

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**TESIS**

**VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION SIMULTANEA DE NICOTINAMIDA, PIRIDOXINA CLORHIDRATO, TIAMINA CLORHIDRATO, RIBOFLAVINA Y D-PANTENOL EN UN JARABE MULTIVITAMINICO**

**PRESENTADO POR:**

Br. KEPLER FUENTES GODOY

Br. PAMELA MENDOZA CACERES

**PARA OPTAR AL TÍTULO  
PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**ASESORA:**

Dra. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ

**CUSCO – PERÚ**

**2025**



# Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

## INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor DRS CARLA DEL CARPIO JIMENEZ  
..... quien aplica el software de detección de similitud al  
trabajo de investigación/tesis titulada: VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS POR  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA LA IDENTIFICACION  
Y CUANTIFICACION SIMULTANEA DE NICOTINAMIDA, PIRIDOXINA CLORHIDRATO,  
TIANINA CLORHIDRATO, RIBOFLAVINA Y D- PANTENOL EN UN JARABE MULTIVITAMINICO

Presentado por: FUENTES GODOY KEPLER DNI N° 47671185 ;

presentado por: MENDOZA CALERES PAMELA DNI N° 47749686

Para optar el título Profesional/Grado Académico de .....  
QUIMICO FARMACÉUTICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 1 veces, mediante el Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de Similitud en la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 7%.

### Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	<input checked="" type="checkbox"/>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	<input type="checkbox"/>
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	<input type="checkbox"/>

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 19 de enero de 2026

Firma

Post firma Carla del Carpio Jimenez

Nro. de DNI 23945000

ORCID del Asesor 0000 - 0001 - 7487 - 354X

#### Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: oid: 27259:546297878

# KEPLER FUENTES GODOY

## VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA ...

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:546297878

297 páginas

Fecha de entrega

14 ene 2026, 7:58 p.m. GMT-5

73.652 palabras

Fecha de descarga

14 ene 2026, 8:18 p.m. GMT-5

386.171 caracteres

Nombre del archivo

VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PA....pdf

Tamaño del archivo

2.1 MB



Carlos del Campo Jimenez

## 7% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

### Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 20 palabras)

### Fuentes principales

- 7%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



Carla del Campo Jarama

## **DEDICATORIA**

Dedico la presente tesis a mis padres Ángel y Nelly, por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificio a lo largo de mi formación académica, a mis hermanos Terry y Daniela por su apoyo incondicional. Gracias por creer en mí incluso en los momentos más difíciles.

Pamela Mendoza Caceres

Dedico la presente tesis a mi familia padres Feliciano y Jenny, y hermanos por su amor incondicional, quienes han sido mi mayor fortaleza y motivación. Gracias por su paciencia, comprensión y palabras de aliento en cada etapa de este camino. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

Kepler Fuentes Godoy

A nuestra asesora, por su valiosa orientación, dedicación y apoyo constante durante el desarrollo de este trabajo. Su conocimiento, paciencia y compromiso fueron fundamentales para la culminación exitosa de esta investigación.

## RESUMEN

El objetivo del trabajo fue validar las dos técnicas analíticas desarrolladas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la identificación y cuantificación de los principios activos: Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato y Riboflavina del mismo modo para D-pantenol en un jarabe multivitamínico, además de desarrollar protocolos de validación para dos técnicas analíticas. Para la validación de las técnicas analíticas de Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato y Riboflavina se empleó el sistema cromatográfico, fase móvil gradiente, longitud de onda 280nm y columna EXTEND SB C18-150 mmx4.5x5  $\mu$ m, y para D-pantenol se empleó el sistema cromatográfico, fase móvil isocrática, longitud de onda 210nm y columna C18-ECLIPSE XDB 150 mm x 4.6 x 5  $\mu$ m. Las técnicas analíticas cumplieron con los parámetros de validación establecidos. Los resultados evidenciaron que el método cumple con aptitud del sistema, platos teóricos mayor a 1000 y una desviación estándar relativa DSR del tiempo de retención menor 1%, selectivo no hay interferencias cromatográficas, linealidad se cumplió la prueba de T ( $T_{exp} > T_{tabla 2.160}$ ), coeficiente de correlación  $\geq 0.999$ , es preciso con el coeficiente de variación (CV) menor a 2.0 %, es exacto por el porcentaje de recuperación de cada activo, Por lo expuesto, se concluye que las técnicas analíticas se validaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la identificación y cuantificación de los principios activos: Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato y Riboflavina y para principio activo de d-pantenol en un jarabe multivitamínico.

**Palabras clave:** Técnica analítica, Cromatografía, Vitaminas, Validación.

## CONTENIDO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>2</b>
<b>GENERALIDADES</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Planteamiento del problema</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Formulación del problema</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2.1. Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3. Limitaciones</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4. Justificación del estudio</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.1. Justificación económica</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.2. Justificación teórica</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4.3. Justificación metodológica</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4.4. Justificación legal</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5. Hipótesis</b> .....	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>6</b>
<b>MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1. Visión histórica</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2. Antecedentes</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.1. Antecedentes internacionales</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2.2. Antecedentes nacionales:</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.3. Antecedentes locales:</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3. Estado de la cuestión</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4. Bases teóricas – científicas</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.1. Método analítico</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.2. Validación</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.2.1. Tipos de validación:</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.3. Validación de métodos analíticos:</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4.4. Etapas en el desarrollo de un método analítico</b> .....	<b>26</b>
<b>la secuencia lógica de un método analítica transcurre en 3 etapas:</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4.5. Parámetros de validación de métodos analíticos</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.6. Datos requeridos para la validación de un método analítico</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5. Análisis instrumental</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5.1. Cromatografía líquida de alta precisión</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6. Propiedades físicas, químicas y farmacológicas de los analitos</b> .....	<b>30</b>

2.6.1. Vitaminas.....	30
2.6.2. Tiamina clorhidrato .....	30
2.6.3. Nicotinamida.....	32
2.6.4. Riboflavina.....	33
2.6.5. Piridoxina clorhidrato: .....	33
2.6.6. D-pantenol.....	34
2.7. Glosario de términos .....	35
2.8. Flujograma del método analítico .....	37
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
3.1. Materiales, instrumentos, equipos y reactivos .....	38
3.1.1. Materales.....	38
3.1.2. Instrumentos y equipos.....	38
3.1.3. Reactivos.....	38
3.2. Diseño metodológico.....	39
3.2.1. Nivel y tipo de investigacion .....	39
3.2.1.1. Tipo de investigación.....	39
3.2.1.2. Nivel de investigación.....	39
3.2.2. Ámbito de estudio.....	39
3.3. Diseño de la investigación .....	39
3.4. Identificación y operacionalización de variables e indicadores .....	40
3.4.1. Variables independientes.....	40
3.4.1.1. Indicadores.....	40
3.4.2. Variable dependiente .....	43
3.5. Operacionalización de variables .....	47
3.6. Diseño experimental .....	48
3.7. Muestra: jarabe multivitamínico, que contiene: cada 5ml.....	49
3.7.1. Fórmula cuali cuantitativa.....	49
3.7.2. Protocolo de la validación de técnica analítica simultánea de nicotinamida, riboflavina, piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato por cromatografía líquida de alta resolución: .....	50
3.7.3. Materiales, reactivos, patrones, equipos y documentos involucrados en el estudio.....	50
3.7.4. Referencia de calibración, calificación de equipos de medición e instrumentos.....	51
3.7.5. Desarrollo del método analítico.....	51
3.7.6. Técnica analítica que se desarrollara .....	52

3.7.7. Técnicas estadísticas empleadas para evaluar el funcionamiento del método y para determinar su uso.....	54
3.7.8. Diseño experimental y criterios de aceptación por parámetros...54	54
3.7.9. Preparacion de solucion de trabajo, parametros de validación ...54	54
3.7.10. Análisis estadístico para utilizar para el procesamiento de resultados.....	94
3.7.11. Protocolo de la validación de técnica analítica de d-pantenol por cromatografía líquida de alta resolución: .....	94
3.7.11.1. Materiales, reactivos, patrones, equipos .....	95
3.7.12. Desarrollo del método analítico.....	96
3.7.13. Técnica analítica desarrollada .....	96
3.7.14. Diseño experimental y criterios de aceptación por parámetros...97	97
3.7.14.1.Preparacion de soluciones de trabajo, parametros de validacion.....	97
selectividad:.....	98
3.7.15. Análisis estadístico que utilizar para el procesamiento de resultados.....	121
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>122</b>
<b>ANALISIS, INTERPRETACION Y DISCUSION DE RESULTADOS .....</b>	<b>122</b>
4.1. Desarrollo de método analítico: .....	122
4.2. Parámetros de validación .....	123
4.2.1. Aptitud del sistema.....	123
4.2.2. Selectividad.....	129
4.2.3. Linealidad.....	148
4.2.4. Exactitud:.....	244
4.3. Rango:.....	256
4.4. Resumen de los resultados de parámetros de validación: .....	257
conclusiones.....	263
sugerencias.....	264
bibliografia .....	265
anexos .....	272

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, todas las industrias farmacéuticas están obligadas a cumplir altos estándares de calidad, esto garantiza que el producto farmacéutico sea seguro, eficaz y que el paciente reciba productos de calidad que cubran la necesidad de la población. **(1)**. En la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) no existe una técnica analítica que determine varias vitaminas en simultáneo. Por ello, se presenta la necesidad de desarrollar y validar una técnica analítica que nos permita cuantificar e identificar los activos de un jarabe multivitamínico.

**(1)**

Se debe considerar que los métodos analíticos que serán usados con fines de identificación, cuantificación, detección y determinación de características de desempeño deben ser validados para cumplir con las normas que dictamina el organismo regulador para industrias farmacéuticas, Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). La entidad, por decreto supremo N°021-2018-SA aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos (BPM). Estas normas se rigen en base a los reglamentos de los textos oficiales como: Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Británica (BP) y el Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) por sus siglas en inglés. **(1)**

La técnica analítica tiene un propósito de medición; se establecen parámetros que son corroborados mediante estudios de laboratorio. **(1)**

Un proceso de validación de técnicas analíticas es esencial, ya que garantiza los resultados obtenidos. Un laboratorio farmacéutico debe validar y verificar sus métodos analíticos con la finalidad de que sean adecuados y puedan emplearse en las actividades para las cuales fue validado. **(2)**

El área de Aseguramiento de la Calidad tiene la responsabilidad de las validaciones, esta área proporciona confianza al asegurar el cumplimiento eficaz de cada una de las actividades. Es por esta razón que en esta investigación se realizó la validación de una técnica analítica para la cuantificación de los componentes de un jarabe multivitamínico. Se desarrolló el método analítico por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), el cual cuantificó e identificó los componentes del jarabe multivitamínico, cumpliendo los parámetros establecidos en la bibliografía especializada.

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cuantificación e identificación en simultaneo de vitaminas hidrosolubles, no se encuentran en normas oficiales, como la Farmacopea Americana de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Británica (BP) y demás normas oficiales permitidas por la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID).

La validación establecida por normativa tiene que ser documentada, lo que nos permite ofrecer al público productos farmacéuticos de calidad y costos accesibles. La Norma Técnica de Salud NTS N.°147-MINSA/2019/DIGEMID indica lo siguiente: “Es de cumplimiento obligatorio por los administradores y titulares de registro sanitario que deben presentar la documentación de la validación de las técnicas analíticas propias en los procedimientos administrativos seguidos ante la DIGEMID”. **(2)(3)**

Además, para lograr una validación adecuada se debe cumplir con normas como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Asegurando de esta manera la calidad, eficacia y seguridad del producto farmacéutico. **(2)**

El laboratorio farmacéutico anteriormente contaba con una técnica propia deficiente, una de estas la reproducibilidad para el activo de Riboflavina, el rápido deterioro de la columna al cuantificar d-pantenol, por la excesiva presencia de sales en la fase móvil, además de que estas se cuantificaban individualmente, lo que conlleva al consumo excesivo de reactivos y mayor tiempo de análisis. La falta de reproducibilidad de la técnica analítica obliga al laboratorio a hacer análisis repetidos, todo esto impacta en la calidad y el costo final del producto farmacéutico. **(2)(3)**

Las deficiencias de vitaminas como el complejo B, clínicamente causaron problemas de función metabólica, neurológica y hematológica, especialmente en pacientes con inadecuada alimentación por esto mismo debemos obtener productos de fácil acceso para todo tipo de economía, productos que ofrezcan seguridad al paciente y eficacia que cumpla el efecto terapéutico.

La Sociedad de Comercio Exterior del Perú (COMEXPERU) en su carta N°85-2023, presenta evidencia que en Perú los precios de medicamentos son

alrededor de 50% más bajos que el promedio del resto de países en la región, Por lo tanto, con precios elevados es imposible competir en el mercado farmacéutico. (38)

## **1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Cumplirán parámetros de validación las dos nuevas técnicas analíticas desarrolladas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación e identificación de los principios activos Nicotinamida, Riboflavina, Tiamina Clorhidrato y Piridoxina Clorhidrato, así mismo para D-pantenol, en un jarabe multivitamínico?

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

1. Validar dos técnicas analíticas desarrolladas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la identificación y cuantificación de los principios activos: Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato y Riboflavina del mismo modo para D-pantenol en un jarabe multivitamínico.

### **1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar protocolos de validación para dos técnicas analíticas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la identificación y cuantificación de los activos nicotinamida, riboflavina, tiamina clorhidrato y piridoxina clorhidrato del mismo modo para D-Pantenol en un jarabe multivitamínico.
2. Identificar y cuantificar los activos tiamina clorhidrato, riboflavina, nicotinamida y piridoxina clorhidrato usando un solo método analítico y otro para d-pantenol.
3. Establecer evidencia documentada que demuestre el desempeño del método analítico de cuantificación, si es factible para la obtención de resultados reproducibles y confiables demostrados estadísticamente.

## **1.3. LIMITACIONES**

- ✓ No se encuentran antecedentes oficiales de técnicas analíticas para la identificación y cuantificación simultánea de tiamina clorhidrato, riboflavina, nicotinamida y piridoxina clorhidrato, así como para d-pantenol.

- ✓ El método puede que no sea aplicable de la misma manera para otros jarabes multivitamínicos, fabricados fuera del laboratorio en el que se realizó el estudio, esto por la diferente formulación cuali-cuantitativa que estas pueden presentar.
- ✓ El desarrollo de una sola técnica analítica para el análisis simultáneo de las 5 vitaminas: tiamina clorhidrato, riboflavina, nicotinamida, piridoxina clorhidrato y d-pantenol en un jarabe multivitamínico.

#### **1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

En la actualidad, la validación de métodos analíticos conforma una parte esencial de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), razón por la que las industrias farmacéuticas están obligadas a realizar estos estudios para garantizar la calidad de los productos farmacéuticos. La creciente aparición de productos poli fármacos, para los cuales no existen métodos analíticos estandarizados en normas oficiales como: Farmacopea Británica (BP), Farmacopea de los Estados Unidos (USP), etc. Por lo que se tiene la necesidad de desarrollar una técnica analítica simultánea para productos poli fármacos y así validar la técnica analítica para su uso; de esta manera se cumple la finalidad de garantizar productos de calidad, productos accesibles a la población de bajo costo, ya que se reduce la inversión en análisis y reactivos cuando se procede a realizar un análisis simultáneo para productos poli fármacos. (2)

##### **1.4.1. JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA**

La economía es un factor indispensable para asegurar el acceso a una adecuada calidad de vida. Por esta razón, por lo que es importante buscar alternativas que permitan disminuir el costo final de los productos farmacéuticos. En ese contexto, la entidad que regula precios de los medicamentos en el Perú, la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (ANM), propone políticas como el Proyecto de Ley 5311/2020-CR: Proyecto de Ley de regulación de precios de medicamentos con estándares internacionales de la “Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos” (OCDE) y de países con economía social de mercado y regulación transitoria sobre servicios de salud privados, donde indican que toda persona tiene derecho

al acceso a servicios de salud, a obtener servicios oportunos y equitativos, medicamentos a precios accesibles y productos sanitarios adecuados y necesarios para prevenir, promover, conservar o restablecer su salud, según lo requiera la salud del usuario. **(5)**

Por lo expuesto, una manera de disminuir costos en la manufactura del producto farmacéutico es desarrollar técnicas analíticas para el análisis de productos poli fármacos como es el caso de jarabes multivitamínicos, donde se reduce el costo de reactivos, el tiempo de analista y el tiempo de uso de equipos.

#### **1.4.2. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA**

Los estudios de técnicas analíticas para productos poli fármacos, como los jarabes multivitamínicos, no se encuentran descritos en normas oficiales como: La Farmacopea Británica (BP), Farmacopea de los Estados Unidos (USP), etc. Es por lo que se tiene la necesidad de desarrollar una técnica analítica simultánea para productos poli fármacos y así validar la técnica analítica para su uso. **(2)**

#### **1.4.3. JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA**

El desarrollo de las técnicas analíticas para la cuantificación simultánea de nicotinamida, tiamina clorhidrato, riboflavina y piridoxina clorhidrato por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), y así mismo para d-pantenol, será de uso común para los laboratorios que tengan el mismo producto farmacéutico; se podrá disponer de la información como antecedente para el estudio de más técnicas analíticas para productos poli fármacos. **(2)**

#### **1.4.4. JUSTIFICACIÓN LEGAL**

Ley N. ° 29459, Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, artículo 11 de la inscripción y reinscripción de registros sanitarios: se deben cumplir requisitos para inscribir un registro sanitario; uno de los requisitos indispensables es tener validada la técnica analítica del producto farmacéutico, es por ello la importancia del estudio de validaciones de técnicas analíticas. **(6)**

NTS N.º 147-MINSA/2019/DIGEMID, norma técnica de salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias, La presente Norma Técnica de Salud es de

cumplimiento obligatorio por los administrados y titulares de registro sanitario que deban presentar la documentación de la validación de las técnicas analíticas propias en los procedimientos administrativos seguidos ante la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID), como Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios (ANM), para obtener la inscripción y la reinscripción, así como para efectuar los cambios en el registro sanitario de productos farmacéuticos. **(7)**

Decreto supremo 021-2018-SA que modifica el reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios y aprueba el manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos, donde exigen contar con validación de técnicas analíticas. **(2)**

### **1.5. HIPÓTESIS**

Las técnicas analíticas desarrolladas para la cuantificación simultánea de nicotinamida, tiamina clorhidrato, riboflavina y piridoxina clorhidrato por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), del mismo modo para D-pantenol en un jarabe multivitamínico, cumplen con los parámetros de validación establecidos según normas oficiales.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

#### 2.1. VISIÓN HISTÓRICA

Entre los años 1966 y 1967, los trabajos de Horvath y Lipstky diseñaron los primeros prototipos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, los cuales fueron concretados en los siguientes 5 años por Hurber, Kirkland, Majors, Snayder, Unger y Karger, estos eran la primera generación de equipos HPLC modernos. La segunda generación, entre 1973 y 1980, tuvo un desarrollo de la instrumentación acelerado; surgieron equipos compactos rellenos de partículas de 10 µm de diámetro. Esta generación hizo al HPLC más fiable, asequible y comprensible. El tercer periodo instrumental comenzó en 1984, donde surgieron nuevos rellenos columnares dominados octadecilsilano (C18). Por último, la cuarta generación incorporó ordenadores para cada equipo que permiten control integral de todos los parámetros, capacidad de almacenar cromatogramas, reprocesar, realizar cálculos y sistematizar procesos de validación. **(8)**

La cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión desde los años 70 hasta la actualidad, hoy en día es considerada una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico, abarcando la mayor parte de las ramas de estudio. **(8)**

El descubrimiento, denominación, síntesis y actividad de las diferentes vitaminas es un tema de gran aporte en la medicina que permitió explicar y encontrar tratamiento para enfermedades cuya causa son la deficiencia de vitaminas. La palabra, ideada por el bioquímico Casimir Funk, está integrada por “vita” vida y “amina” sustancia que contiene amoníaco. Entre 1912 y 1940 se descubrieron todas las vitaminas que conocemos hoy y se lograron sintetizar artificialmente para administración a seres humanos. **(9)**

Elmer Mc Collum descubrió la vitamina B y lo denominó factor hidrosoluble B, a diferencia del factor A, que es soluble en lípidos. La primera vitamina B, fue aislada en forma pura por el Bioquímico Holandés Barend Coenrad Petrus Jansen (1884–1962) y su colega W.F. Donath, en 1925, a la que denominaron tiamina. **(9)**

## 2.2. ANTECEDENTES

### 2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- ✓ **Navales D; García N; Saint E; Llauro V; Rodríguez Y. “Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para identificación y cuantificación de ácido valproico en soluciones orales”. Instituto Nacional de Medicamentos, Buenos Aires. Octubre 2024. Argentina**

El ácido valproico (AV) es uno de los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la epilepsia, uno de los desórdenes neurológicos más prevalentes, en adultos y niños. Es catalogado como principio activo de estrecho rango terapéutico, lo cual implica que su uso eficaz y seguro requiere cuidadosa dosificación y monitoreo del paciente. Los principales efectos adversos severos incluyen hepatotoxicidad y pancreatitis que pueden ser fatales, siendo especialmente susceptibles los niños menores de dos años y los adultos mayores. Actualmente, el ensayo de cuantificación de AV en solución oral codificado en la Farmacopea Nacional Argentina (FNA) se realiza mediante cromatografía gaseosa (CG), la cual implica mayor complejidad en la preparación de la muestra y resulta menos accesible que la cromatografía líquida. El objetivo del presente trabajo consistió en validar una metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) para la identificación y cuantificación de ácido valproico en solución. Una vez validada la técnica, se llevó a cabo el análisis de todos los productos comercializados en Argentina, y se evaluaron las técnicas de control de calidad utilizadas por los laboratorios elaboradores. Las muestras analizadas resultaron dentro de especificación, mientras que a partir de la evaluación de la documentación surgieron acciones correctivas que fueron indicadas a los laboratorios. Esta técnica permite realizar un análisis rápido, sencillo y más aplicable, que podría establecerse como norma de control en la FNA. **(10)**

- ✓ **Verónica Hernandis Belenguer. “Validación de métodos analíticos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de cefuroxima, delafloxacino y tilvalosina en muestras biológicas”. Universidad de Murcia Escuela Internacional de Doctorado. 2022, España.**

El uso de antibióticos indiscriminado generó un problema de salud; el sector salud restringió el uso de este sin receta médica, pero los esfuerzos no están logrando el objetivo planteado. Los estudios farmacocinéticos son una herramienta importantísima ya que cumplen el análisis, un rol de gran importancia al evaluar las concentraciones de medicamentos en sangre constituyen una herramienta muy valiosa a la hora de evaluar la concentración de fármaco en el organismo y establecer posologías adecuadas que aseguren el éxito clínico y minimicen el riesgo de aparición de resistencias bacterianas. Para seguir una serie de estudios en muestras biológicas, desarrollar un método analítico y validar dicho método de esta manera cuantificar las concentraciones del fármaco Los métodos analíticos más usados en los estudios farmacocinéticos para la cuantificación del fármaco son los métodos cromatográficos. En este estudio el objetivo es validar tres métodos analíticos, para: delafloxacino, cefuroxima y tilvalosina donde se obtendrá la concentración exacta del fármaco en diferentes matrices biológicas y de este modo utilizarlos para realizar los estudios farmacocinéticos pertinentes. En dicho trabajo se realizó una investigación experimental con la finalidad de optimizar el proceso, trabajar el estudio de estabilidad, procesar muestras, determinar análisis, recopilar resultados e interpretar y elaborar documentación de los resultados obtenidos. El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de la cefuroxima se realizó en plasma humano mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)/ ultravioleta (UV). La extracción se realizó mediante precipitación de proteínas con metanol/TFA (ácido trifluoroacético). Los resultados obtenidos en los parámetros de validación fueron satisfactorios obteniendo una elevada recuperación (93.52 %), alta selectividad y especificidad, con un valor en el error de la exactitud por debajo del 10 %. De igual forma, para el cálculo de la precisión se obtuvo un valor < 10 % en el coeficiente de variación. Los límites de detección y cuantificación se

establecieron en 0.1 y 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Por lo que el método analítico propuesto es óptimo para estudios clínicos, análisis de rutina y estudios farmacocinéticos. El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de delafloxacino se realizó en plasma humano mediante (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) HPLC/ detector fluorescente (FL). El proceso de extracción consistió en una extracción líquido-líquido con ácido fórmico al 50% y acetato de etilo. También se evaluó la estabilidad de dicho antibiótico en diferentes matrices y a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos en los parámetros de validación fueron satisfactorios obteniendo una elevada recuperación (98.3 %), alta selectividad y especificidad, un límite de detección de 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y un límite de cuantificación de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los valores obtenidos en la precisión, expresados como coeficiente de variación, fueron  $< 11\%$ . De igual forma, los valores obtenidos para el error en la exactitud fueron  $< 11\%$ . Los resultados de los estudios de estabilidad mostraron no fueron favorables tanto en las muestras de plasma como en las disoluciones madre a partir de los quince días de almacenamiento a  $-40^{\circ}\text{C}$ . De ahí que se propongan nuevos estudios con el fin de asegurar la estabilidad del delafloxacino en diferentes condiciones de almacenamiento. El desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de la tilvalosina se realizó en plasma de cerdo mediante HPLC/UV. La extracción se realizó mediante precipitación de proteínas con una solución al 0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. También se evaluó la estabilidad de dicho antibiótico en diferentes matrices y a diferentes temperaturas. Los resultados de los parámetros de validación fueron excelentes, obteniendo un rango en el valor de recuperación entre 89.66-96.92 %. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Con lo que respecta a los valores obtenidos para la precisión y el error en la exactitud, éstos fueron  $< 13.0\%$  en ambos parámetros. Hay que destacar la buena selectividad y especificidad del método analítico. Finalmente, los resultados en los estudios de estabilidad a  $-40^{\circ}\text{C}$  fueron satisfactorios demostrando la estabilidad a corto y largo plazo. Por lo que se puede concluir que este método puede ser aplicado en estudios clínicos, monitorización de niveles eficaces y estudios farmacocinético. **(11)**

- ✓ **Dávila C; Santillán R; Pazmiño C. “Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina y ácido ascórbico) en un jarabe, en la empresa Neofármaco Cía. Ltda. laboratorio Neofármaco”. Avda Atahualpa y Noboa y Caamaño, Ambato. Julio 2021. Ecuador.**

Según Dávila C; Santillán R; Pazmiño C. presentaron el trabajo con el objetivo de describir el desarrollo y validación del método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector ultravioleta visible (UV-VIS), empleando una técnica de par iónico conjugado y una fase reversa. Para ello, se llevó a cabo una investigación experimental con el que obtuvieron resultados de cuantificación de las vitaminas piridoxina, nicotinamida, riboflavina, ácido ascórbico y tiamina del jarabe multivitamínico.

El análisis se realizó utilizando una columna LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4.6mm, 5 µm), la detección UV se hizo con gradiente de 0.0 a 6.0 min a 267 nm, 6.1 a 12.0 min a 290 nm, 12.1 a 18 min a 248 nm, y de 18.1 a 24 min a 340 nm. En cuanto a la fase móvil se trabajó con PH de par iónico conjugado 7 pH 2,0 metanol y acetonitrilo se usó un gradiente de: 0 a 16 min (80:17,5:2,5), 16 a 21 min (17,5:80:2,5), y 21 a 24 min (80:17,5:2,5). En cuanto al flujo se trabajó con 1 mL/min a 35 °C. Se conoce que trabajaron con un volumen de inyección de la muestra de 10 µL. Posterior al diseño del método se trabajó en la validación, el estudio se evaluó con los parámetros establecidos según bibliografía de textos estandarizados de validación de métodos analíticos de la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI), es así como se determina que el método cumple: selectividad con un porcentaje de discrepancia < al 3,5 %, linealidad ( $r > 0,998$ ), precisión ( $RSD < 1,8247$ ), exactitud (recuperación del: 98,4 % para tiamina, 97,3 % para ácido ascórbico, 97,9 % para nicotinamida, 99,9 % para riboflavina, y 99,0 % para piridoxina), el método es idóneo y robusto. Teniendo estos resultados, se concluye que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida, este método se puede usar para el control de rutina en el laboratorio. **(12)**

- ✓ **Bautista Mamani Franz Freddy. “Validación del método analítico para la cuantificación de vitaminas (tiamina B1, piridoxina B6, nicotinamida y riboflavina B2) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en suero Vitadex B – solución de gran volumen”. Universidad Mayor de San Andrés Facultad de Tecnología Química Industrial. 2019. La Paz Bolivia.**  
Esta investigación se realizó con el objetivo de validar la metodología analítica con la que se desea trabajar en el laboratorio Vita S.A. se desea cuantificar las Vitaminas por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en suero Vitadex B – Solución de gran volumen. El estudio es de tipo experimental tiene el propósito de validar el método analítico que ya se encontraba desarrollado en el laboratorio Vita S.A. y determinar que la metodología sea exacta y precisa verificando parámetros establecidos de precisión, selectividad, exactitud y linealidad. Esta validación otorgará una metodología automatizada que permita analizar más rápido y eficiente la separación, cuantificación y detección de los principios activos. El estudio se trabajó con las siguientes condiciones cromatográficas: HPLC (Shimadzu), columna Kinetex Evo C18 100 A 150 x 4,6 mm de 5 µm (Phenomenex), fase móvil metanol y acetato de sodio 0,1 M pH 5,4 (20:80), flujo 1 mL/min, 20 µL de volumen de inyección y longitud de onda de 280 nm. Se determina que la metodología analítica cumple con los parámetros según las normas establecidos, aptitud del sistema, linealidad, selectividad, precisión, exactitud para la cuantificación de los principios activos de riboflavina, piridoxina, nicotinamida y tiamina. El estudio se realizó en las instalaciones de Laboratorios Vita S.A. Así como los equipos e instrumentos calificados, estándares de referencia, reactivos de alta pureza grados Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y muestra del mismo lote de fabricación es parte del laboratorio Vita SA. El método analítico es efectivo y reproducible, cumple con parámetros establecidos según las normas, para su uso del método, además puede ser usado por otras instalaciones siempre y cuando tenga mismas condiciones del laboratorio Vita SA y los mismos principios activos, logrando resultados confiables y satisfactorios. **(13)**

## 2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES:

- ✓ **Rojas Castillo M. “Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para evaluar perfiles de disolución de losartán potásico 50mg tabletas”. Universidad Nacional de Trujillo Facultad de Farmacia y Bioquímica. Septiembre 2024. Trujillo- Perú.**

La evaluación de perfiles de disolución es esencial para asegurar la calidad y eficacia de los medicamentos. Este trabajo presenta el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para evaluar perfiles de disolución de Losartán Potásico 50mg tabletas, basado en las técnicas establecidas por la FDA. Se trabajó con tabletas de Losartán Potásico 50mg procedentes del medicamento COZAAR, utilizando una columna cromatográfica de 15cm x 4,6mm, 5µm, con relleno L1; la fase móvil consistió en acetonitrilo y ácido fosfórico al 0,1% en agua ultrapura (40:60), con un flujo de 1,5mL/min, volumen de inyección de 20µL, temperatura de 35°C y detección a 254nm; obteniéndose como resultado un tiempo de retención de 4,1 minutos para el analito en los tres medios de disolución y los porcentajes de interferencias fueron (14)

- ✓ **Grimaldo Medina, Elisabeth Lourdes y Maravi Armas, Jessica “Desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación de fexofenadina 30mg/5ml suspensión oral por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).” Universidad Privada Norbert Wiener. 2021. Lima-Perú.**

Los Método Analítico que son utilizados en la actualidad para el análisis de un Producto Terminado debe sostener la calidad y la confiabilidad. Para lo cual se debe garantizar el proceso de validación cumpliendo las exigencias las normas vigentes. El objetivo principal de esta tesis es demostrar que el método analítico desarrollado para la cuantificación de Fexofenadina 30mg/5mL suspensión oral por Cromatografía Líquida de Alta Resolución cumpla con los parámetros establecidos. Método de investigación analítico cuantitativo, investigación de tipo aplicativo diseño de investigación longitudinal y prospectivo. Resultados en el parámetro de aptitud del sistema con 5 inyecciones repetidas debe dar un DSR  $\leq$  2% obteniendo 0,70%. Para el parámetro de Selectividad el promedio total debe estar entre 98% - 102%,

obteniendo 99,90%. Estabilidad los resultados a las 0,24 y 48 horas el RSD debe ser <3% obteniendo 0,26% y la diferencia absoluta debe estar en <2% obteniendo (24 h):0,18% y (48 h): 0,53%. Parámetro de exactitud el porcentaje de muestras al 80%, 100% y 120% debe estar entre 98% - 102% obteniendo un resultado de 100,0% y el Coeficiente de Variación debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,52%. Parámetro de Linealidad del Sistema y Método el Coeficiente de correlación (r) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de 0,998 y 0,999 además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de 0,60% y 0,79%. El parámetro de Repetibilidad Instrumental de RSD de los tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,05%. El parámetro de repetibilidad del método el RSD de 6 muestras debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%. Parámetro de precisión Intermedia el RSD global debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%. Parámetro de robustez se evaluó los diferentes cambios como la marca de reactivo, volumen de inyección, temperatura, flujo y columna cromatografía **Conclusión:** El método analítico para la cuantificación de Fexofenadina 30mg/5 mL suspensión oral realizado mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cumple con los resultados estadísticos requeridos para una validación demostrando la confiabilidad. **(15)**

- ✓ **Quispe Escalante R. “Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1% gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)”. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Facultad Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2023. Ayacucho- Perú.**

El reglamento de la Ley de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios de Perú establece que, si una técnica analítica no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, se deben presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias. El objetivo de la investigación es validar el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). La muestra de diclofenaco al 1% gel fue obtenida según el plan de muestreo con un nivel de inspección S-4. Se evaluó la aptitud del sistema, especificidad,

exactitud, precisión, linealidad y robustez. Se calculó el área, tiempo de retención, resolución y se comparó con los criterios de especificación para determinar la conformidad de cada prueba. Se evidenció que la prueba de adecuabilidad es conforme con un área de 47977778,6 y tiempo de retención de 10,493 minutos ( $CV \leq 2\%$ ). La especificidad es conforme porcentajes de recuperación de 100,25 y 100,68% y con una resolución de 15,14 min. La precisión es conforme, tanto para la precisión del sistema y del método. El método analítico cumple con la característica de desempeño analítico de linealidad del sistema y del método. La robustez es conforme, tanto para la prueba de estabilidad de 24 horas y de cambio de volumen de inyección. Se concluye que el método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con las características de desempeño analítico por lo que el método es confiable y válido. **(16)**

- ✓ **Bermudo Huaraca, J. “Validación de técnica analítica por espectrofotometría UV-Visible para la determinación cuantitativa de glutaraldehído al 2% como dispositivo médico”. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Facultad Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2023. Ayacucho- Perú.**

La validación de la técnica analítica es parte del sistema de control de calidad puesto que confiere la seguridad de los resultados obtenidos en el laboratorio de análisis, que es un requisito necesario por parte de las Buenas Prácticas de Manufactura, considerando las exigencias de la organización mundial de la salud (OMS) y la dirección general de medicamentos insumos y drogas (DIGEMID). El objetivo es validar la técnica por espectrofotometría UV-Visible para la determinación cuantitativa de glutaraldehído al 2 % como dispositivo médico, para desarrollar los parámetros de validación de la técnica analítica como: linealidad (linealidad de sistema y linealidad de método), exactitud, precisión (precisión intermedia y repetibilidad), selectividad y robustez, con la confiabilidad y seguridad. El estudio es tipo descriptivo que se realizó en el área de control de calidad del Laboratorio Roker Perú S.A. Lima durante los meses de julio - diciembre del 2019, se aplicó el método de espectrofotometría UV-Visible. Los resultados de los parámetros fueron : En linealidad de sistema y linealidad de método el coeficiente de determinación fue 0,9998 en precisión

intermedia y repetibilidad el coeficiente de variación es 0,1946 %; en el segundo analista de precisión intermedia es 0,1379 la prueba de  $f_{exp} (0,1641) < f_{tablas}(2,2719)$  esto fue en ambos analistas de la precisión intermedia en la que no existe variabilidad significativa; en exactitud la prueba de test de Cochran  $G_{exp} (0,2216) < G_{tabla}(0,879)$  la variabilidad observada son iguales para cada concentración, para el mismo parámetro se realizó la prueba t  $t_{exp} (0,5388) < t_{tabla} (2,306)$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media (promedio) y el 100 %, para la robustez se realizó las variaciones en cada caso, los cuales cuentan con valores alternativos y nominales para su identificación y determinación del Glutaraldehído, según el cálculo Youden y Steiner el resultado es 0.0058 quien afirma que nuestra prueba es robusta para este método analítico los cambios en cuanto al tipo de equipo y al tiempo de la preparación de la muestra no interfirieron en la concentración para la selectividad las muestras sometidas a diferentes tipos de estrés glutaraldehído son sometidos a estrés la recuperación es el 100 %, hidrólisis alcalina el principio activo más el excipiente 76,3 % ; para la hidrólisis ácida para principio activo más el excipiente 100 %, termólisis principio activo más excipiente 100 % y para oxidación el porcentaje de recuperación es 99,7 % evaluando la especificidad a través de la pureza, donde se determinó que no se presentan impurezas las muestras son. En conclusión, el método analítico se llega a validar porque cumple con las especificaciones determinadas por la farmacopea de los estados unidos (USP 42) por lo tanto el método queda validado. (17)

- ✓ **Camones Vargas, FA. Vidal Sánchez, KP. “Validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5ml en jarabe”. Universidad María Auxiliadora Facultad Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Lima- Perú. 2021.**

Objetivo: Validar la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de Ambroxol Clorhidrato 7,5mg + Clenbuterol clorhidrato 0.005mg/5ml en jarabe.

Materiales y métodos: Consistió en la identificación, cuantificación y

separación de los principios activos en el sistema cromatográfico y se evaluó los parámetros de desempeño: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, robustez y rango.

Resultados: La técnica analítica es específica, puesto que no presenta interferencia con ningún compuesto de degradación del principio activo o algún excipiente. Es lineal, muestra proporcionalidad con la concentración del analito, donde el coeficiente de correlación ( $r$ ) para el sistema y el método fueron  $r \geq 0.995$  que es su valor aceptable. Es exacta, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 100.1% en ambroxol y 100.5% en clenbuterol. Es precisa, con un coeficiente de variación (CV) para repetibilidad en ambroxol del 0.16% y en clenbuterol 0.41%, para precisión intermedia entre diferentes analistas, se obtuvo 0.23 y 1% en ambroxol y clenbuterol respectivamente y entre diferentes equipos 0.48% y 1.08% en ambroxol y clenbuterol respectivamente, el  $CV \leq 2.0\%$ . El límite de detección 1.9052ppm y 0.001949ppm en ambroxol y clenbuterol respectivamente. El límite de cuantificación fue 2.3003ppm en ambroxol y 0.004971ppm en clenbuterol. Es robusto, el producto terminado no evidencia alteración. El rango obtenido oscila entre 80%-120%.

Conclusión: La técnica analítica validada cumplió con las exigencias establecidas de la USP vigente y se encuentra aptos para su respectiva utilización. **(18)**

- ✓ **Purilla de la Cruz A. “Validación de método analítico de valoración de bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)”. Universidad Nacional San Luis Gonzaga”. 2024. Ica Perú.**

La validación de métodos analíticos forma parte integral del sistema de control de calidad, siendo un proceso crítico en las industrias farmacéutica, garantizar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos. En este trabajo presentamos la validación de un método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance establecido en la USP 2023. Entre los parámetros estadísticos usados en la presente validación se encuentran: La linealidad; se producen resultados proporcionales a la concentración del analito, queda

demostrado por un coeficiente de correlación de  $r = 0.999$ , (valor mínimo permisible = 0.997). La exactitud mide la cercanía de los resultados conseguidos por esta metodología y el valor real. Empleando el test de student para demostrar la exactitud del método analítico se obtuvo un  $t_{exp}$  (-0.097) que es menor al  $t$  de las tablas (2.306); por lo tanto, no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación del analito es muy cercano al 100%. La precisión del método analítico indica grado de concordancia o dispersión de resultados de la prueba. Los valores de RSD obtenidos, (0.65% para repetibilidad y 0.93% para precisión intermedia), demuestran la precisión del método analítico (valor máximo permitido, RSD = 2.0%). El método es específico, como tampoco se detectó presencia de productos de degradación del Bisoprolol fumarato al someter al principio activo a diferentes procedimientos de degradación forzada, por lo tanto, el método es selectivo.

(19)

### 2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES:

- ✓ **Alma Zuri Ríos Zúñiga. “Desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía de Capa Fina para la Identificación y Cuantificación de naproxeno sódico en tabletas expandidas en el Perú”. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2018.**

El autor de la tesis indica que este estudio se trabajó en colaboración con el Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud, Lima. con el objetivo de desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de capa fina (CCF) para la identificación y cuantificación de naproxeno sódico en tabletas expandidas en el Perú. El estudio tiene nivel de investigación cuasi experimental prospectivo, en este estudio se evaluó los parámetros de especificidad, linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud siguiendo normas internacionales de la Farmacopea Americana (USP 41). Se concluye que el método es idóneo, es robusto, práctico y no afecta, dentro de 24 horas de realización del ensayo, la estabilidad del analito. Se validó el método analítico por cromatografía de capa fina para la identificación y cuantificación de naproxeno sódico en tabletas en las

presentaciones de 275mg y 550mg. El método cumple con los parámetros de especificidad, precisión, el método es lineal en el rango de 0.08ug. mancha-1 a 0.24ug. mancha-1, tiene un límite de cuantificación 0.96ug. mancha-1, un límite de detección 0.32ug. Mancha - 1. El método no cumple con los criterios para precisión intermedia establecidos, que no desmerecen la utilidad del método con fines semicuantitativos. De esta manera de acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es confiable garantizando la calidad del producto del mismo modo este puede ser empleado a nivel nacional como parte del Programa de Pruebas Rápidas de Control de Calidad. (20)

- ✓ **Luz Stephanie Peñafiel Camacho. “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de amoxicilina-ácido clavulánico en polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia.” Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2017.**

Según esta tesis indican que la asociación de amoxicilina y el ácido clavulánico en la proporción de 4 a 1, respectivamente fortalece la acción bactericida del antibiótico del mismo modo amplía su espectro de acción a gérmenes Gram positivos y Gram negativos incluyendo aquellos que por formación de betalactamasas se han hecho resistentes a la amoxicilina sola. Esta tesis reporta el desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC) para cuantificar simultáneamente la amoxicilina y ácido clavulánico en un producto farmacéutico en polvo para suspensión oral. El nivel de investigación es descriptivo y diseño prospectivo transversal. La metodología permitió mejorar el tiempo de análisis en un 64.3% en comparación con el método HPLC, para preparar las muestras se usa agua ultrapura como disolvente de esta manera se realizó la separación cromatográfica utilizando una columna de fase reversa C18 Kinetex (50 mm x 4.6 mm D.I., 2,5 µm) y una fase móvil isocrática compuesta por una mezcla filtrada y desgasificada de Buffer formiato de Amonio pH 4,4: Metanol HPLC (950: 50 v/v). Para la detección se utilizó un detector DAD 220 nm, la velocidad de flujo de 0,6 mL /min y el volumen de inyección con 1,7 µL. El método analítico se validó de acuerdo con las normas

emitidas por la Autoridad Nacional de Medicamentos (DIGEMID), para validar la norma categoriza los parámetros, en este caso se trabaja con categoría I los siguientes parámetros de desempeño analítico: Exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo. A los resultados obtenidos se somete a evaluación estadística de esta manera se verifica que la técnica analítica propuesta para la cuantificación de los principios activos es selectiva, lineal ( $r > 0,999$  y  $r^2 > 0,998$ ), exacta (entre 98%- 102 % de recuperación) y precisa (C.V.  $< 2\%$ ) de esta manera se evidencia el cumplimiento los parámetros de validación establecidos; por lo cual la técnica validada es confiable y puede ser empleada en los análisis de rutina. (37)

- ✓ **Bach. Alberto Palomino Huarhua Bach. Roxana Quispe Huahuaccapa. “Diseño y desarrollo de una formulación de tabletas recubiertas de naproxeno sódico 275 mg + paracetamol 300 mg y su evaluación fisicoquímica mediante una metodología analítica”. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2016.**

El trabajo de investigación tiene como objetivo diseñar y desarrollar una formulación de naproxeno sódico 275 mg + paracetamol 300 mg tabletas recubiertas. Para lo que se trabajó inicialmente una etapa de pre-formulación, con la finalidad de establecer una fórmula cualitativa y cuantitativa con su respectivo proceso de fabricación, en esta etapa inicial se evaluó características reológicas de los principios activos, evidenciando de los principios activos mala fluidez, en el estudio se sometió a los principios activos a condiciones extremas como: hidrólisis, termólisis, oxidación y fotólisis, teniendo como resultado favorable de que estos activos no presentan alteraciones esto se evidencia por el porcentaje de degradación es menor de 2 %, además se sometió al estudio de compatibilidad por mezclas binarias entre los principios activos y los posibles excipientes a ser usados, a condiciones normales como grupo control y a condiciones extremas de temperatura y humedad ( $30\text{ }^{\circ}\text{C} / 40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $65\% / 75\% \pm 5\%$ ), se obtiene un resultado en un intervalo de 98.00 % a 102.00 % concluyendo compatibilidad entre todo sus componentes. a partir de tres ensayos fabricados por método de granulación, se eligió el ensayo c con resultados de dosaje para (paracetamol 300.82 mg/tab. y naproxeno sódico 275.78 mg/tab.)

y de disolución (paracetamol 102 % y naproxeno sódico 101 %). posterior a la elección del ensayo c se trabaja tres pilotos con esta formulación, para un ensayo de estabilidad acelerada (Temperatura  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm \text{ }^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa  $75\% \pm 5\%$ ), el piloto I, es sometido a pruebas de disolución y contenido, en tiempo cero, 3 meses y 6 meses, dando resultados de la disolución para paracetamol en tiempo cero 102 %, 3 meses 99% y 6 mese 97% de igual modo resultados para naproxeno tiempo cero 101 %, 3 meses 99 % y 6 mese 98 %. En cuanto a la determinación cuantitativa 101.23 %, 99.70 % y 99.68 % para el paracetamol y 101.31 %, 100.87 % y 99.82 % para naproxeno sódico y para febrax 101.36 %, 100.92 % y 100.21 % para el paracetamol y 100.76 %, 100.50 % y 100.02 % para naproxeno sódico respectivamente, al finalizar se somete a un análisis estadístico por el método de ANOVA y se encontró que para todas las pruebas realizadas presenta una sig. mayor a 0.05 lo cual indica que no hay diferencia significativa entre los pilotos lo cual se corrobora con el test de Tukey. Se desarrolló una metodología analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar los principios activos, naproxeno sódico y paracetamol en tabletas recubiertas, mediante un solo sistema cromatográfico (fase móvil, columna cromatográfica, longitud de onda). El método de RP-HPLC con columna eclipse C8 (150 x 4.6 mm 5 micras), fase móvil óptima que consiste en un buffer fosfato pH 7,0 y acetonitrilo, con una elución en gradiente, con el caudal del efluente de 1,5 mL / min, y detección UV de longitud de onda 240 nm. Linealidad del sistema, resultando  $r^2$  0.9998 y  $r^2$  0.9993) para naproxeno sódico y paracetamol respectivamente, La selectividad del sistema demuestra que no existe ninguna interferencia, la precisión del sistema y los parámetros de estabilidad del sistema demuestra la reproductibilidad de la metodología analítica. **(21)**

### 2.3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

La norma ISO/IEC 17025 (organización internacional de normalización ISO y comisión electrotécnica internacional IEC) versión 2017, es el referente global para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, principalmente enfatiza la gestión de riesgos y oportunidades, promoviendo la imparcialidad, confidencialidad y mejora continua, siendo así requisito clave para la acreditación internacional. Su uso no es obligatorio, pero es indispensable para la credibilidad y el acceso a mercados, genera resultados técnicamente válidos y cumple con principios de gestión como los de la ISO 9001, siendo adoptada por miles de laboratorios en sectores tan diversos como farmacéutico, alimentario y ambiental. **(29)**

Según la ley N°: 29459, artículo 5, ley de productos farmacéuticos dispositivos médicos y productos sanitarios ordena que la autoridad nacional de salud, responsable de determinar políticas, normas que intervengan en los productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios, se atribuye las siguientes funciones de regular, normar, ejecutar, controlar, evaluar, supervisar, auditar, vigilar, certificar y acreditar según su ámbito lo permita según ley mencionada. **(2)**

La autoridad nacional de salud coordina y convoca con entidades privadas y públicas para el cumplimiento de la ley mencionada según sistemas de control con soporte en estándares internacionales. Por lo antes mencionado se aprueba el manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos N° 021-2018-SA, mediante la resolución ministerial N° 055-99 SA/DM. Según reglamento de establecimientos farmacéuticos N° 014-2011-SA, artículo 91 contempla que los laboratorios de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios deben ajustarse a las exigencias establecidas en BPM, BPL, BPA Y BPDYT. Por lo expuesto en el manual de buenas prácticas de manufactura en la sección VI página 52 al 59 nos otorgan lineamientos que debemos seguir en el proceso de validaciones. **(2)**

Así mismo según la norma técnica NTS N.° 147– MINSA/2019/DIGEMID norma técnica de salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias, esta norma es de cumplimiento obligatorio por los titulares de registro sanitarios, que deben

presentar documentos de la validación de técnicas analíticas propias en los procedimientos administrativos ante la DIGEMID para obtener la inscripción, reinscripción y cambios en el registro sanitario de los productos farmacéuticos. (NTS). **(7)**

La DIGEMID, es el ente regulador encargado de fiscalizar a todas las industrias farmacéuticas en Perú, el trabajo lo realiza a través de pesquisas de productos farmacéuticos de los diferentes laboratorios, esto en coordinación con el Instituto Nacional de Salud – control de calidad, encargado de verificar la calidad del producto farmacéutico pesquisado, además verifica conformidad de las técnicas analíticas de cada producto proporcionado por los laboratorios. **(2)** Por todo lo expuesto actualmente los laboratorios farmacéuticos en el Perú, implementaron áreas de investigación y desarrollo y área de validaciones las dos áreas trabajan en coordinación para cumplir la normativa expuesta.

A nivel regional no existen empresas dedicadas a la fabricación de productos farmacéuticos, más sin embargo hay empresas en crecimiento dedicados a la fabricación de galénicos según lista de la RD\_027-2020-DIGEMID-DG-MINSA. Sobre todo, dedicándose a la fabricación de alcohol medicinal al 70°. **(41)**

Como tal estas empresas no están obligadas a realizar validación de técnicas analíticas según el decreto supremo Decreto Supremo N.º016-2011-SA, por lo tanto, no hay la necesidad del desarrollo de dichas áreas para el proceso de validación de técnicas analíticas. **(42)**

Es importante mencionar que, aunque no exista fabricación de productos farmacéuticos en Cusco, existen centros de investigación, incluso las investigaciones que se realizan en las tesis de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica que estudiantes y docentes, realizan investigaciones farmacológicas, incluyendo estudios de productos naturales y sintéticos, así como el desarrollo de nutracéuticos. Este trabajo en cooperación docentes y estudiantes contribuye a la investigación y el desarrollo en la región, aunque no se traduce en producción industrial.

## 2.4. BASES TEÓRICAS – CIENTÍFICAS

### 2.4.1. MÉTODO ANALÍTICO

Según la Farmacopea de Los Estados Unidos de América, se describe como la explicación consecutiva de actividades, procesos, recursos, materiales y parámetros establecidos bajo normas, las cuales se deben de cumplir tal como lo indica para el análisis de un componente específico de la muestra. El proceso de medición debe emitir resultados confiables seguros y eficaces. La validación de métodos analíticos se conceptualiza como el proceso que determina mediante análisis de laboratorio la capacidad del método. **(24)**

### 2.4.2. VALIDACIÓN

**CONCEPTO:** Según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) el proceso de validación determina por medio de estudios de laboratorio el cumplimiento de los parámetros de desempeño, y estas son aplicadas en el análisis de los productos para fines previstas. **(24)**

Según la FDA en el proceso de validación se establecen pruebas físicas y documentadas que dan seguridad y eficacia al proceso específico que cumplen atributos de calidad. **(25)**

El proceso, actividad, equipo, material y sistema se evidencia mediante documentos con resultados pronosticados. **(26)**

Según manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos la validación es la actividad, proceso, equipo, material o sistema que se evidencia en documentos físicos con resultados pronosticados. **(27)**

#### 2.4.2.1. TIPOS DE VALIDACIÓN:

- ✓ **Validación prospectiva:** Validación llevada en la etapa de desarrollo sobre la base de un riesgo, se realiza el análisis en el proceso de producción la cual se separa en etapas que serán evaluados y comparados con la bibliografía es así como se determina si se trata de un proceso factible.

Este tipo de validación se trabaja durante el proceso de desarrollo ósea antes de implementar, se trabaja durante la fabricación de productos nuevos, implementación de equipos cambios de sistemas de apoyo crítico y cuando se implemente algún cambio que afecte los atributos críticos de calidad.

Se tiene preferencia por este tipo de validación ya que determina el éxito del proceso antes de implementar, además permite controlar los atributos críticos de calidad del proceso. **(28)**

- ✓ **Validación concurrente:** Este tipo de validación se realiza durante el proceso de manufactura de un producto que se va a comercializar. **(28)**
- ✓ **Validación retrospectiva:** Se trabaja con la documentación de los procesos de manufactura siempre y cuando no haya existido modificación en el procedimiento de manufactura, formula cualitativa y cuantitativa, equipos. **(28)**

#### **2.4.3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS:**

Según la norma es deber de los laboratorios validar todos los métodos no normalizados. Si se cuenta con métodos normalizados estos deben ser verificado por el laboratorio, de esta manera se determina la idoneidad del método para el análisis previsto. El proceso de validación se trabaja vastamente para lograr satisfacer necesidades del laboratorio. **(29)**

##### **IMPORTANCIA**

- ✓ Los métodos deben ser idóneos para el fin previsto del laboratorio, el método debe brindar seguridad y confianza, además deben ser claros y precisos para evitar fallos y repeticiones en el proceso de análisis y así evitar costos sobrevalorados por cada análisis de producto.
- ✓ Se demuestra que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, ya que la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto. **(24)**

#### **2.4.3.1. INICIO DE UNA VALIDACIÓN**

Antes de iniciar un proceso de validación se desarrolla un método analítico así mismo el uso de instrumentación y metodología analítica se trabaja con antecedentes en base al objetivo que se desea lograr. En el desarrollo de la metodología analítica se evalúa los parámetros con los parámetros: Especificidad, Linealidad, Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC), Exactitud y Precisión. En un proceso inicial del desarrollo de la metodología analítica se prioriza evaluar la robustez del método de análisis con este resultado se define la metodología que mejor convenga para lo previsto. **(30)**

### **2.4.3.2. PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN**

Toda las actividades planificadas y organizadas sistemáticamente que involucran al laboratorio, en el que se detalla equipos, métodos analíticos sistemas y procedimientos se deben validar y programar en qué momento se desarrolla la actividad. En el documento se precisará el contenido detallado de una validación según indique la norma, en el caso de equipos y sistemas se aplicará la calificación (calificación de instalación, operación y desempeño), procesos y métodos analíticos una validación.

El plan maestro de validación controla cuando se realiza las revalidaciones, además de los motivos por el cual se efectúa una revalidación como cambios de equipos usados en la fabricación, modificación de procesos o sistemas, cambios de los procesos, cambios en los métodos de valoración o equipos utilizados en las pruebas.

El orden en que cada parte será validada habrá de especificarse en el plan maestro de validación. **(2) (3)**

#### **Contenido**

- ✓ Objetivos (objetivo principal y objetivos específicos)
- ✓ Alcances
- ✓ Responsabilidades
- ✓ Cronograma de trabajo:
  - Actividad y/o proceso a realizar
  - Tipos de validación
  - Programación anual
  - Fases:
    - Identificación de las necesidades
    - Elaboración de los protocolos de validación
    - Realización de las pruebas analíticas
    - Compilación de datos
    - Evaluación de los resultados
    - Conclusiones. **(2) (3)**

### **2.4.4. ETAPAS EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

La secuencia lógica de un método analítica transcurre en 3 etapas:

- ✓ Desarrollo de las especificaciones y requerimientos que debe tener el método analítico: sensibilidad deseable, precisión exigible, grado de selectividad,

tiempo, costo, tipo de instrumentación necesaria, etc. En base a bibliografía y normas estandarizadas.

- ✓ Se desarrollo un método analítico desde la etapa inicial, desde la prueba con patrones hasta una etapa final, uso del método analítico en el análisis de muestras de un producto farmacéutico dando resultados óptimos, que indique que el método analítico es ideal para lo previsto.
- ✓ Validación del método analítico etapa final, que determina parámetros confiables para la aplicación del método en el laboratorio, estos parámetros determinan la capacidad del método analítica. **(31)**

#### **2.4.5. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

- ✓ **SYSTEM SUITABILITY:** El sistema permite dar conformidad del buen funcionamiento en conjunto de: equipo, operaciones, controles analíticos y componentes electrónicos, como un sistema integrado al realizar el uso del método analítico. **(32)**
- ✓ **EXACTITUD:** Según la farmacopea de los estados unidos la exactitud de un método analítico se define como la proximidad de resultados de un análisis de prueba o valor medido con el valor verdadero. **(24).**
- ✓ **PRECISIÓN:** Es un proceso analítico en la que debe existir concordancia entre resultados del análisis repetido con el método analítico muestreados a partir de una muestra homogénea. Se expresa como la desviación estándar o también como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación CV) de un conjunto de mediciones. La precisión determina el grado de repetibilidad del método analítico en condiciones normalizados. **(24)**

**La precisión intermedia:** también llamada fortaleza o tolerancia, se define como la obtención de resultados semejantes de un mismo método analítico analizado en diferentes días, con equipos diferentes o con diferentes analistas en el mismo laboratorio.

Para determinar repetibilidad se ejecuta el método analítico en un periodo corto con mismo equipo y analista.

- ✓ **ESPECIFICIDAD:** La capacidad de analizar el principio activo de un producto farmacéutico de forma segura en presencia de componentes cuya presencia inevitable, tales como impurezas, productos de degradación y excipientes. **(24)**

- ✓ **LINEALIDAD E INTERVALO (RANGO):** Linealidad de un método analítico es la capacidad para lograr resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango determinado de concentraciones. **(24)**. El intervalo de un procedimiento analítico es el límite inferior y superior de las concentraciones del analito, además es validado cuando se determina que el método cumple precisión, exactitud y linealidad en los extremos y dentro del intervalo. **(24)**
- ✓ **ROBUSTEZ:** Es un parámetro que determina la susceptibilidad del método a pequeñas variaciones, el método no debe variar por pequeñas variaciones, la robustez del método puede determinarse en la fase de desarrollo. **(24)**

#### **2.4.6. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

Las exigencias de las normas de la farmacopea de los estados unidos van desde determinaciones analíticas radicales hasta evaluaciones subjetivas de atributos de calidad. Se detallan las categorías.

**Categoría I:** Métodos analíticos para cuantificar componentes como principio activo y conservantes de un producto a granel y producto terminado.

**Categoría II:** Métodos analíticos para identificar, cuantificar y evaluar pruebas de límite de impurezas en impurezas en productos a granel y producto terminado.

**Categoría III:** Métodos analíticos para determinar parámetros de desempeño como liberación del fármaco, disolución etc.

**Categoría IV:** Para cada categoría se necesita información de ensayos analíticos, pruebas de identificación. **(24)**

TABLA 1: Parámetros necesarios para Validación USP 41

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Exactitud	Si	Si	a	a	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	a	Si
Límite de detección	No	No	Si	a	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	a	No
Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Linealidad	Si	Si	No	a	No
Intervalo	Si	Si	a	a	No

a: Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos (USP). USP–NF: Capítulo(1225).

## 2.5. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

### 2.5.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN

#### ✓ CROMATOGRAFÍA:

La cromatografía se usa para separar en múltiples etapas, los componentes de la muestra de un producto farmacéutico en la que los componentes se distribuyen en dos fases: fase estacionaria y fase móvil. La fase estacionaria tiene naturaleza sólida, líquido absorbido sobre un sólido o un gel, esta puede estar en una columna, extendida en una capa, distribuida como película. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida. La separación se da por adsorción, distribución de masa o intercambio iónico. **(33)**

#### ✓ CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)

Los términos mencionados son sinónimos, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de líquidos, cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es un proceso de separación en dos fases: la fase estacionaria sólida y fase móvil líquida. **(34)**

La cromatografía líquida es una técnica que se usa para separar componentes de una muestra de un producto farmacéutico, donde a la columna se le

considera parte esencial del sistema cromatográfico, en torno a la columna se monta un equipo de mayor o menor complejidad.

