



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE
VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN UNA FORMA
FARMACÉUTICA LÍQUIDA (JARABE) POR HPLC EN LA
EMPRESA NEOFARMACO CIA. LTDA**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR/(ES): CHRISTIAN OMAR DÁVILA MEDINA

ROBERTO ANDRÉS SANTILLÁN MONTERO

DIRECTOR(A): BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Christian Omar Dávila Medina, Roberto Andrés Santillán Montero

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Nosotros, CHRISTIAN OMAR DÁVILA MEDINA Y ROBERTO ANDRÉS SANTILLÁN MONTERO, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 20 de febrero de 2021



CHRISTIAN OMAR DÁVILA MEDINA

180489824-3



ROBERTO ANDRÉS SANTILLÁN MONTERO




060372972-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Trabajo experimental, **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN UNA FORMA FARMACÉUTICA LÍQUIDA (JARABE) POR HPLC EN LA EMPRESA NEOFARMACO CIA. LTDA**, realizado por los señores: **CHRISTIAN OMAR DÁVILA MEDINA Y ROBERTO ANDRÉS SANTILLÁN MONTERO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Fabián Ernesto Arias Arias. PhD. DELEGADO DEL DECANO	 Firmado electrónicamente por: FABIAN ERNESTO	<u>19-03-2021</u>
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia. M.Sc. DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado electrónicamente por: DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA	<u>19-03-2021</u>
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla. M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA	<u>19-03-2021</u>

DEDICATORIA

A nuestros padres por la confianza que depositaron en nosotros para vernos triunfar en la vida, por las palabras de aliento y superación que nunca faltaron; a nuestros amigos y familiares por el apoyo incondicional y los deseos de superación. Al personal técnico-operativo de la empresa NEOFARMACO Cia. Ltda por la apertura y confianza que nos bridaron para la realización de este trabajo de titulación.

Christian Omar Dávila Medina y Roberto Andrés Santillán Montero

AGRADECIMIENTO

Mil palabras no bastarían para agradecerles padres por su apoyo, comprensión y consejos en todo este trayecto. Gracias a ustedes hoy podemos alcanzar una meta de las muchas venideras en nuestra vida. A Laboratorio Neofarmaco del Ecuador, por abrirnos sus puertas y darnos la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por brindarnos todas las herramientas necesarias para lograr este objetivo. A Carlitos Pazmiño por toda su ayuda incondicional en la búsqueda del conocimiento, y la inspiración para descubrir la ciencia cada día. A nuestros amigos y hermanos de Neofarmaco por toda su ayuda durante este proceso con esas palabras de ánimo y sobre todo por permitirnos formar parte de sus vidas y formar una linda amistad.

Christian Omar Dávila Medina y Roberto Andrés Santillán Montero

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	3
1.1. Información del laboratorio farmacéutico	3
<i>1.1.1. Misión</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. Visión</i>	<i>3</i>
1.2. Fundamento teórico	3
<i>1.2.1. Suplementos Dietéticos</i>	<i>3</i>
<i>1.2.1.1. Vitaminas hidrosolubles</i>	<i>3</i>
<i>1.2.2. Validación</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2.1. Tipos de validación</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.2. Categorías de validación</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2.3. Validación de Métodos Analíticos</i>	<i>6</i>
<i>1.2.3. Ensayos Estadísticos</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3.1. Distribución T Student</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3.2. Prueba de Levene</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3.3. Análisis de Varianza ANOVA</i>	<i>8</i>
<i>1.2.3.4. Diseño de Cribado</i>	<i>9</i>
<i>1.2.4. Métodos analíticos</i>	<i>9</i>
<i>1.2.5. High-performance liquid chromatography (HPLC)</i>	<i>9</i>
<i>1.2.5.1. Equipo HPLC</i>	<i>10</i>
<i>1.2.5.2. Parámetros Cromatográficos</i>	<i>12</i>
<i>1.2.5.3. Tipos de Cromatografía según la polaridad de la fase estacionaria</i>	<i>12</i>
<i>1.2.5.4. Cromatografía de interacción iónica/ pares iónicos (PIC)</i>	<i>13</i>
<i>1.2.5.5. Gradiente de elusión HPLC</i>	<i>15</i>
CAPÍTULO II	18
2. MARCO METODOLÓGICO	18
2.1. Materiales, equipos y reactivos	18
2.1.1. Materiales	18
2.1.2. Equipos	18
2.1.3. Reactivos	19

2.1.4.	Estándares de Referencia	19
2.2.	Desarrollo del método analítico	20
2.2.1.	Identificación de las vitaminas hidrosolubles	20
2.3.	Validación del método analítico	22
2.3.1.	Preparación de soluciones	22
2.3.1.1.	<i>Preparación estándares</i>	22
2.3.1.2.	<i>Preparación de las muestras</i>	23
2.3.2.	Parámetros de desempeño a evaluar	23
2.3.2.1.	<i>Selectividad</i>	23
2.3.2.2.	<i>Linealidad y rango</i>	24
2.3.2.3.	<i>Exactitud</i>	27
2.3.2.4.	<i>Precisión</i>	27
2.3.2.5.	<i>Robustez</i>	28
2.3.2.6.	<i>Estabilidad</i>	28
2.3.2.7.	<i>Límite de detección y límite de cuantificación (LOD-LOQ)</i>	29
2.3.2.8.	<i>Idoneidad del sistema</i>	30
2.3.2.9.	<i>Incertidumbre de la medición</i>	30
2.3.3.	Registro y revisión de datos	31
	CAPÍTULO III	35
3.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
3.1.	Desarrollo del método	35
3.2.	Validación del método analítico	36
3.2.1.	Selectividad	36
3.2.2.	Linealidad y rango	37
3.2.3.	Exactitud	45
3.2.3.1.	<i>Precisión</i>	45
3.2.3.2.	<i>Robustez</i>	47
3.2.3.3.	<i>Estabilidad</i>	73
3.2.3.4.	<i>Idoneidad del sistema</i>	74
3.2.3.5.	<i>Incertidumbre de la medición</i>	75
3.2.3.6.	<i>Límite de Detección LOD y Límite de Cuantificación LOQ</i>	79
	CONCLUSIONES	80
	RECOMENDACIONES	82
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2. Equipos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.	18
Tabla 2-2. Reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.	19
Tabla 3-2. Estándares utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.	19
Tabla 4-2. Desarrollo del método analítico.	20
Tabla 5-2. Concentración de estándares.	22
Tabla 6-2. Concentración de vitaminas hidrosolubles para parámetro de selectividad.	23
Tabla 7-2. Pesos y diluciones para parámetro de Linealidad.	25
Tabla 8-2. Variables propuestas para parámetro de Robustez.	28
Tabla 9-2. Variables respuestas establecidas para el diseño experimental (unidad).	28
Tabla 10-2. Intervalo de tiempo para análisis de Estabilidad.	29
Tabla 11-2. Pesos y diluciones para parámetro de Estabilidad.	29
Tabla 12-2. Límite de LOD y LOQ calculados para cada vitamina.	29
Tabla 13-2. Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto.	31
Tabla 1-3. Resultados del ensayo Selectividad.	35
Tabla 2-3. Resultados del ensayo Selectividad.	36
Tabla 3-3. Resultados del análisis de linealidad del sistema vitaminas Hidrosolubles.	38
Tabla 4-3. Resultados del análisis de linealidad del método vitaminas Hidrosolubles.	38
Tabla 5-3. Resultados del análisis de Linealidad del sistema vitaminas Hidrosolubles.	40
Tabla 6-3. Resultados del análisis de Exactitud del sistema vitaminas Hidrosolubles.	45
Tabla 7-3. Resultados del análisis de Repetibilidad del sistema y método, Precisión Intermedia de vitaminas Hidrosolubles.	45
Tabla 8-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de Vitamina C.	53
Tabla 9-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de vitamina B1.	53
Tabla 10-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención.	54
Tabla 11-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de vitamina B3.	55
Tabla 12-3. Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teórico de vitamina C.	62
Tabla 13-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B1.	62
Tabla 14-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B2.	63
Tabla 15-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B3.	63
Tabla 16-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B6.	64
Tabla 17-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B1.	70
Tabla 18-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B2.	70
Tabla 19-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B3.	71
Tabla 20-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B6.	71
Tabla 21-3. Resultados comparación fase estacionaria.	72
Tabla 22-3. Resultados del parámetro Estabilidad del Sistema.	73
Tabla 23-3. Resultados del parámetro Idoneidad del Sistema.	74
Tabla 24-3. Resultados de la incertidumbre de la medición para las vitaminas hidrosolubles.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. (A) hexylamine, (B) 1-octanesulfonate, (C) 1-hexyl-3-methylimidazolium, tetrafluoroborate, (D) sodium dodecyl sulfate, and (E) cetyltrimethylammonium chloride.....	14
Figura 2-1. Factor de retención vs pH.....	14
Figura 3-1. Tipos de gradiente	17

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Cromatograma del método analítico inicial.....	36
Gráfico 2-3. Cromatograma del método analítico final.....	36
Gráfico 3-3. Cromatograma Selectividad del Sistema.....	37
Gráfico 4-3. Cromatograma Selectividad del Placebo Cargado.....	37
Gráfico 5-3. Cromatograma Linealidad del Sistema.....	44
Gráfico 6-3. Cromatograma Linealidad del Método.....	44
Gráfico 7-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina C en influencia de los factores evaluados.....	47
Gráfico 8-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención en influencia de vitamina C de los factores evaluados.....	48
Gráfico 9-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.....	48
Gráfico 10-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.....	49
Gráfico 11-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.....	49
Gráfico 12-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.....	50
Gráfico 13-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.....	50
Gráfico 14-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.....	51
Gráfico 15-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.....	51
Gráfico 16-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.....	52
Gráfico 17-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina C.....	53
Gráfico 18-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de Vitamina B1.....	54
Gráfico 19-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B2.....	54
Gráfico 20-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B3.....	55
Gráfico 21-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B6.....	55
Gráfico 22-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina C en influencia de los factores evaluados.....	56
Gráfico 23-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina C en influencia de los factores evaluados.....	57
Gráfico 24-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.....	57
Gráfico 25-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.....	58
Gráfico 26-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.....	58
Gráfico 27-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.....	59
Gráfico 28-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.....	59
Gráfico 29-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.....	60
Gráfico 30-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.....	60
Gráfico 31-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.....	61
Gráfico 32-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina C 62	

Gráfico 33-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B1	63
Gráfico 34-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B2	63
Gráfico 35-3. Superficie-respuesta para el número de platos teóricos de vitamina B3.....	64
Gráfico 36-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B6	64
Gráfico 37-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.....	65
Gráfico 38-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.	66
Gráfico 39-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.....	66
Gráfico 40-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B2 en influencia de los efectos de factores evaluados.	67
Gráfico 41-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.....	67
Gráfico 42-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.	68
Gráfico 43-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.....	68
Gráfico 44-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.	69
Gráfico 45-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B1.....	70
Gráfico 46-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B2.....	71
Gráfico 47-3. Superficie-respuesta estimada para resolución.....	71
Gráfico 48-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B6.....	72
Gráfico 49-3. Fuentes de incertidumbre para Vitamina C.	76
Gráfico 50-3. Fuentes de Incertidumbre para Vitamina B1.	76
Gráfico 51-3. Fuente de incertidumbre para Vitamina B2.	77
Gráfico 52-3. Fuentes de incertidumbre para Vitamina B3.	78
Gráfico 53-3. Fuente de incertidumbre para Vitamina B6.	78

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A:** Desarrollo del Método
- Anexo B:** Validación del Método
- Anexo B1:** Linealidad
- Anexo B2:** Precisión Intermedia

RESUMEN

El presente trabajo describe el desarrollo, optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa acoplado con un detector ultravioleta visible (UV-VIS) mediante la técnica de par iónico conjugado (PIC), para la cuantificación de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina en estándar combinado y placebo cargado. Se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (125 x 4,6 mm, 5 µm). La detección UV se realizó con gradiente de 0.0-6.0 min a 267 nm, 6.1-12.0 min a 290 nm, 12.1-18 min a 248 nm, y de 18.1-24 min a 340 nm. La fase móvil consistió en un buffer PIC 7 pH 2.0, metanol y acetonitrilo usando el gradiente: 0-16 min (80:17,5:2,5), 16-21 min (17,5:80:2,5), y 21-24 min (80:17,5:2,5). El flujo fue de 1 ml / min a 35 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. Después del desarrollo y optimización del método se procedió a validarlo, de acuerdo a la categoría I de Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados, descrita en la USP para la validación, demostrando ser selectivo con un porcentaje de discrepancia menor al 3,465%, lineal ($r > 0,998$), preciso ($RSD < 1,8247$), exacto (recuperación del 97,2630 % para ácido ascórbico, 98,3540% para tiamina, 99,8853% para Riboflavina, 97,8945 % para nicotinamida y 98,9522 % para piridoxina), idóneo y robusto; Además, en el ensayo de robustez se compararon parámetros cromatográficos con octilsilano C8, demostrando un coeficiente de discrepancia menor al 5%. De acuerdo con estos resultados, se demostró que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida y puede ser aplicado para el control de rutina en el laboratorio.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <PAR IÓNICO>, <CROMATOGRAFÍA>, <VALIDACIÓN>, <MÉTODO ANALÍTICO>, <MULTIVITAMINAS>, < CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)>



0873-DBRAI-UTP-2021

SUMMARY

This work describes the development, optimization and validation of a reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method coupled with an ultraviolet visible detector (UV-VIS) by means of the conjugated ion pair technique (CIP), for the quantification of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxine in combined standard and loaded placebo. A LiChrospher® 100 RP-18 endcapped column (125 x 4.6 mm, 5 μ m) was used. UV detection was performed with a gradient of 0.0-6.0 min at 267 nm, 6.1-12.0 min at 290 nm, 12.1-18 min at 248 nm, and 18.1-24 min at 340 nm. The mobile phase consisted of a CIP 7 buffer pH 2.0, methanol and acetonitrile using the gradient: 0-16 min (80: 17.5: 2.5), 16-21 min (17.5: 80: 2.5), and 21-24 min (80: 17.5: 2.5). The flow was 1 ml / min at 35 ° C. The injection volume of the sample was 10 μ l. The method was validated after the development and optimization of it, according to category I of analytical procedures for the quantification of the main components of bulk drugs or active ingredients (including preservatives) in finished pharmaceutical products, described in the USP for the validation, proving to be selective with a percentage of discrepancy less than 3.465%, linear ($r > 0.998$), precise (RSD < 1.8247), accurate (recovery of 97.2630% for ascorbic acid, 98.3540% for thiamine, 99.8853% for riboflavin, 97.8945% for nicotinamide and 98.9522% for pyridoxine), suitable and robust; furthermore, in the robustness test chromatographic parameters were compared with octylsilane C8, showing a discrepancy coefficient of less than 5%. According to these results, it was demonstrated that the analytical method developed, optimized and validated is appropriate for the identification and quantification of water-soluble vitamins in a liquid pharmaceutical form and can be applied for routine control in the laboratory.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <ION PAIR>, <CHROMATOGRAPHY>, <VALIDATION>, <ANALYTICAL METHOD>, <MULTIVITAMINS>, <HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida (jarabe) por HPLC en la empresa NEOFARMACO Cía. Ltda

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Optimizar la fase móvil y el sistema cromatográfico para la identificación y cuantificación de todos los principios activos presentes en el jarabe multivitamínico
- Comprobar las características de validación del método analítico desarrollado.
- Determinar que el método analítico desarrollado proporciona seguridad y fiabilidad en el momento del análisis de rutina.

INTRODUCCIÓN

Los suplementos dietéticos pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, aminoácidos y hierbas; además, se pueden encontrar en formas farmacéuticas diversas como; líquidos, polvos, tabletas, cápsulas, etc. Algunos suplementos ayudan a obtener las sustancias vitales suficientes que el cuerpo necesita para su funcionamiento; mientras otros pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades (FDA 2010).

En la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) no se describe un método analítico único para la determinación de varias vitaminas en un suplemento dietético, por esta razón se origina la necesidad de desarrollar un método que permita identificar y cuantificar estos componentes dentro de un jarabe multivitamínico. La industria farmacéutica maneja altos estándares de calidad con el fin de asegurar que los medicamentos y suplementos producidos sean seguros y eficientes; lo anterior se logra teniendo metodologías validas que garanticen que los resultados derivados de su aplicación sean fiables.

La Agencia de Control, Regulación y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) habla sobre la gestión de “Análisis de Laboratorio de Medicamentos, Productos Naturales, Dispositivos Médicos, Reactivos Bioquímicos” determinada en el Estatuto orgánico Resolución 16 apartado 8 en el cual se establece como requisito los informes de validación de los métodos de ensayo (ARCSA, 2017). Además, la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) en su guía Q2 (R1 y R2) da pautas de cómo llevar a cabo validaciones analíticas en la industria farmacéutica como recomendación para lograr resultados satisfactorios en sus análisis (ICH Q2, 1994).

Por esta razón, la especificación, aprobación y documentación de procesos mediante una validación analítica es vital para que la industria farmacéutica pueda asegurar la inocuidad y eficacia del producto durante todas las fases de su periodo de actividad, incluyendo el almacenamiento distribución y uso (OMS, 2018).

Debido a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo permitirá verificar que los datos obtenidos durante los análisis de control de calidad del jarabe multivitamínico cumplan con las especificaciones requeridas, mediante su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). El uso de HPLC como método analítico para la cuantificación de vitaminas hidrosolubles se justifica por su elevada sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y la sociedad en general.

El método analítico ha de demostrar selectividad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, linealidad y rango dentro de lo establecido por organismos nacionales e internacionales y así garantizar que el método analítico desarrollado permite obtener resultados fiables siempre y cuando se trabaje a las mismas condiciones establecidas en la validación. (AEFI, 2001)

En la empresa Neofármaco Cía. Ltda., surge la necesidad de validar procesos analíticos tanto de la materia prima como de especialidades farmacéuticas debido a la exigencia establecida por la Agencia de Control, Regulación y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) sobre la gestión de “Análisis de Laboratorio de Medicamentos, Productos Naturales, Dispositivos Médicos y Reactivos Bioquímicos” (ARCSA, 2017). Así como la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) en su guía Q2 (R1 y R2) da pautas acerca de cómo llevar a cabo validaciones analíticas en la industria farmacéutica, como recomendación para lograr resultados satisfactorios en sus análisis (ICH Q2, 1994), (OMS, 2018).

Por ende, el presente trabajo permite desarrollar un método analítico capaz de comprobar que los resultados obtenidos durante los análisis de control de calidad del jarabe multivitamínico cumplen con las especificaciones requeridas.

El método analítico fue validado según los parámetros de: selectividad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, linealidad y rango dentro de lo establecido por organismos nacionales e internacionales para garantizar resultados fiables siempre y cuando se trabaje con los mismos excipientes y principios activos (AEFI, 2001).

La empresa Neo Fármaco proporcionó los recursos técnicos, instrumentales y demás materiales y productos necesarios para llevar a cabo la investigación, puesto que es de interés mutuo el desarrollo y validación del método para la determinación de vitaminas hidrosolubles en un jarabe multivitamínico.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Información del laboratorio farmacéutico

Neofármaco Cia. Ltda., es una empresa ambateña comprometida con la calidad, integridad, profesionalismo, honestidad y el respeto, que ha venido garantizando la eficacia y la seguridad de sus productos desde el año 1969 con precios razonables. (Neofarmaco 2019)

1.1.1. Misión

“Elaborar y comercializar productos farmacéuticos, naturales y cosméticos que cumplan con las más estrictas normas de calidad, producidos con las mejores materias primas e insumos a nivel mundial, con excelentes presentaciones y a precios razonables en el mercado”. (Neofarmaco 2019)

1.1.2. Visión

“Convertirnos en una empresa LÍDER a nivel nacional y PARTICIPANTE ACTIVA a nivel internacional con productos farmacéuticos, naturales y cosméticos, que se integren y se adapten a las exigencias de los mercados”(Neofarmaco 2019)

1.2. Fundamento teórico

1.2.1. Suplementos Dietéticos

Los suplementos dietéticos pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, aminoácidos y productos herbales; además, se pueden encontrar en formas farmacéuticas diversas en estado líquido y sólido tal como, por ejemplo: polvos, comprimidos, cápsulas, etc. Algunos suplementos ayudan a obtener las sustancias vitales suficientes que el cuerpo necesita para su funcionamiento; mientras otros pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades (FDA 2010)

1.2.1.1. Vitaminas hidrosolubles

Las vitaminas solubles en agua se pueden definir simplemente como el grupo de vitaminas que se disuelve en agua. Estas vitaminas muestran una alta solubilidad en el ambiente polar de la luz

intestinal debido a uno o más grupos polares presentes en su estructura y por lo tanto son absorbidos por la superficie del intestino. Debido a las condiciones fisiológicas, el cuerpo humano no es capaz de almacenar este grupo de vitaminas durante tiempos prolongados por lo que debe ser suministrado de forma continua a través de la dieta. En consecuencia, propiedades como la biodisponibilidad y la bioaccesibilidad se vuelven críticas debido a la falta de capacidad de almacenamiento del cuerpo, así como a la biosíntesis de vitaminas por las células de mamíferos.(Khaneghah et al. 2019)

-Vitamina B1: La coenzima TDP (pirofosfato de tiamina y cocarboxilasa) actúa en el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos de cadena ramificada (Pablo et al. 2011). (Khaneghah et al. 2019)

-Vitamina B2: Es antioxidante y participa indirectamente en la producción de energía en varias rutas metabólicas siendo el precursor de las coenzimas flavín mononucleótido (FMN) y flavinadenín dinucleótido (FAD) que transportan de electrones en varias reacciones de oxidoreducción; Las formas biológicamente activas participan en las reacciones redox Coenzima en el metabolismo energético. Protección contra el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. (Pablo et al. 2011, P.xx)(Khaneghah et al. 2019)

-Vitamina B3: Ayuda en la obtención de energía a partir de carbohidratos, grasas, y proteínas, además es indispensable en la formación de glóbulos rojos. Cambios favorables en el nivel de tres lipoproteínas principales. (Pablo et al. 2011) (Khaneghah et al. 2019)

-Vitamina B6: Coenzima que ayuda en el metabolismo de las proteínas y biosíntesis de neurotransmisores, mantiene niveles normales de homocisteína, participa en la función inmunológica y la formación de hemoglobina; además ayuda en la síntesis de dopamina, serotonina y noradrenalina que participan activamente en la función cerebral. (Pablo et al. 2011, p xx) (Khaneghah et al. 2019)

-Vitamina C: El ácido ascórbico además de ser un potente antioxidante también facilita el metabolismo de carnitina, serotonina, histamina, norepinefrina, hierro y ciertos neurotransmisores (Pablo et al. 2011, p xx) (Khaneghah et al. 2019)

1.2.2. Validación

La Validación es aquel proceso que implica la recolección y análisis de datos, que se realiza con el fin de implantar evidencia documentada de que un proceso, sistema, o metodología es capaz de entregar resultados con las especificaciones que se requieren de una forma constante,

estableciendo mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (WHO 2006) (The United States Pharmacopeial Convention 2019)

1.2.2.1. Tipos de validación

-Validación prospectiva

La validación prospectiva se realiza en la etapa de desarrollo, en conjunto a un análisis de riesgos del proceso de producción, que se descompone en pasos individuales; se evalúa con la experiencia basada en una planificación, donde se estudian todos los pasos a realizar desde los lotes de producción a escala piloto hasta el primer lote de fabricación industrial para determinar si podrían conducir a situaciones críticas; es decir, que evalúa un producto antes de su comercialización. Para este tipo de validación, es necesario que el tamaño de los lotes objeto del estudio sean del mismo tamaño y se desarrollen a escala industrial. (Bismuth y Neumann 2000) (WHO 2006)

-Validación concurrente

La validación concurrente se aplica durante la manufactura de los tres primeros lotes de un producto, en esta validación se aplican estudios estadísticos a los resultados tras el análisis de los parámetros críticos de calidad, su análisis ha de demostrar, el cumplimiento en parámetros tales como robustez, fiabilidad y consistencia del proceso de producción. (Bismuth y Neumann 2000)

-Validación retrospectiva

La validación retrospectiva supone el examen de la experiencia relativa a la producción, partiendo del supuesto de que la composición, los procedimientos y el equipo no han cambiado; a continuación, se evalúan esa experiencia y los resultados de las pruebas en el curso del proceso y de control final. Se analizan las dificultades y los fallos de la producción registrados a fin de determinar los límites de los parámetros del proceso. Se puede llevar a cabo un análisis de tendencias para determinar el grado en que los parámetros del proceso se hallan dentro del intervalo admisible. Evidentemente, la validación retrospectiva no es una medida de garantía de la calidad por sí misma, de manera que nunca debe aplicarse a procesos o productos nuevos. Se puede considerar únicamente en circunstancias especiales, por ejemplo, cuando en una empresa se introducen por vez primera los requisitos de validación. En ese caso, la validación retrospectiva puede ser útil para establecer las prioridades del programa de validación. Si la validación retrospectiva arroja resultados positivos, ello indica que el proceso no necesita atención inmediata y puede validarse de conformidad con el calendario normal. En esta validación el uso de datos

históricos es esencial y son tomados de protocolos de producción, bitácoras, cambios, mantenimiento, estudios de estabilidad, registros y análisis de tendencias. (Bismuth y Neumann 2000) Si es necesario, este tipo de validación permite recurrir al análisis de muestras pertenecientes a retención obteniendo así datos necesarios para la validación, puesto que se necesitan de datos correspondientes de 10 a 30 lotes sucesivos. (Fugate 2004)

1.2.2.2. Categorías de validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Para lo cual se ha dividido en las categorías descritas a continuación (The United States Pharmacopeial Convention 2019)

-Categoría I

Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

-Categoría II

Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

-Categoría III

Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño como por ejemplo perfiles de disolución, desintegración, entre otros.

-Categoría IV

Pruebas de identificación.

1.2.2.3. Validación de Métodos Analíticos

La validación de un método analítico se basa en una serie de operaciones que buscan analizar una determinada especificación referente al desempeño del equipo, esto con el objetivo de asegurarse que el equipo pueda operar en base a las especificaciones del diseño. En la validación se incluye la evaluación del método que se usa en el equipo asegurando que los resultados obtenidos son fiables y consistentes. (Aguilar y Hernandez 1996)

Al hablar de parámetros de validación de un método analítico encontramos que son especificidad, reproducibilidad, límite de cuantificación, límite de detección, precisión, linealidad y margen de error, exactitud, recuperación y por último la estabilidad. (Haider y Asif 2010)

-Selectividad

El parámetro selectividad hace referencia a la capacidad inequívoca de un método analítico en cuantificar e identificar de manera simultánea uno o varios analitos de interés, cuando estas se encuentran en una muestra combinada con otras sustancias. (AEFI 2001)

-Linealidad y rango

La linealidad evalúa la capacidad del método al proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración de un analito en una muestra dentro de un rango establecido. (AEFI 2001)

-Precisión

La precisión es aquel parámetro que indica la dispersión entre una secuencia de tomas múltiples que se originan a partir de una única muestra homogénea en las condiciones establecidas. (AEFI 2001)

-Exactitud

La exactitud se establece en un análisis como la proximidad o cercanía entre un valor de referencia y el valor experimental encontrado tras el análisis. (FAO 2005)

-Robustez

La robustez indica la capacidad de un ensayo en proporcionar de manera inalterada un resultado a pesar de las pequeñas variaciones que pueden presentarse en ciertos parámetros, lo que proporciona una clara idea de su estabilidad durante su aplicación rutinaria. (AEFI 2001)

-Idoneidad del Sistema

La idoneidad del sistema representa un conjunto de metodologías que permiten confirmar que todos los elementos correspondientes al sistema, (analista, reactivos, instrumental) son adecuados para establecer que u método ha sido validado. (FAO 2005)

-Incertidumbre de la medición

No es posible realizar mediciones exactas en lo absoluto, por esta razón toda medición que se realice tiene un rango de duda, la incertidumbre de medición es darle un valor a ese rango de duda. Si ese rango de duda es muy grande la incertidumbre es también grande y si el rango es muy pequeño la incertidumbre es muy pequeña de igual manera. (Guillén 2013)

Se asocia una incertidumbre a todas las mediciones realizadas que tiene como factores los siguientes:

- El instrumento de medición
- La naturaleza de la magnitud
- El observador
- Las condiciones externas

Cada factor contribuye por separado al aumento de la incertidumbre y constituye en un grado mayor o menor a la incertidumbre total de la medición. (Taylor 1982)

-Estabilidad

El ensayo de estabilidad permite determinar el porcentaje de degradación que sufren las muestras al ser sometidas a factores como tiempo, temperatura, luz, etc. y comprobar si las muestras son factibles de utilizarse en el análisis. (Aguilar y Hernandez 1996)

-Límite de detección y cuantificación (LOD-LOQ)

El límite de detección es considerado como la cantidad o concentración más pequeña del analito en la muestra de prueba que es distinta de cero; el límite de cuantificación es la concentración más baja del analito que se puede determinar con una repetibilidad y veracidad, aceptables. El LOD se puede valorar considerando de 2 a 3 desviaciones estándares el ruido, mientras que el LOQ se considera 10 desviaciones estándar del ruido del detector. Se calcula aplicando la siguiente ecuación. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

$$LOD = \frac{3.3x\sigma}{S'}$$
$$LOQ = \frac{10x\sigma}{S'}$$

Donde:

σ = Desviación estándar del intercepto calculado en el ensayo de linealidad

S' = El valor de la pendiente calculada en el ensayo de linealidad

1.2.3. Ensayos Estadísticos

1.2.3.1. Distribución T Student

La distribución “T Student” hace referencia a un método de análisis estadístico para pequeñas muestras que ayuda a establecer una diferencia significativa entre la media de un grupo y la media de otro grupo, de las cuales se asume presentan una distribución normal. (Barrientos 2001)

1.2.3.2. Prueba de Levene

La prueba de Levene interviene en el análisis de datos al evaluar las varianzas de dos grupos de poblaciones. La igualdad entre desviaciones medias también hace alusión a una igualdad entre varianzas. (Bryman 2005)

1.2.3.3. Análisis de Varianza ANOVA

ANOVA es un análisis estadístico que prueba una hipótesis, estableciendo una igualdad o una diferencia estadísticamente significativa entre dos medias de dos grupos de poblaciones o más. Este modelo estadístico es ampliamente utilizado en el desarrollo de proyectos. (Beltra 1994)

1.2.3.4. Diseño de Cribado

El diseño de cribado ayuda a identificar aquellos factores que influyen en la calidad de un proceso ayudando a reducir la enorme cantidad de factores críticos de calidad que pueden estar presentes en un proceso. (Polo 2007)

1.2.4. Métodos analíticos

Se entiende como método analítico aquel procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones para efectuar un análisis concreto además de que deben cumplir con ciertos parámetros los cuales van a dar una sustentación al momento de decir que el método es apto para su empleo en cualquier momento de manera repetida. (FAO 2005)

Dentro de estos parámetros encontramos la exactitud la cual hace alusión a que tan exacto es un procedimiento analítico, expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimental encontrado (FAO 2005); idoneidad del sistema es un conjunto de ensayos que permiten comprobar que todos los elementos del sistema, (analista, reactivos, instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método (FAO 2005); límite de cuantificación se entiende por la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, con una adecuada precisión y exactitud; el límite de detección es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar bajo las condiciones experimentales (FAO, 2005); la linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido (AEFI, 2001); la precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas (FAO, 2005); robustez es la capacidad de proporcionar inalterado el ensayo ante pequeñas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo rutinario (AEFI, 2001); selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. (AEFI, 2001)

1.2.5. High-performance liquid chromatography (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia es un tipo de cromatografía de elución, en ésta, una solución conocida como fase móvil entra en contacto con una sustancia que puede ser sólida o líquida y es conocida como fase estacionaria; el método se basa en que al introducir una mezcla de analitos en la corriente de la solución conocida como fase móvil, cada analito irá avanzando a través de una columna que contiene la fase estacionaria, cada analito ira a una velocidad distinta la cual depende del grado de afinidad por cada una de las fases. Después de terminado el recorrido

cada analito eluirá con un tiempo diferente lo que indica una separación en cada uno de ellos.
(Estrella et al. 2011)

1.2.5.1. Equipo HPLC

-Recipientes reservorios, filtración y desgasificación de solventes

Los recipientes de fase móvil son partes simples pero esenciales del sistema de HPLC; la mayoría de los recipientes están hechos de vidrio y deben ser limpiados con regularidad (por ejemplo, semanalmente), utilizando técnicas estándar de lavado de material de laboratorio. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

El funcionamiento de varias partes del sistema HPLC puede verse comprometido si hay partículas presentes. Tales piezas incluyen válvulas dosificadoras, válvulas de retención, tubos y fritas de columna. Por esta razón, es importante utilizar una fase móvil libre de partículas. Si no hay disolventes prefiltrados (es decir, grado HPLC) disponibles, los componentes de la fase móvil deben filtrarse antes de agregarlos al depósito. Se debe usar una cubierta de algún tipo para evitar que el polvo entre en el recipiente y minimizar la evaporación de la fase móvil; pero el envase no debe taparse herméticamente para evitar que se forme un vacío cuando se bombea la fase móvil. Se deben evitar los productos de película (por ejemplo, Parafilm®) para cubrir el depósito, ya que algunas fases móviles pueden extraer componentes que pueden contaminar el sistema (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

La presencia de burbujas de aire en la fase móvil es un problema común en el funcionamiento de un sistema de HPLC. Estas burbujas pueden provocar problemas de suministro de la bomba y picos falsos en la salida del detector. La mayoría de las veces, la preocupación por las burbujas puede eliminarse desgasificando la fase móvil antes de su uso. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

- Bomba

La mayoría de los sistemas de bombeo de HPLC que se venden para trabajos analíticos de rutina están diseñados para trabajar a presiones de hasta 6000 psi (400 bar), pero la mayoría de los trabajadores operan dichos sistemas en la región de 2000 a 3000 psi (150-200 bar). La función es dotar el flujo suficiente de la fase móvil. Para lo cual, es necesario un sistema para regular la velocidad y flujo de la fase móvil. La bomba cromatografía impulsa la fase móvil con un flujo y presión adecuada para atravesar la columna al sistema (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

- Sistema de inyección

La introducción de la muestra en la columna requiere que se agregue una cantidad medida de muestra a la fase móvil presurizada que fluye. Para separaciones de columna abierta, de flujo detenido o algunas preparativas, la inyección manual de la muestra puede resultar satisfactoria. Pero para el análisis automatizado y desatendido, que a menudo involucra cientos de muestras por día, la inyección de la muestra debe ser precisa, exacta y automática. Para tales aplicaciones, se utiliza un muestreador automático. La inyección manual, popular en el pasado, rara vez se usa en la actualidad, excepto durante la capacitación del operador o en entornos de muy bajo rendimiento. Las descripciones del proceso y el equipo de inyección de muestras se presentan aquí en términos de muestreadores automáticos, pero se aplican los mismos principios para la inyección manual. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

- Conducciones y conexiones

Los tubos y los accesorios utilizados para conectar los tubos a varios componentes del sistema de HPLC son necesarios para transportar la fase móvil y la muestra a través del cromatógrafo. Si se tiene un cuidado razonable en la selección y el uso de tubos y conexiones, rara vez se encontrarán problemas. Sin embargo, la selección y el uso incorrectos pueden generar un volumen adicional de columna no deseado, que puede comprometer la separación, especialmente para pico pequeños. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Detector UV-visible

El detector cromatográfico es un transductor que convierte una propiedad física o química de un analito eluido en una señal eléctrica que puede relacionarse con la concentración del analito. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

Características de un detector ideal:

- Tienen una alta sensibilidad y una respuesta predecible
- Responder a todos los solutos, o bien tener una especificidad predecible
- No se verá afectado por cambios en la temperatura y el flujo del portador
- Responder independientemente de la fase móvil
- Ser confiable y conveniente de usar
- Tienen una respuesta que aumenta linealmente con la cantidad de soluto
- Ser no destructivo del soluto
- Proporcionar información cualitativa sobre el pico detectado

1.2.5.2. Parámetros Cromatográficos

-Tiempo de retención

Tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta la detección del máximo número de moléculas del soluto. (Estrella et al. 2011)

- Tiempo muerto

Tiempo necesario para que eluya un compuesto que no es retenido por la fase estacionaria.(Estrella et al. 2011)

- Factor de capacidad

Número de moléculas que pasan a la fase estacionaria en equilibrio con respecto a las moléculas que permanecen en la fase móvil. (Estrella et al. 2011)

- Resolución

Representa de forma cuantitativa el grado de separación entre dos picos consecutivos. (Estrella et al. 2011)

-Número de platos teóricos, eficiencia

Es la longitud requerida de una columna para que se establezca un equilibrio del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. (Estrella et al. 2011)

1.2.5.3. Tipos de Cromatografía según la polaridad de la fase estacionaria

-Cromatografía de fase reversa (FR)

Las separaciones de FR involucran fases estacionarias no polares y fases móviles polares; los últimos compuestos típicamente por un eluyente acuoso A y un monocomponente o multicomponente eluyente orgánico B. El principio de separación es la partición de analitos entre una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar (hidrófoba) de acuerdo con el coeficiente de partición específico del compuesto. Las fases estacionarias apolares más populares resultan de unir cadenas de octadecilo u octilo al soporte de sílice para obtener columnas FR C18 y C8, respectivamente. Un ejemplo de la fase móvil utilizada en la FR consiste en agua que contiene ácido fórmico al 0,1% o formiato de amonio 5 mM como eluyente A y acetonitrilo o metanol

como eluyente B. La elución en gradiente se utiliza ampliamente para la separación de mezclas complejas. (Fanali 2017a)

1.2.5.4. Cromatografía de interacción iónica/ pares iónicos (PIC)

Un modelo de cromatografía en fase reversa con un amplio alcance se logra agregando aniones o cationes anfifílicos a la fase móvil. El reactivo añadido normalmente contiene una cola hidrófoba que interactúa fuertemente con las cadenas unidas en la fase estacionaria y una cabeza cargada que se proyecta hacia la fase móvil para interactuar con los analitos. La modificación de la fase estacionaria facilita la separación de mezclas de especies iónicas y neutras. La retención está regulada por la naturaleza y concentración del contraión del reactivo, el solvente orgánico y los iones competidores con la misma carga que el analito. (Fanali 2017a)

El uso de PIC puede crear cambios similares en la retención de la muestra como por un cambio en el pH de la fase móvil, pero con un mayor control sobre la retención de solutos ácidos o básicos, y sin la necesidad de valores extremos del pH de la fase móvil. Los reactivos de apareamiento de iones típicos incluyen alquilsulfonatos y sales de tetraalquilamonio, así como ácidos carboxílicos fuertes (normalmente ionizados) (ácido trifluoroacético, TFA; ácido heptafluorobutírico y los denominados caótopos. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010) En principio, cualquier sal que contenga un ion lipófilo se puede utilizar como reactivo PIC. Para separar los aniones, la fase estacionaria debe contener cationes inmovilizados. Por el contrario, para separar los cationes, debe contener aniones inmovilizados. Cuanto más larga sea la cadena de alquilo, más hidrófobo será el reactivo y más fuerte será la adsorción en la fase estacionaria.

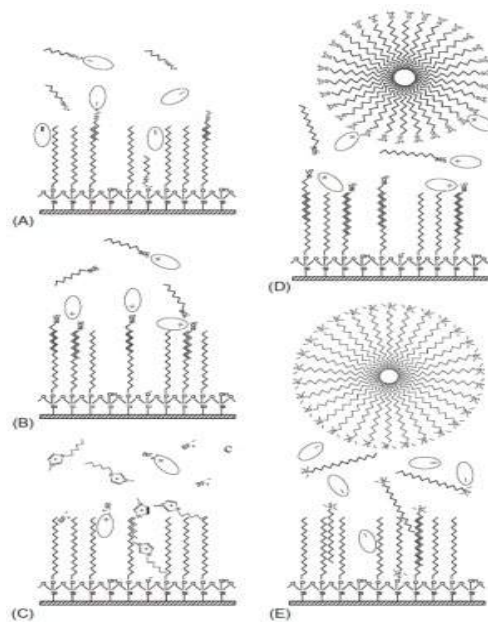


Figura 1-1. (A) hexylamine, (B) 1-octanesulfonate, (C) 1-hexyl-3-methylimidazolium, tetrafluoroborate, (D) sodium dodecyl sulfate, and (E) cetyltrimethylammonium chloride.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R. 2020

Los analitos deben ionizarse para interactuar con el contraíón PIC. Por lo tanto, la retención de compuestos ionizables depende del pH y pKa (que cambia por la interacción de las especies iónicas con el contraíón PIC), los ácidos pierden un protón y se ionizan cuando aumenta el pH, y las bases aceptan un protón cuando el pH disminuye, **Figura. 2.1.** B, C, E y F. Pequeñas variaciones en el pH de la fase móvil a valores cercanos al pKa dan como resultado cambios significativos en la retención y selectividad. Por lo tanto, el pH en esta región debe controlarse estrictamente. Sin embargo, para lograr métodos robustos, es preferible una región apenas afectada por cambios de pH. Para ácidos débiles, donde se obtiene una especie neutra a pH ácido, el modo cromatográfico se denomina cromatografía de supresión de iones. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

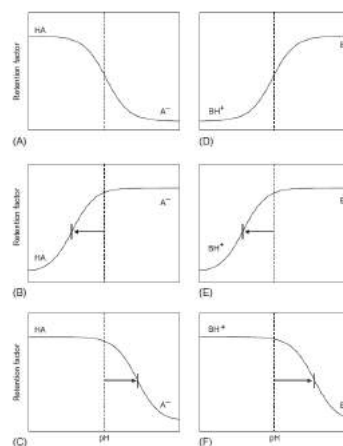


Figura 2-1. Factor de retención vs pH

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R. 2020

El rango de pH de trabajo para columnas convencionales en RPLC es de 2,5 a 7,5. Fuera de este rango, el empaque de sílice puede sufrir daños importantes (es decir, hidrólisis de los enlaces de siloxano por debajo de pH = 2 y disolución de sílice por encima de pH = 8).

