

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO
250mg/5mL POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL
POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)”**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS: Lovatón Osorio, Jeamily Milagros

Carbajal Rosales, Erika Isabel

ASESORA: Dra. Q.F. Maritza Galine Ruiz Sánchez

LIMA – PERÚ

2017

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO
250mg/5mL POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL
POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE
ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)”**



ACTA DE EXAMEN DE TITULACION

Siendo las 10.00 horas del día 18 de Enero del 2018, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, el jurado designado por Resolución N° 035-2018-D/FCsFB, de fecha 15 de Enero 2018, procedió a evaluar a la Bachiller: **LOVATON OSORIO JEAMELLY MILAGROS**, postulante al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico por la Modalidad de Trabajo de Investigación, Tesis titulado: "VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO 250mg/5ml POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)."

Siendo las 13.00 horas, finalizada la Exposición y la absolución de las preguntas y observaciones, se procedió a la calificación de la aspirante al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico, obteniendo el siguiente resultado:

APROBADO POR UNANIMIDAD


Por lo que lo declaramos apta para que se le confiera el Título de **QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**.

Se extiende la presente Acta de conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

Lima, 18 de Enero de 2018.


Dra. TERESA MORALES QUISPE
Presidenta del Jurado


Mg. CARLOS CANO PEREZ
Vocal del Jurado


Mg. PEDRO JACINTO HERVIAS
Secretario del Jurado


Dra. MARITZA GALINE RUIZ SANCHEZ
Asesora


DR. JAIME ALIAGA TOVAR
JEFE DE LA OFICINA DE GRADOS Y TITULOS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA



ACTA DE EXAMEN DE TITULACION

Siendo las 10.00 horas del día 18 de Enero del 2018, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, el jurado designado por Resolución N° 035-2018-D/FCsFB, de fecha 18 de Enero 2018, procedió a evaluar a las Bachilleres: CARBAJAL ROSALES ERIKA ISABEL, postulantes al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico por la Modalidad de Trabajo de Investigación, Tesis titulado: "VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO 250mg/5ml POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)."

Siendo las 13.00 horas, finalizada la Exposición y la absolución de las preguntas y observaciones, se procedió a la calificación del aspirante al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico, obteniendo el siguiente resultado:

APROBADO POR UNANIMIDAD

Por lo que lo declaramos apto para que se le confiera el Título de **QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**.

Se extiende la presente Acta de conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

Lima, 18 de Enero de 2018.

Dra. TERESA MORALES QUISPE
Presidenta del Jurado

Mg. CARLOS CANO PEREZ
Vocal del Jurado

Mg. PEDRO JACINTO HERVIAS
Secretario del Jurado

Dra. MARITZA GALINE RUIZ SANCHEZ
Asesora

DR. JAIME ALIAGA TOVAR
JEFE DE LA OFICINA DE GRADOS Y TITULOS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

DEDICATORIA

A mi madre querida, con amor y eterna gratitud, por su abnegación, apoyo incondicional, cariño y comprensión.

Jeamelly

A mis padres por todo su esfuerzo y apoyo para realizarme como profesional. A mi esposo y mi hija por todo su amor y apoyo incondicional.

Erika

AGRADECIMIENTO

A la universidad Inca Garcilaso de la vega, nuestra alma mater que nos permitió alcanzar con éxito nuestros estudios profesionales.

A nuestra querida Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, representada por el decano, Dr. Jaime Aliaga Tovar que posibilitó la realización de la investigación y lograr nuestra formación y la titulación profesional.

A nuestra asesora Dra. Q.F Maritza Galine Ruiz Sánchez, quien me brindó su valiosa orientación, paciencia y apoyo incondicional para la realización y culminación del presente trabajo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega Qco. Rodolfo Pumachagua Huertas, Dr. Q.F Daniel Echevarría Rodrigues-Sawao por instruirnos y guiarnos durante el desarrollo del trabajo.

Al Laboratorio de servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por brindarnos sus instalaciones para realizar este trabajo.

A nuestro gran y querido amigo Dr. Q.F Erik Olivar Gallegos, coordinador de aseguramiento de la calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por brindarnos su apoyo en la realización de nuestro trabajo.