El cromatógrafo líquido consta de:

- Un depósito para el solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
  - El inyector, sistema que facilita la introducción de la muestra.
  - La bomba, sistema para forzar, desplazar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna.
  - El detector, sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna.
  - Un sistema de registro de los datos provenientes del detector.
- La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora. **(34)**

## 2.6. PROPIEDADES FISICAS, QUIMICAS Y FARMACOLOGICAS DE LOS ANALITOS.

### 2.6.1. VITAMINAS

Se define a las vitaminas como sustancias orgánicas indispensable para el funcionamiento celular o metabolismo, en alimentos se encuentra en pequeñas cantidades. Se dividen en dos grupos: vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles, cada una de las vitaminas cumplen funciones y son indispensables, si fuera el caso alguna de las vitaminas fuera insuficiente causaría diversos tipos de enfermedades. **(35)**

### 2.6.2. TIAMINA CLORHIDRATO

**Fórmula química:**  $C_{12}H_{11}ClN_4OS \cdot HCl$

**Peso molecular:** 337,27



**Descripción:**

- Polvo cristalino blanco o casi blanco.
- cristales incoloros.
- soluble en agua.
- soluble en glicerol y poco soluble en etanol al 96%.
- Punto de fusión: 248°C (desc.).

**Propiedades:**

La tiamina, la vitamina más inestable. con una estructura de uniones débiles y se descompone con facilidad en un medio alcalino. Resistente a temperaturas de hasta 100 °C, si se excede temperaturas de 100°C la vitamina se desnaturaliza. **(35)**

Según investigaciones la tiamina cumple funciones bioquímicas como la de metabolizar carbohidratos esta acción proporciona energía al sistema nervioso, además que trabaja en el mecanismo de la ruptura u oxidación de los carbohidratos y el metabolismo del ácido pirúvico. **(35)**

Carencia de la tiamina genera falta de energía, se produce lesiones en los tejidos nerviosos y el cerebro. La falta de tiamina en ocasiones se produce por el bajo consumo de carbohidratos. **(35)**

**Función:** Constituye parte de una coenzima que interviene en el metabolismo energético. Por lo tanto, el consumo de tiamina se estima en función de la ingesta energética (0.4 mg por 1000 kcal). Además, cumple una función importante en la transmisión nerviosa.

La falta de tiamina, la enfermedad "Beriberi" que se manifiesta con los síntomas generales, alteraciones neurológicas, musculares y trastornos cardíacos. La enfermedad se produjo por primera vez en Asia, la población de Asia obtiene la tiamina del consumo de arroz pulido o descascarillado. Existe otros factores de deficiencia como consumo de alcohol crónico, el alcohol aumenta excreción de tiamina por la orina. **(36)**

**Fuentes alimentarias:** La tiamina se encuentra en diferentes alimentos de origen vegetal y animal, los alimentos más ricos de origen vegetal: salvado de

arroz y trigo, granos, germen de semillas, levaduras, cereales, hortalizas verdes y frutas. Alimentos de origen animal como: carnes, pescado y leche. En alimentos como raíces la tiamina es escasa.

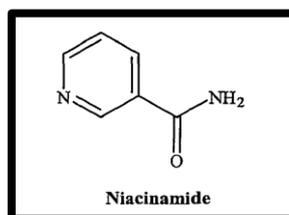
Recomendación al consumir alimentos que contienen tiamina, por la característica de ser soluble en agua si se lavan en exceso como el arroz, si se cosen por tiempos prolongados, se pierde gran cantidad de vitamina tiamina. (35)

**Envasado y almacenamiento:** Envasar en envases para productos fotosensibles. (35)

### 2.6.3. NICOTINAMIDA

**Fórmula química:**  $C_6H_6N_2O$

**Peso molecular:** 112,12



#### **Descripción:**

- Polvo cristalino, blanco o casi blanco.
- cristales incoloros.
- hidrosoluble y soluble en etanol anhidro.
- **Punto de fusión:** 128°C – 131°C.
- **Absorción UV máx.:** 261 nm.

La vitamina se denomina de las siguientes maneras: niacina, vitamina B3 y nicotinamida. El cuerpo requiere pequeñas cantidades para cumplir sus funciones. (35)

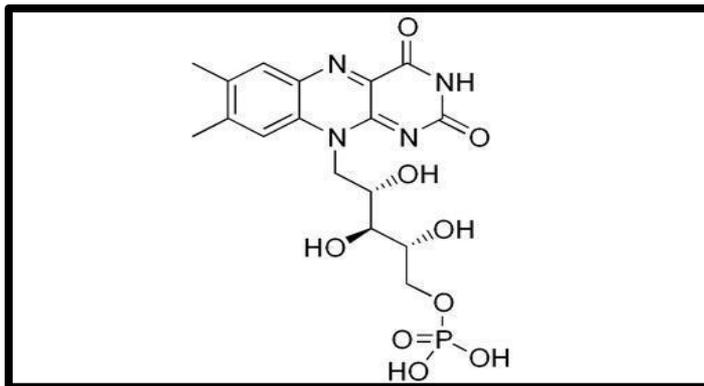
**Función:** Para el tratamiento de la diabetes, afecciones de piel, estudios en proceso revelan tratamiento para ciertos tipos de cáncer, incrementa el flujo sanguíneo e impide llegada de ciertas enzimas a células cancerosas de esta manera se evita reparación del ADN de células cancerosas por tanto se provoca destrucción de células cancerosas con radiación o quimioterapia, La nicotinamida es un tipo de radio sensibilizador y un tipo de quimio sensibilizador. (35)

**Fuentes alimentarias:** La niacinamida se encuentra en alimentos de origen vegetal y animal, fuentes de origen animal: hígado y carne, fuentes de origen vegetal: El maní, Los granos enteros o cereales ligeramente trillados, el salvado de cereal, gérmenes. Alimentos de bajo contenido de niacinamida: Leche, raíces con almidón, los plátanos. **(35)**

#### 2.6.4. RIBOFLAVINA

**Fórmula química:**  $C_{17}H_{20}N_4NaO_9 \cdot 2H_2O$

**Peso Molecular:** 514,36



#### Descripción:

- Sustancia cristalina amarilla.
- Menos soluble en agua.
- Mas resistente al calor que la tiamina.
- Fotosensible (luz solar).
- Coenzima de la oxidación tisular. **(35)**

**Envasado y Almacenamiento:** Envasar en envases para productos fotosensibles. **(35)**

**PH:** 5,0-6,5. En solución muestra con concentración de 10mg/mL. **(35)**

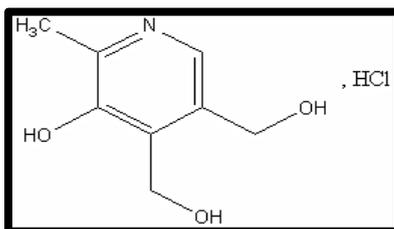
**Fuentes alimentarias:** Las fuentes que contienen riboflavina de origen animal: leche, carne, hígado, pescado y huevos fuentes de origen vegetal: hortalizas verdes, granos, cereales y semillas. Alimentos cantidades pobres de riboflavina: yuca, plátanos, ñame y batatas. **(35)**

#### 2.6.5. PIRIDOXINA CLORHIDRATO:

**Fórmula Molecular:**  $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$

3,4-Pyridinedimethanol, 5-hydroxy-6-methyl-, hydrochloride; Clorhidrato de piridoxol

Peso Molecular: 205,64



#### Descripción:

- Vitamina hidrosoluble.
- Poco soluble en etanol al 96%.
- Polvo blanco cristalino.
- **Punto de fusión:** 205°C - 212°C (desc.).

**Envasado y Almacenamiento:** Envasar en envases para productos fotosensibles. **(35)**

**Función:** Coenzima de procesos metabólicos.

La carencia de vitamina B6, provoca enfermedades neurológicas, anemia y dermatosis. Esto ocurre generalmente en pacientes con tuberculosis por los efectos secundarios de isoniazida, es recomendable suministrar 10mg de vitamina B6 a pacientes con tratamiento de isoniazida. **(35)**

#### 2.6.6. D-PANTENOL

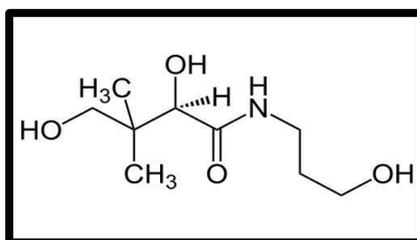
**Fórmula Molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

Butanamide, 2,4-dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethyl-, (R)-;

D-(+)-2,4-Dihidroxi-N-(3-hidroxipropil)-3, 3-dimetilbutiramida

[81-13-0]

**Peso Molecular:** 205,25



#### Características:

- Líquido muy viscoso.
- Incoloro.

- prácticamente inodoro.
- Soluble en agua y en etanol.
- Densidad: 1,2 g/ml.
- Índice de refracción: 1,497 (20°C).
- Rotación óptica: +29.5° (c=5, 20°C).

**Envasado y Almacenamiento:** Envasar en envases para productos fotosensibles. **(35)**

**Propiedades y usos:** Es un factor vitamínico, cumple la función de precursor de la coenzima A, un componente esencial para diferentes procesos bioquímicos, como la producción de energía y el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas. El dexapantenol es estable en PH 4 a 7.

Usos en enfermedades como: alopecia, estreñimiento, atonía intestinal, íleo para regeneración cutánea. Tópicamente, se usa para cicatrizar lesiones, úlceras infectadas, quemaduras y estimulante del metabolismo epitelial, además tiene actividad antiseborreico y eutrófica sobre el folículo piloso. Formas farmacéuticas ungüentos, pomadas, cremas, lociones, o soluciones. Además, Se utiliza en productos cosméticos por la actividad hidratante y humectante. **(35)**

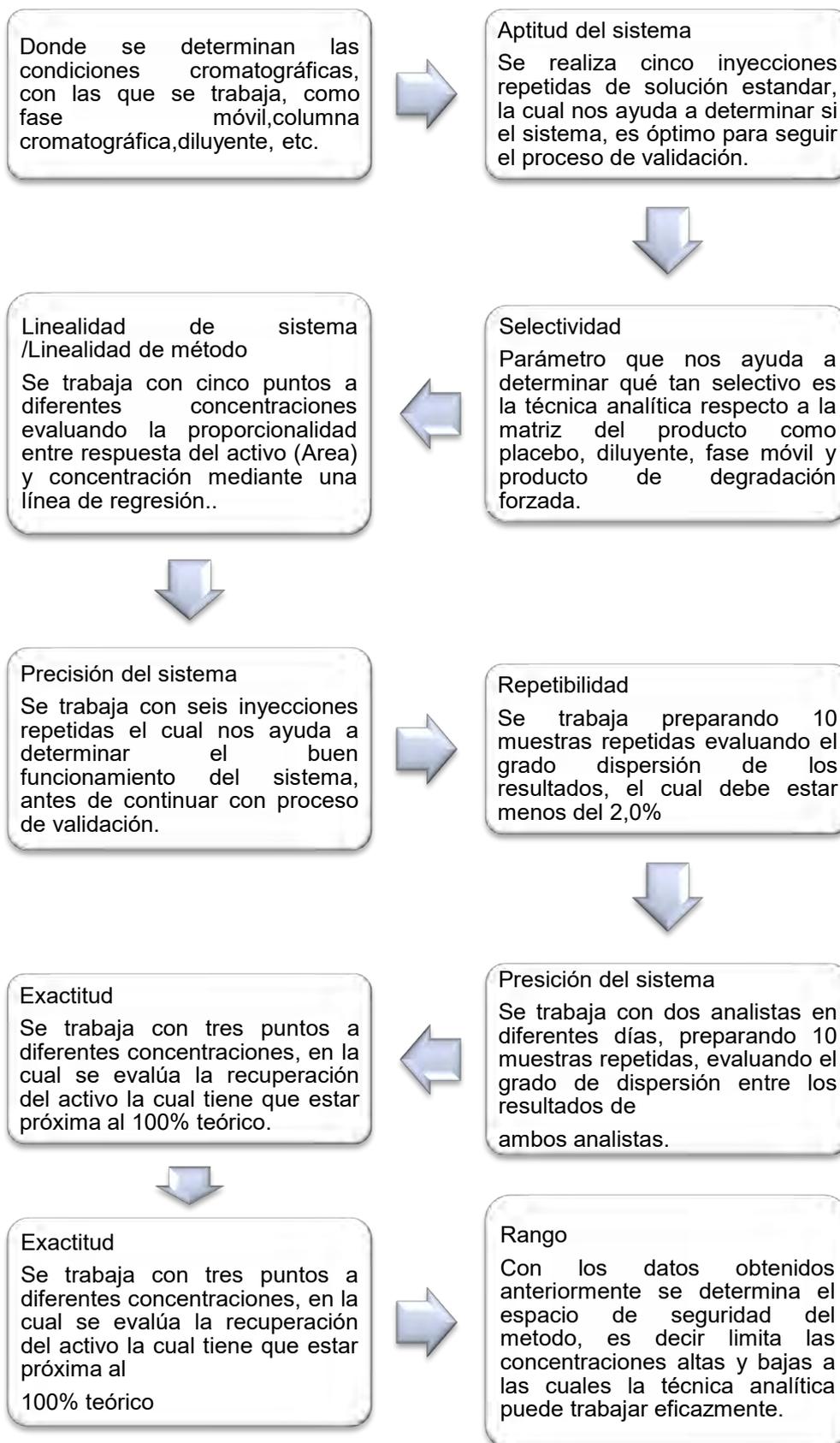
## 2.7. GLOSARIO DE TÉRMINOS

- ✓ Analito: Sustancia (química, física o biológica) determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método. **(2)**
- ✓ Análisis / prueba: determinación de una o más características de una muestra, de acuerdo con un procedimiento o método establecido. **(2)**
- ✓ Auditoria: proceso sistemático, independiente programado y documentado para obtener evidencias de un proceso, actividad, función, reporte o cifra y evaluarlas de manera objetiva con el fin de determinar la extensión en que se cumplen los criterios establecidos para cada caso. **(2)**
- ✓ Calidad: grado en que un conjunto de características inherentes a un producto sistema o proceso cumple con los requisitos específicos. **(2)**
- ✓ Control de calidad: Conjunto de procedimientos técnicos y actividades de muestreo, análisis, incluyendo la emisión de certificado de análisis para asegurar que los insumos, materiales, y productos, en cualquier etapa,

cumplen con las especificaciones establecidas para identidad, potencia, pureza y otras características que sean requeridas. **(2)**

- ✓ Documento: Información y su medio de soporte, tales como: registro, especificación, procedimiento, plano, informe, norma. El medio de soporte puede ser papel, disco magnético, óptico o electrónico, fotografía o muestra patrón o una combinación de estos. **(2)**
- ✓ Eficacia: Grado en el cual las actividades planeadas son realizadas y se logran los resultados esperados. **(2)**
- ✓ Investigación: Serie de actividades encaminadas a encontrar la causa de una no conformidad, sobre las cuales se debe establecer acciones correctivas y preventivas. **(2)**
- ✓ Materia prima: Cualquier sustancia activa o inactiva, de calidad definida usada en la producción de un producto farmacéutico, excluyendo los materiales de envase primario y secundario. **(2)**
- ✓ Método analítico: Descripción detallada de los pasos necesarios para realizar cada prueba o ensayo analítico. Esto puede incluir, pero no está limitado a: la muestra, el patrón de referencia y la preparación de reactivos, el uso de equipos, la generación de la curva de calibración, el uso de las fórmulas para el cálculo, entre otros. **(2)**
- ✓ Muestra: Parte o porción finita representativa de materias primas, materiales de envase y empaque o producto que se somete a análisis a los efectos de verificar las características de calidad o su adecuación para el uso. **(2)**
- ✓ Plan Maestro de Validación: Documento que especifica la información referente a las actividades de validación que la organización debe realizar, donde se definen detalles y escalas de tiempo para cada trabajo de validación a ejecutar. Las responsabilidades relacionadas con dicho plan deben estar establecidas en el documento. **(2)**
- ✓ Producto farmacéutico: Preparado uniforme de composición conocida, rotulado y envasado, destinado a ser usado en la prevención, diagnóstico, tratamiento y curación de una enfermedad, conservación, mantenimiento, recuperación y rehabilitación de la salud. **(2)**
- ✓ Validación: Acción que demuestra, en forma documentada, que un proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce a los resultados previstos. **(2)**

## 2.8. FLUJOGRAMA DEL MÉTODO ANALÍTICO



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES, INSTRUMENTOS, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 3.1.1. MATERIALES

- Matraz volumétrico de: 100 mL.
- Matraz volumétrico de: 50 mL.
- Pipeta graduada de: 3 mL.
- Pipeta volumétrica de: 1 mL.
- Pipeta volumétrica de: 2 mL.
- Probeta de: 500 mL.
- Probeta de: 2000 mL.
- Baker de: 250 mL y 500 mL.

##### 3.1.2. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

- Balanza analítica METLER TOLEDO AB204-S
- Equipo cromatográfico HPLC marca Knauer
- Baño maría.
- Baño de ultrasonido BRANSON
- Termómetro

##### 3.1.3. REACTIVOS

- Ácido etilendiaminotetraacético.
- Agua purificada.
- N-Hexano sulfonato de sodio.
- Ácido Acético Glacial.
- Metanol HPLC.
- Acetonitrilo HPLC.
- Ácido Clorhídrico químicamente puro.
- Hidróxido de Sodio Lentejas.
- Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- Estándar secundario Tiamina Clorhidrato.
- Estándar secundario Piridoxina Clorhidrato.
- Estándar secundario Riboflavina 5 fosfato de sodio.
- Estándar secundario Nicotinamida.

## 3.2. DISEÑO METODOLÓGICO

Programa que precisa el método y el control de la investigación, indicándose los procedimientos y condiciones para lograr la información necesaria para probar la hipótesis. **(40)**

### 3.2.1. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACION

#### 3.2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio reúne características metodológicas de una investigación de tipo **descriptivo**, porque mide variables independientemente describiendo de manera general o detallada, no busca relaciones de causa efecto. **(39)(40)**

#### 3.2.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El nivel de investigación **cuantitativa**, en el estudio se usa la estadística como una herramienta para alcanzar los objetivos. **(39)**

### 3.2.2. ÁMBITO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo en las instalaciones de control de calidad, área de validaciones, perteneciente al Laboratorio farmacéutico Privado. Que se encuentra en Urb. El Éxito Ate Mz. C LOTE 3 LIMA-PERU.

## 3.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño es de tipo **no experimental**, ya que no se manipula variables de forma deliberada en este enfoque, se observa fenómenos que ocurren en contexto natural.

Es **transversal descriptivo**, ya que los datos de los análisis se recolectan en un solo tiempo, no requiere realizar un seguimiento a través del tiempo. **(39)(40)**

### 3.4. IDENTIFICACION Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES E INDICADORES

#### 3.4.1. Variables independientes

✓ **Validación de la técnica analítica.**

**Definición conceptual:** Se considera el cumplimiento de los parámetros: linealidad, exactitud, precisión y especificidad además de la evaluación estadística. **(3)**

La FDA define la validación: contar con evidencias documentadas, los datos reportados y documentados del proceso deben ser confiables y cumplir con atributos de calidad. **(25)**

La validación es una acción que manifiesta de manera documentada, que un proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce a resultados premeditados. **(3)**

**Definición operacional:** Se realizó ensayos de los diferentes parámetros de validación según la normativa del país y lineamientos del organismo regulador en Perú, DIGEMID, así mismo referencias normativas como la USP e ICH(Q2) R2. **(2)(3)(4)**

Variable	Naturaleza	Por importancia respecto al problema	Escala de medición	Forma de medición	Indicador	Expresión final de la variable
Validación de la técnica analítica	Cualitativa	Independiente	Nominal	Indirecta	<b>Aptitud del sistema Selectividad Linealidad Precisión Exactitud Rango.</b>	Cumple No cumple

#### 3.4.1.1. Indicadores

**Definición conceptual:**

- ✓ **Aptitud del sistema:** el sistema permite dar conformidad del buen funcionamiento en conjunto de: equipo, operaciones, controles analíticos y componentes electrónicos, como un sistema integrado al realizar el uso del método analítico. **(3)**

- ✓ **Exactitud:** según la farmacopea de los estados unidos la exactitud de un método analítico se define como la proximidad de resultados de un análisis de prueba o valor medido con el valor verdadero. **(3)**
- ✓ **Precisión:** es un proceso analítico en la que debe existir concordancia entre resultados del análisis repetido con el método analítico muestreados a partir de una muestra homogénea. se expresa como la desviación estándar o también como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación CV) de un conjunto de mediciones. la precisión determina el grado de repetibilidad del método analítico en condiciones normalizados. **(3)**
- ✓ **Precisión intermedia:** también llamada fortaleza o tolerancia, se define como la obtención de resultados semejantes de un mismo método analítico analizado en diferentes días, con equipos diferentes o con diferentes analistas en el mismo laboratorio.  
para determinar repetibilidad se ejecuta el método analítico en un periodo corto con mismo equipo y analista. **(3)**
- ✓ **Selectividad:** la capacidad de analizar el principio activo de un producto farmacéutico de forma segura en presencia de componentes cuya presencia inevitable, tales como impurezas, productos de degradación y excipientes. **(3)**
- ✓ **linealidad e intervalo:** linealidad de un método analítico es la capacidad para lograr resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango determinado de concentraciones. **(3)**  
El intervalo de un procedimiento analítico es el límite inferior y superior de las concentraciones del analito, además es validado cuando se determina que el método cumple precisión, exactitud y linealidad en los extremos y dentro del intervalo. **(3)**

Variable independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador
Validación de técnica analítica	(X)	(XX)	Parámetros de validación	-
	aptitud del sistema	Se verificó el sistema cromatográfico.	-	- N.º de platos teóricos > 1000 - Factor de asimetría < 2 - La (DSR %) entre las 5 inyecciones del estándar debe ser menor o igual al 2%
	Selectividad	Se comparó cromatogramas.	-	- No debe existir interferencias en la determinación del analito. El analito debe ser estable con las diferentes condiciones de estrés. . Conforme . No conforme
	linealidad del sistema y del método	Se cuantifico resultados y se verifico la Correlación entre concentración y área del pico	- Test de Linealidad - Test de Proporcionalidad	- Coeficiente de correlación (r): $\geq$ Mayor o igual que 0,999 - Se determinará ecuación de la recta de regresión lineal: $y = b x + a$ - Se determinará valor de: b (Pendiente) y a (Intercepto) - Test de Linealidad Coeficiente de Variación (CV): menor o igual que 2.0 %. - "T" de Student experimental (>) mayor al "T" de tablas - Test de Proporcionalidad "t" de Student experimental (<) menor al "t" de tablas
	Precisión	Se cálculo de RSD (%) entre múltiples inyecciones del mismo nivel, RSD entre análisis en diferentes días o analistas	-	- Precisión del Sistema o Repetibilidad Instrumental: Coeficiente de Variación (CV): menor o igual que 2,0% - Repetibilidad del Método: Coeficiente de Variación (CV): menor o igual que 2,0% - Precisión Intermedia: Coeficiente de Variación (CV): menor o igual que 2,0%.
	Exactitud	Recuperación (%) tras añadir estándar a matriz	-	- Porcentaje de Recuperación Media: 98 - 102%, "t" de Student experimental menor (<) al "t" de tablas
	Rango	Se verificó especificaciones de los parámetros de la validación.	-	Cumplida las especificaciones para Linealidad, Precisión y Exactitud, se define el Rango del Método Analítico. - Conforme - No conforme

**Legenda:**

**(X):** Se considera el cumplimiento de los parámetros: linealidad, exactitud, precisión y especificidad además de la evaluación estadística. **(3)**

La FDA define la validación: contar con evidencias documentadas, los datos reportados y documentados del proceso deben ser confiables y cumplir con atributos de calidad. **(25)**

La validación es una acción que manifiesta de manera documentada, que un proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce a resultados premeditados. **(26)**

**(XX)**: Los resultados obtenidos de parámetros de una validación se comparan con valores teóricos, el resultado indica la confiabilidad del método analítico.

### **3.4.2. Variable dependiente**

- ✓ **Identificación y cuantificación simultánea de nicotinamida, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato, riboflavina y para D-pantenol. Con las técnicas analíticas desarrolladas**

**Definición conceptual:** Este método sirve para aislar los componentes químicos, esto en base a interacciones químicas entre la muestra en la fase móvil y la fase estacionaria. El tiempo de retención se determina por la naturaleza de los componentes de la muestra en fase móvil y el paso por la fase estacionaria.

**Definición operacional:** Medición y obtención de resultados de concentración del activo por cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

Variable	Naturaleza	por importancia respecto al problema	escala de medición	forma de medición	Indicador	Expresión final de la variable
Cuantificación simultánea de nicotinamida, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato, riboflavina y para D-pantenol, con las técnicas analíticas propuestas.	Cuantitativa	Dependiente	de proporción – razón	Directa	Cuantificación •Tiamina clorhidrato (B1) 5 mg (4.5 mg- 12.5 mg) (90%-250%). •Riboflavina (B2) 2,74 mg (2,47 mg – 4,11 mg) (90 %-150%). •Nicotinamida (B3) 20 mg (18mg-30 mg) (90 %-150%). •Piridoxina clorhidrato (B6) 2mg (1,80 mg- 3,0 mg) (90 %-150%). •D-Pantenol (B5) 3 mg (2,7 mg- 3,4 mg) (90 %-150 %)	Porcentaje de recuperación (%)
Identificación simultánea de nicotinamida, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato, riboflavina y para D-pantenol, con las técnicas analíticas propuestas.	Cualitativa	Dependiente	Nominal	Indirecta	Tiempo de retención: •Tiamina clorhidrato (B1) 22.017 min. ± 10% •Riboflavina (B2) 12.20 min. ± 10% •Nicotinamida (B3) 6.317 min. ± 10% •Piridoxina clorhidrato (B6) 14.917 min. ± 10% •D-Pantenol (B5) 14.583 min. ± 10%	Identificación: conforme No identificado: no conforme

### 3.4.3. Indicadores

#### ✓ Nicotinamida

**Definición conceptual:** La vitamina se denomina de las siguientes maneras: niacina, vitamina B3 y nicotinamida. El cuerpo requiere pequeñas cantidades para cumplir sus funciones. Son sustancias orgánicas indispensable para el funcionamiento celular o metabolismo (35)

**Definición operacional:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Escala de medición:** intervalo

**Forma de medición:** Indirecta.

**Instrumento de medición:** HPLC

**Expresión final de la variable:**

Concentración: 20 mg (18mg-30 mg) (90 %-150%).

Tiempo de Retención: 6.317 min.  $\pm$  10%

✓ **Piridoxina Clorhidrato**

**Definición conceptual:** Son sustancias orgánicas indispensable para el funcionamiento del metabolismo, coenzima de procesos metabólicos. **(35)**

**Definición operacional:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Escala de medición:** intervalo

**Forma de medición:** Indirecta.

**Instrumento de medición:** HPLC

**Expresión final de la variable:**

Concentración 2mg (1,80 mg- 3,0 mg) (90 %-150%).

Tiempo de retención: 14.917 min.  $\pm$  10%

✓ **Tiamina Clorhidrato**

**Definición conceptual:** La tiamina, la vitamina más inestable. con una estructura de uniones débiles y se descompone con facilidad en un medio alcalino. Resistente a temperaturas de hasta 100 °C, si se excede temperaturas de 100°C la vitamina se desnaturaliza. (35)

**Definición operacional:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Escala de medición:** intervalo

**Forma de medición:** Indirecta.

**Instrumento de medición:** HPLC

**Expresión final de la variable:**

Concentración: 5 mg (4.5 mg- 12.5 mg) (90%-250%).

Tiempo de retención: 22.017 min.  $\pm$  10%

✓ **Riboflavina**

**Definición conceptual:** Son sustancias orgánicas indispensable para el funcionamiento del metabolismo, Menos soluble en agua, Fotosensible, Coenzima de la oxidación tisular. **(35)**

**Definición operacional:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Escala de medición:** intervalo

**Forma de medición:** Indirecta.

**Instrumento de medición:** HPLC

**Expresión final de la variable:**

Concentración: 2,74 mg (2,47 mg–4,11 mg) (90 %-150%).

Tiempo de retención: 12.20 min.  $\pm$  10%

✓ **D-Pantenol**

**Definición conceptual:** Es un factor vitamínico, cumple la función de precursor de la coenzima A, un componente esencial para diferentes procesos bioquímicos, como la producción de energía y el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas.

**Definición operacional:**

**Naturaleza:** Cuantitativa.

**Escala de medición:** intervalo

**Forma de medición:** Indirecta.

**Instrumento de medición:** HPLC

**Expresión final de la variable:**

Concentración: 3 mg (2,7 mg- 3,4 mg) (90 %-150 %).

Tiempo de retención: 14.583 min.  $\pm$  10%

### 3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

#### 3.5.1. Variable independiente: validación de técnica analítica.

Indicadores para validación de técnica analítica.	Naturaleza	Escala de medición	Forma de medición	Instrumento de medición	Sub indicador	Expresión final de la variable
Aptitud del sistema	Cuantitativo	de proporción – razón	Directa	HPLC	N° de platos teóricos > 1000 Factor de asimetría < 2 Desviación estándar relativa (DSR%) ≤ 2% del grupo de 5 inyecciones repetidas	Conforme: platos teóricos >1000  No conforme: platos teóricos <1000
Selectividad	Cualitativa	de proporción – razón	Directa	HPLC	No debe existir interferencias en la determinación del analito por diluyente compuestos de degradación y los excipientes de la matriz.: Intervalo de tipo cualitativo: - conforme - No conforme El analito debe ser estable con las diferentes condiciones de estrés. Intervalo de tipo cualitativo: - conforme - No conforme	Conforme: no hay interferencia tiempo de retención  No conforme: interferencia en el tiempo de retención de los analitos
Linealidad del sistema y del método	Cuantitativo	de proporción – razón	Directa	HPLC	Coefficiente de correlación (r): ≥ (mayor que o igual a) 0,999 Calculo de la ecuación de la recta de regresión lineal $y = b x + a$ Determinar el valor de: a=Intercepto, b = Pendiente <u>Test de Linealidad</u> Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta (CV): Máximo 2 % "T" de Student experimental mayor al "T" tablas ( $T_{exp} > T_{tabla}$ ) <u>Test de Proporcionalidad</u> "T" de Student experimental menor al "T" tablas ( $T_{exp} < T_{tabla}$ )	Conforme: (r): ≥0,999, CV < 2%  No conforme: (r): <0,999 CV > 2%
Precisión	Cuantitativo	de proporción – razón	Directa	HPLC	<u>Precisión del Sistema o Repetibilidad Instrumental:</u> Coefficiente de Variación (CV): Máximo 2 % <u>Repetibilidad del Método:</u> Coefficiente de Variación (CV): Máximo 2 % <u>Precisión Intermedia:</u> Coefficiente de Variación (CV): Máximo 2 %	Conforme: CV < 2% No conforme: CV > 2%
Exactitud	Cuantitativo	de proporción – razón	Directa	HPLC	Porcentaje de Recuperación Media: 98,0 % - 102,0 % "t" de Student experimental menor al "t" de tablas, ( $t_{exp} < t_{tabla}$ )	Porcentaje de recuperación (%)
Rango	Cualitativo	de proporción – razón	Indirecta	HPLC	Cumplida las especificaciones para Linealidad, Precisión y Exactitud, se define el Rango del Método Analítico.	Conforme: 80-160% N, P y R. T 40-280% No conforme: <80->160% N, P y R. T 40-280%

**3.5.2. Variable dependiente:** identificación y cuantificación simultánea de nicotinamida, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato, riboflavina y D-pantenol, con la técnica analítica desarrollada.

Indicadores para identificación y cuantificación de técnica analítica.	Naturaleza	escala de medición	forma de medición	Instrumento de medición	Indicador	Expresión final de la variable
Nicotinamida	Cuantitativa	Intervalo	indirecta	HPLC	Concentración: 20 mg (18mg-30 mg) (90 %-150%). Tiempo de Retención: 6.317 min. ± 10%	Porcentaje de recuperación (%)
<b>Piridoxina Clorhidrato</b>	Cuantitativa	Intervalo	indirecta	HPLC	Concentración 2mg (1,80 mg- 3,0 mg) (90 %-150%). Tiempo de retención: 14.917 min. ± 10%	Porcentaje de recuperación (%)
<b>Tiamina Clorhidrato</b>	Cuantitativa	Intervalo	indirecta	HPLC	Concentración: 5 mg (4.5 mg- 12.5 mg) (90%-250%). Tiempo de retención: 22.017 min. ± 10%	Porcentaje de recuperación (%)
<b>Riboflavina</b>	Cuantitativa	Intervalo	Indirecta	HPLC	Concentración: 2,74 mg (2,47 mg-4,11 mg) (90 %-150%). Tiempo de retención: 12.20 min. ± 10%	Porcentaje de recuperación (%)
<b>D-Pantenol</b>	Cuantitativa	Intervalo	Indirecta	HPLC	Concentración: 3 mg (2,7 mg- 3,4 mg) (90 %-150 %). Tiempo de retención: 14.583 min. ± 10%	Porcentaje de recuperación (%)

Fuente: Elaboración propia

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

**G1 = X1 X2 X3 X4 X5 O1 O2 O3 O4 O5**

- G1: Muestra de jarabe multivitamínico
- X1: Placebo, y muestra con activos en estudio a exposición a luz, T°, H°, calor seco 105°x48h, calor humedo60°x 2h, hidrolisis acida-básica y oxidación.
- X2: muestras con variación de concentración nicotinamida, piridoxina, riboflavina al 80%-100%-120%-140%-160%, tiamina 40%-100%-160%-220%-280%, d-pantenol 80%-100%-120%-140%-160%.
- X3: análisis de analista 1 y 2 de 10 repeticiones cada uno.
- X4: análisis con variación a diferentes concentraciones 80%-120%160% piridoxina, riboflavina, nicotinamida, 40%-160%-280% tiamina y 80%-120%-160% d-pantenol.
- X5: 5 lecturas continuas.
- O1: selectividad

- O2: linealidad
- O3: precisión
- O4: exactitud
- O5: aptitud del sistema

### 3.7. MUESTRA: Jarabe multivitamínico, que contiene: Cada 5mL

Vitaminas	Cantidad (mg/5mL)
Nicotinamida	20,0
Piridoxina clorhidrato	2,0
Tiamina clorhidrato	5,0
D-pantenol	3,0
Riboflavina	2,74

Fuente: Elaboración propia

#### 3.7.1. FÓRMULA CUALI CUANTITATIVA

PRINCIPIO ACTIVO Y EXCIPIENTES:	FÓRMULA POR 5mL
Tiamina Clorhidrato (Vit. B1)	5,00 mg
Piridoxina Clorhidrato (Vit. B6)	2,00 mg
Riboflavina fosfato de sodio (Vit B2 como base)	2,74 mg
Nicotinamida (Vit. B3)	20,00 mg
D-Pantenol (Vit B5)	3,00 mg
Metilparabeno	2.65 mg
Sorbitol solución no cristalizabile	3400.0 mg
Propilenglicol	50.00 mg
Sodio Fosfato dibásico anhidro	16.55 mg
Cloruro de sodio	5.8 mg
Ácido cítrico anhidro	10.80 mg
Esencia de pera	0.95 mg
Esencia de piña	4.30 mg
Color caramelo E 150	7.70 mg
Agua purificada CSP.	5.0mL

Fuente: Elaboración propia

### **3.7.2. PROTOCOLO DE LA VALIDACIÓN DE TÉCNICA ANALÍTICA SIMULTÁNEA DE NICOTINAMIDA, RIBOFLAVINA, PIRIDOXINA CLORHIDRATO Y TIAMINA CLORHIDRATO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN:**

### **3.7.3. MATERIALES, REACTIVOS, PATRONES, EQUIPOS Y DOCUMENTOS INVOLUCRADOS EN EL ESTUDIO.**

#### **✓ MATERIALES:**

- Matraz volumétrico de: 100 mL
- Matraz volumétrico de: 50 mL
- Pipeta graduada de: 3 mL
- Pipeta volumétrica de: 1 mL.
- Pipeta volumétrica de: 2 mL
- Probeta de: 500 mL.
- Probeta de: 2000 mL
- Beaker de: 250 mL y 500 mL

#### **✓ REACTIVOS:**

- Ácido\_etilendiaminotetraacético
- Agua Purificada
- N-Hexano sulfonato de sodio.
- Ácido Acético Glacial
- Metanol HPLC
- Acetonitrilo HPLC
- Ácido Clorhídrico químicamente puro
- Hidróxido de Sodio Lentejas
- Peróxido de Hidrógeno al 30%.

#### **✓ EQUIPOS:**

- Balanza Analítica
- Equipo cromatográfico HPLC marca Knauer
- Baño maría.
- Baño de ultrasonido
- Termómetro.

✓ **PATRONES:**

- Estándar secundario Tiamina Clorhidrato.
- Estándar secundario Piridoxina Clorhidrato.
- Estándar secundario Riboflavina 5 fosfato de sodio.
- Estándar secundario Nicotinamida.

✓ **DOCUMENTOS:**

- Certificados de estándares
- Certificados de calibración
- Certificado de verificación operacional
- Certificados de trazabilidad

**3.7.4. REFERENCIA DE CALIBRACIÓN, CALIFICACIÓN DE EQUIPOS DE MEDICIÓN E INSTRUMENTOS.**

<b>Materiales, instrumentos y reactivos</b>	<b>Certificado de verificación</b>	<b>Vigencia</b>	<b>Código</b>
<b>Materiales</b>			
Matraz volumétrico de 100 ml	LV-0996-2022	Vigente	CCFI-004
Matraz volumétrico de 50 mL	LV-0996-2022	Vigente	CCFI-003
Pipeta volumétrica: 3,0 mL	LV-0895-2022	Vigente	CPV-005
Pipeta volumétrica: 1,0 mL	002-2022-CV	Vigente	CCPV-002
Pipeta volumétrica: 2,0 mL	LV-0442-2022	Vigente	CCPV-003
<b>Equipos</b>			
Balanza analítica	M0429 2022	Vigente	CCBA-001
Baño de ultrasonido	----	----	CCSR-001
Baño maría	-----	-----	CCBM-002
Termómetro líquido en vidrio	LT-0058-2022	Vigente	CCTM-002
Equipo Cromatógrafo HPLC marca Knauer Azura	Certificado de verificación operacional	Vigente	CCHP-002
<b>REACTIVOS</b>	<b>Lote</b>	<b>Fecha de Expira</b>	<b>Procedencia</b>
Agua Purificada	-----	-----	-----
N. Hexano sulfonato de sodio	0000171999	2024-02-28	J. BAKER
Ácido Acético Glacial	K48620863	2023-12-13	MERCK
Metanol HPLC	V39C04	2023-09-04	J.T BAKER
Acetonitrilo HPLC	Y03C51	2023-07-08	J.T BAKER
Ácido Clorhídrico QP	K4935321773 0	2023-07-31	MERCK
Hidróxido de Sodio Lentejas	0000131066	2023-07	MACRON
Peróxido de Hidrogeno al 30%	11730	2023-08	KARAL
Columna Cromatográfica ZORBAX SB-C18 150x 4,6 mm 5µm	USCM038249	-----	Agilent

Fuente: Elaboración propia

### 3.7.5. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se realizará de la siguiente manera:

✓ **ELECCIÓN DEL TIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA QUE SE UTILIZARÁ**

El producto farmacéutico presenta 5 principios activos, en las que se considera algunos aspectos como: peso molecular y solubilidad de los principios activos en estudio.

Cuando un ingrediente farmacéutico activo tiene peso molecular menor a 2000 daltons, lo más recomendable es usar la fase reversa.

Al tratarse de varios principios activos lo más sensato es que se usará una técnica de separación por gradiente, ya que así se separará más los principios activos, y se tendrá una mejor cuantificación e identificación.

✓ **SELECCIÓN DE TIPO DE DETECTOR:**

Para elegir el tipo de detector nos basaremos en antecedentes, teniendo el detector UV, el cual es el más usado por facilidad de uso, robustez y confiabilidad.

✓ **SELECCIÓN DE LONGITUD DE ONDA:**

Para elegir con la longitud de onda que se requiere trabajar se realizara un barrido.

✓ **ELECCIÓN DE LA FASE ESTACIONARIA Y LA FASE MÓVIL**

Para seleccionar el tipo de fase móvil y fase estacionaria se tomará en consideración lo siguiente:

- Solubilidad de principios activos.
- Compatibilidad de fase móvil con muestra y detector.

### 3.7.6. TÉCNICA ANALÍTICA QUE SE DESARROLLARA

Condiciones cromatográficas:

- **COLUMNA CROMATOGRÁFICA:** EXTEND SB C18-150 mmx4.5x5 µm
- **SISTEMA:** Gradiente
- **FASE MÓVIL:**

**SOL. A:** 1,05 g de hexano sulfonato de sodio, en 1050mL de agua purificada, Se agregará 15mL de ácido acético glacial, Se filtrará por un filtro Nylon 0,45 µm.

**SOL. B:** METANOL HPLC

**SOL. C: ACETONITRILO**

- **FLUJO: GRADIENTE**

<b>TIEMPO</b>	<b>FLUJO mL/min</b>	<b>SOL A</b>	<b>SOL B</b>	<b>SOL C</b>
0	1,0	91	9	0
4	0,7	90	10	0
27	0,7	75	5	20
28	1,0	91	9	0
35	1,0	91	9	0

- **LONGITUD DE ONDA:** 280 nm
- **VOLUMEN DE INYECCIÓN:** 20.0 µL
- **TEMPERATURA:** Ambiente
- **DILUYENTE:** Pesar 25 g de EDTA, Diluir en 1000mL de agua.
- **PREPARACIÓN DE LA CONCENTRACION DE TRABAJO O SOLUCIONES DE TRABAJO:**

**PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR MIXTA DE REFERENCIA:**

Se pesará más o menos 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en matraz volumétrico con volumen de enrase de 50mL, Enrasar con diluyente, Se traspasará 3mL a un matraz volumétrico con volumen de enrase de 100mL, enrasar con diluyente y homogenizar, Preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar una corrida en el HPLC.

**PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MUESTRA:**

Tomar 3mL de muestra, llevar a matraz volumétrico con un volumen de enrase de 100mL, Se agregará 60mL del diluyente, Se agitará y llevará a ultrasonido por 5 minutos, posteriormente dejar atemperar y llevar a volumen con diluyente, luego homogenizar. Filtrar una cantidad de esta

solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

Especificaciones:

Tiamina clorhidrato (B1)	5 mg (4.5 mg- 12.5 mg) (90%-250%)
Riboflavina (B2)	2,74 mg (2,47 mg – 4,11 mg) (90 %- 150%)
Nicotinamida (B3)	20 mg (18mg-30 mg) (90 %-150%)
Piridoxina clorhidrato (B6)	2mg (1,80 mg- 3,0 mg) (90 %-150%)

**3.7.7. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS EMPLEADAS PARA EVALUAR EL FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO Y PARA DETERMINAR SU USO.**

3.7.8. Prueba de la t de Student

**3.7.9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN POR PARÁMETROS.**

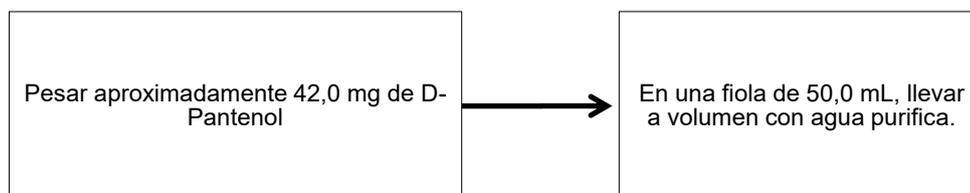
El trabajo se desarrolla en condiciones normales y a temperatura ambiente.

**3.7.10. PREPARACION DE SOLUCION DE TRABAJO, PARAMETROS DE VALIDACIÓN**

✓ **SELECTIVIDAD:**

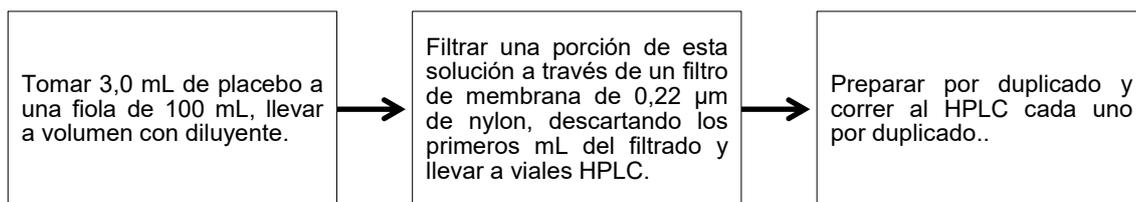
**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO:**

- ✓ **SOLUCIÓN MADRE DE D-PANTENOL 140%:** Pesar aproximadamente 42,0 mg de D-Pantenol a una fiola de 50mL, llevar a volumen con agua.

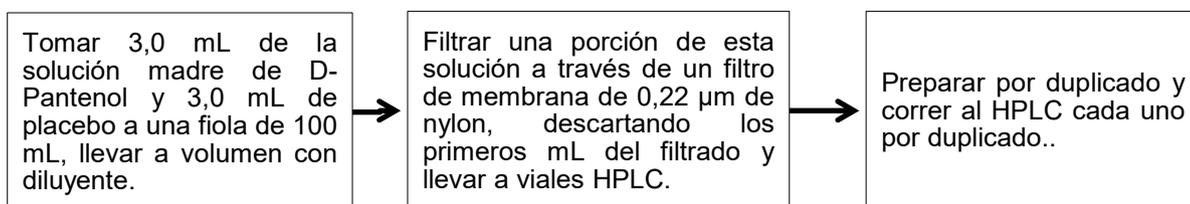


- ✓ **PREPARACIÓN DE DILUYENTE:** Según la técnica analítica propuesta, preparar el diluyente por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC, realizar una corrida en el HPLC cada uno por duplicado.
- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO (excipiente puro):** Preparar el placebo por duplicado, de la misma forma que la preparación de solución muestra en el ítem (3.7.6.), Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y

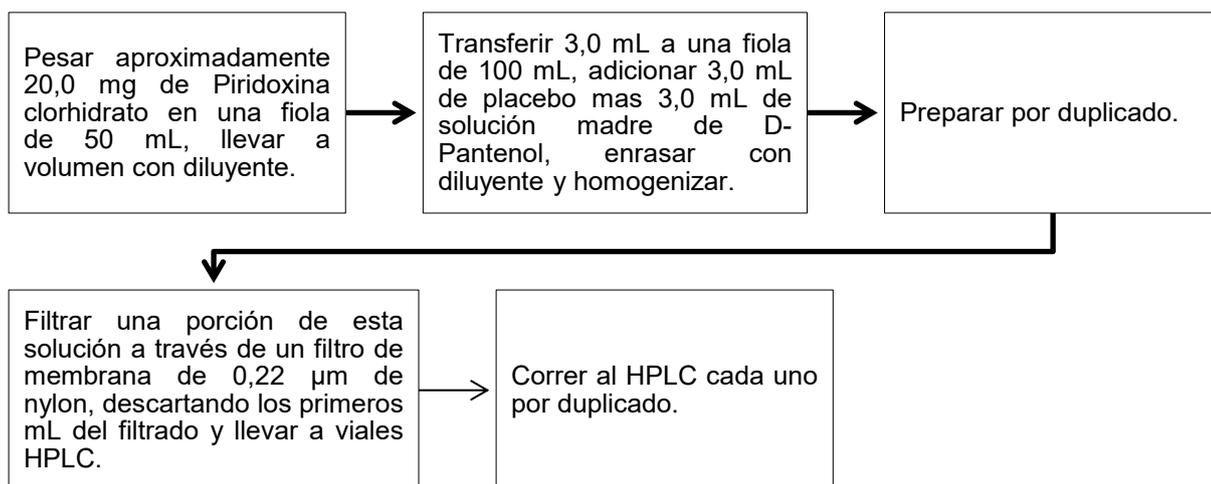
llevar a viales HPLC y realizar una corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO + D-Pantenol 140%:** Tomar 3,0 mL de la solución madre de D-Pantenol y 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC, realizar una corrida en el HPLC cada uno por duplicado.

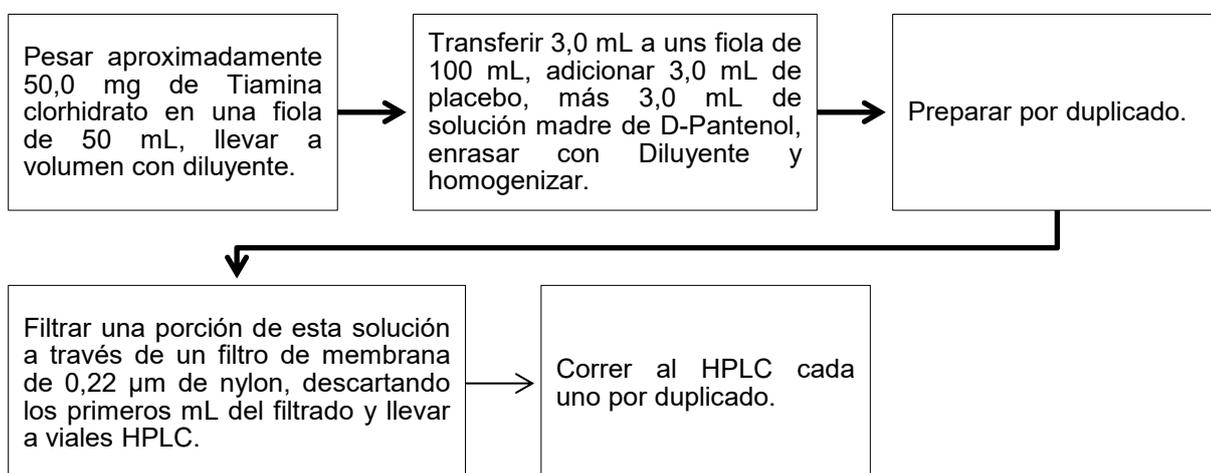


- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO+ SOLUCIÓN MADRE DE D-PANTENOL + ESTÁNDAR DE PIRIDOXINA CLORHIDRATO AL 100%:** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de solución madre de d-pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO+ SOLUCIÓN MADRE DE D-PANTENOL + ESTÁNDAR DE TIAMINA CLORHIDRATO AL 100 %:**

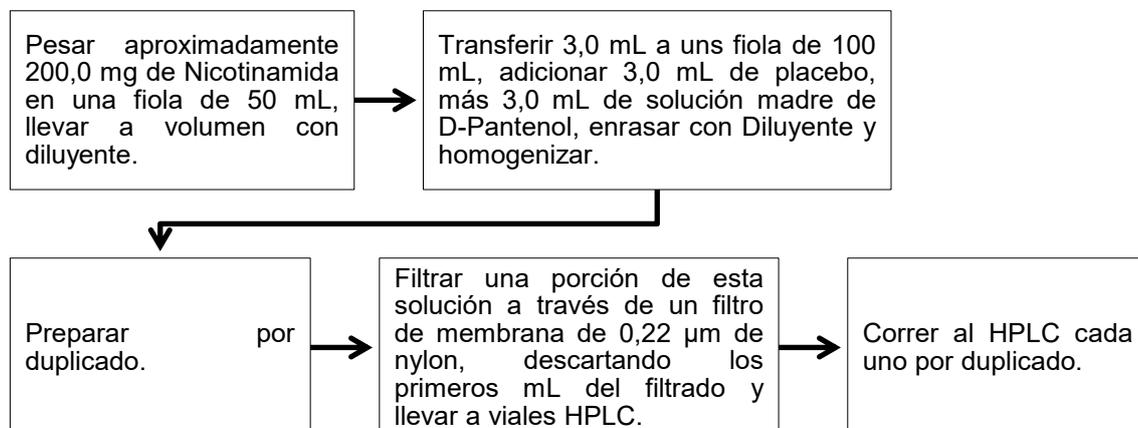
Pesar aproximadamente 50,0 mg de Tiamina clorhidrato en una fiola de 50mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de solución madre de d-pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO+ SOLUCIÓN MADRE DE D-PANTENOL + ESTÁNDAR DE NICOTINAMIDA AL 100 %:**

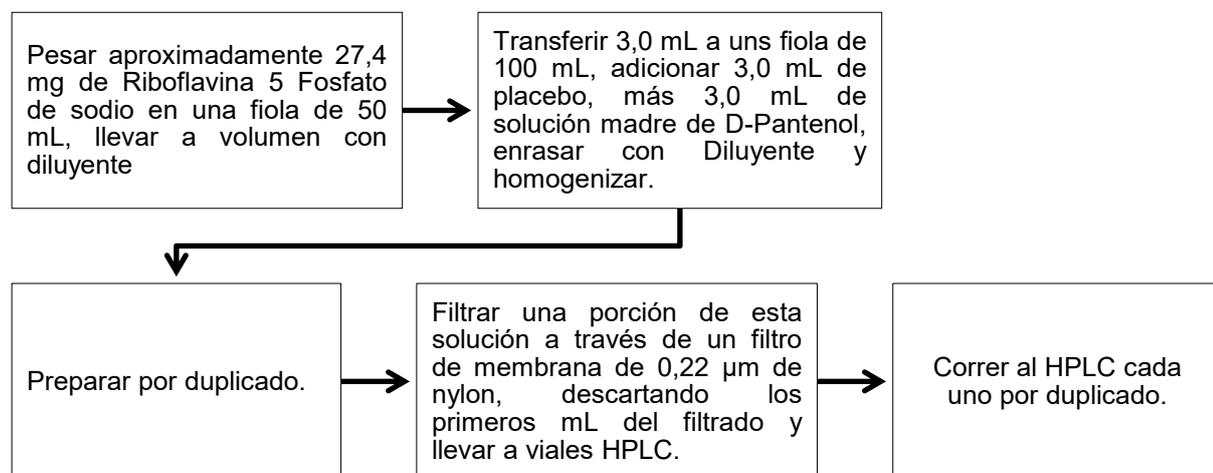
Pesar aproximadamente 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, llevar a volumen con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de solución madre de D-PANTENOL, enrasar con

diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.

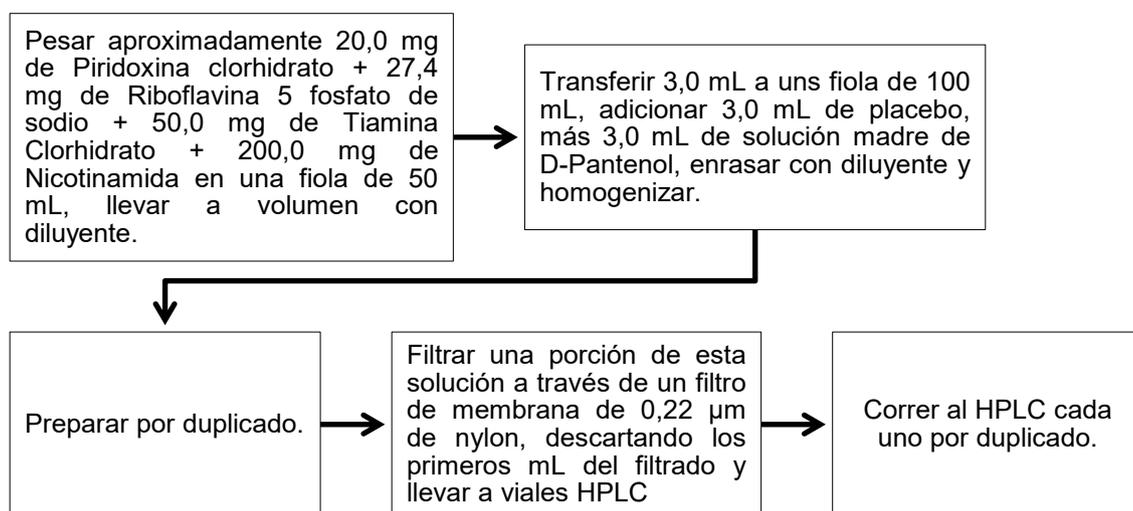


✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO+ SOLUCIÓN MADRE DE D-PANTENOL**

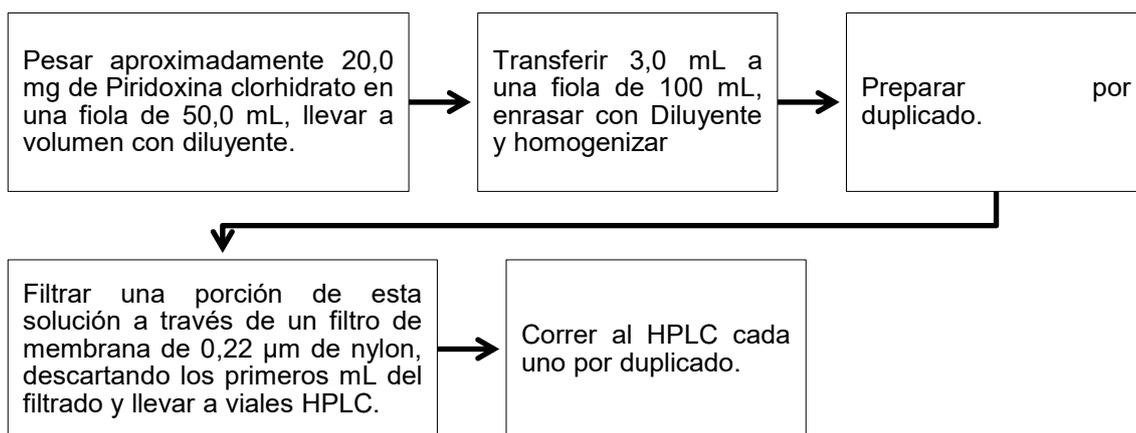
**+ ESTANDAR DE RIBOFLAVINA AL 100 %:** Pesar aproximadamente 27,4mg de Riboflavina 5 Fosfato de sodio, en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



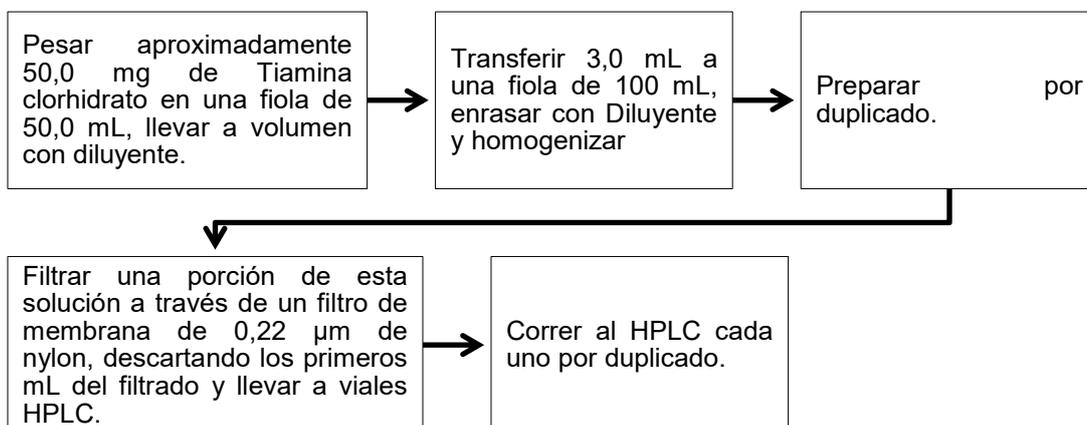
- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO+ SOLUCION MADRE DE D-PANTENOL + ESTANDAR DE PIRIDOXINA CLORHIDRATO AL 100% + TIAMINA CLORHIDRATO AL 100% + NICOTINAMIDA AL 100 % + RIBOFLAVINA AL 100%:** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu$ m, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



- ✓ **PREPARACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO PURO PIRIDOXINA CLORHIDRATO AL 100 %:** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu$ m, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.