-Control de selectividad

Las condiciones de separación disponibles para el control de selectividad en PIC incluyen:

- pH
- Tipo de reactivo PIC (sulfonato, sal de amonio cuaternario, caótopo)
- Concentración de reactivo PIC
- Resistencia al solvente (% orgánico)
- Tipo de solvente (ACN, MeOH, etc.)
- Temperatura

-Tipo de tampón y concentración

A pesar de la gran cantidad de variables que pueden afectar la selectividad en PIC, generalmente solo algunas de estas condiciones deben investigarse durante el desarrollo del método. Además, los efectos sobre la retención de varias de las condiciones anteriores están interrelacionados. La adsorción del contraión en la columna, la interacción entre solutos iónicos y contraiones, y especialmente la ionización de solutos y componentes tampón, dependen de la temperatura; por lo tanto, la reproducibilidad del sistema requiere un control de temperatura preciso. (Fanali 2017b)

La capa adsorbida por el PIC en la fase estacionario se puede eliminar lavando la columna con un disolvente orgánico como metanol. Al aumentar la concentración de reactivo PIC, la retención aumenta, siempre que la superficie de la fase estacionaria permanezca insaturada. Mientras tanto, al aumentar la concentración de disolvente orgánico, la retención disminuye, debido a la desorción del reactivo y los equilibrios de competencia en la fase móvil. Por lo tanto, tanto el reactivo PIC como el solvente orgánico deben mantenerse constantes en la fase móvil a concentraciones específicas, con el fin de mantener una capacidad de intercambio iónico reproducible. (Fanali 2017b)

1.2.5.5. Gradiente de elución HPLC

El gradiente de elución se refiere a un cambio continuo en la fase móvil durante la separación, de modo que la retención de picos posteriores se reduce continuamente; es decir, la fase móvil se vuelve cada vez más fuerte (concentración de orgánico aumenta) a medida que avanza la separación. La razón más común para usar el gradiente de elución es una muestra cuyo rango de

retención excede el objetivo preferido para la separación isocrática. La elución isocrática con una composición de fase móvil fija funciona bien para muchas muestras y es la forma más simple de cromatografía líquida. Para algunas muestras, sin embargo, ningún valor único de orgánico puede proporcionar una separación generalmente satisfactoria. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Otras razones para usar gradiente de elución

Aparte de la necesidad de elución de gradiente en el caso de muestras de amplio rango de polaridad, hay una serie de otras situaciones que favorecen o requieren el uso de elución en gradiente:

-Muestras de alto peso molecular

Con elución en gradiente, retención y las separaciones son más rápidas, efectivas y convenientes que una separación por elución isocrática. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Desarrollo eficiente del método HPLC

Una sola corrida de gradiente al comienzo del desarrollo del método puede reemplazar varias corridas isocráticas de prueba y error como un medio para establecer la mejor concentración del solvente (valor de% B) para la separación isocrática. Un análisis de gradiente inicial también puede establecer si la elución isocrática o en gradiente es la mejor opción para una muestra determinada. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Preparación de la muestra

En muchos casos se requiere porque algunas muestras no son aptas para inyección directa seguida de elución isocrática. Primero se deben eliminar los picos que interfieren, los componentes fuertemente retenidos y las partículas. De manera similar, los no analitos fuertemente retenidos al final de una separación isocrática pueden resultar en tiempos de ejecución excesivos, porque estos picos deben despejar la columna antes de la inyección de la siguiente muestra. El gradiente de elución generalmente puede eliminar estos compuestos de elución tardía en un tiempo de ejecución razonable. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Cola de pico

Debido al aumento de orgánico en la fase móvil durante el tiempo que una banda se mueve a través de la columna en elución de gradiente, la cola de la banda se mueve más rápido que el frente del pico, con una reducción resultante en la cola del pico y el ancho del pico. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

-Forma del gradiente

Por forma de gradiente, nos referimos a la forma en que la composición de la fase móvil (% B) cambia con el tiempo durante una ejecución de gradiente. La elución de gradiente se puede realizar con diferentes formas de gradiente, como se ilustra en la Figura 1 a-f.

La mayoría de las separaciones de gradiente utilizan gradientes lineales, que se recomiendan durante las etapas iniciales del desarrollo del método. Los gradientes curvos (b, c). Los gradientes segmentados pueden proporcionar la mayoría de las ventajas de los gradientes curvos, son más fáciles de diseñar para diferentes muestras y pueden ser replicados por la mayoría de los sistemas de gradientes. El retraso de gradiente o "retención isocrática" se ilustra en la (e); una retención isocrática también se puede usar al final del gradiente. Los gradientes escalonados (f), donde se realiza un cambio instantáneo en el porcentaje de orgánico durante la separación, son un tipo especial de gradiente segmentado. Se usan con poca frecuencia, excepto al final de una separación en gradiente para limpiar compuestos de elución de la columna; un aumento repentino en el porcentaje de orgánico (i,f) logra este propósito. Un gradiente escalonado que proporciona una disminución repentina en el porcentaje de orgánico (i,f) puede devolver el gradiente a su valor inicial para la próxima separación. (Snyder, Kirkland y Dolan 2010)

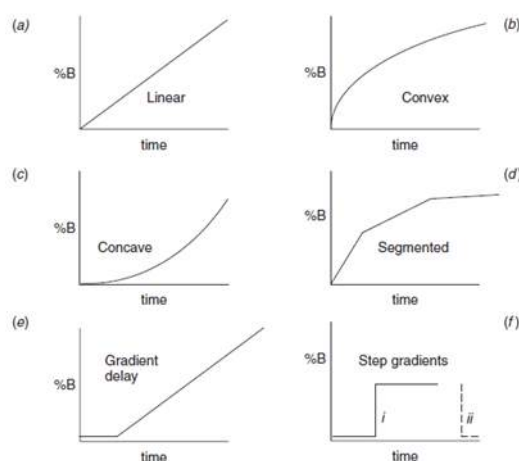


Figura 3-1. Tipos de gradiente

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R. 2020

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describe el proceso de desarrollo del método analítico y su validación, para la determinación y cuantificación porcentual de las vitaminas hidrosolubles. Para lo cual, se cumplió con una nómina de actividades como lo fueron: identificación individual de vitaminas, técnicas de separación de los principios activos, determinación de las condiciones ideales de operación en HPLC, validación del método, protocolo de validación, así como; el respectivo estudio estadístico de los resultados conseguidos; todos los elementos antes mencionados forman parte del instructivo analítico correspondiente al producto Apetitol® Jarabe.

2.1. Materiales, equipos y reactivos

2.1.1. Materiales

- Balón de aforo
- Probeta
- Vaso de Precipitación
- Pesa muestra de vidrio
- Gotero
- Espátula
- Mascara de gases
- Guantes de nitrilo

2.1.2. Equipos

Tabla 1-2. Equipos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.

	MARCA	MODELO
○ Balanza Analítica	Sartorius	BP2105
○ Pipeta electrónica	Brand	HandyStep
○ Agitador ultrasónico	VWR Scientific Products	75T
○ Sorbona	WEMA Laboreinrichtungen	-----
○ pH- metro	Mettler Toledo	SevenEasy pH
○ Conductímetro	Mettler Toledo	Conductivity S230

MÓDULOS	○ HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia)	HITACHI	CROMASTER VWR
	Unidad Bomba	HITACHI	CM5160
	Autosampler (Automuestreador)	HITACHI	CM5260
	Horno-Columna	HITACHI	CM5310
	Detector UV-VIS	HITACHI	CM5420

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.1.3. Reactivos

Tabla 2-2. Reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.

	MARCA	LOTE
○ Acetonitrilo Grado HPLC	Fisher Chemicals	193403
○ Metanol	Merck	110774107
○ Agua Purificada – Grado HPLC	NEO-FÁRMACO	N/A
○ Ácido Heptanosulfónico	Fisher Chemicals	185193
○ Ácido Heptanosulfónico	Fisher Chemicals	166407A
○ Ácido Heptanosulfónico	ISOLAB Chemicals	BA2635108AHW
○ Ácido ortofosfórico	Merck	K48484973

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.1.4. Estándares de Referencia

Tabla 3-2. Estándares utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.

	LOTE	% PUREZA
○ Clorhidrato de Tiamina	Y01201905022	101.85%
○ Riboflavina 5 Fosfato	SLL/R/0619039	101.07%
○ Nicotinamida	RNM221812023	98.36%
○ Piridoxina clorhidrato	PH18036120	100.76%
○ Ácido ascórbico	1909L8-CO1	101.99%

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

Para el desarrollo y validación del método analítico se utilizó estándares secundarios previamente caracterizados frente a un estándar primario.

2.2. Desarrollo del método analítico

El desarrollo del método HPLC se refiere a la selección de las condiciones de separación que proporciona una separación aceptable de una muestra determinada. Consideraciones iniciales para el desarrollo del método:

- Pretratamiento de la muestra
- Selección de modo cromatográfico
- Selección de detector
- Elección de las condiciones de separación
- Anticipación, identificación y solución de problemas potenciales
- Validación de métodos y determinación de criterios de idoneidad del sistema

2.2.1. Identificación de las vitaminas hidrosolubles

El desarrollo del método empezó con una revisión bibliográfica, enfocándose en la búsqueda de información fisicoquímica de cada vitamina; además de tiempos de retención propios de cada una; se realizaron pruebas explorativas con el fin de determinar el tiempo de retención de cada vitamina inyectando estándares individuales y cómo interactúan entre sí en un estándar combinado. En el **Anexo A** se detallan las características fisico-químicas que ayudaron a la optimización del método analítico desarrollado.

2.2.2. Ensayos preliminares

Una vez identificado los tiempos de retención de cada vitamina se realizó ensayos preliminares donde se evaluó factores como fase estacionaria, porcentaje de metanol, gradiente, pH.

Tabla 4-2. Desarrollo del método analítico.

Desarrollo del método	Condiciones	Observaciones
Prueba preliminar 1	-Fase -móvil: (80:20) Buffer:Metanol pH 2 -Tiempo de corrida:20 mins -Flujo: 1mL/min -Temperatura:35 °C -Volumen de inyección: 10 uL	Picos sin resolución, asimétricos. Carry over de principios activos Interferencia de conservantes con principios activos
Prueba preliminar 2	-Fase móvil: (65:35) Buffer:Metanol pH 2 -Tiempo de corrida:20 mins -Flujo: 1mL/min	Mejora de tiempo de retención y área de los picos en general

	<p>-Temperatura:35 °C</p> <p>-Volumen de inyección: 10 uL</p>	<p>Carry over del propil parabeno</p> <p>Resolución entre picos disminuye como consecuencia del aumento del aumento del tiempo de retención</p>
Prueba preliminar 3	<p>-Fase móvil: Buffer:Metanol:ACN pH 3</p> <p>-Tiempo de corrida:</p> <p>0-13 (80:17,5:2,5)</p> <p>13.1-25 (50:42,5:7,5)</p> <p>25.1-30 (80:17,5:2,5)</p> <p>-Flujo: 1mL/min en isocratico</p> <p>1,5 mL/min en gradiente</p> <p>-Temperatura:35 °C</p> <p>-Volumen de inyección: 10 uL</p>	<p>Disminución de tiempo de retención y área de los picos en general</p> <p>No se observa interferencia entre picos y conservantes</p>
Prueba preliminar 4	<p>-Fase móvil :(72,5:20:7,5)</p> <p>Buffer:Metanol:ACN</p> <p>-Tiempo de corrida: 40 mins</p> <p>-Flujo: 1mL/min en isocratico</p> <p>-Temperatura:35 °C</p> <p>-Volumen de inyección: 10 uL</p>	<p>Las vitaminas (C, B2, B3, B6) eluyen en 10 mins</p> <p>vitamina B1 y Benzoato de sodio eluyen hasta los 40 mins</p> <p>Propil parabeno presenta carry over en la corrida siguiente a los 20 mins, es decir eluye a los 60 mins.</p> <p>Cambio de fase móvil mejora la retención.</p>
Prueba preliminar 5	<p>-Fase móvil :Buffer:Metanol:ACN</p> <p>-Tiempo de corrida:</p> <p>0-15 (80:17,5:2,5)</p> <p>15.1-60 (50:43.8:6.3)</p> <p>60.1-70 (80:17,5:2,5)</p> <p>-Flujo: 1mL/min</p> <p>-Temperatura:35 °C</p> <p>-Volumen de inyección: 10 uL</p>	<p>En este ensayo se realizó una corrida de 70 mins para determinar todos los posibles picos que eluyen durante el análisis y así optimizar de mejor manera el método analítico</p>

Prueba preliminar 6	-Fase móvil :Buffer:Metanol:ACN -Tiempo de corrida: inicial (80:17,5:2,5) 15 (80:17,5:2,5) 20 (17.5:80:2.5) 25 (17.5:80:2.5) 30 (80:17,5:2,5) 35 (80:17,5:2,5) -Flujo: 1mL/min -Temperatura:35 °C -Volumen de inyección: 10 uL	Se logró mejorar los tiempos de retención, resolución y área de los picos No se observa interferencia entre picos de conservantes y principios activos Disminuye considerablemente el tiempo de corrida
Prueba preliminar 7	-Fase móvil :Buffer:Metanol:ACN -Tiempo de corrida: inicial (80:17,5:2,5) 6 (80:17,5:2,5) 16 (17.5:80:2.5) 18 (17.5:80:2.5) 21 (80:17,5:2,5) 24 (80:17,5:2,5) -Flujo: 1mL/min -Temperatura:35 °C -Volumen de inyección: 10 uL	Se logró disminuir aún más el tiempo de corrida del análisis Se modificó el gradiente de elución Método final con el cual se realizó la validación

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
 Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3. Validación del método analítico

2.3.1. Preparación de soluciones

2.3.1.1. Preparación estándares

Tabla 5-2. Concentración de estándares.

Vitaminas	C (mg/mL)
Tiamina	0,0232
Riboflavina 5 Fosfato	0,0328
Nicotinamida	0,2352
Piridoxina	0,0292

Ácido Ascórbico	1,2204
-----------------	--------

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3.1.2. Preparación de las muestras

-Placebo

Se pesó las cantidades necesarias de cada excipiente para 100 mL, tomando como referencia las cantidades que se encuentran declaradas en la fórmula maestra de Apetitol® Jarabe, ignorando los principios activos.

-Placebo Cargado

Se preparó el placebo cargado a partir de las soluciones de placebo y las soluciones estándar; tomando en cuenta las cantidades necesarias de cada principio activo. Se tomaron 3 mL de la solución estándar de Ácido Ascórbico, 0,058 mL de solución estándar de Tiamina clorhidrato, 0,082 mL de solución estándar de Riboflavina, 0,588 mL solución estándar de Nicotinamida y 0,073 mL de solución estándar de Piridoxina y se aforó a 25 mL con fase móvil.

-Agua purificada (Grado HPLC)

Obtener este tipo de agua conforme al Instructivo Analítico (Desmineralizador E-PURE BARNSTEAD). Filtrar por membrana 0,22 µm.

-Fase Móvil

Se realizó una mezcla entre Buffer pH 2,0 (80%), Metanol (17,5%), Acetonitrilo (2,5%). Agitar con agitador electromagnético por 10 min. hasta completa homogenización y se filtró por membrana 0,22 µm.

-Buffer

Empleando un vaso de precipitación, colocar agua Tipo I, agregar Ácido Heptanosulfónico, agitar constantemente por 10 minutos con agitador electromagnético y ajustar el pH a 2,0.

2.3.2. Parámetros de desempeño a evaluar

2.3.2.1. Selectividad

Tabla 6-2. Concentración de vitaminas hidrosolubles para parámetro de selectividad.

Ensayo	Pesos Vitaminas	C (mg/mL)	Nº de inyecciones
--------	-----------------	-----------	-------------------

Estándar preparar por duplicado	Vitaminas Hidrosolubles + Medio de disolución	B1 (0,0232)	Inyectar por triplicado
		B2 (0,0328)	
		B3 (0,2352)	
		B6 (0,0292)	
		C (1,2)	
Placebo cargado	Vitaminas Hidrosolubles + Medio de disolución	B1 (0,0232)	Inyectar por triplicado
		B2 (0,0328)	
		B3 (0,2352)	
		B6 (0,0292)	
		C (1,2)	
Placebo	Excipientes + Medio de disolución	-----	Inyectar por triplicado

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3.2.2. Linealidad y rango

Se debe preparar las soluciones con el fin de obtener una curva de calibración a 5 niveles con las respuestas de los picos de los cromatogramas (áreas) para cada principio activo, usando las soluciones de estándares para calcular la Linealidad del Sistema y las Muestras para la Linealidad del método. Intervalo con respecto a la especificación: 50-250%.

-Linealidad del Sistema

- Estándares de Vitaminas

Se preparó soluciones madres de cada vitamina hidrosoluble aforados con Agua Tipo I y Metanol Grado HPLC a las concentraciones expuestas en el método de selectividad.

De cada solución madre se tomaron alícuotas a 7 niveles (50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%) y aforar con fase móvil, como se establece en la **Tabla 7-2**

-Linealidad del Método

- Placebo Cargado

Preparar la solución tomando como referencia:

Preparación de la muestra, preparación de estándares a las concentraciones correspondientes

De esta solución tomar alícuotas a 7 niveles (50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%) y aforar con fase móvil, como se establece en la **Tabla 7-2**

Tabla 7-2. Pesos y diluciones para parámetro de Linealidad.

Vitamin a	Alícuota (mL)	Aforo (mL) Fase móvil	CONCENTRA CIÓN (mg/mL)	CONCENTRACI ÓN %	N° INYECCIO NES
Vitamina B1	0,029	25*	0,0116	50%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,041		0,0164		
Vitamina B3	0,294		0,1176		
Vitamina B6	0,037		0,0146		
Vitamina C	2		0,6000		
Vitamina B1	0,044	25*	0,0174	75%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,062		0,0246		
Vitamina B3	0,441		0,1764		
Vitamina B6	0,055		0,0219		
Vitamina C	2		0,9000		
Vitamina B1	0,058	25*	0,0232	100%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,082		0,0328		
Vitamina B3	0,588		0,2352		
Vitamina B6	0,073		0,0292		
Vitamina C	3		1,2000		
Vitamina B1	0,073	25*	0,0290	125%	Inyectar por triplicado

Vitamina B2	0,103		0,0410		
Vitamina B3	0,735		0,2940		
Vitamina B6	0,091		0,0365		
Vitamina C	4		1,5000		
Vitamina B1	0,087	25*	0,0348	150%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,123		0,0492		
Vitamina B3	0,882		0,3528		
Vitamina B6	0,110		0,0438		
Vitamina C	5		1,8000		
Vitamina B1	0,116	25*	0,0464	200%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,164		0,0656		
Vitamina B3	1,176		0,4704		
Vitamina B6	0,146		0,0584		
Vitamina C	6		2,4000		
Vitamina B1	0,145	25*	0,0580	250%	Inyectar por triplicado
Vitamina B2	0,205		0,0820		
Vitamina B3	1,470		0,5880		
Vitamina B6	0,183		0,0730		

Vitamina C	8		3,0000		
* Estándar Combinado					

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3.2.3. Exactitud

Se prepara las soluciones a siete concentraciones diferentes e inyectando por triplicado. Tomando como dato primario las respuestas de los picos de cada principio activo (áreas), calcular el porcentaje de recuperación de análisis.

Intervalo con respecto a la especificación 50% - 250%

Concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, según lo expuesto en la tabla 12131 y calcular el porcentaje de recuperación conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado} = \left(\frac{ru}{rs}\right) \times \left(\frac{Cs}{Cu}\right) \times 100$$

ru = respuesta del pico de la Solución muestra

rs = respuesta del pico de la Solución estándar

Cs = concentración de principios activos en la Solución estándar (mg/mL)

Cu = concentración nominal de principios activos en la Solución muestra (mg/mL)

2.3.2.4. Precisión

-Repetibilidad

- Repetibilidad del Sistema: Preparar soluciones de cada estándar de vitamina al 100% e inyectar por sextuplicado
- Repetibilidad del Método: Preparar soluciones de placebo cargado al 100% e inyectar por sextuplicado

-Precisión intermedia

Para este análisis se tomará en cuenta precisión intermedia de sistema y del método, dentro del mismo laboratorio y empleando el mismo instrumental y equipo con dos analistas en dos días diferentes.

2.3.2.5. Robustez

En este análisis se aplicará el diseño experimental factorial de cribado, los datos fueron generados en el software estadístico STAT GRAPHICS; todo esto con el objetivo de analizar el efecto de las especificaciones operacionales sobre el estudio de resultados obtenidos de cada estándar.

Sumado a esto, se debe establecer factores y niveles que van a influir en el desarrollo del método analítico, **Tabla 8-2**

Tabla 8-2. Variables propuestas para parámetro de Robustez.

N°	FACTOR	VALOR DE CONDICIÓN ESTABLECIDA EN EL MÉTODO	NIVEL		RESPUESTAS EVALUADAS
			Bajo	Alto	
1	Temperatura Columna	35°C	33°C	37°C	Tiempo de Corrida, Factor de Asimetría, Número de Platos Teóricos, Resolución
2	Flujo	1.0mL/min	0.8mL/min	1.2mL/min	
3	Ph	2	1.8	2.2	
4	Composición de la Fase Móvil	Buffer Ácido Heptano Sulfónico pH 2.0 / Metanol / Acetonitrilo (82,5:15:2,5)	Buffer Ácido Heptano Sulfónico pH 2.0 / Metanol / Acetonitrilo (80:17,5:2,5)	Buffer Ácido Heptano Sulfónico pH 2.0 / Metanol / Acetonitrilo (85:12,5:2,5)	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

Tabla 9-2. Variables respuestas establecidas para el diseño experimental (unidad).

Respuestas	Unidades
Tiempo de corrida	Min
CFactor de Asimetría	-
Número de Platos Teóricos	-
Resolución	-

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3.2.6. Estabilidad

Se prepara soluciones de estándar combinado y se determina la estabilidad de la solución, en un intervalo de tiempo

Tabla 10-2. Intervalo de tiempo para análisis de Estabilidad.

ENSAYO: VALORACIÓN	Condiciones de Almacenamiento	MUESTREAR Y ANALIZAR		
		Estándar	Ambiente (25°C)	4 horas
Refrigeración (4°C)	4 horas		18 horas	24 horas
Congelación (-4°C)	4 horas		18 horas	24 horas

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

Tabla 11-2. Pesos y diluciones para parámetro de Estabilidad.

Ensayo	Pesos Vitaminas	C (mg/mL)	Nº de inyecciones
Estándar preparar por duplicado	Vitaminas Hidrosolubles + Medio de disolución	B1 (0,0232)	Inyectar por triplicado
		B2 (0,0328)	
		B3 (0,2352)	
		B6 (0,0292)	
		C (1,2)	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

2.3.2.7. Límite de detección y límite de cuantificación (LOD-LOQ)

Tabla 12-2. Límite de LOD y LOQ calculados para cada vitamina.

Criterios de Aceptación	Vitamina	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
De 3 a 10 desviaciones para el límite de detección	Vitamina B1	1,624X10 ⁻³	4,921X10 ⁻³
	Vitamina B2	1,063X10 ⁻³	3,22X10 ⁻³
	Vitamina B3	6,96X10 ⁻³	0,02
	Vitamina B6	6,13X10 ⁻³	0,018
	Vitamina C	0,060	0,1818

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

2.3.2.8. *Idoneidad del sistema*

El equipo HPLC permite realizar el ensayo Situability System Test (SST) en el software Clarity, donde se evalúan los siguientes parámetros: Área, altura, cantidad, factor de asimetría, eficiencia de platos teóricos y resolución

Método: 6 inyecciones al 100% del estándar combinado

2.3.2.9. *Incertidumbre de la medición*

- Se define como el mensurando y al porcentaje de principio activo determinado.
- Se identifican las magnitudes de entrada X_i y se establece el modelo matemático que determinará la incertidumbre de medición del mensurando Y .

$$y = f(x)$$

- Se identifican las fuentes de incertidumbre.
- Se cuantifica la variabilidad de cada fuente y se le asocia a una distribución (Normal, Rectangular, Triangular, etc.).
- Se obtiene la incertidumbre estándar $u(x_i)$
- Se estiman las correlaciones (por medio de la ley de propagación de la incertidumbre) y se determina la incertidumbre estándar combinada u_c .

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 [u(x_i)]^2}$$

Se determina el nivel de confianza deseado.

Se calculan los grados de libertad efectivos y se determina el factor de cobertura k .

Con el factor de cobertura se determina la incertidumbre expandida U .

$$U = u_c \times k$$

2.3.3. Registro y revisión de datos

Tabla 13-2. Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto.

PARÁMETRO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
SELECTIVIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	El tiempo de retención del pico principal de la Solución Muestra corresponde al de la Solución Estándar. No debe existir diferencia estadística significativa. p (valor): ≥ 0.05	TEST DE STUDENT
	INTERFERENCIA CON EL PLACEBO	El/los principio/s activo/s no deben presentar interferencia de otras sustancias o impurezas presentes en la formulación del producto. Los excipientes no deben retenerse en el mismo tiempo que los activos.	CUALITATIVO
	PORCENTAJE DE DISCREPANCIA	Máximo 5%	% Discrepancia= Respuesta media placebo cargado – Respuesta media estándar) x100 / Respuesta media estándar o activo solo
LINEALIDAD Y RANGO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$r \geq 0.999$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN-MÍNIMOS CUADRADOS
	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	$r^2 \geq 0.990$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN-MÍNIMOS CUADRADOS

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES RESPUESTA	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser $\leq 5\%$ para indicar linealidad	$CV(\%) = \frac{S}{X} * 100$ X= valor medio de los resultados S = desviación estándar
PENDIENTE	Informativo	TEST DE STUDENT
INTERCEPTO Y TEST DE PROPORCIONALIDAD	Informativo	TEST DE STUDENT
REGRESIÓN LINEAL	ANOVA para la regresión: $\geq 0,05$. La regresión estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0.	ANOVA - REGRESIÓN LINEAL
HOMOGENIDAD DE VARIANZAS	p (valor): ≥ 0.05	TEST LEVENE
HOMOCEDASTICIDAD	Constante	GRÁFICA DE RESIDUOS
COMPARACIÓN PLACEBO CARGADO Y ESTÁNDAR	No debe existir diferencia estadística significativa entre el valor medio del placebo cargado y el estándar p (valor): ≥ 0.05	TEST DE STUDENT
EL FACTOR CONCENTRACIÓN NO INFLUYE EN LA VARIABILIDAD DE LOS RESULTADOS	p (valor): ≥ 0.05	TEST LEVENE

EXACTITUD	RECOBRO O PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	97% - 103% de la cantidad de principio activo adicionado en el placebo.	Resultado = (ru/ rs) x (Cs/ Cu) x 100
PRECISIÓN.- - Repetibilidad - Precisión Intermedia	REPETIBILIDAD DEL SISTEMA O INSTRUMENTAL	Coefficiente de variación menor o igual a 2.0%.	$CV(\%) = \frac{S}{X} * 100$ X= valor medio de los resultados S = desviación estándar
	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	Coefficiente de variación menor o igual a 2.0%	
	PRECISIÓN INTERMEDIA	Coefficiente de variación menor o igual a 4.0%	
	LOS ANÁLISIS EN LABORATORIO POR DIFERENTES ANALISTAS NO DEBEN TENER EFECTO ESTADÍSTICO SIGNIFICATIVO	p (valor): ≥ 0.05	ANOVA
ROBUSTEZ	DETERMINACIÓN DE DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS	p (valor): ≥ 0.05	ANOVA

	EVALUACIÓN DE LOS GRÁFICOS SUPERFICIE-REPUESTA PARA CONDICIONES ÓPTIMAS	Zona Caliente Zona Fría Cimas Valles	DISEÑO DE CRIBADO Factorial 2 ⁴
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el $RSD \leq 20\%$ de la precisión del sistema.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$ X= valor medio de los resultados S = desviación estándar
	DEGRADACIÓN FORZADA	Identificación de Degradantes y sus tiempos de retención	Cualitativo
IDONEIDAD DEL SISTEMA - (SYSTEM SUITABILITY TEST)	PRECISIÓN DEL SST	$RSD \leq 2\%$	SST SOFTWARE CLARITY SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC
	FACTOR DE CAPACIDAD	$K' > 1$	
	NÚMEROS DE PLATOS TEÓRICOS	$N > 2000$	
	FACTOR DE ASIMETRÍA	Asimetría < 2.0	
	RESOLUCIÓN	$R_s > 2.0$	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Desarrollo del método

En el desarrollo del método analítico se evaluaron varios parámetros físico-químicos detallados en el **Anexo A**, en conjunto con la bibliografía expuesta en el marco teórico se estableció las condiciones de operación (**Tabla 1-3**) las cuales fueron evaluadas posteriormente en los ensayos de validación.

Tabla 1-3. Resultados del ensayo Selectividad.

Fase Estacionaria:	Columna Lichrospher 100RP 18 5 μm										
Flujo:	1.0 mL/min										
Detector:	<table border="1"><thead><tr><th>Tiempo (min)</th><th>UV-VIS (nm)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0-6.0</td><td>267nm</td></tr><tr><td>6.1-12.0</td><td>290nm</td></tr><tr><td>12.1-18.0</td><td>248nm</td></tr><tr><td>18.1-24.0</td><td>400nm</td></tr></tbody></table>	Tiempo (min)	UV-VIS (nm)	0.0-6.0	267nm	6.1-12.0	290nm	12.1-18.0	248nm	18.1-24.0	400nm
	Tiempo (min)	UV-VIS (nm)									
	0.0-6.0	267nm									
	6.1-12.0	290nm									
	12.1-18.0	248nm									
18.1-24.0	400nm										
Volumen de inyección:	5 μl										
Temperatura de la columna:	35°C										
Tiempo	24 minutos										

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

Al tener una mezcla compleja de vitaminas con características físico-químicas distintas se evaluó la incidencia de los factores: pH, concentración de orgánico, temperatura de la columna y flujo sobre la separación de las mismas. El pH ácido de la fase móvil repercute en el estado de ionización de las vitaminas, el pka de cada vitamina va a determinar si es un ácido o una base, las especies básicas o ligeramente básicas se van a encontrar en su forma ionizada reaccionando con el reactivo PIC, en consecuencia aumentando su retención en la fase estacionaria; en las primeras etapas del desarrollo analítico se fue probando distintos valores de pH para determinar el valor óptimo al cual se logra una separación adecuada; los tiempos de ejecución del análisis superaban los 60 min por lo que se aplicó un gradiente de elución que redujo significativamente los tiempo de ejecución. Finalmente se aumentó el área de respuesta individualizando la longitud de onda de cada vitamina.



Gráfico 1-3. Cromatograma del método analítico inicial.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

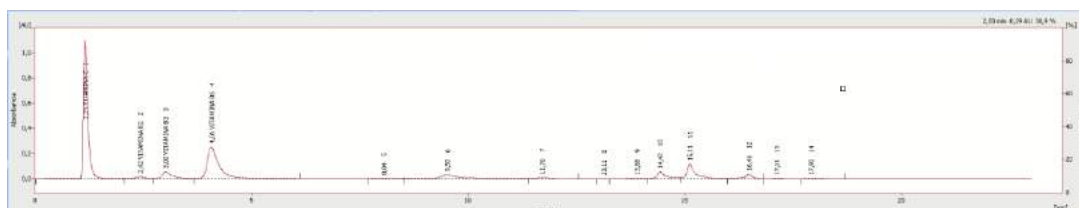


Gráfico 2-3. Cromatograma del método analítico final.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

3.2. Validación del método analítico

3.2.1. Selectividad

Tabla 2-3. Resultados del ensayo Selectividad.

Criterios de aceptación	VITAMINAS	PARÁMETRO (PORCENTAJE DE DISCREPANCIA)		DECISIÓN
		Áreas	Tiempos	
≤ 5%	TIAMINA	1,589	0,151	Cumple
	RIBOFLAVINA	3,465	0,459	
	NICOTINAMIDA	3,417	0,620	
	PIRIDOXINA	1,572	0,587	
	ÁCIDO ASCÓRBICO	1.382	0,523	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

En la **Tabla 2-3** se muestra el porcentaje de discrepancia de cada vitamina hidrosoluble; el objetivo del ensayo es poder determinar si el método posee la capacidad de medir y valorar al mismo tiempo o a distinto tiempo los analitos de interés (AEFI 2001). Para las vitaminas de interés se determinaron porcentajes de discrepancia de áreas y tiempos de retención, para Tiamina

1,589% y 0,151, Riboflavina 3.465% y 0,459, Nicotinamida 3,417% 0,620, Piridoxina 1,572% y 0,587 y Ácido Ascórbico 1.382% y 0,523.

Estos resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas y se encuentran dentro de los rangos establecidos; sin embargo, 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 podría ser debido a que las dos vitaminas 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.

El porcentaje de discrepancia de los tiempos de retención son inferiores al 1% siendo el más alto 0,620 de la nicotinamida, pero al ser valores muy bajos no se consideran críticos para el ensayo.

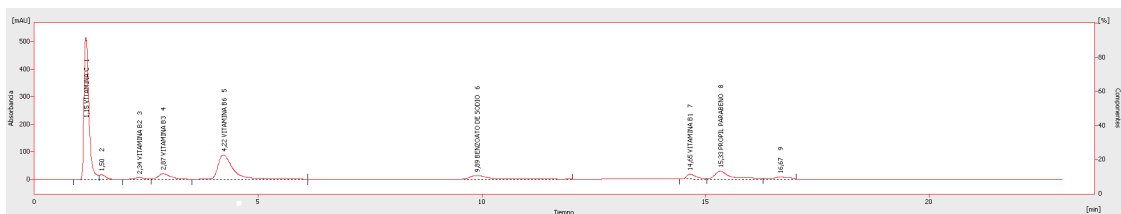


Gráfico 3-3. Cromatograma Selectividad del Sistema.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

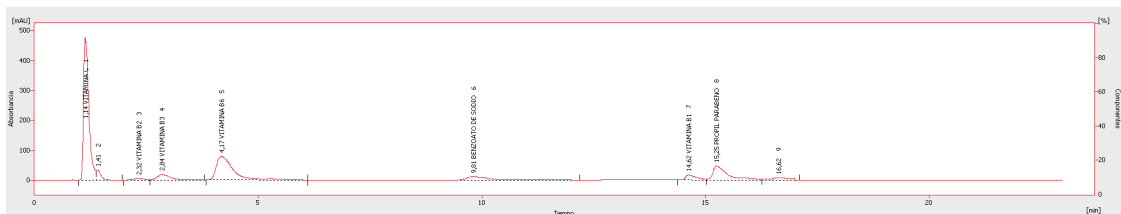


Gráfico 4-3. Cromatograma Selectividad del Placebo Cargado.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

3.2.2. Linealidad y rango

El ensayo de linealidad en la validación demuestra que el método HPLC proporciona una respuesta lineal de acuerdo a las concentraciones a las cuales se evaluó cada vitamina (Vitamina C, Vitamina B1, Vitamina B2, Vitamina B3, Vitamina B6). Se analizó la respuesta de soluciones estándares combinados (linealidad del sistema) y soluciones placebo cargado (linealidad del método) a concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 200% y 250%. Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 3-3. Resultados del análisis de linealidad del sistema vitaminas Hidrosolubles.

Ensayo	Concentración (%)	Respuesta Ácido ascórbico (Vitamina C)	Respuesta Nicotinamida (Vitamina B3)	Respuesta Piridoxina (Vitamina B6)	Respuesta Riboflavina (Vitamina B2)	Respuesta Tiamina (Vitamina B1)
1	50	2058,095	1041,982	177,793	184,547	169,985
	50	2065,188	1057,167	180,636	189,490	166,164
	50	2054,392	1035,944	181,028	183,763	162,677
2	75	3096,549	1654,774	352,772	308,136	229,625
	75	3090,658	1653,121	350,950	307,916	228,844
	75	3094,831	1654,098	341,302	308,495	227,662
3	100	3867,742	2191,425	351,996	404,882	309,853
	100	3994,977	2196,246	352,731	406,033	300,022
	100	3987,037	2193,824	352,731	405,495	304,101
4	125	5001,429	2812,453	443,083	501,533	351,144
	125	4974,657	2800,336	439,869	500,789	352,563
	125	4977,522	2807,969	441,320	500,789	355,353
5	150	5821,290	3315,700	530,917	593,913	421,242
	150	5849,220	3327,924	532,621	594,333	420,973
	150	5824,086	3323,183	531,842	593,114	420,539
6	200	7378,792	4431,425	699,282	798,682	523,110
	200	7378,966	4436,056	698,817	798,869	520,903
	200	7368,508	4432,524	698,662	790,061	511,017
7	250	9466,623	5464,615	1016,158	1006,118	638,197
	250	9436,971	5451,387	1006,474	1005,635	631,374
	250	9449,531	5456,481	1016,158	1008,236	630,560

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

Tabla 4-3. Resultados del análisis de linealidad del método vitaminas Hidrosolubles.

Ensayo	Concentración (%)	Respuesta Ácido ascórbico (Vitamina C)	Respuesta Nicotinamida (Vitamina B3)	Respuesta Piridoxina (Vitamina B6)	Respuesta Riboflavina (Vitamina B2)	Respuesta Tiamina (Vitamina B1)
1	50	1992,964	1016,845	175,549	178,176	166,889
	50	1967,549	1012,259	179,105	183,624	162,760
	50	1988,434	1018,722	174,279	178,489	159,943
2	75	2968,086	1654,175	347,296	307,217	220,848
	75	2963,677	1654,314	347,295	308,273	223,196

	75	2956,608	1645,176	333,645	305,923	220,439
3	100	3866,455	2164,127	348,927	410,011	300,341
	100	3857,092	2160,467	347,217	407,901	296,746
	100	3824,632	2139,256	348,634	403,663	301,161
4	125	4801,196	2713,775	441,617	500,170	350,373
	125	4822,095	2727,280	437,247	504,231	350,542
	125	4789,570	2711,367	440,528	501,291	354,194
5	150	5642,865	3271,689	528,228	602,058	414,562
	150	5604,558	3245,762	530,905	597,065	412,362
	150	5644,379	3269,530	529,245	602,898	411,345
6	200	7325,815	4258,094	688,943	802,453	519,669
	200	7338,576	4300,395	688,985	807,258	512,861
	200	7294,308	4279,957	698,181	800,509	509,936
7	250	9374,355	5383,638	1006,091	1010,106	621,569
	250	9377,366	5380,942	1003,369	1008,975	625,494
	250	9351,850	5354,316	1005,438	999,976	620,867

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Los test estadísticos realizados a los datos obtenidos del ensayo de linealidad de estándares combinados y placebo cargado son:

- Determinación de la ecuación de la recta
- Representación gráfica de la recta de regresión y de los resultados experimentales
- Coeficiente de correlación (r) y de determinación (r²)
- Características de la varianza residual
- Análisis de varianza, después de la comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de residuales.
- Test de proporcionalidad.
- Comparación de las medias entre placebo cargado y estándares combinados

Tabla 6-3. Resultados del análisis de Linealidad del sistema vitaminas Hidrosolubles.