ABREVIATURAS

K'	Factor de capacidad
n	Tamaño de la muestra
r	Coeficiente de correlación
r ²	Coeficiente de determinación
s ²	Varianza de una muestra
t	Test estadístico de Student
t _r	Tiempo de retención de un analito
x	Variable independiente (valor nominal)
y	Variable dependiente (valor experimental)
H ₀	Hipótesis nula
SD	Desviación relativa
μL	Microlitro
μg	Microgramo
mg	Miligramo
mL/min	Mililitros por minuto
p.a.	Principio activo
ppm	Partes por millón
IC	Intervalo de confianza
DS	Desviación estándar
DAD	Detector de arreglo de diodos
FDA	Administración de drogas y alimentos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas
CV (CV%)	Coeficiente de variación
DSR	Desviación estándar relativo
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
DIGEMID	Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Abreviaturas	
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Índice de anexos	
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2 Formulación del Problema.....	4
1.2.1 Problema general.....	4
1.2.2 Problemas específicos	4
1.3 Objetivos de la investigación.	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación de la investigación	6
1.5 Limitaciones de la investigación	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Antecedentes	8
2.1.1 Antecedentes nacionales	8
2.1.2 Antecedentes internacionales	9
2.2 Bases legales y/o teóricas.....	11
2.2.1 Normas nacionales	11
2.2.2 Normas internacionales	12
2.3 Bases teóricas.....	14
2.3.1 Monografía amoxicilina trihidrato	14
2.3.1.1 Definición de amoxicilina trihidrato.....	14
2.3.1.2 Acción antimicrobiana y farmacocinética	15
2.3.1.3 Administración usos y dosis.....	16

2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	17
2.3.2.1. Fase estacionaria (columna cromatográficas)	17
2.3.2.2 Fase móvil (eluyente).....	17
2.3.3 Validación de métodos analíticos.....	18
2.3.3.1 Grados de validación	19
2.3.3.2 Evaluación de los métodos analíticos y sus características de desempeño analítico.....	19
2.3.3.3 Pre-requisitos de validación	22
2.3.3.4 Parámetros de la validación.....	23
2.4 Formulación de la hipótesis.....	24
2.4.1 Hipótesis general	24
2.4.2 Hipótesis específicas	24
2.5 Definición de términos básicos.....	25
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	30
3.1 Nivel, tipo y diseño de la investigación	30
3.2 Población y muestra.....	31
3.2.1 Población	31
3.2.2 Muestra	31
3.3 Equipos, materiales y reactivos.....	31
3.3.1 Validación de instrumentos.....	33
3.4 Procedimiento experimental	33
3.4.1 Calibración, verificación y mantenimiento de equipos.....	33
3.4.2 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral.....	33
3.4.2.1 Determinación del diluyente.....	33
3.4.2.2 Preparación de la fase móvil.....	33
3.4.2.3 Preparación de estándar y muestra	34
3.4.2.4 Preparación del estándar de referencia	34
3.4.2.5 Preparación de la muestra.....	34
3.4.2.6 Sistema cromatográfico	34
3.4.3 Determinación de la idoneidad del sistema – SST.....	35
3.4.4 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral.	35
3.4.4.1 Especificidad.....	36

3.4.4.2 Linealidad.....	37
3.4.4.3 Exactitud	38
3.4.4.4 Precisión	38
3.4.4.5 Robustez.....	39
3.4.4.6 Análisis Estadístico	39
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Técnicas de procesamiento, análisis de datos y resultados.....	40
4.1.1 Determinación de la idoneidad del sistema – SST.....	40
4.1.2 Especificidad.....	42
4.1.3 Linealidad.....	47
4.1.4 Exactitud	55
4.1.5 Precisión	58
4.1.6 Robustez.....	62
4.2 Discusión de los resultados.....	64
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1 Conclusiones.....	67
5.2 Recomendaciones.....	68
Referencias bibliográficas	69
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Acción antimicrobiana y farmacocinética de la amoxicilina.....	15
Tabla 2: Administración usos y dosis de la amoxicilina	16
Tabla 3: Datos requeridos para la validación de métodos analíticos según Farmacopea Americana USP 40 <1225>.....	20
Tabla 4: Datos requeridos para la validación de métodos analíticos según la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).	21
Tabla 5: Parámetros de la validación.....	23
Tabla 6: Instrumentos y equipos usados para medir los parámetros.....	32
Tabla 7: Condiciones de degradación	36
Tabla 8: Parámetros de idoneidad del sistema para amoxicilina trihidrato 250mg/5ml – estándar de referencia.....	41
Tabla 9: Evaluación de parámetros de idoneidad del sistema.....	41
Tabla 10: Especificidad – Principio activo puro – Amoxicilina	43
Tabla 11: Especificidad – Muestra de producto terminado – Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL	45
Tabla 12: Resultados de linealidad del sistema.....	47
Tabla 13: Resultados de linealidad del método	51
Tabla 14: Resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación	55
Tabla 15: Resultados de recuperación en el rango establecido	56
Tabla 16: Resultados del estudio de repetibilidad	58
Tabla 17: Resultados del estudio de precisión intermedia.....	59
Tabla 18: Resultado de la robustez del método.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estructural de la amoxicilina trihidrato.	14
Figura 2: Cromatogramas del estudio de especificidad de amoxicilina estándar de referencia	44
Figura 3: Cromatogramas del estudio de especificidad de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL muestra problema	46
Figura 4: Gráfica de linealidad del sistema	48
Figura 5: Cromatogramas de linealidad del sistema	48
Figura 6: Gráfico de residuales	49
Figura 7: Gráfica de linealidad del método.....	52
Figura 8: Cromatogramas de linealidad del método.....	52
Figura 9: Gráfico de residuales	53
Figura 10: Cromatogramas de la exactitud del método.....	57
Figura 11: Cromatogramas del estudio de precisión.....	61
Figura 12: Cromatogramas del estudio de robustez.....	63
Figura 13: Cromatograma de aptitud del sistema.....	75
Figura 14: Cromatograma del estándar amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales.....	77
Figura 15: Cromatograma de muestra amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales.....	77
Figura 16: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a degradaciones de calor	78
Figura 17: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a luz UV	78
Figura 18: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis ácida.....	79
Figura 19: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis básica	79
Figura 20: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a oxidación con peróxido.....	80
Figura 21: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a degradaciones de calor	81