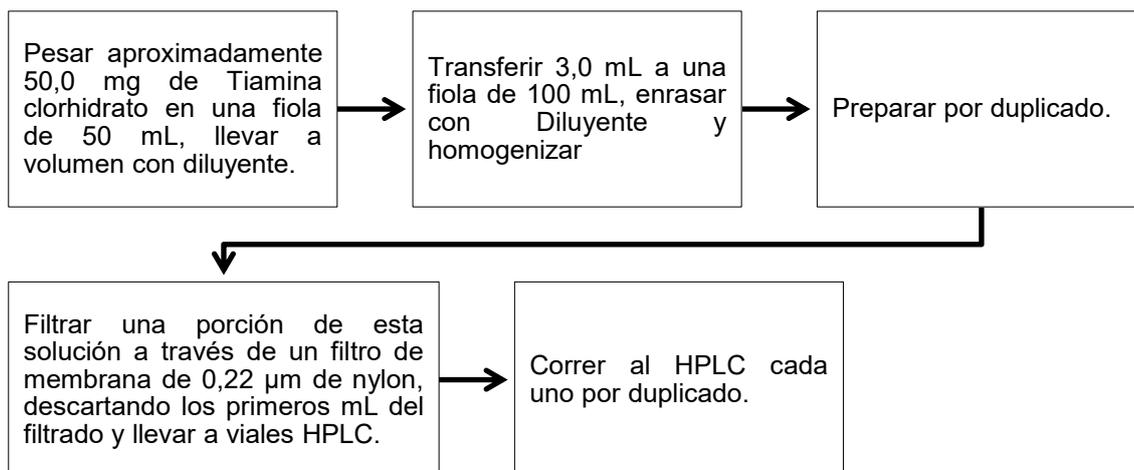


- ✓ **PREPARACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO PURO TIAMINA CLORHIDRATO AL 100%:** Pesar aproximadamente 50,0 mg de Tiamina clorhidrato en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



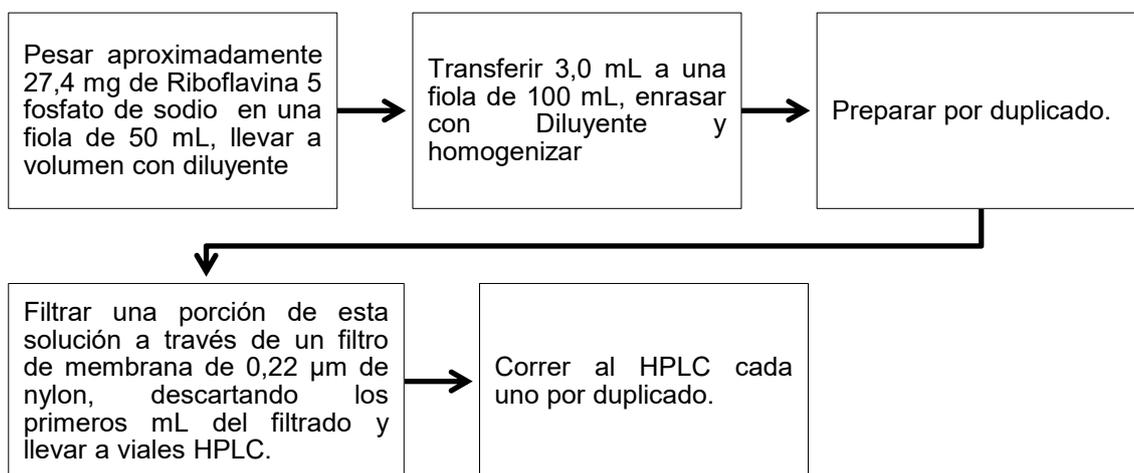
- ✓ **PREPARACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO PURO NICOTINAMIDA AL 100%:** Pesar aproximadamente 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de

0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado



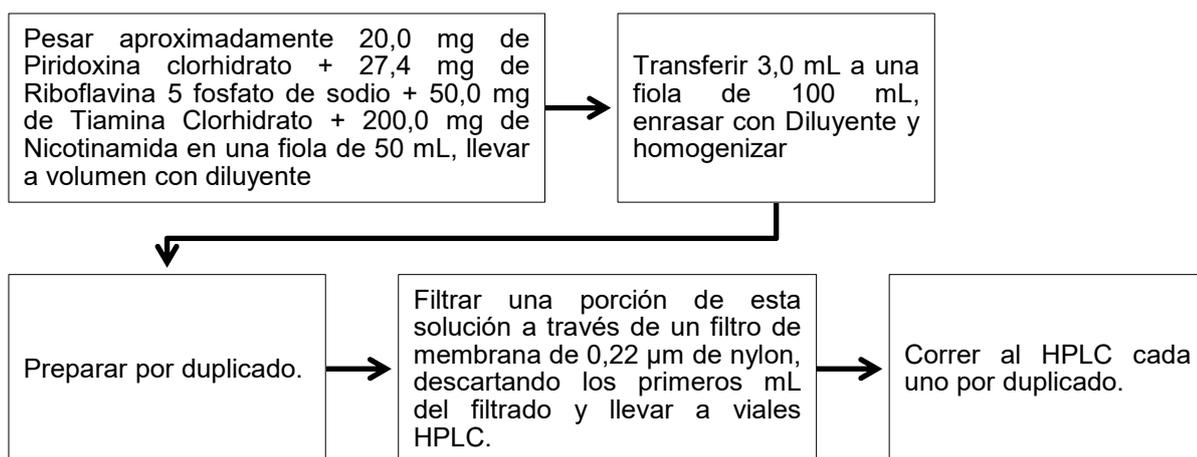
✓ **PREPARACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO PURO RIBOFLAVINA AL 100%:**

Pesar aproximadamente 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado

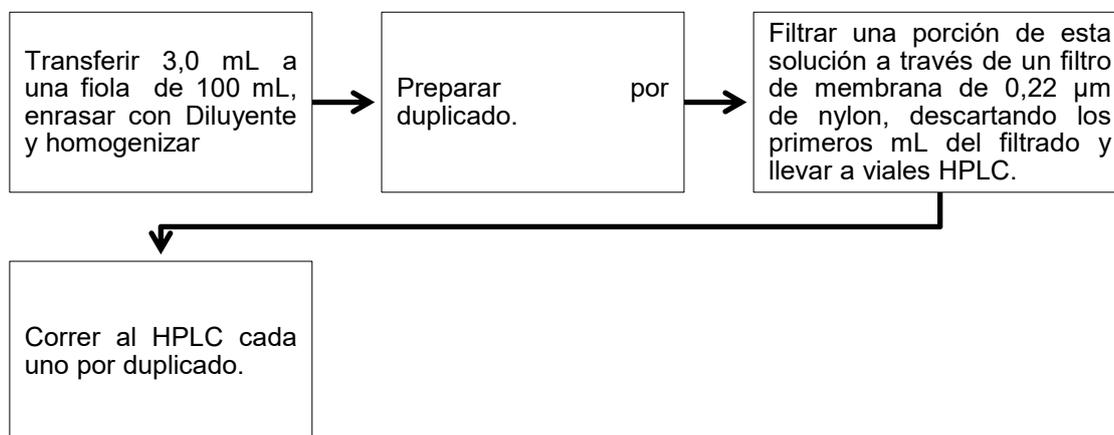


✓ **PREPARACION DE PRINCIPIO ACTIVO PURO DE PIRIDOXINA CLORHIDRATO AL 100% + TIAMINA CLORHIDRATO AL 100% + NICOTINAMIDA AL 100 % + RIBOFLAVINA AL 100%:** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg

de Nicotinamida en una fiola de 50mL, llevar a volumen con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC cada uno por duplicado.



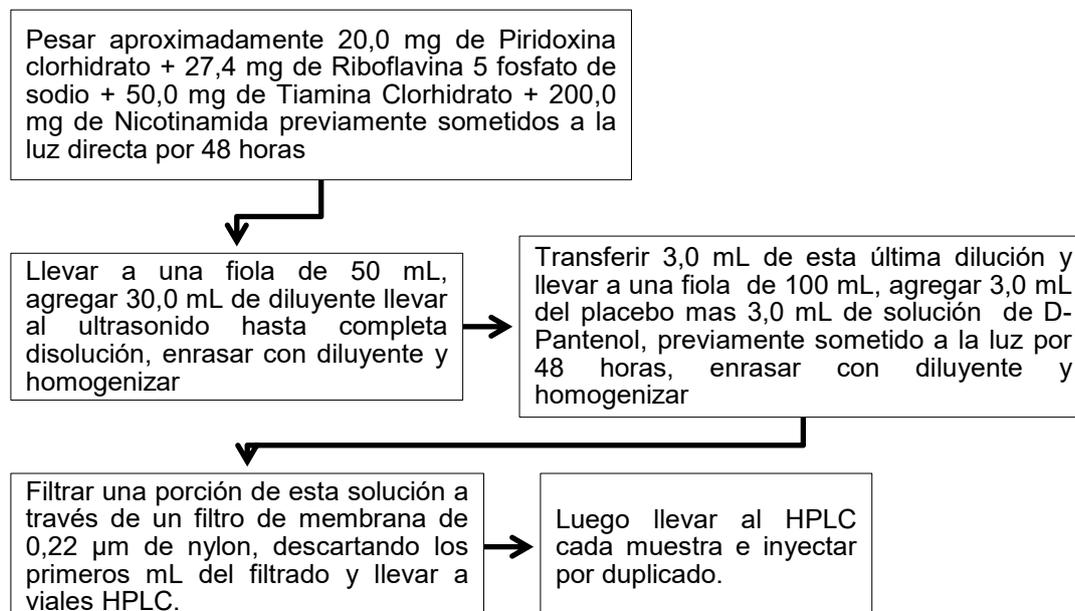
- ✓ **PREPARACIÓN DE CONTROL NEGATIVO:** Considerar una muestra diferente de producto terminado Clobuler Jarabe (Ambroxol clorhidrato) 15 mg/5mL Solución Oral lote **105177**, y realizar la preparación de la misma forma que la muestra, descrito en la técnica (ver técnica analítica del producto terminado jarabe multivitamínico). Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartando la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y correr al HPLC cada uno por duplicado.



✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO + SOLUCIÓN MADRE D- PANTENOL + ESTÁNDAR DE NICOTINAMIDA AL 100 %+ ESTÁNDAR DE RIBOFLAVINA AL 100%, ESTÁNDAR DE PIRIDOXINA CLORHIDRATO AL 100% + TIAMINA CLORHIDRATO AL 100% + ESTRÉS**

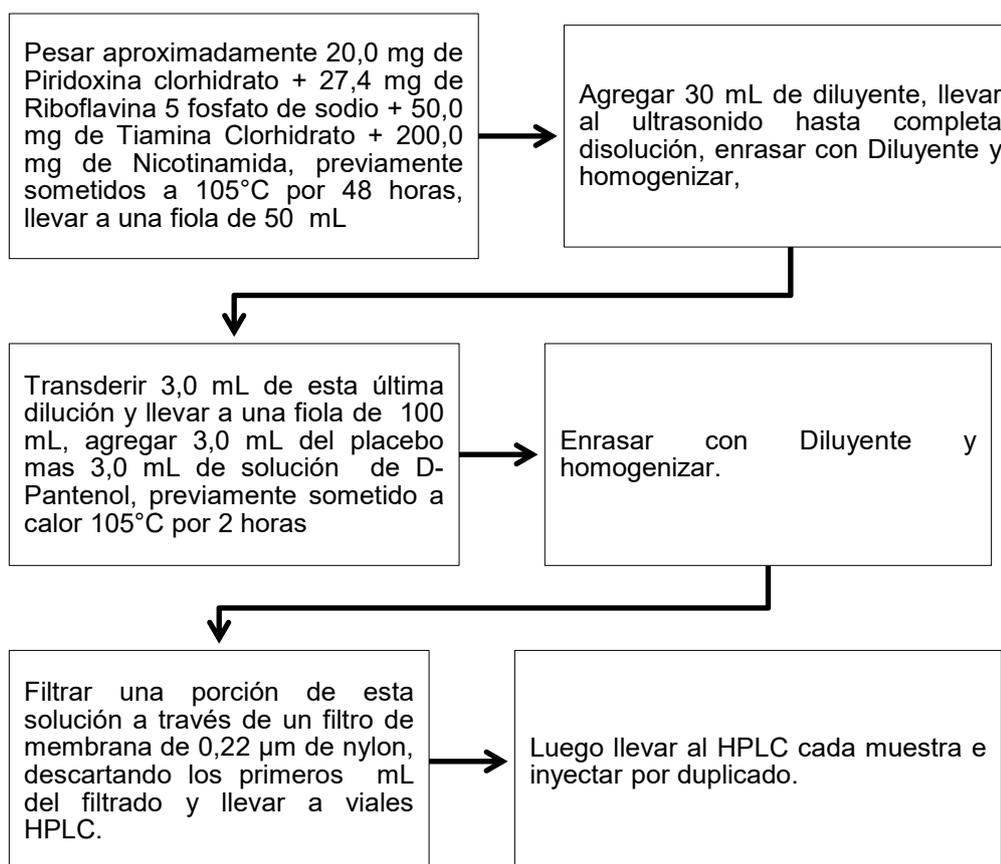
✓ **Placebo + sol. D-Pantenol + PAs (Luz + temperatura + humedad / Preparar por Duplicado):** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida previamente sometidos a luz directa durante 48 horas, llevar a un fiola de 50 mL, agregar 30mL de diluyente llevar a un proceso de ultrasonido hasta lograr completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, transferir 3,0 mL de esta última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D-Pantenol, previamente sometido a la luz por 48 horas, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



- ✓ **Placebo + sol. D-Pantenol + PAs (Calor seco 105 °C x 48 horas / realizar la preparación por Duplicado):** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida, previamente sometidos a 105 °C por 48 horas, llevar a fiola de 50 mL , agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido hasta lograr una completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, transferir 3,0 mL de la última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D-Pantenol, previamente sometido a calor 105°C por 2 horas, enrasar con diluyente y homogenizar. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

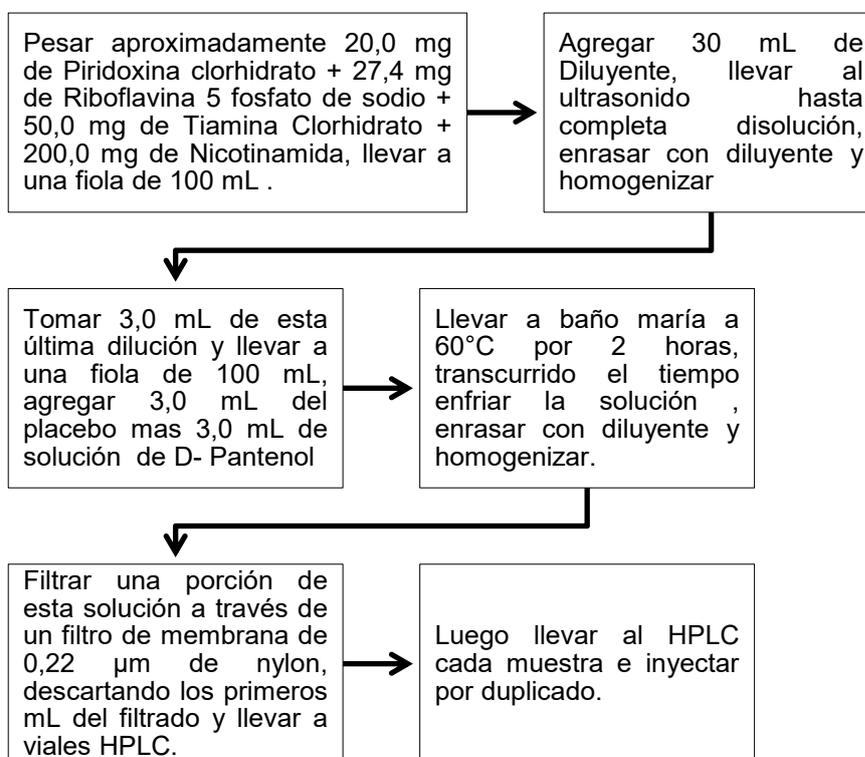
Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



- ✓ **Placebo + sol. d-pantenol + PAs (Calor húmedo 60°C durante 2 horas / Preparar por Duplicado):** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0

mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida, llevar a una fiola de 100 mL , adicionar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido hasta una lograr completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, transferir 3,0 mL de la última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D-Pantenol, Se llevará a baño maría a una temperatura de 60 °C durante 2 horas, pasado el tiempo se procede a enfriar la solución, enrasar con diluyente y homogenizar. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

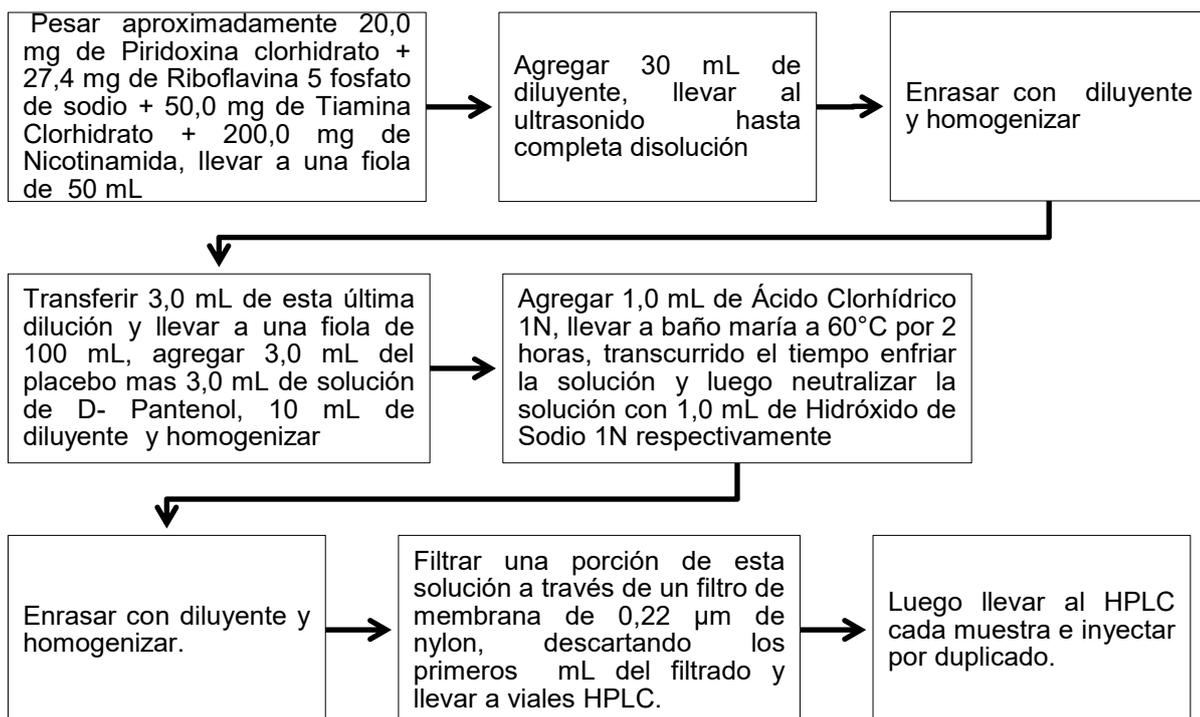
Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



- ✓ **Placebo + sol. d-pantenol + PA (hidrólisis ácida con Ácido Clorhídrico a 1N):** Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida, llevar a una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido hasta llegar a una completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, tomar 3,0 mL de esta última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D- Pantenol,

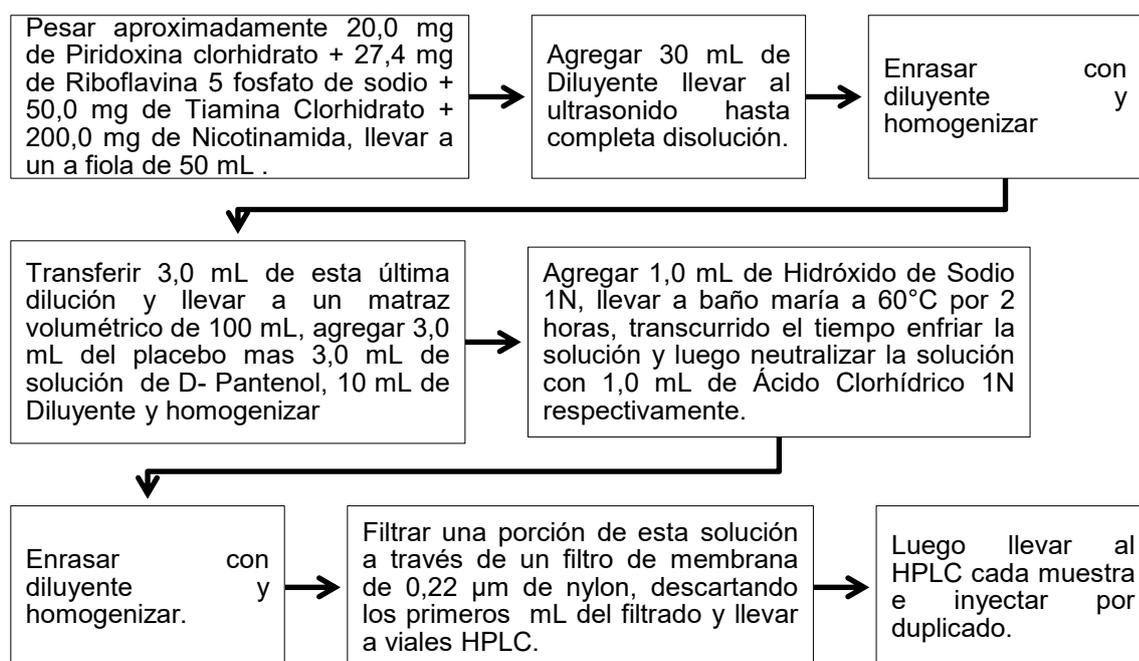
10mL de diluyente y homogenizar, **Se agregará 1,0 mL de reactivo Ácido Clorhídrico 1N, después se neutralizará esta solución con 1mL de Hidróxido de Sodio 1N respectivamente**, Se enrasará con diluyente y se homogenizará. Se filtrará una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



- ✓ **Placebo + sol. D-Pantenol + PA (hidrólisis Básica con Hidróxido de Sodio 1N):** Pesar un aproximado 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida, llevar a una fiola de 50mL, adicionar 30mL del diluyente llevar a un proceso de ultrasonido hasta lograr un completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, transferir 3,0 mL de esta última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D- Pantenol, 10,0 mL de diluyente y homogenizar, **Se agregará 1,0 mL de Hidróxido de Sodio 1N, llevar a un proceso de baño maría a una temperatura de 60 °C durante 2 horas, pasado el tiempo hacer enfriar esta**

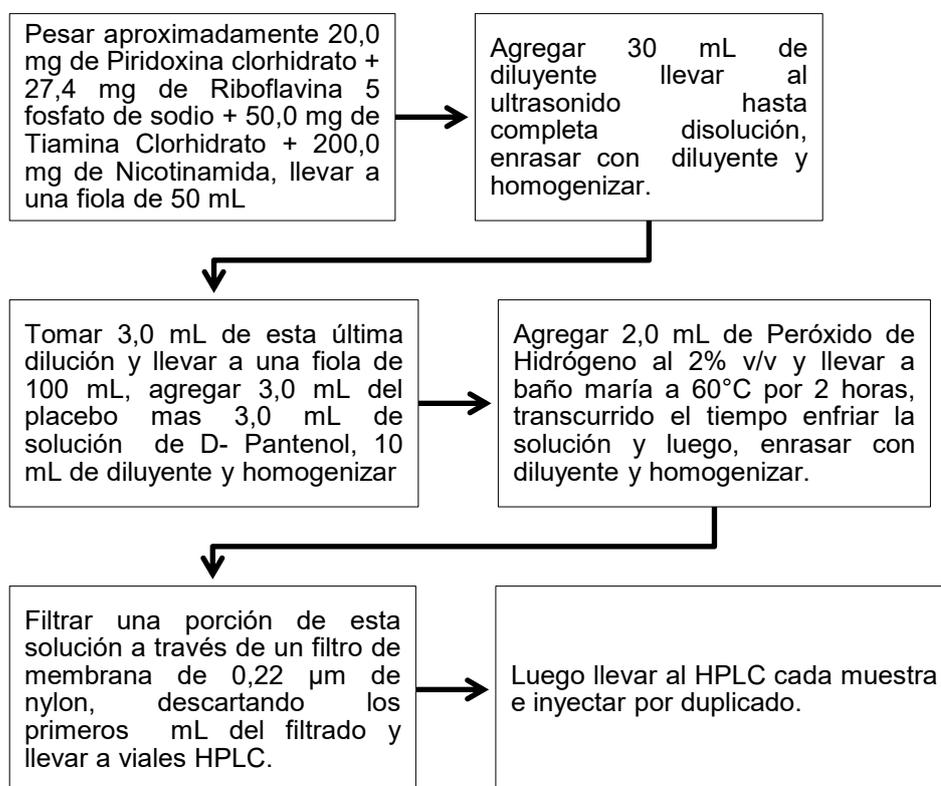
**solución y después neutralizar esta solución con 1,0 mL de Ácido Clorhídrico 1N respectivamente**, llevar a volumen con diluyente y homogenizar. Filtrar una pequeña cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC. Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



- ✓ **Placebo + sol. D-Pantenol + PA (Oxidación con Peróxido de Hidrógeno 2% v/v):** Pesar aproximadamente 20,0mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida, llevar a una fiola de 50 mL , adicionar 30 mL de diluyente llevar a un proceso de ultrasonido hasta lograr una completa disolución, enrasar con diluyente y homogenizar, transferir 3,0 mL de la última dilución y llevar a una fiola de 100 mL, agregar 3,0 mL del placebo más 3,0 mL de solución de D-Pantenol, 10,0 mL de diluyente y homogenizar, **Se agregará 2,0 mL del reactivo Peróxido de Hidrógeno al 2% v/v y llevar a un proceso de baño maría a una temperatura de 60 °C durante 2 horas, pasado el tiempo proceder a enfriar esta solución** y después, llevar a volumen con diluyente y homogenizar. Filtrar una pequeña porción de esta

solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

Luego llevar al HPLC cada muestra e inyectar por duplicado.



#### ✓ LINEALIDAD:

Este parámetro evalúa la capacidad del método para lograr resultados linealmente proporcionales se determina directamente o por una transformación matemática, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. **(3)**

Se mide parámetros como: Coeficiente de correlación, coeficiente de variación de respuesta, además se evalúa el cumplimiento de Prueba: Test de proporcionalidad y Linealidad.

Se desarrolla y evalúa 2 tipos de Linealidad:

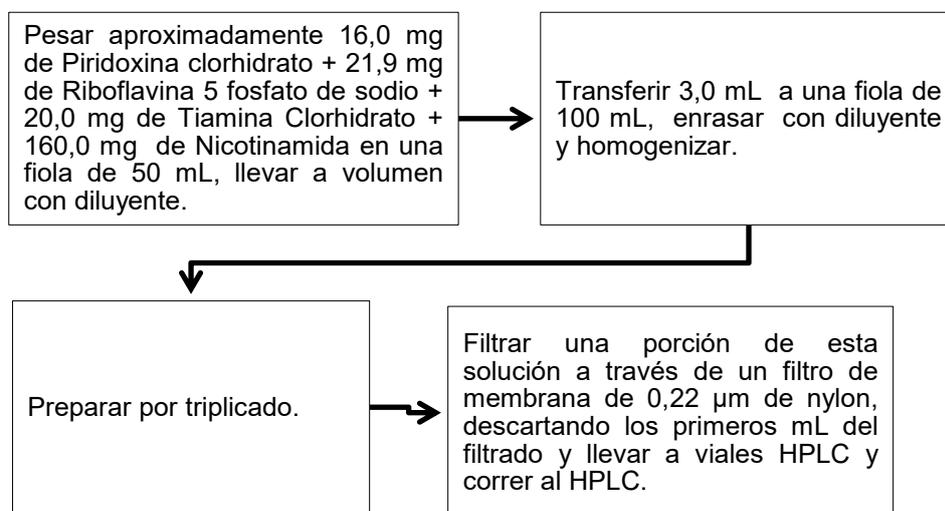
- **Linealidad del Sistema:** Se trabaja con estándares
- **Linealidad del Método:** Se trabaja con estándares con placebos de producto.

### LINEALIDAD DE SISTEMA:

En este parámetro se valora la capacidad del procedimiento analítico de alcanzar resultados linealmente proporcionales de la concentración del ingrediente farmacéutico activo, haciendo uso del estándar de Piridoxina Clorhidrato + Tiamina Clorhidrato + Nicotinamida + Riboflavina 5 fosfato de sodio. Se preparan las muestras mixtas dispensadas separadamente para lograr cinco niveles de concentración del activo, se indican las concentraciones de trabajo: **80 %, 100%, 120% 140% y 160%, para Piridoxina clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina, y 40%, 100%, 160%, 220 % y 280 %, para Tiamina clorhidrato.** Se dispensa las cantidades de los activos en un mismo matraz volumétrico (**1° Dilución**) para cada nivel de concentración, se trabaja por triplicado y se procede según técnica analítica preparación de estándares:

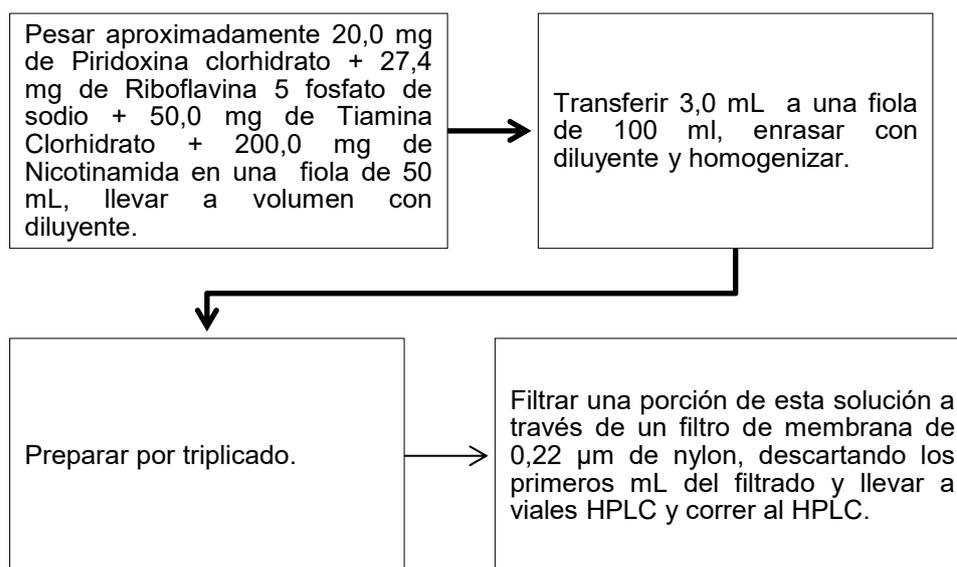
#### ✓ **Solución mixta 1: (80 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 40 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 16,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 21,9 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 20,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 160,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



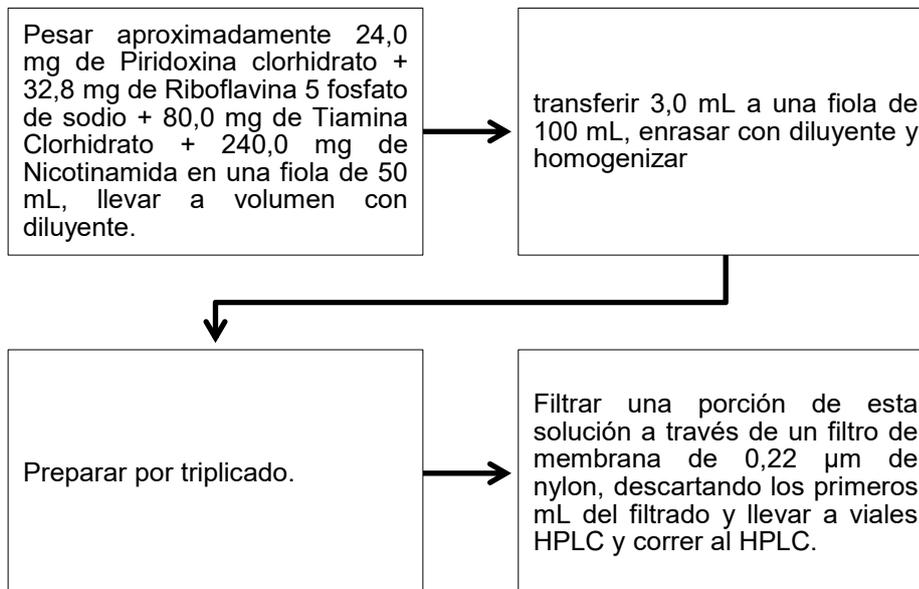
✓ **Solución mixta 2: (100 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 100 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



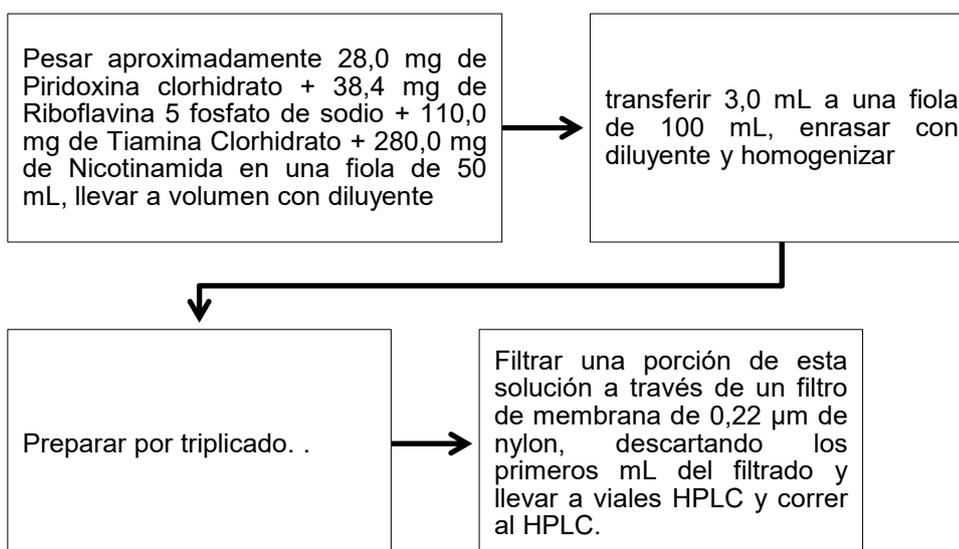
✓ **Solución mixta 3: (120 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 160 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 24,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 32,8 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 80,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 240,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



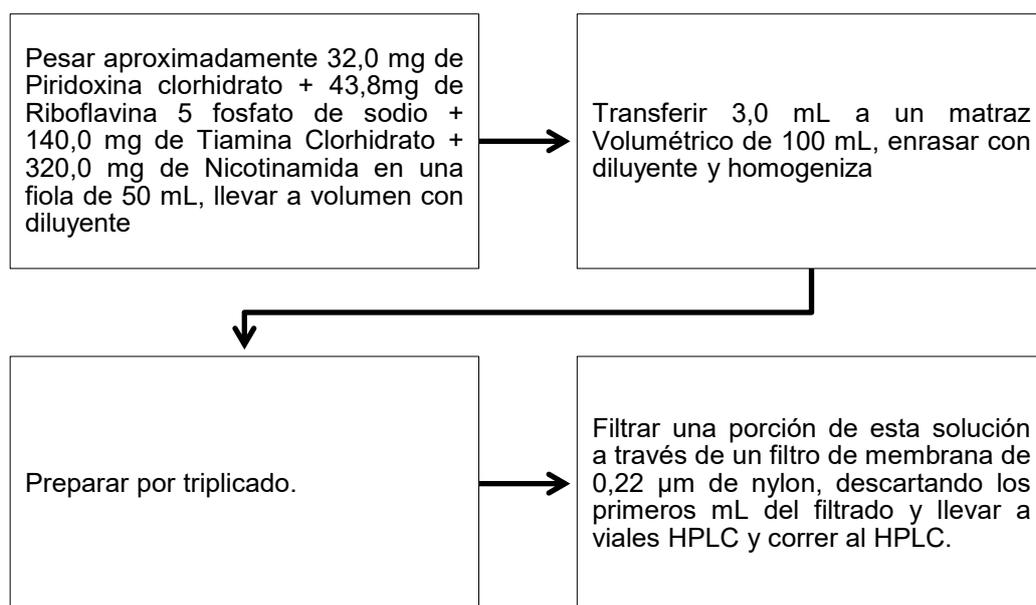
✓ **Solución mixta 4: (140 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 220 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 110,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



✓ **Solución mixta 5: (160 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 280 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 32,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 43,8 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 140,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 320,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



**La preparación de cinco niveles de concentraciones:** Preparar cada uno de los cinco niveles de concentración, se trabaja por **triplicado** y proceder según la técnica analítica del producto terminado – Preparación del estándar mixto y proceder a llevar al equipo por HPLC e inyectar por duplicado cada una de las 15 muestras.

✓ **LINEALIDAD DEL MÉTODO:**

Este parámetro valora la capacidad del método analítico de contar con resultados linealmente proporcionales de la concentración del activo, haciendo uso del placebo más solución madre de D-Pantenol, para verificar de cómo interfiere la matriz de este en los resultados de la linealidad.

✓ **Se prepararán Principios activos al 80 %, 100%, 120% 140% y 160%, para Piridoxina clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina, y 40%, 100%, 160%, 220 % y 280 %, para Tiamina clorhidrato.**

**Las cantidades a pesar son respectivamente:** Por cada rango de concentración en el mismo matraz volumétrico por triplicado, según la técnica analítica de preparación del estándar mixto.

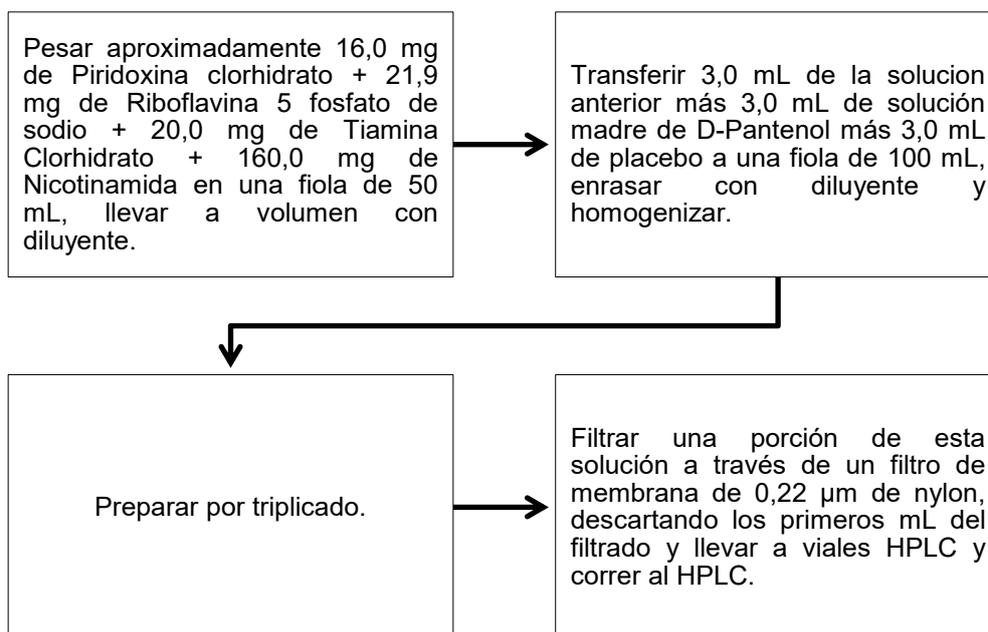
✓ **Solución madre de D-Pantenol 140%:** Pesar aproximadamente 42,0 mg de D-Pantenol a una fiola de 50mL, llevar a volumen con agua.

✓ **Placebo**

✓ **Solución muestra mixta 1: (80 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato, 40 % de tiamina clorhidrato).**

Pesar aproximadamente 16,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 21,9 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 20,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 160,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente.

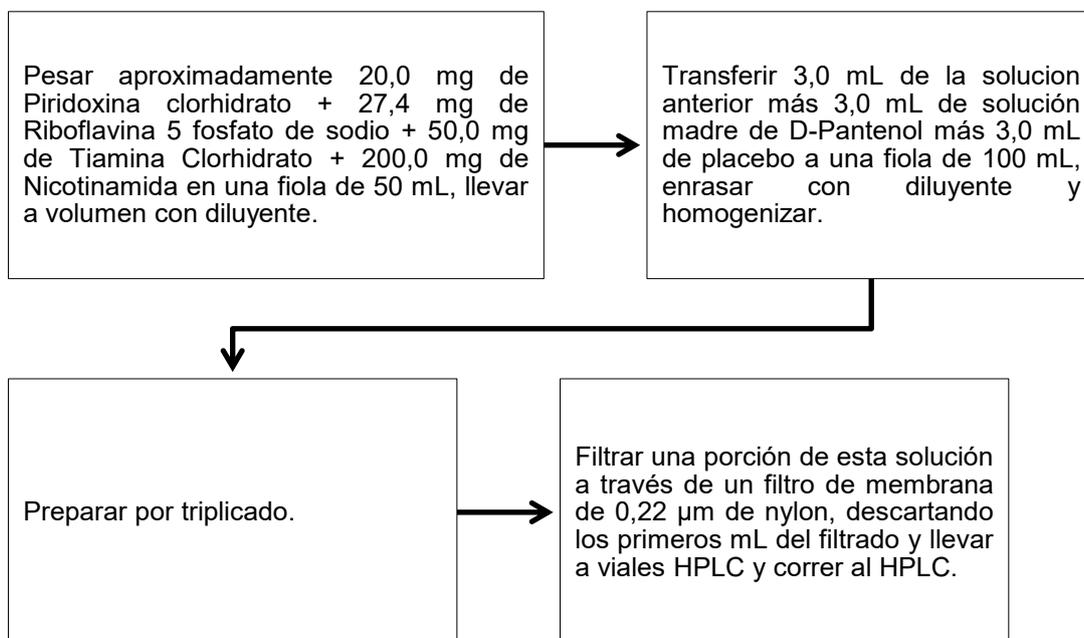
Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



✓ **Solución muestra mixta 2: (100 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 100 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente.

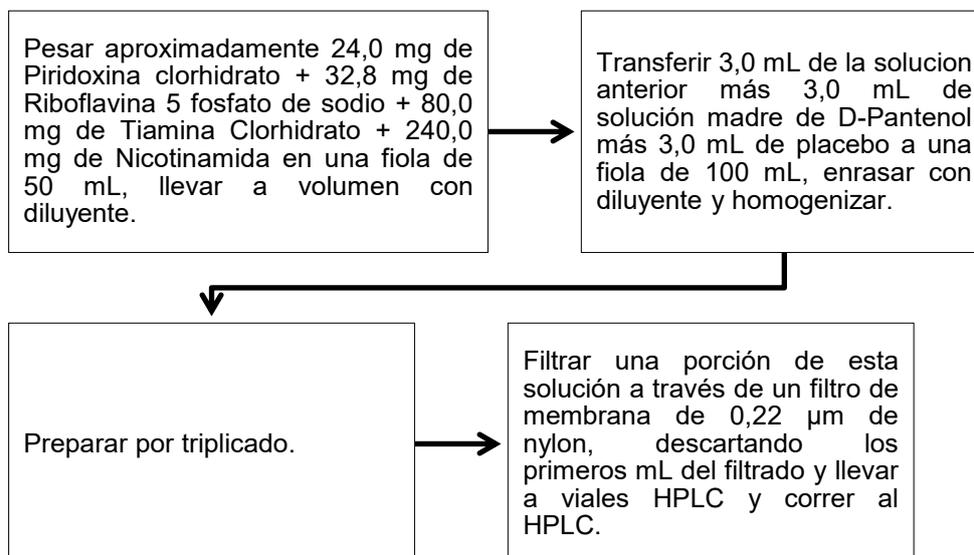
Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



✓ **Solución muestra mixta 3: (120 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 160 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 24,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 32,8 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 80,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 240,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente.

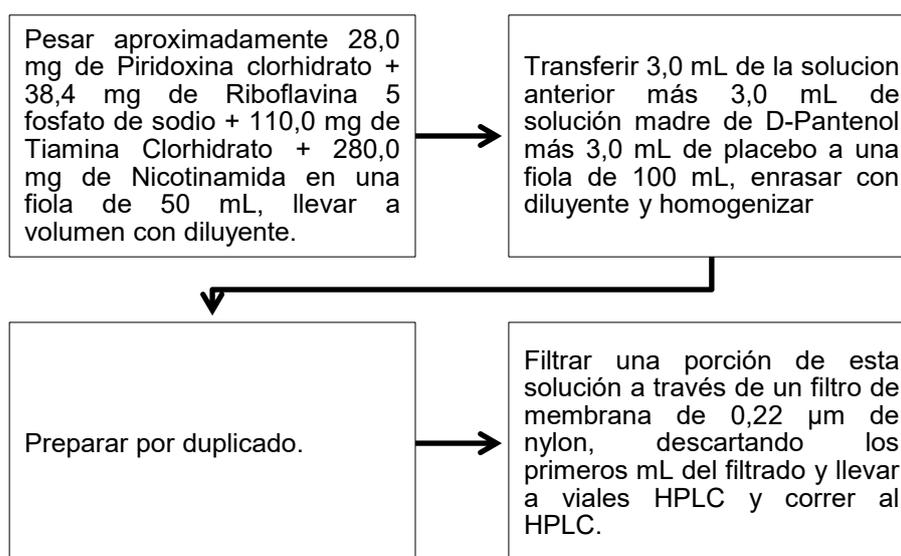
Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



✓ **Solución muestra mixta 4: (140 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 220 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 110,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente.

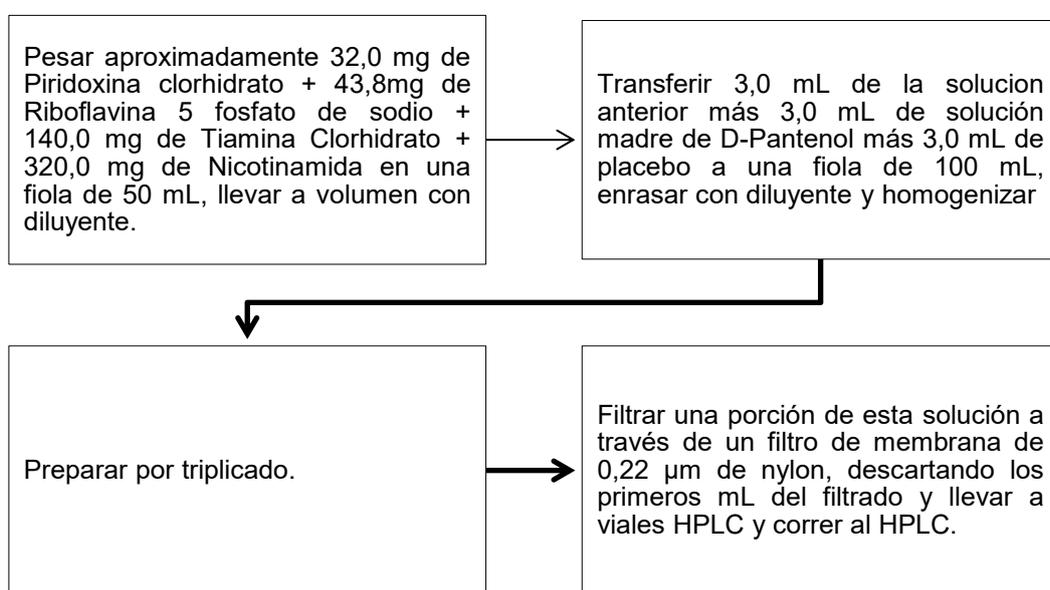
Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



✓ **Solución muestra mixta 5: (160 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 280 % de tiamina clorhidrato).**

Pesar aproximadamente 32,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 43,8mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 140,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 320,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente.

Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100mL, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.



**Las cantidades de placebo son respectivamente:**

	Concentración		mL de Placebo	ml de sol. Madre de D-Pantenol
Estándar 1	80%	40%	3mL	3mL
Estándar 2	100%	100%	3mL	3mL
Estándar 3	120%	160%	3mL	3mL
Estándar 4	140%	220%	3mL	3mL
Estándar 5	160%	280%	3mL	3mL

Fuente: Elaboración propia

**Preparación de las concentraciones los 5 niveles:** Realizar la preparación de las concentraciones, cada nivel de concentración por **triplicado** y proceder según el método analítico del producto terminado – Preparación de la solución estándar mixto de referencia y proceder a llevar al equipo por HPLC e inyectar por duplicado cada una de las 15 muestras.

**Preparación del Estándar:** Preparar según técnica analítica del producto terminado - preparación de la solución estándar mixta de referencia en el ítem (3.7.6.), Preparar por duplicado e inyectar 3 veces para cada estándar secundario.

**La información obtenida de los resultados puede ser la evaluación de la Exactitud.**

✓ **PRECISIÓN:**

Este parámetro nos permite evaluar en nivel de variación entre resultados de las pruebas individuales cuando se analiza con el método analítico repetidamente y múltiples muestreos de una sola muestra homogénea, se mide el grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico. Este parámetro analítico determina: La desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. **(3)**

Se considera en número de lectura para los siguientes estándares

Estándar 1: Realizar 3 Inyecciones

Estándar 2: Realizar 3 Inyecciones

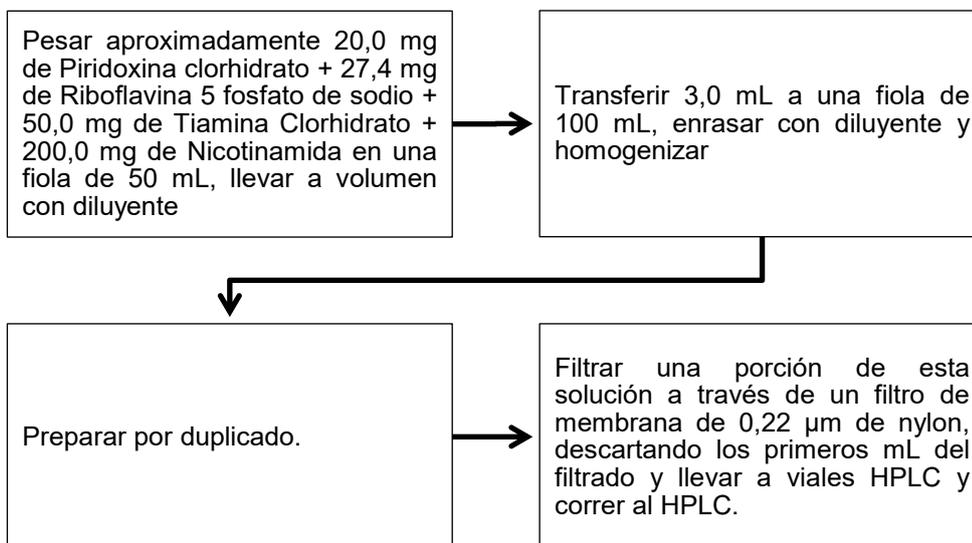
✓ **PRECISIÓN DEL SISTEMA:**

Se realiza el estudio con solución de estándar mixto de Nicotinamida (100%), Piridoxina clorhidrato (100%), Tiamina clorhidrato (100.00%), Riboflavina (100%).

Se preparan 2 determinaciones de solución estándar mixto a una concentración de trabajo. Se realiza la preparación según técnica analítica del producto terminado - preparación de la solución estándar mixta de referencia en el ítem (3.7.6.) y se inyecta por 3 inyecciones cada uno.

**Preparación del estándar:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, enrasar con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo, más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Se filtrará una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar una corrida en el HPLC.



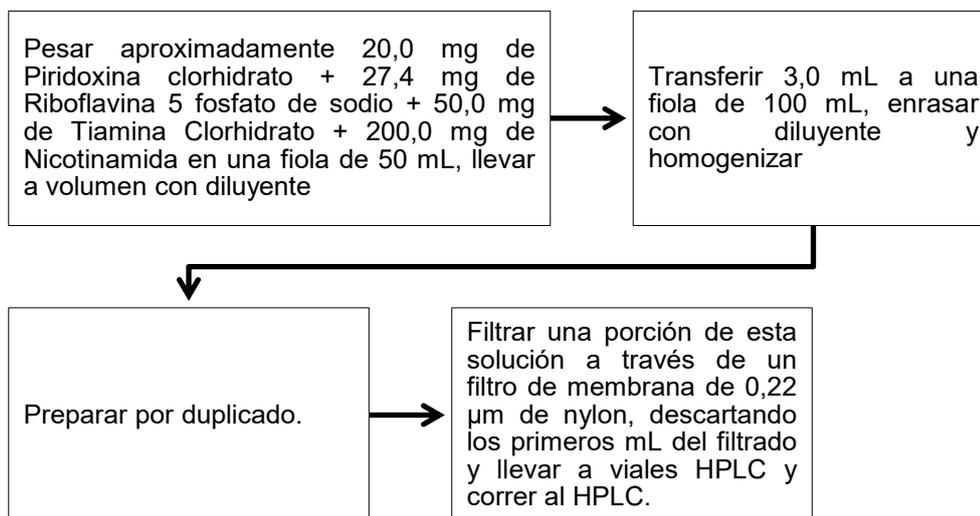
Concentración
Nicotinamida: 0.12 mg / mL
Riboflavina: 0.01644 mg / mL
Piridoxina clorhidrato: 0.012 mg / mL
Tiamina clorhidrato: 0.024 mg / mL

**Se evalúa el Coeficiente de Variación a todos los datos obtenidos.**

✓ **REPETIBILIDAD DEL MÉTODO:**

**Preparación del Estándar:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, llevar a volumen con diluyente, transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo, más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar una corrida en el HPLC.

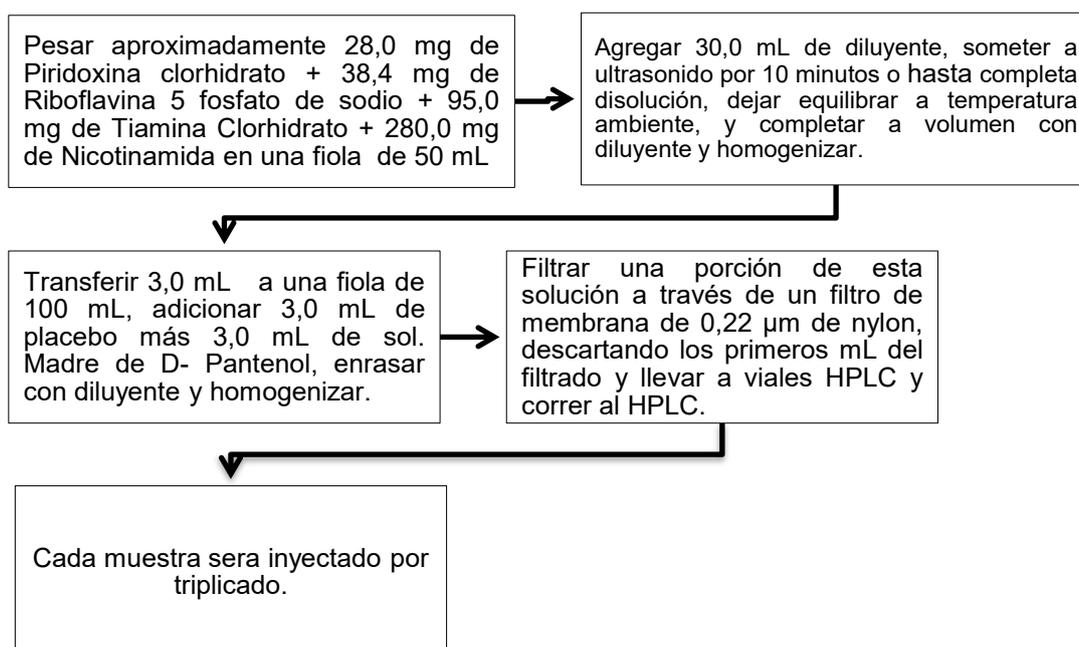


Preparar por duplicado e Inyectar por 3 veces para cada estándar secundario. Se trabaja con principio activo mixto: Nicotinamida (100%), Piridoxina clorhidrato (100%), Tiamina clorhidrato (100%), Riboflavina (100%).

#### ✓ Preparación de muestra:

Se preparan 10 muestras de principio activo mixto Nicotinamida (140%), Piridoxina clorhidrato (140%), Tiamina clorhidrato (190%), Riboflavina (135%). + Placebo de Producto al 100% + Sol. Madre de D- Pantenol, a la concentración de trabajo, según método analítico, filtrar con filtros nylon de 0.22 µm y llevar a viales HPLC y correr al HPLC.

Cada muestra será leída por triplicado.



Determinar coeficiente de variación al conjunto de resultados obtenidos.

Asimismo, los resultados obtenidos serán usados como información para el Analista 1, esto en la evaluación de Precisión Intermedia.

✓ **PRECISIÓN INTERMEDIA:** Este parámetro evalúa la capacidad de dispersión de los resultados obtenidos en un Laboratorio, se realizará con la colaboración de diferentes analistas:

- Analista 1
- Analista 2

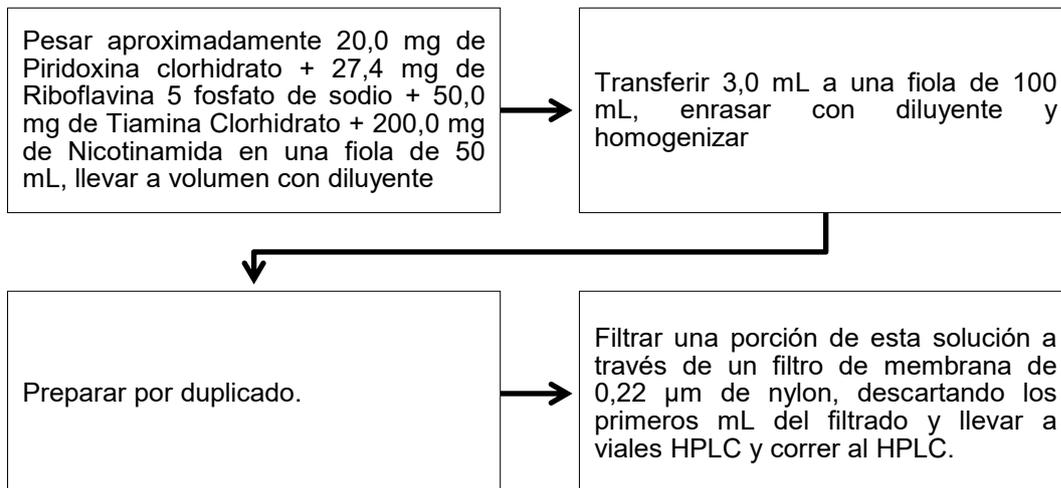
Los analistas trabajarán en diferentes días. Se evalúa entonces la capacidad de dispersión de resultados obtenidos de los 2 analistas que realizan un análisis a partir de la misma muestra solución homogénea (pool) de un producto, con la diferencia de que se analiza en diferentes días.

✓ **Preparación de los Estándar 1 al 100 %:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, y agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido por diez minutos o hasta una disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, y enrasar con diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.

✓ **Preparación de los Estándar 2 al 100 %:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, y agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido por diez minutos o hasta una disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, y enrasar con diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.

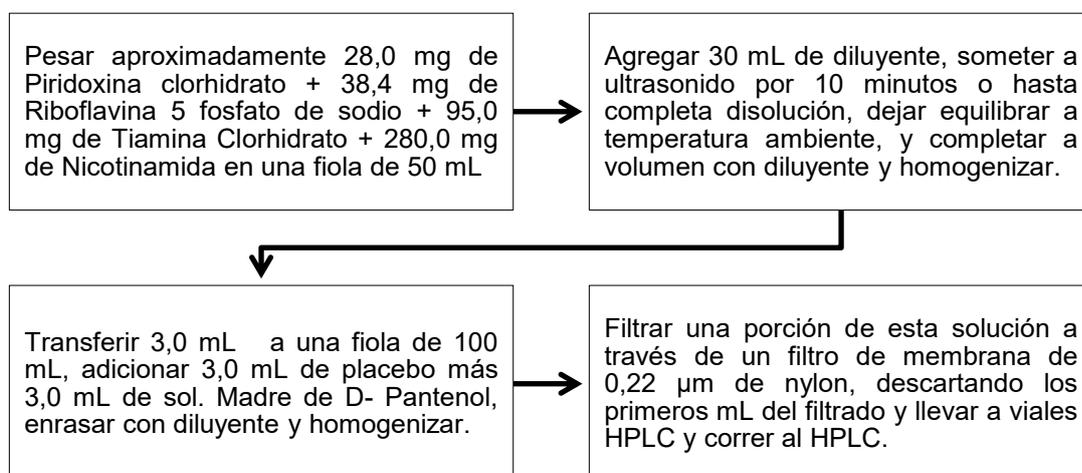


✓ **Preparación de las muestras:**

La preparación de la muestra se realizará por 10 veces a las siguientes concentraciones, Piridoxina Clorhidrato (140%) + Tiamina Clorhidrato (190%) + Riboflavina (135 %) + Nicotinamida (140%) + Placebo + Sol. Madre de D- Pantenol.

Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, y agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido por 10 minutos o hasta disolución completa, dejar equilibrar a temperaturas ambiente, enrasar a volumen con diluyente y homogenizar.

Transferir 3 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.



**DIA 1: ANALISTA 1**

<b>Concentración</b>	<b>mg del Estándar de Piridoxina HCl + Tiamina HCl + Riboflavina + Nicotinamida</b>
<b>Estándar 100%-1</b>	<b>al</b> Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, y completar a volumen con el diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>Estándar 100%-2</b>	<b>al</b> Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, y completar a volumen con el diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 1)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y

	homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 2)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 3)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 4)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola

	de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 5)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 6)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 7)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa

	<p>disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 8)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 9)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 10)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola</p>

	de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
--	---

### DIA 2: ANALISTA 2

Concentración	mg del Estándar de Piridoxina HCl + Tiamina HCl + Placebo
<b>Estándar 100%-1</b>	al Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, y completar a volumen con el diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>Estándar 100%-2</b>	al Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, y completar a volumen con el diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de

	membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 1)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 2)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 3)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol.

	<p>Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 4)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 5)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 6)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar</p>

	<p>con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 7)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 8)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.</p>
<b>(Muestra 9)</b>	<p>Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso</p>

	de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.
<b>(Muestra 10)</b>	Pesar aproximadamente 28,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 38,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 95,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 280,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una completa disolución, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Traspasar 3,0 mL a una fiola de 100 mL, adicionar 3,0 mL de placebo más 3,0 mL de sol. Madre de D- Pantenol, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.