CRITERIO DE ACEPTACION		RESULTADO					DECISIÓN
		AC. ASCORBICO	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA	RIBOFLAVINA	TIAMINA	
Coeficiente de correlación	$r \geq 0,999$	Estándar 0,999011 Placebo cargado 0,999525	Estándar 0,999663 Placebo cargado 0,999698	Estándar 0,998967 Placebo cargado 0,998924	Estándar 0,999596 Placebo cargado 0,99952	Estándar 0,998823 Placebo cargado 0,998282	Cumple
Coeficiente de determinación	$r^2 \geq 0,990$	Estándar 0,998023 Placebo cargado 0,999051	Estándar 0,999326 Placebo cargado 0,999396	Estándar 0,997934 Placebo cargado 0,997849	Estándar 0,999191 Placebo cargado 0,999041	Estándar 0,997648 Placebo cargado 0,996567	Cumple
Coeficiente de variación de los factores respuesta	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser $\leq 5\%$	Estándar 0,4237 Placebo cargado 0,3790	Estándar 0,2553 Placebo cargado 0,4029	Estándar 0,5707 Placebo cargado 0,8091	Estándar 0,4095 Placebo cargado 0,6861	Estándar 0,9782 Placebo cargado 0,8840	Cumple
Pendiente	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Cumple
Intercepto informativo	Comprobación que la recta pasa por el origen $a=0$	Estándar P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000	Cumple

		Placebo cargado P (valor) 0,0000	Placebo cargado P (valor) 0,0000	Placebo cargado P (valor) 0,0000	Placebo cargado P (valor) 0,0000	Placebo cargado P (valor) 0,0000	
Límite de confianza		Estándar Hipérbole superior 4005,01 Hipérbole inferior 3909,97 Placebo cargado Hipérbole superior 3867,35 Hipérbole inferior 3801,29	Estándar Hipérbole superior 2216,73 Hipérbole inferior 2182,92 Placebo cargado Hipérbole superior 2168,33 Hipérbole inferior 2137,07	Estándar Hipérbole superior 393,22 Hipérbole inferior 351,52 Placebo cargado Hipérbole superior 388,89 Hipérbole inferior 348,05	Estándar Hipérbole superior 401,86 Hipérbole inferior 395,09 Placebo cargado Hipérbole superior 402,35 Hipérbole inferior 394,91	Estándar Hipérbole superior 296,69 Hipérbole inferior 288,32 Placebo cargado Hipérbole superior 291,81 Hipérbole inferior 283,49	Cumple
Regresión lineal	La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0	Estándar Y= 340,19 + 36,173*X Placebo cargado Y= 203,417 + 36,309*X	Estándar Y= -5,81791 + 22,0564*X Placebo cargado Y = -1,34516 +21,5405*X	Estándar Y= -54,2204 + 4,25536*X Placebo cargado Y= -56,2407 + 4,23361*X	Estándar Y= -4,5768 + 4,03051*X Placebo cargado Y = -7,90962 + 4,06539*X	Estándar Y= 60,1081 + 2,30829*X Placebo cargado Y = 60,6944 + 2,27772*X	Cumple
Homogeneidad de varianzas	p (valor) \geq 0,05 Test de Levens	Estándar 0,558773 Placebo cargado	Estándar 0,485764 Placebo cargado	Estándar 0,594696 Placebo cargado	Estándar 0,659277 Placebo cargado	Estándar 0,687053	Cumple

		0,961021	0,809414	0,820101	0,947003	Placebo cargado 0,830988	
Homocedasticidad Revisión de residuos	Constante	No hay tendencias, Gráfica de residuos muestra una distribución aleatoria de los puntos					
ANOVA	Para la regresión estándar $\geq 0,05$ La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0.	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Cumple
El factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados	$p(\text{valor}) \geq 0,05$	Estándar 0,558773 Placebo cargado 0,961021	Estándar 0,485764 Placebo cargado 0,809414	Estándar 0,594696 Placebo cargado 0,820101	Estándar 0,659277 Placebo cargado 0,947003	Estándar 0,687053 Placebo cargado 0,830988	Cumple
Comparación placebo cargado vs estándar	Significativa entre el valor medio del placebo cargado y el estándar $p(\text{valor}) \geq 0,05$	0,875208	0,884942	0,955069	0,986703	0,940462	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

En la **Tabla 7-3.**, se detallan los resultados obtenidos de los parámetros de linealidad y rango; se determinó la ecuación de la recta entre el placebo cargado vs el nivel, y el estándar combinado vs nivel y su representación gráfica como se muestra en el **Anexo B1.**

El coeficiente de correlación entre las muestras analizadas oscila entre $r=0,998823$ a $r= 0,999663$ para el estándar combinado (linealidad del sistema) y entre $r=0,998282$ a $r= 0,999698$ para el placebo cargado (linealidad del método); determinando la existencia de una relación lineal con una elevada probabilidad entre la variable concentración y la variable respuesta (área del pico).

El ensayo de coeficiente de determinación indica la proporción de la variación total de la variable respuesta; en las muestras analizadas oscila entre $r=0,997648$ a $r= 0,999326$ para el estándar combinado (linealidad del sistema) y entre $r=0,9966567$ a $r= 0,999396$ para el placebo cargado (linealidad del método), las cuales cumplen con el criterio de $r^2 \geq 0,990$.

El coeficiente de variación del factor respuesta tiene un criterio de aceptación menor o igual al 5%, considerándose como falta de linealidad los valores que excedan este rango; todos las respuestas obtenidas se encuentran dentro del rango menor a 5%, observándose que el valor más elevado es el de Tiamina con 0,9782 y 0,8840 para el estándar combinado y el placebo cargado respectivamente; esto se debe a la ínfima concentración de la misma en la formulación; las demás vitaminas presentan un coeficiente de variación entre 0,2553 a 0,5070 y 0,3790 a 0,8091 para el estándar combinado y el placebo cargado respectivamente, valores que son aceptables y se encuentran dentro del rango especificado anteriormente de 5% (AEFI 2001)

El siguiente criterio evaluado es la Pendiente (b) e intercepto los estimadores de la ordenada del origen, en la cual la pendiente se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (Respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito); este valor proviene de la regresión lineal y debe ser significativamente diferente de cero.

Los resultados obtenidos con el análisis de linealidad para todas las vitaminas analizadas tanto para estándar combinado y placebo cargado dan resultados de p (valor): 0,00 dando a entender que el resultado es estadísticamente diferente a cero.

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplicó el test de Levene que permite indicar si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados; se aplicó tanto a estándar combinado como a placebo cargado y se considera aceptado cuando el p (valor) > 0.05 es decir que no existe diferencia significativa entre las desviaciones estándar **Anexo B1**

La varianza residual (homocedasticidad) aporta información sobre la validez del modelo, en este parámetro se evaluó la distribución aleatoria de los puntos representados en el gráfico de residuos, los cuales no reflejan ninguna tendencia. En el **Anexo B1** se presenta cada gráfico de residuos de los estándares combinados y los placebos cargados por vitamina.

Finalmente, se comparó las medias entre el placebo cargado y el estándar combinado con una prueba de t-student para determinar si existe diferencia significativa entre ambas muestras; se considera aprobado cuando el p (valor) es mayor a 0.05 al 95% de confianza. En la tabla 32, se expone los resultados de la comparación de medias que para todas las vitaminas el $p(\text{valor}) > 0.05$. En el Anexo B1 se observa la comparación entre ambas muestras con gráficos de densidad suavizada y cuantiles.

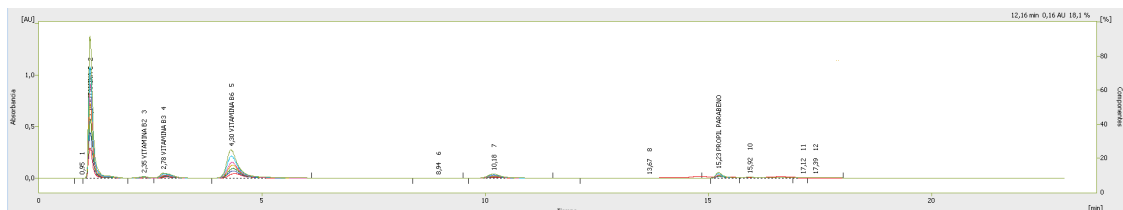


Gráfico 5-3. Cromatograma Linealidad del Sistema.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

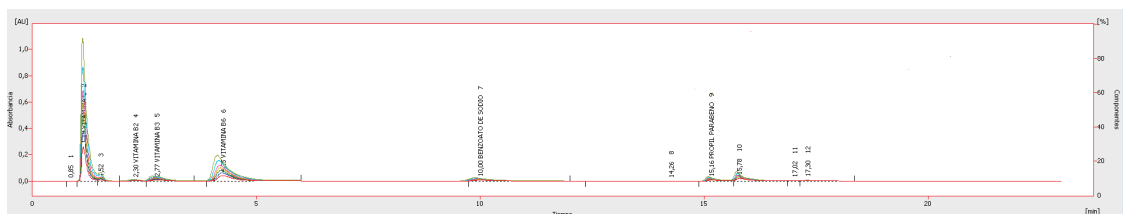


Gráfico 6-3. Cromatograma Linealidad del Método.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

3.2.3. Exactitud

Tabla 8-3. Resultados del análisis de Exactitud del sistema vitaminas Hidrosolubles.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VITAMINA					DECISIÓN
		AC. ASCÓRBICO	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA	RIBOFLAVINA	TIAMINA	
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	97% al 103% de la cantidad de principio activo adicionado en el placebo	97,26 %	97,89%	98,95%	99,89%	98,35%	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estandar 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.

3.2.3.1. Precisión

Tabla 9-3. Resultados del análisis de Repetibilidad del sistema y método, Precisión Intermedia de vitaminas Hidrosolubles.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VITAMINA					DECISIÓN
		AC. ASCORBICO	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA	RIBOFLAVINA	TIAMINA	
REPETIBILIDAD DEL SISTEMA	Coefficiente de variación menor o igual a 2%	0,5883	1,6658	1,0649	1,8247	0,7641	Cumple

REPETIBILIDAD DEL METODO	Coefficiente de variación menor o igual a 2%	0,2379	0,5071	0,9161	0,2952	0,8712	Cumple
	Coefficiente de variación menor o igual a 4%	0,505	0,346	1,354	1,822	3,184	Cumple
PRECISION INTERMEDIA	Los análisis en laboratorio por diferentes analistas no deben tener efecto estadístico significativo p (valor) : $\geq 0,05$ comparación de medias	0,05779 81	0,15331 9	0,80267 1	0,09082 24	0,12482 4	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el ensayo de Precisión, se evaluó repetibilidad y precisión intermedia del sistema y del método en etapas distintas, los resultados obtenidos en este ensayo se encuentran plasmados en la **Tabla 9-3**.

El coeficiente de variación de Riboflavina, en el análisis de repetibilidad del sistema fue 1,8247 la cual no se encuentra fuera del rango establecido para este ensayo; este valor puede deberse a la naturaleza inestable de la vitamina frente a condiciones ambientales, observándose variación en el área bajo la curva de las muestras inyectadas.

Los picos de la Riboflavina, nicotinamida y piridoxina eluyen de manera consecutiva provocando una variación en sus áreas cuando no ocurre una correcta integración de los picos; esto se ve reflejado en sus valores elevados de coeficiente de variación. Para el ensayo de repetibilidad del método el coeficiente de variación más elevado es el de la Piridoxina con un 0,9161 % que se encuentra dentro del rango establecido.

La precisión intermedia evalúa la variación del método al realizar inyecciones consecutivas sobre la misma muestra en condiciones operativas diferentes, para lo cual se evaluó la variación entre analistas y días distintos. Los valores presentados en la **Tabla 9-3** muestran el coeficiente de variación grupal para cada vitamina analizada encontrándose dentro del rango establecido.

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.

3.2.3.2. Robustez

-Tiempo de retención

Se evaluaron los factores pH, flujo, metanol y temperatura frente a las vitaminas hidrosolubles ácido ascórbico, riboflavina, nicotinamida y piridoxina.

- Ácido ascórbico (Vitamina C)

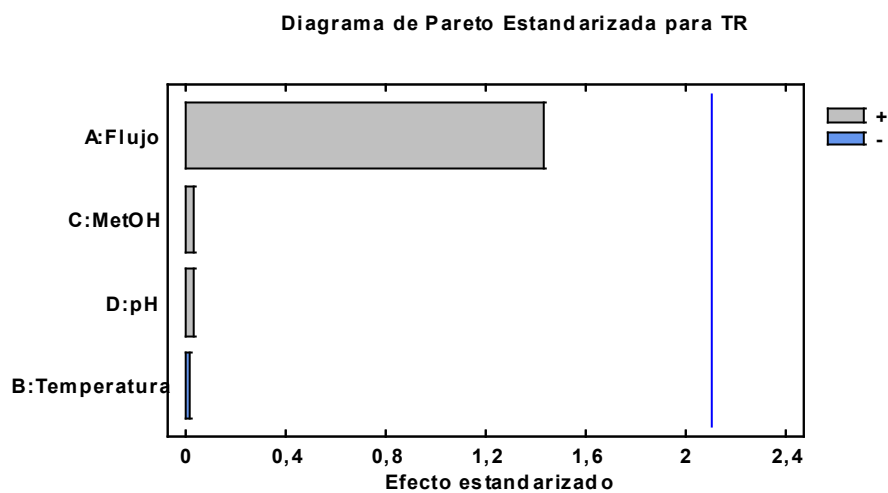


Gráfico 7-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina C en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020

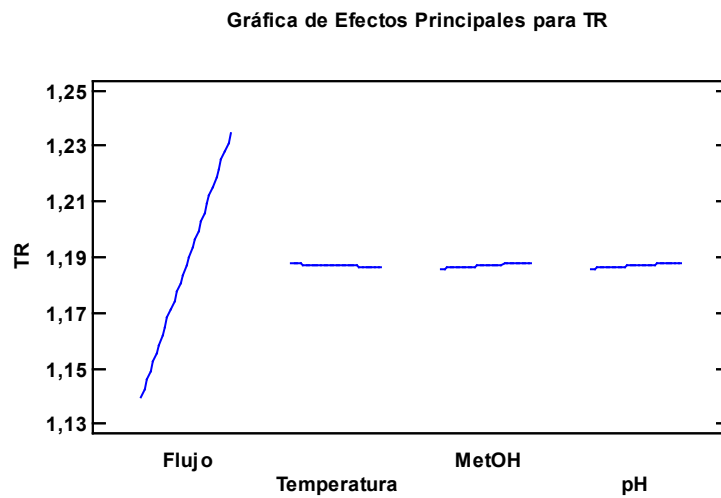


Gráfico 8-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención en influencia de vitamina C de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Tiamina (Vitamina B1)

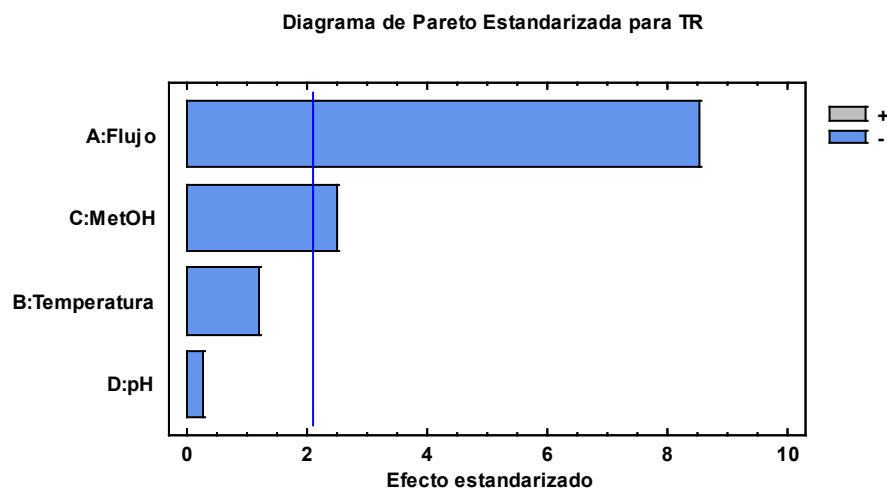


Gráfico 9-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Gráfica de Efectos Principales para TR

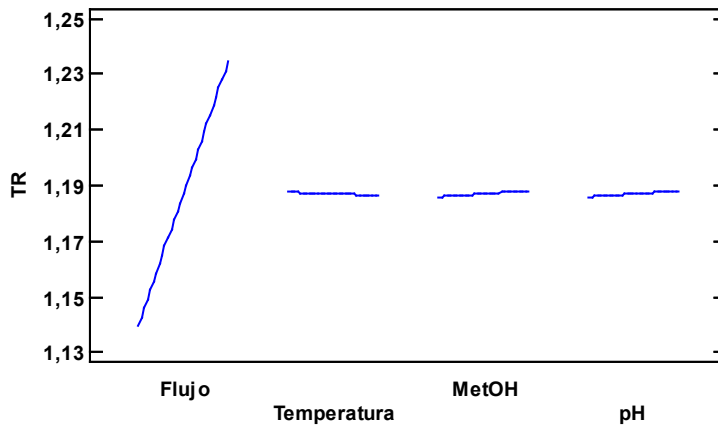


Gráfico 10-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

Diagrama de Pareto Estandarizada para TR

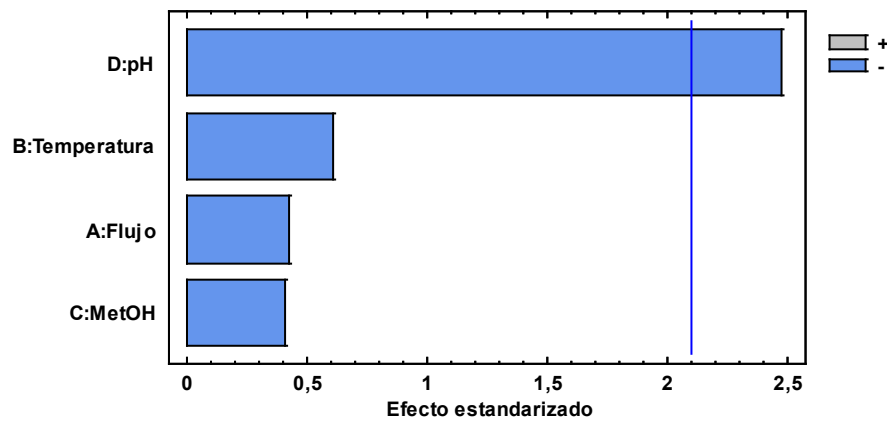


Gráfico 11-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

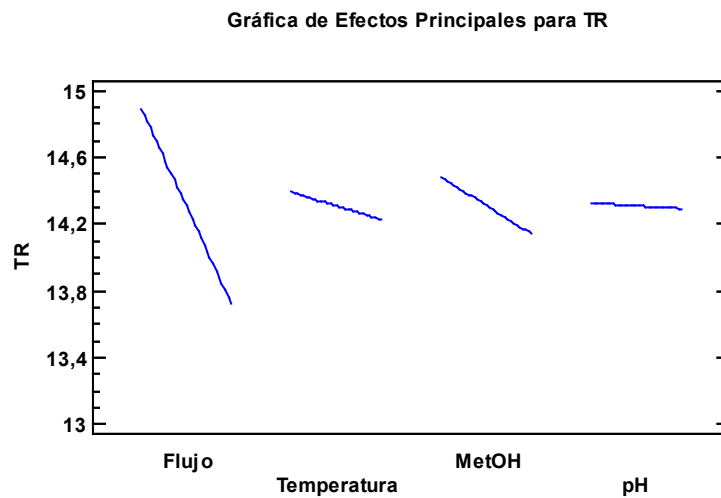


Gráfico 12-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

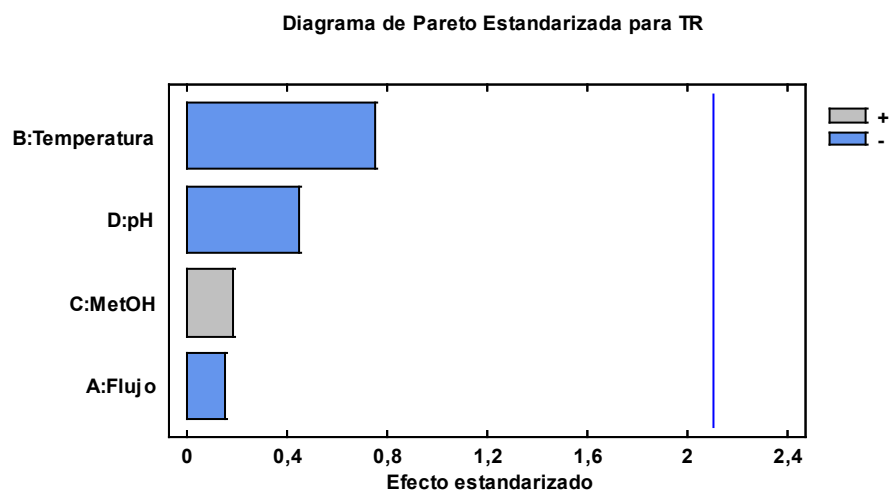


Gráfico 13-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

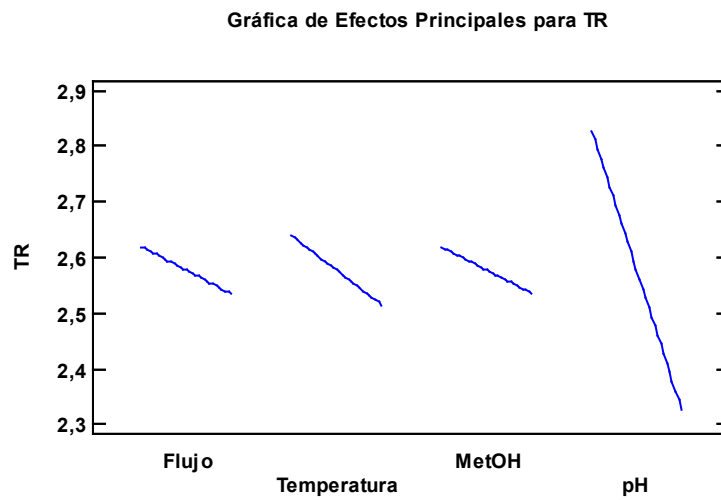


Gráfico 14-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

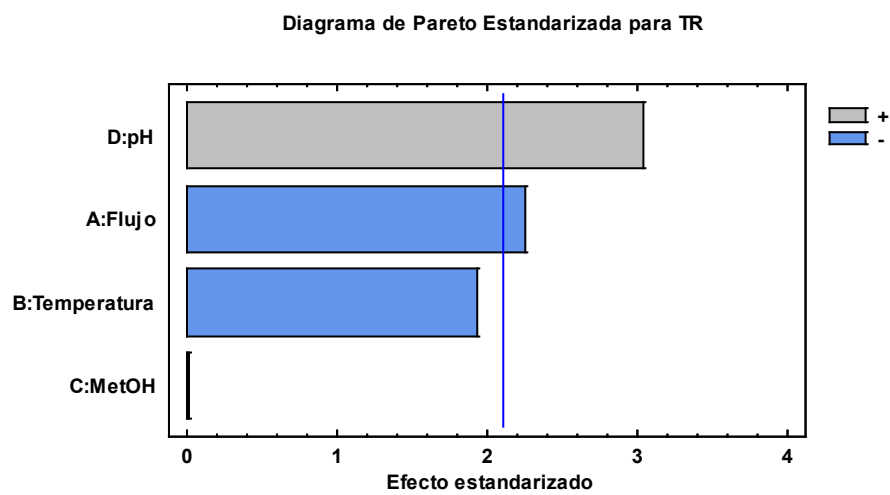


Gráfico 15-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

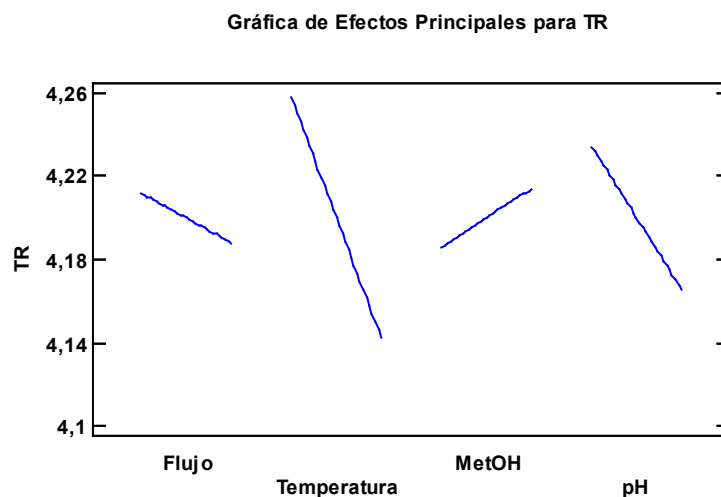


Gráfico 16-3. Gráfico de efectos principales para el tiempo de retención de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el ensayo de robustez se evaluó el tiempo de retención tomando como factores el valor de pH, % de orgánico, velocidad de flujo y temperatura de la columna para todas las vitaminas hidrosolubles; el objetivo fue disminuir el tiempo de retención en que eluye cada vitamina.

Los resultados expuestos en los gráficos anteriores de 7-4 a 16.4 muestran que para ácido ascórbico y nicotinamida no existió diferencia significativa entre los parámetros comparados, esto quiere decir que, la variación de los factores evaluados en el rango de estudio no va a afectar significativamente al tiempo de retención de estas vitaminas.

Al evaluar el factor pH con respecto al tiempo de retención de la Riboflavina se determinó que se encuentra fuera del nivel de significancia de 5% con una influencia negativa; según el gráfico 6.4 de efectos principales al aumentar las variables flujo, temperatura, % de orgánico y pH de manera lineal disminuye el tiempo de retención para esta vitamina.

La Piridoxina presentó una diferencia estadísticamente significativa al evaluar los factores pH y flujo con respecto al tiempo de retención con una variación positiva y negativa respectivamente; según el gráfico de efectos principales 10-4 al aumentar las condiciones de pH, flujo y temperatura el tiempo de retención disminuyó, por el contrario, al aumentar el % de orgánico el tiempo de retención aumento.

Al evaluar el tiempo de retención de la tiamina en relación a los factores orgánico y flujo se encontraron por debajo del nivel de significancia del 5%; la variación del % de orgánico no influye sobre esta vitamina ya que tiene una elución en isocrático y el factor orgánico solo varia dentro del tiempo de gradiente; el gráfico de efectos principales 4-4 para la tiamina muestra una tendencia lineal que al aumentar los factores temperatura, orgánico y pH se observa que no existe una variación considerable del tiempo de retención, no es así con el flujo el cual al aumentar su valor de igual manera aumenta el tiempo de retención.

Se determinó las condiciones óptimas de los factores pH, flujo, metanol y temperatura frente a las vitaminas hidrosolubles ácido ascórbico, riboflavina, nicotinamida y piridoxina. Los resultados se exponen a continuación:

- Ácido ascórbico (Vitamina C)

Tabla 10-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de Vitamina C.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	0,665362
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3588
MetOH	78,2955	86,7045	78,2955
pH	1,66364	2,33636	1,66364

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

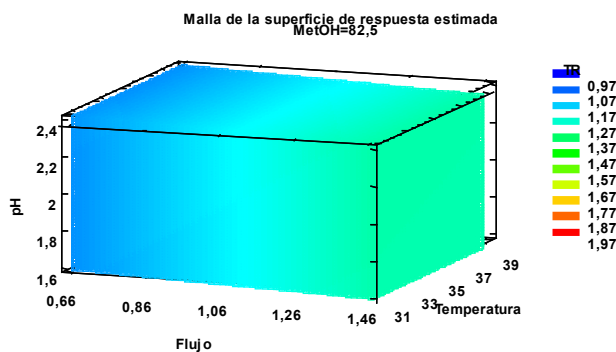


Gráfico 17-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina C

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Tiamina (Vitamina B1)

Tabla 11-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de vitamina B1.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,32235
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3636

MetOH	78,2955	86,7045	86,6697
pH	1,66364	2,33636	1,67027

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

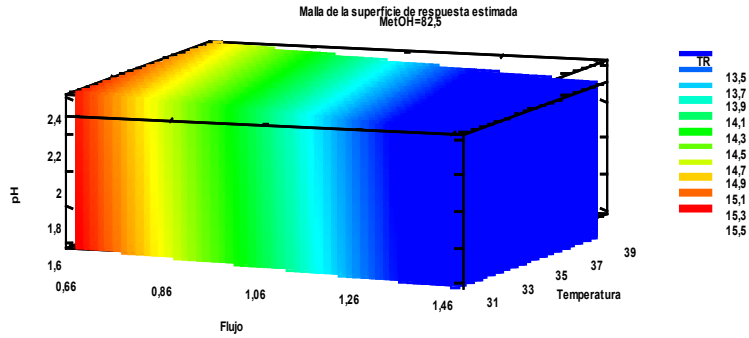


Gráfico 18-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de Vitamina B1

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

Tabla 12-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,16759
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3636
MetOH	78,2955	86,7045	83,0903
pH	1,66364	2,33636	2,33636

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

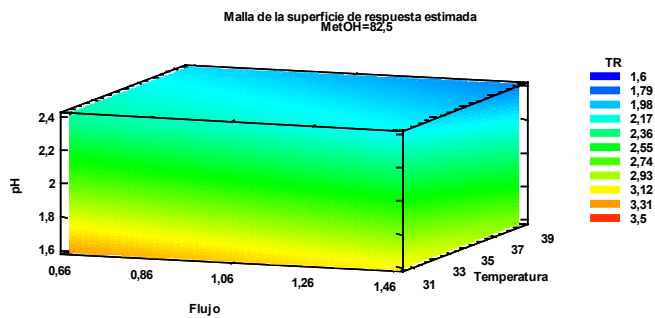


Gráfico 19-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B2

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

Tabla 13-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de vitamina B3.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,33636
Temperatura	31,6364	38,3636	37,967
MetOH	78,2955	86,7045	79,1963
78,29, pH	1,66364	2,33636	2,33636

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

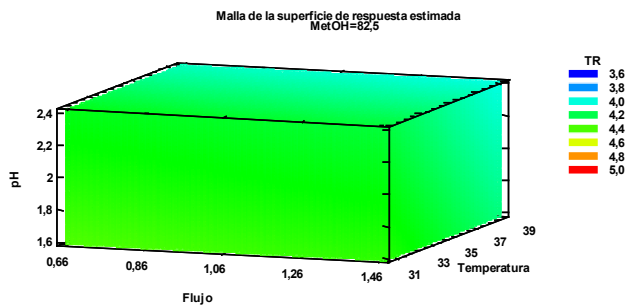


Gráfico 20-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B3

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

Tabla 14-3. Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención de vitamina B6.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,33636
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3631
MetOH	78,2955	86,7045	79,4978
pH	1,66364	2,33636	1,66372

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

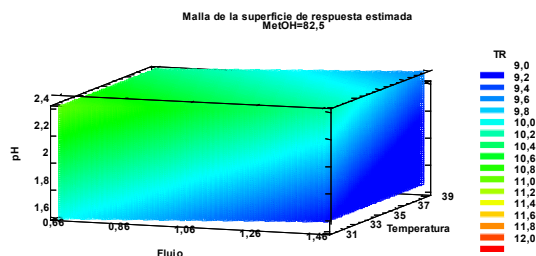


Gráfico 21-3. Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención de vitamina B6

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En las tablas 10-3 a 14-3 de optimización de variables se determinaron los valores óptimos de pH, flujo, temperatura y % de orgánico para minimizar el tiempo de retención de cada vitamina, no se estableció condiciones óptimas para todas las vitaminas en conjunto, pero si se lo hizo de manera individual para cada factor evaluado se estableció los rangos a continuación citados: pH de 1,66372 a 2,33636, flujo de 0,665362 a 1,33636, % de orgánico de 78,2955 a 86,6697, temperatura de 37,967 a 38, 3636.

En los gráficos 17-3 a 21-3 de superficie-respuesta se compara los cuatro factores evaluados en el diseño experimental para inferir las condiciones óptimas que reduzcan el tiempo de retención de cada vitamina; de color azul se observa las zonas frías con condiciones óptimas, mientras más alejado este de las zonas frías se considera zonas calientes con un tiempo de retención más elevado.

-Número de platos teóricos

- Ácido ascórbico (Vitamina C)

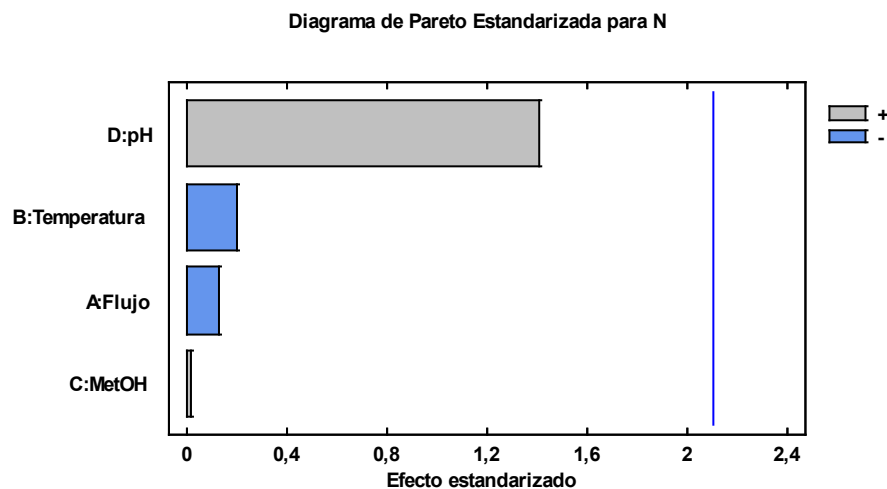


Gráfico 22-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina C en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Gráfica de Efectos Principales para N

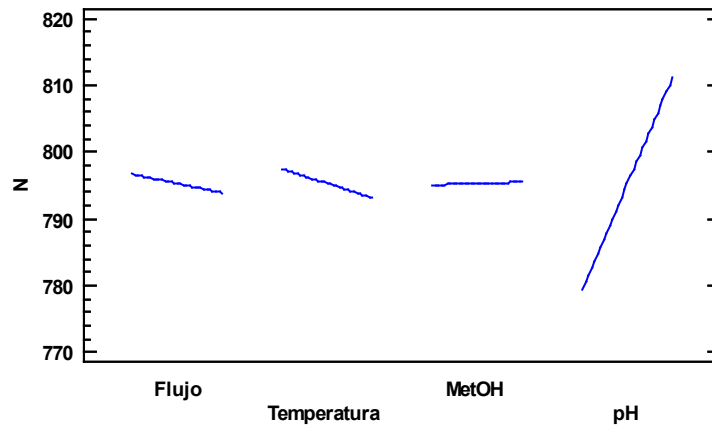


Gráfico 23-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina C en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Tiamina (Vitamina B1)

Diagrama de Pareto Estandarizada para N

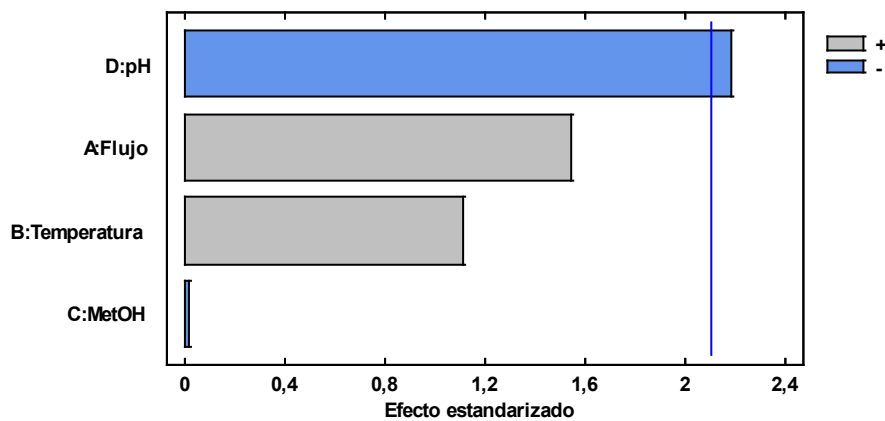


Gráfico 24-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

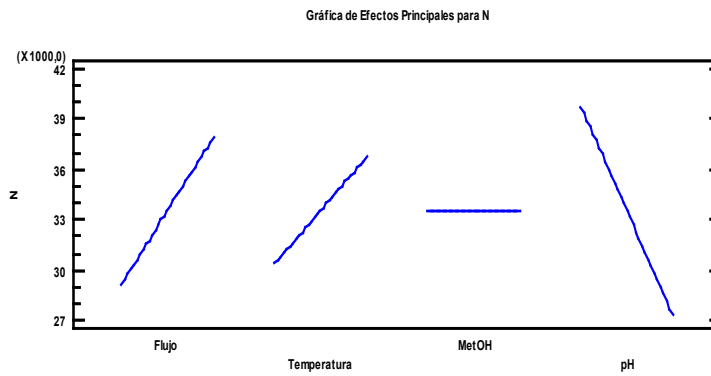


Gráfico 25-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

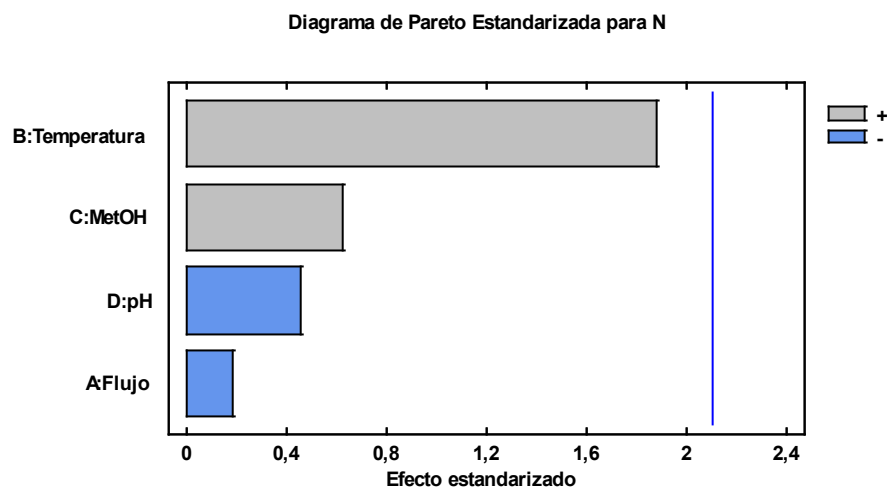


Gráfico 26-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Gráfica de Efectos Principales para N

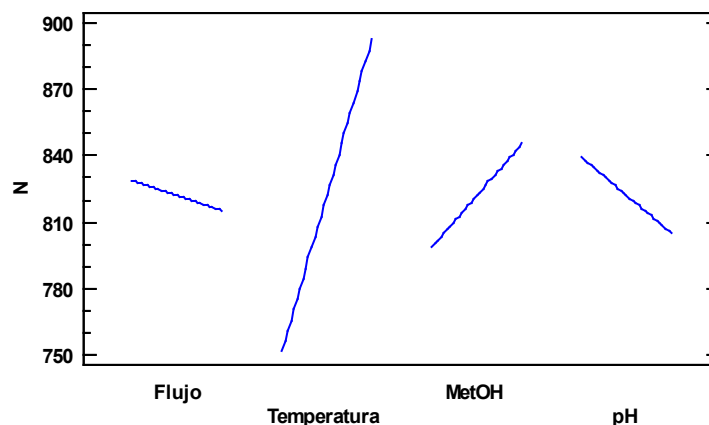


Gráfico 27-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

Diagrama de Pareto Estandarizada para N

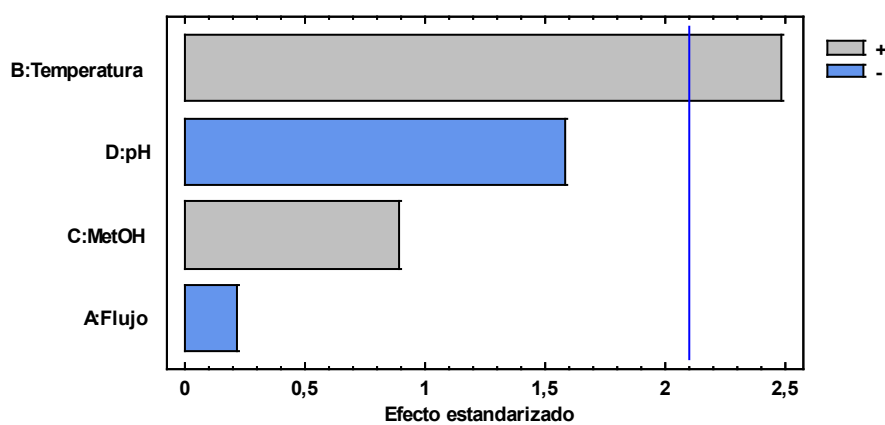


Gráfico 28-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Gráfica de Efectos Principales para N

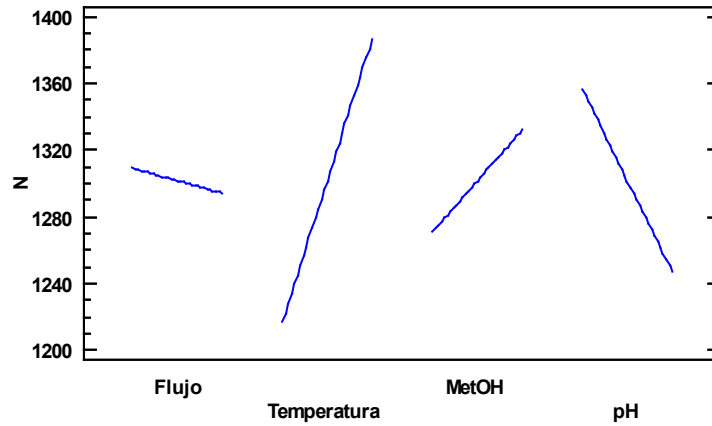


Gráfico 29-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

Diagrama de Pareto Estandarizada para N

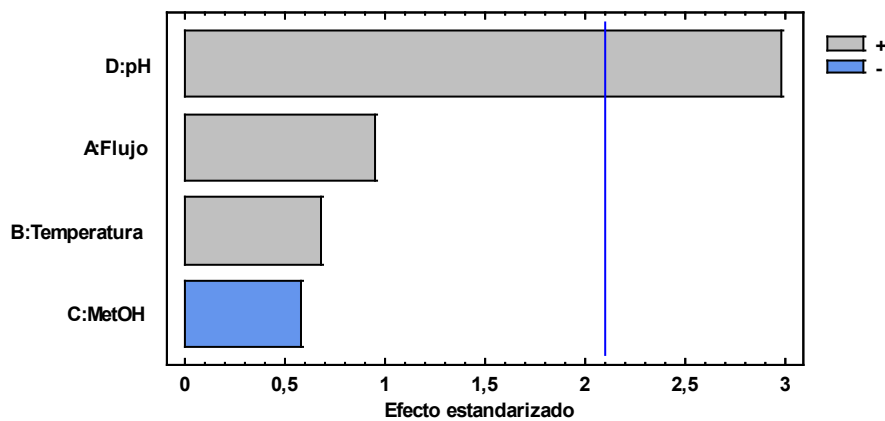


Gráfico 30-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

Gráfica de Efectos Principales para N

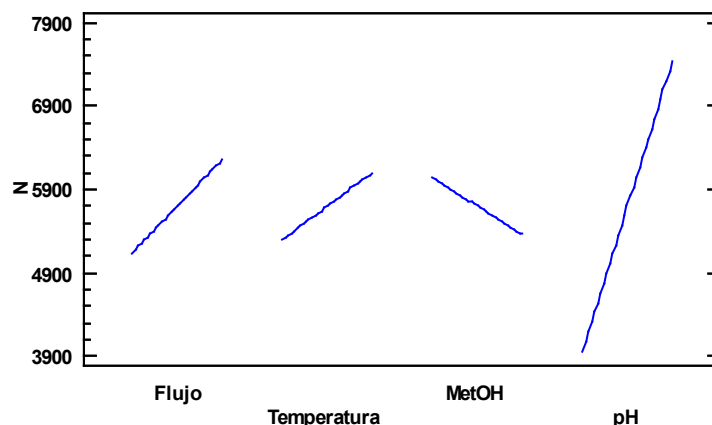


Gráfico 31-3. Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el ensayo de robustez se evaluó el número de platos teóricos tomando como factores pH, % de orgánico, velocidad de flujo y temperatura de la columna para todas las vitaminas hidrosolubles; el objetivo fue maximizar el número de platos teóricos de cada vitamina analizada.