Se determina el coeficiente de variación a los resultados obtenidos.

**✓ EXACTITUD:**

En este parámetro se estudia la cercanía que existe entre el valor teórico y el valor obtenido.

La exactitud de un método analítico es la concordancia que existe entre valores obtenidos de la prueba por medio de la técnica analítica en estudio y el valor teórico o verdadero. La exactitud permite expresar la recuperación de las cantidades agregadas de analito en la muestra. **(3)**

Se realiza un análisis con los 3 niveles de concentraciones con las que se trabajó en la prueba de linealidad del método en cuanto al estándar preparar por duplicado según método analítico –preparación de la solución estándar mixta de referencia en el ítem (3.7.6) y llevar al HPLC el análisis se realiza por triplicado.

Se preparan Placebos + activos del Producto a los 3 niveles de concentraciones de: **80%, 120% y 160% para Piridoxina clorhidrato, Nicotinamida y Riboflavina, 40%, 160 % y 280 % para Tiamina clorhidrato**. Los tres niveles de concentración se analizarán por duplicado, se evaluará la data obtenida de las 9 muestras (se trabajará con 2 inyecciones de cada muestra).

Se valora la concentración en mg/5mL del activo obtenido, obteniendo resultados del Porcentaje de Recuperación Media, coeficiente de variación, desviación estándar. Determinando la Prueba de Student para todos los datos obtenidos.

#### **Preparación de los estándares:**

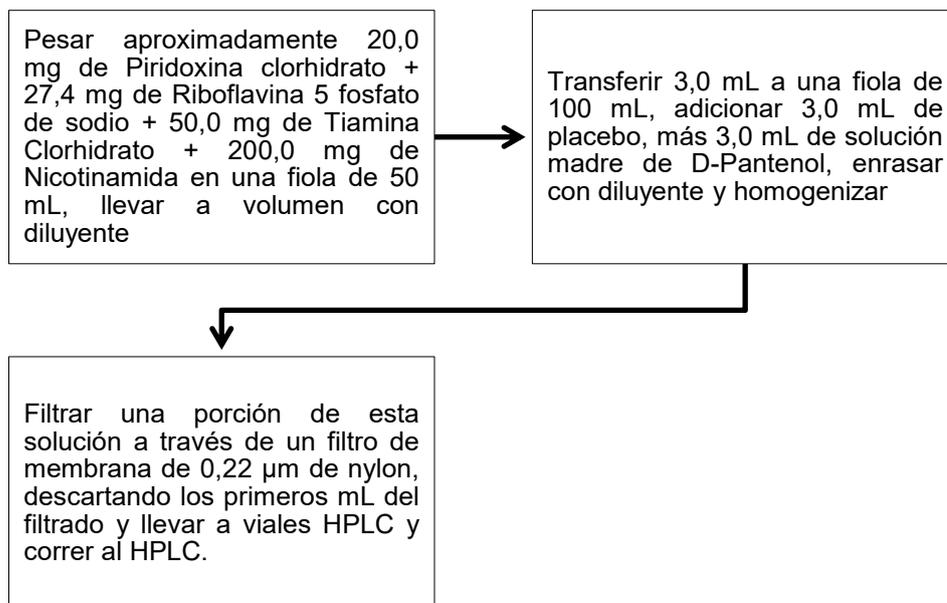
Cada estándar será inyectado por triplicado.

##### **✓ Preparación de estándar: Preparación de los Estándar 1 al 100 %:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de 0,22 µm de nylon, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.

##### **✓ Preparación de los Estándar 2 al 100 %:**

Pesar aproximadamente 20,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 200,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de diluyente, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, enrasar con diluyente y homogenizar. Transferir 3,0 mL a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de 0,22 µm de nylon, descartar la primera parte del filtrado y colocar en vial HPLC.

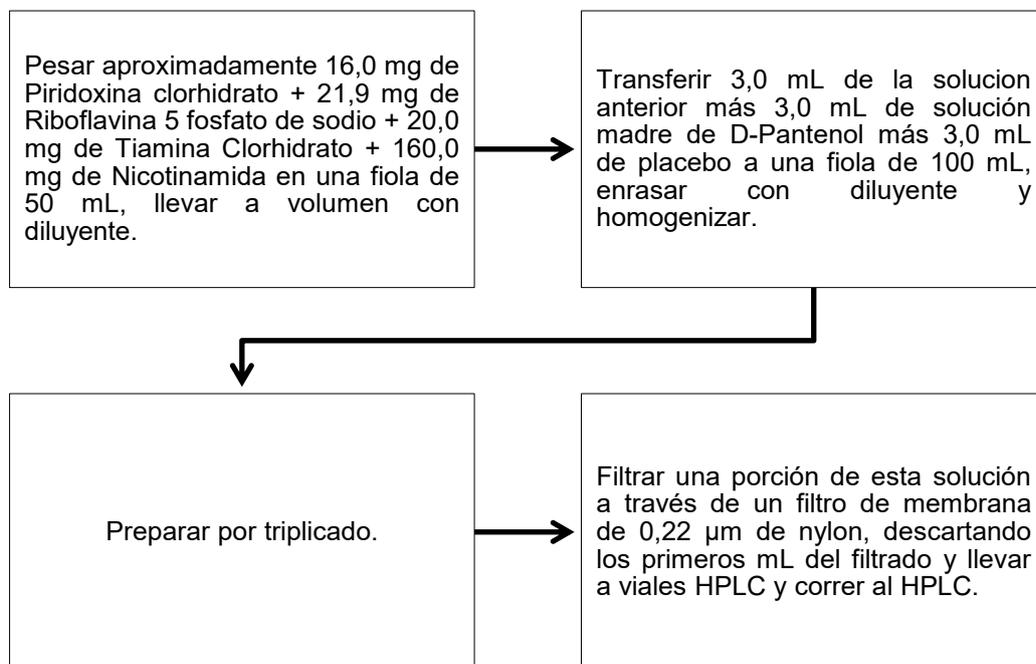


**Las cantidades a pesar son respectivamente para las muestras:**

Cada muestra se prepara por triplicado, y será inyectada por duplicado

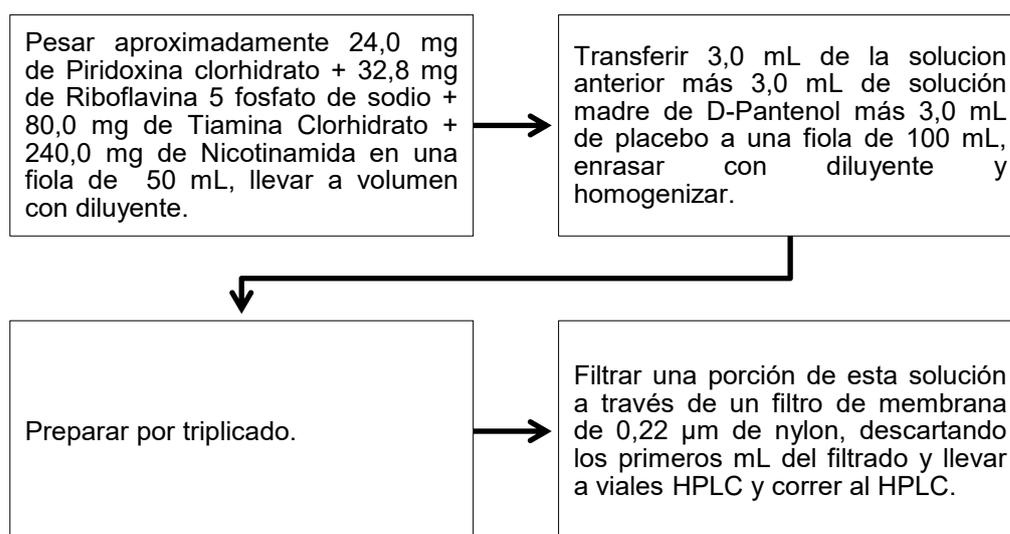
- ✓ **Solución madre de D-Pantenol 140%:** Pesar aproximadamente 42,0 mg de D-Pantenol a una fiola de 50,0 mL, llevar a volumen con agua.
- ✓ **Placebo:** todos los excipientes sin activos (preparados en laboratorio)
- ✓ **Solución muestra mixta 1: (80 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 40 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 16,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 21,9 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 20,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 160,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50mL, enrasar con diluyente. Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.



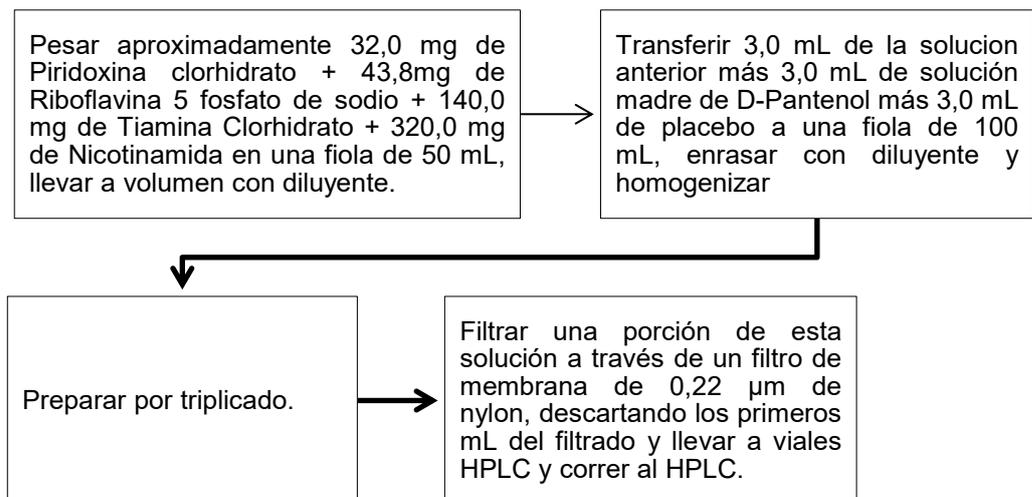
✓ **Solución muestra mixta 3: (120 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 160 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 24,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 32,8 mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 80,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 240,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50mL, enrasar con diluyente. Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.



✓ **Solución muestra mixta 5: (160 % para nicotinamida, riboflavina y piridoxina clorhidrato: 280 % de tiamina clorhidrato)**

Pesar aproximadamente 32,0 mg de Piridoxina clorhidrato + 43,8mg de Riboflavina 5 fosfato de sodio + 140,0 mg de Tiamina Clorhidrato + 320,0 mg de Nicotinamida en una fiola de 50mL, enrasar con diluyente. Transferir 3,0 mL de la solución anterior más 3,0 mL de solución madre de D-Pantenol más 3,0 mL de placebo a una fiola de 100 mL, enrasar con diluyente y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.



✓ **RANGO:**

En este parámetro se determina si el método analítico cumple en los intervalos superior e inferior, así como los márgenes de concentraciones establecidas. Posterior al cumplimiento de las especificaciones para los parámetros de Linealidad, Precisión y Exactitud, es factible establecer el rango del método analítico. Como parte de la Validación del Método Analítico, se efectúa La prueba de Aptitud del Sistema ó System Suitability Test (SST).

**3.7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA UTILIZAR PARA EL PROCESAMIENTO DE RESULTADOS.**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
<b>APTITUD DEL SISTEMA</b>	La desviación estándar relativa entre las 5 lecturas continuas del estándar no debe ser mayor o igual del 2%, ( $DSR \leq 2\%$ ).
<b>SELECTIVIDAD</b>	No debe existir interferencias en la determinación del analito: Piridoxina HCl, Nicotinamida, Riboflavina y la Tiamina HCl por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz. Así mismo el analito debe ser estable con las diferentes condiciones de estrés y la recuperación de la concentración de activos debe ser en no menos del 85% de lo declarado.
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO</b>	Se determina Coeficiente de correlación ( $r$ ): $\geq$ (mayor que o igual a) 0,999 Cálculo de la ecuación de la recta de regresión lineal: $y = b x + a$ Determinar el valor de: $a$ =Intercepto, $b$ = Pendiente <u>Test de Linealidad</u> Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta (CV): Máximo 2 % ( $CV \leq 2\%$ ) "T" de Student experimental mayor al "T" tablas ( $T_{exp} > T_{tabla}$ ) <u>Test de Proporcionalidad</u> "T" de Student experimental menor al "T" tablas ( $T_{exp} < T_{tabla}$ )
<b>PRECISIÓN</b>	<u>Precisión del Sistema ó Repetibilidad Instrumental:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2 % <u>Repetibilidad del Método:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2 % <u>Precisión Intermedia:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2 %
<b>EXACTITUD</b>	<u>Porcentaje de Recuperación Media:</u> 98,0 - 102% "T" de Student experimental menor al "T" de tablas ( $T_{exp} < T_{tablas}$ )
<b>RANGO</b>	Cumplida las especificaciones para Linealidad, Precisión y Exactitud, se define el Rango del Método Analítico.

Fuente: Elaboración propia

### 3.7.12. PROTOCOLO DE LA VALIDACIÓN DE TÉCNICA ANALÍTICA DE D-PANTENOL POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN:

#### 3.7.12.1. MATERIALES, REACTIVOS, PATRONES, EQUIPOS

##### ✓ MATERIALES:

- Matraz Volumétrico de 50mL
- Pipeta graduada de: 5mL
- Pipeta volumétrica de: 1mL.
- Pipeta volumétrica de 2mL
- Probeta de 500 mL.
- Probeta de 2000 mL
- Beaker de 500 mL y 2000 mL
- Filtros Nylon 0.45  $\mu\text{m}$
- Filtros Nylon 0.22  $\mu\text{m}$

##### ✓ REACTIVOS:

- Agua purificada
- Fosfato monobásico de sodio
- Ácido Fosfórico al 85%.
- Metanol HPLC
- Ácido Clorhídrico Químicamente Puro
- Hidróxido de Sodio Lentejas
- Peróxido de Hidrogeno al 50%

##### ✓ EQUIPOS:

- Balanza Analítica
- Equipo cromatográfico HPLC marca Kanuer -Azura
- Baño maría.
- Baño de ultrasonido
- Termómetro

##### ✓ PATRONES:

- Estándar secundario D-Pantenol.

✓ **DOCUMENTOS:**

- Certificados de estándares
- Certificados de calibración
- Certificado de verificación operacional
- Certificados de trazabilidad

**3.7.13. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALITICO**

Se realizó de la siguiente manera:

✓ **ELECCIÓN DEL TIPO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA A USAR**

El producto farmacéutico presenta 5 principios activos, en las que se considera algunos aspectos como: peso molecular y solubilidad de los principios activos en estudio.

Cuando un ingrediente farmacéutico activo tiene peso molecular menor a 2000 daltons, lo más recomendable es usar la fase reversa.

Al tratarse de varios principios activos lo más sensato es que se usará una técnica de separación por gradiente, ya que así se separará más los principios activos, y se tendrá una mejor cuantificación e identificación.

✓ **SELECCIÓN DE TIPO DE DETECTOR:**

Para elegir el tipo de detector nos basaremos en antecedentes, teniendo el detector UV, el cual es el más usado por facilidad de uso, robustez y confiabilidad.

✓ **SELECCIÓN DE LONGITUD DE ONDA:**

Para elegir con la longitud de onda que se requiere trabajar se realizara un barrido.

✓ **ELECCION DE LA FASE MOVIL Y FASE ESTACIONARIA**

Para seleccionar el tipo de fase móvil y fase estacionaria se tomará en consideración lo siguiente:

- Solubilidad de principios activos.
- Compatibilidad de fase móvil con muestra y detector.

**3.7.14. TÉCNICA ANALÍTICA DESARROLLADA**

Condiciones cromatográficas:

- **COLUMNA CROMATOGRAFICA:** C18-ECLIPSE XDB 150 mm x 4.6 x 5  $\mu\text{m}$
- **SISTEMA:** Isocrática
- **FASE MÓVIL:** (METANOL: SOL. A) (5:95)  
**SOL. A:** Pesar 10 gramos de fosfato monobásico de sodio, en 1000 mL de agua, llevar a pH de 3.5 con ácido fosfórico.
- **FLUJO:** 1 mL/min
- **LONGITUD DE ONDA:** 210 nm
- **VOLUMEN DE INYECCIÓN:** 20.0  $\mu\text{L}$
- **TEMPERATURA:** AMBIENTE

**PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO:**

**PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR MIXTA DE REFERENCIA:**

Pesar un aproximado de 30,0 mg de D-Pantenol en una fiola de 50 mL, adicionar 30 mL de agua, llevar a ultrasonido hasta disolución completa, enrasar con agua, transferir 5,0 mL a una fiola de 50 mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

**PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MUESTRA:**

Tomar 5 mL de muestra, llevar a una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de fase móvil, agitar, enrasar con la fase móvil, homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC.

**Especificaciones:**

D-Pantenol (B5)	3 mg (2,7 mg- 3,4 mg) (90 %-150 %)
-----------------	------------------------------------

**3.7.15. DISEÑO EXPERIMENTAL Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN POR PARÁMETROS.**

Los desarrollará en condiciones normales de trabajo a temperatura ambiente.

**3.7.15.1. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO, PARAMETROS DE VALIDACION**

## **SELECTIVIDAD:**

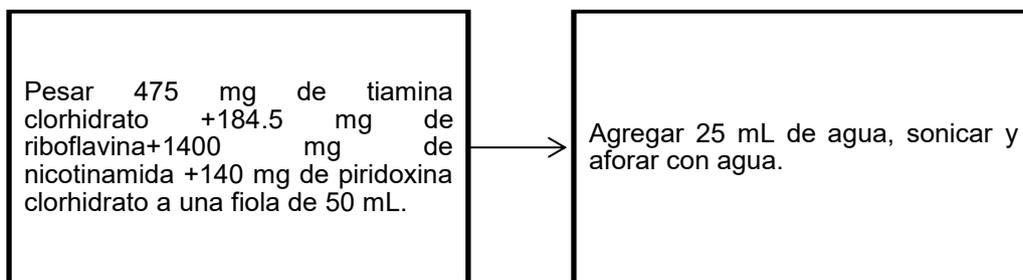
Este parámetro posee la capacidad de evaluar de forma segura, eficaz e inequívocamente el analito en presencia de sustancias que pueden estar en la muestra estos pueden ser: componentes de la matriz (excipiente), impurezas, productos de degradación. **(3)**

En este parámetro analizaremos:

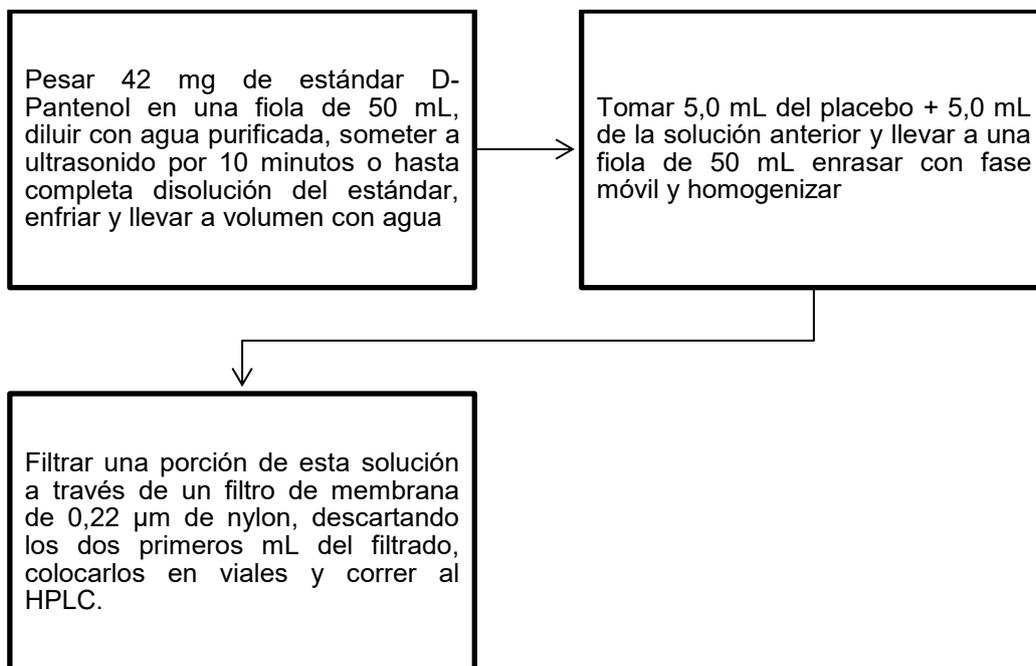
- ✓ Diluyente (Fase Móvil)
- ✓ Placebo de excipiente puro
- ✓ Placebo de excipientes + cuatro vitaminas (Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Riboflavina, Tiamina clorhidrato).
- ✓ Placebo de excipiente puro + D-Pantenol al 140 %,
- ✓ Placebo de excipientes + cuatro vitaminas (Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Riboflavina) + D-Pantenol 140 %
- ✓ Principio activo puro de D-Pantenol al 100%
- ✓ Control negativo. (Clobuler Jarabe)
- ✓ Placebo de excipiente puro +sol madre de cuatro vitaminas + P.A D-Pantenol+ estrés:
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas+ PA (Luz)
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas + PA (Calor Seco).
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas+ PA (Calor Húmedo).
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas + PA (Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 1N).
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas + PA (Hidrólisis alcalina con Hidróxido de Sodio a 1N).
  - Placebo de excipiente puro + cuatro vitaminas + PA (Hidrólisis Oxidación con peróxido de 10 % v/v).

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRABAJO.**

- ✓ **PREPARACIÓN DE SOLUCION MADRE DE CUATRO VITAMINAS 140% NICOTINAMIDA, 140 % PIRIDOXINA CLORHIDRATO, 135 % RIBOFLAVINA Y 190 % DE TIAMINA CLORHIDRATO.**



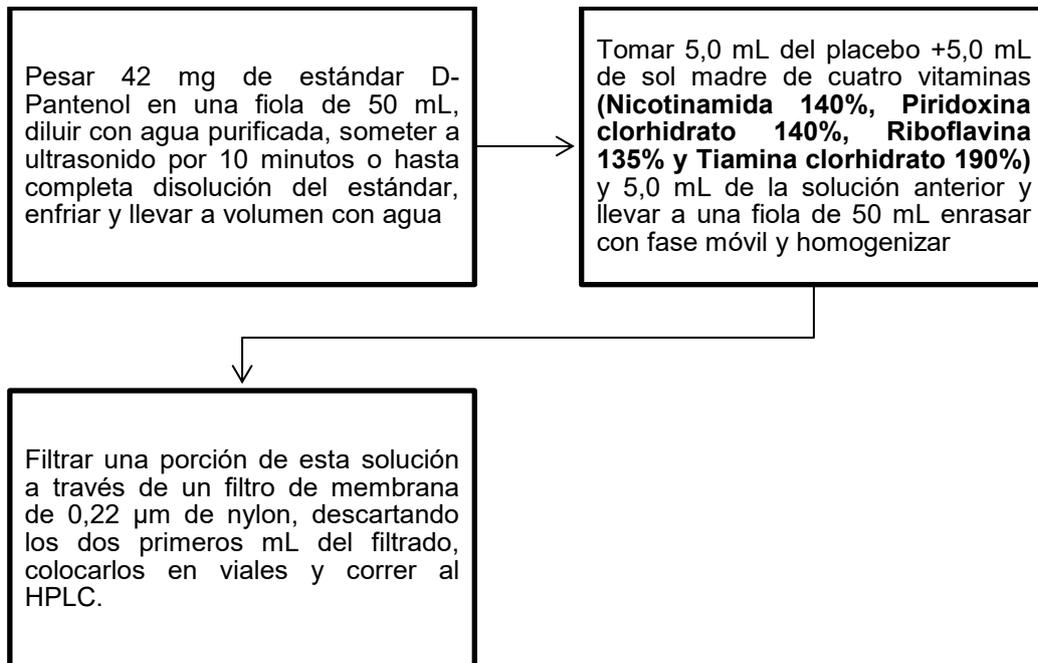
- ✓ **PREPARACIÓN DE DILUYENTE:** Preparar según la técnica analítica, preparar el diluyente por duplicado y realizar la corrida en el HPLC. **Preparar Por Duplicado.**
  
- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO (excipiente puro):** Preparar el placebo por duplicado, de la misma forma que la muestra (ver técnica analítica del producto terminado, ítem 3.6.15.) y correr al HPLC. **Preparar por Duplicado.**
  
- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO + CUATRO VITAMINAS (Nicotinamida 140%, Piridoxina clorhidrato 140%, Tiamina Clorhidrato 190%, Riboflavina 135 %):** Preparar el placebo por duplicado, de la misma forma que la muestra (ver técnica analítica del producto terminado ítem 3.6.15.) y correr al HPLC. **Preparar por Duplicado.**
  
- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO PURO + ESTÁNDAR DE D-PANTENOL AL 140 %:** Pesar 42,0 mg de estándar D-Pantenol fiola de 50 mL, diluir con agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta lograr disolución completa del estándar, enfriar y aforar con agua. Tomar 5,0 mL del placebo y 5,0 mL de la solución anterior y llevar a una fiola de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración: 0,084 mg/mL de D-Pantenol. Preparar por Duplicado.**



✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO + SOL. MADRE DE CUATRO VITAMINAS + ESTÁNDAR DE D-PANTENOL AL 140 %:** Pesar 42,0 mg de estándar D-PANTENOL fiola de 50 mL, diluir con agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta lograr disolución completa del estándar, enfriar y aforar con agua. Tomar 5,0 mL del placebo + 5.0 mL de sol madre de cuatro vitaminas (Nicotinamida 140%, Piridoxina clorhidrato 140%, Riboflavina 135% y Tiamina clorhidrato 190%) y 5mL de la solución anterior y llevar a una fiola de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

**Concentración; 0,084 mg/mL de D-pantenol.**

**Preparar por Duplicado.**

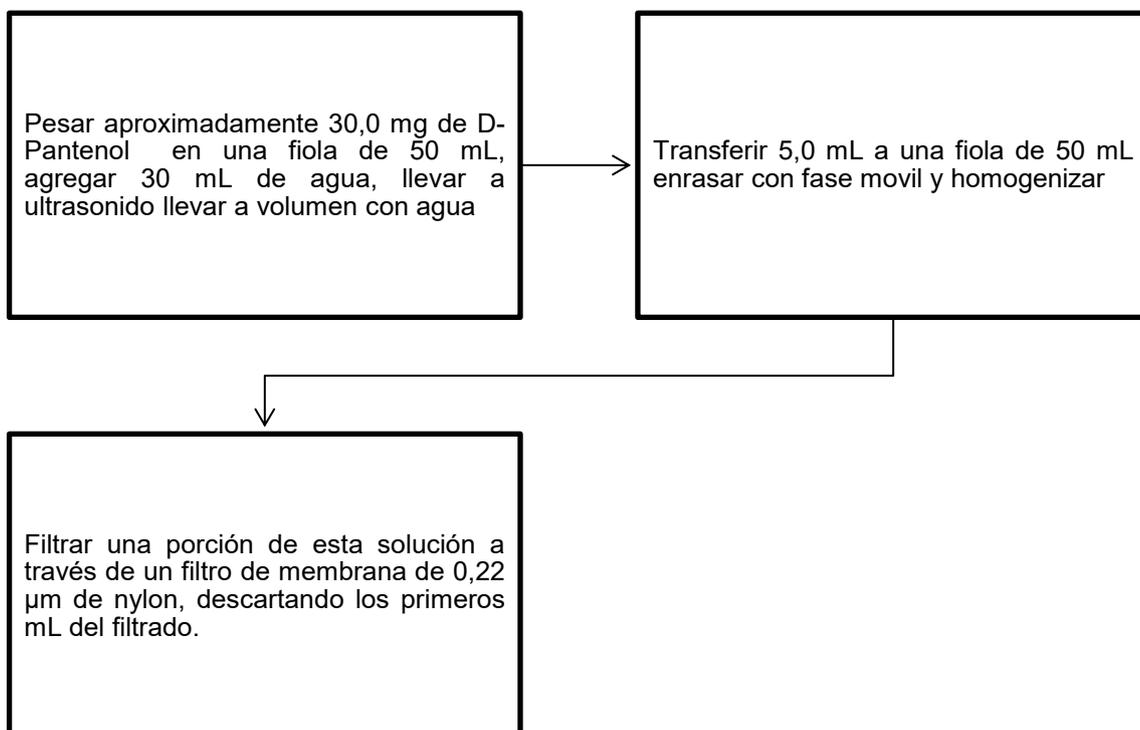


✓ **PREPARACIÓN DE PRINCIPIO ACTIVO PURO DE D-PANTENOL 100%:**

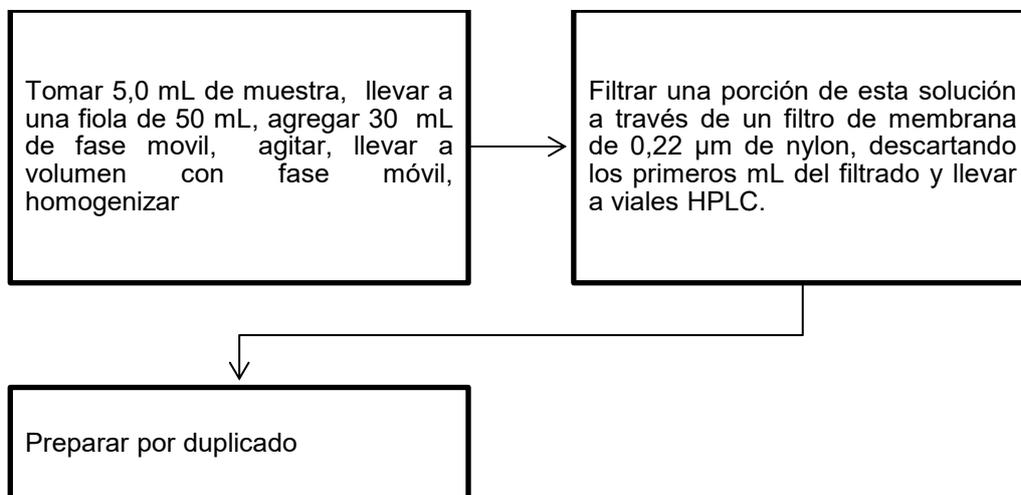
Preparar por duplicado y así mismo el estándar pero solo del principio indicado (ver técnica analítica del producto terminado) y realizar la corrida en el HPLC.

**Concentración; 0,06 mg / mL de D-Pantenol.**

**Preparar por Duplicado.**



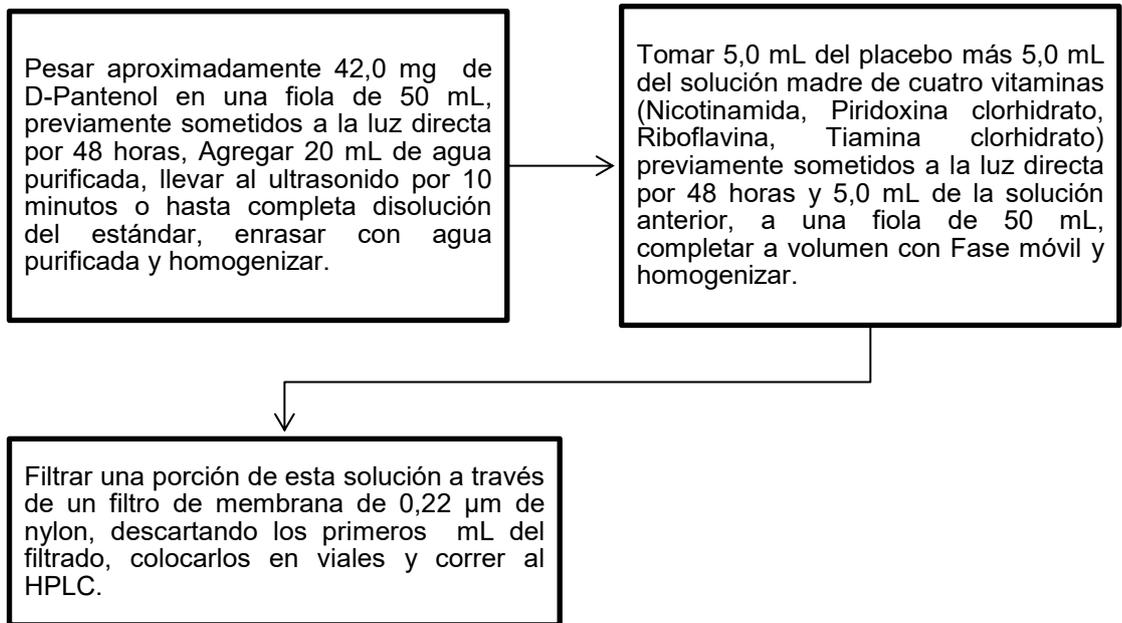
- ✓ **PREPARACIÓN DE CONTROL NEGATIVO:** Considerar una muestra diferente de producto terminado (Clobuler Jarabe), y realizar la preparación de la misma forma que la muestra descrita en la técnica (ver técnica analítica del producto terminado jarabe multivitamínico y proceder colocar en el equipo por HPLC. **Preparar por Duplicado.**



- ✓ **PREPARACIÓN DE PLACEBO + SOL. MADRE DE CUATRO VITAMINAS + ESTÁNDAR DE D PANTENOL AL 140% + ESTRÉS.**

**Placebo + Sol madre de cuatro vitaminas + PAs (Luz + temperatura + humedad / Preparar por Duplicado):** Pesar un aproximado de 42,0 mg de D-Pantenol en una fiola de 50 mL, previamente sometidos a la luz directa durante 48 horas, agregar 20 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta lograr la disolución completa del estándar, enrasar con agua purificada y homogenizar.

Tomar 5,0 mL del placebo más 5,0 mL del sol. Madre de cuatro vitaminas (Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Riboflavina, Tiamina clorhidrato) previamente sometidos a la luz directa durante 48 horas y 5,0 mL de la solución anterior, a una fiola de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración; 0,084 mg/mL de D-Pantenol. Preparar por Duplicado.**



✓ **Placebo + Sol madre de cuatro vitaminas + PAs (Calor seco a 105°C durante 48 horas / Preparar por Duplicado):**

Pesar un aproximado de 42 mg de D-Pantenol en matraz volumétrico de 50 mL, previamente sometidos a 105°C durante 48 horas, agregar 20 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta lograr disolución completa del estándar, enrasar con agua purificada y homogenizar. Tomar 5mL del Placebo más 5mL de sol. Madre de cuatro vitaminas, previamente sometidos a 105°C por 48 horas, y 5 mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la Fase Móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración; 0,084 mg/mL de D-Pantenol. Preparar por Duplicado.**

✓ **Placebo + Sol madre de cuatro vitaminas + PAs (Calor Húmedo 60°C por 2 horas / Preparar por Duplicado):**

Dispensar un aproximado de 42 mg de D-Pantenol en matraz volumétrico de 50 mL, agregar 20mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta lograr disolución completa del estándar, enrasar con agua purificada y homogenizar.

Tomar 5 mL de la solución anterior y 5 mL del placebo más 5,0 mL sol. Madre de cuatro vitaminas, llevar a un matraz volumétrico de 50mL, adicionar 20 mL de fase la móvil, **llevar a baño maría a 60°C por 2 horas, pasado el tiempo hacer enfriar la solución** enrasar con la Fase móvil y homogenizar. Filtrar una

cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración; 0,084 mg/mL de D pantenol. Preparar por Duplicado.**

- ✓ **Placebo (+ cuatro vitaminas) + PA (hidrólisis ácida con el reactivo Ácido Clorhídrico a 1N):** Pesar un aproximado de 42 mg de D PANTENOL en matraz volumétrico de 50 mL, agregar 20 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta completar la disolución del estándar, enrasar con agua purificada y homogenizar. Tomar 5 mL de la solución anterior y 5 mL del placebo más 5,0 mL sol. Madre de cuatro vitaminas, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, adicionar **1mL de Ácido clorhídrico (HCL) 1N, someter a baño maría a una temperatura de 60°C durante 2 horas, pasado el tiempo proceder a enfriar la solución y luego a neutralizar la solución con 1mL de Hidróxido de Sodio 1N respectivamente**, completar a volumen con la Fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocarlos en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración; 0,084 mg/mL de D-pantenol. Preparar por Duplicado.**
- ✓ **Placebo + sol. Madre de cuatro vitaminas+ PA (hidrólisis Básica con Hidróxido de Sodio 1N):**  
Dispensar un aproximado de 42 mg de D-Pantenol en matraz volumétrico de 50 mL, agregar 20 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta lograr disolución completa del estándar, enrasar con agua purificada y homogenizar. Tomar 5 mL de solución anterior y 5 mL del placebo más 5,0 mL sol. Madre de cuatro vitaminas, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, adicionar **1mL de Hidróxido de Sodio 1N, llevar a baño maría a una temperatura de 60°C durante 2 horas, pasado el tiempo se procede a enfriar la solución y luego neutralizar la solución con 1mL de Ácido Clorhídrico (HCL) 1N respectivamente** completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC. **Concentración; 0,084 mg/mL de D-pantenol. Preparar por Duplicado.**

- ✓ **Placebo + sol. madre de cuatro vitaminas + PA (Oxidación con Peróxido de Hidrogeno 2 % v/v):** Dispensar un aproximado de 42 mg de D-Pantenol en matraz volumétrico de 50mL, agregar 20mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos o hasta disolución completa del estándar, proceder a enrasar con agua purificada y homogenizar.

Tomar 5 mL de la solución anterior y 5 mL del placebo más 5,0 mL sol. Madre de cuatro vitaminas, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 20mL de la fase móvil, **agregar 20 mL de la fase móvil, adicionar 2mL de Peróxido de Hidrogeno al 2% v/v y llevar a baño maría a una temperatura de 60°C durante 2 horas, pasado el tiempo proceder a enfriar la solución y luego,** completar a volumen con la Fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

**Concentración; 0,084mg/mL de D-pantenol.**

**Preparar por Duplicado.**

Se verificará que no exista interferencias en el diluyente y la identificación del principio activo

✓ **LINEALIDAD:**

Este parámetro evalúa la capacidad del método para lograr resultados linealmente proporcionales se determina directamente o por una transformación matemática, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. **(3)**

Se mide parámetros como: Coeficiente de correlación, coeficiente de variación de respuesta, además se evalúa el cumplimiento de Test: Test de proporcionalidad y Linealidad

Se desarrolla y determina 2 tipos de Linealidad:

- Linealidad del Sistema: Se trabaja con estándares
- Linealidad del Método: Se trabaja con estándares con placebos de producto.

✓ **LINEALIDAD DE SISTEMA:**

En este parámetro se valora la capacidad del procedimiento analítico de alcanzar resultados linealmente proporcionales de la concentración del ingrediente farmacéutico activo, haciendo uso del estándar de D-Pantenol. Se preparan las muestras mixtas dispensadas por separado para lograr cinco

niveles de concentración del activo, las cuales se indican: **80%, 100%, 120% 140% y 160%**. Se dispensa las cantidades del activo en un matraz volumétrico para cada nivel de concentración, se trabaja por triplicado y se procede según técnica analítica preparación del estándar:

✓ **Preparación de estándar al 80 %:**

Pesar un aproximado de 24,0 mg de D-Pantenol en un matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5mL a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de estándar al 100 %:**

Pesar un aproximado de 30,0 mg de D-Pantenol en un matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5mL a matraz volumétrico de 50mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de estándar al 120 %:**

Pesar un aproximado de 36,0 mg de D-Pantenol en un matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5mL a matraz volumétrico de 50mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de estándar al 140 %:**

Pesar un aproximado de 42,0 mg de D-Pantenol en un matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5mL a matraz volumétrico de 50mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de estándar al 160 %:**

Pesar un aproximado de 48,0 mg de D-Pantenol en un matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5mL a matraz volumétrico de 50mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

Preparar cada uno de los niveles de concentración por **triplicado**, de acuerdo a la técnica analítica y filtrar una cantidad de cada una de estas soluciones por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida por duplicado cada uno de las 15 muestras al HPLC.

✓ **LINEALIDAD DE MÉTODO:**

Este parámetro valora la capacidad del método analítico de contar con resultados linealmente proporcionales de la concentración del activo, haciendo uso del placebo más solución madre de D-Pantenol, para verificar de cómo interfiere la matriz de este en los resultados de la linealidad.

**Se preparan Principio activo + Placebo de Producto a las concentraciones de: 80%, 100%,120%,140% y 160%.**

**Las cantidades a pesar son respectivamente:** Por cada rango de concentración en el matraz volumétrico por triplicado y proceder según técnica analítica de producto terminado preparación de muestra:

Pesar un aproximado de 24 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, agregar 20mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogeneizar. Tomar 5mL del placebo y 5mL de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 80%:**

Pesar un aproximado de 24 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido

durante 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 100%:**

Pesar un aproximado de 30 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 120%:**

Pesar un aproximado de 36,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 140%:**

Pesar un aproximado de 42,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar

con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 160%:**

Pesar un aproximado de 48,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

Preparar cada uno de los niveles de concentración por **triplicado** analizar según la técnica analítica. Y colocar al HPLC en cada vial las muestras preparadas.

La información generada a base de los análisis, son usados para la evaluación de la Exactitud.

✓ **PRECISIÓN:**

Este parámetro nos permite evaluar en nivel de variación entre resultados de las pruebas individuales cuando se analiza con el método analítico repetidamente y múltiples muestreos de una sola muestra homogénea, se mide el grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico. Este parámetro analítico determina: La desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. (6)

Se considera en número de lectura para los siguientes estándares

Estándar 1: 3 Inyecciones

Estándar 2: 3 Inyecciones

✓ **PRECISIÓN DEL SISTEMA:**

Se preparan 10 determinaciones de solución estándar 140% más placebo con las vitaminas restantes.

Se prepara según técnica analítica del producto terminado y cada preparación será inyectado por 3 inyecciones.

✓ **Preparación de muestra 140%**

Pesar un aproximado de 42,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 20 mL de agua purificada, pasar por el proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta una disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5 mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

Se evaluará el **Coefficiente de Variación (CV)** a todos los datos obtenidos, Tiempo de retención y áreas.

✓ **REPETIBILIDAD DE MÉTODO:**

✓ **Preparación del Estándar 100%:**

Pesar un aproximado 30,0 mg de D-Pantenol en matraz volumétrico de 50mL, adicionar 30mL de agua, llevar a ultrasonido, enrasar con agua, transferir 5,0 mL a matraz volumétrico de 5,0 mL enrasar con la fase móvil y homogenizar, preparar por duplicado. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC y realizar la corrida en el HPLC.

Preparar por duplicado e Inyectar por 3 veces para cada estándar secundario.

✓ **Preparación de muestra al 140%:**

**Se preparan 10 muestras de principio activo + Placebo de producto con cuatro vitaminas (Nicotinamida 140%, Piridoxina clorhidrato 140%, Tiamina clorhidrato 190% y Riboflavina 135%) a la concentración de trabajo, según método analítico y correr por triplicado en el HPLC.**

Dispensar aproximadamente 42,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 20mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos a hasta una disolución completa, luego enrasar con metanol y homogenizar.

Tomar 5 mL del placebo más 5 mL de solución madre mixta de vitaminas más 5 mL de la solución anterior y llevar a matraz volumétrico de 50.0 mL, completar

a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **PRECISIÓN INTERMEDIA:**

Este parámetro evalúa la capacidad de dispersión de los resultados obtenidos en un Laboratorio, se realizará con la colaboración de diferentes analistas:

- Analista 1
- Analista 2

El analista 1 y 2 trabajaran en diferentes días, realizaran el análisis del mismo pool a una concentración 100%.

**DIA 1: ANALISTA 1**

Concentración	mg del Estándar de D-Pantenol
Estándar al 100%-1	<p>Pesar un aproximado de 30.0 mg de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50 mL, y agregar 20 mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, completar a volumen con agua purificado. Traspasar 5mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en viales HPLC.</p>
Estándar al 100%-2	<p>Pesar un aproximado de 30.0 mg de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, y agregar 20mL de agua purificada, llevar a ultrasonido durante 10 minutos, hasta disolución completa, dejar equilibrar a temperatura ambiente, completar a volumen con agua purificado. Traspasar 5mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en viales HPLC.</p>

Concentración	50 mg del Estándar de D-Pantenol + 5,0 mL Placebo
Placebo + Estándar al 140% MP-1	<p>Pesar un aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+ cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
Placebo + Estándar al 140% MP-2	<p>Pesar <math>\mu</math>m aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
Placebo + Estándar al 140% MP-3	<p>Pesar aproximadamente 42 mg de estándar de D-Pantenol llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos a hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
Placebo + Estándar al 140% MP-4	<p>Pesar un aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa</p>

	<p>disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-5</p>	<p>Pesar un aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-6</p>	<p>Pesar un aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu</math>m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-7</p>	<p>Pesar un aproximado de 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un</p>

	<p>filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-8</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-9</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-10</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, agregar 30mL de agua purificada, llevar a ultrasonido por 10 minutos o hasta completa disolución y llevar a volumen con agua purificada. Traspasar 5mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a matraz volumétrico de 50 mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 <math>\mu\text{m}</math>, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>

**DIA 2: ANALISTA 2**

<b>Concentración</b>	<b>mg del Estándar de D- Pantenol</b>
Estándar al 100%- 1	Pesar un aproximado 30.0 mg de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, y agregar 20mL de agua purificada, someter a ultrasonido por 10 minutos o hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, enrasar con agua purificado. Traspasar 5mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en viales HPLC.
Estándar al 100%- 2	Pesar un aproximado 30.0 mg de D-Pantenol, llevar a matraz volumétrico de 50mL, y agregar 20mL de agua purificada, someter a ultrasonido por 10 minutos o hasta disolución completa, dejar equilibrar a una temperatura ambiente, enrasar con agua purificado. Traspasar 5mL de la solución anterior a matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y colocar en viales HPLC.

<b>Concentración</b>	<b>42 mg del Estándar de D- Pantenol + 5,0 mL Placebo</b>
Placebo + Estándar al 140% MP-1	Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.

<p>Placebo + Estándar al 140% MP-2</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-3</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-4</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>

<p>Placebo + Estándar al 140% MP-5</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-6</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-7</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>

<p>Placebo + Estándar al 140% MP-8</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-9</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>
<p>Placebo + Estándar al 140% MP-10</p>	<p>Pesar un aproximado 42 mg de estándar de D-Pantenol, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua purificada, llevar a un proceso de ultrasonido durante 10 minutos o hasta disolución completa y enrasar con agua purificada. Transferir 5 mL de la solución anterior y 5 mL de placebo (+cuatro vitaminas) a un matraz volumétrico de 50 mL, completar a volumen con la fase móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado, en viales y realizar la corrida en el HPLC.</p>

Se determina el Coeficiente de Variación (CV) a la data obtenida a partir de los análisis.

✓ **EXACTITUD:**

En este parámetro se estudia la cercanía que existe entre el valor teórico y el valor obtenido.

La exactitud de un método analítico es la concordancia que existe entre valores obtenidos de la prueba por medio de la técnica analítica en estudio y el valor teórico o verdadero. La exactitud permite expresar la recuperación de las cantidades agregadas de analito en la muestra. **(3)**

Se realiza un análisis con los 3 niveles de concentraciones con las que se trabajó en la prueba de linealidad del método en cuanto al estándar preparar por duplicado según método analítico (3.4.5) y llevar al HPLC el análisis se realiza lectura por triplicado.

Se procede a preparar placebos + activos del producto en los 3 niveles de concentraciones de: 80%, 120% y 160%. El nivel de 120 % está a una concentración de 0.072 mg/mL de D-Pantenol, todos los niveles de concentración se analizan por triplicado, se evaluará resultados obtenidos de 9 muestras (2 inyecciones por cada muestra).

Determinar el Porcentaje de Recuperación Media (calcular mg/mL del principio activo), desviación estándar y coeficiente de variación y la Prueba de Student para los datos obtenidos.

**Proceder según la técnica analítica del producto terminado – preparación de muestras.**

**Las cantidades a pesar son respectivamente:**

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 80%:**

Pesar un aproximado 24 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada llevar a ultrasonido durante diez minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar. Tomar 5mL del Placebo, mas 5mL de solución madre mixta de vitaminas, mas 5mL de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase Móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu$ m, descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 120%:**

Pesar un aproximado 36,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL de agua purificada llevar a ultrasonido durante diez minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar. Tomar 5mL del Placebo, mas 5mL de solución madre mixta de vitaminas, mas 5mL de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase Móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **Preparación de Estándar 1 + Placebo al 160%:**

Pesar un aproximado 48,0 mg de estándar de D-Pantenol y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, adicionar 20mL de agua purificada llevar a ultrasonido durante diez minutos o hasta disolución completa, enrasar con metanol y homogenizar. Tomar 5mL del Placebo, mas 5mL de solución madre mixta de vitaminas, mas 5mL de la solución anterior y llevar a un matraz volumétrico de 50mL, enrasar con la fase Móvil y homogenizar. Filtrar una cantidad de la solución por un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , descartar la primera parte del filtrado, colocar en viales y realizar la corrida en el HPLC.

✓ **RANGO:**

En este parámetro se determina si el método analítico cumple en los intervalos superior e inferior, así como los márgenes de concentraciones establecidas. Posterior al cumplimiento de las especificaciones para los parámetros de Linealidad, Precisión y Exactitud, es factible establecer el rango del método analítico. Como parte de la Validación del Método Analítico, se efectúa La prueba de Aptitud del Sistema o System Suitability Test (SST).

### 3.7.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO QUE UTILIZAR PARA EL PROCESAMIENTO DE RESULTADOS.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN
APTITUD DEL SISTEMA	La desviación estándar relativa entre las 5 lecturas continuas del estándar no debe ser mayor o igual del 2%, (DSR < 2 %).
SELECTIVIDAD	No debe existir interferencias en la determinación del analito: D-Pantenol por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz. Así mismo el analito debe ser estable con las diferentes condiciones de estrés y la recuperación de la concentración de activos debe ser en no menos del 85% de lo declarado.
LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL MÉTODO	Se determina Coeficiente de correlación (r): $\geq$ (mayor que o igual a) 0,999 Cálculo de la ecuación de la recta de regresión lineal: $y = b x + a$ Determinar el valor de: a=Intercepto, b = Pendiente <u>Test de Linealidad</u> Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta (CV): Máximo 2 % (CV $\leq$ 2 %) "T" de Student experimental mayor al "T" tablas (T exp > T tabla) <u>Test de Proporcionalidad</u> "T" de Student experimental menor al "T" tablas (T exp < T tabla)
PRECISIÓN	<u>Precisión del Sistema o Repetibilidad Instrumental:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2% <u>Repetibilidad del Método:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2% <u>Precisión Intermedia:</u> Coeficiente de Variación (CV): Máximo 2%
EXACTITUD	<u>Porcentaje de Recuperación Media:</u> 98,0 - 102% "T" de Student experimental menor al "T" de tablas (T exp < T tablas)
RANGO	Cumplida las especificaciones para Linealidad, Precisión y Exactitud, se define el Rango del Método Analítico.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS, INTERPRETACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

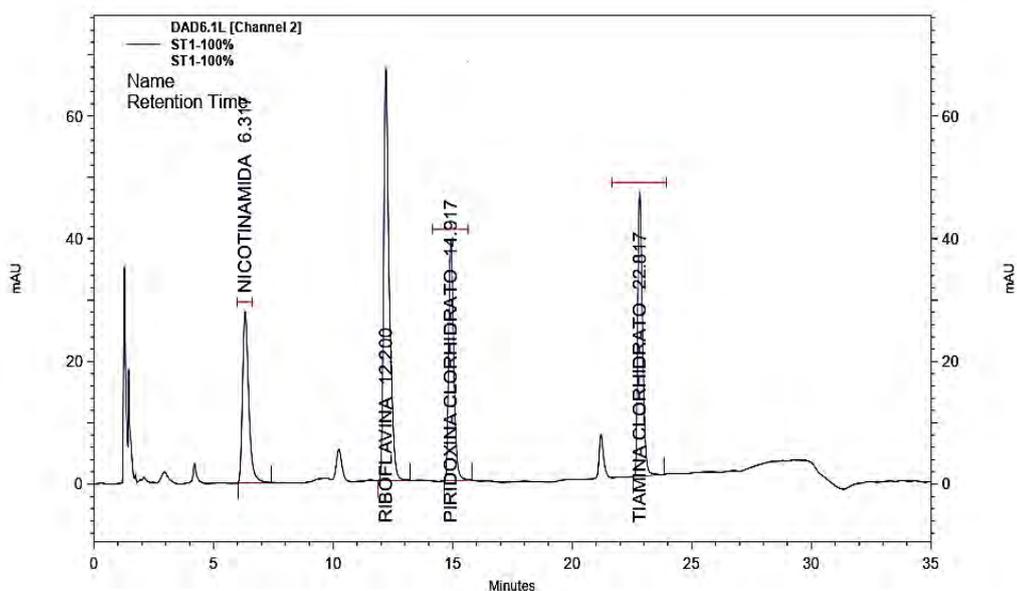
#### 4.1. DESARROLLO DE MÉTODO ANALÍTICO:

##### ✓ SELECCIÓN DEL DETECTOR:

Se determinó la longitud de onda para: Nicotinamida, Riboflavina, Tiamina clorhidrato y Piridoxina clorhidrato es a 280 nm. y para el activo D-Pantenol una longitud de onda a 210 nm.

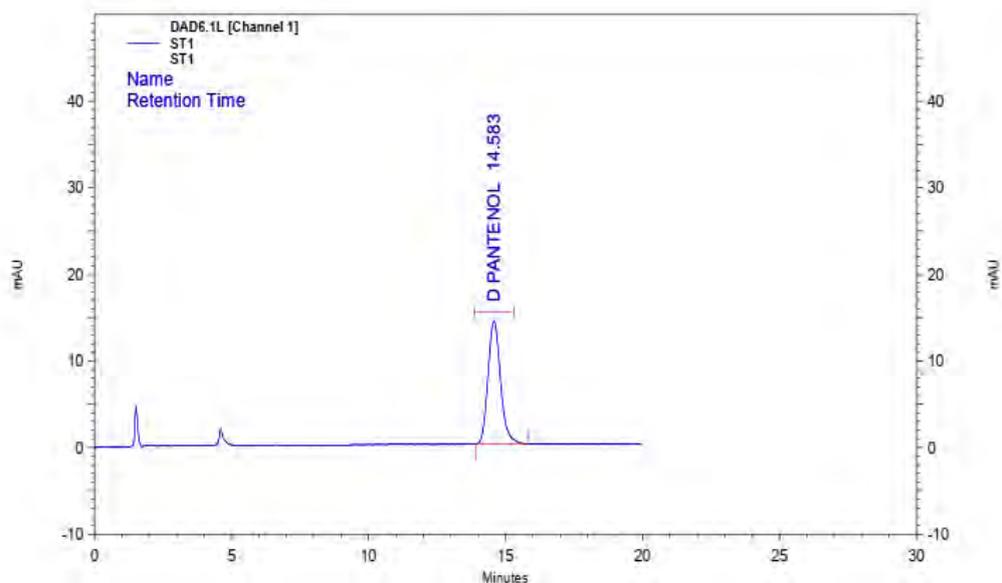
##### ✓ SELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL Y FASE ESTACIONARIA

Para: Piridoxina Clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina y Tiamina clorhidrato, el método de separación por HPLC, de fase reversa y el método de elución por gradiente. La fase estacionaria columna "ZORBAX SB-C18 150 mm x 4.6 x 5  $\mu\text{m}$ ". En la fase móvil se usó un modificador orgánico, "Metanol HPLC", y un tampón como componente acuoso, el cual estuvo compuesto por la sal de hexano sulfonato de sodio. Diluyente: 25 g de EDTA en 1000 mL de agua.



**Gráfica N.º 1.** Cromatograma de estándar mixto de las cuatro vitaminas (nicotinamida, tiamina clorhidrato, piridoxina clorhidrato y riboflavina). Se observa tiempo de retención de cada activo y área.

Para: D-pantenol, el método de separación por HPLC, fase reversa y el método de elución isocrática. La fase estacionaria columna "Eclipse XDB - C18 150mm x 4.6 x 5  $\mu\text{m}$ ". Fase móvil usó: "Metanol HPLC" y un tampón, componente acuoso de sal de fosfato monobásico de sodio, a un pH de 3.5. Diluyente: agua.



**Grafica N.º 2.:** Cromatograma de estándar de D-Pantanol, Se observa tiempo de retención del activo y área.

**Discusión:** Según autor **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** en el año 2021, menciona que, para la elección de método analítico, como “longitud de onda, fase estacionaria y fase móvil”, se tiene que conocer las características fisicoquímicas, de los diferentes activos, para lo cual los autores trabajaron probando distintos valores de Ph, temperatura de la columna, composición de la fase móvil, y tipo de columna, determinando así cuatro longitudes de onda mínimo 267nm y máximo 340nm. para Piridoxina Clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina, Tiamina clorhidrato y Acido Ascórbico, de la misma manera nosotros, llegamos a la conclusión de que la longitud de onda, óptima para nuestro método analítico para las cuatro vitaminas (Piridoxina Clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina y Tiamina clorhidrato) es de 280mn. Y para D-Pantanol 210 nm, además de un sistema cromatográfico en gradiente para las cuatro vitaminas, el cual ayuda a una buena separación de los activos, y un sistema isocrático para D-Pantanol.

## 4.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

### 4.2.1. APTITUD DEL SISTEMA

**Tabla N.º 1. Resultados de aptitud del sistema de Nicotinamida, se evalúa desviación estándar relativa de área y tiempo de retención en las cinco inyecciones sucesivas.**

Muestra	Área	Tiempo de retención	Factor de asimetría < 2.0	N.º de platos teóricos > 1000
std 1	49452946.00	6.32	1.42	3071.33
std 2	50782869.00	6.40	1.41	3307.48
std 3	51337130.00	6.32	1.39	2994.26
std 4	50489712.00	6.32	1.37	3234.32
std 5	50624811.00	6.33	1.35	3129.25
<b>Promedio.</b>	<b>50537493.6</b>	<b>6.3</b>	<b>1.4</b>	<b>3147.3</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>686618.23</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>125.25</b>
<b>(DSR %) &lt;2.0%</b>	<b>1.359</b>	<b>0.551</b>	-	-

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°1, se observa el resultado de las 5 inyecciones repetidas del estándar de Nicotinamida, obteniéndose una desviación estándar para el área de 1.359% y para el tiempo de retención 0.551%. Según las normas oficiales como USP y la Conferencia Internacional sobre Armonización ICH, nos indican que, para el parámetro de aptitud del sistema, la desviación estándar debe tener un resultado menor a 2.0%, de esta manera se evidencia que cumple el parámetro de aptitud del sistema para el activo de nicotinamida.

**Discusión:** De acuerdo con los resultados, se determina que el equipo y las condiciones cromatográficas son aptos para el análisis de un proceso de validación, ya que cumple con la prueba de aptitud del sistema, al igual que la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** En el año 2021. Indica que, según las normas, un método analítico no puede ser validado si no cumple con parámetros. Menciona que, para la aptitud del sistema, el análisis sucesivo dio como resultado la desviación estándar menor al 2.0%. Es así como concluye que su trabajo de investigación cumple con criterios del parámetro aptitud del sistema para las vitaminas con las que trabajó.

**Tabla N.º2. Resultados de aptitud del sistema de piridoxina clorhidrato, se evalúa desviación estándar relativa de área y tiempo de retención en las cinco inyecciones sucesivas.**

Muestra	Área	Tiempo de retención	Factor de asimetría < 2.0	N.º de platos teóricos > 1000
std 1	57159601.00	14.92	1.36	25279.58
std 2	59218418.00	15.02	1.31	26379.80
std 3	59296937.00	14.97	1.27	25544.11
std 4	57388094.00	14.90	1.28	25193.74
std 5	57355228.00	14.90	1.34	24904.68
<b>Promedio.</b>	58083655.6	14.9	1.3	25460.4
<b>Desviación estándar</b>	<b>1075642.49</b>	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>562.35</b>
<b>(DSR %) &lt;2.0%</b>	<b>1.852</b>	<b>0.349</b>	-	-

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 2, se observa el resultado de las cinco inyecciones repetidas del estándar de Piridoxina Clorhidrato, obteniéndose una desviación estándar para el área de 1.852% y para el tiempo de retención 0.349%, Según las normas oficiales como farmacopea americana USP y la ICH, nos indican que, para el parámetro de aptitud del sistema, la desviación estándar debe tener un resultado menor a 2.0%. De esta manera se evidencia que cumple el parámetro de aptitud del sistema para el activo de piridoxina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con los resultados, se determina que el equipo y las condiciones cromatográficas son aptos para el análisis de un proceso de validación, ya que cumple con la prueba de aptitud del sistema, al igual que la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** En el año 2021. Indica que, se demuestra el cumplimiento de los parámetros de validación que fueron establecidos según las normas estandarizadas de la USP. El método de investigación planteado fue correcto para separar cromatográficamente las vitaminas del producto farmacéutico jarabe de complejo B. La investigación dio como resultado el cumplimiento del parámetro aptitud del sistema; de esta manera, los autores de la investigación concluyen que se determinó condiciones cromatográficas adecuadas para una correcta cuantificación de las vitaminas hidrosolubles en jarabe de complejo B.

**Tabla N. 3. Resultados de aptitud del sistema de riboflavina, se evalúa desviación estándar relativa de área y tiempo de retención en las cinco inyecciones sucesivas.**

Muestra	Área	Tiempo de retención	Factor de asimetría < 2.0	N.º de platos teóricos > 1000
Std 1	108349856.00	12.20	1.55	14962.97
Std 2	112095387.00	12.32	1.50	16078.64
Std 3	112956952.00	12.25	1.51	15089.71
Std 4	109160388.00	12.18	1.49	14590.18
Std 5	109688782.00	12.18	1.52	14695.59
<b>Promedio.</b>	<b>110450273.0</b>	<b>12.2</b>	<b>1.5</b>	<b>15083.4</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1977704.67</b>	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>591.34</b>
<b>(DSR %) &lt;2.0%</b>	<b>1.791</b>	<b>0.489</b>	-	-

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 3, se observa el resultado de las 5 inyecciones repetidas del estándar de Riboflavina, obteniéndose una desviación estándar para el área de 1.791% y para tiempo de retención 0.489%, según las normas oficiales como farmacopea americana USP y la ICH nos indican que, para el parámetro de aptitud del sistema, la desviación estándar debe tener un resultado menor a 2.0%, de esta manera se evidencia que cumple el parámetro de aptitud del sistema para el activo de Riboflavina.

**Discusión:** De acuerdo con los resultados, se determina que el equipo y las condiciones cromatográficas son aptos para el análisis de un proceso de validación, ya que cumple con la prueba de aptitud del sistema, al igual que la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** En el año 2021. Indica que, se demuestra el cumplimiento de los parámetros de validación que fueron establecidos según las normas estandarizadas de la USP, el método de investigación planteado fue correcto para separar cromatográficamente las vitaminas del producto farmacéutico jarabe de complejo B. La investigación dio como resultado el cumplimiento al parámetro aptitud del sistema, de esta manera, los autores de la investigación concluyen que se determinó condiciones cromatográficas adecuadas para una correcta cuantificación de las vitaminas hidrosolubles en jarabe de complejo B.

**Tabla N.º4. Resultados de aptitud del sistema de tiamina clorhidrato, se evalúa desviación estándar relativa de área y tiempo de retención en las cinco inyecciones sucesivas.**

<b>Muestra</b>	<b>Área</b>	<b>Tiempo de retención</b>	<b>Factor de asimetría &lt; 2.0</b>	<b>N.º de platos teóricos &gt; 1000</b>
<b>std 1</b>	63385505.00	22.82	1.47	66377.27
<b>std 2</b>	65300370.00	22.85	1.39	68269.38
<b>std 3</b>	66169153.00	22.87	1.40	67698.01
<b>std 4</b>	63683586.00	22.82	1.44	65715.13
<b>std 5</b>	64209746.00	22.87	1.44	65946.17
<b>Promedio.</b>	<b>64549672.0</b>	<b>22.8</b>	<b>1.4</b>	<b>66801.2</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1162669.95</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>1123.63</b>
<b>(DSR %) &lt;2.0%</b>	<b>1.801</b>	<b>0.110</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º4, se observa el resultado de las 5 inyecciones repetidas del estándar de Tiamina clorhidrato, obteniéndose una desviación estándar para el área de 1.801% y para tiempo de retención 0.110%, según las normas oficiales como farmacopea americana USP y la ICH nos indican que, para el parámetro de aptitud del sistema, la desviación estándar debe tener un resultado menor a 2.0%, de esta manera se evidencia que cumple el parámetro de aptitud del sistema para el activo de Tiamina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con los resultados se determina que el equipo y las condiciones cromatográficas son aptos para el análisis de un proceso de validación, ya que cumple con la prueba de aptitud del sistema, al igual que la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** En el año 2021. Indica que, se demuestra el cumplimiento de los parámetros de validación que fueron establecidos según las normas estandarizadas de la USP, el método de investigación planteado fue correcto para separar cromatográficamente las vitaminas del producto farmacéutico jarabe de complejo B. La investigación dio como resultado el cumplimiento al parámetro aptitud del sistema, de esta manera los autores de la investigación concluyen que se determinó condiciones cromatográficas adecuadas para una correcta cuantificación de las vitaminas hidrosolubles en jarabe de complejo B.

**Tabla N.º5. Resultados de aptitud del sistema de D- Pantenol, se evalúa desviación estándar relativa de área y tiempo de retención en las cinco inyecciones sucesivas.**

Muestra	Área	Tiempo de retención	Factor de asimetría < 2.0	N.º de platos teóricos > 1000
std 1	46093852.00	14.58	1.11	2921.61
std 2	45528049.00	14.60	1.07	2908.73
std 3	45443845.00	14.63	1.07	3122.85
std 4	46219948.00	14.63	1.14	3156.48
std 5	46626000.00	14.65	1.12	3113.51
<b>Promedio.</b>	<b>45982338.8</b>	<b>14.6</b>	<b>1.1</b>	<b>3044.6</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>494860.55</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>119.35</b>
<b>(DSR %) &lt;2.0%</b>	<b>1.076</b>	<b>0.190</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 5, se observa el resultado de las 5 inyecciones repetidas del estándar de D-Pantenol, obteniéndose una desviación estándar para el área de 1.076% y para tiempo de retención 0.190%, según las normas oficiales como farmacopea americana USP y la ICH nos indican que, para el parámetro de aptitud del sistema, la desviación estándar debe tener un resultado menor a 2.0%, de esta manera se evidencia que cumple el parámetro de aptitud del sistema para el activo de D-Pantenol.

**Discusión:** De acuerdo con los resultados se determina que el equipo y las condiciones cromatográficas son aptos para el análisis de un proceso de validación, ya que cumple con la prueba de aptitud del sistema, al igual que la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** En el año 2021. Ya que el autor mencionado indica, que según las normas un método analítico no puede ser validado si no cumple con dichos parámetros. Cabe mencionar que los valores de los parámetros de aptitud del sistema se obtuvieron por software del HPLC los cuales ya presentan en su sistema las fórmulas establecidas en la USP, con los resultados obtenidos concluye que su trabajo de investigación cumple con criterios del parámetro aptitud del sistema.

#### 4.2.2. SELECTIVIDAD

Se determina la presencia de interferencias del diluyente, fase móvil, placebo y excipiente para los activos de: nicotinamida, riboflavina, tiamina clorhidrato y piridoxina clorhidrato.

**Tabla N.º6. Evaluación de la interferencia del diluyente, de fase móvil y placebo con respecto al activo: Piridoxina clorhidrato.**

Muestra		Área	% Interferencia con estándar	% Interferencia en relación con el producto.	Resultado
<b>Diluyente</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente puro</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente más D- Pantenol</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Estándar de Piridoxina Clorhidrato 100 %</b>	Muestra 1	77504848	100.61	-----	-----
	Muestra 2	77845801	100.55	-----	-----
<b>Placebo más Piridoxina Clorhidrato al 100%</b>	Muestra 1	74758833	-----	98.51	-----
	Muestra 2	75701290	-----	98.76	-----
<b>Placebo más 4 vitaminas (Piridoxina clorhidrato 100 % + Nicotinamida al 100% + Riboflavina al 1&lt;00 % +Tiamina Clorhidrato al 100 %)</b>	Muestra 1	70142740	0.000	98.92	-----
	Muestra 2	69779929	0.000	99.49	-----
<b>Control negativo (Clobuler jarabe)</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla Nº6. Como resultado podemos observar que no hay presencia de un área en el tiempo de retención

de la Piridoxina clorhidrato, por lo que se interpreta que no existe interferencias en la cuantificación de la piridoxina por parte del diluyente, placebo y otros activos como D-Pantenol, Nicotinamida, Riboflavina, Tiamina clorhidrato y el control negativo (clobuler jarabe).

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas, la investigación nos otorgó un valor para la selectividad con un porcentaje de discrepancia < al 3,5 %, Teniendo estos resultados, se concluye que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles.

**Tabla N.º7. Evaluación de la interferencia del diluyente, de fase móvil y placebo con respecto al activo: Tiamina clorhidrato.**

Muestra		Área	% Interferencia con el estándar	% Interferencia con relación al producto.	Resultado
<b>Diluyente</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente puro</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente más D-Pantenol</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Estándar de Tiamina Clorhidrato 100 %</b>	Muestra 1	132195246.5	99.06	-----	-----
	Muestra 2	126428117.0	99.04	-----	-----
<b>Placebo más Tiamina Clorhidrato al 100%</b>	Muestra 1	137160979.5	-----	101.19	-----
	Muestra 2	139973707.0	-----	102.47	-----
<b>Placebo más 4 vitaminas (Tiamina clorhidrato 100 % + Nicotinamida al 100% + Riboflavina al 100 % +Tiamina Clorhidrato al 100 %)</b>	Muestra 1	123271863.0	-----	98.60	-----
	Muestra 2	122700105.5	-----	98.76	-----
<b>Control negativo (Clobuler jarabe)</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°7. Como resultado podemos observar que no hay presencia de un área en el tiempo de retención de la Tiamina clorhidrato, por lo que se interpreta que no existe interferencias en la cuantificación de la Tiamina clorhidrato por parte del diluyente, placebo y otros activos como D-Pantenol, Nicotinamida, Riboflavina Piridoxina clorhidrato y el control negativo (clobuler jarabe).

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**,

donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C.** en el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas, la investigación nos otorgó un valor para la selectividad con un porcentaje de discrepancia < al 3,5 %, Teniendo estos resultados, se concluye que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles.

**Tabla N.º8. Evaluación de la interferencia del diluyente, de fase móvil y placebo con respecto al activo: Nicotinamida**

Muestra		Área	% Interferencia con el estándar	% Interferencia en relación con el producto.	Resultado
Diluyente	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	Conforme
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	Conforme
Placebo de excipiente puro	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	Conforme
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	Conforme
Placebo de excipiente más D- Pantenol	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	Conforme
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	Conforme
Estándar de Nicotinamida 100 %	Muestra 1	67682882.5	98.37	-----	-----
	Muestra 2	68295374.5	99.21	-----	-----
Placebo más Nicotinamida al 100%	Muestra 1	67895027.5	-----	98.43	-----
	Muestra 2	65975897.0	-----	98.25	-----
Placebo más 4 vitaminas (Nicotinamida 100 % + piridoxina clorhidrato al 100% + Riboflavina al 100 % +Tiamina Clorhidrato al 100 %)	Muestra 1	61296315.0	-----	97.69	-----
	Muestra 2	62228915.0	-----	98.63	-----
Control negativo (Clobuler jarabe)	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	Conforme
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	Conforme

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°8. Como resultado podemos observar que no hay presencia de un área en el tiempo de retención de la Nicotinamida, por lo que se interpreta que no existe interferencias del diluyente, placebo y otros activos como D-Pantenol, Piridoxina clorhidrato, Riboflavina y Tiamina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP–NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del

producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas de Riboflavina y Nicotinamida es mayor a las demás, esto puede ser debido a degradación por condiciones ambientales, incluso el aumento casi similar de las dos vitaminas mencionadas podría ser debido a que las dos vitaminas diferentes, eluyen en tiempos muy cercanos por lo que, si una vitamina de las antes mencionadas es afectada, esta condición se ve reflejada en la otra. por último, la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menos al 0.05 % de del factor de respuesta del activo, debe ser despreciado.

**Tabla N.º9. Evaluación de la interferencia del diluyente, de fase móvil y placebo con respecto al activo: Riboflavina**

Muestra		Área	% Interferencia con el estándar	% Interferencia en relación con el producto.	Resultado
<b>Diluyente</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente puro</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente más D-Pantenol</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Estándar de Riboflavina 100 %</b>	Muestra 1	145588515.5	99.40	-----	-----
	Muestra 2	145621483.0	99.94	-----	-----
<b>Placebo más Riboflavina al 100%</b>	Muestra 1	150878517.5	-----	101.69	-----
	Muestra 2	150182767.5	-----	101.22	-----
<b>Placebo más 4 vitaminas (Nicotinamida 100 % + piridoxina clorhidrato al 100% + Riboflavina al 100 % +Tiamina Clorhidrato al 100 %)</b>	Muestra 1	132337055.0	-----	98.85	-----
	Muestra 2	131657420.5	-----	98.06	-----
<b>Control negativo (Clobuler jarabe)</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla Nº9. Como resultado podemos observar que no hay presencia de un área en el tiempo de retención de la Riboflavina por lo que se interpreta que no existe interferencias del diluyente, placebo y otros activos como D-Pantenol, Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato y Tiamina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP–NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias

en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas de Riboflavina y Nicotinamida es mayor a las demás, esto puede ser debido a degradación por condiciones ambientales, incluso el aumento casi similar de las dos vitaminas mencionadas podría ser debido a que las dos vitaminas diferentes, eluyen en tiempos muy cercanos por lo que, si una vitamina de las antes mencionadas es afectada, esta condición se ve reflejada en la otra. por último, la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menos al 0.05 % de del factor de respuesta del activo, debe ser despreciado.

**Tabla N.º10. Evaluación de la interferencia del diluyente, de fase móvil y placebo con respecto al activo: D-Pantenol**

Muestra		Área	% Interferencia con el estándar	% Interferencia en relación con el producto.	Resultado
<b>Diluyente</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente puro</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Placebo de excipiente más 4 vitaminas (Nicotinamida, piridoxina clorhidrato, Riboflavina y Tiamina Clorhidrato)</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
<b>Estándar de D-pantenol a</b>	Muestra 1	62062121	98.21	-----	-----
	Muestra 2	62248602.5	99.20	-----	-----
<b>Placebo más D-pantenol más las 4 vitaminas (Nicotinamida 100 % + piridoxina clorhidrato al 100% + Riboflavina al 100 % +Tiamina Clorhidrato al 100 %)</b>	Muestra 1	63180276.5	-----	99.75	-----
	Muestra 2	63147653.5	-----	99.93	-----
<b>Control negativo (Clobuler jarabe)</b>	Muestra 1	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>
	Muestra 2	0.000	0.000	0.000	<b>Conforme</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°10. Como resultado podemos observar que no hay presencia de un área en el tiempo de retención de la D-Pantenol, por lo que se interpreta que no existe interferencias del diluyente, placebo y otros activos como Piridoxina clorhidrato, Nicotinamida, Riboflavina y Tiamina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, por lo tanto, concluyen que el método desarrollado, optimizado cumple con el parámetro de selectividad.

**DETERMINACIÓN DEL ANALITO CON INTERFERENCIA DEL PRODUCTO DE DEGRADACIÓN A CAUSA DE ESTRÉS.**

**Tabla N.º11. Interferencia por compuestos degradados de la muestra del producto por estrés para: Nicotinamida.**

Muestra (Condiciones)	Muestra	Área	Conc. Final (mg/5mL)	% Analito Cuantificación	Porcentaje de Degradación %
Placebo + Nicotinamida expuesta a luz	Muestra 1	62396562.0	18.1	90.69	<b>9.31</b>
	Muestra 2	61452836.0	17.9	89.32	<b>10.68</b>
Placebo + Nicotinamida (Hidrólisis ácida con el ácido clorhídrico a 1N)	Muestra 1	57771652.5	17.7	88.39	<b>11.61</b>
	Muestra 2	61606185.0	17.9	89.54	<b>10.46</b>
Placebo + Nicotinamida (Hidrólisis alcalina con el Hidróxido de Sodio a 1N).	Muestra 1	61615169.0	18.1	90.37	<b>9.63</b>
	Muestra 2	66286278.0	18.3	91.62	<b>8.38</b>
Placebo + Nicotinamida (Calor seco 105 °C x 48 h)	Muestra 1	65388321.0	19.0	95.04	<b>4.96</b>
	Muestra 2	64725171.5	18.8	94.07	<b>5.93</b>
Placebo + Nicotinamida (Calor Húmedo 60 °C x 2 h)	Muestra 1	63289120.5	18.4	91.99	<b>8.01</b>
	Muestra 2	64928749.5	18.4	91.89	<b>8.20</b>
Placebo + Nicotinamida (Oxidación con peróxido de 2% v/v)	Muestra 1	65292375.5	19.0	94.90	<b>5.10</b>
	Muestra 2	65075701.5	18.9	94.58	<b>5.42</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°11. Se observa que la nicotinamida más placebo sometido a diferentes factores de degradación como: Luz por 48 h al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 90.005%, hidrólisis ácida con HCL 1N e hidrólisis alcalina con NaOH 1N al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 88.965% y 90.995% respectivamente, calor seco a 105°C y calor húmedo a 60°C al cuantificar el porcentaje de

recuperación es de 94.555% y 91.94% respectivamente y al someter a estrés de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2% al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 94.74%. Podemos observar que la concentración recuperada no es al 100% por los factores de degradación a las que la nicotinamida resulta ser sensible, Además se observa que la degradación no generó ningún área por lo tanto no existe interferencia en la cuantificación de la nicotinamida.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP–NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas de Riboflavina y Nicotinamida es mayor a las demás, esto puede ser debido a degradación por condiciones ambientales, incluso el aumento casi similar de las dos vitaminas mencionadas podría ser debido a que las dos vitaminas diferentes, eluyen en tiempos muy cercanos por lo que, si una vitamina de las antes mencionadas es afectada, esta condición se ve reflejada en la otra. por último, la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menos al 0.05 % de del factor de respuesta del activo, debe ser despreciado.

**Tabla N.º12. Interferencia por compuestos degradados de la muestra del producto por estrés para: Riboflavina.**

Muestra (Condiciones)	Muestra	Área	Conc. Final (mg/5mL)	% Analito Cuantificación	Porcentaje de Degradación %
Placebo + Riboflavina expuesta a luz	Muestra 1	134164980.0	2.5	92.57	7.43
	Muestra 2	131340252.0	2.5	90.62	9.38
Placebo + Riboflavina (Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 1N)	Muestra 1	124435669.0	2.4	87.70	12.3
	Muestra 2	133051322.5	2.5	90.37	9.63
Placebo + Riboflavina (Hidrólisis alcalina con Hidróxido de Sodio a 1N).	Muestra 1	132210462.5	2.5	90.98	9.02
	Muestra 2	141455453.0	2.7	97.08	2.92
Placebo + Riboflavina (Calor seco 105 °C x 48 h)	Muestra 1	105244380.5	2.0	72.42	27.58
	Muestra 2	103468435.5	1.9	71.01	28.99
Placebo + Riboflavina (Calor Húmedo 60°C x 2h)	Muestra 1	137067294.0	2.6	94.07	5.93
	Muestra 2	138830415.5	2.6	95.28	4.72
Placebo + Riboflavina (Oxidación con peróxido de 2% v/v)	Muestra 1	137767079.0	2.6	94.80	5.20
	Muestra 2	139340049.0	2.6	96.63	3.37

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°12. Se observa que la riboflavina más placebo sometido a diferentes factores de degradación como: Luz por 48h al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 91.595%, hidrólisis ácida con HCL 1N e hidrólisis alcalina con NAOH 1N al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 89.035% y 94.030% respectivamente, calor seco a 105°C y calor húmedo a 60°C; al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 71.715% y 94.675% respectivamente y al someter a estrés

de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2%; al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 95.715%. Podemos observar que la concentración recuperada no es al 100% por los factores de degradación a los que la riboflavina resulta ser sensible. Además, se observa que la degradación no generó ningún área; por lo tanto, no existe interferencia en la cuantificación de la riboflavina.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito, se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumplen criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultáneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas de Riboflavina y Nicotinamida es mayor a las demás, esto puede ser debido a degradación por condiciones ambientales, incluso el aumento casi similar de las dos vitaminas mencionadas podría ser debido a que las dos vitaminas diferentes, eluyen en tiempos muy cercanos por lo que, si una vitamina de las antes mencionadas es afectada, esta condición se ve reflejada en la otra. por último, la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menor al 0.05 % del factor de respuesta del activo debe ser despreciada.

**Tabla N.º13. Interferencia por compuestos degradados de la muestra del producto por estrés para: Piridoxina clorhidrato.**

Muestra (Condiciones)	Muestra	Área	Conc. Final (mg/5 mL)	% Analito Cuantificación	Porcentaje de Degradación %
Placebo + Piridoxina Clorhidrato expuesta a luz	Muestra 1	73754472.0	1.92	96.22	<b>3.78</b>
	Muestra 2	70984106.5	1.91	95.47	<b>4.53</b>
Placebo + Piridoxina Clorhidrato (Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 1N)	Muestra 1	69974752.0	1.83	91.28	<b>8.72</b>
	Muestra 2	72448072.0	1.81	90.44	<b>9.56</b>
Placebo + Piridoxina Clorhidrato (Hidrólisis alcalina con Hidróxido de Sodio a 1N).	Muestra 1	71740138.5	19.5	97.49	<b>2.51</b>
	Muestra 2	79462377.5	1.98	99.20	<b>0.8</b>
Placebo + Piridoxina Clorhidrato (Calor seco 105 °C x 48 h)	Muestra 1	77463230.0	1.99	99.56	<b>0.44</b>
	Muestra 2	77693984.5	2.00	99.86	<b>0.14</b>
Placebo + Piridoxina Clorhidrato (Calor Húmedo 60 °C x 2 h)	Muestra 1	74474247.5	1.94	97.15	<b>2.85</b>
	Muestra 2	76790838.0	1.95	97.73	<b>2.27</b>
Placebo + Piridoxina Clorhidrato (Oxidación con peróxido de 2% v/v)	Muestra 1	70886489.0	1.85	92.47	<b>7.53</b>
	Muestra 2	72733720.0	1.87	93.48	<b>6.52</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°13. Se observa que la piridoxina clorhidrato más placebo, sometido a diferentes factores de degradación como: luz por 48 h al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 95.845%, hidrólisis ácida con HCL 1N e hidrólisis alcalina con NaOH 1N al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 90.860% y 98.345% respectivamente, calor seco a 105°C y calor húmedo a 60°C al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 99.710% y 97.440% respectivamente y al

someter a estrés de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2% al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 92.975%. Podemos observar que la concentración recuperada no es al 100% por los factores de degradación a los que la piridoxina clorhidrato resulta ser sensible. Además, se observa que la degradación no generó ningún área; por lo tanto, no existe interferencia en la cuantificación de la piridoxina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, no se observa interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultáneo cumple con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, por lo tanto, concluyen que el método desarrollado, optimizado cumple con el parámetro de selectividad.

**Tabla N.º14. Interferencia por compuestos degradados de la muestra del producto por estrés para: Tiamina clorhidrato.**

Muestra (Condiciones)	Muestra	Área	Conc. Final (mg/5 mL)	% Analito Cuantificación	Porcentaje de Degradación %
Placebo + Tiamina Clorhidrato expuesta a luz	Muestra 1	124048203.5	4.7	93.88	<b>6.12</b>
	Muestra 2	122071543.5	4.6	92.57	<b>7.43</b>
Placebo + Tiamina Clorhidrato (Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 1N)	Muestra 1	115660960.0	4.4	87.89	<b>12.11</b>
	Muestra 2	124912258.5	4.6	91.44	<b>8.56</b>
Placebo + Tiamina Clorhidrato (Hidrólisis alcalina con Hidróxido de Sodio a 1N).	Muestra 1	121494427.0	4.6	92.32	<b>7.68</b>
	Muestra 2	128001664.0	4.7	93.88	<b>6.12</b>
Placebo + Tiamina Clorhidrato (Calor seco 105 °C x 48 h)	Muestra 1	13547149.0	5.1	101.12	<b>0.00</b>
	Muestra 2	132280808.0	5.0	99.52	<b>0.48</b>
Placebo + Tiamina Clorhidrato (Calor Húmedo 60 °C x 2 h)	Muestra 1	128055898.5	4.9	97.11	<b>2.89</b>
	Muestra 2	124612479.0	4.7	94.50	<b>5.50</b>
Placebo + Tiamina Clorhidrato (Oxidación con peróxido de 2% v/v)	Muestra 1	84801609.5	3.2	64.44	<b>35.56</b>
	Muestra 2	85140167.0	3.2	64.69	<b>35.31</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º14. Se observa que la tiamina clorhidrato más placebo sometido a diferentes factores de degradación, como: Luz por 48 h; al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 93.225%, hidrólisis ácida con HCL 1N e hidrólisis alcalina con NaOH 1N al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 89.665% y 93.100% respectivamente. Calor seco a 105°C y calor húmedo a 60°C al cuantificar, el porcentaje de recuperación es de 100.320% y 95.805% respectivamente y al someter a estrés de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2%; al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 64.565 % podemos observar que la concentración recuperada no es al 100% por los factores de degradación a las que la tiamina clorhidrato resulta ser sensible. Además, se observa que la degradación no generó ningún área; por lo tanto, no existe interferencia en la cuantificación de la tiamina clorhidrato.

**Discusión:** De acuerdo con las normas oficiales **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP–NF 2024**, donde señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito, se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que no se observa interferencia alguna; además, existe evidencia de que se cumplen criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultáneo cumple con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas; por lo tanto, concluyen que el método desarrollado y optimizado cumple con el parámetro de selectividad.

**Tabla N.º15. Interferencia por compuestos degradados de la muestra del producto por estrés para: D-Pantenol**

Muestra (Condiciones)	Muestra	Área	Conc. Final (mg/5m L)	% Analito Cuantificación	Porcentaje de Degradación %
Placebo + D-Pantenol expuesta a luz	Muestra 1	64901768.0	3.07	102.46	<b>-2.46</b>
	Muestra 2	64373115.5	3.06	101.87	<b>-1.87</b>
Placebo + D-Pantenol (Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 1N)	Muestra 1	67786688.5	3.03	100.90	<b>-0.90</b>
	Muestra 2	63206523.5	3.01	100.49	<b>-0.49</b>
Placebo + D-Pantenol (Hidrólisis alcalina con Hidróxido de Sodio a 1N).	Muestra 1	63206523.5	3.02	100.79	<b>-0.79</b>
	Muestra 2	65796537.0	3.00	100.14	<b>-0.14</b>
Placebo + D-Pantenol (Calor seco 105 °C x 48 h)	Muestra 1	64582526.5	3.03	101.96	<b>-1.98</b>
	Muestra 2	63703372.0	3.03	101.04	<b>-1.04</b>
Placebo + D-Pantenol (Calor Húmedo 60 °C x 2 h)	Muestra 1	63184588.5	3.00	99.99	<b>0.01</b>
	Muestra 2	63012455.0	3.01	100.18	<b>-0.18</b>
Placebo + D-Pantenol (Oxidación con peróxido de 2% v/v)	Muestra 1	64267841.5	3.04	101.46	<b>-1.46</b>
	Muestra 2	64970912.5	3.08	102.57	<b>-2.57</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N°15. Se observa que el D-Pantenol más placebo sometido a diferentes factores de degradación como: Luz por 48 h al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 102.165%, hidrólisis ácida con HCL 1N e hidrólisis alcalina con NaOH 1N al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 100.695% y 100.465% respectivamente, calor seco a 105°C y calor húmedo a 60°C al cuantificar el

porcentaje de recuperación es de 101.500% y 100.085% respectivamente y al someter a estrés de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2% al cuantificar el porcentaje de recuperación es de 102.015%. Podemos observar que la concentración recuperada no es al 100% por los factores de degradación a las que el D-Pantenol resulta ser sensible. Además, se observa que, a causa del estrés, sometido a la muestra, al cuantificar no genero ningún área por lo tanto no existe interferencia en la cuantificación del D-Pantenol.

**Discusión:** Según **Conference on Harmonization ICH Q2(R2)** y la farmacopea americana **USP-NF 2024**, señalan que, para demostrar selectividad, no debe existir interferencias en el análisis del analito por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Por lo antes descrito se llega a la conclusión de que los métodos planteados son selectivos, ya que, al no observarse interferencia alguna, además existe evidencia de que se cumple criterios para el parámetro de selectividad. Estos resultados coinciden con la investigación de **Dávila C, Santillán R, Pazmiño C**. En el año 2021, que la técnica analítica para identificar y cuantificar vitaminas hidrosolubles en simultaneo cumplen con los parámetros establecidos, demostrando que sus resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas, encontrándose dentro de los rangos, el porcentaje de discrepancia de las áreas de Riboflavina y Nicotinamida es mayor a las demás, esto puede ser debido a degradación por condiciones ambientales, incluso el aumento casi similar de las dos vitaminas mencionadas podría ser debido a que las dos vitaminas diferentes, eluyen en tiempos muy cercanos por lo que, si una vitamina de las antes mencionadas es afectada, esta condición se ve reflejada en la otra. por último, la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menos al 0.05 % de del factor de respuesta del activo, debe ser despreciado.

#### **4.2.3. LINEALIDAD**

Este parámetro evalúa la capacidad del método para lograr resultados linealmente proporcionales; se determina directamente o por una transformación matemática, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. **(3)**

Se miden parámetros como: Coeficiente de correlación, coeficiente de variación de respuesta. Además, se evalúa el cumplimiento de Test:

Test de proporcionalidad y Test de linealidad. (3)

✓ **LINEALIDAD DEL SISTEMA**

✓ **Riboflavina:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 80% a 160%, se preparó 5 concentraciones crecientes del activo: 80%, 100%, 120%, 140% y 160%; se analizó por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º16. Resultados de linealidad del sistema de riboflavina.**

Concentración teórica	muestra	X Concentration mq/mL	y AREAS	xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp1	0.0135301	87522543.5	1184185.79004	0.00018	7660195620709390.0	6468744757.0
	mp2	0.0135301	87206330.0	1179907.40052	0.00018	7604943992C68900.0	6445373585.0
	mp3	0.0136997	88419245.5	1211319.08280	0.00019	7817962974789270.0	6454090491.8
100%	mp4	0.0164990	107169589.0	1768195.97871	0.00027	11485320806428900.0	6495502164.2
	mp5	0.0164990	107087186.0	1766836.40782	0.00027	11467665405398600.0	6490507754.2
	Mp6	0.0162021	104544243.0	1693841.29763	0.00026	10929498744443G00.0	6452492780.6
120%	mp7	0.0195529	125798117.5	2459712.22495	0.00038	15825166366543800.0	6433747088.8
	mp8	0.0195104	124866894.5	2436208.05313	0.00038	15591741342074100.0	6400004023.5
	mp9	0.0195953	126C67952.0	2470335.3C565	0.00038	15893128521474300.0	6433591620.2
140%	mp10	0.0227339	144753911.0	3290821.51630	0.00052	2095369474979590G.0	6367314254.5
	mp11	0.0220553	139355147.0	3073516.78653	0.00049	19419856995391600.0	6318448326.2
	mp12	0.0221825	140248505.0	3111065.54763	0.00049	19669643154735000.0	6322477895.0
160%	mp13	0.0262119	169736936.5	4449119.45847	0.00069	2881G627612405G00.0	6475579692.0
	mp14	0.0261694	167153183.5	4374304.87211	0.00068	27940186754184700.0	6387343262.8
	mp15	0.0262967	168057538.5	4419355.31152	0.00069	28243336246679000.0	6390827226.1
suma	15	0.29427	1887987322.5	38888725.034	0.00607	249312969287122000	96336044922
<b>Promedio f</b>							6422402994.8
<b>Desv. estándar de f</b>							56189969.40122
<b>Desv. estándar/Promedio f</b>							0.00875

Fuente: Elaboración propia

**Cálculo de la recta de regresión lineal:**

Ecuación de la recta:  $y = b x + a$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Hallar “b”

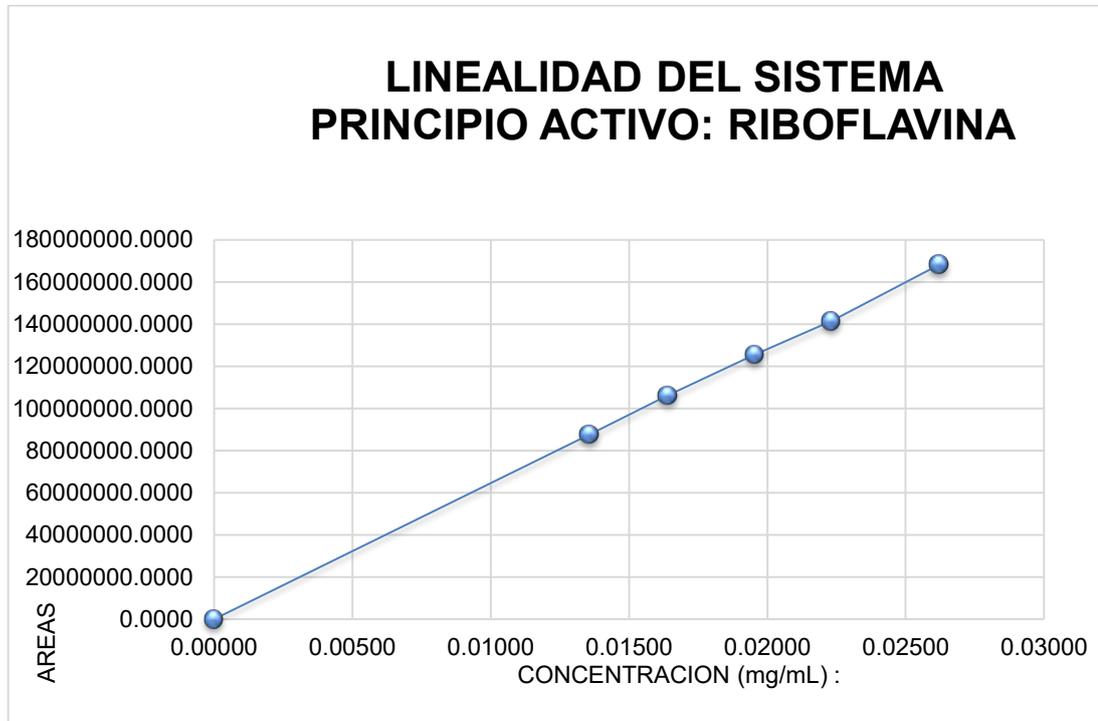
$$b = 6304105143.857$$

Hallar "a"

$$a = 2192587.804$$

Ecuación de la recta:

$$y = 6304105143.857 x + 2192587.804$$



**Grafica N.º 3.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del sistema de riboflavina.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación "r", refleja el grado de relación entre las variables X "concentraciones", e Y "área", el cual se halla según la siguiente fórmula.

**Criterio de aceptación:**

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

$$r = 0.99918$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente "b"**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:**  $s_{yx}^2$

**Fórmula para hallar:**

$$s_{yx}^2 = 1.13690656624E+12$$

$$s_{yx} = \sqrt{1.13690656624E + 12} = 1.06625820805E+06$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:**  $S_b^2$

**Hallar:**  $s_b^2$

$$s_b^2 = 3873313743858130.0$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:**  $s_b$

$$s_b = \sqrt{3873313743858130.00} = 62235952.181$$

La desviación estándar relativa de la pendiente "b":

$$S_b \text{ relat.(\%)} = \mathbf{0.987}$$

- **Determinación de los límites de confianza para "b":**

**b +/- t<sub>s<sub>b</sub></sub>**

**Donde:**

t = valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad seleccionada, generalmente 95 %.

t = valor de: t, para 15 -2 = 13 grados de libertad y P = 0,05 (intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces: 6304105143.857 +/- 2.160 (62235952.181)

Entonc	6304105143.857	+/-
es:	2.306(62235952.181)	

6304105143.857 +/- 134429656.711

(6169675487.147 a 6438534800.568)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{exp} = \frac{b}{s_b} = \frac{6304105143.85748}{62235952.181} = 101.291$$

T, tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

**101.291 > 2.160**

Como podemos observar el valor de t exp = 101.291, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**c. Análisis del intercepto o término independiente “a”**

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

$$s_a^2 = 1566483344667.230$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = \sqrt{1566483344667.23} = 1251592.324$$

$$a = 2192587.804$$

La desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relat}(\%)} = \frac{s_a \times 100}{a} = \frac{1251592.324 \times 100}{2192587.804} = 57.0829$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

**Donde:**

**t** = valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad seleccionada, generalmente 95%.

**t** = valor de t para 15-2 = 13 grados de libertad y P=0.05 (Intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces: 2192587.804 +/- 2.160 (1251592.324)

2192587.804 +/- 2703439.418

(-510851.614 a 4896027.222)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

$$t \text{ exp} = \frac{a}{s_a} = \frac{2192587.804}{1251592.324}$$

$$t_{\text{exp}} = 1.752$$

t tabla = 2.650 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

$$1.752 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp = 1.752 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 16 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración cada una

por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones, Además en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observa las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para riboflavina se observa en la Grafica N° 3, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a:  $b = 6304105143.857$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor b mayor sensibilidad y  $a = 2192587.804$  intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Riboflavina a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado el coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.99918 teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que existe relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de T,  $T_{exp} = 101.291$  es mayor que  $T_{tablas} = 2.160$ , con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** La linealidad de sistema según el autor **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación ( $r$ ) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de 0,998 además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de 0,60%. al igual que la tesis mencionada nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis. El cual indica que existe una correlación lineal significativa entre la concentración del analito y el área, al igual que la tesis mencionada, nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

- ✓ **Nicotinamida:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 80% a 160%, se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo de 80%, 100%, 120%, 140% y 160%; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º17. Resultados de linealidad de sistema de nicotinamida.**

Concentración teórica	Muestra	X Concentración n mq/mL	y AREAS	Xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp 1	0.0965002	38740375.0	3738452.38596	0.00931	1500816655140620.0	401453997.6
	mp 2	0.0984063	39498259.5	3886878.99577	0.00968	1560112503529340.0	401379231.3
	mp3	0.0992403	39834337.5	3953171.12579	0.00985	1586774444063910.0	401392804.3
100%	mp4	0.1196721	48021052.0	5746780.71330	0.01432	2306021435186700.0	401271868.6
	mp5	0.1197317	48068261.5	5755293.70407	0.01434	2310557763632380.0	401466525.0
	mp6	0.1171703	47026139.0	5510064.74532	0.01373	2211457749247320.0	401348777.5
120%	mp7	0.1420101	56147052.5	7973449.21399	0.02017	3152491504437760.0	395373623.1
	mp8	0.1418314	56311379.5	7986722.24091	0.02012	3170971461193020.0	397030391.9
	mp3	0.1429632	57161243.5	8171954.28674	0.02044	3267407758466290.0	399831869.3
140%	mp 10	0.1667904	66138404.0	11031250.85852	0.02782	4374288483667220.0	396536035.6
	mp 11	0.1641098	64204439.0	10536580.21158	0.02693	4122209987304720.0	391228454.1
	mp 12	0.1610719	62883589.5	10128777.47884	0.02594	3954345828404510.0	390407019.7
160%	mp 13	0.1994932	80055706.0	15970571.52998	0.03980	6408916063158440.0	401295348.2
	mp 14	0.1998506	80206750.5	16029370.41975	0.03994	6433122825769250.0	401333468.3
	mp 15	0.1962766	78764467.0	15459618.63299	0.03852	6203841261794090.0	401293292.5
<b>Suma</b>	<b>15</b>	2.16512	863061456.0	131878936.544	0.330910	52563335724995600	5982642707
<b>Promedio f</b>							398842847.1
<b>Desv estandar</b>							3852661.49751
<b>Desv. estándar/Promedio f</b>							0.00966

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

Coefficiente de Variación de Respuesta :	Des. estándar f x 100 =
Especificación: Máximo 2.0%	Promedio f

**Resultado:** 0.966 %

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

Donde:

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Hallar "b"

$$b = 397065365.16485$$

Hallar "a"

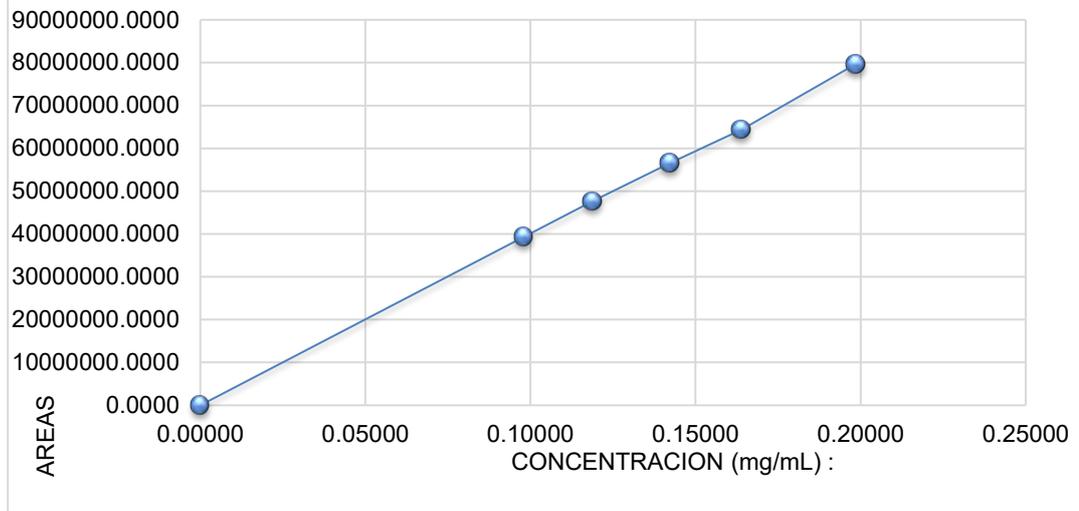
$$a = 224536.572$$

Ecuación de la recta:

$$y = 397065365.165 x + 224536.572$$

**Grafica N°4.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del sistema de nicotinamida.

## LINEALIDAD DEL SISTEMA PRINCIPIO ACTIVO: NICOTINAMIDA



### Interpretación estadística de la regresión lineal:

#### a. Coeficiente de correlación "r":

El coeficiente de correlación "r", refleja el grado de relación entre las variables X "concentraciones", e Y "área".

#### Criterio de aceptación:

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99911$$

#### b. Prueba de linealidad de la pendiente "b"

- Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$

Fórmula para hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 3.83751355966E+11$$

$$s_{yx} = \sqrt{3.83721355966E + 11} = 6.19476679114E+05$$

- Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 20862899449199.9$$

- Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$

$$s_{yx} = \sqrt{20862899449199.9} = 4567592.303$$

La desviación estándar relativa de la pendiente "b":

$$s_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 1.150$$

- **Determinación de los límites de confianza para "b":**

**b +/- t<sub>s<sub>b</sub></sub>**

Donde:

t = valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t = valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P = 0,05 intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces: 397065365.165 +/- 2.160 (4567592.303)

397065365.165 +/- 9865999.375

(387199365.79 a 406931364.54)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{b}{s_b} = \frac{397065365.16485}{4567592.303} = 86.928$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

**86.928 > 2.160**

Como podemos observar el valor de t exp = 86.928, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

- c. **Análisis del intercepto o término independiente "a"**

- **Determinación de la varianza del término independiente: s<sub>a</sub><sup>2</sup>**

Hallar s<sub>a</sub><sup>2</sup>

$$s_a^2 = 460249079392.759$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente: s<sub>a</sub>**

$$s_a = \sqrt{460249079392.759}$$

$$s_a = 678416.597$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = 302.1408$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

**Donde:**

**t**= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95%.

**t**= valor de t para 15-2 =13 grados de libertad y P=0.05 (Intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces: 224536.572 +/- 2.160 (678416.597)

224536.572 +/- 1465379.849

(-1240843.277 a 1689916.421)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a} = 0.331$$

t tabla = 2.650 para n-2 =15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

$$0.331 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp =0.331 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:** En la tabla N° 17 se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración, cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal **y = b x + a**, Así mismo se observan las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para nicotinamida se observa en la Grafica N° 4, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación

de la recta, teniendo  $a: b = 397065365.16485$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor  $b$  mayor sensibilidad; y  $a = 224536.572$  intercepto con el eje  $Y$  de la coordenada  $y$ , que es indicativo del error de método.

Para el activo nicotinamida a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado el coeficiente de correlación  $(r) = 0.99911$  teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. Se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente "x" e independiente "y"). Además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de  $T$ ,  $T_{exp} = 86.928$  es mayor que  $t_{tablas} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** La linealidad de sistema según el autor **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación  $(r)$  debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación  $(r^2)$  debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de 0,998 además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de 0,60%. al igual que la tesis mencionada nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis. El cual indica que existe una correlación lineal significativa entre la concentración del analito y el área, al igual que la tesis mencionada, nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

- ✓ **Tiamina clorhidrato:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 40% a 280%, se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo de 40%, 100%, 160%, 220% y 280%; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º18. Resultados de linealidad de sistema de tiamina clorhidrato.**

Concentración teórica	muestra	X Concentración mq/mL	y AREAS	Xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
40%	mp1	0.0116601	25693834.5	299591.75468	0.00014	660173131313390.0	2203575769.4
	mp2	0.0117161	25836906.0	302708.34280	0.00014	667545711652836.0	2205243851.2
	mp3	0.0117161	25896066.5	303401.47443	0.00014	670606260172422.0	2210293346.2
100%	mp4	0.0288138	63130813.0	1819039.37719	0.00083	3985499550040970.0	2190991355.1
	mp 5	0.0285335	62959380.0	1796452.85434	0.00081	3963883529984400.0	2206505737.4
	mp6	0.0280290	61395267.5	1720847.95276	0.00079	3769378871396560.0	2190419476.3
160%	mp7	0.0509567	111645117.5	5689069.21510	0.00260	12464632261588800.0	2190979190.1
	mp8	0.0504522	110012076.0	5550351.26077	0.00255	12102656865829800.0	2180520889.1
	mp9	0.0505083	110079036.0	5559900.35068	0.00255	12117394166689300.0	2179426500.9
220%	mp 10	0.0617199	133709140.0	8252509.13410	0.00381	17878134119539600.0	2166387680.3
	mp11	0.0616638	129324580.0	7974645.03620	0.00380	16724846992176400.0	2097252845.3
	mp12	0.0600942	128862941.5	7743912.28638	0.00361	16605657692032400.0	2144349920.0
280%	mp13	0.0796584	177122425.5	14109292.20765	0.00635	31372353615003100.0	2223524267.1
	mp14	0.0789297	172530354.5	13617762.91049	0.00623	29766723223895700.0	2185874685.8
	mp15	0.0788736	175364829.5	13831656.46824	0.00622	30752823425564100.0	2223365183.8
suma	15	0.69333	1513562768.0	88571140.626	0.04055	193502309416880000	32798710698
<b>Promedio f</b>							2186580713.2
<b>Desv. estándar f</b>							32323111.2
<b>Desv. estándar f/Promedio f</b>							0.0148

Fuente: Elaboración propia

**Formula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado:** 1.478 %

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Hallar "b"

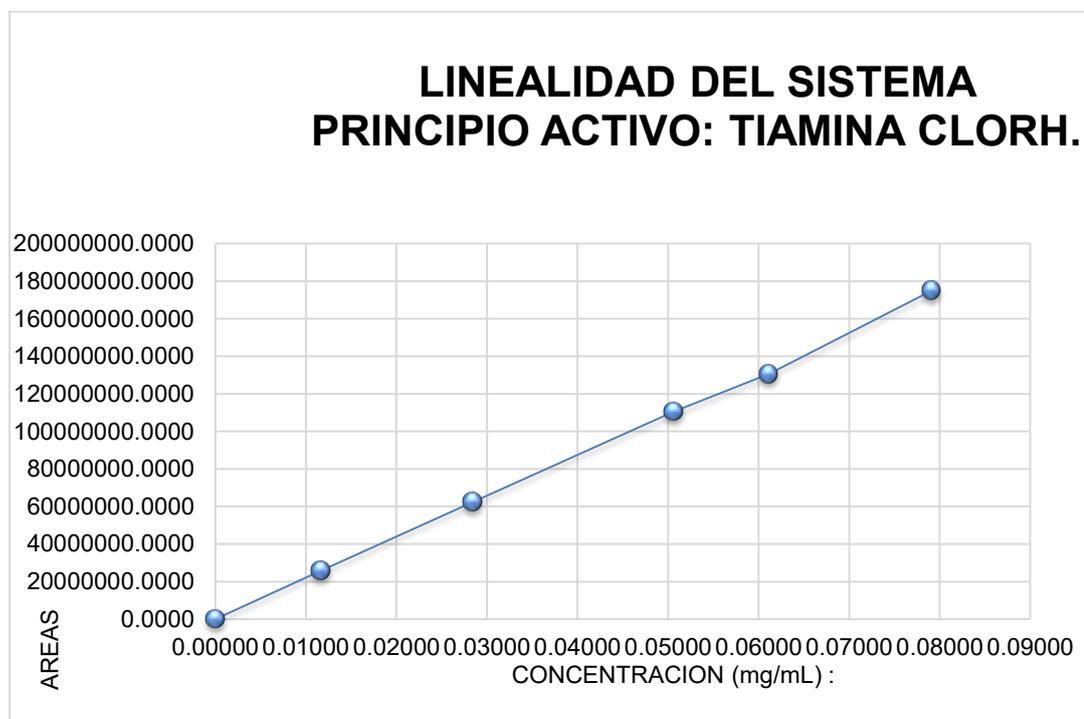
$$b = 2187961126.49216$$

Hallar "a"

$$a = -227075.51223$$

Ecuación de la recta:

$$y = 2187961126.492 x - 227075.512$$



**Grafica N° 5.:** Representación de la de calibración de la linealidad del sistema de tiamina clorhidrato.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación "r", refleja el grado de relación entre las variables X "concentraciones", e Y "área".

**Criterio de aceptación:**

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99909$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Fórmula para hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 4.29152610666E+12$$

$$s_{yx} = \sqrt{4.29152610666E + 12} = 2.07159989058E+06$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 504504486601924.0$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_{yx} = \sqrt{504504486601924.00} = 22461177.320$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$s_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 1.027$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

**b +/-  $t s_b$**

donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 2187961126.492 +/- 2.160 (22461177.32)

2187961126.492 +/- 48516143.011

(2139444983.481 a 2236477269.503)

**Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de**

**t:**

Hallando el t experimental:

$$t \text{ exp exp} = \frac{b}{s_b} = \frac{2187961126.49216}{22461177.320} = 97.408$$

t tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad del 95.0 %

Entonces debe cumplirse que: t tabla = 2.160

t exp > t tablas

**97.408 > 2.160**

Como podemos observar el valor de t exp = 97.408, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

### c. Análisis del intercepto o término independiente "a"

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 1363947621212.5$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = \sqrt{1363947621212.5}$$

$$s_a = 1167881.681$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = -514.3142$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

**Donde:**

**t** = valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

**t** = valor de t para 15 - 2 = 13 grados de libertad y P = 0,05 intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces: -227075.512 +/- 2.160 (1167881.681)

-227075.512 +/- 2522624.43

(-2749699.943 a 2295548.918)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{/a/}{s_a} = 0.194$$

T tabla = 2,650 para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de  $P=0,02$

Entonces debe cumplirse que:  $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$ .

$t_{\text{tabla}} = 0.194$

**0.194 2.650**

Como podemos observar el valor obtenido para el  $t_{\text{exp}} = 0.194$  menor que el  $t_{\text{tabla}} = 2.650$  indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 18 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones, Además en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observa las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Tiamina clorhidrato se observa en la Grafica N° 5, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a:  $b = 2187961126.49216$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor  $b$  mayor sensibilidad y  $a = -227075.51223$  intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Tiamina clorhidrato a una concentración de 40% a 280%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación  $(r) = 0.99909$  teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. Se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de T,  $T_{\text{exp}} = 97.408$  es mayor que  $t_{\text{tablas}} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** La linealidad de sistema según el autor **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación (r) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado  $0,999$  y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de  $0,998$  además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de  $0,60\%$ . al igual que la tesis mencionada nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis. El cual indica que existe una correlación lineal significativa entre la concentración del analito y el área, al igual que la tesis mencionada, nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

- ✓ **Piridoxina clorhidrato:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de  $80\%$  a  $160\%$ , se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo de  $80\%$ ,  $100\%$ ,  $120\%$ ,  $140\%$  y  $160\%$ ; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º19. Resultados de linealidad de sistema de piridoxina clorhidrato.**

Concentración teórica	muestra	X Concentración mg/mL	Y AREAS	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f(yfx)
80%	mp 1	0.0099308	46080822.0	457620.44090	0.00010	2123442156195680.0	4640182051.4
	mp2	0.0100498	46686474.5	469187.58385	0.00010	2179626901239150.0	4645534059.8
	mp 3	0.0100498	46729829.0	469623.28591	0.00010	2183676918369240.0	4649848046.0
100%	mp4	0.0122500	56940045.0	697515.32349	0.00015	3242168724602020.0	4648168456.5
	mp5	0.0123095	56942669.5	700933.62639	0.00015	3242467609786230.0	4625926746.4
	mp6	0.0120716	55414581.0	668942.54517	0.00015	3070775787405560.0	4590492576.0
120%	mp 7	0.0148070	68667890.0	1016767.78194	0.00022	4715279117052100.0	4637518222.8
	mp 8	0.0142718	66373327.5	947269.51035	0.00020	4405418603422260.0	4650649635.9
	mp 9	0.0145692	67537286.0	983962.20107	0.00021	4561285000245800.0	4635630307.0
140%	mp10	0.0166505	76855219.5	1279676.29518	0.00028	5906724764393180.0	4615796031.1
	mp 11	0.0163532	75461299.5	1234029.94992	0.00027	5694407722228700.0	4614480971.6
	mp 12	0.0159369	74085210.5	1180687.70219	0.00025	5488618414829310.0	4648662304.7
180%	mp13	0.0195643	91071517.0	1781751.75504	0.00038	8294021208681290.0	4654981360.5
	mp 14	0.0199211	91535295.5	1823484.69054	0.00040	8378710322272320.0	4594889315.9
	mp 15	0.0199211	92482977.0	1842363.55794	0.00040	8553101034782530.0	4642461037.6
Suma	15	0.21866	1012864443.5	15553816.250	0.00336	72039724285505400	6949522112.3
<b>Promedio f</b>							4633014741.6
<b>Desv. estándar de f</b>							20402606.5
<b>Desv. estándar / Promedio f</b>							<b>0.0044</b>

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado:** 0.440 %

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Hallar "b"

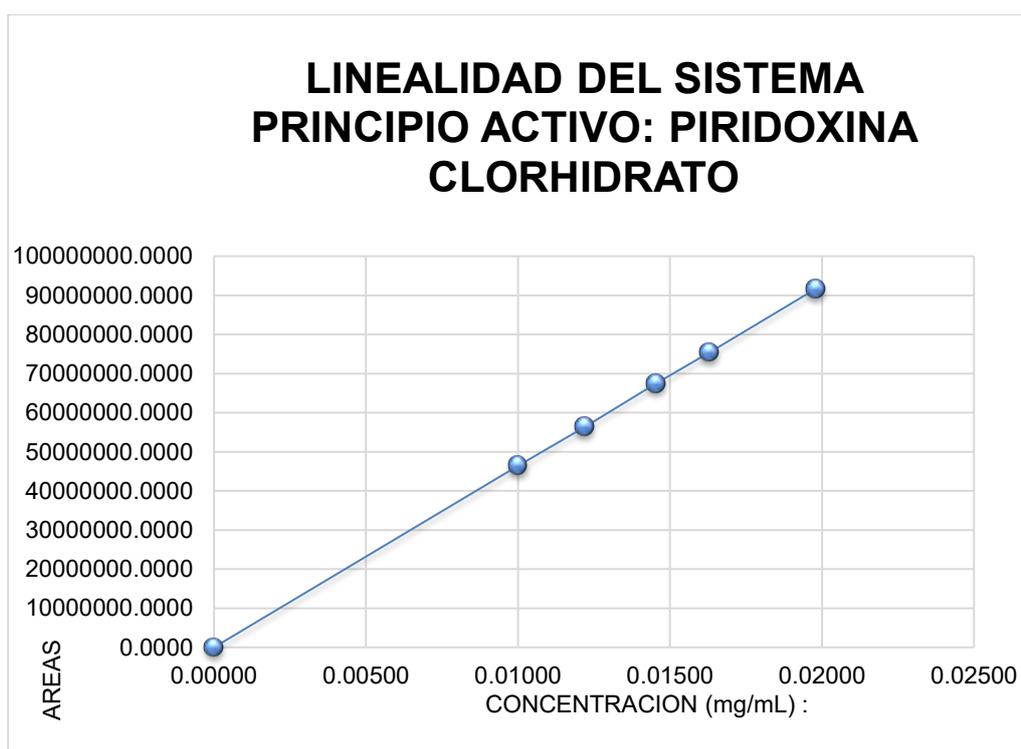
$$b = 4619087588.67062$$

Hallar "a"

$$a = 191400.08745$$

Ecuación de la recta:

$$Y = 4619087588.67x - 191400.087$$



**Grafica N.º 6.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del sistema de piridoxina clorhidrato.

#### **Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación "r", refleja el grado de relación entre las variables X "concentraciones", e Y "área".

**Criterio de aceptación:**

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99942$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 1.09411240390E+11$$

$$s_{yx} = \sqrt{1.09411240390E + 11} = 3.30773699665E+05$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 640377276792738.0$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_{yx} = \sqrt{640377276792738.00} = 25305676.770$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$s_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 0.548$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

**b +/-  $t s_b$**

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 4619087588.671 +/- 2.160 (25305676.77)

4619087588.671 +/- 54660261.823

(4554427326.847 a 4673747850.494)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de**

**t:**

Hallando el t experimental:

$$t \text{ exp exp} = \frac{|b|}{s_b} = \frac{4619087588.67062}{25305676.770} = 182.529$$

T tabla = 2.160 para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que  $t_{exp} > t_{tablas}$

$$182.529 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de  $t_{exp} = 182.529$ , es mayor a  $t_{tablas} = 2.160$ , el cual nos indica que el valor de  $b$  es diferente de 0, lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

### c. Análisis del intercepto o término independiente “a”

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 143369008952.995$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = 378641.003$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = 197.8270$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

donde:

$t$  = valor de la distribución de student para  $n-2$  grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95%.

$t$  = valor de  $t$  para  $15-2 = 13$  grados de libertad y  $P=0.05$  (Intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces:  $191400.087 \pm 2.160$  (8731460.151)

$191400.087 \pm 817864.565$

(-626464.477 a 1009264.652)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de  $t$ :**

$$t_{exp} = \frac{b}{s_b} = 0.505$$

t tabla = 2.650 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

$$0.505 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp= 0.505 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 19 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración, cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observan las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Piridoxina clorhidrato se observa en la Grafica N.º 6, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a: b = 2187961126.49216 valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor b mayor sensibilidad y a = -227075.51223 intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Piridoxina clorhidrato a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación (r) = 0.99942, teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). Además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de T, Texp = 182.529 es mayor que t tablas = 2.160 con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** La linealidad de sistema según el autor **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada

analito; el Coeficiente de correlación (r) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado  $0,999$  y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de  $0,998$  además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de  $0,60\%$ . al igual que la tesis mencionada nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis. El cual indica que existe una correlación lineal significativa entre la concentración del analito y el área, al igual que la tesis mencionada, nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

- ✓ **D-Pantenol:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de  $80\%$  a  $160\%$ , se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo de  $80\%$ ,  $100\%$ ,  $120\%$ ,  $140\%$  y  $180\%$ ; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º20. Resultados de linealidad de sistema de D- Pantenol.**

concentración teórica	muestra	X Concentración n mg/mL	y AREAS	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp1	0.04856	36741426.0	1784306.93812	0.00236	1349932384513480.0	756558390.1
	mp2	0.04856	36560188.0	1775505.31401	0.00236	1336647346595340.0	752826441.0
	mp3	0.04856	36901351.0	1792073.51983	0.00236	1361709705625200.0	759851474.0
100%	mp4	0.06105	46094900.5	2814174.80255	0.00373	2124739852104900.0	755013459.1
	mp5	0.06125	46851213.0	2869635.85923	0.00375	2195036159571370.0	764918013.0
	mp6	0.06125	45947916.5	2814308.96667	0.00375	2111211030690970.0	750170310.3
120%	mp7	0.07394	57128950.5	4223889.51191	0.00547	3263716985231450.0	772680482.3
	mp8	0.07374	56479589.0	4164682.89695	0.00544	3189943973608920.0	765951226.7
	mp9	0.07314	55559980.0	4063833.61794	0.00535	3086911377600400.0	759605748.6
140%	mp10	0.08464	65024339.5	5503656.19382	0.00716	4228164727411260.0	768246521.7
	mp11	0.08504	65616208.0	5579764.79765	0.00723	4305486752299260.0	771625132.7
	mp12	0.08484	64753584.0	5493574.91997	0.00720	4193026640845060.0	763260117.9
180%	mp13	0.09693	73530959.5	7127325.02133	0.00940	5406802004990640.0	758601858.2
	mp14	0.09614	72723023.0	6991351.44524	0.00924	5288638074258530.0	756454330.1
	mp15	0.09693	73041495.0	7079881.43292	0.00940	5335059991835020.0	753552166.4
suma	15	1.09457	832955123.5	64077965.238	0.08419	48777027007181800	11409315672
<b>Promedio f</b>							760621044.8
<b>Desv. estándar de f</b>							6915107.6
<b>Desv. estándar/Promedio f</b>							0.0091

Fuente: Elaboración propia

**Formula:**

Coefficiente de Variación de Respuesta :  $\frac{\text{Des. estándar } f \times 100}{\text{Promedio } f} =$   
Especificación: Máximo 2.0%

**Resultado:** 0.909 %

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

**Hallar “b”**

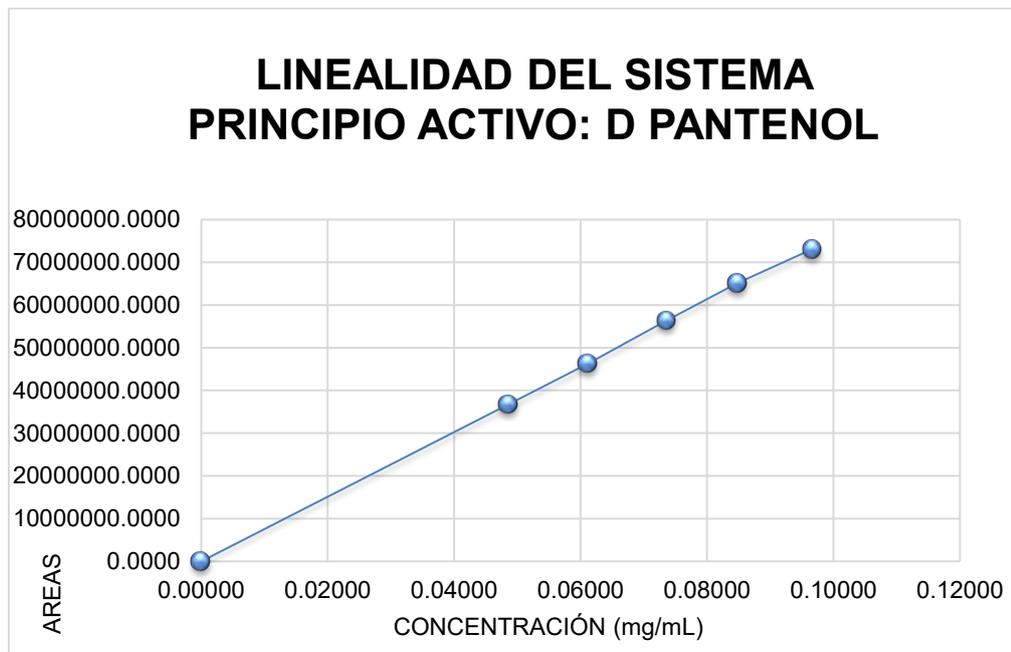
b=764263217.81546

**Hallar “a”**

A= -239007.25367

**Ecuación de la recta:**

$$Y = 764263217.815 x - 239007.254$$



**Grafica N.º 7.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del sistema de D-Pantenol.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación “r”:**

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación entre las variables X “concentraciones”, e Y “área”.