Los resultados expuestos en los **Gráficos 22-3 a 27-3** muestran que para ácido ascórbico y Riboflavina no existió diferencia significativa entre los factores evaluados, esto quiere decir que la variación de dichos factores en el rango de estudio no afectó significativamente al número de platos teóricos de estas vitaminas.

Al evaluar el factor pH de la tiamina y la piridoxina se determinó que existe diferencia significativa con una influencia negativa y positiva respectivamente; según el gráfico de efectos principales para la tiamina **Gráfico 24-3** al aumentar las condiciones de flujo y temperatura aumenta de manera lineal el número de platos teóricos, al aumentar el pH disminuye el número de platos teóricos, mientras que al aumentar el % de orgánico no existió variación en la respuesta de platos teóricos, esto se debe a que el pico de tiamina eluye en isocrático a partir de los 14 minutos donde no varía la concentración de orgánico.

Al evaluar la temperatura en la nicotinamida presentó valores de eficiencia de platos teóricos con un nivel de significancia menor al 5% con una variación positiva; según el gráfico de efectos principales **Gráfico 28-3** al aumentar la temperatura y el % de orgánico aumentó de igual manera

el número de platos teóricos, mientras que al aumentar los valores de pH y flujo disminuyó el número de platos teóricos.

Se determinó las condiciones óptimas de los factores pH, flujo, metanol y temperatura para aumentar el número de platos teóricos de las vitaminas hidrosolubles ácido ascórbico, riboflavina, nicotinamida y piridoxina. Los resultados se exponen a continuación:

-Optimización eficiencia de platos teóricos (N)

- Ácido ascórbico (Vitamina C)

Tabla 12-3. Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teórico de vitamina C.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	0,663641
Temperatura	31,6364	38,3636	31,6563
MetOH	78,2955	86,7045	84,416
pH	1,66364	2,33636	2,33278

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

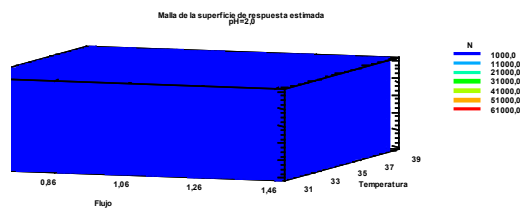


Gráfico 32-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina C

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Tiamina (Vitamina B1)

Tabla 13-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B1.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,33636
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3427
MetOH	78,2955	86,7045	81,1727
pH	1,66364	2,33636	1,66364

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

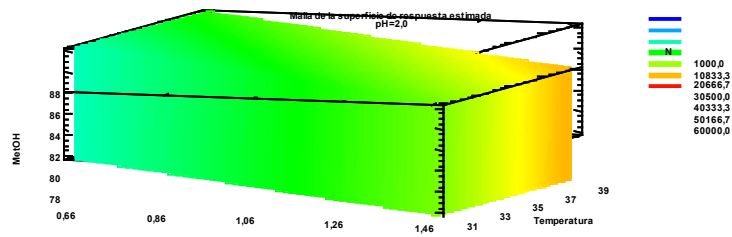


Gráfico 33-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B1

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

Tabla 14-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B2.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	0,706419
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3413
MetOH	78,2955	86,7045	86,7045
pH	1,66364	2,33636	1,66421

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

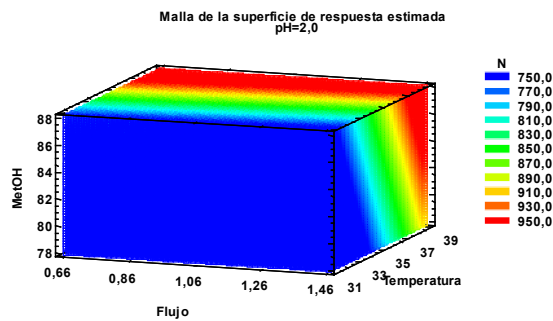


Gráfico 34-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B2

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

Tabla 15-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B3.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,07117
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3636
MetOH	78,2955	86,7045	86,7045
pH	1,66364	2,33636	1,66836

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

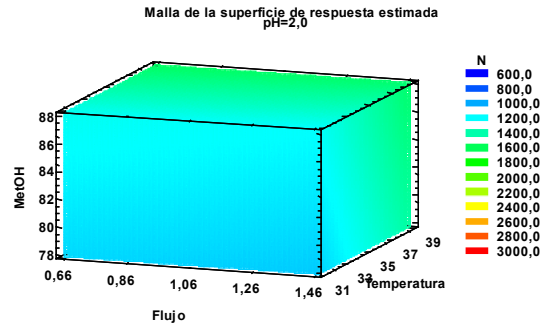


Gráfico 35-3. Superficie-respuesta para el número de platos teóricos de vitamina B3

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

Tabla 16-3. Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos de vitamina B6.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,33636
Temperatura	31,6364	38,3636	38,2807
MetOH	78,2955	86,7045	78,6944
pH	1,66364	2,33636	2,3363

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

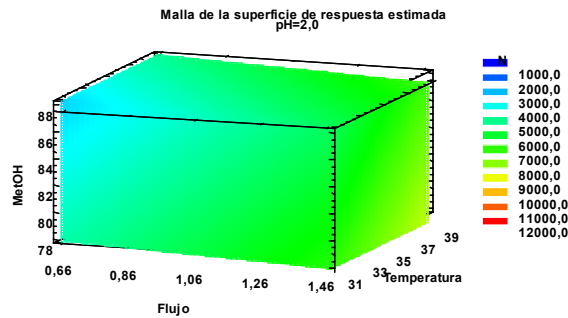


Gráfico 36-3. Superficie-respuesta estimada para el número de platos teóricos de vitamina B6

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En las **Tablas 12-3 a 16-3** de optimización de variables se determinó los valores óptimos de pH, flujo, temperatura y % de orgánico para maximizar la eficiencia de platos teóricos de cada vitamina, no se estableció condiciones óptimas para todas las vitaminas en conjunto, pero se lo hizo de manera individual para cada factor evaluado se determinó los rangos a continuación

citados: pH 1,66364 a 2,3363, flujo 0,706419 a 1,33636, orgánico 78,6944 a 86,7045, temperatura de 31,6563 a 38, 3636.

En los **Gráfico 32-3 a 36-3** de superficie-respuesta se compara los cuatro factores evaluados en el diseño experimental para inferir las condiciones óptimas que aumenten la eficiencia de platos teóricos de cada vitamina; de color rojo se observa las zonas calientes con condiciones óptimas, mientras más alejado este de las zonas calientes se considera zonas frías con una eficiencia de platos teóricos menor.

-Resolución

- Tiamina (Vitamina B1)

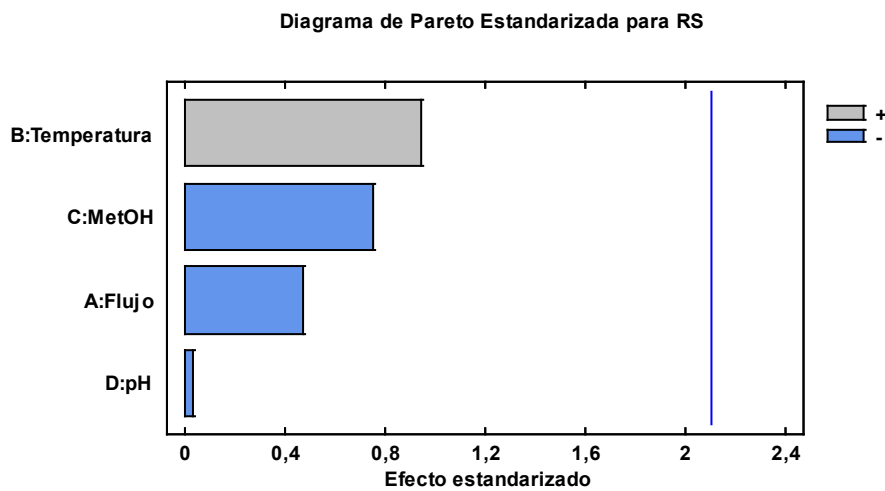


Gráfico 37-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

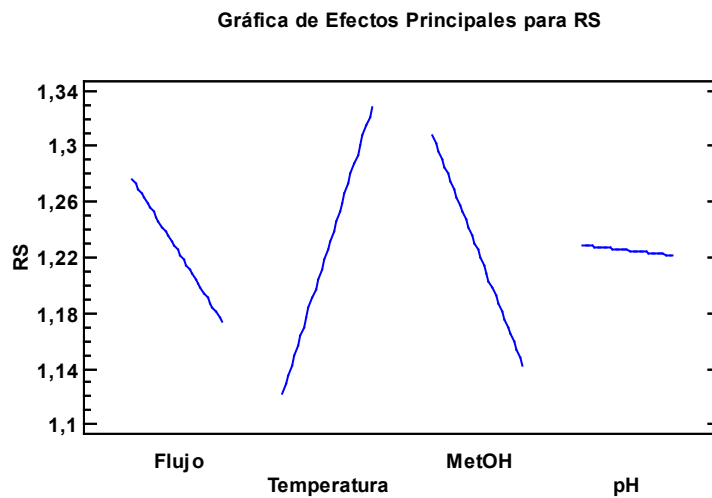


Gráfico 38-3: Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B1 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

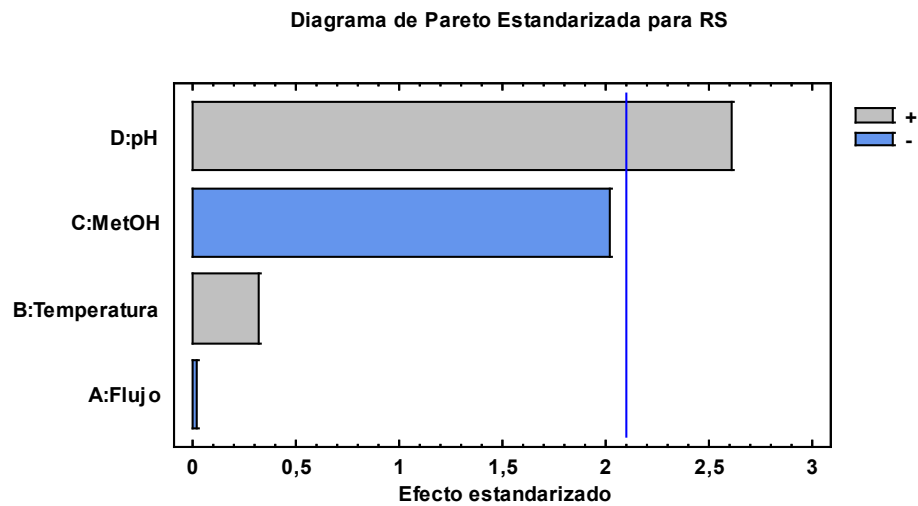


Gráfico 39-3: Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B2 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

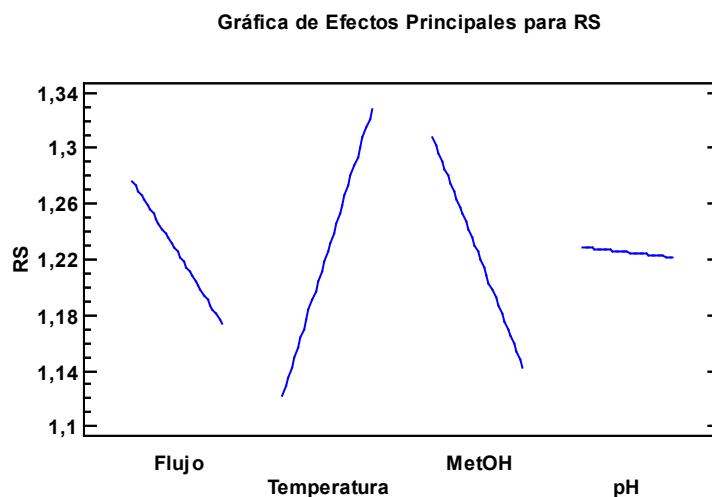


Gráfico 40-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B2 en influencia de los efectos de factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

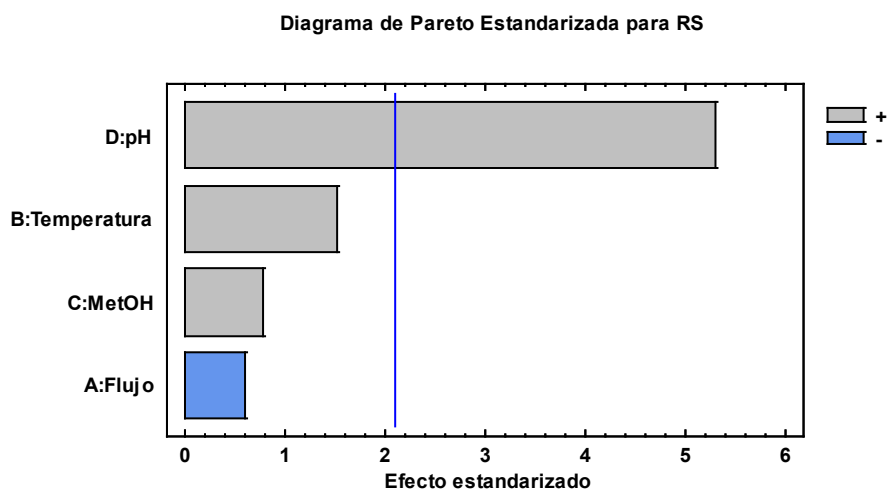


Gráfico 41-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

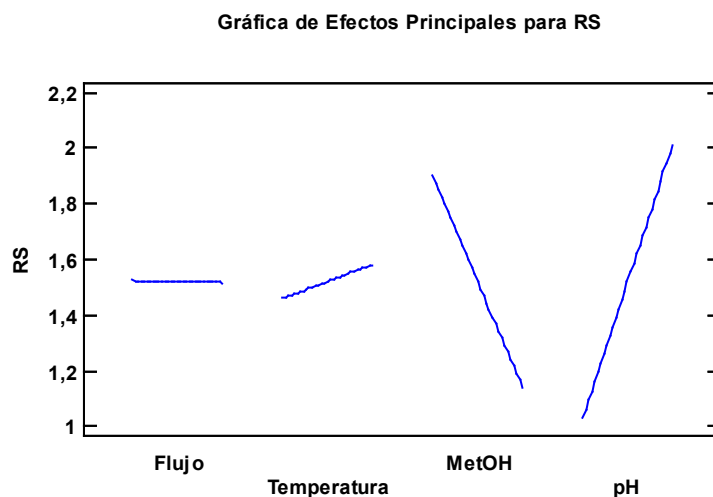


Gráfico 42-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B3 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

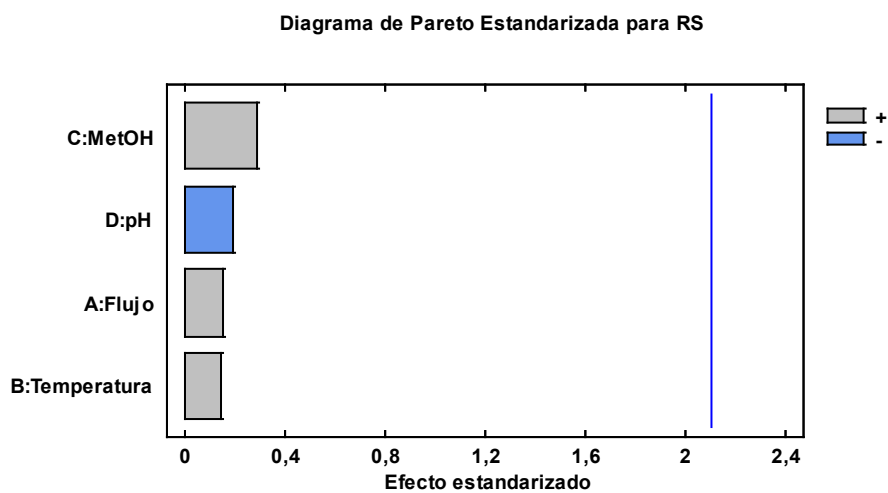


Gráfico 43-3. Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

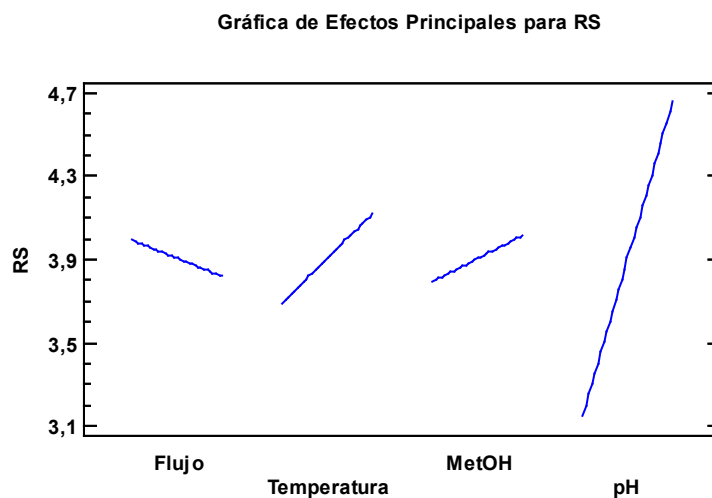


Gráfico 44-3. Gráfico de efectos principales para la resolución de vitamina B6 en influencia de los factores evaluados.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el ensayo de robustez se evaluó la resolución tomando como factores pH, % de orgánico, velocidad de flujo y temperatura de la columna para todas las vitaminas hidrosolubles; el objetivo fue maximizar la resolución entre cada pico de vitamina analizada.

Los resultados expuestos en los **Gráficos 37-3 a 44-3** muestran que para la resolución evaluada en el pico de tiamina y piridoxina no existió diferencia significativa entre los parámetros comparados, esto quiere decir que la variación de los factores evaluados en el rango de estudio no va a afectar significativamente a la resolución de estas vitaminas.

Al evaluar el factor pH con respecto a la resolución de Riboflavina y nicotinamida se determinó que se encuentra fuera del nivel de significancia de 5% con una influencia positiva; según el gráfico de efectos principales **40-3** para la Riboflavina al aumentar el flujo, % de orgánico y pH disminuye de manera lineal la resolución, al aumentar el valor de temperatura aumenta de igual forma la resolución; en el gráfico **42-3** de efectos principales para la nicotinamida se observa que no existe variación de la resolución, no es así con la temperatura y el pH los cuales aumentan la resolución al aumentar su valor, la resolución disminuye al aumentar el % de orgánico.

-OPTIMIZACIÓN RS

- Tiamina (Vitamina B1)

Tabla 17-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B1.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Flujo	0,663641	1,33636	0,663643
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3636
MetOH	78,2955	86,7045	78,2956
pH	1,66364	2,33636	2,21995

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

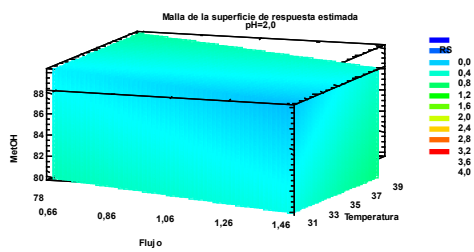


Gráfico 45-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B1.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Riboflavina (Vitamina B2)

Tabla 18-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B2.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Flujo	0,663641	1,33636	1,14894
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3624
MetOH	78,2955	86,7045	78,2992
pH	1,66364	2,33636	2,33636

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

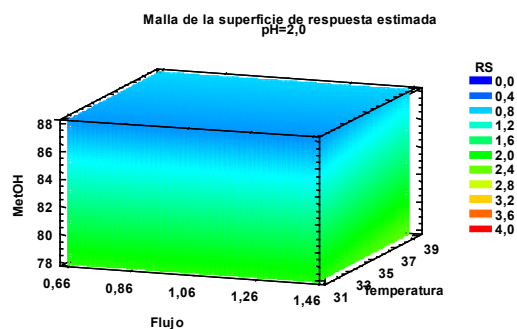


Gráfico 46-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B2.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Nicotinamida (Vitamina B3)

Tabla 19-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B3.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	0,666959
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3503
MetOH	78,2955	86,7045	86,7045
pH	1,66364	2,33636	2,32338

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

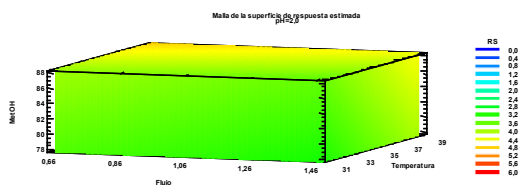


Gráfico 47-3. Superficie-respuesta estimada para resolución.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

- Piridoxina (Vitamina B6)

Tabla 20-3. Condiciones óptimas para maximizar la resolución de vitamina B6.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0,663641	1,33636	1,13584
Temperatura	31,6364	38,3636	38,3636
MetOH	78,2955	86,7045	86,7045
pH	1,66364	2,33636	1,66364

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

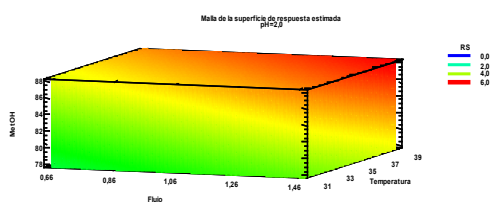


Gráfico 48-3. Superficie-respuesta estimada para resolución de vitamina B6

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En las **Tablas 16-3 a 20-3** de optimización de variables se determinó los valores óptimos de pH, flujo, temperatura y % de orgánico para maximizar la resolución de cada vitamina, no se estableció condiciones óptimas para todas las vitaminas en conjunto, pero si de manera individual para cada factor evaluado se determinó los rangos a continuación citados: pH 1,66364 a 2,33636, flujo 0,66364 a 1,14894, orgánico 78,2956 a 86.7045, temperatura de 38,3503 a 38,3636.

En los **Gráficos 44-3 a 48-3** de superficie-respuesta se compara los cuatro factores evaluados en el diseño experimental para inferir las condiciones óptimas que aumenten la resolución entre cada vitamina; de color rojo se observa las zonas calientes con condiciones óptimas, mientras más alejado este de las zonas calientes se considera zonas frías con una resolución menor.

- COMPARACIÓN ENTRE FASE ESTACIONARIA C8 C18

Tabla 21-3. Resultados comparación fase estacionaria.

Criterios Cromatográficos	Vitaminas	P valor	Criterios de aceptación
RESOLUCION	Vitamina C	0,6433	P ≥ 0,05
	Vitamina B1	0,0826	
	Vitamina B2	0,0222	
	Vitamina B3	0,1542	
	Vitamina B6	0,8939	

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En la **Tabla 21-3**. Se detalla los valores de p de la resolución entre las vitaminas en donde se evalúa la fase estacionaria c8 y c18; todos los valores son mayores que el nivel de significancia de 5% es decir, que no existe diferencia significativa entre ambas fases estacionarias

3.2.3.3. Estabilidad

Tabla 22-3. Resultados del parámetro Estabilidad del Sistema.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CONDICIONES	TIEMPO (HORAS)	% DIERENCIA ABSOLUTA (AUC)				
			ÁCIDO ASCÓRBICO	TIAMINA	RIBOFLAVINA	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA
La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el RSD 20% de la precisión del sistema.	AMBIENTE	4	0,0553	0,7645	0,4147	0,5529	0,6318
		12	0,1717	0,0437	9,1162	5,5384	3,2660
		24	1,0025	6,9152	9,0730	5,0680	4,8842
	REFRIGERACIÓN	4	0,1199	0,3447	0,4316	0,5604	0,1946
		12	3,0277	2,5817	3,7053	1,4110	6,3350
		24	1,3278	9,1318	7,0457	1,4141	6,2526
	CONGELACIÓN	4	0,0403	0,0454	0,3977	0,0096	0,0472
		12	1,6556	3,4067	5,9770	2,0747	7,8359
		24	2,1805	11,8068	0,2936	2,3538	7,8993

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

El ensayo de estabilidad de la solución se realizó a 4, 12 y 24 horas, en la **Tabla 22-3** se detalla el porcentaje de degradación de principios activos evaluados frente a factores ambiente, refrigeración y congelación en comparación con las condiciones normales de tiempo y temperatura del método analítico.

El estudio de estabilidad de las vitaminas hidrosolubles demostró como se observa en la **Tabla 22-3** que el RSD no supera el 20% de degradación, el ácido ascórbico presenta porcentajes de degradación bajos considerándose estable a los cambios de temperatura y tiempo, la tiamina presenta el porcentaje más elevado de todas las vitaminas evaluadas al ambiente (11,8068) debido a su pequeña concentración dentro de la formulación que hace que su área bajo la curva sea susceptible a disminuir.

La riboflavina presenta porcentajes de degradación de hasta 9,1162% al ambiente en 24 horas, esto debido a su inestabilidad en condiciones lumínicas y de temperatura lo cual no se observa al disminuir la temperatura donde la degradación disminuye, la nicotinamida y la piridoxina presentan una tendencia de degradación similar, debido a que, al variar los factores ambientales, refrigeración y congelación en el tiempo aumenta el porcentaje de degradación.

3.2.3.4. Idoneidad del sistema

Tabla 23-3. Resultados del parámetro Idoneidad del Sistema.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN		VITAMINAS				
		ÁCIDO ASCÓRBICO	TIAMINA	RIBOFALVINA	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA
PRECISIÓN DEL SST	RSD ≤2%	0.55%	1.49%	0.63%	0.80%	0.75%
FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	1.283 min	15.050 min	2.140 min	4.153 min	9.377 min
NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS	N>1000	1520.744	73087.342	1483.229	3975.916	8448.057
FACTOR DE ASIMETRÍA	ASIMETRÍA	2.067	2.628	1.457	1.971	1.189

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
 Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En la **Tabla 23-3** se muestra los resultados del ensayo de Idoneidad del Sistema, el cual expresa que el sistema cromatográfico es adecuado para cumplir la determinación para la que se ha establecido.

Para evaluar este ensayo se determinaron ciertos criterios como Precisión del SST, el cual evalúa la variación de los datos tras varias inyecciones consecutivas de una misma muestra, y con RSDs que se encuentran dentro del rango establecido se habla de una alta concordancia entre varias inyecciones, sin embargo, la tiamina presenta el valor más elevado esto debido a que el pico de la misma presenta una interacción con el pico de un excipiente, lo que provoca que no se dé una correcta integración (AEFI 2001).

Para el factor de capacidad que se centra en evaluar la retención del analito, se obtuvieron valores (minutos) para Ácido Ascórbico, Tiamina, Riboflavina, Nicotinamida y Piridoxina de 1.283, 15.050, 2.140, 4.153, 9.377 respectivamente; estos valores son superiores a 1 minuto por lo que no se ve comprometida la selectividad del método.

En cuanto al Número de platos teóricos se obtuvieron valores de 1520.744, 73087.342, 1483.229, 3975.916, 8448.057, lo que demuestra que se cumple con el límite establecido además de la buena condición operativa de la columna cromatográfica y de las condiciones cromatográficas del

análisis. Y para el factor de asimetría se tuvieron resultados que indican que los picos sufren de una poca asimetría, esto puede ser causado por el pH de la fase móvil o la sobrecarga de la muestra.

3.2.3.5. Incertidumbre de la medición

En el análisis de la incertidumbre se evaluó las fuentes de error del análisis en relación a las 6M de Ishikawa, mano de obra, medio ambiente, maquinaria, material, método y materia prima, se realizó la suma de las incertidumbres individuales de los factores evaluados para obtener las incertidumbres combinada y expandida que permite evaluar de mejor manera la influencia de dichos factores en el análisis; además se determinó que factor influye en mayor grado a la incertidumbre de cada vitamina de manera individual.

Tabla 24-3. Resultados de la incertidumbre de la medición para las vitaminas hidrosolubles.

PARÁMETRO	VITAMINA				
	ÁCIDO ASCÓRBICO	TIAMINA	RIBOFLAVINA	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA
INCERTIDUMBRE COMBINADA	$\mu = 3,23E-04$	$\mu = 4,38E-04$	$\mu = 6,56E-04$	$\mu = 5,70E-04$	$\mu = 4,83E-04$
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	$U = k\mu$ 6,47E-04	$U = k\mu$ 8,76E-04	$U = k\mu$ 1,31E-03	$U = k\mu$ 1,14E-03	$U = k\mu$ 9,67E-04

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones
Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

-Vitamina C

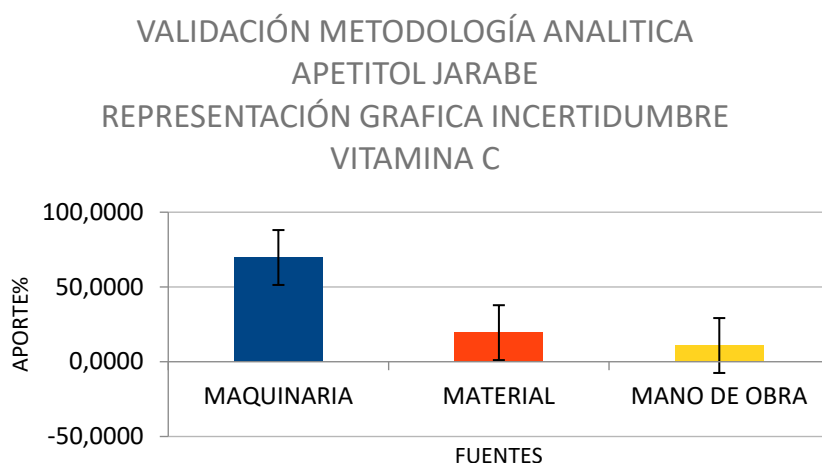


Gráfico 49-3. Fuentes de incertidumbre para Vitamina C.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el **Gráfico 49-3** se observa que la mayor fuente de error para esta vitamina es la maquinaria, sin embargo, el material también aporta un grado de error a la medición por lo que se debe tener precaución especialmente al momento de realizar los aforos en los balones, entre las posibles causas de este error se tiene: utilizar el material caliente y no a temperatura ambiente lo que afecta al volumen de aforo del mismo; en cuanto a maquinaria se puede tener errores por parte de la mala calibración de balanza, posición inadecuada de la misma o error de succión de la pipeta automática.

-Vitamina B1

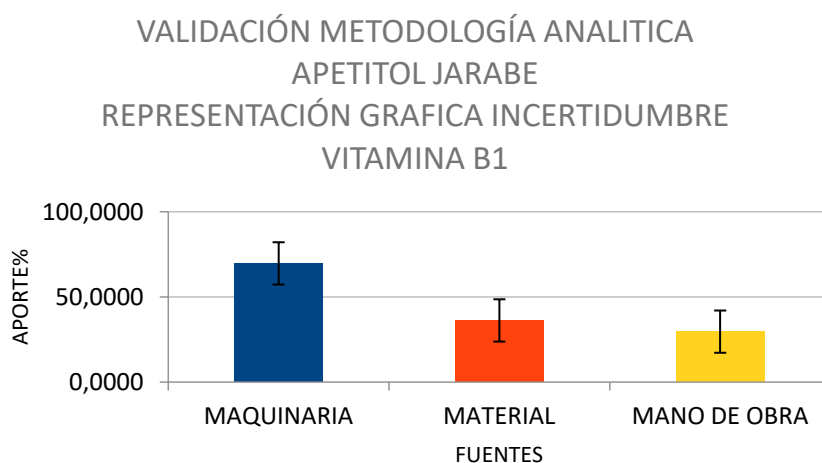


Gráfico 50-3. Fuentes de Incertidumbre para Vitamina B1.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el **Gráfico 50-3** se observa que existen 3 fuentes considerables de error por parte de mano de obra, maquinaria y material, esto se traduce a que para esta vitamina existe una alta probabilidad de que se obtengan resultados alejados del valor real por lo que se debe tener especial cuidado al momento de realizar pesaje, aforos y alícuotas.

Entre las posibles causas de error al usar el material podría ser utilizar el material de vidrio caliente lo cual afecta al volumen de aforo del mismo; en cuanto a maquinaria se puede tener errores por parte de la mala calibración de balanza, posición inadecuada de la misma o error de succión de la pipeta automática; la mano de obra se refiere al error que aporta el analista, entre los errores se encuentran fallos en la preparación de muestras, pesaje y aforos incorrectos.

-Vitamina B2

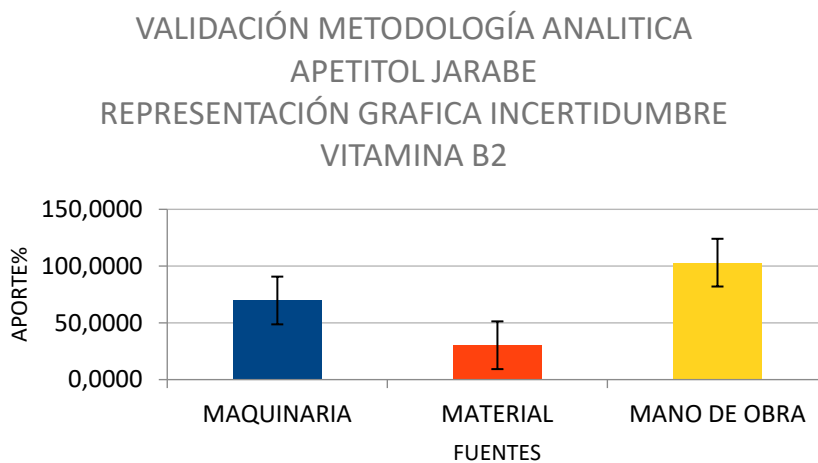


Gráfico 51-3. Fuente de incertidumbre para Vitamina B2.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el **Gráfico 51-3** se observa que la mayor fuente de error proviene de la mano de obra, es decir que existe una mayor probabilidad de aumentar la incertidumbre al momento de realizar pesajes, diluciones y aforos por parte del analista ; sin embargo, la maquinaria también aporta un error considerable al ensayo, pudiendo ser errores de calibración de balanza, pipetas, etc; el material de aforo utilizado tiene su propio grado de incertidumbre pero es menor en comparación de las fuentes principales de error.

-Vitamina B3

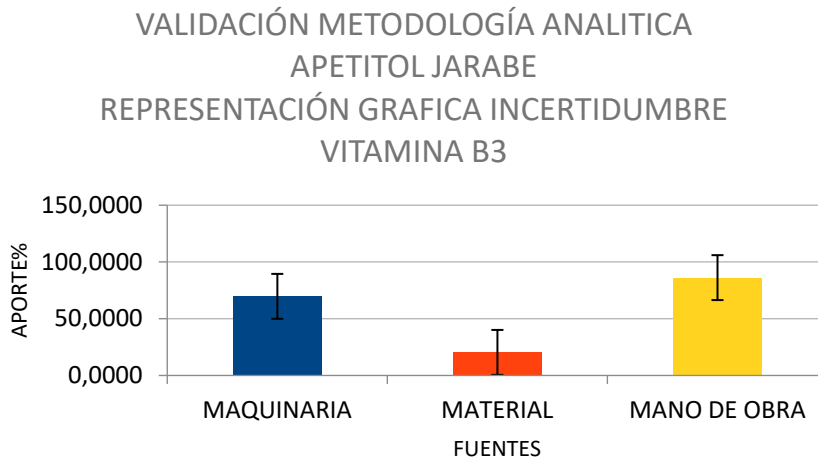


Gráfico 52-3. Fuentes de incertidumbre para Vitamina B3.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el **Gráfico 52-3** se observa que para esta vitamina la fuente principal de error es la mano de obra posiblemente por la técnica de pesaje, aforo o toma de alícuotas; la maquinaria y material aportan un error propio de su fabricación, a la final aporta a la suma total de la incertidumbre, pero no representa un valor tan alto como la mano de obra la cual es posible controlar y disminuir.

-Vitamina B6

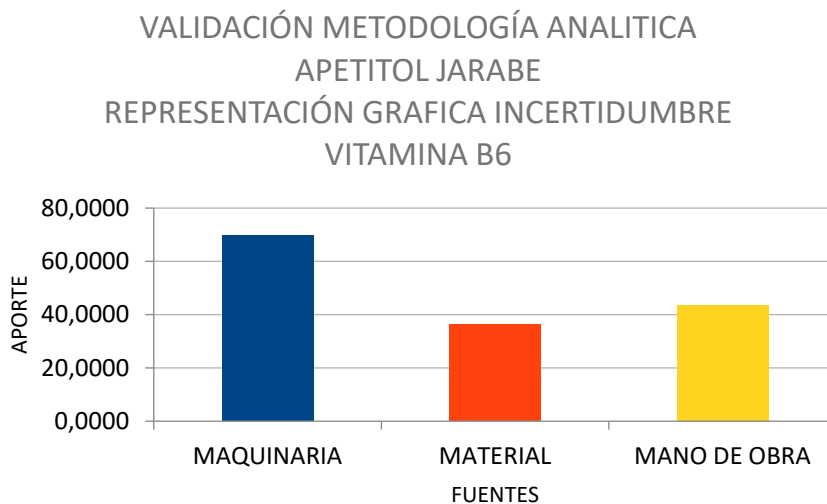


Gráfico 53-3. Fuente de incertidumbre para Vitamina B6.

Realizado por: Dávila, C; Santillán, R, 2020.

En el **Gráfico 53-3** se observa 3 fuentes considerables de error, siendo la maquinaria (HPLC, pipeta, balanza) la más alta, seguida de materiales como balones y puntas de pipeta, por último, se observa el error de la mano de obra cuyo aporte es mínimo para la suma total de la incertidumbre.

3.2.3.6. Límite de Detección LOD y Límite de Cuantificación LOQ

Los límites de detección y cuantificación evaluados en la tabla 11-3 cumplen con los criterios de aceptación de ser 3 y 10 desviaciones estándar mayor que el valor del ruido para cada vitamina evaluada.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló y optimizó un método analítico para determinar vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida; al modificar parámetros físico-químicos y la concentración del par iónico conjugado en el desarrollo y optimización del método se logró reducir el tiempo de elución de las vitaminas en un 50% y se observó una mejora significativa en los parámetros cromatográficos como tiempo de retención, resolución y eficiencia de platos teóricos. El método analítico desarrollado fue capaz de identificar, cuantificar y diferenciar eficientemente vitaminas y conservantes presentes en el jarabe.
- Se demostró que el método es selectivo con un porcentaje de discrepancia menor al 3,465% para las áreas y 0,620 para los tiempos de retención evaluados en estándares combinados, lineal con un $r^2 > 0,998$ para estándares combinados y placebos cargados a niveles del 70 al 250%, preciso (RSD $< 1,8247$) al evaluarlo frente a estándares combinados, en días diferentes y con analistas distintos, exacto (recuperación del 97,2630 % para ácido ascórbico, 98,3540% para tiamina, 99,8853% para Riboflavina, 97,8945 % para nicotinamida y 98,9522 % para piridoxina), idóneo al cumplir con parámetros cromatográficos como son resolución, número de platos teóricos y tiempo de retención con un RSD $< 2\%$, robusto en los parámetros cromatográficos evaluados en el espacio de diseño con los factores pH, temperatura, porcentaje de orgánico y flujo, detectable y cuantificable de 2 a 10 desviaciones estándar respectivamente comparado con el ruido del fondo del detector; capaz dar resultados fiables después de su preparación al almacenar las muestras hasta 24 horas en refrigeración ($2-8^{\circ}\text{C}$) como condiciones óptimas para todas las vitaminas en general con un porcentaje de degradación menor al 20%; el método tuvo una incertidumbre combinada entre maquinaria, mano de obra y materiales menor a $1,31\text{E}-03$. Demostrando que el método desarrollado y optimizado cumplió con todos los parámetros de validación para la categoría 1 de la USP.
- En los ensayos de robustez y estabilidad se puso a prueba el método analítico para determinar si es capaz de tolerar pequeñas variaciones de sus factores, es decir que fue robusto y estable. En el ensayo de robustez se evaluó en base a un diseño experimental de superficie respuesta basado en el Diseño de Draper-Lin se evaluó mediante un diseño experimental de superficie respuesta como influyeron los factores: pH, flujo, temperatura y % de orgánico en los parámetros cromatográfico evaluados dentro del espacio de diseño; se evaluó de manera individual cada vitamina, observándose que no existió diferencia significativa de nicotinamida-ácido ascórbico para tiempo de retención, ácido

ascórbico-riboflavina para eficiencia de platos teóricos y tiamina-piridoxina para resolución es decir que se puede modificar los valores dentro del rango de estudio; se determinó que la variación del factor pH tuvo una influencia sobre todas las vitaminas evaluadas, mientras que los demás factores afectaron a las vitaminas de forma individual, esto quiere decir que no se deben modificar dichos factores ya que en el rango de estudio se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos resultados; se comparó la resolución de las vitaminas en fases estacionarias c8 y c18 y se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativamente entre ambas medias por lo tanto se puede utilizar cualquiera de las dos columnas para el análisis obteniendo resultados fiables en ambas. Mediante el ensayo de estabilidad se determinó que para los factores: ambiente, refrigeración y congelación el RSD no excedieron el 20%.