**Criterio de aceptación:**

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Fórmula para hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99931$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 2.82878440326E+11$$

$$s_{yx} = \sqrt{2.82878440326E + 11} = 5.31863178201E+05$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 65591269282147.3$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_{yx} = \sqrt{65591269282147.30} = 8098843.7$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$s_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 1.060$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

**b±/ -  $t s_b$**

donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 764263217.815 +/- 2.160 (8098843.7)

764263217.815 +/- 17493502.393

(746769715.423 a 781756720.208)

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{b}{s_b} = \frac{764263217.81546}{8098843.700} = 94.364$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 =13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

$$94.364 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de t exp = 94.364, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

c. **Análisis del intercepto o termino independiente "a"**

- **Determinación de la varianza del término independiente:  $s_a^2$**

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 368120505332.510$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:  $s_a$**

$$s_a = \sqrt{368120505332.51}$$

$$s_a = 606729.351$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = -253.8539$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: -239007.254 +/- 2.160 (606729.351)

-239007.254 +/- 1310535.397  
(-1549542.651 a 1071528.143)

- **Determinación de la prueba estadística para el intercepto o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a} = 0.394$$

t tabla = 2.650 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

**0.394 < 2.650**

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp = 0.394 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 20 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observa las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para D-Pantenol se observa en la Grafica N° 7, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a: b = 764263217.81546 valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor b mayor sensibilidad y a = -239007.25367 intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo D-Pantenol a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación (r) = 0.99931 teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” concentraciones e independiente “y” área). Además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de T, T exp = 94.364 es mayor que t tablas = 2.160 con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%;

evidenciando así que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** La linealidad de sistema según el autor **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación (r) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado  $0,999$  y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de  $0,998$  además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de  $0,60\%$ . al igual que la tesis mencionada nosotros usamos el mismo criterio estadístico, el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

#### ✓ LINEALIDAD DE MÉTODO

✓ **Nicotinamida:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de  $80\%$  a  $160\%$ , se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º21. Resultados de linealidad de método de nicotinamida**

concentración teórica	muestra	X Concentración mg/mL	y ÁREA	Xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp1	0.0966193	37158272.50000	3590206.12953	0.00934	1380737215184260.0	384584384.67612
	mp2	0.0961428	36947257.50000	3552211.01490	0.00924	1365099836771310.0	384295817.74402
	mp3	0.0967980	37218355.00000	3602662.32729	0.00937	1385205948906020.0	384495082.54303
100%	mp4	0.1191360	45794330.50000	5455753.35845	0.01419	2097120705943230.0	384387007.28579
	mp5	0.1217570	46809240.50000	5699352.32108	0.01482	2191104996186840.0	384448069.31498
	mp6	0.1171703	45049347.50000	5278443.57921	0.01373	2029443710175760.0	384477674.09504
120%	mp7	0.1420101	54603477.50000	7754245.95536	0.02017	2981539755093010.0	384504150.66217
	mp8	0.1444524	55555244.00000	8025088.32839	0.02087	3086385135899540.0	384592045.54580
	mp9	0.1453459	55872442.50000	8120831.55781	0.02113	3121729830915810.0	384410119.66487
140%	mp10	0.1667904	64311894.00000	10726606.52502	0.02782	4136019709867240.0	385585105.61759
	mp11	0.1678031	64522368.50000	10827050.61466	0.02816	4163136036849790.0	384512475.74418
	mp12	0.1716154	65971460.50000	11321719.11006	0.02945	4352233600503060.0	384414553.84938
160%	mp13	0.2051522	78857480.50000	16177784.98017	0.04209	6218502230807880.0	384385268.96169
	mp14	0.2127769	81796614.50000	17404429.73662	0.04527	6690686143661610.0	384424324.43417
	mp15	0.2125982	81723630.50000	17374296.08798	0.04520	6678751782100530.0	384404165.11162
Suma	15	221617	852191416.00000	134910681.62653	0.35084	51877696638865900.0	5767920245.3
<b>Promedio f</b>							384528016.35003
<b>Desv. estándar de f</b>							302675.86501
<b>Desv. estándar / Promedio f</b>							0.00079

Fuente: Elaboración propia

**Formula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado: 0.079 %**

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

Donde:

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Hallar “b”

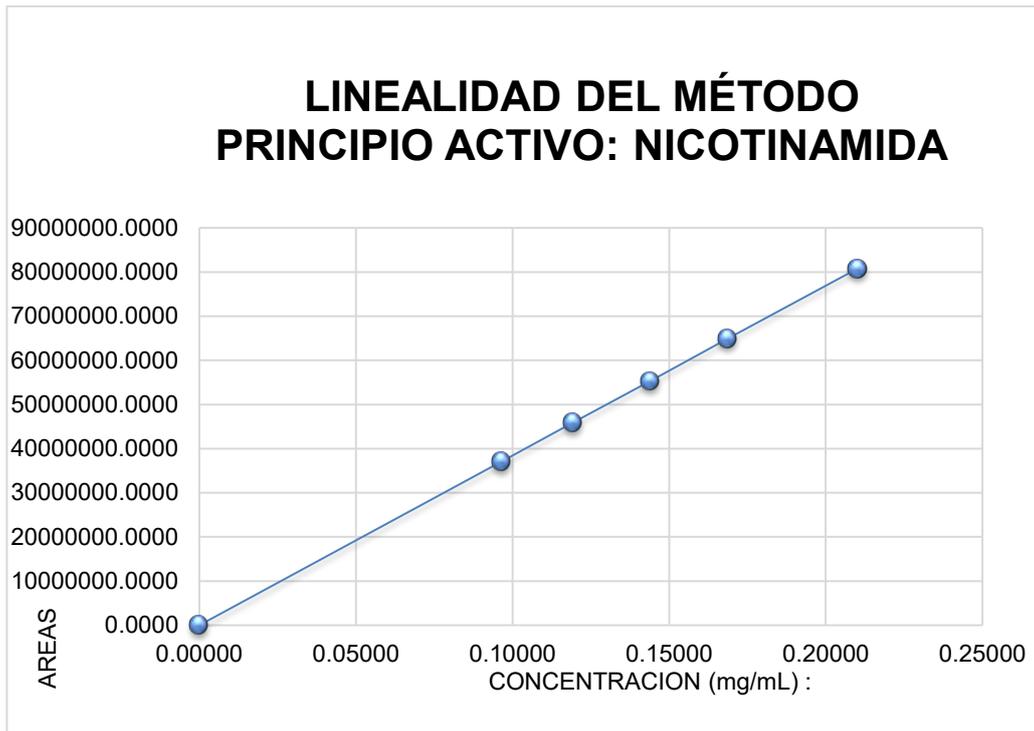
$$b = 384527897.1$$

Hallar “a”

$$a = 869.64008$$

Ecuación de la recta:

$$Y = 384527897.082 x + 869.64$$



**Grafica N.º7.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad de método de nicotinamida.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación “r”:**

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación entre las variables X “concentraciones”, e Y “área”.

**Criterio de aceptación:**

Coefficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99930$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 2.6799493E+09$$

$$s_{yx} = \sqrt{2.6799493E + 09} = 5.17682271490E+04$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 114449994499.1$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_b = \sqrt{114449994499.146} = 338304.588$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$S_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 10069219572.786$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

$$b \pm t s_b$$

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 84527897.082 +/- 2.160 (338304.588)

$$384527897.082 \pm 730737.911$$

$$(383797159.171 \text{ a } 384866201.67)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{b}{s_b} = \frac{384527897.082}{338304.588} = 1136.632$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 =13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

$$1136.632 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de t exp = 1136.632, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**c. Análisis del intercepto o termino independiente “a”**

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2=2676928654.8$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = \sqrt{2676928654.8}$$

$$s_a = 51739.0438144221$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = \mathbf{5949.48}$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 869.64 +/- 2.160 (51739.044)

$$896.64 \pm 111756.335$$

$$(-110886.695 \text{ a } 112625.975)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la el intercepto o Test de t:**

$$t \text{ exp} = \frac{|a|}{s_a} = 0.017$$

$$t_{\text{exp}} = 0.017$$

$t_{\text{tabla}} = 2.650$  para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de  $P = 0.02$ .

Entonces deba cumplirse que  $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$

$$0.017 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el  $t_{\text{exp}} = 0.017$  menor que el  $t_{\text{tabla}} = 2.650$  indica que nuestra linealidad es correcta.

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:** En la tabla N° 21. Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones, Además en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observa las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Nicotinamida se observa en la Grafica N° 7, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a:  $b = 384527897.1$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor  $b$  mayor sensibilidad y  $a = 869.64008$  intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Nicotinamida a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación  $(r) = 0.99930$  teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. Se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). además, se muestra una prueba estadística de la pendiente o test de T,  $T_{\text{exp}} = 1136.632$  es mayor que  $t_{\text{tablas}} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** Según resultados obtenidos esta investigación cumple con el parámetro de linealidad asimismo coincide con la investigación de **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, que determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test

estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación (r) debe ser > 0,999 obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) debe ser > 0,998 obteniéndose un resultado de 0,999 además el DSR debe ser < 5% obteniéndose un resultado de 0,79%.

**Tiamina clorhidrato:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 40% a 280%, se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º22. Resultados de linealidad de método de tiamina clorhidrato.**

Concentración teórica	muestra	X Concentración mg/mL	y ÁREA	xy	x <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
40%	mp 1	0.0112116	23905172.50000	268015.23200	000013	571457272254756 0	2132182070.35570
	mp 2	0.0113237	24129841.50000	273239 47227	000013	582249250815122.0	2130911928.55773
	mp 3	0.0117161	24487435.00000	286897.77593	000014	599634472879225.0	2090063162.53791
100%	mp4	0.0280290	59377118.50000	1664281.25444	000079	3525642201363040.0	2118417299.93935
	mp 5	0.0285335	60690890.00000	1731724.84501	000081	3683384128992100.0	2127003108 83458
	mp 6	0.0280290	58815419.00000	1648537.37915	000079	3459253512145560.0	2098377359.16372
160%	mp 7	0.0509567	107041899.50000	5454504.31517	000260	11457968248568100.0	2100643355.74804
	mp 8	0.0504522	106335848.50000	5364877.49569	000255	1 1307312676215000.0	2107655335.14891
	mp 9	0.0505083	108692035.50000	5489845.37158	000255	11813958581133300.0	2151965635.00567
220%	mp 10	0.0615517	128445958.00000	7906065.01789	000379	16498364126537800.0	2086798437.55371
	mp 11	0.0616638	129535998.00000	7987681.87347	000380	16779574777856000.0	2100681404.64908
	mp 12	0.0617759	130493057.00000	8061328.12782	000382	17028437925205200.0	2112361344.83218
280%	mp 13	0.0797145	173846735.50000	13858101.42469	000635	30222687444007000.0	2180867820.04312
	mp 14	0.0799387	176193021.00000	14084642.45736	000639	31043980649106400.0	2204101434.81428
	mp 15	0.0801069	176989627.00000	14178087.16531	000642	31325328065599100.0	2209418499.14967
	15	0.69551	1488980056.50000	88257829.20779	0.04104	189899233332678000.0	319514481963
<b>Promedio f</b>							2130096546.42225
<b>Desv. Estándar f</b>							39650305.89508
<b>Desv. Estándar/Promedio f</b>							0.01861

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado: 1.861 %**

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Hallar "b"

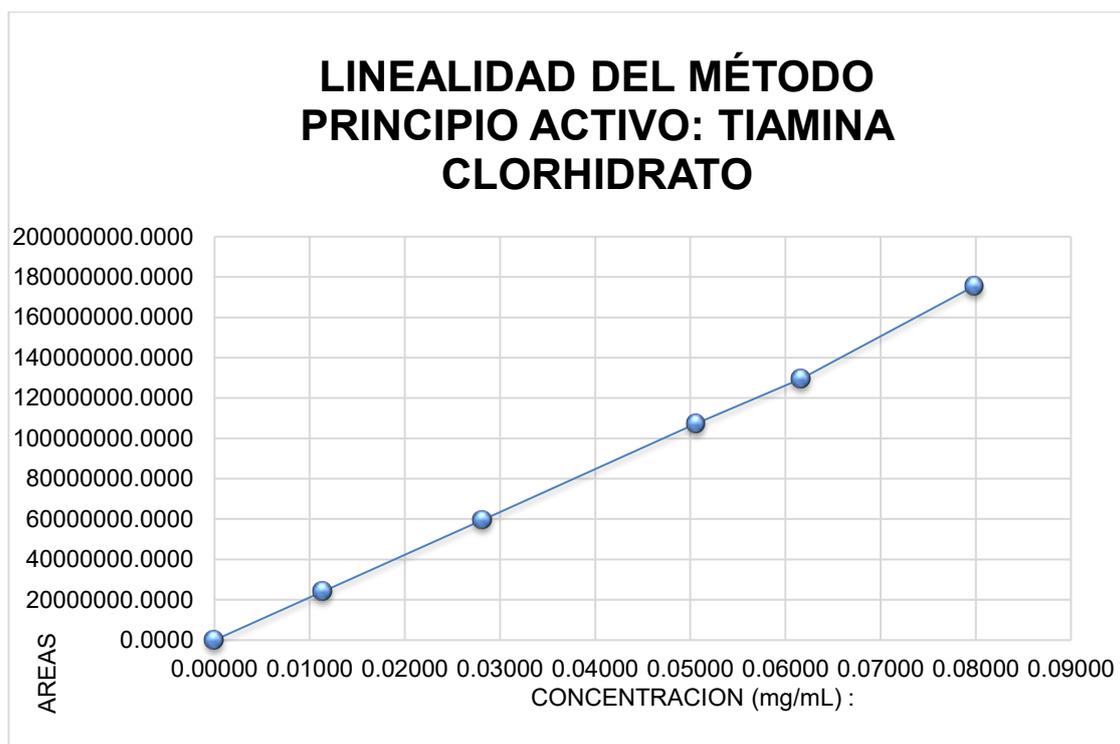
$$b = 2186402662$$

Hallar "a" (intercepto)

$$a = -2112558.02169$$

Ecuación de la recta:

$$Y=2186402662.024 x + 2112558.022$$



**Grafica N.º8.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del método de tiamina clorhidrato.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación entre las variables X “concentraciones”, e Y “área”.

Criterio de aceptación:

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99918$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 5.9721054E+12$$

$$s_{yx} = \sqrt{5.97210544784E + 12} = 2.44378915781E+06$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 679450261485949.0$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_b = \sqrt{679450261485949.0} = 26066266.735$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$s_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 810039799918645.0$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

$$b \pm t s_b$$

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95%) =2.160

Entonces: 2186402662.024 +/- 2.160 (26066266.735)

$$2186402662.024 \pm 56303136.147$$

$$(2130099525.877 \text{ a } 2212468928.758)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{exp} = \frac{b}{s_b} = \frac{2186402662.024}{26066266.735} = 83.879$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

$$83.879 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de t exp = 83.879, es mayor a t tablas = 2.160, el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

### c. Análisis del intercepto o término independiente "a"

- **Determinación de la varianza del término independiente:  $s_a^2$**

Fórmula para hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = \frac{(s_b^2) (\sum x^2)}{n}$$

$$s_a^2 = 1858917338515.2$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:  $s_a$**

$$s_a = \sqrt{1858917338515.2}$$

$$s_a = 1363421.1889637200$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$S_a = -64.54$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: -2112558.022 +/- 2.160 (1363421.189)

-2112558.022 +/- 2944989.768

(-5057547.79 a 832431.746)

- **Determinación de la prueba estadística para la intercepto o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} = 1.549$$

t tabla = 2.650 para n-2 =15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

$$1.549 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp =1.549 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 22 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , así mismo se observa las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Tiamina clorhidrato se observa en la Grafica N° 8, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a: b =2186402662 valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor b mayor sensibilidad y a =- 2112558.02169 intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Tiamina clorhidrato a una concentración de 40% a 280%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.99918 teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). además, se muestra una prueba estadística la pendiente o test de T,  $T_{exp} = 83.879$  es mayor que  $t_{tablas} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** Según resultados obtenidos esta investigación cumple con el parámetro de linealidad asimismo coincide con la investigación de **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, que determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación ( $r$ ) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de 0,999 además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de 0,79%.

- ✓ **Piridoxina clorhidrato:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 80% a 160%; se prepararon 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º23. Resultados de linealidad de método de piridoxina clorhidrato.**

Concentración teórica	Muestra	X Concentración mg/mL	y ÁREA	Xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp1	0.0099308	43270418.00000	429710.81902	0.00010	1872329073894720.0	4357183926.96999
	mp2	0.0098714	43289245.00000	427323.54837	0.00010	1873958732670020.0	4385339258.35518
	mp3	0.0100498	44127331.50000	443468.82625	0.00010	1947221385310890.0	4390886732.15285
100%	mp4	0.0122500	53892031.00000	660177.16418	0.00015	2904351005304960.0	4399350905.91050
	mp5	0.0123095	54307512.00000	668496.25528	0.00015	2949305859630140.0	4411850980.97707
	mp6	0.0120716	52692445.50000	636082.01971	0.00015	2776493812770470.0	4364993391.92707
120%	mp7	0.0148070	64286432.00000	951891.38436	0.00022	4132745339290620.0	4341614397.58969
	mp8	0.0146286	64269288.00000	940172.02013	0.00021	4130541380026940.0	4393388966.68151
	mp9	0.0148070	64978250.00000	962135.15701	0.00022	4222172973062500.0	4388336651.35097
140%	mp10	0.0167694	73279558.00000	1228855.09928	0.00028	5369893620675360.0	4369834672.79592
	mp11	0.0169478	73882843.00000	1252152.38542	0.00029	5458674489762650.0	4359433047.69171
	mp12	0.0168883	74075790.00000	12510174.2359	0.00029	5487222664124100.0	4386208026.08000
160%	mp13	0.0200995	89250875.00000	1793898.67607	0.00040	7965718688265620.0	4440450731.43084
	mp14	0.0203374	90495212.00000	1840434.79066	0.00041	8189383394924940.0	4449700384.10076
	mp15	0.0203968	90980489.50000	1855714.30549	0.00042	8277449469659610.0	4460519297.15773
<b>Suma</b>	15	0.22216	977077720.50000	15341529.87484	0.00348	67557461889373600.0	65899091371.2
<b>Promedio f</b>							4393272758.07812
<b>Desv. estándar de f</b>							34766706.54226
<b>Desv. estandar/Promedio f</b>							0.00791

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado: 0.791 %**

**cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Hallar “b”

$$b = 4492416450$$

Hallar “a” (intercepto)

$$a = -1398658.14709$$

Ecuación de la recta:

$$Y=4492416449.602 x -1398658.147$$



**Grafica N.º9.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del método de piridoxina clorhidrato.

#### **Interpretación estadística de la regresión lineal:**

##### **a. Coeficiente de correlación “r”:**

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación entre las variables X “concentraciones”, e Y “área”.

Criterio de aceptación:

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99939$$

##### **b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 2.7064859E+11$$

$$s_{yx} = \sqrt{2.70648592517E + 11} = 5.20238976353E+0.5$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:**  $S_b^2$

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 1397493821628860.0$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:**  $s_b$

$$s_b = \sqrt{1397493821628860.0} = 37383068.649$$

La desviación estándar relativa de la pendiente "b":

$$S_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 1162906601754980$$

- **Determinación de los límites de confianza para "b":**

**b +/- t<sub>s<sub>b</sub></sub>**

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 4492416449.602 +/- 2.160 (37383068.649)

$$4492416449.602 +/- 80747428.282$$

$$(4411669021.32 \text{ a } 4529799518.251)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{s_b} = \frac{4492416449.602}{37383068.649} = 120.172$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 =13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que t exp > t tablas

$$120.172 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de  $t_{exp} = 120.172$ , es mayor a  $t_{tablas} = 2.160$ , el cual nos indica que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta

**c. Análisis del intercepto o término independiente “a”**

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 324605413041.3$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = \sqrt{324605413041.3}$$

$$s_a = 569741.5317855030$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = -40.73$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

Donde:

$t$  = valor de la distribución de student para  $n-2$  grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

$t$  = valor de  $t$  para  $15 - 2 = 13$  grados de libertad y  $P = 0,05$  intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces:  $-1398658.147 \pm 2.160 (569741.531)$

$$-1398658.147 \pm 1230641.709$$

$$(-2629299.856 \text{ a } -168016.438)$$

- **Determinación de la prueba estadística para el intercepto o Test de t:**

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} = 2.455$$

$t_{tabla} = 2.650$  para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de  $P = 0.02$ .

Entonces deba cumplirse que  $t_{experimental} < t_{tabla}$

$$2.455 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el  $t_{exp} = 0.331$  menor que el  $t_{tabla} = 2.650$  indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 23 se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración, cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones, Además en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observan las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Piridoxina clorhidrato se observa en la Grafica N° 9, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a:  $b = 4492416450$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor  $b$  mayor sensibilidad y  $a = -1398658.14709$  intercepto con el eje Y de la coordenada y que es indicativo del error de método.

Para el activo Piridoxina clorhidrato a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación  $(r) = 0.99939$  teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que hay relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). Además, se muestra una prueba estadística de la pendiente o test de T,  $T_{exp} = 120.172$  es mayor que  $t_{tablas} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** Según resultados obtenidos esta investigación cumple con el parámetro de linealidad asimismo coincide con la investigación de **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, que determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación  $(r)$  debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación  $(r^2)$  debe ser  $> 0,998$

obteniéndose un resultado de 0,999 además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de 0,79%.

✓ **Riboflavina:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 80% a 160%, se preparó 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º 24. Resultados de linealidad de método de riboflavina**

Concentración teórica	Muestra	X Concentración mg/mL	y ÁREA	Xy	x <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp 1	0.0133604	83025227.50000	1109251.07974	0.00018	6893188401426760.0	6214272428.76529
	mp 2	0.0133180	82764190.00000	1102253.15136	0.00018	6849911146356100.0	6214462746.49730
	mp 3	0.0134877	83315820.50000	1123734.79300	0.00018	6941525945588220.0	6177192331.17818
100%	mp4	0.0164990	102053215.00000	1683780.68873	0.00027	10414858691836200.0	6185400961.97077
	mp 5	0.0164990	102824976.00000	1696514.00897	0.00027	10572975689400600.0	6232177060.41913
	mp 6	0.0162021	101067796.50000	1637515.39693	0.00026	10214699489365400.0	6237925767.62044
120%	mp 7	0.0195529	121148139.00000	2368791.87424	0.00038	14676871583163300.0	6195931243.59237
	mp 8	0.0195104	121788733.00000	2376151.76787	0.00038	14832495485745300.0	6242234055.20327
	mp 9	0.0195953	123606203.50000	2422096.68405	0.00038	15278493543683400.0	6307961876.30605
140%	mp 10	0.0226491	139771425.00000	3165693.62745	0.00051	19536051246530600.0	6171175592.32880
	mp 11	0.0220553	141266873.00000	3115680.43874	0.00049	19956329407198100.0	6405127162.29402
	mp 12	0.0221825	142369781.00000	3158120.79917	0.00049	20269154541988000.0	6418106155.82845
160%	mp 13	0.0267208	168706980.50000	4507988.85868	0.00071	28462045269427400.0	6313690242.29047
	mp 14	0.0269753	170635794.00000	4602952.41643	0.00073	29116574194010400.0	6325630065.18851
	mp 15	0.0269753	171306297.00000	4621039.43869	0.00073	29345847391852200.0	6350486244.75187
Suma	15	0.29558	1855651451.50000	38691565.02406	0.00615	243361022027572000.0	93991773934.2
<b>Promedio f</b>							6266118262.28233
<b>Desv. estándar de f</b>							81650115.27790
<b>Desv. estándar / Promedio f</b>							0.01303

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado: 1.303 %**

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

Hallar "b"

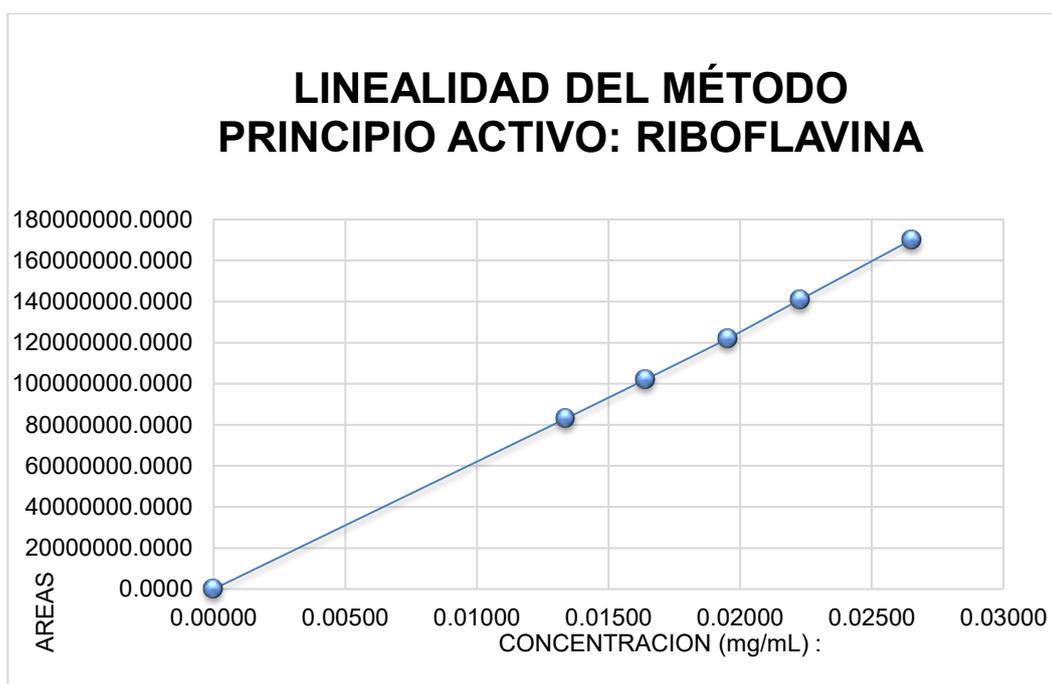
$$b = 6481088180.03648$$

Hallar "a" (intercepto)

$$a = -4003274.12526$$

Ecuación de la recta:

$$Y=6481088180.036 x - 4003274.125$$



**Grafica N.º10.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del método de riboflavina.

**Interpretación estadística de la regresión lineal:**

**a. Coeficiente de correlación "r":**

El coeficiente de correlación "r", refleja el grado de relación entre las variables X "concentraciones", e Y "área".

Criterio de aceptación:

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99920$$

**b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”**

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:  $s_{yx}^2$**

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 2.5811424E+12$$

$$s_{yx} = \sqrt{2.01990187050E + 12} = 1.42123251810E+06$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:  $S_b^2$**

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 6160712269104930$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:  $s_b$**

$$s_b = \sqrt{6160712269104930} = 78490204.925$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$S_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 7461024368916880.0$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

**b +/-  $t_{s_b}$**

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 6481088180.036 +/- 2.160 (78490204.925)

$$6481088180.036 +/- 169538842.637$$

$$(6481088180.036 \text{ a } 6559578384.961)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t \text{ exp exp} = \frac{/b/}{s_b} = \frac{6481088180.036}{78490204.925} = 82.572$$

T tabla = 2.160 para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que  $t_{exp} > t_{tablas}$

$$82.572 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de  $t_{exp} = 82.572$ , es mayor a  $t_{tablas} = 2.160$ , el cual nos indica que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**c. Análisis del intercepto o termino independiente "a"**

- **Determinación de la varianza del término independiente:**  $s_a^2$

Fórmula para hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 2526916942251.7$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:**  $s_a$

$$s_a = \sqrt{2526916942251.7}$$

$$s_a = 1589627.92572719$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = -39.71$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

Donde:

$t$  = valor de la distribución de student para  $n-2$  grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

$t$  = valor de  $t$  para  $15 - 2 = 13$  grados de libertad y  $P = 0,05$  intervalo de confianza del 95 %) = 2.160

Entonces:  $-4003274.125 \pm 2.160 (1589627.926)$

$$-10531942.843 \pm 3433596.32$$

$$(-7436870.445 \text{ a } -569677.806)$$

- **Determinación de la prueba estadística para el intercepto o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{/a/}{s_a} = 2.518$$

$t_{\text{tabla}} = 2.650$  para  $n-2 = 15-2 = 13$  grados de libertad y una probabilidad de  $P = 0.02$ .

Entonces deba cumplirse que  $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$

$$2.518 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el  $t_{\text{exp}} = 2.518$  menor que el  $t_{\text{tabla}} = 2.650$  indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 24 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración, cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observan las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para Riboflavina se observa en la Grafica N°10, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta, teniendo a:  $b = 6481088180.03648$  valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo: a mayor valor b mayor sensibilidad y  $a = -4003274.12526$  intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo Riboflavina a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado el coeficiente de correlación  $(r) = 0.99920$  teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que existe relación lineal entre las variables (dependiente “x” e independiente “y”). Además, se muestra una prueba estadística de la pendiente o test de T,  $T_{\text{exp}} = 82.572$  es mayor que  $T_{\text{tablas}} = 2.160$ , con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** Según resultados obtenidos esta investigación cumple con el parámetro de linealidad asimismo coincide con la investigación **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, que determino la linealidad del sistema

para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación (r) debe ser > 0,999 obteniéndose un resultado 0,999 y el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) debe ser > 0,998 obteniéndose un resultado de 0,999 además el DSR debe ser < 5% obteniéndose un resultado de 0,79%.

- ✓ **D-Pantenol:** Para este activo se evaluó en los intervalos de concentración de 80% a 160%, se prepararon 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado, teniendo 15 determinaciones. Se calculó la recta de regresión lineal que corresponde a los resultados de los 15 puntos experimentales.

**Tabla N.º25. Resultados de linealidad de método de D-pantenol.**

Concentración teórica	Muestra	X Concentración mg/mL	y ÁREA	xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	f(y/x)
80%	mp 1	0.04936	37259563.00000	1839012.05389	0.00244	1388275034950970.0	754902629.38547
	mp2	0.04856	36719008.50000	1783218.25689	0.00236	1348285585223070.0	756096781.76588
	mp3	0.04837	36578589.00000	1769148.33043	0.00234	1337993173230920.0	756292251.03420
100%	mp4	0.05947	44840337.50000	2666475.50978	0.00354	2010655867113910.0	754050003.36327
	mp5	0.05947	43951270.00000	2613606.22182	0.00354	1931714134612900.0	739099149.09360
	mp6	0.05610	42222840.00000	2368543.41058	0.00315	1782768217665600.0	752685473.14919
120%	mp7	0.07354	55485934.50000	4080414.53847	0.00541	3078688927338290.0	754503959.90624
	mp8	0.07433	56161860.00000	4174651.45845	0.00553	3154154518659600.0	755549187.77116
	mp9	0.07394	55752569.50000	4122125.32371	0.00547	3108349005852330.0	754064653.97264
140%	mp 10	0.08345	62926211.50000	5251231.36393	0.00696	3959708093742730.0	754053253.28919
	mp 11	0.08583	64764385.50000	5558679.28182	0.00737	4194425629192610.0	754572339.31645
	mp 12	0.08504	64127654.00000	5453183.55405	0.00723	4112356007543720.0	754120224.77909
160%	mp 13	0.09534	71910702.00000	6856241.02756	0.00909	5171149062132800.0	754225098.17626
	mp 14	0.09614	72580288.50000	697762942144	0.00924	5267898278743230.0	754969626.58381
	mp 15	0.09515	71758265.00000	6827483.17838	0.00905	5149248595810220.0	754194255.96139
<b>Suma</b>	15	1.08407	817039478.50000	62341642.93119	0.08270	46995670131812900.0	11303378887.5
<b>Promedio f</b>							753558592.50319
<b>Desv. estándar de f</b>							4100004.00331
<b>Desv. estándar / Promedio f</b>							0.00544

Fuente: Elaboración propia

**Fórmula:**

$$\text{Coeficiente de Variación de Respuesta : } \frac{\text{Des. estándar f} \times 100}{\text{Promedio f}} = \text{Especificación: Máximo 2.0\%}$$

**Resultado: 0.544 %**

**Cálculos para la recta de regresión:**

**Ecuación de la recta:**

$$y = b x + a$$

**Donde:**

x: Concentración de analito

y: Valor de la respuesta en área de pico cromatográfico

b: Valor de la pendiente de la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje “y”

Hallar “b”

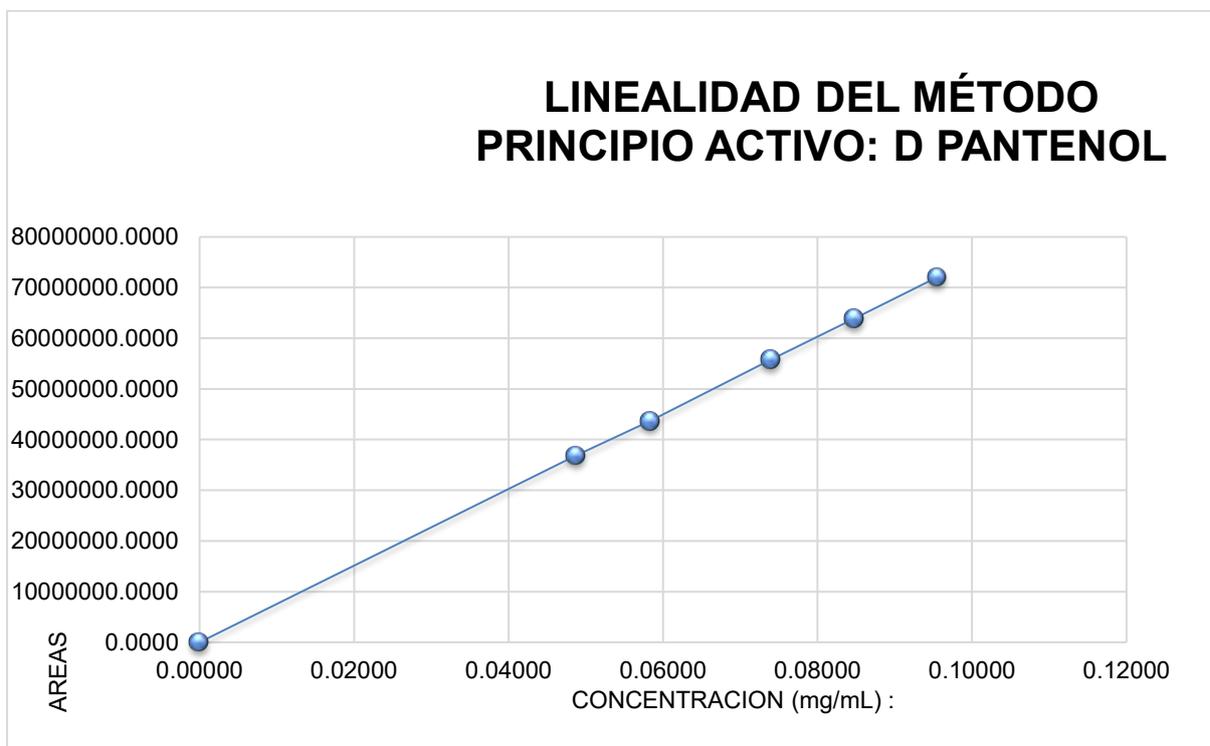
$$b = 756457031.6$$

Hallar “a” (intercepto)

$$a = -200616.64389$$

Ecuación de la recta:

$$Y=756457031.6 x -200616.64389$$



**Grafica N.º11.:** Representación de la curva de calibración de la linealidad del método de D-Pantenol.

## Interpretación estadística de la regresión lineal:

### a. Coeficiente de correlación “r”:

El coeficiente de correlación “r”, refleja el grado de relación entre las variables X “concentraciones”, e Y “área”.

Criterio de aceptación:

Coeficiente de correlación: Mayor o igual que 0,999

Hallar coeficiente de correlación:

$$r = 0.99950$$

### b. Prueba de linealidad de la pendiente “b”

- **Determinación de la varianza de regresión de y sobre x:**  $s_{yx}^2$

Hallar:  $s_{yx}^2$

$$s_{yx}^2 = 6.2130080E+10$$

$$s_{yx} = \sqrt{6.21300800449E + 10} = 2.49259062112E+05$$

- **Determinación de la varianza de la pendiente b:**  $S_b^2$

Hallar:  $s_b^2$

$$s_b^2 = 14270699452439.7$$

- **Determinación de la desviación estándar de la pendiente b:**  $s_b$

$$s_b = \sqrt{14270699452439.7} = 3777657.932$$

La desviación estándar relativa de la pendiente “b”:

$$S_b \text{ relat.(\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 712662038225.840$$

- **Determinación de los límites de confianza para “b”:**

$$b \pm t s_b$$

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: 756457031.633 +/- 2.160 (37777657.932)

$$756457031.633 \pm 8159741.133$$

$$(748297290.5 \text{ a } 760234689.566)$$

- **Determinación de la prueba estadística para la pendiente o Test de t:**

Hallando el t experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{b}{s_b} = \frac{7564570631.633}{3777657.932} = 200.245$$

T tabla = 2.160 para n-2 = 15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de 95,0 %

Entonces debe cumplirse que  $t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$

$$200.245 > 2.160$$

Como podemos observar el valor de  $t_{\text{exp}} = 200.245$ , es mayor a  $t_{\text{tablas}} = 2.160$ , el cual nos indica que el valor de b es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

- c. **Análisis del intercepto o término independiente "a"**

- **Determinación de la varianza del término independiente:  $s_a^2$**

Hallar  $s_a^2$

$$s_a^2 = 78679283880.2$$

- **Determinación de la desviación estándar del término independiente:  $s_a$**

$$s_a = \sqrt{78679283880.2}$$

$$s_a = 280498.2778560920$$

Desviación estándar relativa del intercepto a:

$$S_{a \text{ relativa}} (\%) = \frac{s_a \times 100}{a}$$

$$s_a = -139.82$$

- **Determinación de los límites de confianza del intercepto a:**

$$a \pm t s_a$$

Donde:

t= valor de la distribución de student para n-2 grados de libertad a la probabilidad elegida, generalmente 95 %.

t= valor de t para 15 -2 = 13 grados de libertad y P =0,05 intervalo de confianza del 95 %) =2.160

Entonces: -200616.644+/- 2.160 (280498.278)

-200616.644 +/- 605876.28

(-806492.924 a -405259.636)

- **Determinación de la prueba estadística para el intercepto o Test de t:**

$$t_{\text{exp}} = \frac{/a/}{s_a} = 0.715$$

t tabla = 2.650 para n-2 =15-2 = 13 grados de libertad y una probabilidad de P = 0.02.

Entonces deba cumplirse que t experimental < t tabla

$$0.715 < 2.650$$

Como podemos observar el valor obtenido para el t exp =0.715 menor que el t tabla = 2.650 indica que nuestra linealidad es correcta.

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 25 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas en los 5 niveles de concentración, cada una por triplicado, se observa numéricamente que las áreas son directamente proporcionales a las concentraciones. Además, en la tabla se observa la relación de “X” concentración y “Y” área, esta relación se expresa matemáticamente como la recta de regresión lineal  $y = b x + a$ , Así mismo se observan las varianzas obtenidas de cada nivel de concentración.

La representación gráfica de la recta de regresión lineal para D-Pantenol se observa en la Grafica N°11, aquí se evidencia el ajuste de la recta y la ecuación de la recta teniendo a: b =756457031.6 valor de la pendiente de la recta que evidencia la sensibilidad del sistema ante cambios en la concentración del activo a mayor valor b mayor sensibilidad y a =-200616.64389 intercepto con el eje Y de la coordenada y es indicativo del error de método.

Para el activo D-Pantenol a una concentración de 80% a 160%, posterior a una evaluación estadística, se tiene como resultado coeficiente de correlación (r) = 0.99950 teniendo la especificación de mayor o igual que 0.999. se demuestra que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” concentraciones e independiente “y” área). además, se muestra una prueba

estadística la pendiente o test de T,  $T_{exp} = 200.245$  es mayor que  $t_{tablas} = 2.160$  con  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%; evidenciando así que el valor de  $b$  es diferente de 0 lo cual indica que nuestra linealidad es correcta.

**Discusión:** Según resultados obtenidos esta investigación cumple con el parámetro de linealidad asimismo coincide con la investigación de **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, que determino la linealidad del sistema para los principios activos trabajados por medio de pruebas estadísticas test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; el Coeficiente de correlación ( $r$ ) debe ser  $> 0,999$  obteniéndose un resultado  $0,999$  y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser  $> 0,998$  obteniéndose un resultado de  $0,999$  además el DSR debe ser  $< 5\%$  obteniéndose un resultado de  $0,79\%$ .

✓ **PRECISIÓN:**

El parámetro determinó con base al cálculo de repetibilidad y precisión intermedia.

✓ **REPETIBILIDAD:**

**Repetibilidad del sistema (precisión instrumental)**

Se evaluó el nivel de variación de los resultados emitidos a partir de una misma muestra. Se obtuvieron resultados precisos demostrando que el método es exacto y que el equipo empleado cumple con los parámetros de estudio. Los resultados de las 6 inyecciones por cada activo se muestran en las tablas y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención.

Tabla N.º26. Resultados de precisión instrumental de piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato.

Nº Inyecciones	PIRIDOXINA CLORHIDRATO		TIAMINA CLORHIDRATO	
	Area	Tiempo de retención	Area	Tiempo de retención
1	57246083	14.92	62423083	22.78
2	58013400	14.8	63268759	22.72
3	58295524	14.95	63593856	22.77
4	58330556	14.87	63628340	22.78
5	58885668	14.9	63477529	22.68
6	58308347	14.85	63207313	22.72
<b>Promedio</b>	<b>58179929.7</b>	<b>14.88166667</b>	<b>63266480</b>	<b>22.74166667</b>
<b>DSR%(CV)</b>	<b>0.926</b>	<b>0.359</b>	<b>0.706</b>	<b>0.181</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 26 se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las 6 inyecciones de piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención, para Piridoxina Clorhidrato se obtuvo resultados de 0.926% y 0.359% respectivamente y Tiamina clorhidrato se obtuvo resultados de 0.706% y 0.181% respectivamente. Estos resultados cumplen criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí. Como podemos observar resultados, el coeficiente de variación (CV) de los promedios de área y el tiempo de retención cumplen los parámetros establecidos según norma  $CV \leq 2.0$  %, por lo tanto, la precisión del sistema (instrumental) es adecuada para todos los sistemas.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,05%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

Tabla N.º27. Resultados de precisión instrumental de nicotinamida y riboflavina.

Nº Inyecciones	NICOTINAMIDA		RIBOFLAVINA	
	Area	Tiempo de retención	Area	Tiempo de retención
1	49626029	6.35	77961272	12.28
2	50517188	6.35	79209313	12.15
3	49725925	6.43	78897037	12.32
4	51254317	6.38	79510689	12.22
5	49641501	6.43	78902734	12.27
6	50223076	6.32	78921096	12.2
<b>Promedio</b>	<b>50164672.7</b>	<b>6.376666667</b>	<b>78900356.8</b>	<b>12.24</b>
<b>DSR%(CV)</b>	<b>1.283</b>	<b>0.713</b>	<b>0.659</b>	<b>0.504</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 27 se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las 6 inyecciones de nicotinamida y riboflavina y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención, para nicotinamida se obtuvo resultados de 1.283% y 0.713% respectivamente y riboflavina se obtuvo resultados de 0.659% y 0.504% respectivamente estos resultados cumplen criterios de coeficiente de variación  $c \leq 2.0$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí. Como podemos observar resultados, el coeficiente de variación (CV) de los promedios de área y el tiempo de retención cumplen los parámetros establecidos según norma  $CV \leq 2.0$  %, por lo tanto, la precisión del sistema (instrumental) es adecuada para todos los sistemas.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,05%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

Tabla N.º28. Resultados de precisión instrumental de D-Pantenol.

N ° de inyecciones	D- pantenol	
	Área	Tiempo de retención
1	44759358	14.25
2	43743128	14.22
3	45227616	14.12
4	43691360	14.20
5	43445675	14.20
6	43323605	14.22
<b>Promedio</b>	<b>44031790.33</b>	<b>14.20</b>
<b>DSR % (CV)</b>	<b>1.760</b>	<b>0.310</b>

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º28 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las 6 inyecciones de D-Pantenol y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención, para D-Pantenol se obtuvo resultados de 1.760% y 0.310% respectivamente, estos resultados cumplen criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí. Como podemos observar resultados, el coeficiente de variación (CV) de los promedios de área y el tiempo de retención cumplen los parámetros establecidos según norma  $CV \leq 2.0 \%$ , por lo tanto, la precisión del sistema (instrumental) es adecuado para todos los sistemas.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,05%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

✓ **Repetibilidad del método:**

**Repetibilidad de método para las cuatro vitaminas (Nicotinamida, riboflavina, piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato).**

Se estudió el nivel de variación del método, se trabajó en una misma condición operativa de: área (laboratorio), analista, reactivos, equipos, instrumentos, en un periodo corto. Los resultados de las inyecciones por triplicado de dos

estándares mixtos (Nicotinamida, piridoxina clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato) y de 10 muestras de cada principio activo mixto a una concentración de: Nicotinamida (140%), Piridoxina clorhidrato (140%), Tiamina clorhidrato (190%), riboflavina (135%) se muestran en las tablas y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas.

**a. Repetibilidad de método de nicotinamida.**

**Tabla N.º29. Resultados de repetibilidad de método de nicotinamida.**

Muestra	Peso activo (mg)	Área	Promedio de área	mg/5mL	%
Estándar 1	200.1	49626029	49956380.7	---	--
		50517188			
		49725925			
Estándar 2	200.1	51254317	50372964.7	---	--
		49641501			
		50223076			
Muestra 1-140 %	275.9	69202537	69484801.7	20.18	100.88
		69850577			
		69401291			
Muestra 2 -140 %	275.8	70063424	69871144	20.3	101.48
		69505859			
		70044149			
Muestra 3 -140 %	275.9	69601351	69557691	20.2	100.98
		68654861			
		70416861			
Muestra 4 -140 %	275.9	69647993	70224738.7	20.39	101.95
		71288100			
		69738123			
Muestra 5 -140 %	277.3	70357191	70744017	20.44	102.19
		71343751			
		70531109			
Muestra 6 -140 %	275	69540376	68010111	19.81	99.06
		67147821			
		67342136			
Muestra 7 -140 %	275.6	68471950	68487613	19.91	99.54
		68604436			
		68386453			
Muestra 8 -140 %	275.2	68915775	68112494	19.83	99.14
		67087572			
		68334135			
Muestra 9 -140 %	275.3	69791484	68970391.7	20.07	100.35
		69181203			
		67938488			
Muestra 10 -140 %	275.1	69964087	69030580.3	20.1	100.51
		69130562			
		67997092			
<b>Media (x)</b>		<b>=</b>			<b>100.61</b>
<b>Desviación estándar (s).</b>		<b>=</b>			<b>1.108</b>
<b>Coeficiente de Variación (DRS %)</b>		<b>Formula: <math>100 \times 1.108 / 100.61</math></b>			<b>1.101%</b>
<b>Especificación (CV): Máximo 2,0 %</b>					

Fuente elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 29 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las inyecciones por triplicado de 2 estándares de nicotinamida y de 10 muestras de Nicotinamida al 140%, el coeficiente de variación de las áreas es 1.101%, este resultado cumple criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0\%$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí y se determina la precisión del sistema (instrumental) para Nicotinamida.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**b. Repetibilidad del método de riboflavina.**

Tabla N.º30. Resultados de repetibilidad del método de riboflavina.

Muestra	Peso activo (mg)	Área	Promedio de área	mg/5mL	%
Estándar 1	27.4	77961272	78688874	---	--
		79208313			
		78897037			
Estándar 2	27.6	79510689	79111507	---	--
		78902734			
		78921098			
Muestra 1 - 135 %	54.3	159635878	158677190	2.79	101.75
		156533915			
		159861776			
Muestra 2 - 135 %	53.9	156165538	156338627	2.77	101.00
		156542059			
		156308284			
Muestra 3 - 135 %	53.8	155825465	155611640	2.76	100.72
		155130209			
		155879247			
Muestra 4 - 135 %	53.7	156275352	156033947	2.77	101.18
		156661484			
		155165006			
Muestra 5 - 135 %	53.8	151602978	155283574	2.75	100.50
		157705221			
		156542524			
Muestra 6 - 135 %	53.1	154117304	150879272	2.71	98.94
		148263128			
		150257383			
Muestra 7 - 135 %	53.4	153624255	154356158	2.76	100.65
		155140433			
		154303785			
Muestra 8 - 135 %	53.8	153762985	153259615	2.72	99.19
		153230646			
		152785215			
Muestra 9 - 135 %	53.1	155030954	153987431	2.77	100.98
		153892048			
		153039290			
Muestra 10 - 135 %	53.4	153905409	153874935	2.75	100.34
		153911422			
		153807974			
<b>Media (x)</b>		<b>=</b>			<b>100.53</b>
<b>Desviación estándar (s)</b>		<b>=</b>			<b>0.866</b>
<b>Coeficiente de Variación (DRS %)</b>		<b>Formula: 100x0.866/100.53</b>			<b>0.861%</b>
<b>Especificación (CV): Máximo 2,0 %</b>					

Fuente: elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 30 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las inyecciones por triplicado de 2 estándares de Riboflavina y de 10 muestras de Riboflavina al 135%, el coeficiente de variación de las áreas es 0.861%, este resultado cumple criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0\%$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí y se determina la precisión del sistema (instrumental) para Riboflavina.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**c. Repetibilidad de método de piridoxina clorhidrato.**

Tabla N.º31. Resultados de repetibilidad del método de piridoxina clorhidrato.

Muestra	Peso activo (mg)	Área	Promedio de área	mg/5 mL	%
Estándar 1	20.8	57246083	57851669	---	--
		58013400			
		58295524			
Estándar 2	20.2	58330556	58508190.3	---	--
		58885668			
		58308347			
Muestra 1-140 %	28.9	81509566	80837127.3	2.01	100.57
		79307887			
		81693929			
Muestra 2 -140 %	28.4	79485249	79174059.7	2.00	100.23
		78557321			
		79479609			
Muestra 3 -140 %	28.4	77890093	78369457.7	1.98	99.21
		78430443			
		78787837			
Muestra 4 -140 %	28.4	78651145	78714372.3	1.99	99.65
		79300208			
		78191764			
Muestra 5 -140 %	28.1	76164671	77760146.3	1.99	99.49
		78540343			
		78575425			
Muestra 6 -140 %	28.1	78107569	76491439	1.96	97.87
		75683374			
		75683374			
Muestra 7 -140 %	28	78544770	78317465.7	2.01	100.57
		78214920			
		78192707			
Muestra 8 -140 %	28.1	78097833	78178960.7	2.00	100.03
		77540966			
		78898083			
Muestra 9 -140 %	28.3	78934488	78229373	1.99	99.39
		77842141			
		77911490			
Muestra 10 -140 %	28.4	78475687	78373890.7	1.98	99.22
		78050455			
		78595530			
<b>Media (x)</b>		<b>=</b>			<b>99.62</b>
<b>Desviación estándar (s).</b>		<b>=</b>			<b>0.803</b>
<b>Coeficiente de Variación (DRS %)</b>		<b>Formula: 100x0.803/99.62</b>			<b>0.806%</b>
<b>Especificación (CV): Máximo 2,0 %</b>					

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 31 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las inyecciones por triplicado de 2 estándares de Piridoxina clorhidrato y de 10 muestras de Piridoxina clorhidrato al 140%, el coeficiente de variación de las áreas es 0.806%, este resultado cumple criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0\%$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí y se determina la precisión del sistema (instrumental) para Piridoxina clorhidrato.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**d. Repetibilidad de método de tiamina clorhidrato.**

Tabla N.°32. Resultados de repetibilidad de método de tiamina clorhidrato

Muestra	Peso activo (mg)	Área	Promedio de área	mg/5mL	%
Estándar 1	50.9	62423083	63095232.7	---	--
		63268759			
		63593856			
Estándar 2	50.6	63628340	63437727.3	---	--
		63477529			
		63207313			
Muestra 1-190 %	104.5	130473767	130069639	5.02	100.41
		129714973			
		130020177			
Muestra 2 -190 %	104.5	129336022	129234164	4.99	99.77
		129010338			
		129356133			
Muestra 3 -190 %	104.2	128758913	128484099	4.97	99.47
		128391142			
		128302242			
Muestra 4 -190 %	104.3	128447331	128749059	4.98	99.58
		129126275			
		128673570			
Muestra 5 -190 %	104	124217507	127032291	4.93	98.54
		127907858			
		128971508			
Muestra 6 -190 %	101.5	125784029	122992187	4.89	97.75
		121580529			
		121612002			
Muestra 7 -190 %	104.1	127188417	127231367	4.93	98.60
		127264222			
		127241462			
Muestra 8 -190 %	101.5	123585963	122750046	4.88	97.56
		122205536			
		122458638			
Muestra 9 -190 %	104	127701383	126829673	4.92	98.38
		126936908			
		125850729			
Muestra 10 -190 %	104	126875551	126607896	4.91	98.21
		126533589			
		126414547			
Media (x)			=		<b>98.83</b>
Desviación estándar (s).			=		<b>0.934</b>
Coeficiente de Variación (DRS %)			Formula: $100 \times 0.934 / 98.83$		<b>0.945%</b>
Especificación (CV): Máximo 2,0 %					

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º 31 se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las inyecciones por triplicado de 2 estándares de tiamina clorhidrato y de 10 muestras de tiamina clorhidrato al 190%, el coeficiente de variación de las áreas es 0.945%, este resultado cumple criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0\%$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí y se determina la precisión del sistema (instrumental) para tiamina clorhidrato.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**Repetibilidad de método para D- Pantenol.**

Tabla N.º33. Resultados de repetibilidad de método de D-Pantenol.

Muestra	Peso activo (mg)	Área	Promedio de área	mg/5mL	%
Estándar 1	30.2	45558454	45838747.7	---	--
		45441357			
		46516432			
Estándar 2	29.5	43751064	43713300	---	--
		43968220			
		43420616			
Muestra 1-140 %	42.2	63767171	64100951.3	3.00	100.08
		64799436			
		63736247			
Muestra 2 -140 %	42.5	63646446	64090664.3	2.98	99.35
		64128195			
		64497352			
Muestra 3 -140 %	42.3	63828842	64158764.7	3.00	99.93
		64583179			
		64064273			
Muestra 4 -140 %	42.1	64043053	64461853	3.03	100.88
		65203482			
		64139024			
Muestra 5 -140 %	42.3	65418451	64301173.3	3.00	100.15
		63084327			
		64400742			
Muestra 6 -140 %	42.5	63430493	64078398.7	2.98	99.33
		63894061			
		64910642			
Muestra 7 -140 %	42.3	64081044	64330785	3.01	100.20
		63931010			
		64980301			
Muestra 8 -140 %	42.1	64927120	64840935.7	3.04	101.47
		64350369			
		65245318			
Muestra 9 -140 %	42.3	64789042	64806958.7	3.03	100.94
		65088577			
		64543257			
Muestra 10 -140 %	42.6	65202633	65257018	3.03	100.92
		65336878			
		65231543			
<b>Media (x)</b>		=		<b>100.33</b>	
<b>Desviación estándar</b>		=		<b>0.711</b>	
<b>Coefficiente de Variación (DRS %)</b>		<b>Formula: 100x0.711/100.33</b>		<b>0.709%</b>	
<b>Especificación (CV): Máximo 2,0 %</b>					

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 31 Se muestran los resultados de las áreas obtenidas de las inyecciones por triplicado de 2 estándares de D-Pantenol y de 10 muestras de D-Pantenol al 140%, el coeficiente de variación de las áreas es 0.709%, este resultado cumple criterios de coeficiente de variación  $CV \leq 2.0\%$ , lo que expresa la cercanía en la dispersión de resultados entre sí y se determina la precisión del sistema (instrumental) para D-Pantenol.

**Discusión:** Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, La desviación estándar relativa (RSD) de tiempos de retención de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,64%, esto nos indica que existe correlación el cual respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

#### ✓ **PRECISIÓN INTERMEDIA:**

**Precisión intermedia para las cuatro vitaminas (Nicotinamida, riboflavina, piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato).**

Se estudió el nivel de variación del método, se trabajó con dos analistas donde la preparación de estándares mixtos y muestras se realizó en diferentes días. Los resultados de las inyecciones por triplicado de dos estándares mixtos (Nicotinamida, piridoxina clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato) y de 10 muestras de cada principio activo mixto a una concentración de: Nicotinamida (140%), Piridoxina clorhidrato (140%), Tiamina clorhidrato (190%), riboflavina (135%) se muestran en las tablas y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y análisis de T-pareado.

##### **a. Precisión intermedia de nicotinamida**

Tabla N.º34. Resultados de precisión intermedio analista 1, para nicotinamida.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 1	Promedio de área – analista 1	Mg/5mL	%
Estándar 1	200.1	49626029	49956380.7	---	---
		50517188			
		49725925			
Estándar 2	200.1	51254317	50372964.7	---	---
		49641501			
		50223076			
Muestra 1 -140%	275.9	69202537	69484801.7	20.18	100.88
		69850577			
		69401291			
Muestra 2 -140%	275.8	70063424	69871144	20.3	101.48
		69505859			
		70044149			
Muestra 3 -140%	275.9	69601351	69557691	20.2	100.98
		68654861			
		70416861			
Muestra 4 -140%	275.9	69647993	70224738.7	20.39	101.95
		71288100			
		69738123			
Muestra 5 -140%	277.3	70357191	70744017	20.44	102.19
		71343751			
		70531109			
Muestra 6 -140%	275	69540376	68010111	19.81	99.06
		67147821			
		67342136			
Muestra 7 -140%	275.6	68471950	68487613	19.91	99.54
		68604436			
		68386453			
Muestra 8 -140%	275.2	68915775	68112494	19.83	99.14
		67087572			
		68334135			
Muestra 9 -140%	275.3	69791484	68970391.7	20.07	100.35
		69181203			
		67938488			
Muestra 10 -140%	275.1	69964087	69030580.3	20.1	100.51
		69130562			
		67997092			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º35. Resultados de precisión intermedio analista 2, para nicotinamida

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 2	Promedio de área – analista 2	Mg/5mL	%
Estándar 1	200.5	49892800	50377839.7	---	---
		50933235			
		50307484			
Estándar 2	200.3	50634663	49881797	---	---
		49788535			
		49222193			
Muestra 1 -140%	275.8	69962899	69753758.7	20.13	100.66
		69907420			
		69390957			
Muestra 2 -140%	275.4	70037383	70546641.3	20.39	101.95
		70562243			
		71040298			
Muestra 3 -140%	275.9	71145825	70435866.7	20.32	101.61
		70169549			
		69992226			
Muestra 4 -140%	275.7	69299821	69509954.7	20.07	100.34
		69932280			
		69297763			
Muestra 5 -140%	275.6	70695764	69586673.3	20.1	100.49
		68539560			
		69524696			
Muestra 6 -140%	275.8	69340301	69746973.7	20.13	100.65
		69664981			
		70235639			
Muestra 7 -140%	275.4	69785677	70283890.3	20.31	101.57
		70969367			
		70096627			
Muestra 8 -140%	275.4	70045689	69319496.7	20.04	100.18
		69744576			
		68168225			
Muestra 9 -140%	275.8	68835508	69853992.7	20.16	100.8
		70668794			
		70057676			
Muestra 10 -140%	275.1	68879490	68333659.3	19.77	98.86
		68455852			
		67665636			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º36. Resultados de precisión intermedia de nicotinamida, analista 1 y analista 2 en diferentes días.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	(%)	mg/ 5mL	(%)	mg/ 5mL
1	100.88	20.18	100.66	20.13
2	101.48	20.30	101.95	20.39
3	100.98	20.20	101.61	20.32
4	101.95	20.39	100.34	20.07
5	102.19	20.44	100.49	20.10
6	99.06	19.81	100.65	20.13
7	99.54	19.91	101.57	20.31
8	99.14	19.83	100.18	20.04
9	100.35	20.07	100.80	20.16
10	100.51	20.10	98.86	19.77
Nº de análisis (n) =	20			
Media (X) =	100.659 %			
Desviación estandar (s) =	0.976			
Coefficiente de Variación (CV) =	100 x 0.976		0.969	%
Especificación (CV): Máximo 2,0%	100.659			

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º 36 Se muestran los resultados del porcentaje de recuperación obtenidas de las inyecciones por triplicado de 10 muestras de nicotinamida al 140% del analista1 y analista 2, el coeficiente de variación global es 0.969%, este resultado cumple criterios según la norma que el coeficiente de variación (CV)  $\leq 2.0\%$ , con el resultado demostramos que existe repetibilidad del método frente a una variación de analista y día.

Tabla N.º37. Resultados de precisión intermedia de nicotinamida, analista 1 y analista 2 para el cálculo de, análisis de T-pareado.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA (d)
	(%)	(%)	
1	100.88	100.66	0.22
2	101.48	101.95	-0.47
3	100.98	101.61	-0.62
4	101.95	100.34	1.61
5	102.19	100.49	1.70
6	99.06	100.65	-1.59
7	99.54	101.57	-2.03
8	99.14	100.18	-1.04
9	100.35	100.80	-0.45
10	100.51	98.86	1.65
Numero de análisis (n). =	10		
Media (X) =	100.61	100.71	-0.10
Desviación estándar (s). =	1.108	0.881	1.362

Fuente: Elaboración propia

### Resultados:

$$T \text{ experimental } t = \frac{d \cdot \sqrt{n}}{s}$$

t experimental: -0.232

t tabla: 2.262 para 10-1 = 9 grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05).

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º 37 Se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación de nicotinamida de los analistas 1 y 2, Se determinó estadísticamente el análisis de T-pareado al comparar medias y desviación estándar de resultados de ambos analistas, Obteniéndose como resultado T exp -0.232 el cual es menor a T tabla 2.262 lo cual indica que se acepta la Hipótesis Nula (H0), esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que obtuvieron para un análisis simultáneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldo el trajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia entonces el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**b. Precisión intermedia tiamina clorhidrato.**

Tabla N.°38. Resultados de precisión intermedio analista 1, para tiamina clorhidrato.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 1	Promedio de área – analista 1	mg/5mL	%
Estándar 1	50.9	62423083	63095232.7	---	---
		63268759			
		63593856			
Estándar 2	50.6	63628340	63437727.3	---	---
		63477529			
		63207313			
Muestra 1 -190%	104.5	130473767	130069639	5.02	100.41
		129714973			
		130020177			
Muestra 2 -190%	104.5	129336022	129234164	4.99	99.77
		129010338			
		129356133			
Muestra 3 -190%	104.2	128758913	128484099	4.97	99.47
		128391142			
		128302242			
Muestra 4 -190%	104.3	128447331	128749059	4.98	99.58
		129126275			
		128673570			
Muestra 5 -190%	104	124217507	127032291	4.93	98.54
		127907858			
		128971508			
Muestra 6 -190%	101.5	125784029	122992187	4.89	97.75
		121580529			
		121612002			
Muestra 7 -190%	104.1	127188417	127231367	4.93	98.6
		127264222			
		127241462			
Muestra 8 -190%	101.5	123585963	122750046	4.88	97.56
		122205536			
		122458638			
Muestra 9 -190%	104	127701383	126829673	4.92	98.38
		126936908			
		125850729			
Muestra 10 -190%	104	126875551	126607896	4.91	98.21
		126533589			
		126414547			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º39. Resultados de precisión intermedia analista 2, para tiamina clorhidrato.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 2	Promedio de área – analista 2	mg/5mL	%
Estándar 1	51.9	64825387	64696972.7	---	---
		64665667			
		64599864			
Estándar 2	51.8	65281056	64692710	---	---
		64267319			
		64529755			
Muestra 1 -190%	104.5	129269375	129699224	4.98	99.56
		129312150			
		130516146			
Muestra 2 -190%	104.8	131235434	131064322	5.02	100.32
		131024143			
		130933389			
Muestra 3 -190%	104.6	131848683	130306466	5.00	99.94
		130167078			
		128903637			
Muestra 4 -190%	104.8	129822557	129190956	4.94	98.89
		128812261			
		128938050			
Muestra 5 -190%	104.7	129653244	129134681	4.95	98.94
		128510172			
		129240627			
Muestra 6 -190%	104.8	128680545	129295581	4.95	98.97
		129369990			
		129836208			
Muestra 7 -190%	104	128711872	128711732	4.96	99.28
		129103489			
		128319836			
Muestra 8 -190%	101.2	122510364	122108371	4.84	96.79
		122722464			
		121092285			
Muestra 9 -190%	104.3	125629276	128169907	4.93	98.58
		130034472			
		128845973			
Muestra 10 -190%	104.2	127701383	126829673	4.88	97.64
		126936908			
		125850729			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º40. Resultados de precisión intermedia de tiamina clorhidrato, analista 1 y analista 2 en diferentes días.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	(%)	mg/5mL	(%)	mg/5mL
1	100.41	5.02	99.56	4.98
2	99.77	4.99	100.32	5.02
3	99.47	4.97	99.94	5.00
4	99.58	4.98	98.89	4.94
5	98.54	4.93	98.94	4.95
6	97.75	4.89	98.97	4.95
7	98.60	4.93	99.28	4.96
8	97.56	4.88	96.79	4.84
9	98.38	4.92	98.58	4.93
10	98.21	4.91	97.64	4.88
Nº de análisis (n) =	20			
Media (X) =	98.860 %			
Desviación estandar (s) =	0.965			
<b>Coefficiente de Variación (CV) =</b>	100 x 0.965		<b>0.976</b>	%
Especificación (CV): Máximo 2,0%	98.860			

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 40 Se muestran los resultados del porcentaje de recuperación obtenidas de las inyecciones por triplicado de 10 muestras de tiamina clorhidrato al 190% del analista1 y analista 2, el coeficiente de variación global es 0.976%, este resultado cumple criterios según la norma que el coeficiente de variación (CV)  $\leq$  2.0%, con el resultado demostramos que existe repetibilidad del método frente a una variación de analista y día.

Tabla N.º41. Resultados de precisión intermedia de tiamina clorhidrato, analista 1 y analista 2 para el cálculo de, Análisis de T-pareado.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA (d)
	(%)	(%)	
1	100.41	99.56	0.85
2	99.77	100.32	-0.56
3	99.47	99.94	-0.46
4	99.58	98.89	0.69
5	98.54	98.94	-0.40
6	97.75	98.97	-1.22
7	98.60	99.28	-0.68
8	97.56	96.79	0.77
9	98.38	98.58	-0.20
10	98.21	97.64	0.57
<b>Numero de análisis (n).</b> =	10.00		
<b>Media (X)</b> =	98.83	98.89	-0.07
<b>Desviación estándar (s).</b> =	0.93	1.04	<b>0.73</b>

Fuente: Elaboración propia

### Resultados:

$$T \text{ experimental } t = \frac{d \cdot \sqrt{n}}{s}$$

t experimental: -0.303

t tabla: 2.262 para  $10-1 = 9$  grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05).

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º 41 Se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación de tiamina clorhidrato de los analistas 1 y 2, Se determinó estadísticamente el análisis de T-pareado al comparar medias y desviación estándar de resultados de ambos analistas, Obteniéndose como resultado T exp -0.303 el cual es menor a T tabla 2.262 lo cual indica que se acepta la Hipótesis Nula (H0), esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que obtuvieron para un análisis simultaneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldo el trajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia, el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**c. Precisión intermedia de riboflavina.**

Tabla N.º42. Resultados de precisión intermedio analista 1, para riboflavina.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 1	Promedio de área – analista 1	mg/5mL	%
Estándar 1	27.4	77961272	78688874	---	---
		79208313			
		78897037			
Estándar 2	27.6	79510689	79111507	---	---
		78902734			
		78921098			
Muestra 1 -135%	54.3	159635878	158677190	2.79	101.75
		156533915			
		159861776			
Muestra 2 -135%	53.9	156165538	156338627	2.77	101
		156542059			
		156308284			
Muestra 3 -135%	53.8	155825465	155611640	2.76	100.72
		155130209			
		155879247			
Muestra 4 -135%	53.7	156275352	156033947	2.77	101.18
		156661484			
		155165006			
Muestra 5 -135%	53.8	151602978	155283574	2.75	100.5
		157705221			
		156542524			
Muestra 6 -135%	53.1	154117304	150879272	2.71	98.94
		148263128			
		150257383			
Muestra 7 -135%	53.4	153624255	154356158	2.76	100.65
		155140433			
		154303785			
Muestra 8 -135%	53.8	153762985	153259615	2.72	99.19
		153230646			
		152785215			
Muestra 9 -135%	53.1	155030954	153987431	2.77	100.98
		153892048			
		153039290			
Muestra 10 -135%	53.4	153905409	153874935	2.75	100.34
		153911422			
		153807974			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º43. Resultados de precisión intermedia analista 2, para riboflavina.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 2	Promedio de área – analista 2	mg/5mL	%
Estándar 1	26.1	72968034	73126991	---	---
		73320925			
		73092014			
Estándar 2	26.2	73349729	72735978	---	---
		72136792			
		72721413			
Muestra 1 -135%	55.4	157948317	158730036	2.8	102.26
		158174332			
		160067459			
Muestra 2 -135%	55.9	160018819	160308775	2.8	102.35
		160456220			
		160451285			
Muestra 3 -135%	55.7	159677906	158257103	2.78	101.41
		158357576			
		156735826			
Muestra 4 -135%	55.8	158083788	157065308	2.75	100.46
		156397698			
		156714439			
Muestra 5 -135%	55.9	157921900	157484503	2.76	100.55
		156989924			
		157541685			
Muestra 6 -135%	55.4	156507316	157441614	2.78	101.43
		157241358			
		158576167			
Muestra 7 -135%	55.7	158171344	157933203	2.77	101.2
		158181316			
		157446950			
Muestra 8 -135%	55.8	157627839	157252203	2.76	100.58
		158208761			
		155920008			
Muestra 9 -135%	55.9	152661081	155511761	2.72	99.29
		157543653			
		156330549			
Muestra 10 -135%	55.3	154736781	153765451	2.72	99.24
		153683338			
		152876235			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º44. Resultados de precisión intermedia de riboflavina, analista 1 y analista 2 en diferentes días.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	(%)	mg/5mL	(%)	mg/5mL
1	101.75	2.79	102.26	2.80
2	101.00	2.77	102.35	2.80
3	100.72	2.76	101.41	2.78
4	101.18	2.77	100.46	2.75
5	100.50	2.75	100.55	2.76
6	98.94	2.71	101.43	2.78
7	100.65	2.76	101.20	2.77
8	99.19	2.72	100.58	2.76
9	100.98	2.77	99.29	2.72
10	100.34	2.75	99.24	2.72
Nº de analisis (n) =	20			
Media (X) =	100.702 %			
Desviación estandar (s) =	0.965			
<b>Coefficiente de Variación (CV) =</b>	100 x 0.965		<b>0.959</b>	%
Especificación (CV): Maximo 2,0%	100.702			

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º44 Se muestran los resultados del porcentaje de recuperación obtenidas de las inyecciones por triplicado de 10 muestras de tiamina clorhidrato al 135% del analista1 y analista 2, el coeficiente de variación global es 0.959%, este resultado cumple criterios según la norma que el coeficiente de variación (CV)  $\leq$  2.0%, con el resultado demostramos que existe repetibilidad del método frente a una variación de analista y día.

Tabla N.º45. Resultados de precisión intermedia de riboflavina, analista 1 y analista 2 para el cálculo de, Análisis de T-pareado.

MUESTRA N.º	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA (d)
	(%)	(%)	
1	101.75	102.26	-0.51
2	101.00	102.35	-1.36
3	100.72	101.41	-0.69
4	101.18	100.46	0.71
5	100.50	100.55	-0.05
6	98.94	101.43	-2.49
7	100.65	101.20	-0.55
8	99.19	100.58	-1.39
9	100.98	99.29	1.69
10	100.34	99.24	1.10
Numero de análisis (n). =	10		
Media (X) =	100.52	100.88	-0.35
Desviación estándar (s). =	0.87	1.07	1.26

Fuente: Elaboración propia

### Resultados:

$$t \text{ experimental } t = \frac{d \cdot \sqrt{n}}{s}$$

t experimental: -0.878

t tabla: 2.262 para 10-1 = 9 grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05).

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N.º45 Se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación de riboflavina de los analistas 1 y 2, Se determinó estadísticamente el análisis de T-pareado al comparar medias y desviación estándar de resultados de ambos analistas, Obteniéndose como resultado T exp -0.878 el cual es menor a T tabla 2.262 lo cual indica que se acepta la Hipótesis Nula (H0), esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que obtuvieron para un análisis simultaneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldo el trajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia, el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**d. Precisión intermedia de piridoxina clorhidrato.**

Tabla N.º46. Resultados de precisión intermedio analista 1, para piridoxina clorhidrato.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 1	Promedio de área – analista 1	mg/5mL	%
Estándar 1	20.8	57246083	57851669	---	---
		58013400			
		58295524			
Estándar 2	20.2	58330556	58508190.3	---	---
		58885668			
		58308347			
Muestra 1 -140%	28.9	81509566	80837127.3	2.01	100.57
		79307887			
		81693929			
Muestra 2 -140%	28.4	79485249	79174059.7	2.00	100.23
		78557321			
		79479609			
Muestra 3 -140%	28.4	77890093	78369457.7	1.98	99.21
		78430443			
		78787837			
Muestra 4 -140%	28.4	78651145	78714372.3	1.99	99.65
		79300208			
		78191764			
Muestra 5 -140%	28.1	76164671	77760146.3	1.99	99.49
		78540343			
		78575425			
Muestra 6 -140%	28.1	78107569	76491439	1.96	97.87
		75683374			
		75683374			
Muestra 7 -140%	28	78544770	78317465.7	2.01	100.57
		78214920			
		78192707			
Muestra 8 -140%	28.1	78097833	78178960.7	2.00	100.03
		77540966			
		78898083			
Muestra 9 -140%	28.3	78934488	78229373	1.99	99.39
		77842141			
		77911490			
Muestra 10 -140%	28.4	78475687	78373890.7	1.98	99.22
		78050455			
		78595530			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º47. Resultados de precisión intermedia analista 2, para piridoxina clorhidrato.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 2	Promedio de área – analista 2	mg/5mL	%
Estándar 1	20.9	59067268	59503609.3	---	---
		59602310			
		59841250			
Estándar 2	20.7	61140287	60171497	---	---
		59589500			
		59784704			
Muestra 1 -140%	28	79101745	79351293.7	1.99	99.54
		79286799			
		79665337			
Muestra 2 -140%	28.4	80046746	80145974.7	1.98	99.12
		80196931			
		80194247			
Muestra 3 -140%	28.2	80752338	79989214	1.99	99.63
		79732564			
		79482740			
Muestra 4 -140%	28.1	79468643	79268945	1.98	99.08
		79315480			
		79022712			
Muestra 5 -140%	28	79716230	79299496.7	1.99	99.48
		79230966			
		78951294			
Muestra 6 -140%	28.1	79348276	79414816	1.99	99.27
		79115871			
		79780301			
Muestra 7 -140%	28	79046838	79229085.3	1.99	99.39
		79565228			
		79075190			
Muestra 8 -140%	28.1	78958912	78932379.7	1.97	98.66
		79454551			
		78383676			
Muestra 9 -140%	28	76164671	77646274.7	1.95	97.4
		78198728			
		78575425			
Muestra 10 -140%	28	78674025	78019783	1.96	97.87
		77664170			
		77721154			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º48. Resultados de precisión intermedia de piridoxina clorhidrato, analista 1 y analista 2 en diferentes días.

MUESTRA Nº	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	(%)	mg/5mL	(%)	mg/5mL
1	100.57	2.01	99.54	1.99
2	100.23	2.00	99.12	1.98
3	99.21	1.98	99.63	1.99
4	99.65	1.99	99.08	1.98
5	99.49	1.99	99.48	1.99
6	97.87	1.96	99.27	1.99
7	100.57	2.01	99.39	1.99
8	100.03	2.00	98.66	1.97
9	99.39	1.99	97.40	1.95
10	99.22	1.98	97.87	1.96
Nº de análisis (n) =	20			
Media (X) =	99.284 %			
Desviación estandar (s) =	0.833			
<b>Coefficiente de Variación (CV) =</b>	100 x 0.833		<b>0.839</b>	%
Especificación (CV): Máximo 2,0%	99.284			

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 48 Se muestran los resultados del porcentaje de recuperación obtenidas de las inyecciones por triplicado de 10 muestras de piridoxina clorhidrato al 140% del analista1 y analista 2, el coeficiente de variación global es 0.839%, este resultado cumple criterios según la norma que el coeficiente de variación (CV)  $\leq$  2.0%, con el resultado demostramos que existe repetibilidad del método frente a una variación de analista y día.

Tabla N.º49. Resultados de precisión intermedia de piridoxina clorhidrato, analista 1 y analista 2 para el cálculo de, Análisis de T-pareado.

MUESTRA N.º	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA (d)
	(%)	(%)	
1	100.57	99.54	1.03
2	100.23	99.12	1.11
3	99.21	99.63	-0.41
4	99.65	99.08	0.57
5	99.49	99.48	0.02
6	97.87	99.27	-1.39
7	100.57	99.39	1.18
8	100.03	98.66	1.37
9	99.39	97.40	1.99
10	99.22	97.87	1.35
Numero de análisis (n). =	10		
Media (X) =	99.62	98.94	0.68
Desviación estándar (s). =	0.80	0.75	1.01

Fuente: Elaboración propia

### Resultados:

$$t \text{ experimental } t = \frac{d \cdot \sqrt{n}}{s}$$

t experimental: 2.129

t tabla: 2.262 para  $10-1 = 9$  grados de libertad y  $(\alpha: 0.05)$ .

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 49 Se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación de piridoxina clorhidrato de los analistas 1 y 2, Se determinó estadísticamente el análisis de T-pareado al comparar medias y desviación estándar de resultados de ambos analistas, Obteniéndose como resultado T exp 2.129 el cual es menor a T tabla 2.262 lo cual indica que se acepta la Hipótesis Nula (H0), esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que obtuvieron para un análisis simultaneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldo el trajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia, el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

**d) Precisión intermedia para D-Pantenol.**

Se estudió el nivel de variación del método, se trabajó con dos analistas donde la preparación de estándares mixtos y muestras se realizó en diferentes días. Para este parámetro se utilizaron 2 analistas, los cuales prepararon los estándares y las muestras en diferentes días.

Los resultados de las inyecciones por triplicado de dos estándares mixtos y de 10 muestras de cada principio activo mixto a una concentración de principio activo D-Pantenol (140) se muestran en las tablas y se determina el promedio del coeficiente de variación de las áreas y análisis de T-pareado.

Tabla N.º50. Resultados de precisión intermedio analista 1, para D-pantenol.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 1	Promedio de área – analista 1	mg/5mL	%
Estándar 1	30.2	45558454	45838747.7	---	---
		45441357			
		46516432			
Estándar 2	29.5	43751064	43713300	---	---
		43968220			
		43420616			
Muestra 1 -140%	42.2	63767171	64100951.3	3.00	100.08
		64799436			
		63736247			
Muestra 2 -140%	42.5	63646446	64090664.3	2.98	99.35
		64128195			
		64497352			
Muestra 3 -140%	42.3	63828842	64158764.7	3.00	99.93
		64583179			
		64064273			
Muestra 4 -140%	42.1	64043053	64461853	3.03	100.88
		65203482			
		64139024			
Muestra 5 -140%	42.3	65418451	64301173.3	3.00	100.15
		63084327			
		64400742			
Muestra 6 -140%	42.5	63430493	64078398.7	2.98	99.33
		63894061			
		64910642			
Muestra 7 -140%	42.3	64081044	64330785	3.01	100.20
		63931010			
		64980301			
Muestra 8 -140%	42.1	64927120	64840935.7	3.04	101.47
		64350369			
		65245318			
Muestra 9 -140%	42.3	64789042	64806958.7	3.03	100.94
		65088577			
		64543257			
Muestra 10 -140%	42.6	65202633	65257018	3.03	100.92
		65336878			
		65231543			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º51. Resultados de precisión intermedia analista 2, para D-pantenol.

Muestra	Peso del activo (mg)	Área – Analista 2	Promedio de área – analista 2	mg/5mL	%
Estándar 1	30	44759358	44576700.7	---	---
		43743128			
		45227616			
Estándar 2	30	43691360	43486880	---	---
		43445675			
		43323605			
Muestra 1 -140%	42.8	62954424	63604537	3.02	100.61
		63871576			
		63987611			
Muestra 2 -140%	42.7	63578682	63691360.7	3.03	100.98
		64035885			
		63459515			
Muestra 3 -140%	42.9	63737507	63868534	3.01	100.19
		64115406			
		63752689			
Muestra 4 -140%	42.9	63455468	63994462	3.01	100.39
		64564231			
		63963687			
Muestra 5 -140%	42.8	64144454	63629644.7	3.00	100.05
		63084327			
		63660153			
Muestra 6 -140%	42.9	63370668	63710448.3	3.00	99.95
		63311083			
		64449594			
Muestra 7 -140%	42.8	63933674	63827739	3.01	100.36
		62655721			
		64893822			
Muestra 8 -140%	42.7	64603956	64436940.7	3.05	101.56
		64024262			
		64682604			
Muestra 9 -140%	42.8	64472778	64446389.3	3.04	101.34
		64757451			
		64108939			
Muestra 10 -140%	42.9	64342867	64136314.3	3.02	100.61
		64750421			
		63315655			

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.º52. Resultados de precisión intermedia de D- Pantenol, analista 1 y analista 2 en diferentes días

MUESTRA Nº	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	(%)	mg/5mL	(%)	mg/5mL
1	100.08	3.00	100.61	3.02
2	99.35	2.98	100.98	3.03
3	99.93	3.00	100.19	3.01
4	100.88	3.03	100.39	3.01
5	100.15	3.00	100.05	3.00
6	99.33	2.98	99.95	3.00
7	100.20	3.01	100.36	3.01
8	101.14	3.03	101.56	3.05
9	100.94	3.03	101.34	3.04
10	100.92	3.03	100.61	3.02
Nº de analisis (n) =	20			
Media (X) =	100.448 %			
Desviación estandar (s) =	0.607			
<b>Coefficiente de Variación (CV) =</b>	100 x 0.607		<b>0.604</b>	%
<b>Especificación (CV): Maximo 2,0%</b>	100.448			

Fuente: Elaboración propia

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla n° 52 se muestran los resultados del porcentaje de recuperación obtenidas de las inyecciones por triplicado de 10 muestras de D-Pantenol al 140% del analista1 y analista 2, el coeficiente de variación global es 0.604%, este resultado cumple criterios según la norma que el coeficiente de variación (cv)  $\leq$  2.0%, con el resultado demostramos que existe repetibilidad del método frente a una variación de analista y día.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que

obtuvieron para un análisis simultáneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldó el trabajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia, el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

Tabla N.º53. Resultados de precisión intermedia de D-Pantenol, analista 1 y analista 2 para el cálculo de, Análisis de T-pareado.

MUESTRA N.º	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA (d)
	(%)	(%)	
1	100.08	100.61	-0.53
2	99.35	100.98	-1.63
3	99.93	100.19	-0.26
4	100.88	100.39	0.49
5	100.15	100.05	0.10
6	99.33	99.95	-0.62
7	100.20	100.36	-0.16
8	101.14	101.56	-0.42
9	100.94	101.34	-0.40
10	100.92	100.61	0.31
Numero de análisis (n). =	10		
Media (X) =	100.29	100.60	-0.31
Desviación estándar (s). =	0.66	0.54	0.59

Fuente: Elaboración propia

### Resultados:

$$t \text{ experimental } t = \frac{d \cdot \sqrt{n}}{s}$$

t experimental: -1.662

t tabla: 2.262 para  $10-1 = 9$  grados de libertad y ( $\alpha: 0.05$ ).

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 53 Se muestran los resultados de los porcentajes de recuperación de D-Pantenol de los analistas 1 y 2, Se determinó

estadísticamente el análisis de T-pareado al comparar medias y desviación estándar de resultados de ambos analistas, Obteniéndose como resultado  $T_{exp} -1.662$  el cual es menor a  $T_{tabla} 2.262$  lo cual indica que se acepta la Hipótesis Nula ( $H_0$ ), esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2.

**Discusión:** Al igual que en las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, indican que estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B como se puede observar en el Anexo B2, a partir del p valor ( $>0.05$ ) para un 95% de confianza se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas. El ácido ascórbico y la riboflavina presentan valores cercanos al 0.05 es decir que son las más variables de todas las vitaminas analizadas; esto se debe a su naturaleza inestable que entre inyecciones presenta pérdida de área bajo la curva, pero manteniéndose dentro del rango establecido en base a los resultados que obtuvieron para un análisis simultaneo de vitaminas, determinan que el método es preciso, con este estudio respaldo el trajo que realice concluyendo conformidad del parámetro de precisión intermedia.

Según los autores **Medina G; Lourdes E; Armas M. en el año 2021**, obtuvo resultados de desviación estándar relativa (RSD) debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39% y el RSD de las áreas de 6 inyecciones debe ser  $\leq 2\%$  obteniéndose 0,39%, es así como determinan que su trabajo de investigación cumple el parámetro de precisión intermedia, el método es repetible, además respalda los resultados obtenidos en nuestra tesis.

#### **4.2.4. EXACTITUD:**

**Exactitud para las cuatro vitaminas (Nicotinamida, riboflavina, piridoxina clorhidrato y tiamina clorhidrato).**

En esta prueba trabajamos con 3 niveles de concentración para las vitaminas como nicotinamida, piridoxina clorhidrato, riboflavina a (80 %, 120 %, 160 %), tiamina clorhidrato (40 %, 160 %, 280 %) y la muestra de 2 estándares mixtos de: Nicotinamida, piridoxina clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato, todos inyectados por triplicado.

Los resultados del análisis en las tablas: Porcentaje de recuperación y varianza, para realizar la prueba de homogeneidad.

**a. Exactitud para nicotinamida:**

**b.**

Tabla N.°54. Resultados de exactitud de nicotinamida.

Niveles de concentraciones	Peso mg del analito.	Área	Promedio de área	mg/5mL	% De Recuperación
<b>STD-1 Nicotinamida</b>	215.9	48919964	49840183.0	---	---
		50070486		---	---
		50530099		---	---
<b>STD-2 Nicotinamida</b>	215.4	49144175	49040899.7	---	---
		49707987		---	---
		48270537		---	---
<b>80%</b>	162.2	36953094	37158272.5	20.01	100.04
		37363451			
	161.4	36313780	36947257.5	19.99	99.97
		37580735			
	162.5	36881370	37218355.0	20.00	100.02
		37555340			
<b>120%</b>	238.4	54382072	54603477.5	20.00	100.02
		54824883			
	242.5	56407627	55296841.0	19.92	99.58
		54186055			
	244	56203172	55837478.0	19.99	99.93
		55471784			
<b>160%</b>	344.4	79068918	78857480.5	20.00	99.99
		78646043			
	357.2	81376072	81796614.5	20.00	100.00
		82217157			
	356.9	82177218	81723630.5	20.00	99.99
		81270043			
<b>PROMEDIO</b>					99.95
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR (S)</b>					0.142
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>					0.142

Fuente: Elaboración propia

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con el analito preparado, se usó la prueba de t de student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

**Número de muestras** n=9

**Porcentaje de Recuperación Media: Promedio** %= 99.95%

**Desviación estándar** = 0.142%

**Coefficiente de variación o DRS** = 0.142 %

**Student para el conjunto de datos:**

Fórmula para hallar el valor del “t” experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R/\sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

$$T_{\text{exp}} = 1.056$$

T tabla =2.306 (n-1 =8; a 95 % de nivel de confianza)

$$1.056 < 2.306$$

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 54 Se muestran los resultados para el analito Nicotinamida, el porcentaje de recuperación es de 99.95%, teniendo como especificación de 90% a 150%, el valor de la desviación estándar relativa es de 0.142 % se tiene como parámetro DSR% menor a 2%. El test de t de student confirma que los valores de cantidad media de analito añadido y porcentaje recuperado no son estadísticamente diferentes, Se tiene t exp = 1.056 menor que t tabla = 2.306 con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Concluyendo que el método analítico para nicotinamida tiene la exactitud.

**Discusión:** Según las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo cargado a distintos niveles. (AEFI 2001) Para formas farmacéuticas se determinó un porcentaje de recuperación de 97% - 103% de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la Tabla 8-3, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se

encuentra dentro del rango de aceptación. Con estos resultados respaldamos nuestro trabajo.

**c. Exactitud para riboflavina:**

Tabla N.º 55. Resultados de exactitud de riboflavina.

Niveles de concentraciones	Peso mg del analito.	Área	Promedio de área	mg/5mL	% De Recuperación
<b>STD-1 Riboflavina</b>	39.9	106859309	108315220.0	----	----
		108446437		----	----
		109639914		----	----
<b>STD-2 Riboflavina</b>	39.5	107662677	106771864.3	----	----
		108131274		----	----
		104521642		----	----
<b>80%</b>	31.5	83308533	83025227.5	2.68	97.79
		82741922			
	31.4	83225119	82764190.0	2.68	97.79
		82303261			
	31.8	83688819	83315820.5	2.66	97.21
		82942822			
<b>120%</b>	46.1	119998810	121148139.0	2.67	97.50
		122297468			
	46.0	123066331	121788733.0	2.69	98.23
		120511135			
	46.2	123429910	123606203.5	2.72	99.26
		123782497			
<b>160%</b>	61.8	168732192	168706980.5	2.78	101.28
		168681769			
	62.4	170534889	170635794.0	2.78	101.46
		170736699			
	63.4	171631367	171306297.0	2.75	100.25
		170981227			
<b>PROMEDIO</b>					98.97
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR (S)</b>					1.653
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>					1.670

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados hallados en la tabla anterior podemos observar la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), es 1.670 %, este valor es inferior a 3.0 %.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con el analito preparado, se usó la prueba de t de student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

**Número de muestras** n=9

**Porcentaje de Recuperación Media: Promedio** %= 98.97%

**Desviación estándar** = 1.653

**Coefficiente de variación o DRS** = 1.670 %

**Student para el conjunto de datos:**

Fórmula para hallar el valor del “t” experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R/\sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

$$T_{\text{exp}} = 1.850$$

T tabla =2.306 (n-1 =8; a 95 % de nivel de confianza)

$$1.850 < 2.306$$

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 55 Se muestran los resultados para el analito riboflavina, el porcentaje de recuperación es de 98.97 %, teniendo como especificación de 90% a 150%, el valor de la desviación estándar relativa es de 1.670 %, se tiene como parámetro DSR% menor a 2%. El test de t de student confirma que los valores de cantidad media de analito añadido y porcentaje recuperado no son estadísticamente diferentes, Se tiene T exp = 1.850 menor que t tabla = 2.306 con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Concluyendo que el método analítico para riboflavina tiene la exactitud.

**Discusión:** Según las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo cargado a distintos niveles. (AEFI 2001) Para formas farmacéuticas se determinó un porcentaje de recuperación de 97% - 103% de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la Tabla 8-3, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se

encuentra dentro del rango de aceptación. Con estos resultados respaldamos nuestro trabajo.

**d. Exactitud para tiamina clorhidrato:**

Tabla N.º56. Resultados de exactitud de tiamina clorhidrato.

Niveles de concentraciones	Peso mg del analito.	Área	Promedio de área	mg/5mL	% De Recuperación
<b>STD-1 Tiamina clorhidrato</b>	52.4	63712478	64465569.0	-----	-----
		64601802		-----	-----
		65082427		-----	-----
<b>STD-2 Tiamina clorhidrato</b>	52.4	63668910	63126645.0	-----	-----
		63796416		-----	-----
		61914609		-----	-----
<b>80%</b>	20.0	23964316	23905172.5	4.91	98.17
		23846029			
	20.2	24820828	24543780.5	4.99	99.80
		24266733			
	20.9	24674155	24487435.0	4.81	96.24
		24300715			
<b>120%</b>	90.9	106061784	107041899.5	4.84	96.72
		108022015			
	90.0	107399962	106335848.5	4.85	97.05
		105271735			
	90.1	108659420	108692035.5	4.95	99.09
		108724651			
<b>160%</b>	142.2	173182359	173846735.5	5.02	100.42
		174511112			
	142.6	176118721	176193021.0	5.07	101.49
		176267321			
	142.9	177234663	179252353.0	5.15	103.03
		181270043			
<b>PROMEDIO</b>					99.11
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR (S)</b>					2.299
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>					2.320

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados hallados en la tabla anterior podemos observar la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), es 2.320 %, este valor es inferior a 3.0 %.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con el analito preparado, se usó la prueba de t de student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

**Número de muestras** n=9

**Porcentaje de Recuperación Media: Promedio** %= 99.11%

**Desviación estándar** = 2.299

**Coefficiente de variación o DRS** = 2.320 %

**Student para el conjunto de datos:**

Fórmula para hallar el valor del “t” experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{/100 - R/\sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

$$T_{\text{exp}} = 1.161$$

T tabla =2.306 (n-1 =8; a 95 % de nivel de confianza)

$$1.161 < 2.306$$

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 56 Se muestran los resultados para el analito tiamina clorhidrato, el porcentaje de recuperación es de 99.11 %, teniendo como especificación de 90% a 250%, el valor de la desviación estándar relativa es de 2.320%, se tiene como parámetro DSR% menor a 2%, El test de t de student confirma que los valores de cantidad media de analito añadido y porcentaje recuperado no son estadísticamente diferentes, Se tiene t exp = 1.161 menor que t tabla = 2.306 con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Concluyendo que el método analítico para tiamina clorhidrato tiene la exactitud.

**Discusión:** Según las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo cargado a distintos niveles. (AEFI 2001) Para formas farmacéuticas se determinó un porcentaje de recuperación de 97% - 103% de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la Tabla 8-3, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se encuentra dentro del rango de aceptación. Con estos resultados respaldamos nuestro trabajo.

e. Exactitud para piridoxina clorhidrato:

Tabla N. 57. Resultados de exactitud de piridoxina clorhidrato.

Niveles de concentraciones	Peso mg del analito.	Área	Promedio de área	mg/5mL	% De Recuperación
STD-1 Piridoxina clorhidrato	21.9	56871147.0	57600005.0	-----	-----
		57544261.0		-----	-----
		58384607.0		-----	-----
STD-2 Piridoxina clorhidrato	21.7	57286850.0	56994094.7	-----	-----
		57655353.0		-----	-----
		56040081.0		-----	-----
80%	16.7	43471224.0	43270418.0	1.98	99.03
		43069612.0			
	16.6	43243964.0	43289245.0	1.99	99.67
		43334526.0			
	16.9	44125924.0	44127331.5	2.00	99.80
		44128739.0			
120%	24.9	63891627.0	64286432.0	1.97	98.68
		64681237.0			
	24.6	64682674.0	64269288.0	2.00	99.80
		63855902.0			
	24.9	64623626.0	64978250.0	1.99	99.74
		65332874.0			
160%	33.8	89122259.0	89250875.0	2.02	100.93
		89379491.0			
	34.2	90635561.0	90495212.0	2.02	101.14
		90354863.0			
	34.3	90887959.0	90980489.5	2.03	101.38
		91073020.0			
<b>PROMEDIO</b>					100.02
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR (S)</b>					0.936
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>					0.936

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados hallados en la tabla anterior podemos observar la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), es 0.936 %, este valor es inferior a 3.0 %.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con el analito preparado, se usó la prueba de t de student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

**Número de muestras** n=9

**Porcentaje de Recuperación Media: Promedio** %= 100.02%

**Desviación estándar** = 0.936

**Coefficiente de variación o DRS** = 0.936 %

**Student para el conjunto de datos:**

Fórmula para hallar el valor del “t” experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R/\sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

$$T_{\text{exp}} = 0.064$$

T tabla =2.306 (n-1 =8; a 95 % de nivel de confianza)

$$0.064 < 2.306$$

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 57 Se muestran los resultados para el analito piridoxina clorhidrato el porcentaje de recuperación es de 100.02 %, teniendo como especificación de 90% a 150%, el valor de la desviación estándar relativa es de 0.936 %, se tiene como parámetro DSR% menor a 2%. El test de t de student confirma que los valores de cantidad media de analito añadido y porcentaje recuperado no son estadísticamente diferentes, Se tiene t exp = 0.064 menor que t tabla = 2.306 con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Concluyendo que el método analítico para piridoxina clorhidrato tiene la exactitud.

**Discusión:** Según las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo cargado a distintos niveles. (AEFI 2001) Para formas farmacéuticas se determinó un porcentaje de recuperación de 97% - 103% de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la Tabla 8-3, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se

encuentra dentro del rango de aceptación. Con estos resultados respaldamos nuestro trabajo.

**e) Exactitud para las D-Pantenol.**

En esta prueba trabajamos con 3 niveles de concentración para el activo D-Pantenol a diferente concentración de (80 %, 120 %, 160 inyectado por triplicado.

Los resultados del análisis en las tablas: Porcentaje de recuperación y varianza, para realizar la prueba de homogeneidad.

Tabla N.º 58. Resultados de exactitud de D-Pantenol.

Niveles de concentraciones	Peso mg del analito.	Área	Promedio de área	mg/5MI	% De Recuperación
STD-1 D-pantenol	31.3	46682934	46766118.0	----	----
		47188976		----	----
		46426444		----	----
STD-2 D-pantenol	31.3	46793262	46901401.3	----	----
		47254501		----	----
		46656441		----	----
80%	24.9	37297407	37259563.0	3.00	100.00
		37221719			
	24.5	36237629	36719008.5	3.00	100.16
		37200388			
	24.4	36936015	36578589.0	3.01	100.19
		36221163			
120%	37.1	55087702	55485934.5	3.00	99.95
		55884167			
	37.5	55730052	56161860.0	3.00	100.10
		56593668			
	37.3	55685329	55752569.5	3.00	99.89
		55819810			
160%	48.1	71728250	71910702.0	3.00	99.92
		72093154			
	48.5	72420971	72580288.5	3.00	100.01
		72739606			
	48.0	72064454	71758265.0	3.00	99.91
		71452076			
<b>PROMEDIO</b>					100.01
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)</b>					0.111
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>					0.111

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados hallados en la tabla anterior podemos observar la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), es 0.111%, este valor es inferior a 3.0 %.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo con el analito preparado, se usó la prueba de t de student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

**Número de muestras n=9**

**Porcentaje de Recuperación Media: Promedio %= 100.01%**

**Desviación estándar = 0.111**

**Coefficiente de variación o DRS = 0.111 %**

**Student para el conjunto de datos:**

Fórmula para hallar el valor del "t" experimental:

$$t_{\text{exp}} = \frac{100 - R/\sqrt{n}}{\text{RSD}}$$

$$T_{\text{exp}} = 0.270$$

T tabla = 2.306 (n-1 = 8; a 95 % de nivel de confianza)

$$0.270 < 2.306$$

**Análisis e interpretación de resultados:** En la tabla N° 58 se muestran los resultados para el analito D-Pantenol, el porcentaje de recuperación es de 100.01 %, teniendo como especificación de 90% a 150%, el valor de la desviación estándar relativa es de 0.111 %, se tiene como parámetro DSR% menor a 2%. La prueba de t de student confirma que los valores de cantidad media de analito añadido y porcentaje recuperado no son estadísticamente diferentes, se tiene  $t_{\text{exp}} = 0.270$  menor que  $t_{\text{tabla}} = 2.306$  con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Concluyendo que el método analítico para D-Pantenol tiene la exactitud.

**Discusión:** Según las investigaciones: **Dávila, C; Santillán, R**, en el año 2021, En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo cargado a distintos niveles. (AEFI 2001) Para formas farmacéuticas se determinó un porcentaje de recuperación de 97% - 103% de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la Tabla 8-3, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se encuentra dentro del rango de aceptación. Con estos resultados respaldamos nuestro trabajo.

#### 4.3. RANGO:

Tabla N.°59. Rango del método de nicotinamida, piridoxina clorhidrato y riboflavina.

Parámetros	Rango	Resultado
Linealidad del Sistema	80% a 160%	Cumple
Linealidad del Método	80% a 160%	Cumple
Exactitud	80% a 160%	Cumple
Precisión – Repetibilidad	100%	Cumple
Precisión Intermedia	100%	Cumple
<b>Resultado</b>	80% a 160%	

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.°60. Rango del método de tiamina clorhidrato.

Parámetros	Rango	Resultado
Linealidad del Sistema	40% a 280%	Cumple
Linealidad del Método	40% a 280%	Cumple
Exactitud	40% a 280%	Cumple
Precisión – Repetibilidad	100%	Cumple
Precisión Intermedia	100%	Cumple
<b>Resultado</b>	40% a 280%	

Fuente: Elaboración propia

Tabla N.°61. Rango del método de D-Pantenol.

Parámetros	Rango	Resultado
Linealidad del Sistema	80% a 160%	Cumple
Linealidad del Método	80% a 160%	Cumple
Exactitud	80% a 160%	Cumple
Precisión – Repetibilidad	100%	Cumple
Precisión Intermedia	100%	Cumple
<b>Resultado</b>	80% a 160%	

Fuente: Elaboración propia

**Discusión:** Según el autor **Hernandis Belenguer V.** en el año **2022**. Los resultados de los parámetros de validación fueron excelentes, obteniendo un

rango en el valor de recuperación entre 89.66-96.92 %, se evalúa mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del principio activo a diferentes cantidades o concentraciones. Bajo este concepto nuestro trabajo queda respaldado con la tesis del autor.

#### **4.4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN:**

En la siguiente tabla veremos una compilación de datos de los resultados obtenidos de los parámetros de validación los cuales fueron trabajados según las recomendaciones de la farmacopea americana (USP) y de la ICH.

**Tabla N. 62:** Resumen de resultados obtenidos de los parámetros de validación de nicotinamida, según la USP y la ICH

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>1. APTITUD DEL SISTEMA</b> Platos teóricos Tiempo de retención (rt) Factor de asimetría Coeficiente de variación (DSR %)	N.º de platos teóricos > 1000 DSR < 1% Factor de asimetría < 2.0 DSR % < 2.0 %	3147.3 0.55% 1.4 1.36%
<b>2. SELECTIVIDAD</b>  <b>2.1. Interferencia del método</b>  <b>2.2. Degradación de la muestra forzada</b>	El analito no debe presentar interferencias en su determinación por el diluyente y los excipientes de la matriz del producto. Así como debe ser estable el analito en sus diferentes condiciones de estrés.	Conforme  Conforme
<b>3. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>  Ecuación de la recta	$y = b x + a$	$y = 397065365.165 x + 224536.572$
Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	Mayor o igual que 0,999  Máximo 2.0% T exp > t tabla - T exp < t tabla	0.99911  0.966% 86.928 > 2.160  0.331 < 2.650
<b>4. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b>  Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	$y = b x + a$ Mayor o igual que 0,999  Máximo 2.0% T exp > t tabla - T exp < t tabla	$Y=384527897.082 x+869.64$ 0.9993  0.079% 1136.632 > 2.160  0.017 < 2.650
<b>5. PRECISIÓN</b> <b>5.1. Precisión del sistema.</b> Coeficiente de variación de áreas (DSR%) Coeficiente de variación de rt (DSR%) <b>5.2. Repetibilidad de método.</b> Coeficiente de variación (DSR %) <b>5.3. Precisión intermedia</b> Coeficiente de variación (DSR %)	DRS % < 2.0 % DRS % < 1.0 % DRS % < 2.0 % DRS % < 2.0 %	1.283% 0.713% 1.101% 0.969%
<b>6. EXACTITUD DEL MÉTODO</b> Porcentaje de recuperación total (%) Prueba de "t" de student	98.0 % -102.0 % T exp < t tabla	99.95% 1.056 < 2.306
<b>7. RANGO</b> Linealidad Precisión Exactitud	80 % - 160 % 100% 80 % - 160 %	Conforme Conforme Conforme

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N.º63:** Resumen de resultados de los parámetros de validación de tiamina clorhidrato, según la USP y la ICH

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>1. APTITUD DEL SISTEMA</b>		
Platos teóricos	Nº de platos teóricos > 1000	66801.2
Tiempo de retención (rt)	DRS < 1%	0.110%
Factor de asimetría	Factor de asimetría < 2.0	1.4
Coficiente de variación (DSR %)	DSR % < 2.0 %	1.801%
<b>2. SELECTIVIDAD</b>		
<b>2.1. Interferencia del método</b>	No debe existir interferencias en la determinación del analito por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz.	Conforme
<b>2.2. Degradación de la muestra forzada.</b>		Conforme
<b>3. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ecuación de la recta	$y = b x + a$	$y = 2187961126.492 x - 227075.512$
Coficiente de correlación (r)	Mayor o igual que 0,999	0.99909
<b>Test de linealidad</b>	-	-
Coficiente de variación de los factores de respuesta.	Máximo 2.0%	1.478%
Test estadístico de la pendiente	t exp > t tabla	97.408 > 2.160
<b>Test de Proporcionalidad</b>	-	-
Test estadístico del intercepto "a"	T exp < t tabla	0.194 < 2.650
<b>4. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b>		
Ecuación de la recta	$y = b x + a$	$y = 2186402662.024 x + 2112558.022$
Coficiente de correlación (r)	Mayor o igual que 0,999	0.99918
<b>Test de linealidad</b>	-	-
Coficiente de variación de los factores de respuesta.	Máximo 2.0%	1.861%
Test estadístico de la pendiente	T exp > t tabla	83.879 > 2.160
<b>Test de Proporcionalidad</b>	-	-
Test estadístico del intercepto "a"	T exp < t tabla	1.549 < 2.650
<b>5. PRECISIÓN</b>		
<b>5.1. Precisión del sistema.</b>		
Coficiente de variación de áreas (DSR %)	DRS % < 2.0 %	0.706%
Coficiente de variación de rt (DSR %)	DRS % < 1.0 %	0.181%
<b>5.2. Repetibilidad de método.</b>		
Coficiente de variación (DSR %)	DRS % < 2.0 %	0.945%
<b>5.3. Precisión intermedia</b>		
Coficiente de variación (DSR%)	DRS % < 2.0 %	0.976%
<b>6. EXACTITUD DEL MÉTODO</b>		
Porcentaje de recuperación total (%)	98.0 % -102.0 %	99.11%
Prueba de "t" de student	T exp < t tabla	1.161 < 2.306
<b>7. RANGO</b>		
Linealidad	80 % - 160 %	Conforme
Precisión	100%	Conforme
Exactitud	80 % - 160 %	Conforme

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N.º64:** Resumen de resultados de los parámetros de validación de riboflavina, según la USP y la ICH

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>1. APTITUD DEL SISTEMA</b> Platos teóricos Tiempo de retención (rt) Factor de asimetría Coeficiente de variación (DSR %)	Nº de platos teóricos > 1000 DSR < 1% Factor de asimetría < 2.0 DSR % < 2.0 %	15083.4 0.489% 1.5 1.791%
<b>2. SELECTIVIDAD</b> <b>2.1. Interferencia del método</b>  <b>2.2. Degradación de la muestra forzada.</b>	No debe existir interferencias en la determinación del analito por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz.  Así como debe ser estable el analito en sus diferentes condiciones de estrés.	Conforme  Conforme
<b>3. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b> Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. (f) Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	$y = b x + a$ Mayor o igual que 0,999 - Máximo 2.0% T exp > t tabla - T exp < t tabla	$y = 6304105143.857 x + 2192587.804$ 0.99918  0.875% 101.291 > 2.160  1.752 < 2.650
<b>4. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b> Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	$y = b x + a$ Mayor o igual que 0,999 - Máximo 2.0% T exp > t tabla - T exp < t tabla	$Y=6481088180.036 x - 4003274.125$ 0.9992  1.303% 82.572 > 2.160  2.518 < 2.650
<b>5. PRECISIÓN</b> <b>5.1. Precisión del sistema.</b> Coeficiente de variación de áreas (DSR %) Coeficiente de variación de rt (DSR %) <b>5.2. Repetibilidad de método.</b> Coeficiente de variación (DSR %)  <b>5.3. Precisión intermedia</b> Coeficiente de variación (DSR%)	DRS % < 2.0 % DRS % < 1.0 % DRS % < 2.0 %  DRS % < 2.0 %	0.659% 0.504% 0.861%  0.959%
<b>6. EXACTITUD DEL MÉTODO</b> Porcentaje de recuperación total (%)  Prueba de "t" de student	98.0 % -102.0 %  T exp < t tabla	98.97%  1.850 < 2.306
<b>7. RANGO</b> Linealidad Precisión Exactitud	80 % - 160 % 100% 80 % - 160 %	Conforme Conforme Conforme

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N.º65:** Resumen de resultados de los parámetros de validación de Piridoxina clorhidrato, según la USP y la ICH

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>1. APTITUD DEL SISTEMA</b>		
Platos teóricos	N.º de platos teóricos > 1000	25460.4
Tiempo de retención (rt)	DSR < 1%	0.35%
Factor de asimetría	Factor de asimetría < 2.0	1.3
Coefficiente de variación (DSR %)	DSR % < 2.0 %	1.85%
<b>2. SELECTIVIDAD</b>		
<b>2.1. Interferencia del método</b>	No debe existir interferencias en la determinación del analito por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz.	Conforme
<b>2.2. Degradación de la muestra forzada.</b>	Así como debe ser estable el analito en sus diferentes condiciones de estrés.	Conforme
<b>3. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ecuación de la recta	$y = b x + a$	$Y=4619087588.67x-191400.087$
Coefficiente de correlación (r)	Mayor o igual que 0,999	0.99942
<b>Test de linealidad</b>	-	
Coefficiente de variación de los factores de respuesta.	Máximo 2.0%	0.440%
Test estadístico de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$	$182.529 > 2.160$
<b>Test de Proporcionalidad</b>	-	
Test estadístico del intercepto "a"	$T_{exp} < t_{tabla}$	$0.505 < 2.650$
<b>4. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b>		
Ecuación de la recta	$y = b x + a$	$Y=4492416449.602 x -1398658.147$
Coefficiente de correlación (r)	Mayor o igual que 0,999	0.99939
<b>Test de linealidad</b>	-	
Coefficiente de variación de los factores de respuesta.	Máximo 2.0%	0.791%
Test estadístico de la pendiente	$T_{exp} > t_{tabla}$	$120.172 > 2.160$
<b>Test de Proporcionalidad</b>	-	
Test estadístico del intercepto "a"	$T_{exp} < t_{tabla}$	$2.455 < 2.650$
<b>5. PRECISIÓN</b>		
<b>5.1. Precisión del sistema.</b>		
Coefficiente de variación de áreas (DSR %)	DRS % < 2.0 %	0.926%
Coefficiente de variación de rt (DSR %)	DRS % < 1.0 %	0.359%
<b>5.2. Repetibilidad de método.</b>		
Coefficiente de variación (DSR %)	DRS % < 2.0 %	0.806%
<b>5.3. Precisión intermedia</b>		
Coefficiente de variación (DSR%)	DRS % < 2.0 %	0.839%
<b>6. EXACTITUD DEL MÉTODO</b>		
Porcentaje de recuperación total (%)	98.0 % -102.0 %	100.02%
Prueba de "t" de student	$T_{exp} < t_{tabla}$	$0.064 < 2.306$
<b>7. RANGO</b>		
Linealidad	80 % - 160 %	Conforme
Precisión	100%	Conforme
Exactitud	80 % - 160 %	Conforme

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N.º66:** Resumen de resultados de los parámetros de validación de D-pantenol, según la USP y la ICH

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<b>1. APTITUD DEL SISTEMA</b> Platos teóricos Tiempo de retención (rt) Factor de asimetría Coeficiente de variación (DSR %)	N.º de platos teóricos > 1000 DRS < 1% Factor de asimetría < 2.0 DSR % < 2.0 %	3044.6 0.190% 1.1 1.076%
<b>2. SELECTIVIDAD</b> <b>2.1. Interferencia del método</b>  <b>2.2. Degradación de la muestra forzada.</b>	No debe existir interferencias en la determinación del analito por diluyente, compuestos de degradación y los excipientes de la matriz.  Así como debe ser estable el analito en sus diferentes condiciones de estrés.	Conforme  Conforme
<b>3. LINEALIDAD DEL SISTEMA</b> Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	$y = b x + a$ Mayor o igual que 0,999 - Máximo 2.0% $t_{exp} > t_{tabla}$ - $T_{exp} < t_{tabla}$	$Y = 764263217.815 x - 239007.254$ 0.99931  0.909% $94.364 > 2.160$  $0.394 < 2.650$
<b>4. LINEALIDAD DEL MÉTODO</b> Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) <b>Test de linealidad</b> Coeficiente de variación de los factores de respuesta. Test estadístico de la pendiente <b>Test de Proporcionalidad</b> Test estadístico del intercepto "a"	$y = b x + a$ Mayor o igual que 0,999 - Máximo 2.0% $T_{exp} > t_{tabla}$ - $T_{exp} < t_{tabla}$	$Y = 756457031.6 x - 200616.64389$ 0.9995  0.544% $200.245 > 2.160$  $0.715 < 2.650$
<b>5. PRECISIÓN</b> <b>5.1. Precisión del sistema.</b> Coeficiente de variación de áreas (DSR %) Coeficiente de variación de rt (DSR %) <b>5.2. Repetibilidad de método.</b> Coeficiente de variación (DSR %)  <b>5.3. Precisión intermedia</b> Coeficiente de variación (DSR %)	DRS % < 2.0 % DRS % < 1.0 %  DRS % < 2.0 %  DRS % < 2.0 %	1.760% 0.310%  0.709%  0.604%
<b>6. EXACTITUD DEL MÉTODO</b> Porcentaje de recuperación total (%)  Prueba de "t" de student	98.0 % -102.0 %  $T_{exp} < t_{tabla}$	100.01%  $0.270 < 2.306$
<b>7. RANGO</b> Linealidad Precisión  Exactitud	80 % - 160 %  100%  80 % - 160 %	Conforme  Conforme Conforme

Fuente: Elaboración propia

## CONCLUSIONES

1. Las técnicas analíticas que se desarrollaron para la identificación y cuantificación simultánea de nicotinamida, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato, riboflavina y d-pantenol en un jarabe multivitamínico cumplieron con los parámetros de validación establecidos. Los resultados evidenciaron que el método cumple con aptitud del sistema, presentando un número de platos teóricos mayor a 1000 y una desviación estándar relativa DSR del tiempo de retención menor 1%. Es selectivo ya que no evidenciaron interferencias cromatográficas por excipientes, diluyente, productos de degradación sometidos a estrés y placebo, en cuanto a la linealidad se cumplió la prueba de T ( $T_{exp} > T_{tabla 2.160}$ ), se obtuvo un coeficiente de correlación  $\geq 0.999$ . El método fue preciso con el coeficiente de variación (CV) menor a 2.0 %. Finalmente es exacto por el porcentaje de recuperación de cada activo, Por lo expuesto, se concluye que las técnicas analíticas se validaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la identificación y cuantificación de los principios activos: Nicotinamida, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato y Riboflavina y para principio activo de d-pantenol en un jarabe multivitamínico.
2. Con los resultados obtenidos se elaboró el protocolo de validación para las dos técnicas analíticas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la que se establece evidencia documentada con un alto grado de seguridad.

### **Anexo 26.**

3. Los resultados que mostró el estudio en cuanto a selectividad, linealidad, precisión, y exactitud evidenciaron que la técnica analítica para identificar y cuantificar las vitaminas de Nicotinamida, Riboflavina, Tiamina clorhidrato y Piridoxina clorhidrato, en un solo método analítico, y la técnica analítica para D-Pantenol, cumplen con los requerimientos oficiales y pueden emplearse en el laboratorio para el análisis del jarabe multivitamínico.
4. La evidencia documentada de cada proceso de validación de las técnicas analíticas, con resultados confiables, sustentadas estadísticamente demuestran la reproducibilidad y confiabilidad de la técnica analítica de cuantificación e identificación para cuatro vitaminas: Tiamina Clorhidrato,

Riboflavina, Nicotinamida, Piridoxina Clorhidrato y la técnica analítica para D-Pantenol.

## **SUGERENCIAS**

### **A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL FARMACIA Y BIOQUIMICA**

- Plantear un enfoque educativo que conecte directamente con la industria farmacéutica, permitiendo poner en práctica lo aprendido durante la formación profesional.
- Establecer convenios con industrias farmacéuticas para realizar prácticas pre profesionales.
- Generar convenios con universidades nacionales e internacionales para intercambios de estudio.
- Fomentar la redacción de protocolos, procedimientos estándares.

### **A LOS ALUMNOS DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

- Elaborar proyectos de investigación relacionados a la industria farmacéutica.
- Consolidar el aprendizaje mediante la investigación, poner en práctica los conocimientos adquiridos.
- Realizar capacitaciones en estadística.