- Se optimizó el método desarrollado aplicando para ello el diseño experimental de superficie respuesta basado en el Diseño de Draper-Lin, en el cual se concluye que el método es óptimo en las condiciones establecidas; dicho método será transferido al departamento de control de calidad de la empresa para el análisis de rutina.

RECOMENDACIONES

- Debido a que la mayoría de las vitaminas son fotosensibles, se recomienda el uso de material de vidrio ámbar de baja actina y luz tenue durante toda la duración del análisis.
- Se recomienda utilizar una columna cromatográfica única para esta valoración ya que el reactivo PIC utilizado en la fase móvil se va a unir a la fase estacionaria, haciéndola de uso exclusivo del mismo.
- Se recomienda que la alícuota a tomar sea el 50% de la capacidad de la punta de pipeta.
- En el estudio de robustez se determinó que el factor pH es el más crítico y no se debe variar, se recomienda trabajar en el pH estudiado para que no exista diferencia significativa en los resultados.
- Si no se logra realizar el análisis en el mismo día de preparación de las muestras, se recomienda almacenarlas al ambiente y en refrigeración hasta máximo de 24 horas donde no se observa una degradación mayor al 20%. No se recomienda trabajar en congelación porque ciertas vitaminas sufren daños mayores a estas condiciones.
- Realizar la transferencia de tecnología al departamento de control de calidad para que el método desarrollado, optimizado y validado pueda ser aplicado para el control rutinario.

BIBLIOGRAFIA

AEFI, 2001. *Validación de Metodos Analiticos*. Primera. Barcelona: s.n.

AGUILAR, B; & HERNANDEZ, R., 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Rev. cubana de farmacia*, vol. 1.

ARCSA, 2017. Estatuto organico ARCSA. [en línea]. S.l.: [Consulta: 1 noviembre 2019]. Disponible en: www.lexis.com.ec.

BARRIENTOS, J., 2001. *Temas de Estadística Inferencial* [en línea]. 1. S.l.: EUNED. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=UmZecqsNgcMC&pg=PA99&dq=t+student+que+es&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjz-573jP7tAhVIh-KHTWzAE4Q6AEwAHoECAAQAg#v=onepage&q&f=false>.

BELTRA, R.O.J., 1994. *Métodos estadísticos en biología del comportamiento - Rafael Lahoz-Beltrá, J. Ortega-Escobar, C. Fernández Montraveta* - Google Libros [en línea]. 1. Madrid: Editorial complutense. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=kvXSoAGJylwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gs_bse_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

BISMUTH, G; & NEUMANN, S., 2000. *Cleaning Validation: A Practical Approach*. 1. S.l.: CRC Press.

BRYMAN, A., 2005. *Quantitative Data Analysis with SPSS 12 and 13: A Guide for Social Scientists - Alan Bryman, Duncan Cramer* - [en línea]. 1. USA: Routledge. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=GHMgxwYHbREC&pg=PA160&dq=que+es+el+test+d+e+cochrane&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiojuXDkv7tAhXvdN8KHXe3AcUQ6AEwAHoECAMQAg#v=onepage&q=que+es+el+test+de+cochrane&f=false>.

ESTRELLA, M; et al. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas . Parte I. *Introducción y práctica de laboratorio : cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter.* , vol. 4, no. 3,

(2011), pp. 1-32.

FANALI, S., 2017a. *Liquid chromatography applications*. 1. S.l.: s.n. ISBN 9780128053928.

FANALI, S., 2017b. *Liquid chromatography fundamentals and instrumentation*. 2. S.l.: s.n. ISBN 9780128053935.

FAO, 2005. Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur. *Tcp/Rla/3013 (a)*, vol. 3013, pp. 1-85.

FDA, 2010. Suplementos dietéticos. *Nursing (Ed. española)*, vol. 28, no. 5, pp. 15. ISSN 02125382. DOI 10.1016/s0212-5382(10)70392-7.

FUGATE, T.L.D., 2004. Pharmaceutical Cleaning a Comprehensive Approach_0 | Quality Management System | Food And Drug Administration. [en línea]. [Consulta: 13 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.scribd.com/document/349394261/pharmaceutical-cleaning-a-comprehensive-approach-0>.

GUILLÉN, E., 2013. Incertidumbre en la Medición. . S.l.:

HAIDER, S; & ASIF, 2010. *Cleaning Validation Manual*. S.l.: CRC Press.

ICH Q2, 1994. *INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. 1994. S.l.: s.n.

KHANEGHAH, A.M; et al. Water-soluble vitamins. *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds*. (2019), pp. 241-266.

NEOFARMACO, 2019. Laboratorio Neofarmaco Cia. Ltda. [en línea]. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: <http://www.neofarmaco.com/quienes-somos/>.

PABLO, O.F; et al. Deficiencia de vitamina A en adolescentes no gestantes y gestantes de Maracaibo, Venezuela. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, vol. 76, no. 2 (2011), pp. 86-93. ISSN 0048766X. DOI 10.4067/s0717-75262011000200005.

POLO, M., 2007. *Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas* [en línea]. 1. Compostela : USC. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=oAo2GtMGm7QC&pg=PA106&dq=que+es+el+diseño+de+cribado&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjExoeLw_7tAhXNct8KHTcBBnMQ6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=que es el diseño de cribado&f=false.

SNYDER, L.R; et al. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (2010). S.l.: s.n. ISBN 9780470167540.

TAYLOR, J., 1982. *An Introduction to Error Analysis* [en línea]. 1. S.l.: University Science Books. [Consulta: 3 enero 2021]. Disponible en: <https://www.fisica.uson.mx/manuales/mecyfluidos/mecyflu-lab001.pdf>.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2019. *USP 42/NF 37. 42*. S.l.: s.n.

WHO, 2006. *Anexo 6 informe 34 WHO Practicas adecuadas de fabricacion* [en línea]. 2006. S.l.: s.n. [Consulta: 13 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/7_Anexo_6_del_informe_34.pdf.

ANEXOS

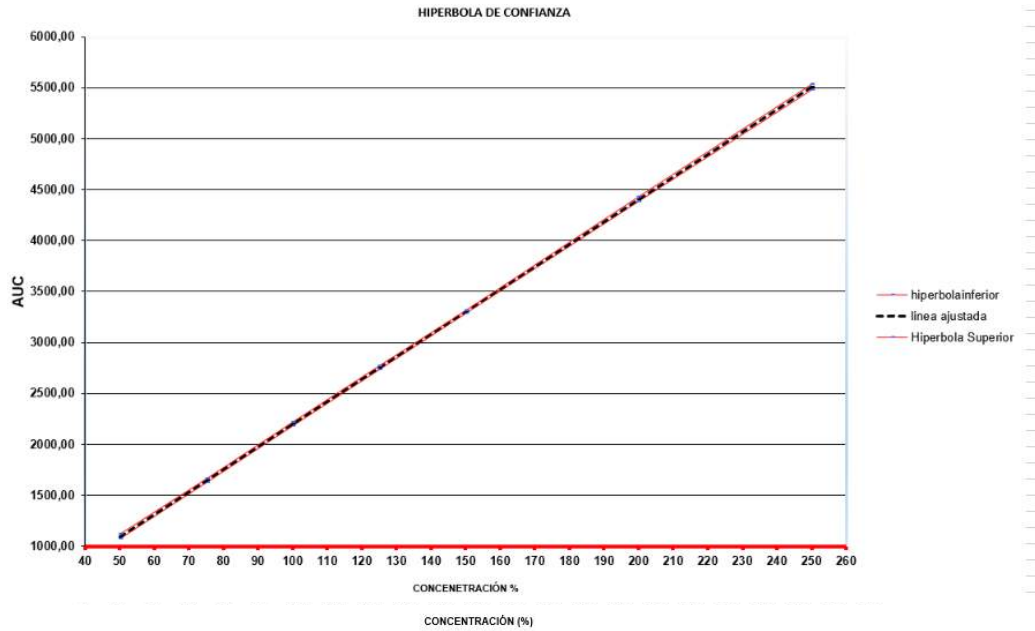
Anexo A Desarrollo del Método.

Atributo de calidad	Componentes												
	Principios Activos										Conservantes		
	A palmitato	B1	B2	B3	B5	B6	C	D3	E(alfa tocoferol)	L-lisina	Metil-parabeno	Propil-parabeno	Benzoato de sodio
Solubilidad (agua)	8.07e-05 mg/mL	0.0153 mg/mL	0.657 mg/mL	83.1 mg/mL	60.5 mg/mL	16.1 mg/mL	245.0 mg/mL	0.00038 mg/mL	7.04e-06 mg/mL	105.0 mg/mL	3.69 mg/mL	0.96 mg/mL	7.08 mg/mL
Logaritmo de premiación	10.12 11.62	-2.1 -3.1	-1 -0.92	0.29 -0.17	-1.1 -1.4	-0.57 -0.95	-1.6 -1.9	7.98 7.13	8.84 10.51	-3.8 -3.2	2.17 1.67	3.28 2.55	1.72 1.63
pka	(Strongest Basic) -7	(Strongest Acidic) 15.5 (Strongest Basic) 5.54	(Strongest Acidic) 6.97 (Strongest Basic) 0.76	(Strongest Acidic) 2.79 (Strongest Basic) 4.19	(Strongest Acidic) 4.35 (Strongest Basic) -2.8	(Strongest Acidic) 9.4 (Strongest Basic) 5.58	(Strongest Acidic) 4.36 (Strongest Basic) -3	(Strongest Acidic) 18.38 (Strongest Basic) -1.3	(Strongest Acidic) 10.8 (Strongest Basic) -4.9	(Strongest Acidic) 2.74 (Strongest Basic) 10.29	(Strongest Acidic) 8.5 (Strongest Basic) -6.1	(Strongest Acidic) 8.5 (Strongest Basic) -6.1	(Strongest Acidic) 4.08 (Strongest Basic) -1
# aceptor de protones	1	4	9	3	5	4	5	1	2	4	2	2	2
# donador de protones	0	2	5	1	4	3	4	1	1	3	1	1	1
Regla Lepinski	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI
Peso molecular	524.8604 g/mol	265.355 g/mol	376.3639 g/mol	123.1094 g/mol	219.235 g/mol	169.1778 g/mol	176.1241 g/mol	384.6377 g/mol	430.7061 g/mol	146.1876 g/mol	152.1473 g/mol	180.2005 g/mol	122.123 g/mol
Punto de Fusión	28.5 °C	248 °C	280 °C	236-239 °C	195°C	159-162 °C	191 °C	84.5 °C	3 °C	224.5 °C	131.0 °C	95-98°C	122.4 °C

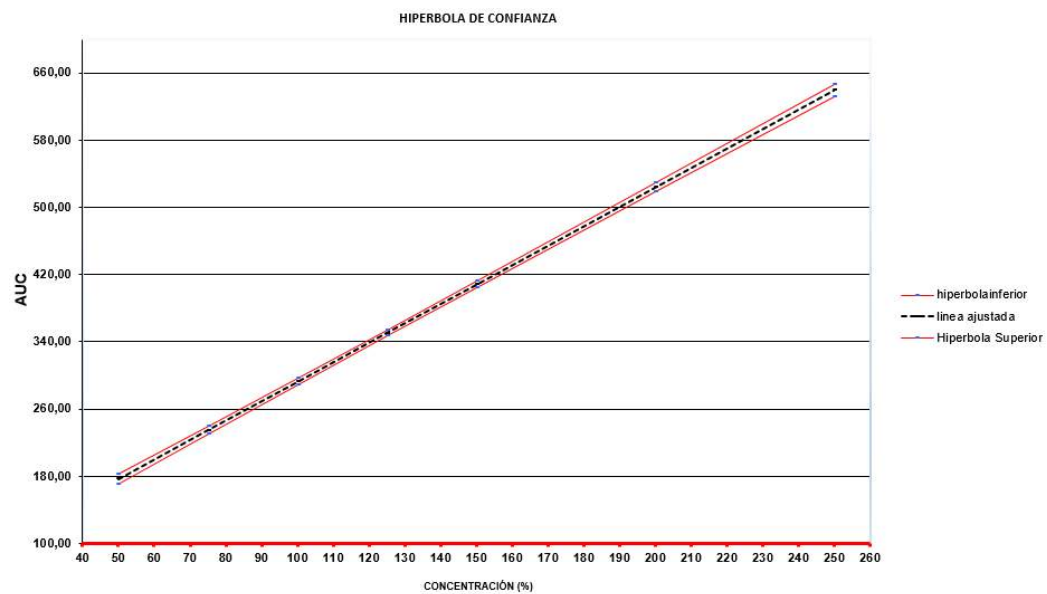
Anexo 1 Validación del Método

Anexo 2 Linealidad

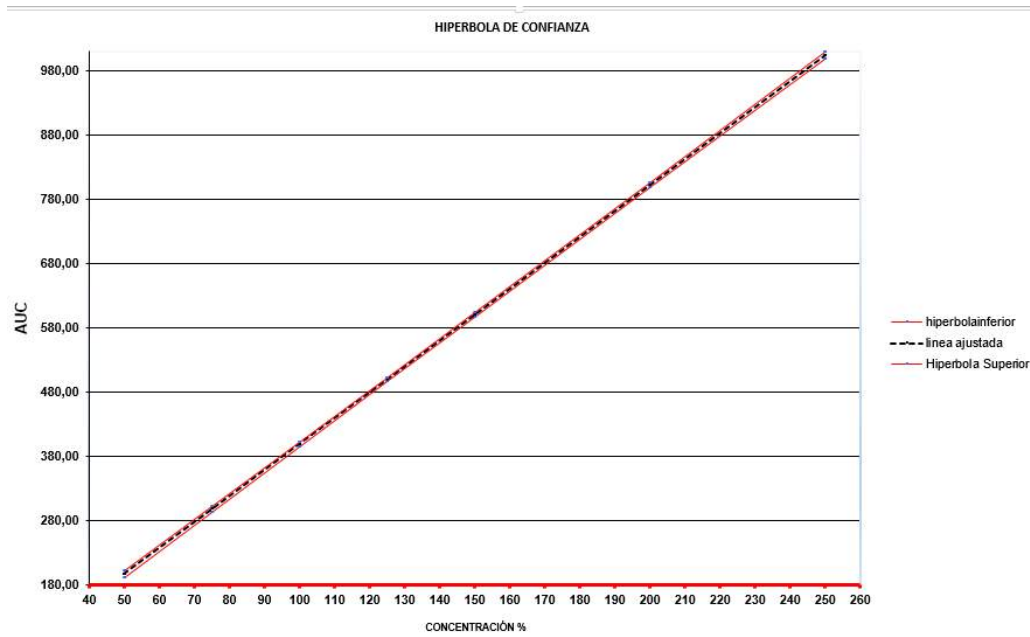
Vitamina C Sistema



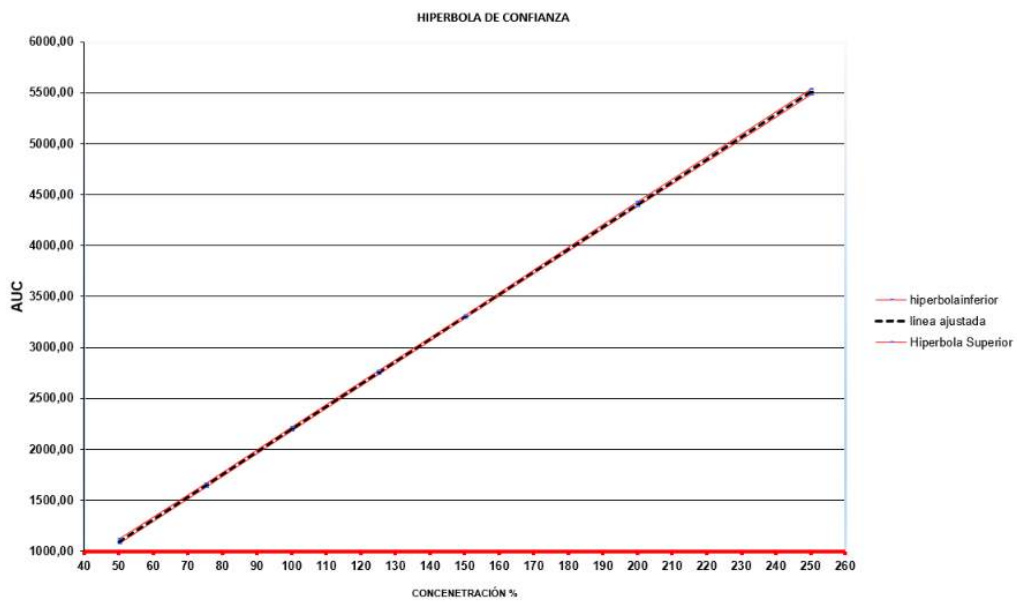
Vitamina B1 Sistema



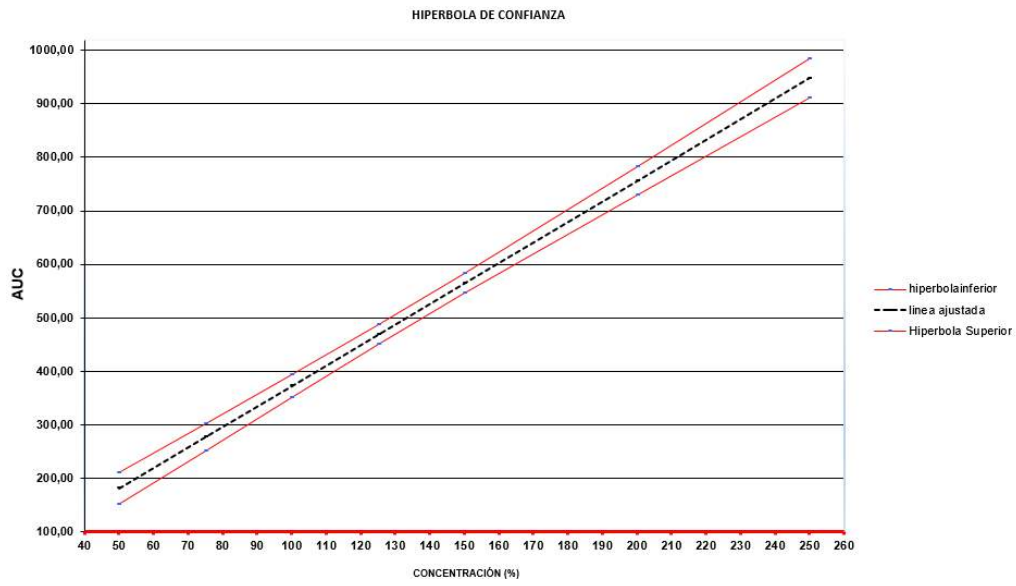
Vitamina B2 Sistema



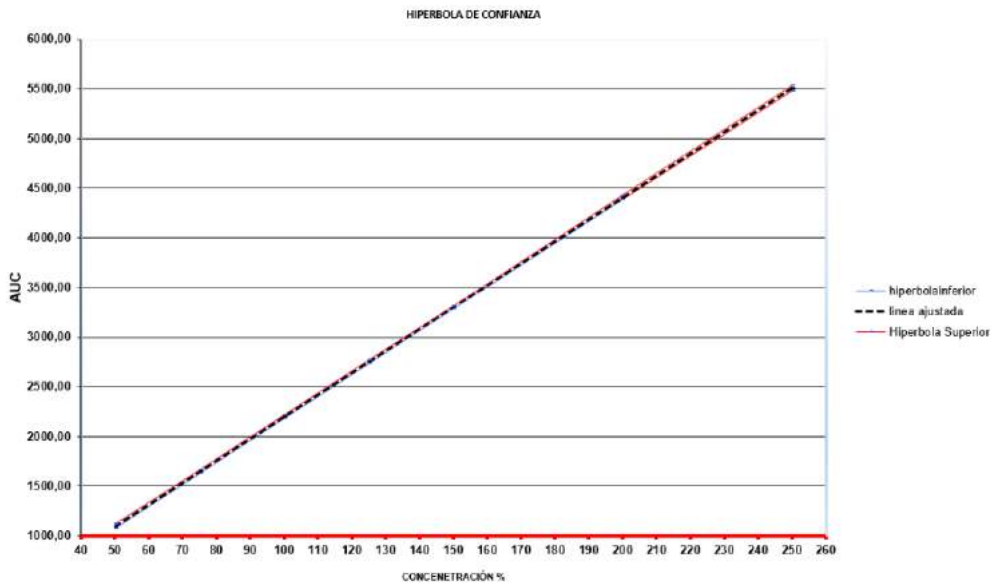
Vitamina B3 Sistema



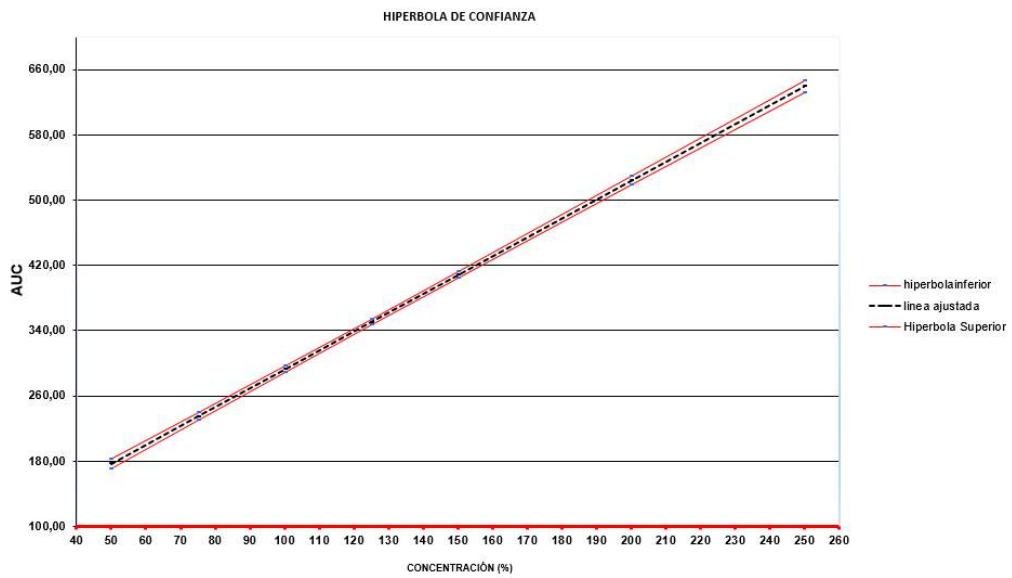
Vitamina B6 Sistema



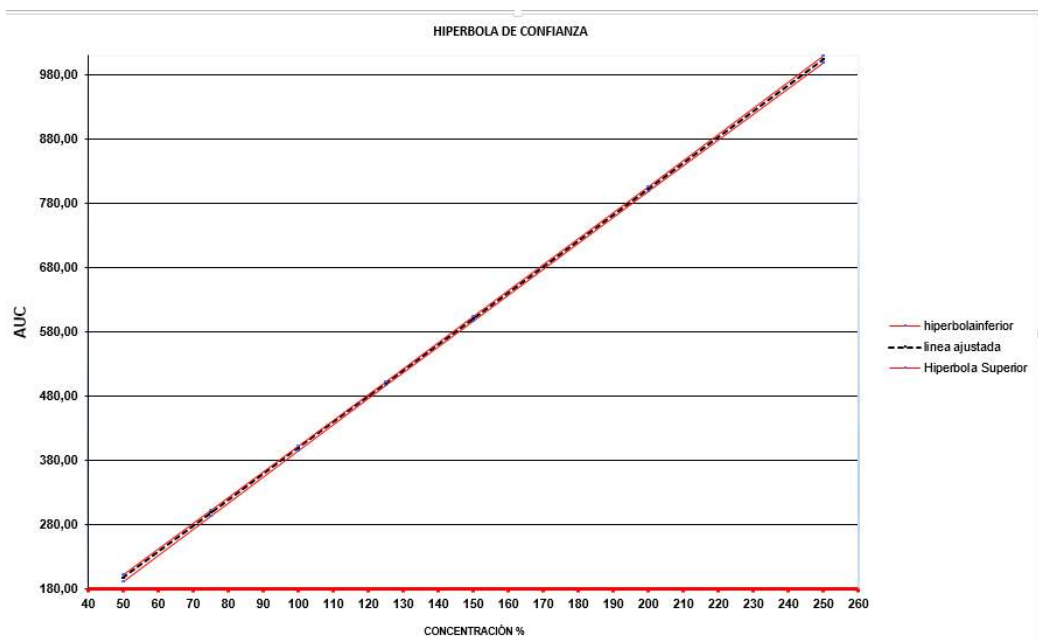
Vitamina C Método



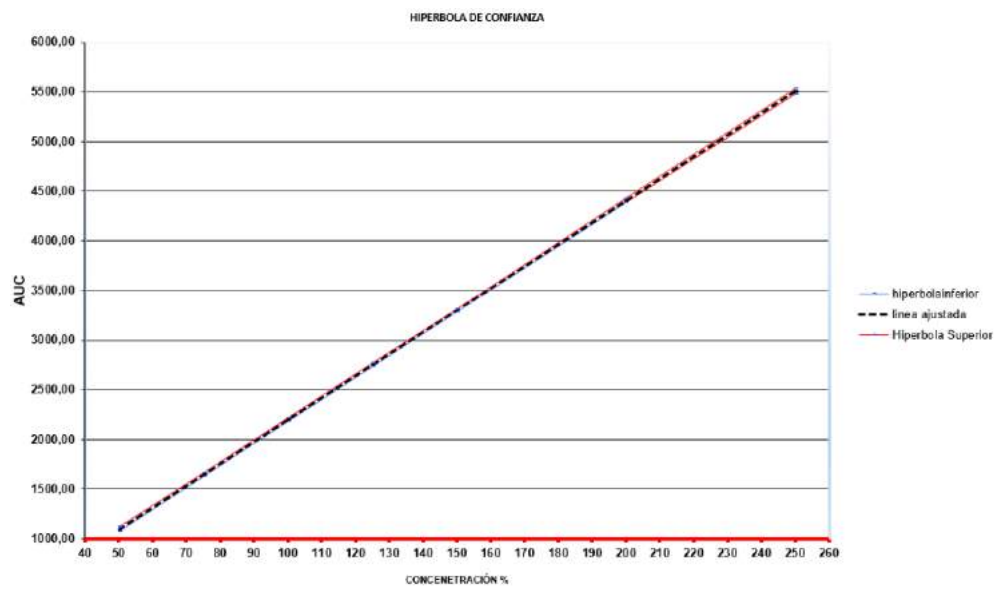
Vitamina B1 Método



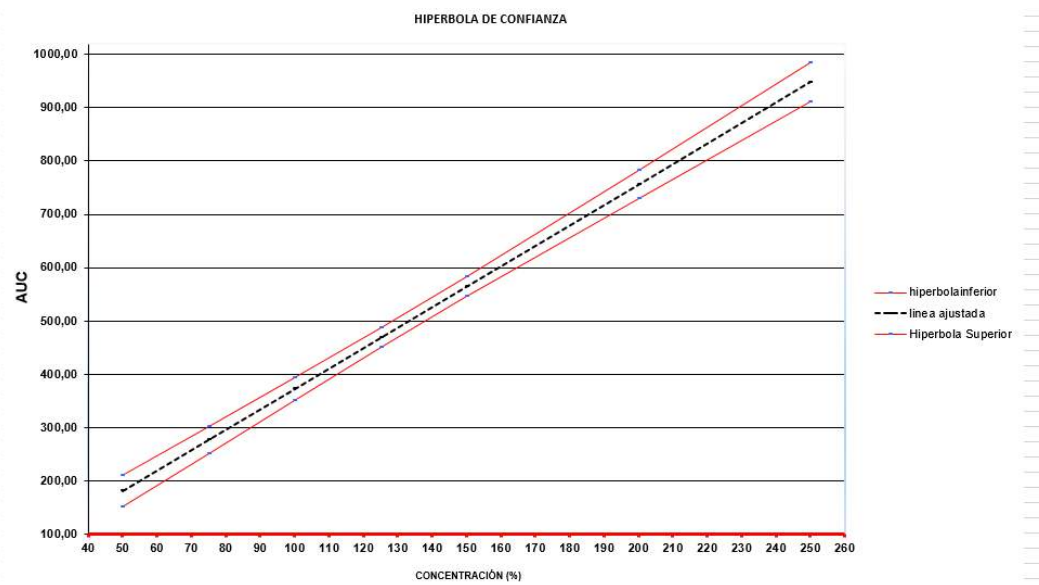
Vitamina B2 Método



Vitamina B3 Método



Vitamina B6 Método



Anexo 3 Precisión Intermedia

-Vitamina C (Ácido Ascórbico)

Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	340,19	55,6223	6,11606	0,0000
Pendiente	36,173	0,369353	97,9362	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,17063E8	1	1,17063E8	9591,50	0,0000
Residuo	231892,	19	12204,9		
Total (Corr.)	1,17295E8	20			

Coefficiente de Correlación = 0,999011

R-cuadrada = 99,8023 por ciento

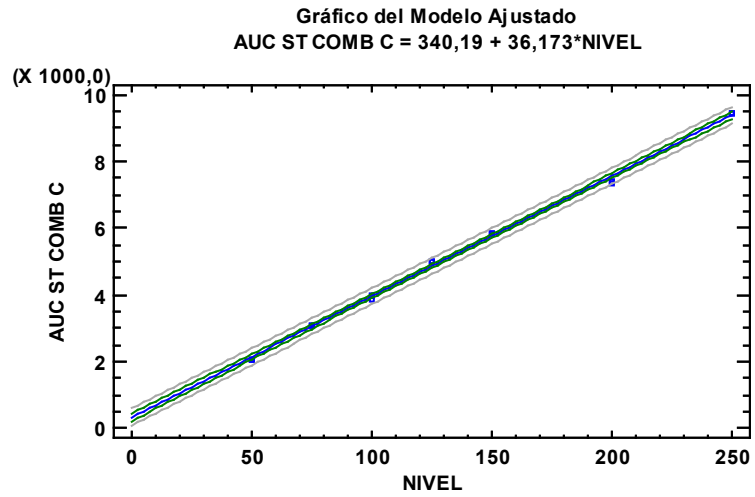
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,7919 por ciento

Error estándar del est. = 110,476

Error absoluto medio = 91,1147

Estadístico Durbin-Watson = 0,949064 (P=0,0018)

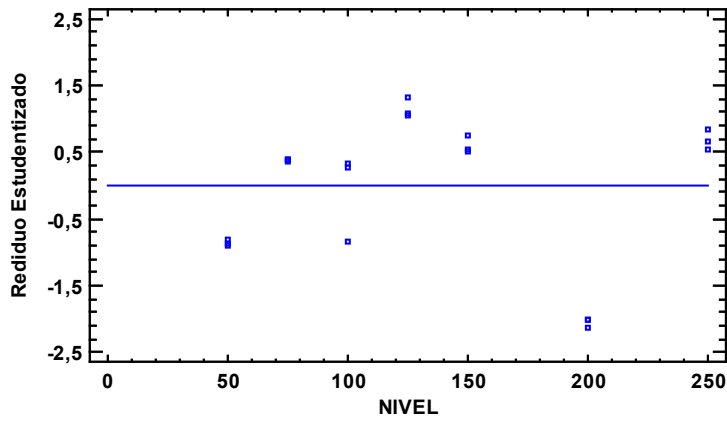
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,498295



Residuos Atípicos

			<i>Prediccione</i>		<i>Residuos</i>
			<i>s</i>		
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>
16	200,0	7378,79	7574,79	-196,0	-2,01
17	200,0	7378,97	7574,79	-195,826	-2,00
18	200,0	7368,51	7574,79	-206,284	-2,14

Gráfico de Residuos
 $AUC\ ST\ COMB\ C = 340,19 + 36,173 \cdot NIVEL$

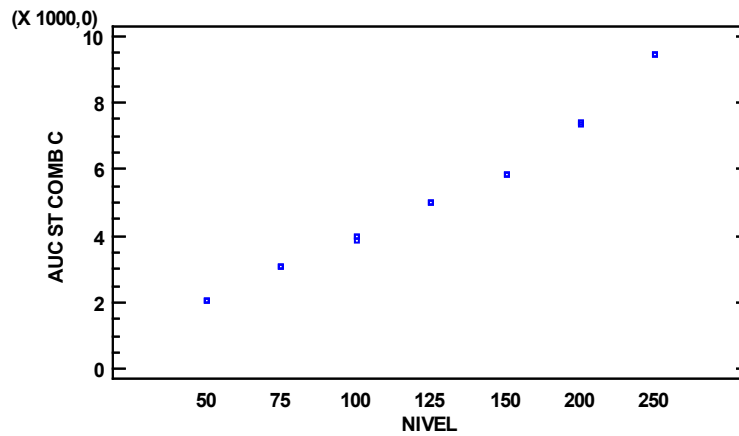


ANOVA simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Dispersión por Código de Nivel



Resumen Estadístico para AUC ST COMB C

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	2059,22	5,48599	0,26641%	2054,39	2065,19	10,796
75	3	3094,01	3,02956	0,0979168%	3090,66	3096,55	5,891
100	3	3949,92	71,2777	1,80454%	3867,74	3994,98	127,235
125	3	4984,54	14,6997	0,294907%	4974,66	5001,43	26,772

150	3	5831,53	15,3819	0,263771%	5821,29	5849,22	27,93
200	3	7375,42	5,98833	0,0811931%	7368,51	7378,97	10,458
250	3	9451,04	14,8836	0,157481%	9436,97	9466,62	29,652
Total	21	5249,38	2421,72	46,1334%	2054,39	9466,62	7412,23

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	0,627614	
75	-0,796793	
100	-1,20767	
125	1,17261	
150	1,17938	
200	-1,22358	
250	0,31964	
Total	0,857783	-0,745693

ANOVA Gráfico para AUC ST COMB C

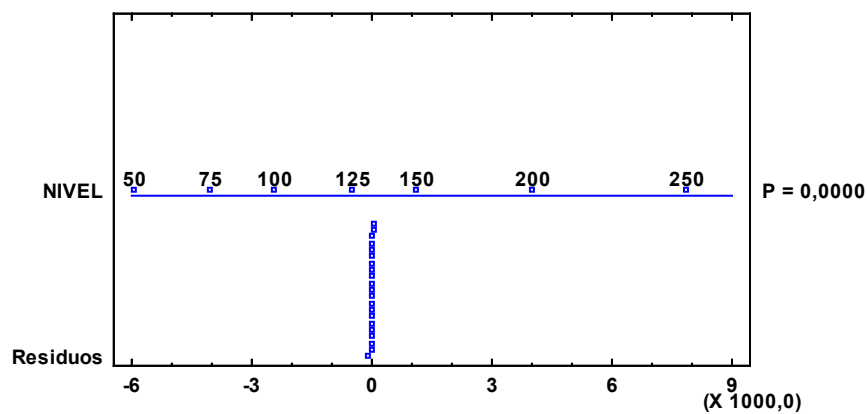
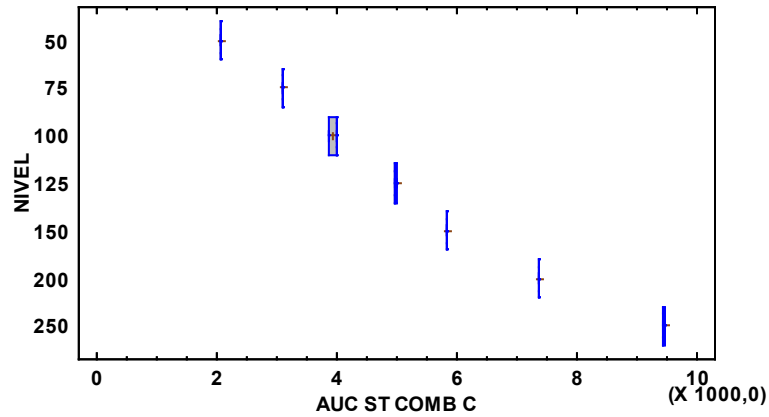


Tabla ANOVA para AUC ST COMB C por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,17283E8	6	1,95472E7	23470,60	0,0000
Intra grupos	11659,7	14	832,837		
Total (Corr.)	1,17295E8	20			

Gráfico Caja y Bigotes



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,841151	0,558773

Regresión simple Placebo cargado vs nivel

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	203,417	38,6622	5,26139	0,0000
Pendiente	36,309	0,256732	141,428	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,17945E8	1	1,17945E8	20001,86	0,0000
Residuo	112037,	19	5896,69		
Total (Corr.)	1,18057E8	20			

Coefficiente de Correlación = 0,999525

R-cuadrada = 99,9051 por ciento

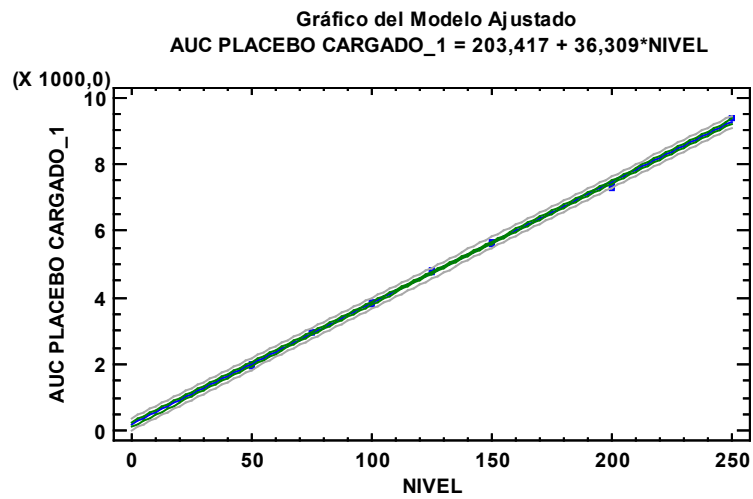
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9001 porciento

Error estándar del est. = 76,7899

Error absoluto medio = 58,2667

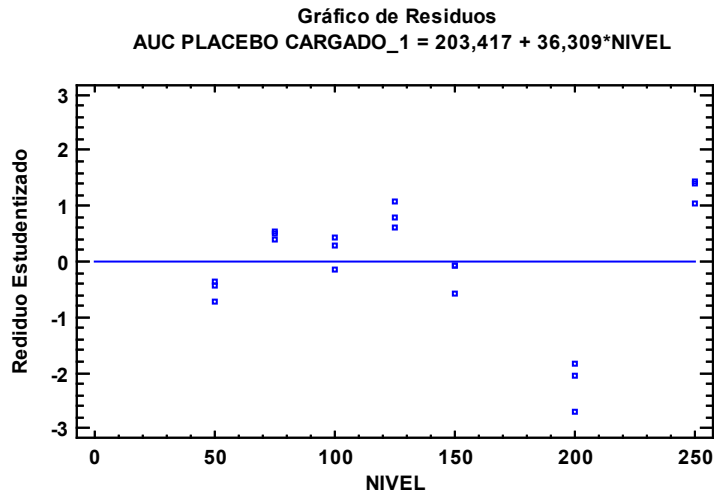
Estadístico Durbin-Watson = 0,986048 (P=0,0025)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,48137



Residuos Atípicos

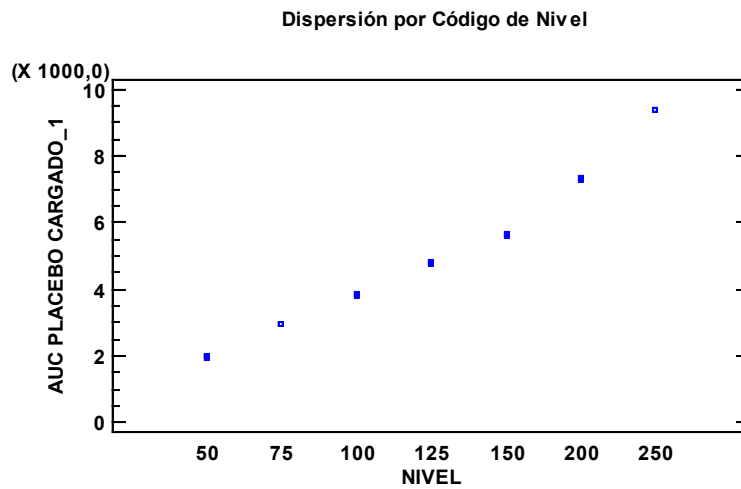
			<i>Prediccione</i> <i>s</i>		<i>Residuos</i>
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>
16	200,0	7325,81	7465,22	-139,404	-2,06
18	200,0	7294,31	7465,22	-170,911	-2,70



ANOVA simple Placebo cargado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7



Resumen Estadístico para AUC PLACEBO CARGADO_1

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	1982,98	13,5562	0,683628%	1967,55	1992,96	25,415
75	3	2962,79	5,79014	0,195429%	2956,61	2968,09	11,478
100	3	3849,39	21,9487	0,570187%	3824,63	3866,45	41,823
125	3	4804,29	16,4813	0,343055%	4789,57	4822,1	32,525

150	3	5630,6	22,5663	0,40078%	5604,56	5644,38	39,821
200	3	7319,57	22,7859	0,311302%	7294,31	7338,58	44,268
250	3	9367,86	13,944	0,148849%	9351,85	9377,37	25,516
Total	21	5131,07	2429,58	47,3503%	1967,55	9377,37	7409,82

NIVEL	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
50	-1,07269	
75	-0,475842	
100	-0,978817	
125	0,575776	
150	-1,21855	
200	-0,806983	
250	-1,16081	
Total	0,932714	-0,734747

ANOVA Gráfico para AUC PLACEBO CARGADO_1

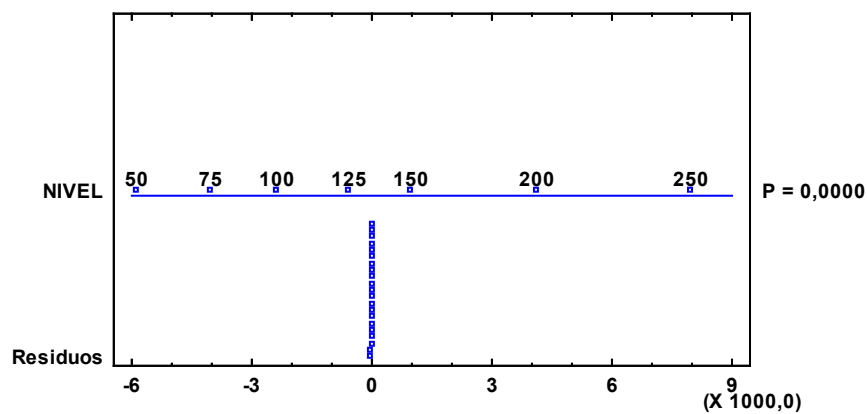
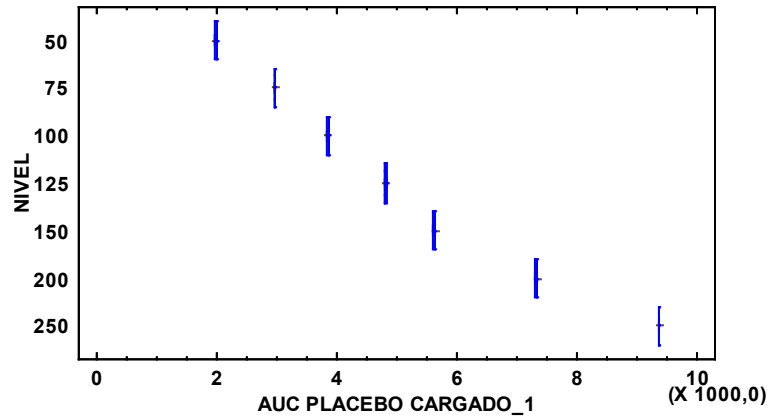


Tabla ANOVA para AUC PLACEBO CARGADO_1 por NIVEL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,18052E8	6	1,96754E7	62787,62	0,0000
Intra grupos	4387,1	14	313,364		
Total (Corr.)	1,18057E8	20			

Gráfico Caja y Bigotes



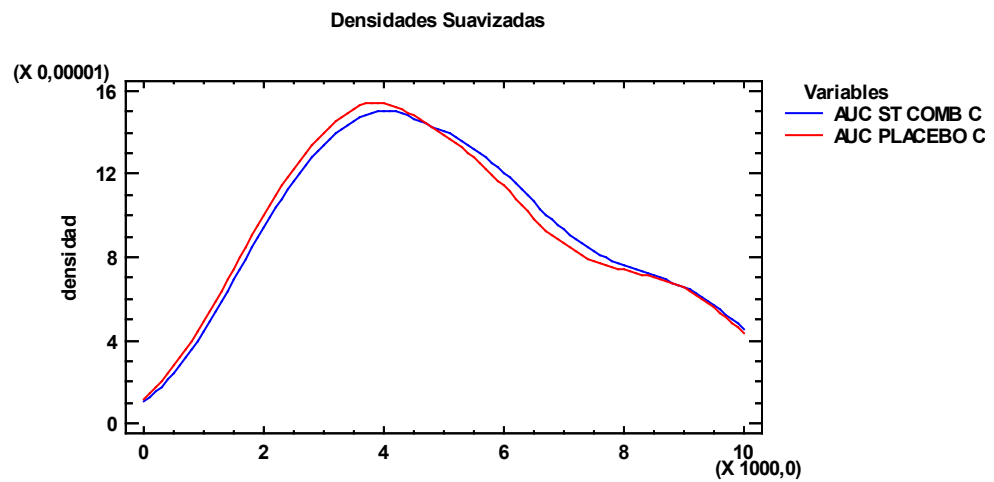
Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,227092	0,961021

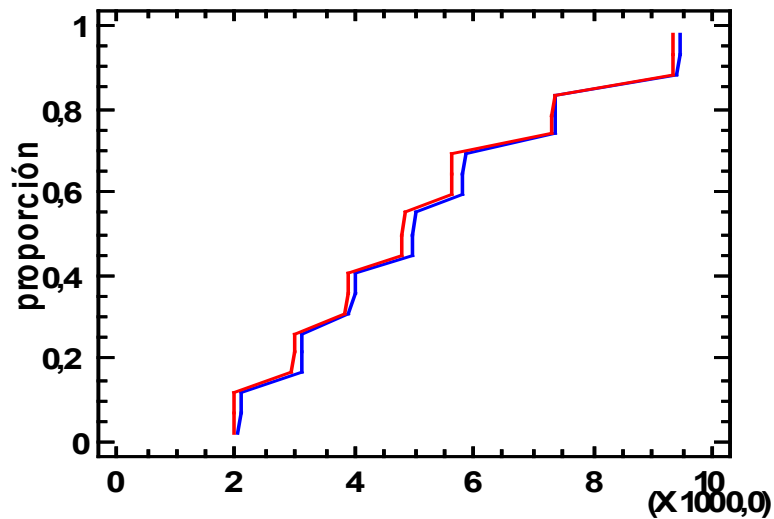
Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado

Resumen Estadístico

	AUC ST COMB C	AUC PLACEBO CARGADO_1
Recuento	21	21
Promedio	5249,38	5131,07
Desviación Estándar	2421,72	2429,58
Coefficiente de Variación	46,1334%	47,3503%
Mínimo	2054,39	1967,55
Máximo	9466,62	9377,37
Rango	7412,23	7409,82
Sesgo Estandarizado	0,857783	0,932714
Curtosis Estandarizada	-0,745693	-0,734747



Gáfico de Cuantiles



Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis Alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,158055$ valor-P = **0,875208**

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

-Vitamina B1 (Tiamina)

Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	60,1081	3,87205	15,5236	0,0000
Pendiente	2,30829	0,0257118	89,7755	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	476685,	1	476685,	8059,65	0,0000
Residuo	1123,75	19	59,1447		
Total (Corr.)	477809,	20			

Coeficiente de Correlación = 0,998823

R-cuadrada = 99,7648 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,7524 por ciento

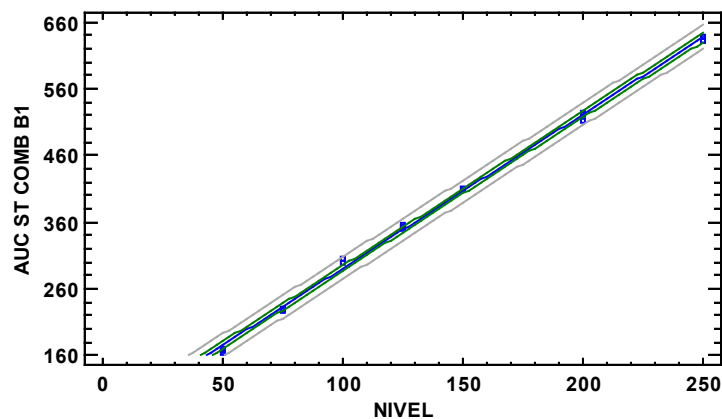
Error estándar del est. = 7,69056

Error absoluto medio = 6,22332

Estadístico Durbin-Watson = 0,689585 (P=0,0001)

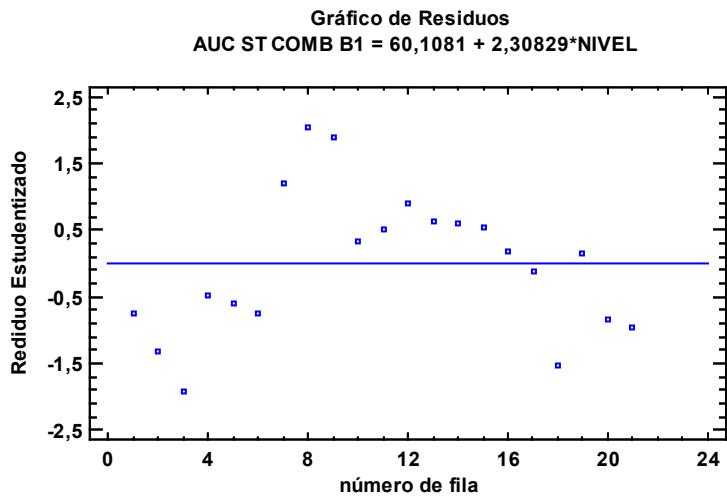
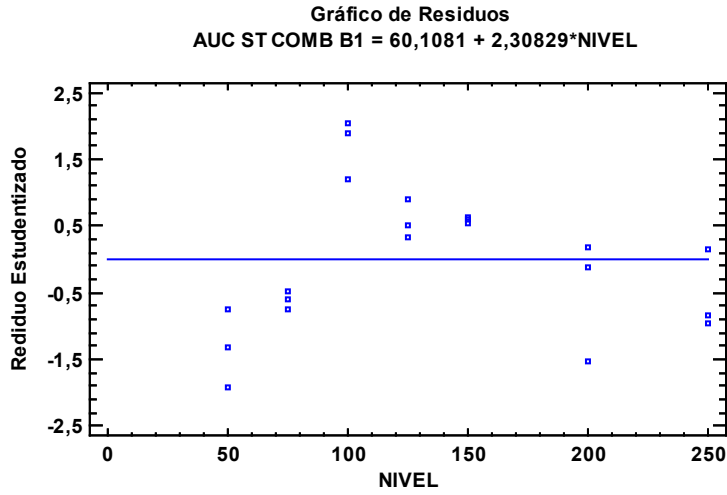
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,622054

Gráfico del Modelo Ajustado
 $AUC\ ST\ COMB\ B1 = 60,1081 + 2,30829 \cdot NIVEL$



Residuos Atípicos

			Predicciones		Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados
8	100,0	305,022	290,938	14,0845	2,04

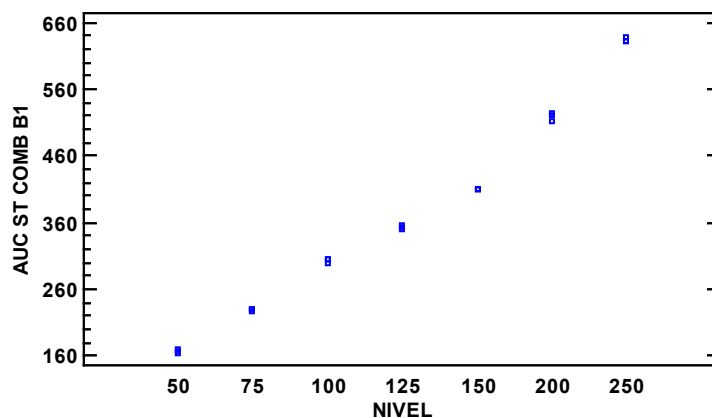


ANOVA simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Dispersión por Código de Nivel



Resumen Estadístico para AUC ST COMB B1

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	166,275	3,65527	2,19832%	162,677	169,985	7,308
75	3	228,71	0,988303	0,43212%	227,662	229,625	1,963
100	3	302,992	2,75718	0,909985%	299,853	305,022	5,169
125	3	353,02	2,14139	0,606592%	351,144	355,353	4,209
150	3	410,918	0,354713	0,086322%	410,539	411,242	0,703
200	3	518,343	6,44004	1,24243%	511,017	523,11	12,093
250	3	633,377	4,19404	0,662171%	630,56	638,197	7,637
Total	21	373,377	154,565	41,3966%	162,677	638,197	475,52

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	0,0968278	
75	-0,422487	
100	-1,0728	
125	0,648146	
150	-0,48152	
200	-1,06492	
250	1,17305	
Total	0,707413	-0,849057

ANOVA Gráfico para AUC ST COMB B1

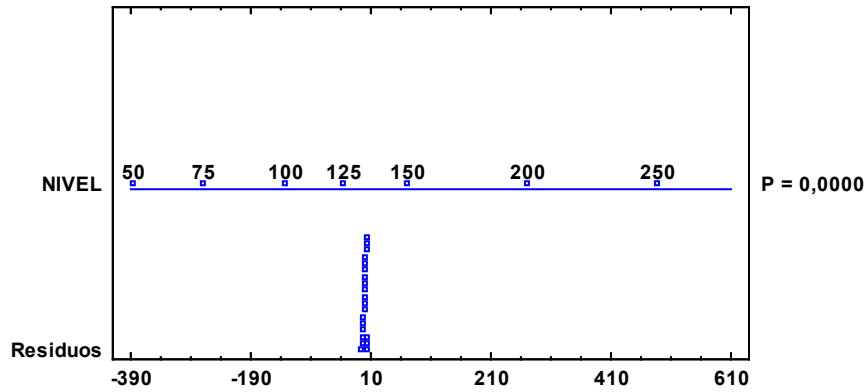
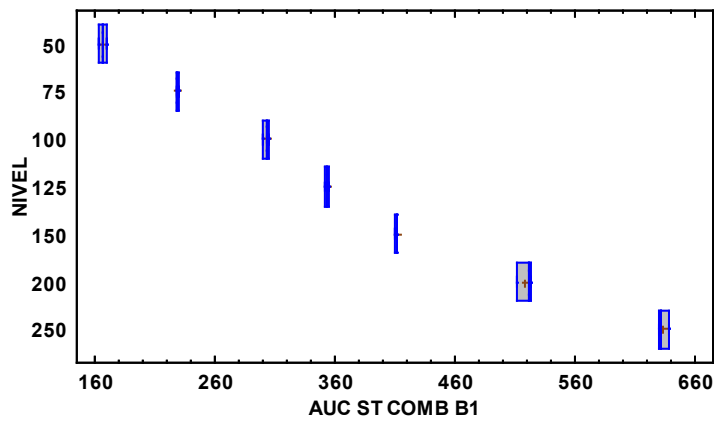


Tabla ANOVA para AUC ST COMB B1 por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	477638,	6	79606,3	6501,11	0,0000
Intra grupos	171,43	14	12,245		
Total (Corr.)	477809,	20			

Gráfico Caja y Bigotes



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,654157	0,687053

Regresión simple Placebo cargado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	60,6944	4,6185	13,1416	0,0000
Pendiente	2,27772	0,0306685	74,2691	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	464143,	1	464143,	5515,89	0,0000
Residuo	1598,78	19	84,1465		
Total (Corr.)	465742,	20			

Coefficiente de Correlación = 0,998282

R-cuadrada = 99,6567 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,6387 por ciento

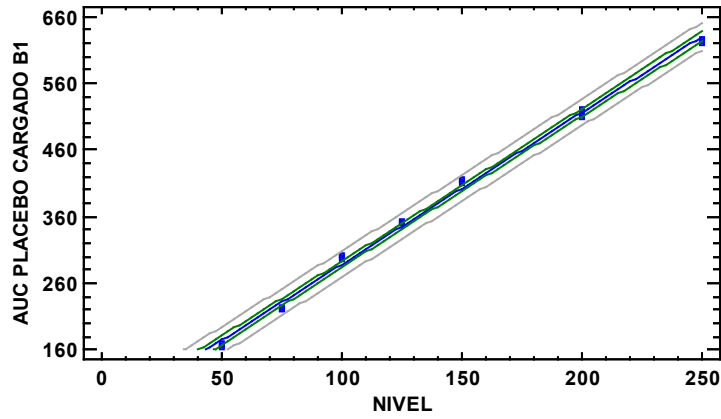
Error estándar del est. = 9,17314

Error absoluto medio = 8,22535

Estadístico Durbin-Watson = 0,560563 (P=0,0000)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,674409

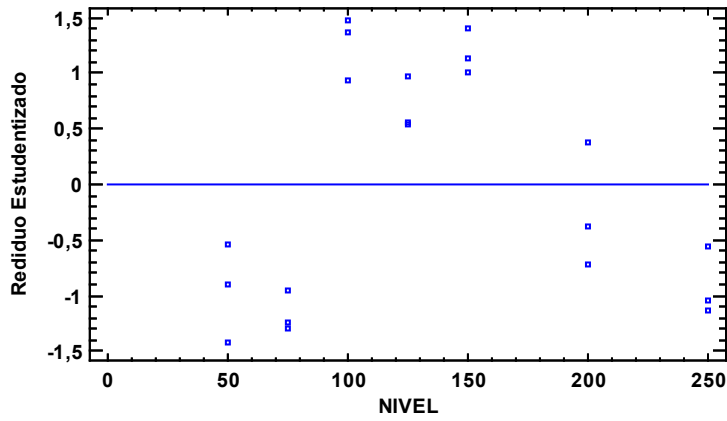
Gráfico del Modelo Ajustado
 AUC PLACEBO CARGADO B1 = 60,6944 + 2,2772*NIVEL

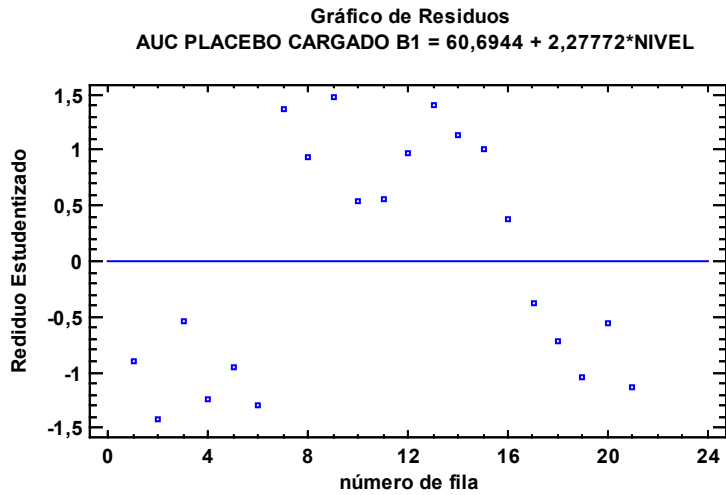


Residuos Atípicos

			Predicciones		Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados

Gráfico de Residuos
 AUC PLACEBO CARGADO B1 = 60,6944 + 2,2772*NIVEL



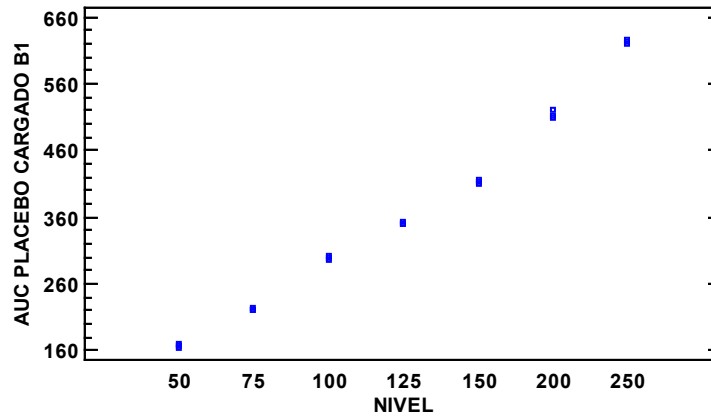


ANOVA simple Placebo cargado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Dispersión por Código de Nivel



Resumen Estadístico para AUC PLACEBO CARGADO B1

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	166,531	3,60488	2,1647%	162,76	169,943	7,183
75	3	221,494	1,48781	0,671714%	220,439	223,196	2,757
100	3	299,416	2,34836	0,784312%	296,746	301,161	4,415
125	3	351,703	2,15892	0,613848%	350,373	354,194	3,821
150	3	412,756	1,64435	0,398383%	411,345	414,562	3,217

200	3	514,155	4,99393	0,971287%	509,936	519,669	9,733
250	3	622,643	2,49358	0,400482%	620,867	625,494	4,627
Total	21	369,814	152,601	41,2643%	162,76	625,494	462,734

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	-0,313171	
75	1,12144	
100	-1,0589	
125	1,21631	
150	0,719189	
200	0,769311	
250	1,11645	
Total	0,631341	-0,924233

ANOVA Gráfico para AUC PLACEBO CARGADO B1

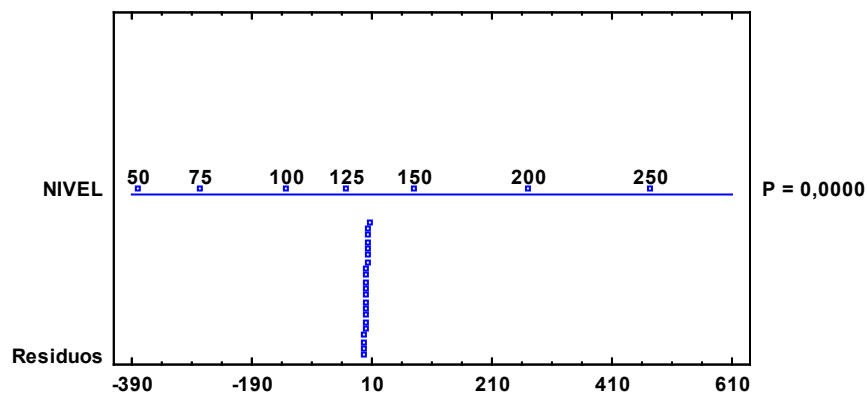


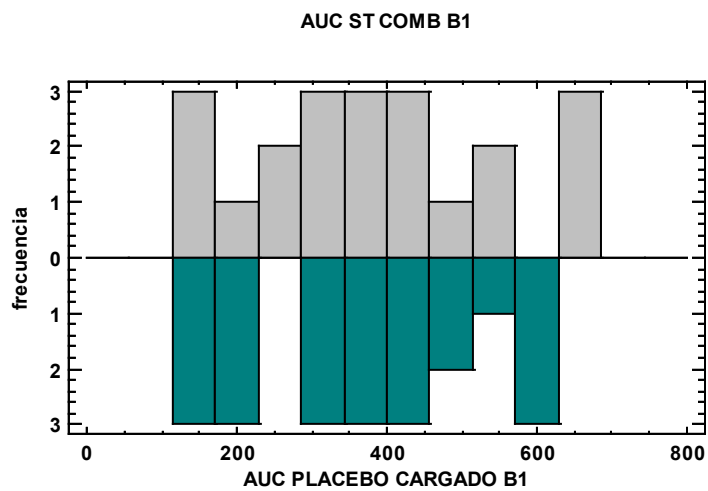
Tabla ANOVA para AUC PLACEBO CARGADO B1 por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	465624,	6	77603,9	9169,08	0,0000
Intra grupos	118,491	14	8,46366		
Total (Corr.)	465742,	20			

Verificación de Varianza

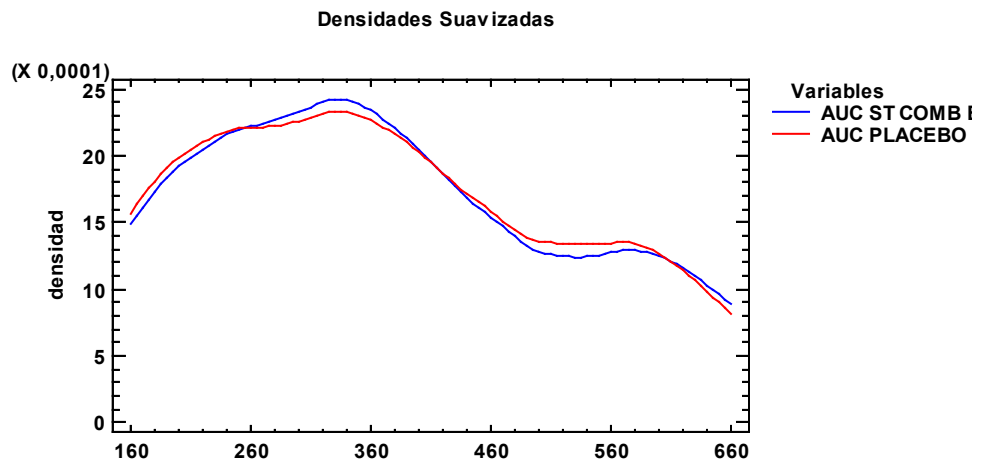
	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,453345	0,830988

Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado



Resumen Estadístico

	<i>AUC ST COMB B1</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO B1</i>
Recuento	21	21
Promedio	373,377	369,814
Desviación Estándar	154,565	152,601
Coefficiente de Variación	41,3966%	41,2643%
Mínimo	162,677	162,76
Máximo	638,197	625,494
Rango	475,52	462,734
Sesgo Estandarizado	0,707413	0,631341
Curtosis Estandarizada	-0,849057	-0,924233



Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis Alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,0751602$ valor-P = 0,940462

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

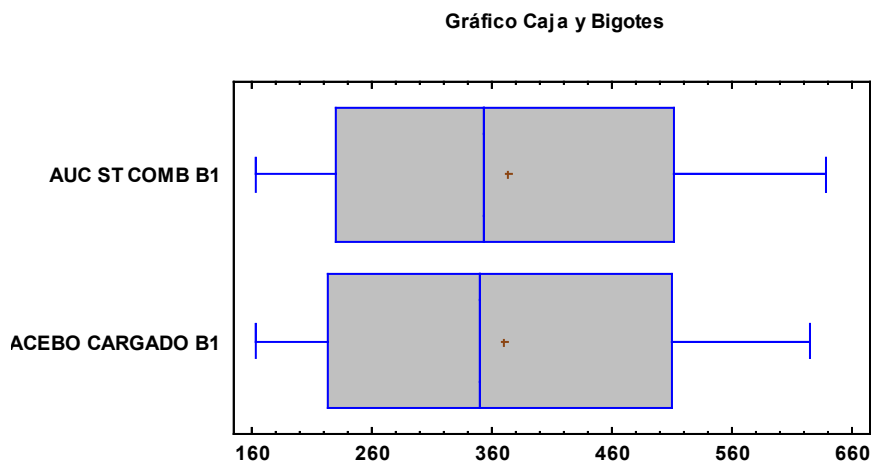
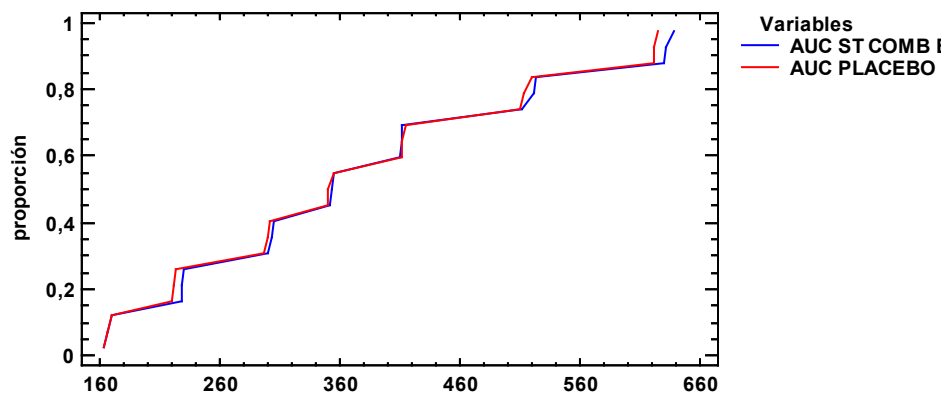


Gráfico de Cuantiles



-Vitamina B2 (Riboflavina)

Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-4,5768	3,96117	-1,15541	0,2622
Pendiente	4,03051	0,0263037	153,23	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,45335E6	1	1,45335E6	23479,40	0,0000
Residuo	1176,08	19	61,8987		
Total (Corr.)	1,45452E6	20			

Coefficiente de Correlación = 0,999596

R-cuadrada = 99,9191 por ciento

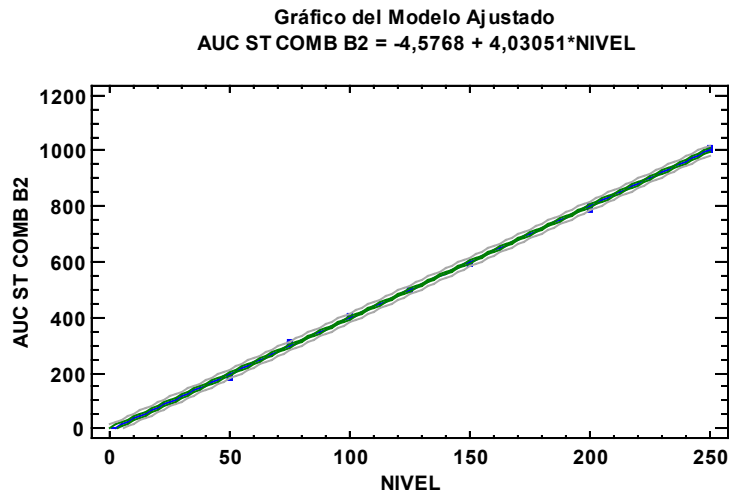
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9149 por ciento

Error estándar del est. = 7,86758

Error absoluto medio = 6,53751

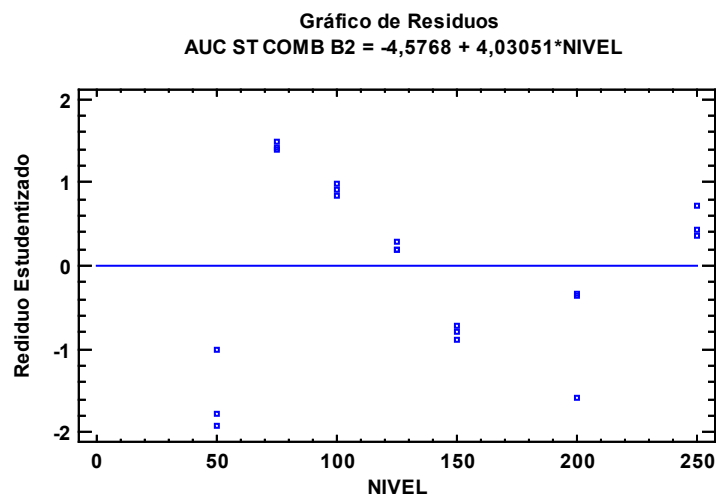
Estadístico Durbin-Watson = 0,876508 (P=0,0008)

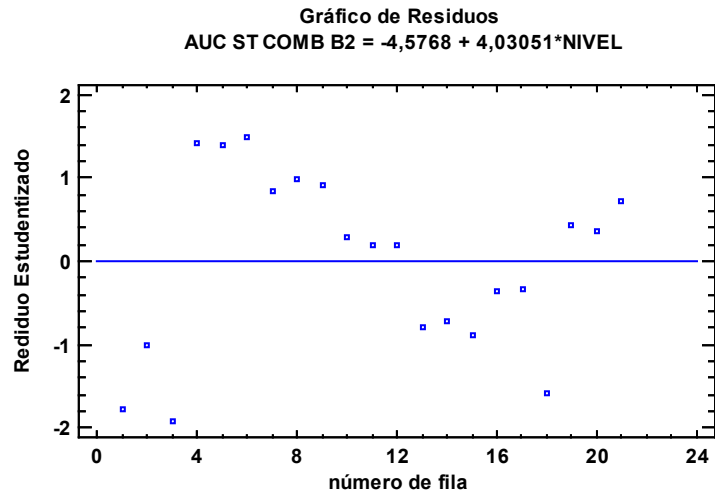
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,484925



Residuos Atípicos

			<i>Predicciones</i>		<i>Residuos</i>
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>

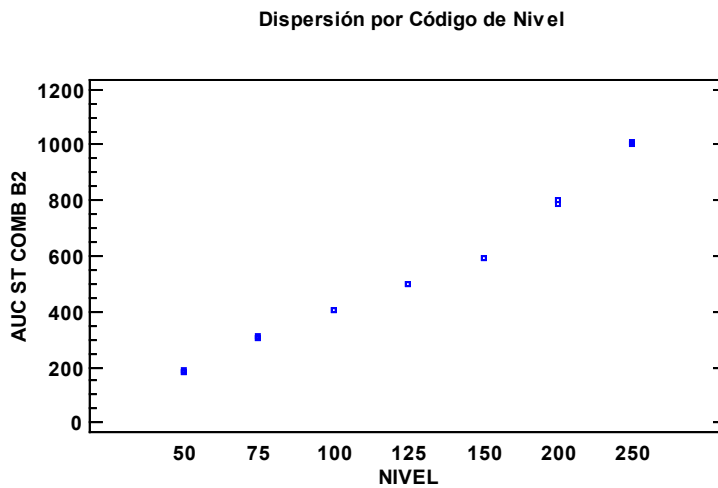




ANOVA simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7



Resumen Estadístico para AUC ST COMB B2

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	185,933	3,10501	1,66996%	183,763	189,49	5,727
75	3	308,182	0,292268	0,0948359%	307,916	308,495	0,579
100	3	405,47	0,575907	0,142034%	404,882	406,033	1,151

125	3	501,037	0,429549	0,0857319%	500,789	501,533	0,744
150	3	593,787	0,619242	0,104287%	593,114	594,333	1,219
200	3	795,871	5,03219	0,632287%	790,061	798,869	8,808
250	3	1006,66	1,3835	0,137434%	1005,64	1008,24	2,601
Total	21	542,42	269,678	49,7175%	183,763	1008,24	824,473

NIVEL	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
50	1,13749	
75	0,491763	
100	-0,137869	
125	1,22474	
150	-0,622146	
200	-1,22284	
250	1,05896	
Total	0,880602	-0,769591

ANOVA Gráfico para AUC ST COMB B2

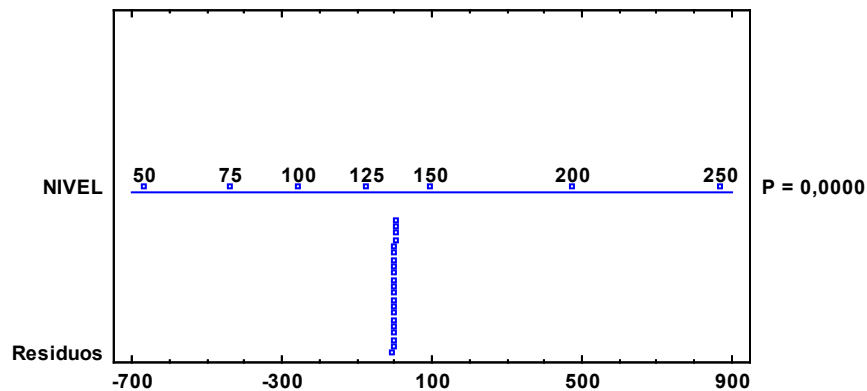
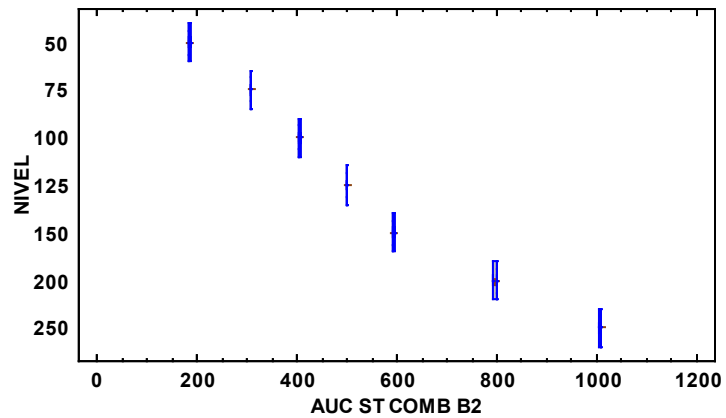


Tabla ANOVA para AUC ST COMB B2 por NIVEL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,45445E6	6	242408,	44815,47	0,0000
Intra grupos	75,7262	14	5,40902		

Total (Corr.)	1,45452E6	20			
---------------	-----------	----	--	--	--

Gráfico Caja y Bigotes



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,693148	0,659277

Regresión simple Placebo cargado vs nivel

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-7,90962	4,35141	-1,81771	0,0849
Pendiente	4,06539	0,028895	140,696	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,47861E6	1	1,47861E6	19795,24	0,0000
Residuo	1419,21	19	74,6954		
Total (Corr.)	1,48003E6	20			

Coefficiente de Correlación = 0,99952

R-cuadrada = 99,9041 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,8991 por ciento

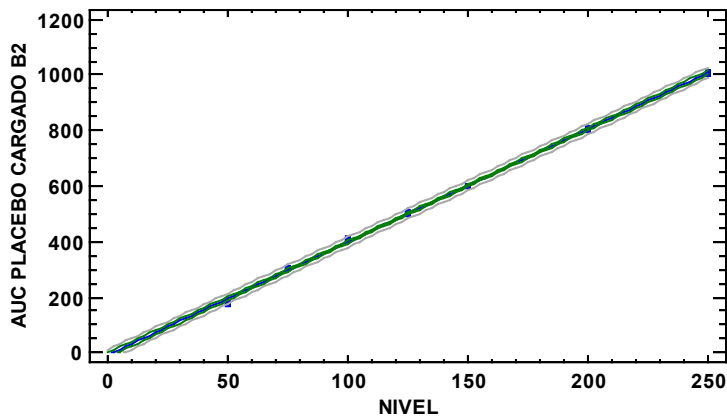
Error estándar del est. = 8,64265

Error absoluto medio = 6,33887

Estadístico Durbin-Watson = 0,803986 (P=0,0004)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,468743

Gráfico del Modelo Ajustado
 $AUC\ PLACEBO\ CARGADO\ B2 = -7,90962 + 4,06539 * NIVEL$



Residuos Atípicos

			Predicciones	Residuos	
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados
1	50,0	178,176	195,36	-17,184	-2,38
3	50,0	178,489	195,36	-16,871	-2,32

Gráfico de Residuos
AUC PLACEBO CARGADO B2 = $-7,90962 + 4,06539 \cdot \text{NIVEL}$

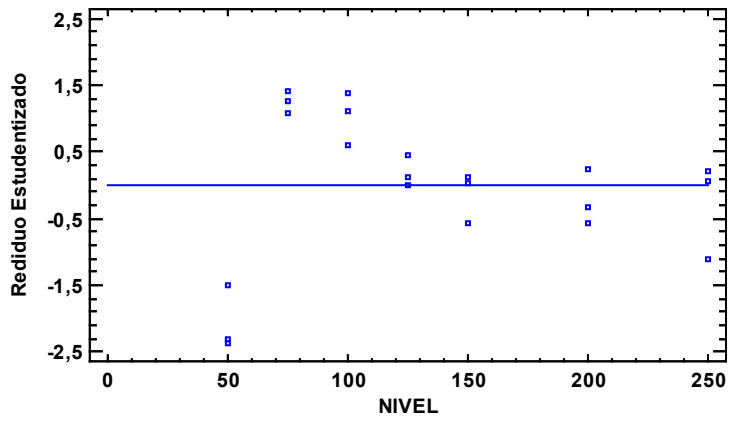
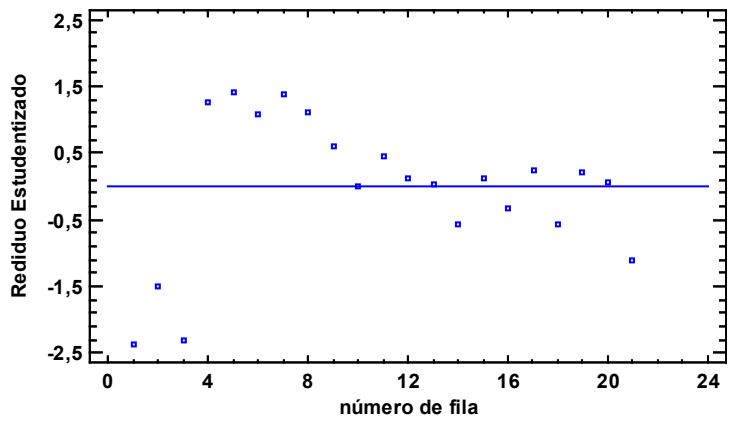


Gráfico de Residuos
AUC PLACEBO CARGADO B2 = $-7,90962 + 4,06539 \cdot \text{NIVEL}$

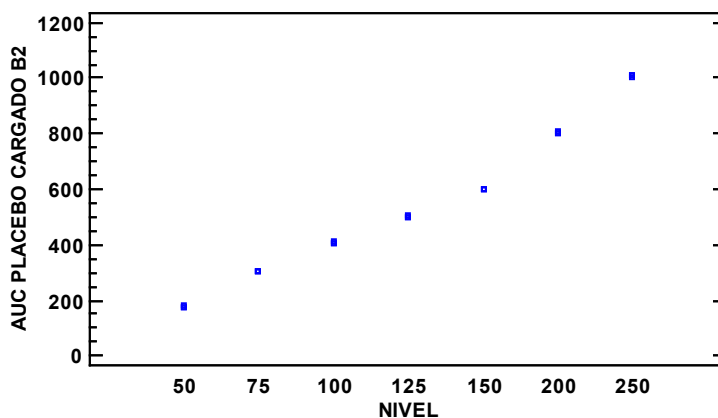


ANOVA simple Placebo cargado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Dispersión por Código de Nivel