## BIBLIOGRAFIA

1. Choque Cerón L J. Validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), para la cuantificación de Clorhidrato de Clorhexidina + Benzocaína + Enoxolona en comprimidos orales. [Tesis pregrado]. Arequipa Perú. Universidad Católica De Santa María. 2017. [Citado: 20 julio 2023]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7224>
2. Dirección General de Medicamentos, insumos y drogas (Digemid) MINSA. (2018). Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Validación. Agosto 2018: p 156-157. [Citado: 20 julio 2023]. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/197773/Decreto-Supremo-021-2018-SA.PDF>
3. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea De Los Estados Unidos De América (USP41). <1225> Validación De Procedimientos Farmacopeicos. Trigésima Sexta Edición, Estados Unidos de América, p 8235.
4. ICH Q2A (R1). Harmonised Tripartita Guideline, "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology". November 2010. [citado:20 julio del 2018]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
5. Proyecto de Ley 5311/2020-CR: Proyecto de Ley de regulación de precios de medicamentos con estándares internacionales de la OCDE, y de países con economía social de mercado y regulación transitoria sobre servicios de salud privados. [internet]. Lima Perú. Diario oficial el peruano. Mayo 2020. [Citado: 20 julio 2024]. Disponible en: [https://www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/2016\\_2021/Proyectos\\_de\\_Ley\\_y\\_de\\_Resoluciones\\_Legislativas/PL05311-20200521.pdf](https://www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/2016_2021/Proyectos_de_Ley_y_de_Resoluciones_Legislativas/PL05311-20200521.pdf)
6. Ley N° 29459, Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios. [internet]. Lima Perú. Diario oficial el peruano. Noviembre 2009. [Citado: 20 julio 2024]. Disponible <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-los-productos-farmaceuticos-dispositivos-medicos-y-p-ley-n-29459-427971-1/>

7. NTS N° 47-MINSA/2019/DIGEMID, norma técnica de salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias. [internet]. Lima Perú. Diario oficial el peruano. Marzo 2019. [Citado: 20 julio 2024]. Disponible <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/norma-tecnica-de-salud-que-regula-la-informacion-minima-que-anexo-rm-no-234-2019minsa-1753107-1/>
8. Garcia de Marina Bayo A, Yusa Marco DJ. HPLC instrumental. España: Editorial universidad politécnica de valencia. [Internet]. 2016. [Citado 20 julio 2023]; Disponible en: [https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/0fc53ce9-a267-4235-85bb-31be388412c0/TOC\\_0360\\_11\\_01.pdf?quest=true](https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/0fc53ce9-a267-4235-85bb-31be388412c0/TOC_0360_11_01.pdf?quest=true)
9. Palacios Sanchez L. Breve historia de las vitaminas. Revista médica sanitas. [Internet]. 2013. [Citado 20 julio 2023]; 16(3): 142-145. Disponible en: [file:///C:/Users/pmend/Downloads/310-Texto%20del%20art%C3%ADculo-538-1-10-20210430%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/pmend/Downloads/310-Texto%20del%20art%C3%ADculo-538-1-10-20210430%20(1).pdf)
10. Navalesi D, García N, Saint Martin E, Llauro, V, Rodríguez Y. “Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para identificación y cuantificación de ácido valproico en soluciones orales”. [Tesis]. Argentina: Instituto Nacional de medicamentos, administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica Buenos Aires; 2024 [Citado: 2025 diciembre 18]. Disponible en: <https://doi.org/10.62035/rca.5.66>
11. Hernandis Belenguer V. Validación De Métodos Analíticos Por Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC) Para La Cuantificación De Cefuroxima, Delafloxacino Y Tilvalosina En Muestras Biológicas. [Tesis de Maestría]. España: Universidad De Murcia Escuela Internacional De Doctorado; 2022. [Citado: 2023 mayo 31]. Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/122944/1/Tesis%20Doctoral%200%20Ver%c3%b3nica%20Hernandis%20Belenguer%20%28sin%20art%c3%adculos%29.pdf>
12. Dávila C, Santillán R, Pazmiño C. Desarrollo y Validación de un Método Analítico por HPLC para la Determinación de Vitaminas Hidrosolubles (Tiamina, Riboflavina, Nicotinamida, Piridoxina Y Ácido Ascórbico) en un Jarabe, En La Empresa Neofármaco Cía. Ltda. [Tesis de Licenciatura]. Ecuador: Laboratorio

- Neofármaco. Avda Atahualpa y Noboa y Caamaño. 2021. [Citado: 2023 mayo 28]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8084288>.
13. Bautista Mamani, FF. Validación Del Método Analítico Para La Cuantificación De Vitaminas (Tiamina B1, Piridoxina B6, Nicotinamida Y Riboflavina B2) Por Cromatografía Líquida De Alta Eficacia (HPLC) En Suero Vitadex B – Solución de Gran Volumen. [Tesis de Licenciatura]. La Paz Bolivia: Universidad Mayor De San Andrés Facultad De Tecnología Química Industrial. 2019. [Citado: 2023 mayo 31]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/2928>
14. Rojas Castillo, M. “Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para evaluar perfiles de disolución de Losartán Potásico 50mg tabletas”. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de Trujillo Facultad de Farmacia y bioquímica; 2024. [Citado: 2025 diciembre 2021]. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/server/api/core/bitstreams/1392bb73-a4af-4f10-a022-46bd020eef9a/content>
15. Grimaldo Medina, EL, Maravi Armas J. Desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación de fexofenadina 30mg/5ml suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). [Tesis de licenciatura]. Perú. Universidad privada Norbert Wiener facultad de farmacia y bioquímica. 2021, [Citado: 2023 mayo 31]. Disponible en: [https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/5206/T061\\_10359617\\_72738989\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/5206/T061_10359617_72738989_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
16. Quispe Escalante R. Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1% gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) [Tesis]. Perú. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga escuela profesional de Farmacia y bioquímica. 2023 [Citado: 2025 diciembre 21]. Disponible en: <https://repositorio.unsch.edu.pe/items/29caf852-a853-4660-8e12-ade081894e74>
17. Bermudo huaraca, J. Validación de técnica analítica por espectrofotometría UV-Visible para la determinación cuantitativa de glutaraldehído al 2% como dispositivo médico. [Tesis]. Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2020. [Citado: 2025 diciembre 21]. Disponible en: <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/c8cca23d-29e6-40c8-986a-9e99f142881d/content>

18. Camones Vargas, FA. Vidal Sánchez, K Validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5ml en jarabe. [Tesis de licenciatura]. Lima-Perú. Universidad María Auxiliadora. 2021. [Citado: 2025 diciembre 21]. Disponible en: <file:///C:/Users/pmend/Downloads/TESIS%20CAMONES-VIDAL.pdf>
19. Purilla de la Cruz A. Validación de método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)". [Tesis de licenciatura]. Ica-Perú. San Luis Gonzaga. 2023. [Citado: 2025 diciembre 21]. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/items/aae6ce59-2c62-4e0d-9236-ebcebb004896>
20. Ríos Zúñiga, AZ. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de capa fina para la identificación y cuantificación de naproxeno sódico en tabletas expendidas en el Perú. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2018.
21. Palomino Huarhua P, Quispe Huahuaccapa R. Diseño y desarrollo de una formulación de tabletas recubiertas de naproxeno sódico 275 mg + paracetamol 300 mg y su evaluación fisicoquímica mediante una metodología analítica. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2016.
22. Lechuga Noa VE, Quehwarucho Acuña J. Determinación y cuantificación De 3.4 Benzopireno Por HPLC y grado de alteración en aceites y mantecas comestibles según el tiempo de reutilización en la fritura de chicharronerías y pollerías del centro histórico del Cusco. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2015.
23. Mamani Cruz, FM. Validación de la técnica analítica para la cuantificación y disolución de fenilefrina clorhidrato 5 mg, clorfenamina maleato 2 mg, dextrometorfano bromhidrato 15 mg y paracetamol 500mg en tabletas

- recubiertas por el método de cromatografía líquida. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2013.
24. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea De Los Estados Unidos De América (USP41). <1225> Validación De Procedimientos Farmacopeicos. Trigésima Sexta Edición, Estados Unidos de América, p 8236 - 8237.
  25. FDA U.S. Food and Drug Administration. Guideline on General Principles of Process Validation. [Internet]. enero 2011 [Citado: 2018 julio 18]. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Process-Validation--General-Principles-and-Practices.pdf>
  26. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. [Internet]. AEFI - Sección Catalana. Barcelona; 2001 [Citado: 2018 julio 21]. p. 57-85. Disponible en: [http://www.aefi.org/detalle-publicacion.asp?id\\_publicacion=78](http://www.aefi.org/detalle-publicacion.asp?id_publicacion=78)
  27. Digemid MINSA. Manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos. Validación. Agosto 2018: p 162-22. Disponible en: <https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2018/DS-021-2018.pdf>
  28. Supplementary guidelines on good manufacturing practices: Validation. [Internet]. World Health Organization Geneva. Who technical report series, N°: 937. 2006. [Citado: 2018 julio 18]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20108en/s20108en.pdf>
  29. Norma internacional ISO/IEC 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Segunda edición 2015. [citado: 2018 julio 21]. Disponible en: [http://www.medicinalaboraldevenezuela.com.ve/archivo/otras-normas/iso\\_17025\\_es.pdf](http://www.medicinalaboraldevenezuela.com.ve/archivo/otras-normas/iso_17025_es.pdf)
  30. Instituto de salud pública. Guía técnica para la realización de la validación de métodos de ensayo, [internet]. Resolución N.º 201 Santiago-chile, 2015. [Citado: 2018 julio 21]. Disponible en: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n\\_exenta\\_201\\_2015.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n_exenta_201_2015.pdf)

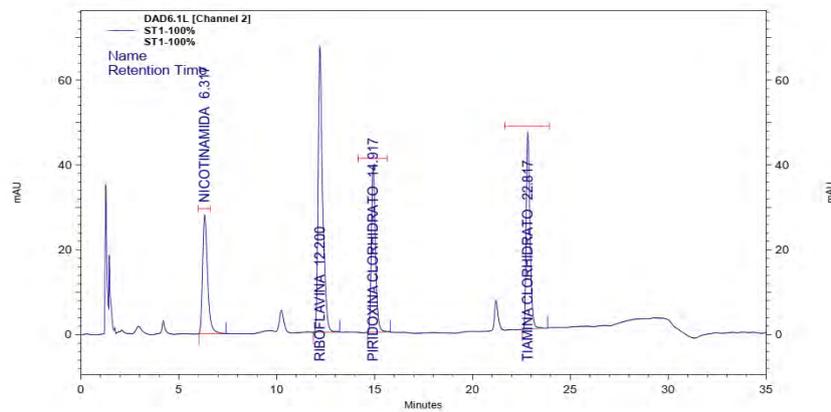
31. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos [Internet]. AEFI - Sección Catalana. Barcelona; 2001 [Citado: 2018 julio 21]. p. 57-85. Disponible en: [https://www.academia.edu/10365264/Validacion de Metodos Analiticos Asociacion Espanola de Farmaceuticos de la Industria](https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Aso_ciacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria)
32. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. [internet]. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). July 2015. [Citado: 2018 julio 22]. p.5. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>
33. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea De Los Estados Unidos De América (USP41). Cromatografía <621>. Trigésima Sexta Edición, Estados Unidos de América, p 546.
34. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea De Los Estados Unidos De América (USP41). Cromatografía <621>. Trigésima Sexta Edición, Estados Unidos de América, p 551.
35. Latham Michael C. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Universidad de Cornell Ithaca, Nueva York, Estados Unidos. [Internet]. [Citado: 2018 agosto 13]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0f.htm#topofpage>
36. Carbajal Azcona. A. Manual de nutrición y dietética. [Internet] Facultad de Farmacia. Universidad Complutense Madrid 2013. [Citado: 2018 julio 25]. Disponible en: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/manual-de-nutricion>.
37. Peñafiel Camacho LS. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de amoxicilina-ácido clavulánico en polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2017.
38. Cárdenas Luna JM. Referencia al Proyecto de Ley 4542/2022-CR. [Internet] Sociedad del comercio exterior del Perú - COMEXPERU. 2023. [Citado: 2024 noviembre 14]. Disponible en: <https://www.comexperu.org.pe/upload/articles/proyectos-de->

ley/Carta Salud Regulacion de precios medicamentos May2023.pdf#:~:tex  
t=%20Per%C3%BA%20en%202020%2C%202021%20y%20lo,econ%C3%B  
3micos%20de%20Lationam%C3%A9rica%20y%20los%20medicamentos%20i  
nnovadores.

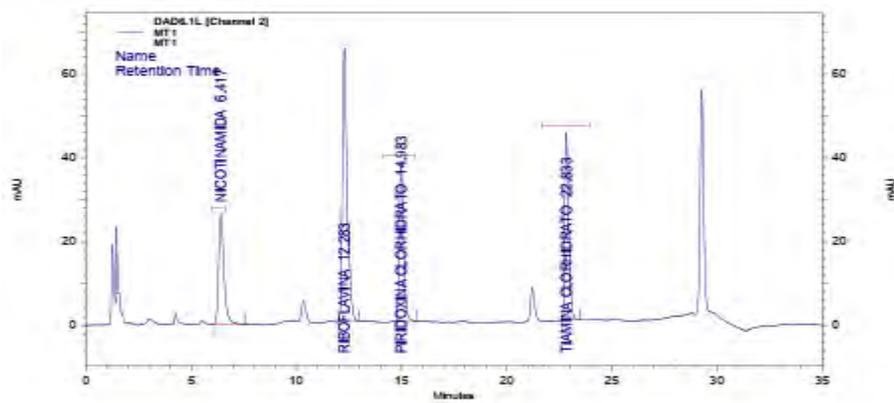
39. Guevara Alban GP, Verdesoto Arguello AE, Castro Molina NE. Metodologías de Investigación Educativa (Descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación). Recimundo. 2020; 4(3). 163-173. [Citado: 2024 noviembre 20]. Disponible en: <http://recimundo.com/index.php/es/article/view/860>
40. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación [libro en línea]. Primera edición. Colombia.1991. [Citado: 2024 noviembre 20]. Disponible en: [https://www.uv.mx/personal/cbustamante/files/2011/06/metodologia-de-la-investigaci%C3%83%C2%B3n\\_sampieri.pdf](https://www.uv.mx/personal/cbustamante/files/2011/06/metodologia-de-la-investigaci%C3%83%C2%B3n_sampieri.pdf)
41. RD-N°027-2020-DIGEMID-DG-MINSA, resolución directoral “listado de productos galénicos”. [internet]. Lima Perú. Diario oficial el peruano. Mayo 2020. [Citado:13 junio 2025]. Disponible [https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Normatividad/2020/RD\\_027-2020-DIGEMID-DG-MINSA.pdf](https://www.digemid.minsa.gob.pe/Archivos/Normatividad/2020/RD_027-2020-DIGEMID-DG-MINSA.pdf).
42. DS-N.°016-2011-SA, Decreto Supremo Aprueba Reglamento para el Registro, Control Y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos Y Productos Sanitario. [internet]. Lima Perú. Diario oficial el peruano. Julio 2011. [Citado: 13 junio 2025]. Disponible [https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/272181/243290\\_16\\_DS\\_N\\_C2\\_B0\\_016-2011-SA.pdf20190110-18386-a4eggt.pdf?v=1656602611](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/272181/243290_16_DS_N_C2_B0_016-2011-SA.pdf20190110-18386-a4eggt.pdf?v=1656602611)

## ANEXOS

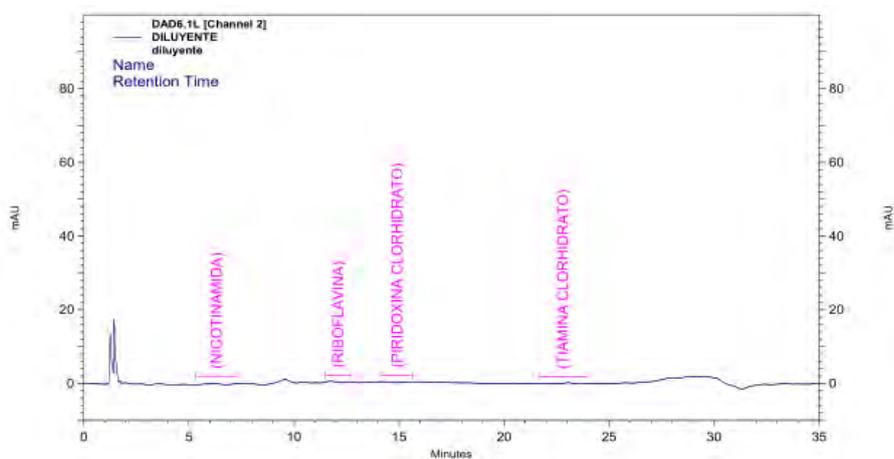
**ANEXO N°1:** Cromatograma obtenido del estándar de cuatro Vitaminas: “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina Clorhidrato, Tiamina Clorhidrato”.



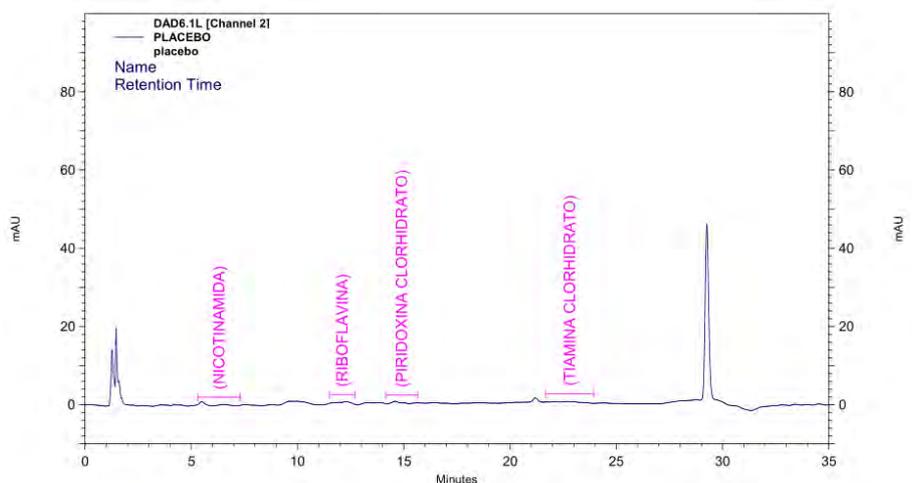
**ANEXO N°2:** Cromatograma obtenido de la muestra de cuatro vitaminas: “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato”.



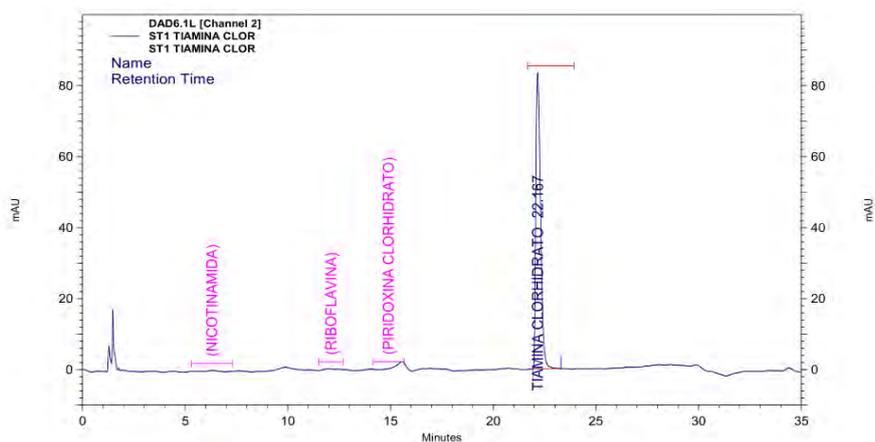
**ANEXO N°3:** cromatograma del diluyente no se observa picos en el tiempo de retención de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato”.



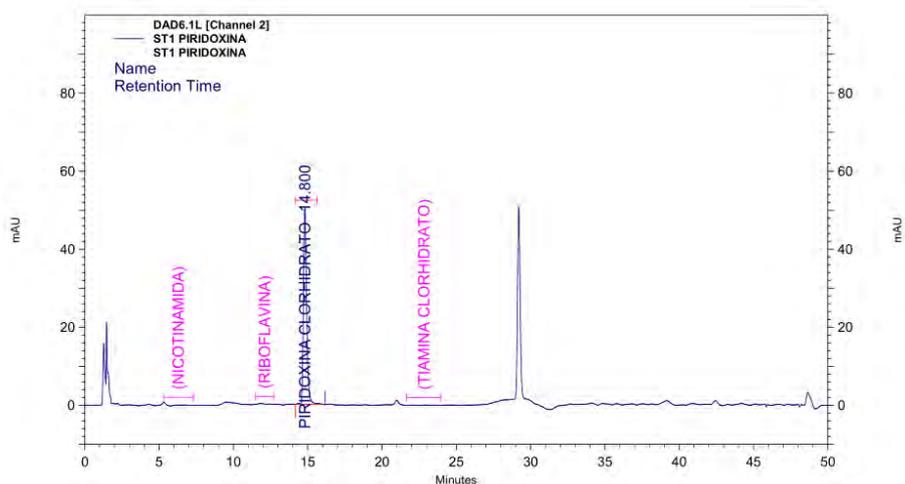
**ANEXO N°4:** Cromatograma del placebo no se observa picos en el tiempo de retención de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato”.



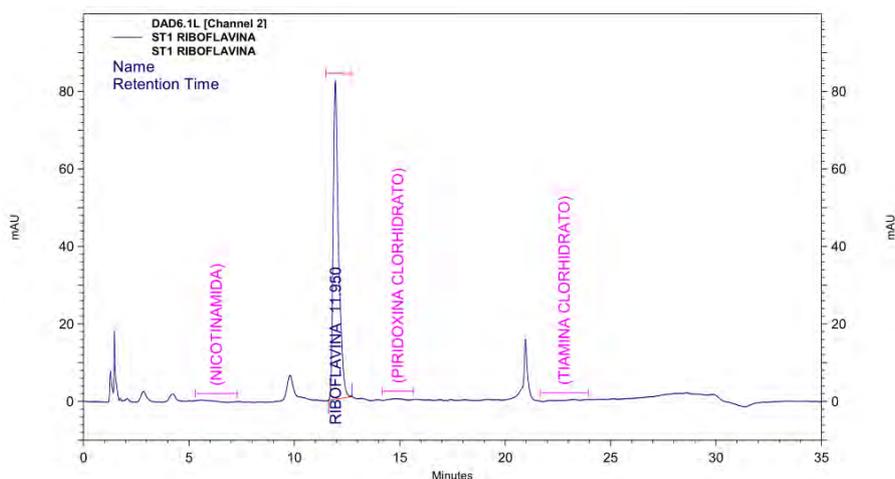
**ANEXO N°5:** Cromatograma de estándar de tiamina clorhidrato, presenta tiempo de retención de 22.167 min la muestra se analizó por HPLC en fase reversa.



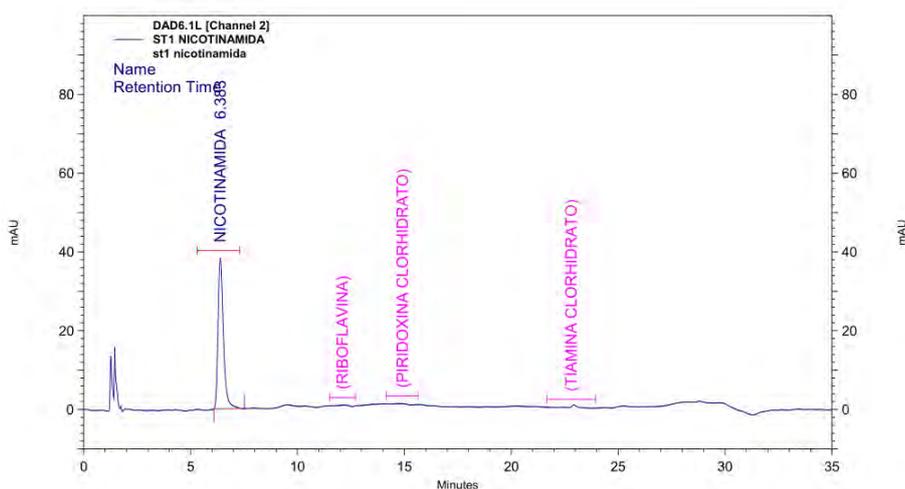
**ANEXO N°6:** Cromatograma de estándar de piridoxina clorhidrato, presenta tiempo de retención de 14.800 min la muestra se analizó por HPLC en fase reversa.



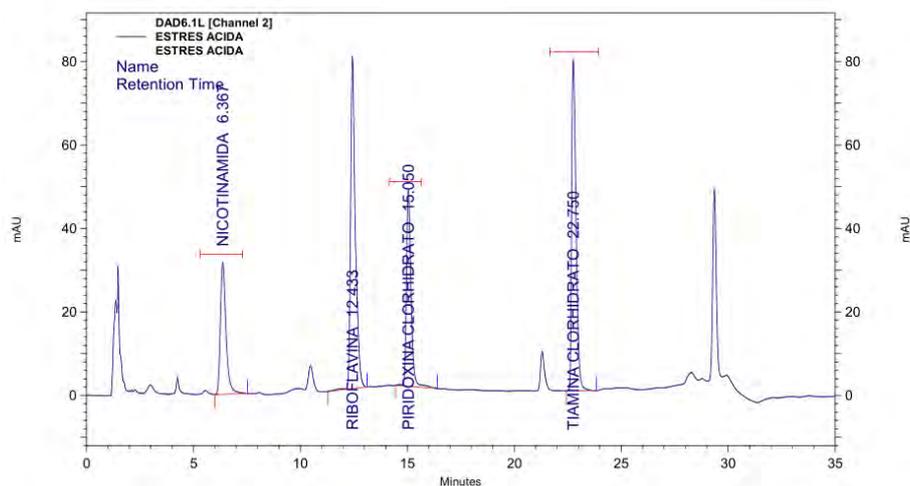
**ANEXO N°7:** Cromatograma de estándar de riboflavina, presenta tiempo de retención de 11.950 min la muestra se analizó por HPLC en fase reversa.



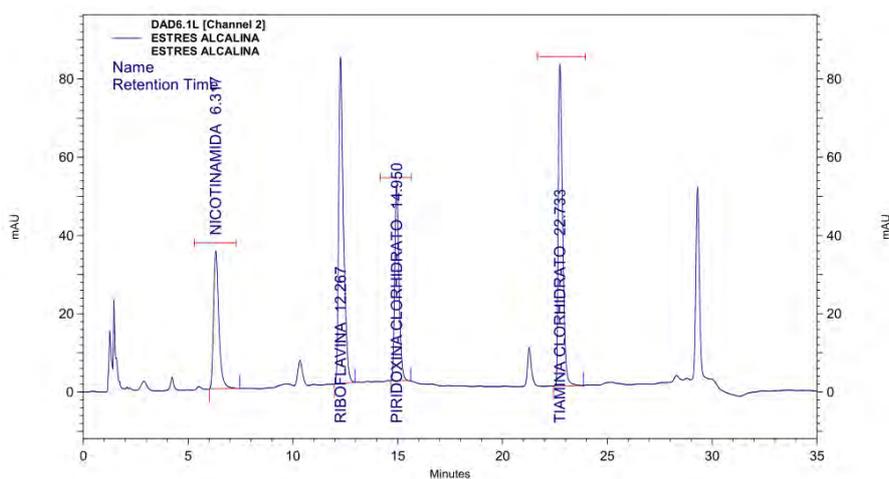
**ANEXO N°8:** Cromatograma de estándar de nicotinamida, presenta tiempo de retención de 6.385 min la muestra se analizó por HPLC en fase reversa.



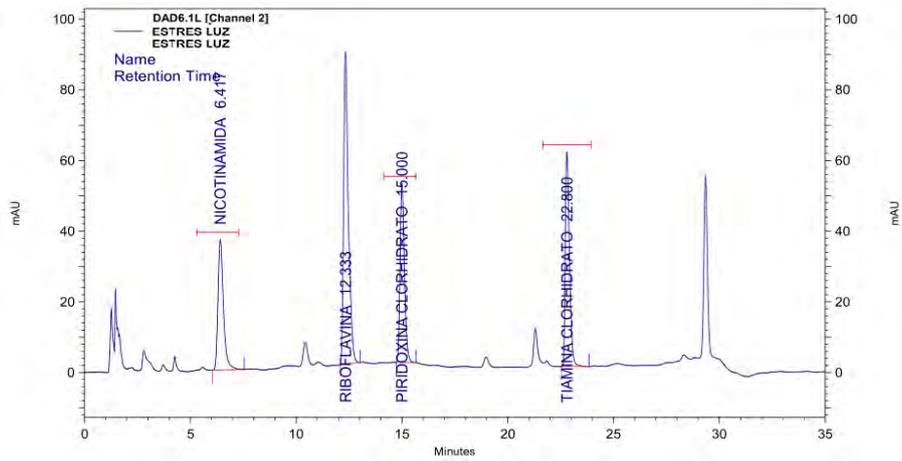
**ANEXO N°9:** Cromatograma obtenido de las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a estrés acida.



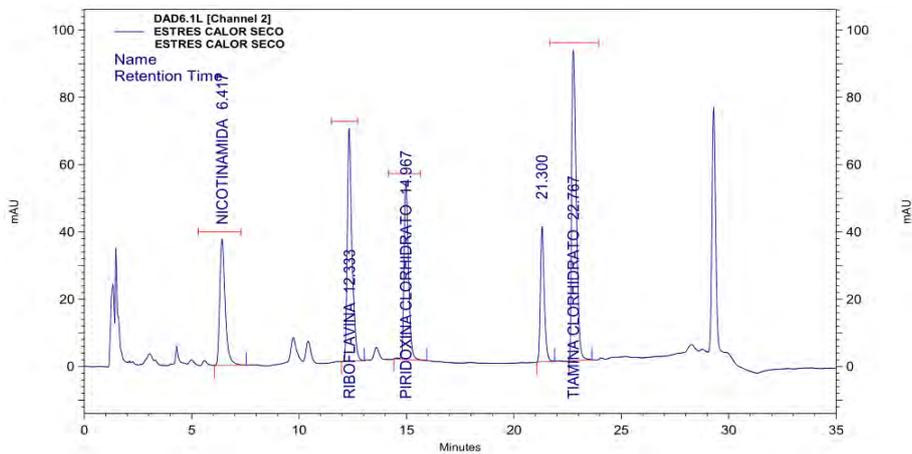
**ANEXO N°10:** Cromatograma obtenido de las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a estrés alcalina.



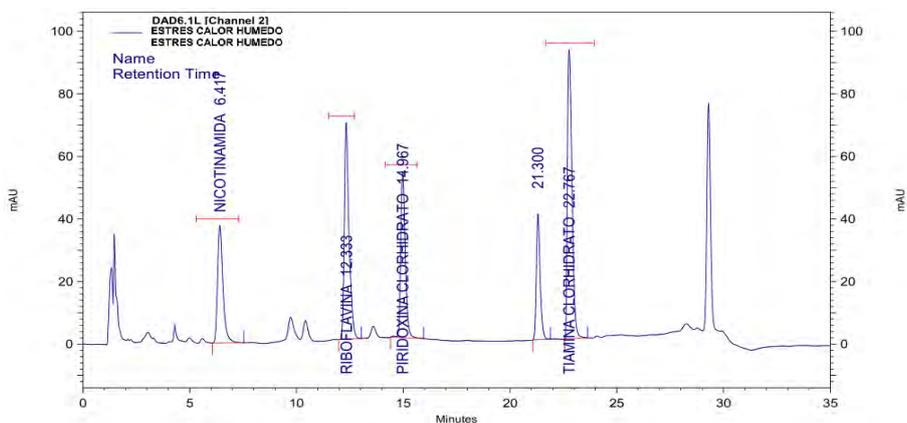
**ANEXO N°11:** Cromatograma obtenido de las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a fotólisis.



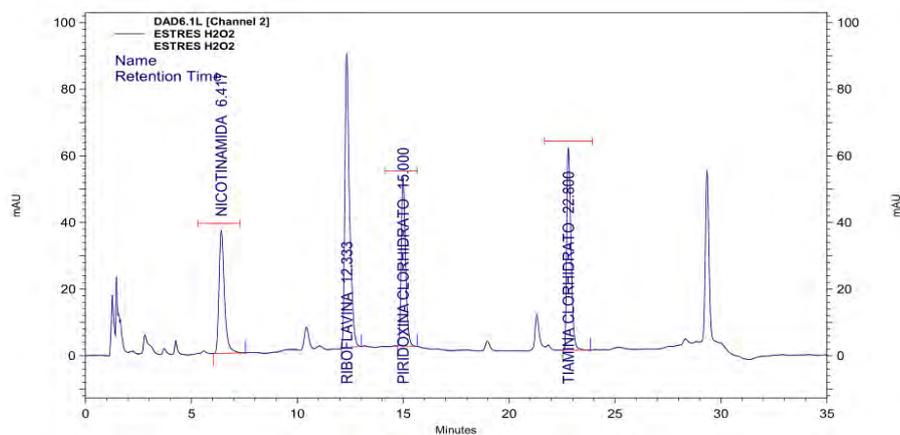
**ANEXO N°12:** Cromatograma obtenido de las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a estrés con calor seco.



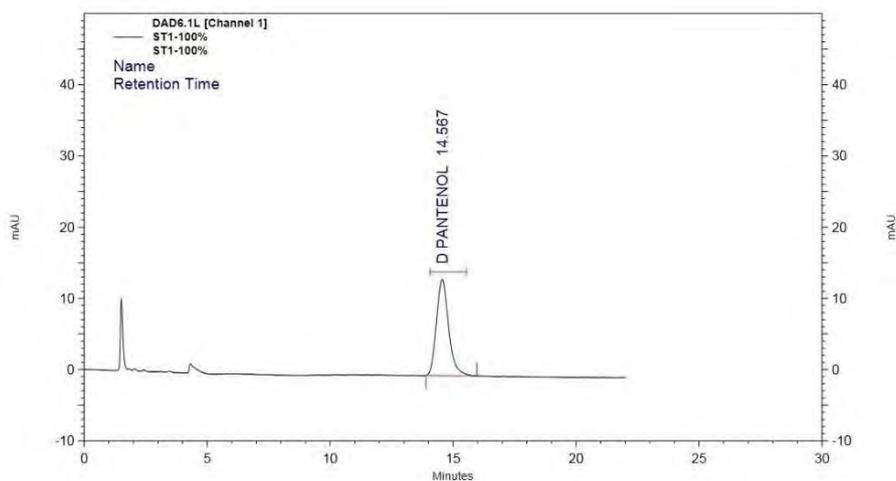
**ANEXO N°13:** Cromatograma obtenido para las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a estrés con calor humedo.



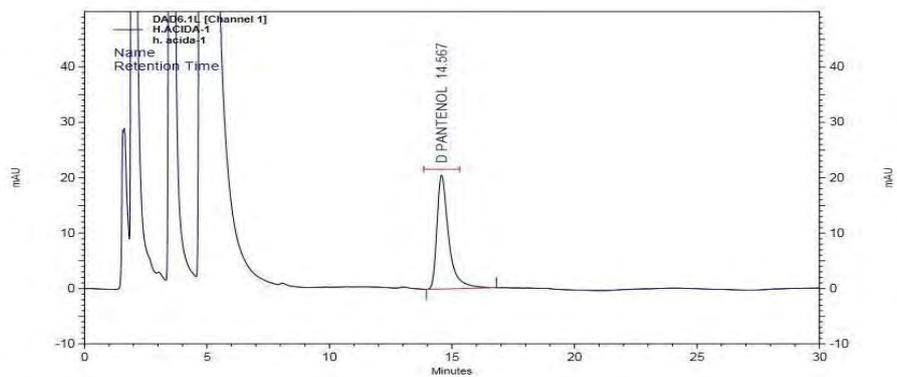
**ANEXO N°14:** Cromatograma obtenido de las vitaminas de “Nicotinamida, Riboflavina, Piridoxina clorhidrato, Tiamina clorhidrato” luego de que la muestra fue sometida a oxidación con peróxido de hidrogeno.



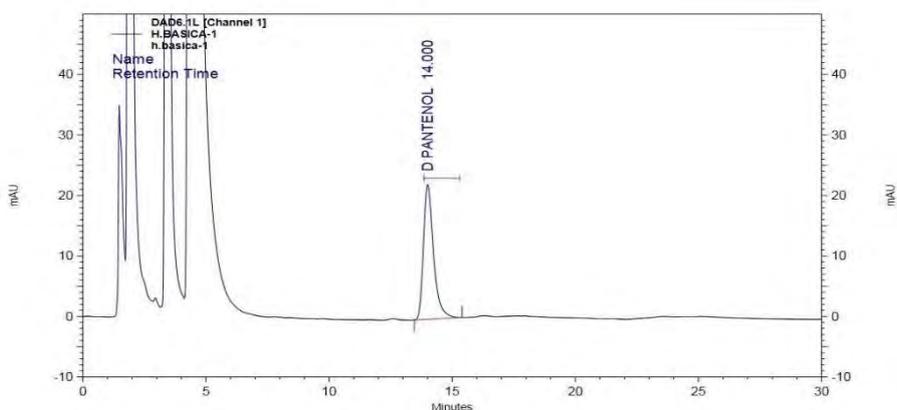
**ANEXO N°15:** Cromatograma obtenido del estándar de d-pantenol.



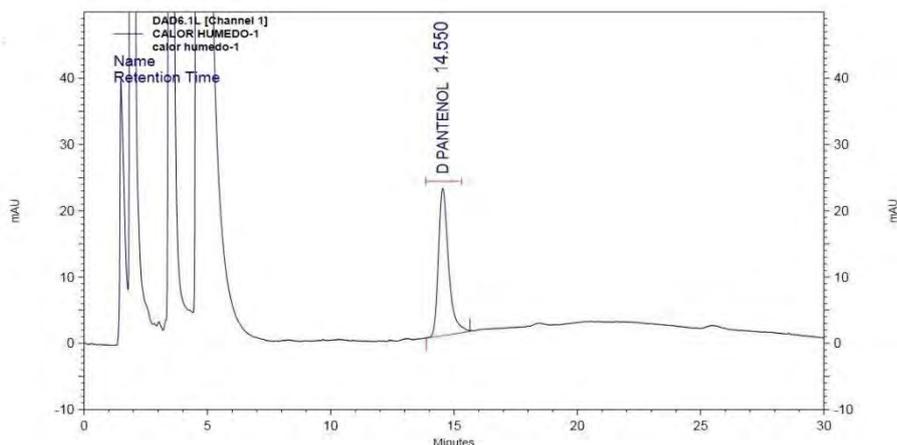
**ANEXO N°16:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a hidrolisis acida.



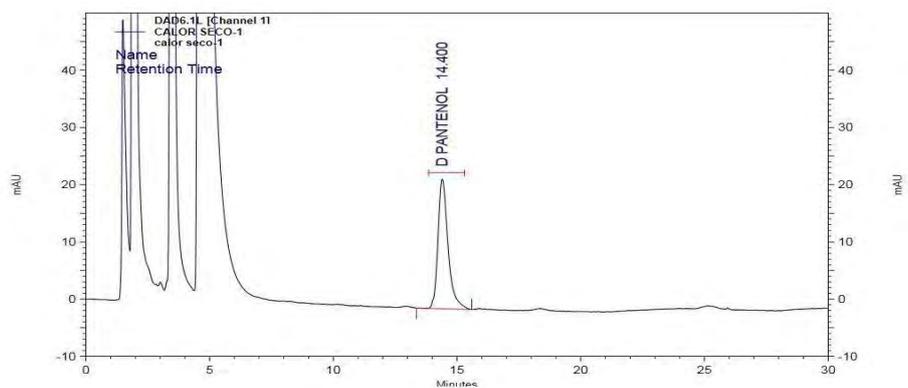
**ANEXO N°17:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a hidrolisis alcalina.



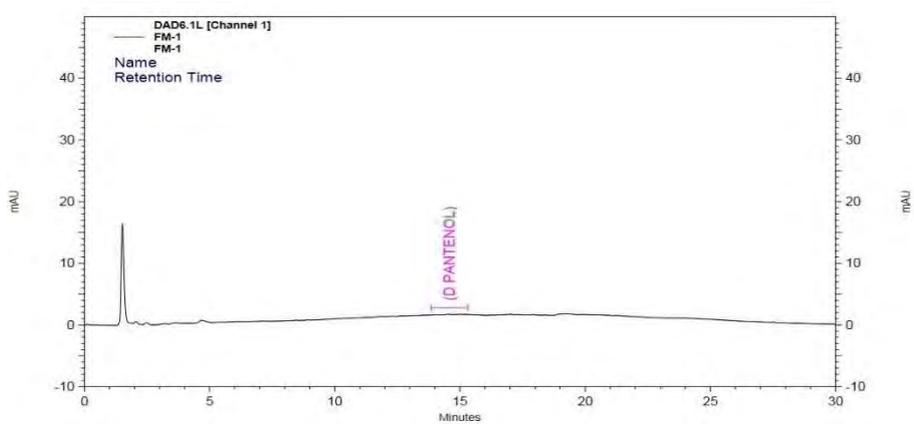
**ANEXO N°18:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a calor húmedo.



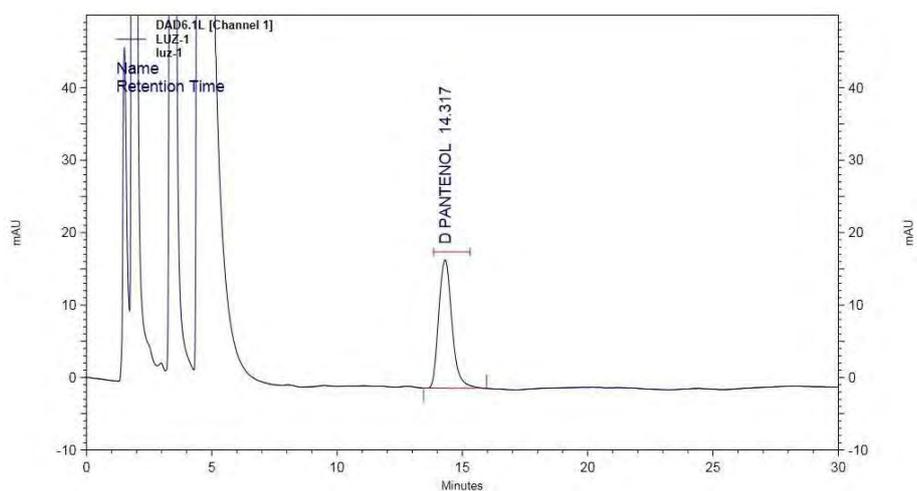
**ANEXO N°19:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a calor seco



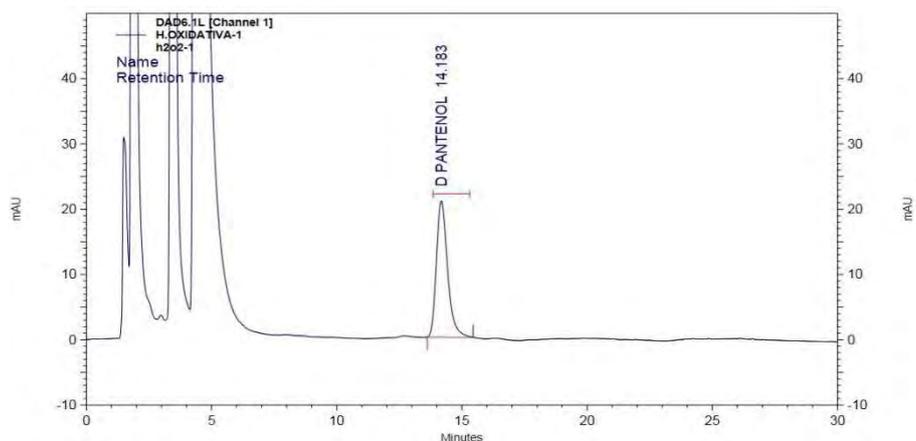
**ANEXO N°20:** Cromatograma de la fase móvil de la muestra de d-pantenol no se observa picos en el tiempo de retención de la vitamina d-pantenol.



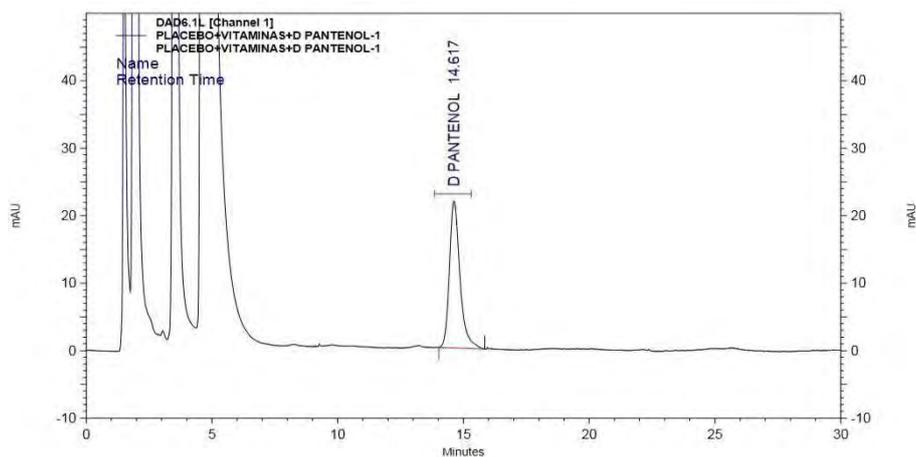
**ANEXO N°21:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a fotólisis.



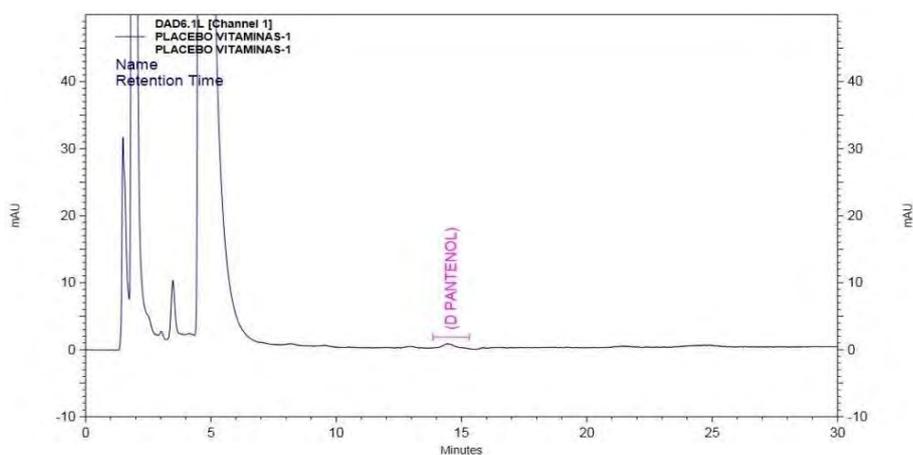
**ANEXO N°22:** Cromatograma obtenido de la vitamina de d-pantenol luego de que la muestra fue sometida a oxidación con peróxido de hidrogeno.



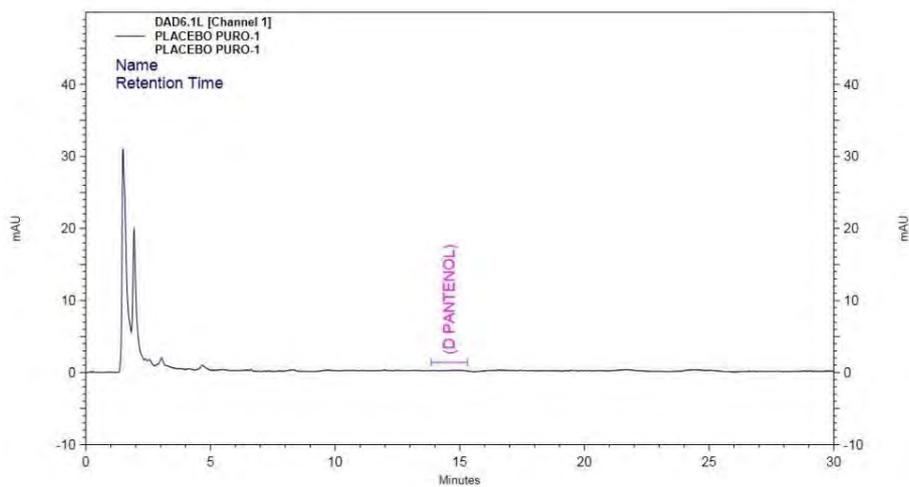
**ANEXO N°23:** Cromatograma del estándar de d-pantenol más placebo, la vitamina presenta tiempo de retención de 14.617.



**ANEXO N°24:** Cromatograma de placebo más cuatro vitaminas “nicotinamida, riboflavina, piridoxina clorhidrato, tiamina clorhidrato”, no se observa picos en el tiempo de retención del d-pantenol.



**ANEXO N°25:** Cromatograma de placebo puro, no se observa picos en el tiempo de retención del d-pantenol.



## ANEXO N°26: Protocolo de validación

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	<b>Versión: N/A</b> <b>Página: 282 de 298</b> <b>N° de anexos: III</b>
<b>TITULO:</b> <b>Jarabe multivitamínico (nicotianamina, piridoxina Clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato y D-pantenol)</b>		
<b>ÁREA:</b> <b>ASEGURAMIENTO</b>	<b>FECHA DE ELABORACIÓN: 2022-03-22</b>	<b>VPR-008</b>

## PROTOCOLO DE METODO ANALITICO

### ÍNDICE

1. OBJETIVOS
2. ALCANCE
3. RESPONSABILIDADES
4. ANÁLISIS POR CONTROL DE CALIDAD
5. METODOLOGÍA DE ANALISIS
6. REGISTRO DE DESVIACIONES
7. CONTROL DE CAMBIOS
8. ANEXOS

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	<b>Versión: N/A</b> <b>Página: 283 de 298</b> <b>Nº de anexos: III</b>
<b>TÍTULO:</b> <b>Jarabe multivitamínico (nicotianamina, piridoxina Clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato y D-pantenol)</b>		
<b>ÁREA:</b> <b>ASEGURAMIENTO</b>	<b>FECHA DE ELABORACIÓN: 2022-03-22</b>	<b>VPR-008</b>

## 1. OBJETIVO

Hay que asegurar que el proceso de análisis del vitagen NF jarabe, se realiza de acuerdo con la técnica analítica, y que los resultados obtenidos sean consistentes y reproducibles conforme a las especificaciones preestablecidas.

## 2. ALCANCE

El presente protocolo, se extenderá a verificar el correcto proceso de análisis, desde de producto granel o producto terminado.

## 3. RESPONSABILIDADES

- 3.1** Control de calidad; Realizar operaciones, registrar datos, adjuntar certificados y gráficos, realizar los análisis fisicoquímicos y proporcionar los resultados analíticos.
- 3.2** Aseguramiento de la calidad; Revisión del protocolo, realizar operaciones y coordinar en conjunto con producción y control de calidad.
- 3.3** Director Técnico; Aprobación del protocolo.

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	<b>Versión: N/A</b> <b>Página: 284 de 298</b> <b>Nº de anexos: III</b>
<b>TÍTULO:</b> <b>Jarabe multivitamínico (nicotianamina, piridoxina Clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato y D-pantenol)</b>		
<b>ÁREA:</b> <b>ASEGURAMIENTO</b>	<b>FECHA DE ELABORACIÓN: 2022-03-22</b>	<b>VPR-008</b>

#### 4. ANÁLISIS POR CONTROL DE CALIDAD

<b>Materiales, instrumentos y reactivos</b>	<b>Certificado de verificación</b>	<b>Vigencia</b>	<b>Código</b>
<b>Materiales</b>			
Matraz volumétrico de 100 ml	LV-0996-2022	Vigente	CCFI-004
Matraz volumétrico de 50 mL	LV-0996-2022	Vigente	CCFI-003
Pipeta volumétrica: 3,0 mL	LV-0895-2022	Vigente	CCPV-005
Pipeta volumétrica: 1,0 MI	002-2022-CV	Vigente	CCPV-002
Pipeta volumétrica: 2,0 MI	LV-0442-2022	Vigente	CCPV-003
<b>EQUIPOS</b>			
Balanza analítica	M0429 2022	Vigente	CCBA-001
Baño de ultrasonido	----	----	CCSR-001
Baño maría	-----	-----	CCBM-002
Termómetro líquido en vidrio	LT-0058-2022	Vigente	CCTM-002
Equipo Cromatógrafo HPLC marca Knauer Azura	Certificado de verificación operacional	Vigente	CCHP-002
<b>Reactivos</b>	<b>Lote</b>	<b>Fecha de Expira</b>	<b>Procedencia</b>
Agua Purificada	-----	-----	-----
N. Hexano sulfonato de sodio	0000171999	2024-02-28	J. BAKER
Ácido Acético Glacial	K48620863	2023-12-13	MERCK
Metanol HPLC	V39C04	2023-09-04	J.T BAKER
Acetonitrilo HPLC	Y03C51	2023-07-08	J.T BAKER
Ácido Clorhídrico QP	K49353217730	2023-07-31	MERCK
Hidróxido de Sodio Lentejas	0000131066	2023-07	MACRON
Peróxido de Hidrogeno al 30%	11730	2023-08	KARAL
Columna Cromatográfica ZORBAX SB-C18 150x 4,6 mm 5µm	USCM038249	-----	Agilent

## 5. METODOLOGIA DE ANALISIS

### Anexo 1

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	<b>Versión: N/A</b> <b>Página: 285 de 298</b> <b>N° de anexos: III</b>
<b>TITULO:</b> <b>Jarabe multivitamínico (nicotianamina, piridoxina Clorhidrato, riboflavina, tiamina clorhidrato y D-pantenol)</b>		
<b>ÁREA:</b> <b>ASEGURAMIENTO</b>	<b>FECHA DE ELABORACIÓN: 2022-03-22</b>	<b>VPR-008</b>

## 6. REGISTRO DE DESVIACIONES

DESCRIPCION	CRITICIDAD		ACCIONES CORRECTIVAS	FIRMA	FECHA
	SI	NO			

## 7. CONTROL DE CAMBIOS

Descripción	Criticidad		N.º ocurrencia	Decisión de recalificación	
	SI	NO		SI	NO
<b>Solicitado por</b> .....	<b>Aprobado por</b> .....		<b>Autorizado por</b> .....	<b>Fecha</b> .....	

## 8. ANEXOS

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:286 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

## 1. ASPECTO

Observar el líquido en un tubo nessler sobre fondo blanco y con luz blanca. Evaluar organolépticamente.

**Especificación:** Líquido siruposo libre de materias orgánicas de color marrón fluorescente con olor aromático agradable y de sabor dulce

## 2. VOLUMEN DE ENTREGA

**Referencia:** USP vigente

**Procedimiento:** Realizar el ensayo por volumen utilizando 10 unidades

- a. Vaciar cuidadosamente el contenido de cada envase en sendas probetas individuales, graduadas y secas, con una capacidad marcada que no exceda de dos veces y medio el volumen a medir. Evitar la formación de burbujas de aire durante el proceso.
- b. Dejar escurrir cada envase durante un periodo que no exceda de 10 minutos
- c. Determinar el volumen una vez transcurrido el tiempo y registrar.

**Criterios de aceptación:** El volumen promedio de líquido obtenido a partir de los 10 envases es no menos de 100 % y el volumen de ningún envase es menos de 95 % del volumen declarado en el etiquetado.

Realizar la prueba en 20 envases adicionales si A, el volumen promedio es menos de 100 % del declarado en el etiquetado, pero el volumen de ningún envase es menos de 95 % de la cantidad declarada, o si B, el volumen promedio es no menos de 100 % y el volumen de no más de 1 envase es menos de 95 %, pero es no menos del 90 % del volumen declarado. El volumen promedio de líquido obtenido de los 30 envases es no menos de 100 % del volumen declarado en el etiquetado; y el volumen de líquido obtenido de no más de 1 de los 30 envases es menos de 95 %, pero no menos de 90 % del volumen declarado en el etiquetado.

**Especificación:** Según se indique en la especificación del producto.

Mínimo: 340 mL por frasco.

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:287 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

### 3. pH

**Referencia** : USP vigente

**Equipo** : Potenciómetro

**Procedimiento** : Agitar y transferir el contenido de un frasco a un recipiente y medir el pH a 25 °C +/- 2 °C, utilizando electrodo de vidrio

**Especificación:** 5,0 - 7,0

### 4. IDENTIFICACIÓN

#### 4.1. TIAMINA CLORHIDRATO, RIBOFLAVINA, PIRIDOXINA CLORHIDRATO, NICOTINAMIDA, D-PANTENOL.

**Referencia** : Técnica propia

**Método** : Cromatografía líquida (HPLC)

**Procedimiento** : Proceder según el ensayo de valoración

**Especificación:** El tiempo de retención de los principios activos en la muestra se corresponden al estándar mixto (HPLC).

#### 5. VALORACIÓN DE TIAMINA CLORHIDRATO, RIBOFLAVINA, PIRIDOXINA CLORHIDRATO, NICOTINAMIDA.

**Referencia** : Técnica propia

**Consideraciones** : Proteger de la luz.

##### 5.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

- Equipos:
- Cromatógrafo Knauer Azura D.A.D

Columna cromatográfica: Extend SB C18 ; 150 mm x 4,6 mm (5 µm)

##### 5.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Longitud de onda: 280 nm
Flujo: Ver tabla N° 1
Volumen de inyección: 20 µL
Desviación estándar relativa: No más de 2,0 %

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:288 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

**Tabla N° 1**

TIEMPO	FLUJO mL/min	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN N B	SOLUCIÓN C
0	1,0	91	9	0
4	0,7	90	10	0
27	0,7	75	5	20
28	1,0	91	9	0
35	1,0	91	9	0

### 5.3 REACTIVOS

#### Fase móvil:

**Solución A:** 1.05 g de hexanosulfonato de sodio, diluir en 1050 mL de agua purificada. Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad. Dejar al vacío por 3 minutos para desgasificar.

**Solución B:** metanol HPLC

**Solución C:** Acetonitrilo

**Solución diluyente:** Pesar 25 g de Edetato disodico en 1000 mL de agua purificada.

### 5.4 PROCEDIMIENTO

**Solución estándar:** Pesar una cantidad equivalente 20,0 mg de piridoxina clorhidrato + 27,4 mg de riboflavina 5 fosfato de sodio + 50,0 mg de tiamina clorhidrato + 200,0 mg de nicotinamida en matraz volumétrico de 50 mL, sonicar por 5 minutos, enfriar si es necesario, completar a volumen con solución diluyente y mezclar. Transferir 3,0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 mL, completar a volumen con solución diluyente y mezclar. Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad. (*Concentraciones*

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:289 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

aproximadas para nicotinamida:0,12 mg/mL; riboflavina:0,16 mg/mL, piridoxina clorhidrato:0,012 mg/5mL; tiamina clorhidrato: 0,03 mg/mL).

**Solución muestra:** Tomar 3mL de muestra, llevar a matraz volumétrico con un volumen de enrase de 100mL, Se agregará 60mL del diluyente, Se agitará y llevará a ultrasonido por 5 minutos, posteriormente dejar atemperar y llevar a volumen con diluyente, luego homogenizar. Filtrar una cantidad de esta solución por medio de un filtro de membrana de nylon de 0,22 µm, descartar la primera parte del filtrado y llevar a viales HPLC. *Concentraciones aproximadas para nicotinamida:0,12 mg/mL; riboflavina:0,16 mg/mL, piridoxina clorhidrato:0,012 mg/5mL; tiamina clorhidrato: 0,03 mg/mL).*

## 5.5 CÁLCULOS

### Piridoxina clorhidrato:

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{3}{100} \times \frac{Pot\% \ t/c}{100} \times \frac{100}{1,2} \times 5$$

### Tiamina clorhidrato

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{3}{100} \times \frac{Pot\% \ t/c}{100} \times \frac{100}{30} \times 5$$

### Riboflavina

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{3}{100} \times \frac{Pot\% \ t/c}{100} \times \frac{100}{1,64} \times 5$$

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:290 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

### Nicotinamida:

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{3}{100} \times \frac{Pot\% \frac{t}{c}}{100} \times \frac{100}{12} \times 5$$

Donde:

X : mg vitamina/5 mL.

Wst : Peso del estándar (mg).

Amp : Área de la muestra.

Ast : Área del estándar.

Pot%/t/c : Potencia del estándar de referencia, tal cual.

### Especificación:

Tiamina clorhidrato (B1): 5 mg/5 mL (4.5 mg- /5 mL 12.5 mg/5 mL) (90%-250%)

Riboflavina (B2): 2,74 mg /5 mL (2,47 m/5 mL g – 4,11 mg/5 mL) (90 %- 150%)

Nicotinamida (B3): 20 mg /5 mL (18mg/5 mL -30 mg/5 mL) (90 %-150%)

Piridoxina clorhidrato (B6): 2mg/5 mL (1,80 mg/5 mL - 3,0 m/5 mL g) (90 %-150%)

## 6.0 VALORACIÓN DE D-PANTENOL

**Referencia:** Técnica propia

**Consideraciones:** Proteger de la luz

### 6.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

- Equipos:
- Cromatógrafo Knahuer Azura D.A.D

Columna cromatográfica: Eclipse C18; 150 mm x 4,6 mm (5 µm)

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:291 de 6
N° Revisión: 00	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

## 6.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Longitud de onda : 210 nm

Flujo : 1,0 mL/min

Volumen de inyección : 20 µL

Desviación estándar relativa: No más de 2,0 %

## 6.3 REACTIVOS

**Fase móvil:** (Solución A: Metanol) (95:5)

Solución A: Pesar 10g de fosfato mono básico de sodio, disolver en 1000 mL de agua, llevar a ph de 3,5 con ácido fosfórico. Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad. Dejar al vacío por 3 minutos para desgasificar.

## 6.4 PROCEDIMIENTO

**Solución estándar:** Pesar 30 mg de D-pantenol en un matraz volumétrico de 50 mL, agregar 30 mL de agua, someter a ultrasonido hasta completa disolución, atemperar, llevar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5 mL de la solución anterior a una fiola de 50 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad descartando los primeros mL del filtrado. (*Concentraciones aproximadas D- pantenol: 0,06 mg/mL*).

**Solución muestra:** Transferir 5 mL de la muestra, equivalente a 3,0 mg de D-pantenol, a una fiola de 50 mL, agregar 30 mL de fase móvil, agitar, llevar a volumen con fase móvil y mezclar. Filtrar por membrana de nylon de 0,2 µm de porosidad. (*Concentraciones aproximadas D- pantenol: 0,06 mg/mL*).

## 6.5 CÁLCULOS

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{5}{50} \times \frac{Pot\% t/c}{100} \times \frac{50}{3} \times 5$$

	<b>LABORATORIO XY S.A.</b>	Código: TPT-0324	Pág:292 de 6
<b>N° Revisión: 00</b>	<b>Producto terminado</b>	físico Químico C.C	

Donde:

X : mg D Pantenol/5 mL

Wst : Peso del estándar (mg)

Amp : Área de la muestra.

Ast : Área del estándar

Pot%/t/c : Potencia del estándar de referencia, tal cual.

**Especificación:** 2,7 mg/5 mL – 4,5 mg/5 mL (90,0 % - 150,0 %)

**7.0 REFERENCIA:** Técnica propia

**8.0 CONTROL DE CAMBIOS DE DOCUMENTO**

-