Resumen Estadístico para AUC PLACEBO CARGADO B2

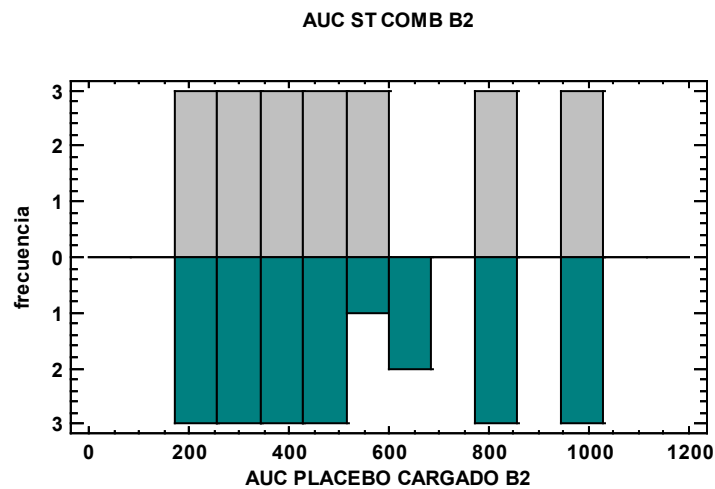
<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	180,096	3,05905	1,69857%	178,176	183,624	5,448
75	3	307,138	1,17701	0,383218%	305,923	308,273	2,35
100	3	407,192	3,2329	0,79395%	403,663	410,011	6,348
125	3	501,897	2,0973	0,417874%	500,17	504,231	4,061
150	3	600,674	3,15329	0,524959%	597,065	602,898	5,833
200	3	803,407	3,4741	0,432421%	800,509	807,258	6,749
250	3	1006,35	5,55095	0,551591%	999,976	1010,11	10,13
Total	21	543,822	272,032	50,0223%	178,176	1010,11	831,93

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	1,21034	
75	-0,213499	
100	-0,664551	
125	0,843031	
150	-1,1277	
200	0,807658	
250	-1,16779	
Total	0,81118	-0,812693

Verificación de Varianza

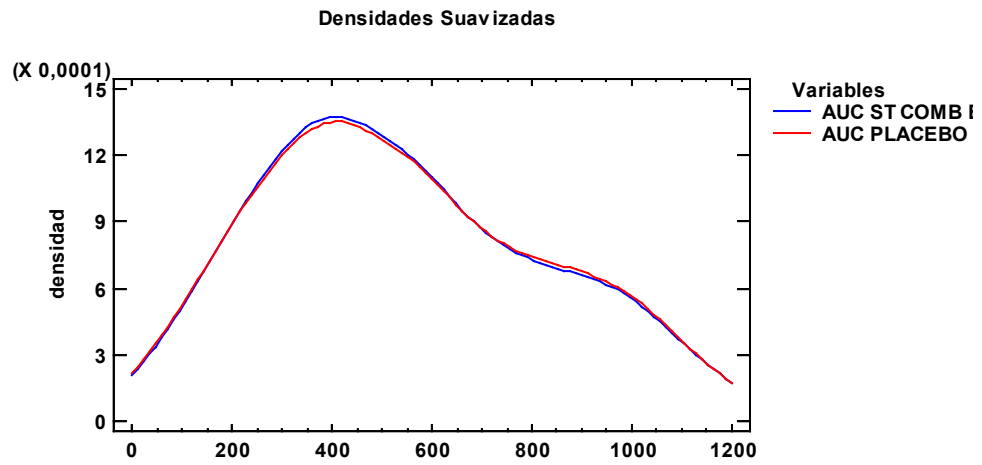
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,259313	0,947003

Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado



Resumen Estadístico

	<i>AUC ST COMB B2</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO B2</i>
Recuento	21	21
Promedio	542,42	543,822
Desviación Estándar	269,678	272,032
Coefficiente de Variación	49,7175%	50,0223%
Mínimo	183,763	178,176
Máximo	1008,24	1010,11
Rango	824,473	831,93
Sesgo Estandarizado	0,880602	0,81118
Curtosis Estandarizada	-0,769591	-0,812693



Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 < media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = -0,0167704$ valor-P = **0,986703**

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Caja y Bigotes

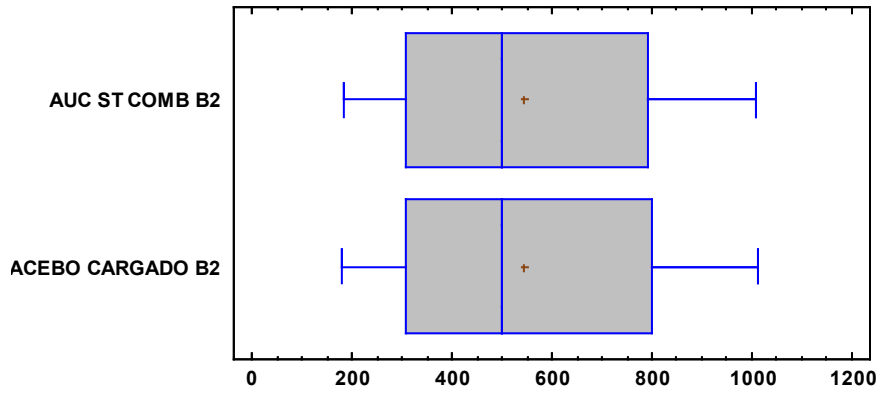
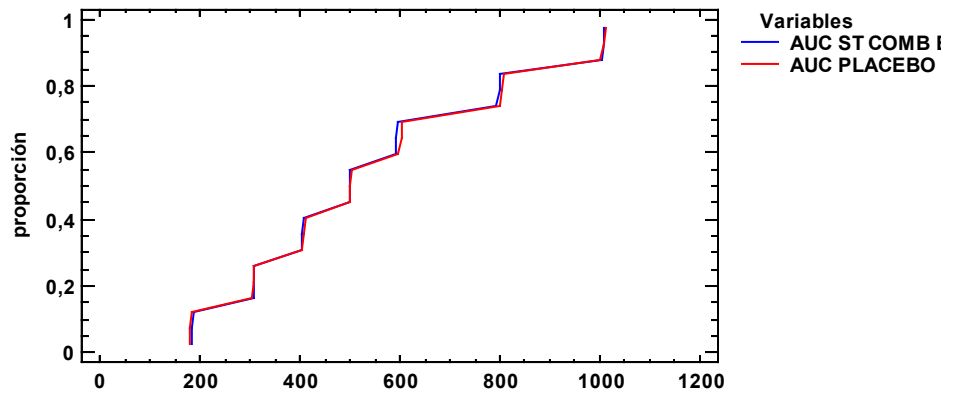


Gráfico de Cuantiles



-Vitamina B3 (Nicotinamida)

Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-5,81791	19,7836	-0,294077	0,7719
Pendiente	22,0564	0,131371	167,895	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	4,35231E7	1	4,35231E7	28188,64	0,0000
Residuo	29335,9	19	1543,99		
Total (Corr.)	4,35524E7	20			

Coefficiente de Correlación = 0,999663

R-cuadrada = 99,9326 por ciento

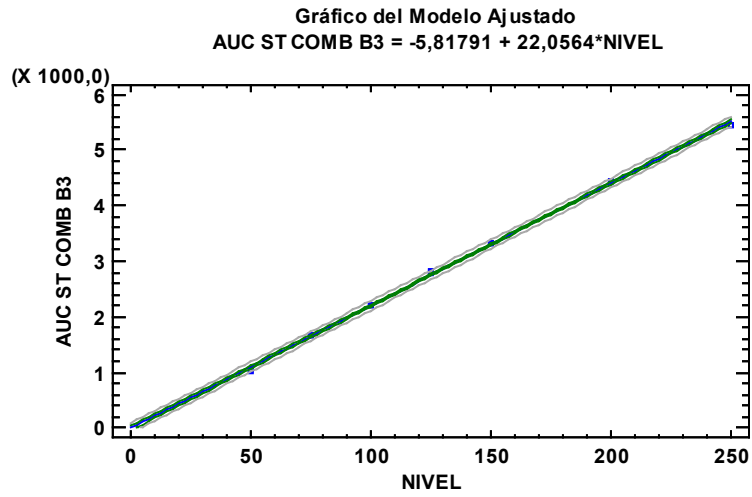
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9291 por ciento

Error estándar del est. = 39,2937

Error absoluto medio = 31,074

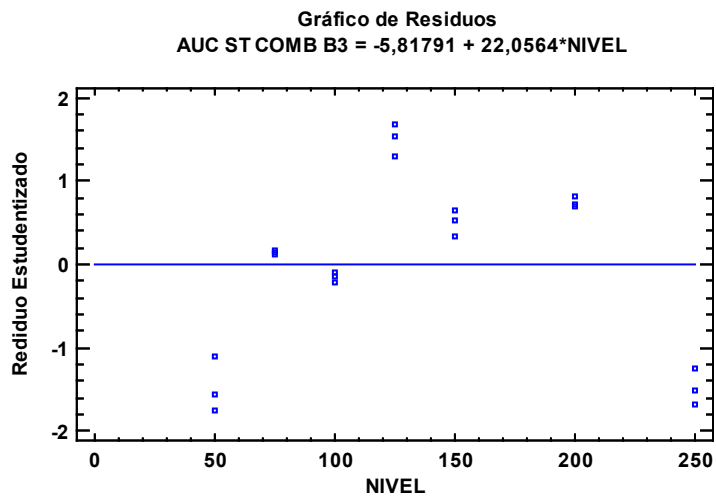
Estadístico Durbin-Watson = 0,597484 (P=0,0000)

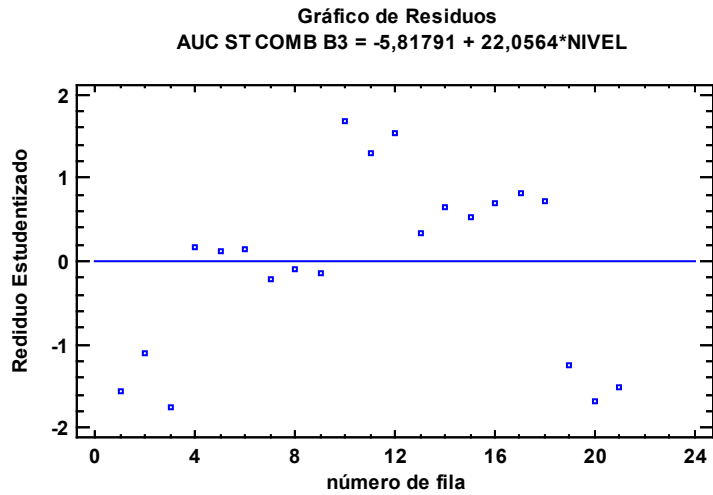
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,603914



Residuos Atípicos

			<i>Predicciones</i>		<i>Residuos</i>
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>

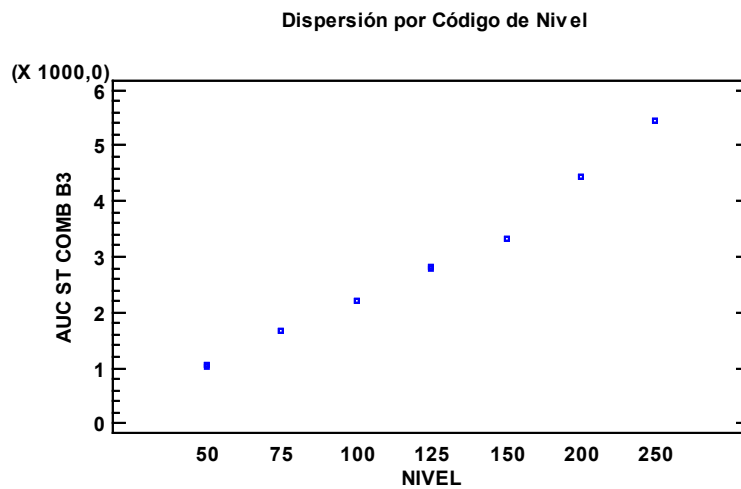




ANOVA simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7



Resumen Estadístico para AUC ST COMB B3

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	1045,03	10,9351	1,04639%	1035,94	1057,17	21,223
75	3	1654,0	0,831055	0,0502452%	1653,12	1654,77	1,653
100	3	2193,83	2,41051	0,109877%	2191,43	2196,25	4,821
125	3	2806,92	6,12632	0,218258%	2800,34	2812,45	12,117
150	3	3322,27	6,16304	0,185507%	3315,7	3327,92	12,224

200	3	4433,34	2,41968	0,0545791%	4431,43	4436,06	4,631
250	3	5457,49	6,67197	0,122253%	5451,39	5464,61	13,228
Total	21	2987,55	1475,68	49,3942%	1035,94	5464,61	4428,67

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	0,818246	
75	-0,378561	
100	0,0101202	
125	-0,529187	
150	-0,46152	
200	0,946692	
250	0,472129	
Total	0,764447	-0,907822

ANOVA Gráfico para AUC ST COMB B3

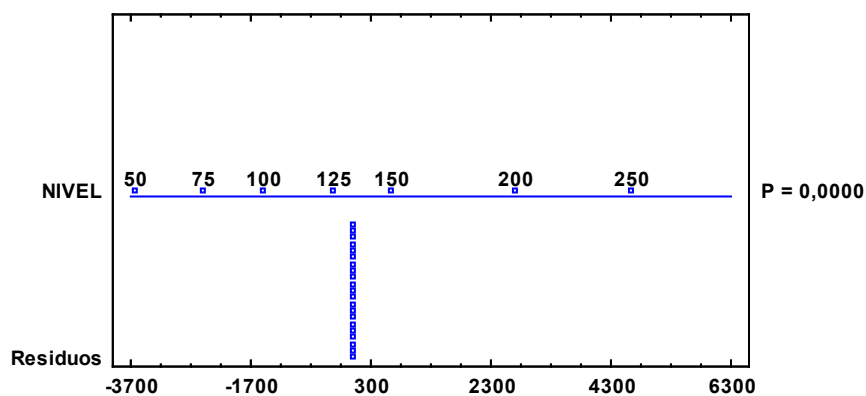
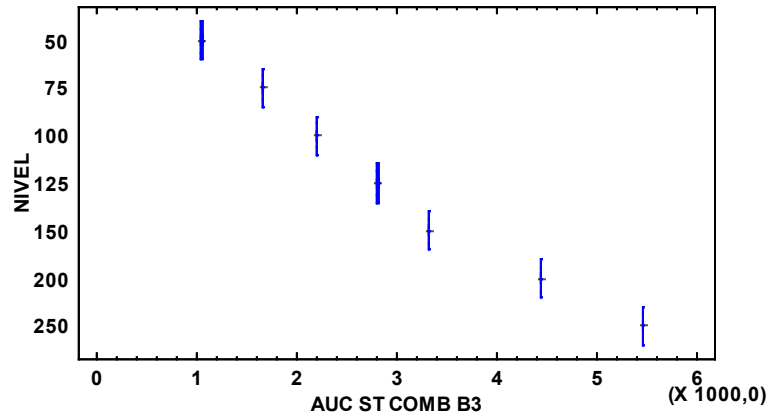


Tabla ANOVA para AUC ST COMB B3 por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4,35519E7	6	7,25866E6	201659,56	0,0000
Intra grupos	503,925	14	35,9946		
Total (Corr.)	4,35524E7	20			

Gráfico Caja y Bigotes



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,959876	0,485764

Regresión simple Placebo cargado vs nivel

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-1,34516	18,2951	-0,0735258	0,9422
Pendiente	21,5405	0,121486	177,308	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4,15107E7	1	4,15107E7	31438,04	0,0000
Residuo	25087,5	19	1320,4		
Total (Corr.)	4,15358E7	20			

Coefficiente de Correlación = 0,999698

R-cuadrada = 99,9396 por ciento

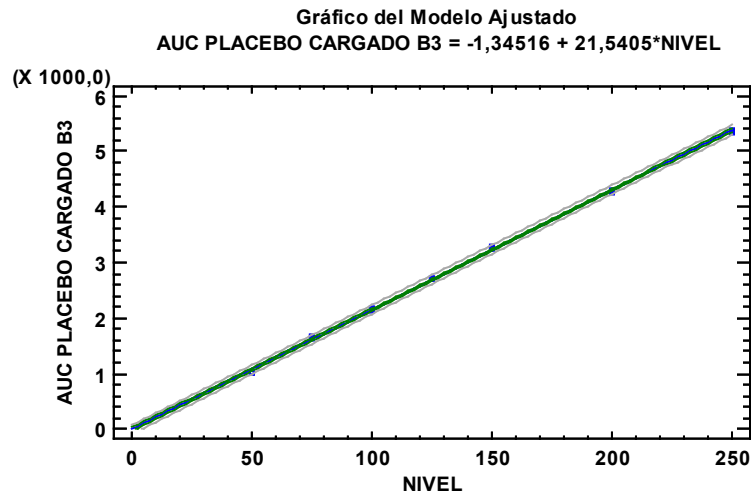
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9364 porciento

Error estándar del est. = 36,3373

Error absoluto medio = 29,226

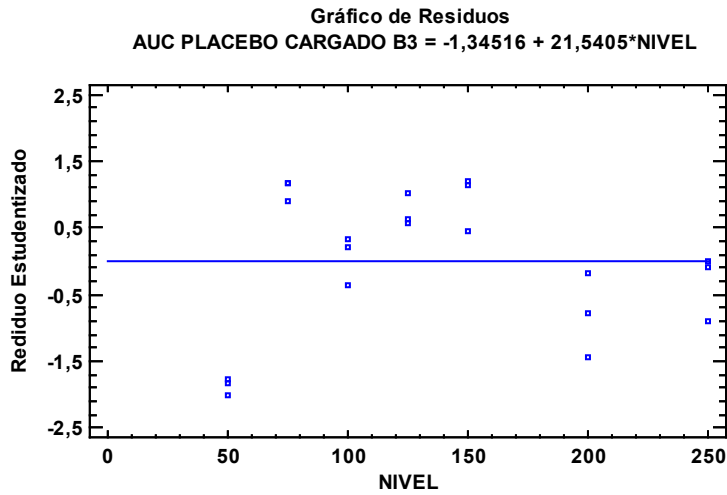
Estadístico Durbin-Watson = 1,00822 (P=0,0030)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,409611



Residuos Atípicos

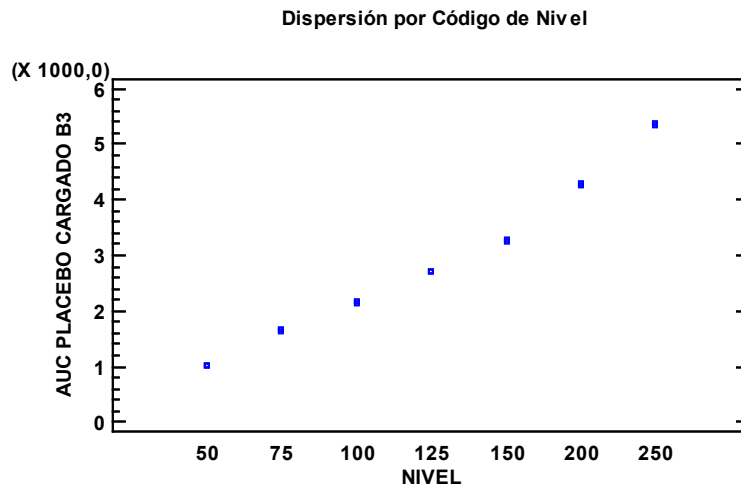
			<i>Predicciones</i>		<i>Residuos</i>
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>
2	50,0	1012,26	1075,68	-63,4192	-2,02



ANOVA simple Placebo cargado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7



Resumen Estadístico para AUC PLACEBO CARGADO B3

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	1015,94	3,32478	0,327261%	1012,26	1018,72	6,463
75	3	1651,22	5,23616	0,317108%	1645,18	1654,31	9,138
100	3	2154,62	13,428	0,62322%	2139,26	2164,13	24,871
125	3	2717,47	8,57717	0,31563%	2711,37	2727,28	15,913

150	3	3262,33	14,3863	0,440982%	3245,76	3271,69	25,927
200	3	4279,48	21,1545	0,494324%	4258,09	4300,4	42,301
250	3	5372,97	16,207	0,301639%	5354,32	5383,64	29,322
Total	21	2922,0	1441,11	49,3191%	1012,26	5383,64	4371,38

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	-0,800468	
75	-1,22377	
100	-1,12318	
125	1,11704	
150	-1,19379	
200	-0,0714117	
250	-1,18673	
Total	0,811359	-0,836003

ANOVA Gráfico para AUC PLACEBO CARGADO B3

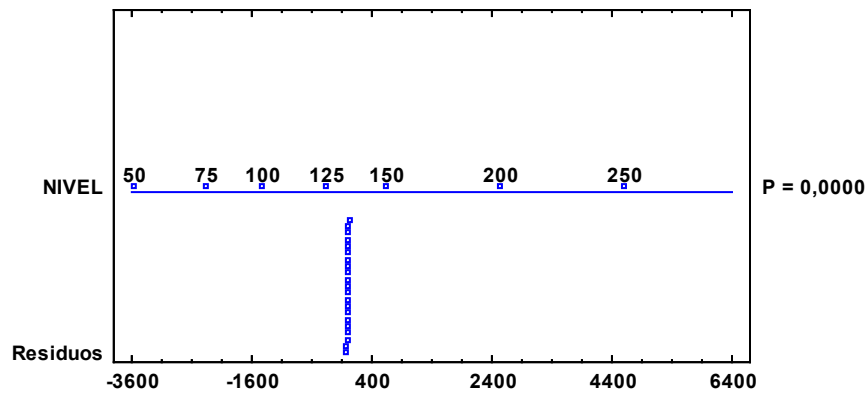
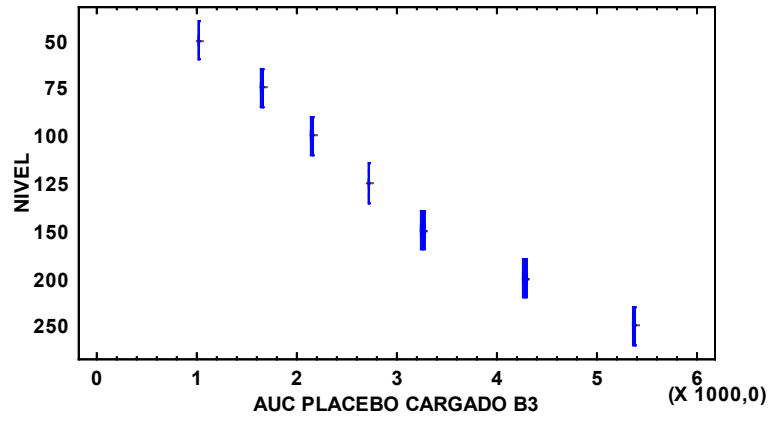


Tabla ANOVA para AUC PLACEBO CARGADO B3 por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4,15334E7	6	6,92223E6	40062,70	0,0000
Intra grupos	2418,99	14	172,785		
Total (Corr.)	4,15358E7	20			

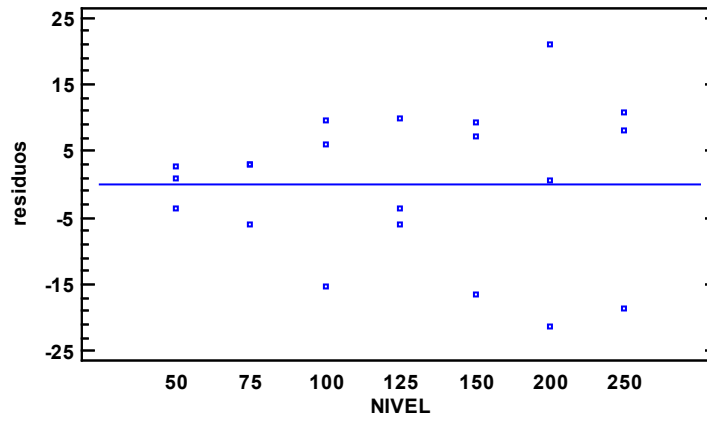
Gráfico Caja y Bigotes

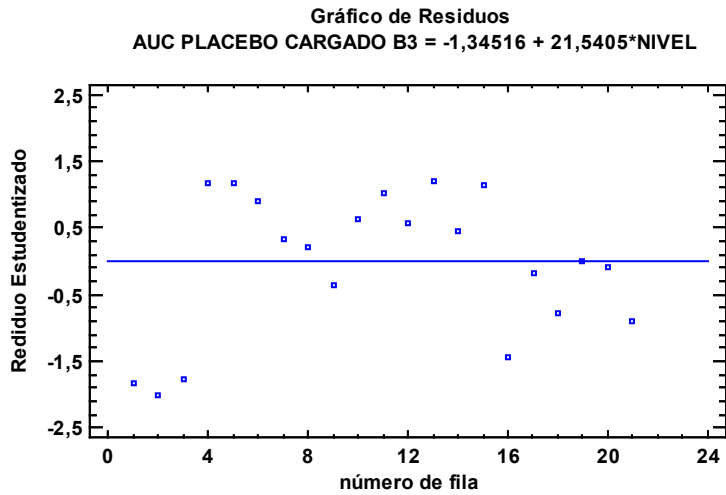


Verificación de Varianza

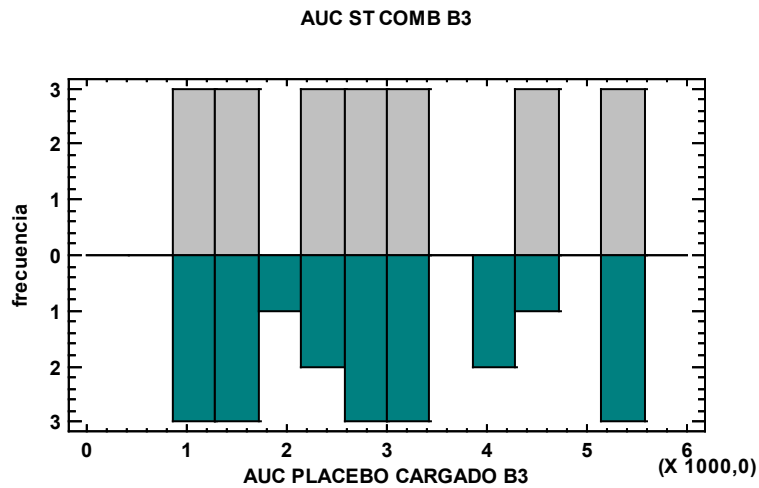
	Prueba	Valor-P
Levene's	0,48423	0,809414

Gráfico de Residuos para AUC PLACEBO CARGADO B3





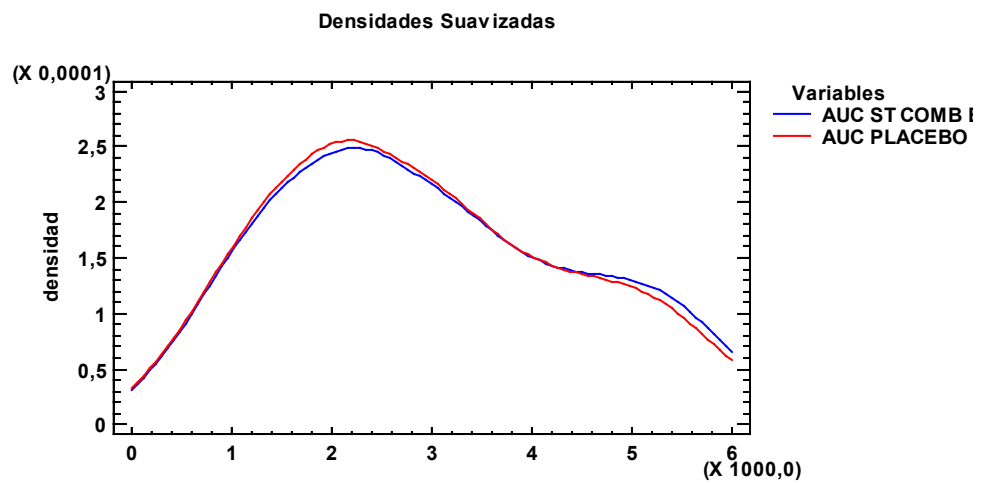
Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado



Resumen Estadístico

	<i>AUC ST COMB B3</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO B3</i>
Recuento	21	21
Promedio	2987,55	2922,0
Desviación Estándar	1475,68	1441,11
Coefficiente de Variación	49,3942%	49,3191%
Mínimo	1035,94	1012,26

Máximo	5464,61	5383,64
Rango	4428,67	4371,38
Sesgo Estandarizado	0,764447	0,811359
Curtosis Estandarizada	-0,907822	-0,836003



Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 < media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,145634$ valor-P = 0,884942

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Caja y Bigotes

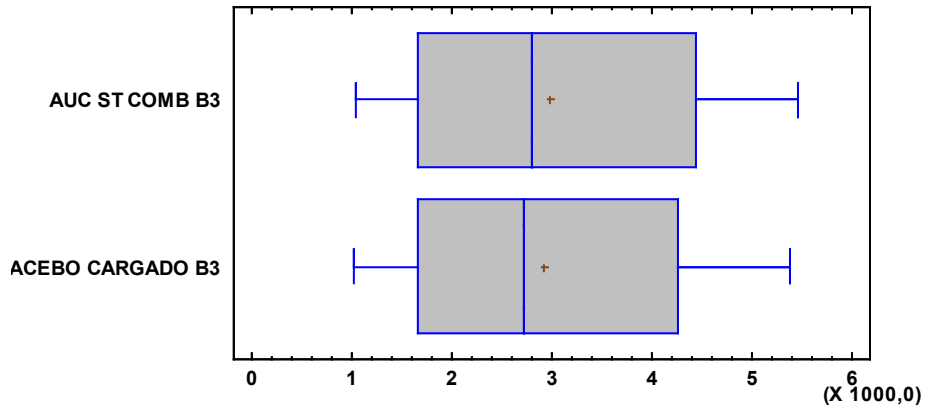
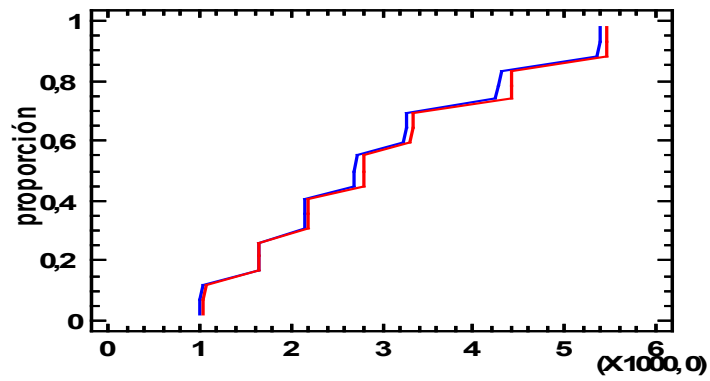


Gráfico de Cuantiles



-Vitamina B6 (Piridoxina)

Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-54,2204	6,68899	-8,10592	0,0000
Pendiente	4,25536	0,0444173	95,804	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,62003E6	1	1,62003E6	9178,40	0,0000
Residuo	3353,58	19	176,504		
Total (Corr.)	1,62338E6	20			

Coefficiente de Correlación = 0,998967

R-cuadrada = 99,7934 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,7825 por ciento

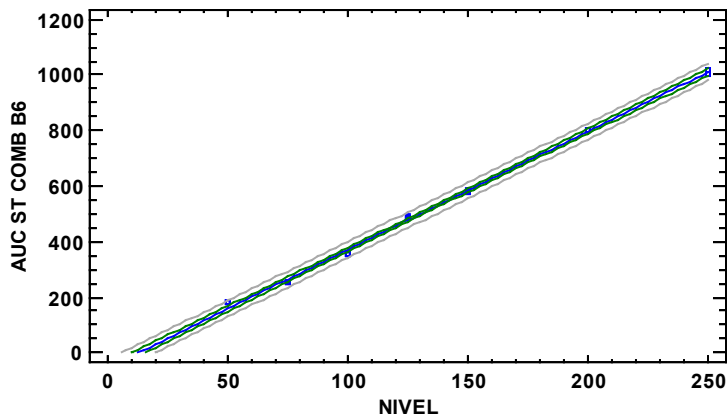
Error estándar del est. = 13,2855

Error absoluto medio = 10,1213

Estadístico Durbin-Watson = 0,659686 (P=0,0001)

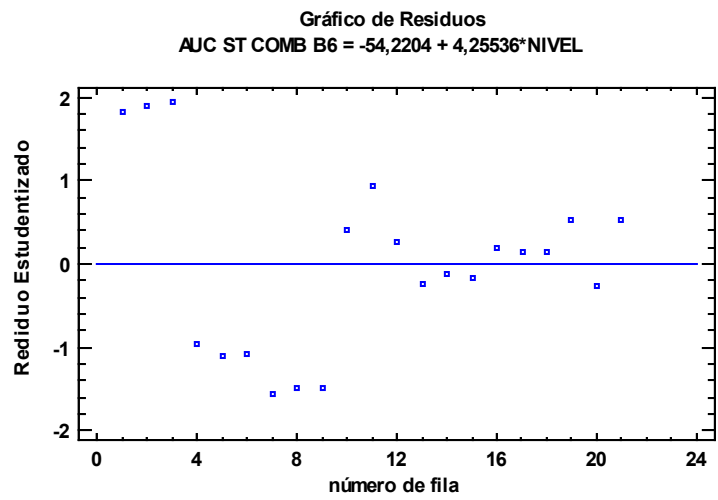
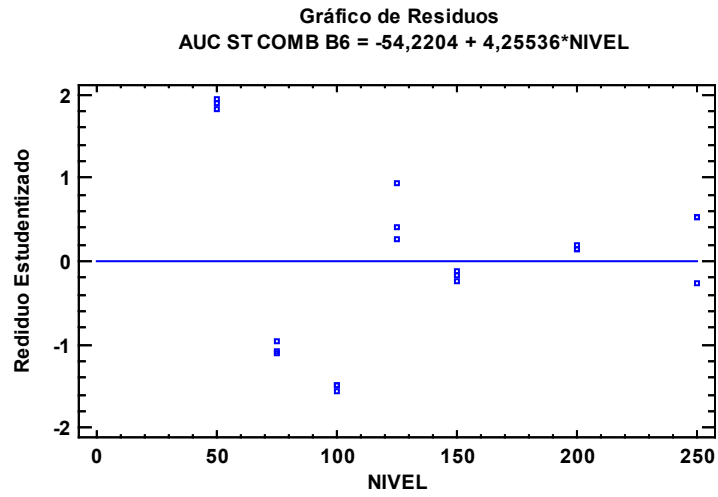
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,596485

Gráfico del Modelo Ajustado
 $AUC\ ST\ COMB\ B6 = -54,2204 + 4,25536 * NIVEL$



Residuos Atípicos

			Predicciones		Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados

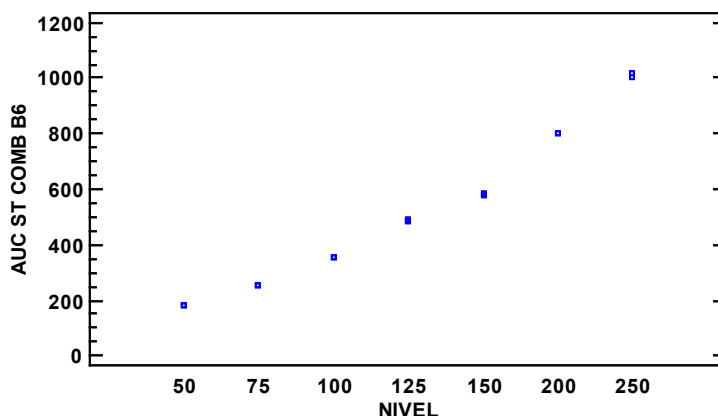


Regresión simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7

Dispersión por Código de Nivel



Resumen Estadístico para AUC ST COMB B6

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	180,486	0,631076	0,349654%	179,793	181,028	1,235
75	3	251,675	0,966479	0,384019%	250,95	252,772	1,822
100	3	352,486	0,424352	0,120388%	351,996	352,731	0,735
125	3	484,757	4,51375	0,931135%	481,32	489,869	8,549
150	3	581,793	0,853042	0,146623%	580,917	582,621	1,704
200	3	798,92	0,322658	0,0403868%	798,662	799,282	0,62
250	3	1012,93	5,59106	0,551969%	1006,47	1016,16	9,684
Total	21	523,292	284,902	54,4441%	179,793	1016,16	836,365

<i>NIVEL</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
50	-0,714989	
75	1,04452	
100	-1,22474	
125	1,01792	
150	-0,180943	
200	0,914531	
250	-1,22474	
Total	0,981671	-0,882849

ANOVA Gráfico para AUC ST COMB B6

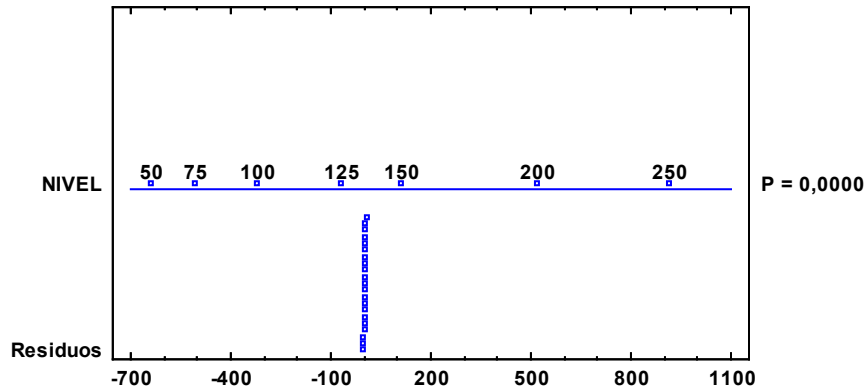
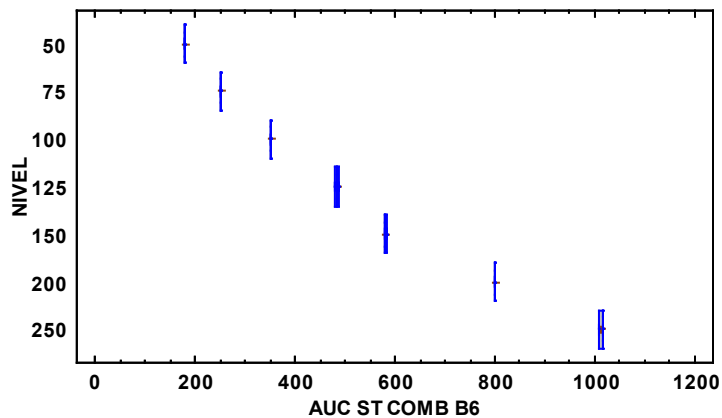


Tabla ANOVA para AUC ST COMB B6 por NIVEL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,62327E6	6	270545,	35084,94	0,0000
Intra grupos	107,956	14	7,71115		
Total (Corr.)	1,62338E6	20			

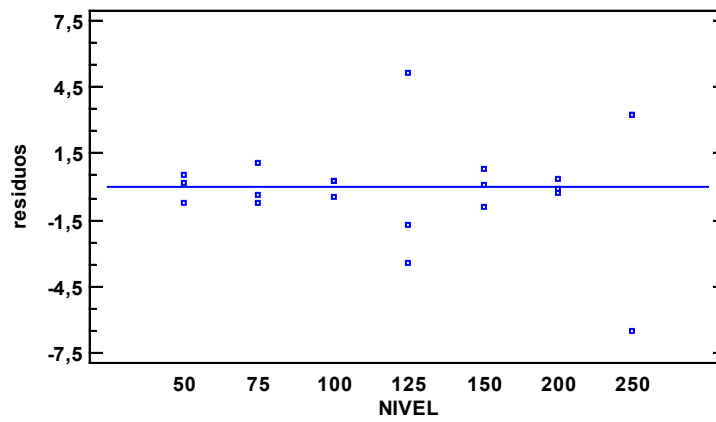
Gráfico Caja y Bigotes



Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,786654	0,594696

Gráfico de Residuos para AUC ST COMB B6



Regresión simple Placebo cargado vs nivel

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-56,2407	6,79032	-8,28248	0,0000
Pendiente	4,23361	0,0450903	93,8918	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,60351E6	1	1,60351E6	8815,68	0,0000
Residuo	3455,96	19	181,893		
Total (Corr.)	1,60696E6	20			

Coefficiente de Correlación = 0,998924

R-cuadrada = 99,7849 por ciento

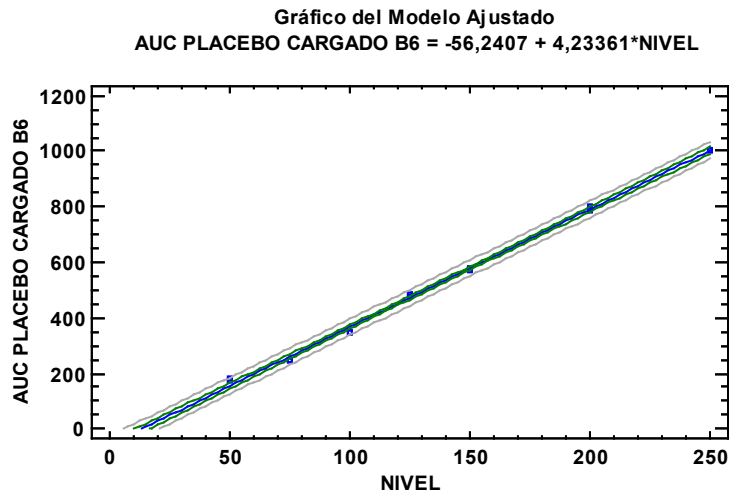
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,7736 por ciento

Error estándar del est. = 13,4868

Error absoluto medio = 10,4463

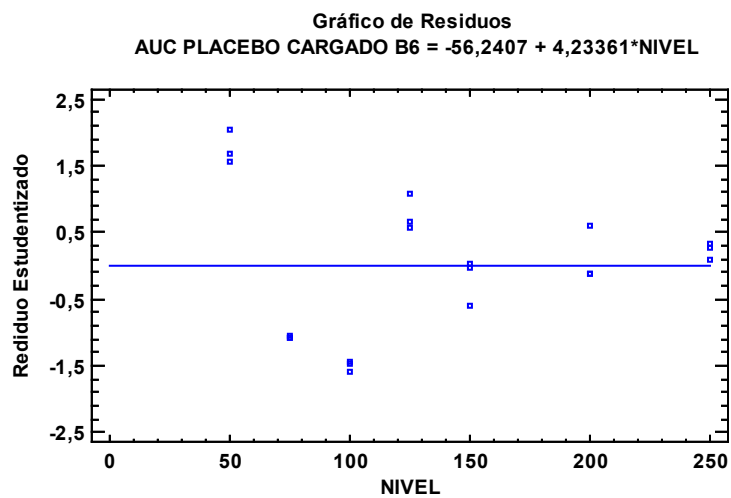
Estadístico Durbin-Watson = 0,652944 (P=0,0000)

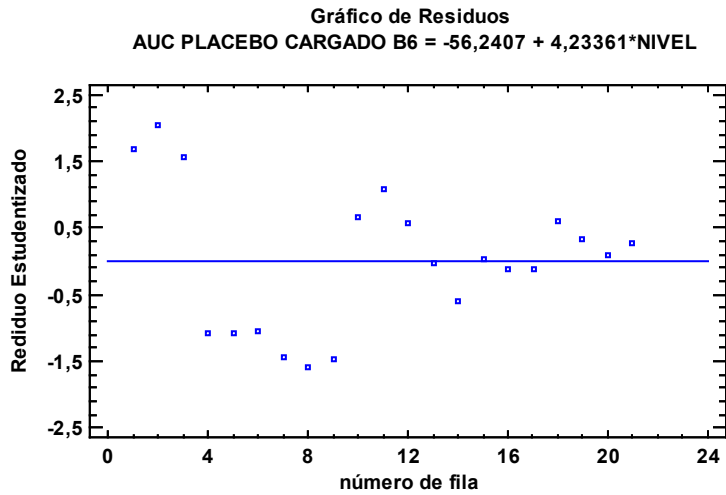
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,613468



Residuos Atípicos

			<i>Predicciones</i>		<i>Residuos</i>
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Studentizados</i>
2	50,0	179,105	155,44	23,6654	2,03

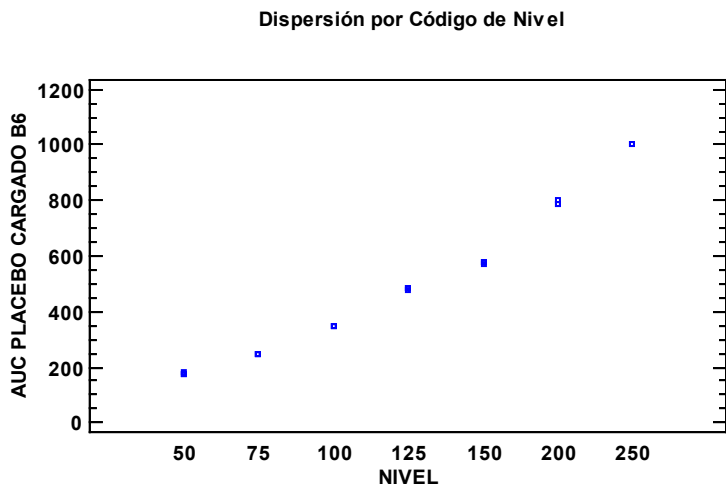




ANOVA simple Placebo cargado vs nivel

Número de observaciones: 21

Número de niveles: 7



Resumen Estadístico para AUC PLACEBO CARGADO B6

<i>NIVEL</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coefficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>
50	3	176,311	2,50161	1,41886%	174,279	179,105	4,826
75	3	247,412	0,201785	0,0815581%	247,295	247,645	0,35
100	3	348,259	0,914498	0,262591%	347,217	348,927	1,71

125	3	483,131	3,60619	0,746422%	480,528	487,247	6,719
150	3	576,126	4,55002	0,789762%	570,905	579,245	8,34
200	3	792,036	5,32148	0,671873%	788,943	798,181	9,238
250	3	1004,97	1,42106	0,141404%	1003,37	1006,09	2,722
Total	21	518,32	283,457	54,6877%	174,279	1006,09	831,812

NIVEL	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
50	0,879314	
75	1,22471	
100	-1,08483	
125	1,1003	
150	-1,15627	
200	1,22466	
250	-0,940287	
Total	0,968475	-0,885478

ANOVA Gráfico para AUC PLACEBO CARGADO B6

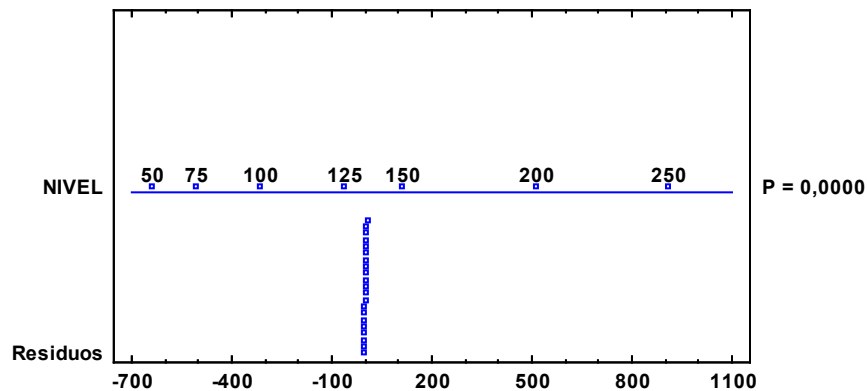
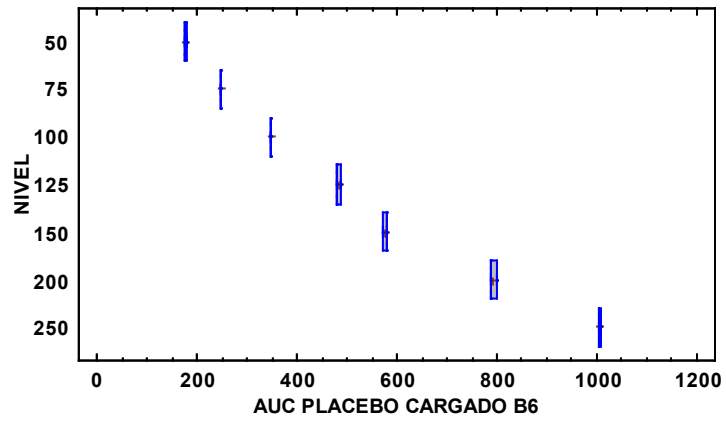


Tabla ANOVA para AUC PLACEBO CARGADO B6 por NIVEL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,60682E6	6	267803,	26336,40	0,0000
Intra grupos	142,36	14	10,1686		

Total (Corr.)	1,60696E6	20			
---------------	-----------	----	--	--	--

Gráfico Caja y Bigotes

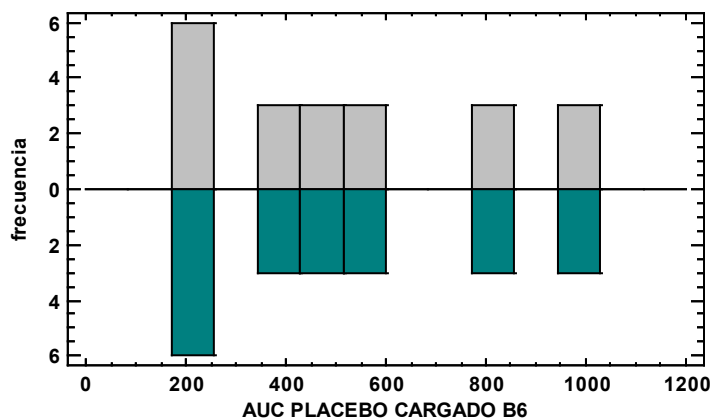


Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,469014	0,820101

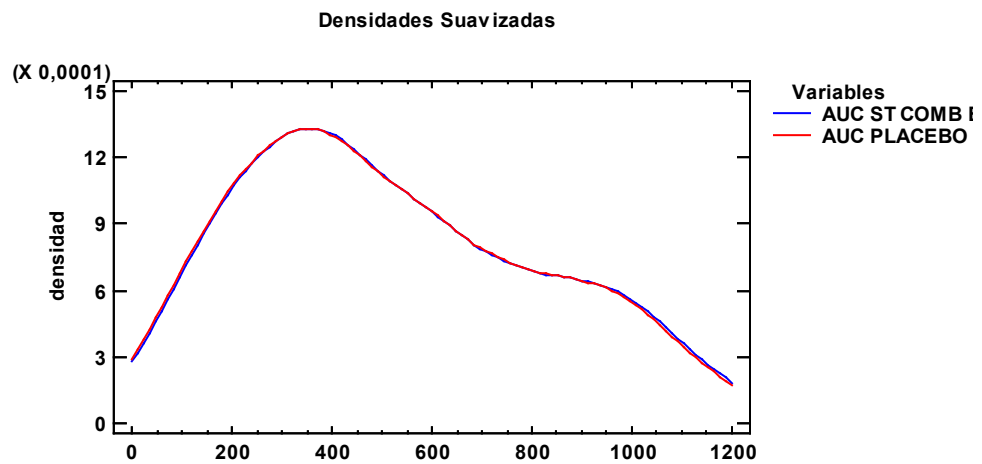
Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado

AUC ST COMB B6



Resumen Estadístico

	<i>AUC ST COMB B6</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO B6</i>
Recuento	21	21
Promedio	523,292	518,32
Desviación Estándar	284,902	283,457
Coefficiente de Variación	54,4441%	54,6877%
Mínimo	179,793	174,279
Máximo	1016,16	1006,09
Rango	836,365	831,812
Sesgo Estandarizado	0,981671	0,968475
Curtosis Estandarizada	-0,882849	-0,885478



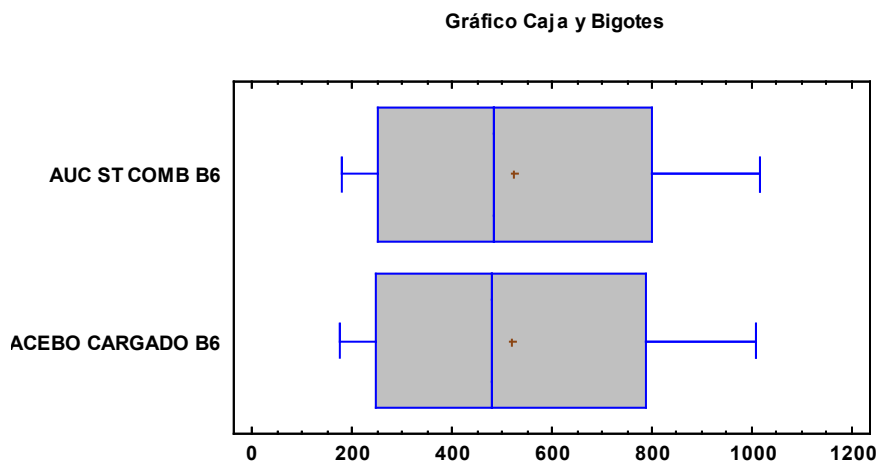
Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

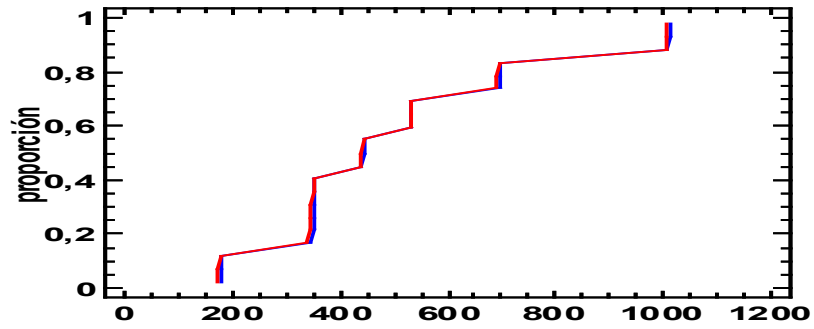
Hipótesis Alt.: $\text{media1} <> \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,0566965$ valor-P = 0,955069

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.



Gáfico de Cuantiles



ANEXO B. Precisión Intermedia

-Vitamina C (Ácido Ascórbico)

Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

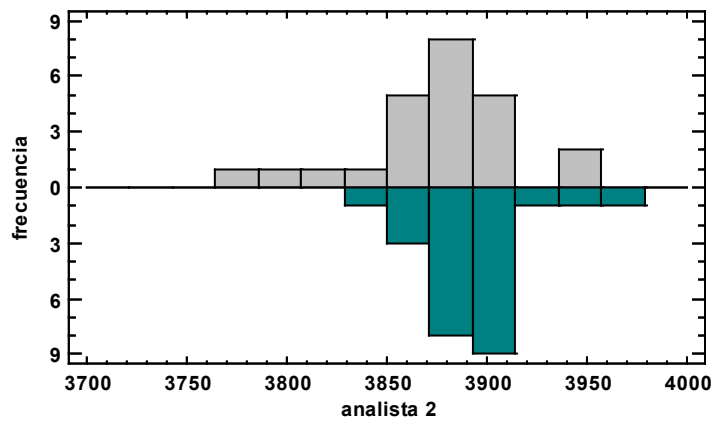
Muestra 1: analista 1 (vit c)

Muestra 2: analista 2 (vit c)

Muestra 1: 24 valores en el rango de 3773,01 a 3943,17

Muestra 2: 24 valores en el rango de 3833,12 a 3972,66

analista 1



Resumen Estadístico

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Recuento	24	24
Promedio	3872,38	3891,93
Desviación Estándar	39,7131	29,0966
Coefficiente de Variación	1,02555%	0,747613%
Mínimo	3773,01	3833,12
Máximo	3943,17	3972,66
Rango	170,159	139,544
Sesgo Estandarizado	-1,55939	1,77198
Curtosis Estandarizada	1,19589	2,38327

-Vitamina B1 (Tiamina)

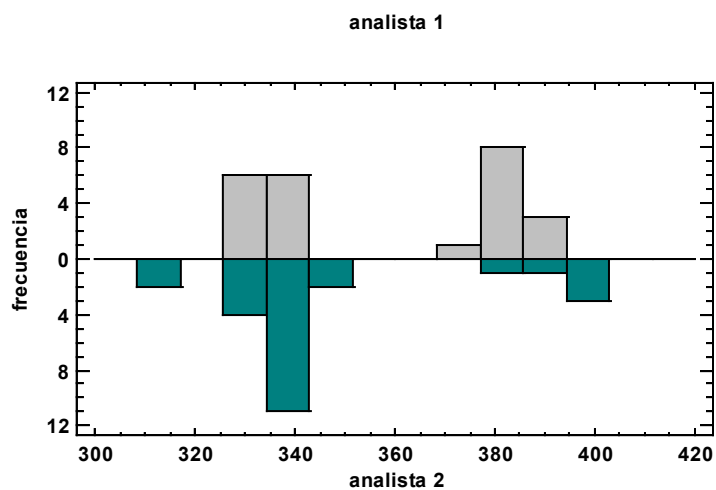
Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

Muestra 1: analista 1 (vit b1)

Muestra 2: analista 2 (vit b1)

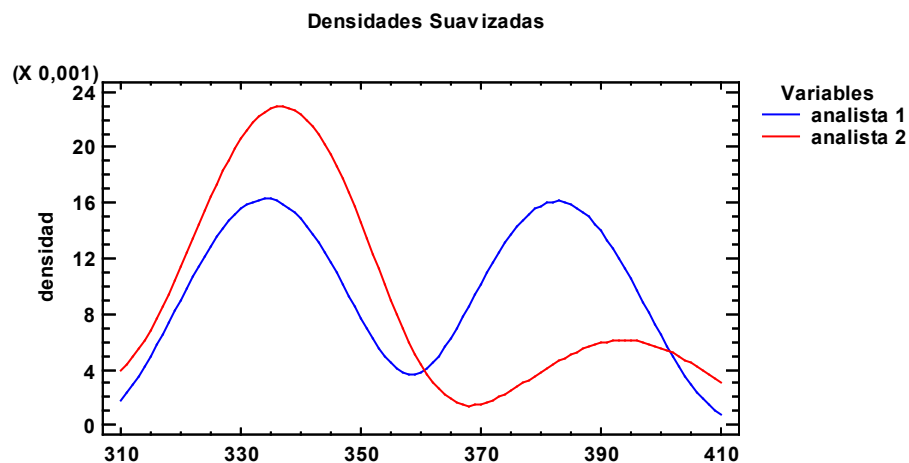
Muestra 1: 24 valores en el rango de 330,031 a 389,195

Muestra 2: 24 valores en el rango de 311,704 a 398,944



Resumen Estadístico

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Recuento	24	24
Promedio	358,438	347,026
Desviación Estándar	24,997	25,5756
Coefficiente de Variación	6,97386%	7,36993%
Mínimo	330,031	311,704
Máximo	389,195	398,944
Rango	59,164	87,24
Sesgo Estandarizado	0,0221963	2,39386
Curtosis Estandarizada	-2,10736	0,343673



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 1: 358,438 +/- 10,5553 [347,883; 368,994]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 2: 347,026 +/- 10,7996 [336,226; 357,826]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 11,4125 +/- 14,6942 [-3,28171; 26,1066]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis Alt.: $\mu_1 < \mu_2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 1,56335$ valor-P = **0,124824**

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

-Vitamina B2 (Riboflavina)

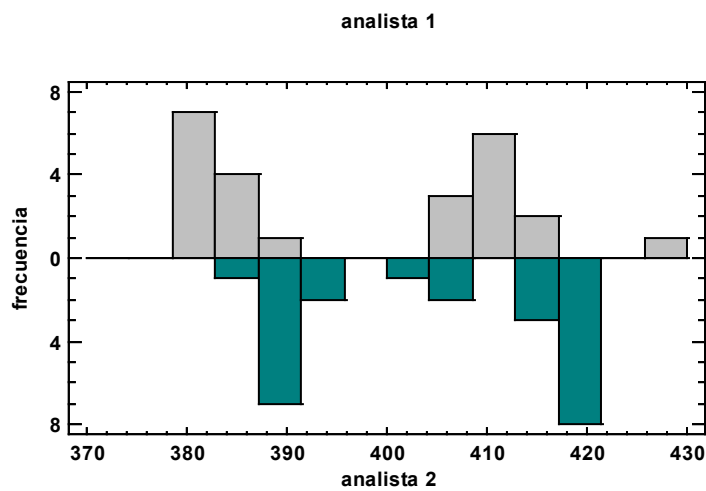
Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

Muestra 1: analista 1 (vit b2)

Muestra 2: analista 2 (vit b2)

Muestra 1: 24 valores en el rango de 380,63 a 427,073

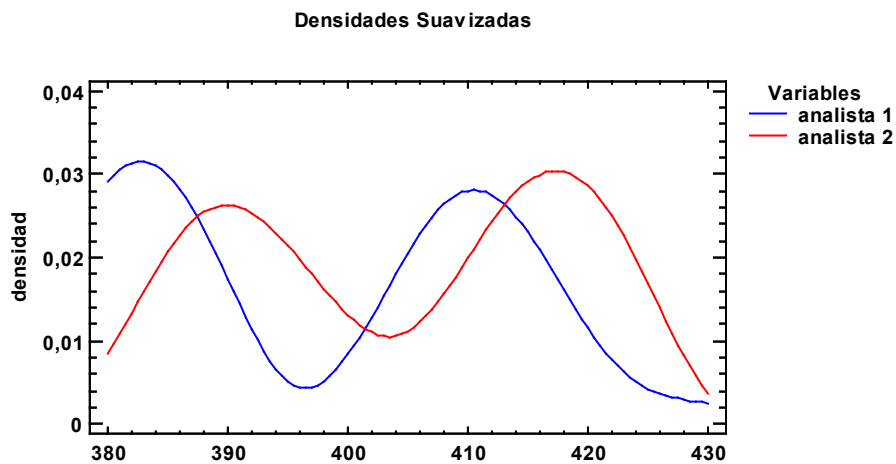
Muestra 2: 24 valores en el rango de 386,869 a 420,016



Resumen Estadístico

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Recuento	24	24
Promedio	397,405	404,644
Desviación Estándar	15,3665	13,6184
Coefficiente de Variación	3,86671%	3,36553%
Mínimo	380,63	386,869

Máximo	427,073	420,016
Rango	46,443	33,147
Sesgo Estandarizado	0,396622	-0,285975
Curtosis Estandarizada	-1,6292	-1,89813



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 1: 397,405 +/- 6,4887 [390,916; 403,893]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 2: 404,644 +/- 5,75056 [398,893; 410,395]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: -7,2395 +/- 8,43648 [-15,676; 1,19698]

Prueba t para comparar medias

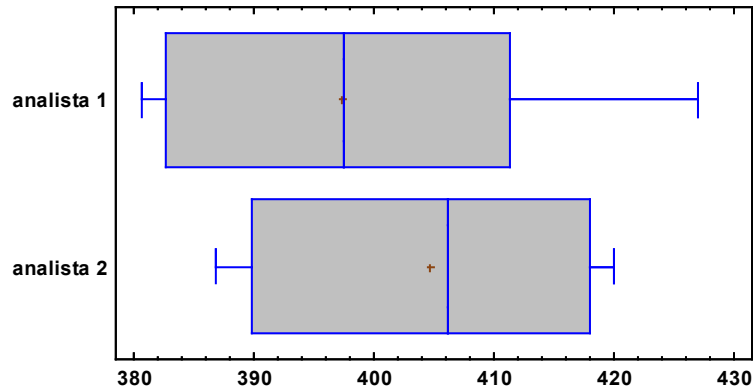
Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 <> media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = -1,72731$ valor-P = 0,0908224

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Caja y Bigotes



Comparación de Desviaciones Estándar

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Desviación Estándar	15,3665	13,6184
Varianza	236,128	185,461
Gl	23	23

Razón de Varianzas= 1,2732

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de analista 1: [11,943; 21,5555]

Desviación Estándar de analista 2: [10,5844; 19,1034]

Razones de Varianzas: [0,550777; 2,94318]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

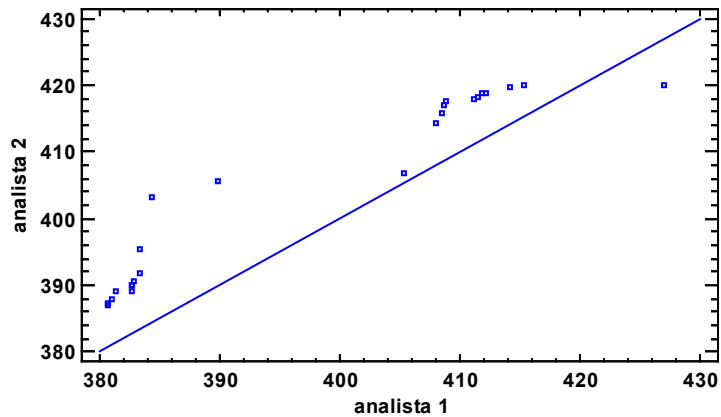
Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 1,2732 valor-P = 0,567167

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Cuantil-Cuantil



Comparación de Medianas

Mediana de muestra 1: 397,568

Mediana de muestra 2: 406,183

Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas

Hipótesis Nula: $\text{mediana1} = \text{mediana2}$

Hipótesis Alt.: $\text{mediana1} < \text{mediana2}$

Rango Promedio de muestra 1: 19,625

Rango Promedio de muestra 2: 29,375

$W = 405,0$ valor-P = 0,0162972

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

-Vitamina B3 (Nicotinamida)

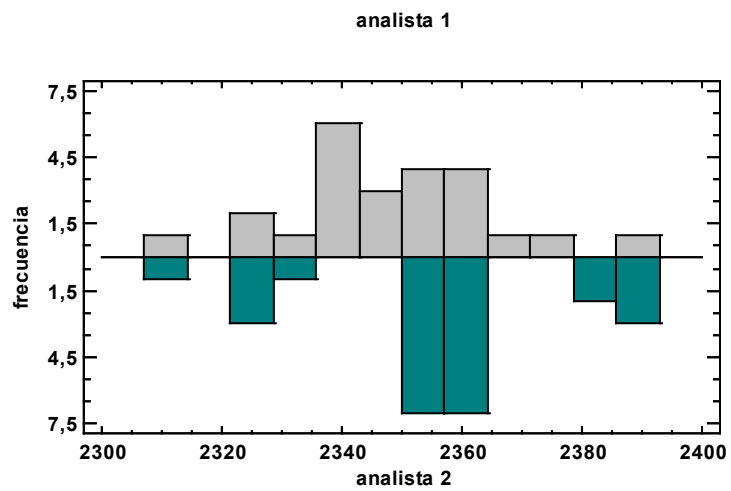
Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

Muestra 1: analista 1 (vit b3)

Muestra 2: analista 2 (vit b3)

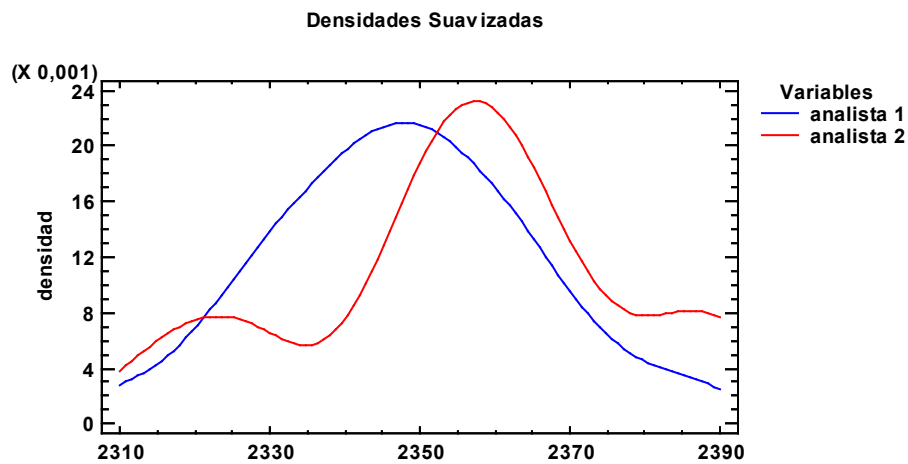
Muestra 1: 24 valores en el rango de 2311,58 a 2386,99

Muestra 2: 24 valores en el rango de 2313,61 a 2389,95



Resumen Estadístico

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Recuento	24	24
Promedio	2347,97	2356,09
Desviación Estándar	17,1774	21,3263
Coefficiente de Variación	0,731583%	0,905154%
Mínimo	2311,58	2313,61
Máximo	2386,99	2389,95
Rango	75,417	76,334
Sesgo Estandarizado	0,323587	-0,517054
Curtosis Estandarizada	0,290541	-0,259273



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 1: 2347,97 +/- 7,25339 [2340,72; 2355,23]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 2: 2356,09 +/- 9,00531 [2347,09; 2365,1]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: -8,11563 +/- 11,2515 [-19,3671; 3,13586]

Prueba t para comparar medias

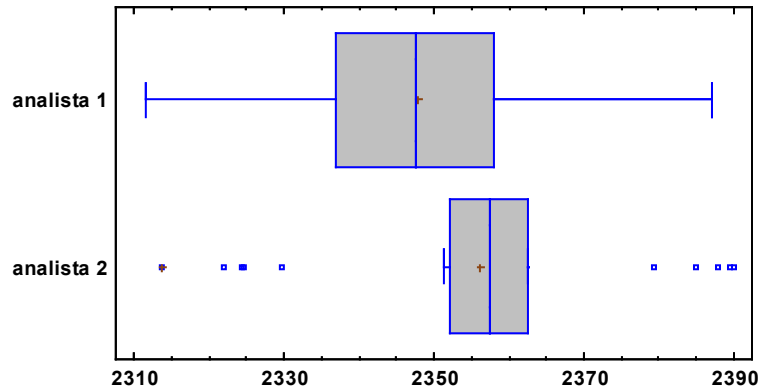
Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis Alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = -1,45189$ valor-P = **0,153319**

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Caja y Bigotes



Comparación de Desviaciones Estándar

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Desviación Estándar	17,1774	21,3263
Varianza	295,062	454,809
Gl	23	23

Razón de Varianzas= 0,648761

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de analista 1: [13,3505; 24,0958]

Desviación Estándar de analista 2: [16,5751; 29,9156]

Razones de Varianzas: [0,28065; 1,4997]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

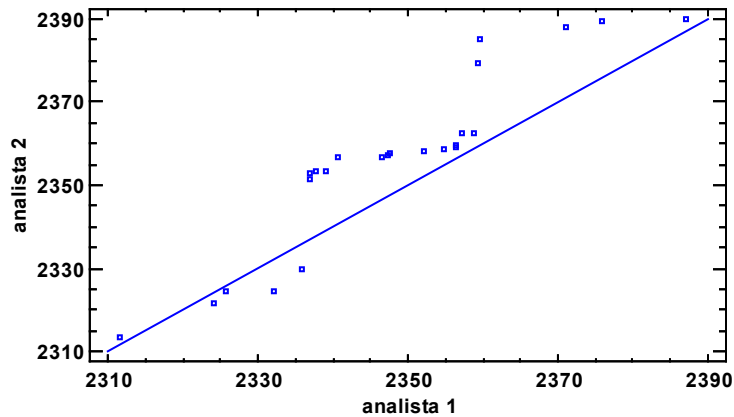
Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 0,648761 valor-P = 0,30658

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Cuantil-Cuantil



Comparación de Medianas

Mediana de muestra 1: 2347,49

Mediana de muestra 2: 2357,46

Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas

Hipótesis Nula: $\text{mediana1} = \text{mediana2}$

Hipótesis Alt.: $\text{mediana1} < \text{mediana2}$

Rango Promedio de muestra 1: 21,125

Rango Promedio de muestra 2: 27,875

$W = 369,0$ valor-P = 0,0969378

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

-Vitamina B6 (Piridoxina)

Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

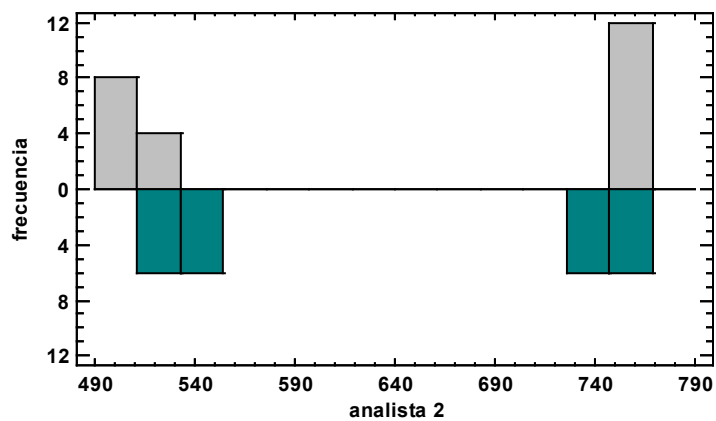
Muestra 1: analista 1 (vit b6)

Muestra 2: analista 2 (vit b6)

Muestra 1: 24 valores en el rango de 503,156 a 757,702

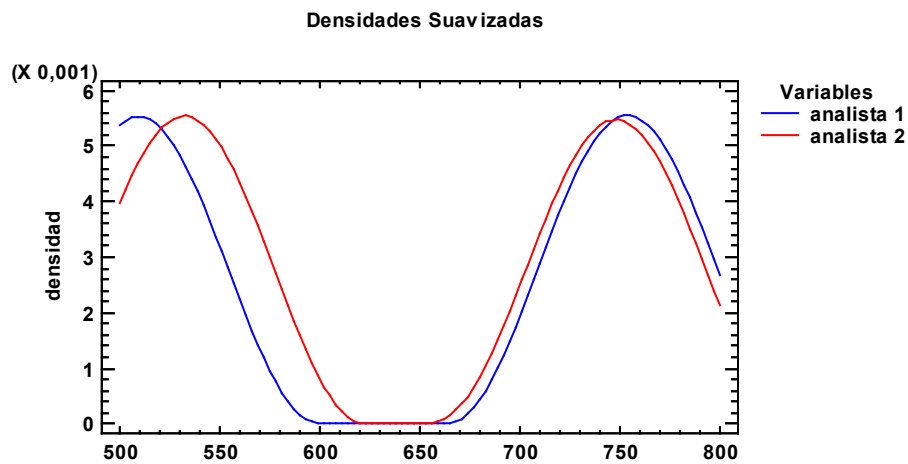
Muestra 2: 24 valores en el rango de 523,599 a 759,671

analista 1



Resumen Estadístico

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Recuento	24	24
Promedio	631,55	640,103
Desviación Estándar	124,947	110,355
Coefficiente de Variación	19,7842%	17,2402%
Mínimo	503,156	523,599
Máximo	757,702	759,671
Rango	254,546	236,072
Sesgo Estandarizado	-0,0030611	0,0111767
Curtosis Estandarizada	-2,18706	-2,17749



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 1: 631,55 +/- 52,7606 [578,789; 684,311]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de analista 2: 640,103 +/- 46,599 [593,504; 686,702]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
 suponiendo varianzas iguales: -8,55263 +/- 68,4953 [-77,0479; 59,9427]

Prueba t para comparar medias

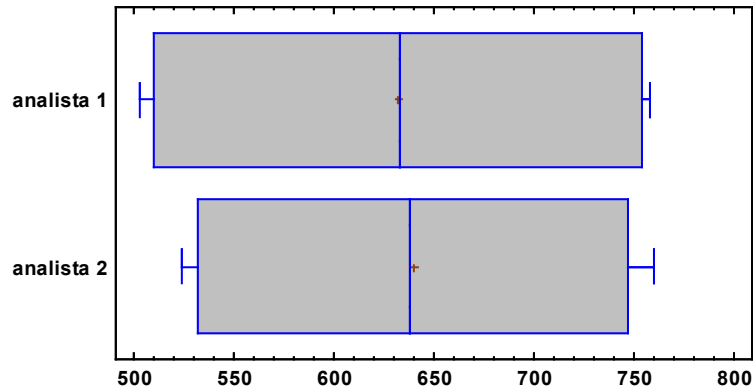
Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis Alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = -0,251339$ valor-P = **0,802671**

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

Gráfico Caja y Bigotes



Comparación de Desviaciones Estándar

	<i>analista 1</i>	<i>analista 2</i>
Desviación Estándar	124,947	110,355
Varianza	15611,7	12178,3
Gl	23	23

Razón de Varianzas= 1,28194

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de analista 1: [97,1105; 175,271]

Desviación Estándar de analista 2: [85,7695; 154,802]

Razones de Varianzas: [0,554557; 2,96337]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 1,28194 valor-P = 0,55627

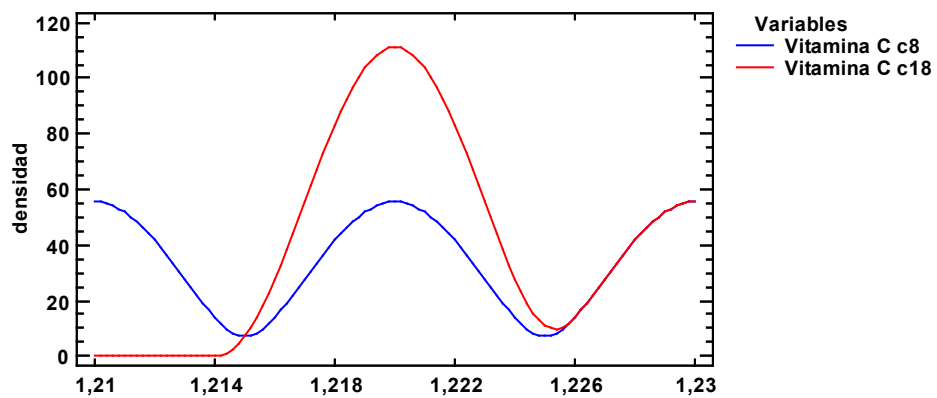
No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Anexos C

Robuste cambio de fase movi

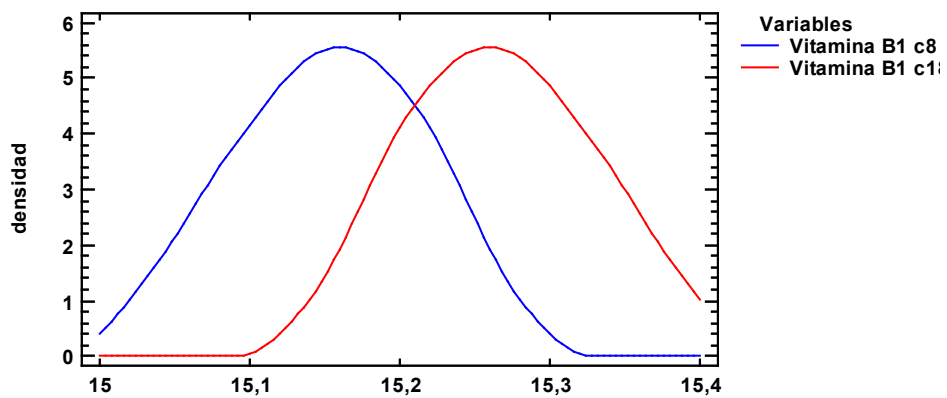
Vitamina C

Densidades Suavizadas



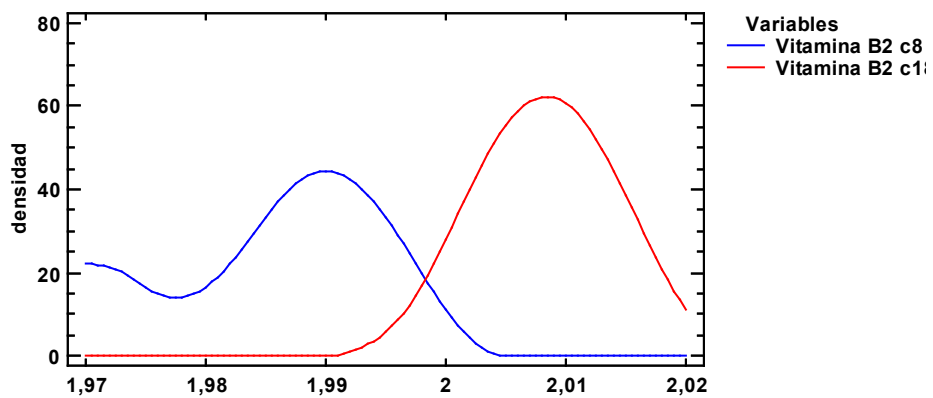
Vitamina B1

Densidades Suavizadas



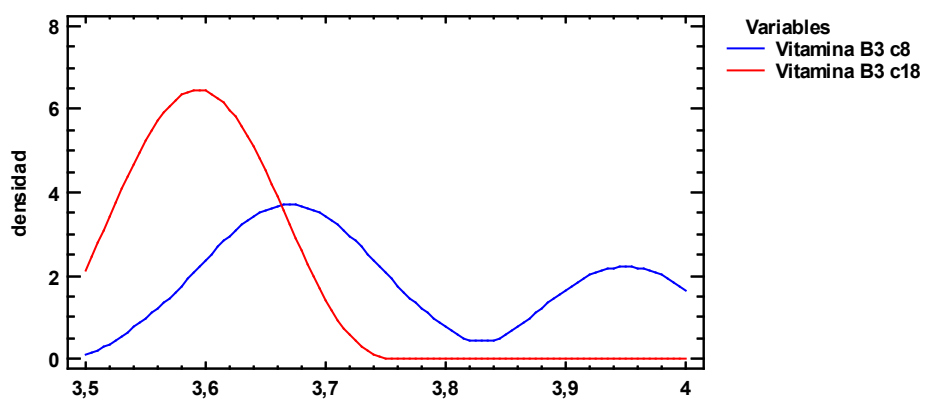
Vitamina B2

Densidades Suavizadas



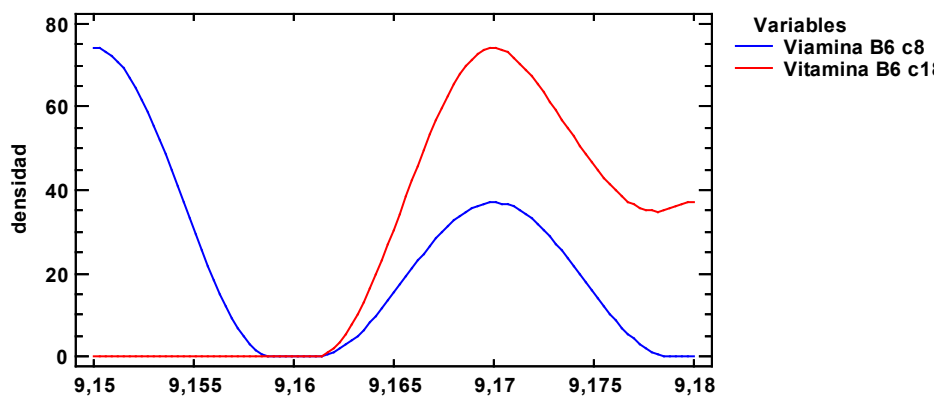
Vitamina B3

Densidades Suavizadas



-Vitamina B6

Densidades Suavizadas





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 21/04/2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Christian Omar Dávila Medina Roberto Andrés Santillán Montero
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutico
f. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.

**LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**

Firmado digitalmente por LUIS
ALBERTO CAMINOS VARGAS
Nombre de reconocimiento
(DN): c=EC, l=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766974,
cn=LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Fecha: 2021.04.21 12:42:43
-05'00'



0873-DBRAI-UTP-2021