Figura 22: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a luz UV	81
Figura 23: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis ácida	82
Figura 24: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis básica	82
Figura 25: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a oxidación con peróxido	83
Figura 26: Grafica de probabilidad de residuos normal	85
Figura 27: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de estándar de referencia al 50 por ciento	90
Figura 28: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de estándar de referencia al 75 por ciento	90
Figura 29: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de estándar de referencia al 100 por ciento	91
Figura 30: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de estándar de referencia al 125 por ciento	91
Figura 31: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de estándar de referencia al 150 por ciento	92
Figura 32: Gráfica de prueba de probabilidad de residuos normal	94
Figura 33: Gráfica de probabilidad normal de muestra problema más estándar al 10 , 25 y 50 por ciento	98
Figura 34: Cromatograma del estándar al 100 por ciento en exactitud	102
Figura 35: Cromatograma del estándar al 10 por ciento en exactitud	102
Figura 36: Cromatograma del estándar al 25 por ciento en exactitud	103
Figura 37: Cromatograma del estándar al 50 por ciento en exactitud	103
Figura 38: Cromatograma de la muestra al 100 por ciento en exactitud	104
Figura 39: Cromatograma de la muestra más el estándar al 10 por ciento en exactitud	104
Figura 40: Cromatograma de la muestra más el estándar al 25 por ciento en exactitud	105
Figura 41: Cromatograma de la muestra más el estándar al 50 por ciento en exactitud	105
Figura 42: Cromatograma de estándar de repetibilidad	107

Figura 43: Cromatograma de la muestra de repetibilidad	107
Figura 44: Grafico de probabilidad normal del analista 1 y analista 2	110
Figura 45: Cromatograma del estándar de precisión intermedia.....	113
Figura 46: Cromatograma de la muestra de precisión intermedia.....	113
Figura 47: Cromatograma del estándar de robustez	115
Figura 48: Cromatograma de la muestra de robustez	115
Figura 49: Analizando amoxicilina trihidrato polvo para suspensión oral 250mg/5mL	123
Figura 50: Fotos de los tesistas filtrando la muestra para ser llevado al cromatógrafo líquido (HPLC).....	123
Figura 51: Fotos de los tesistas preparando la muestra problema.....	124
Figura 52: Fotos de los tesistas pesando en la balanza analítica	124
Figura 53: Fotos de los tesistas poniendo las muestras en el cromatógrafo líquido (HPLC)	125

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Evaluación de la aptitud del sistema (SST).....	74
Anexo 2: Cromatogramas de aptitud del sistema (SST) . Parámetros establecidos por la (USP 40).....	75
Anexo 3: Cálculo del producto terminado sin degradaciones.....	76
Anexo 4: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales.....	77
Anexo 5: Cromatograma del estándar.....	78
Anexo 6: Cromatograma de la muestra.....	81
Anexo 7: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los residuales de la linealidad del sistema y planteamiento de hipótesis.....	84
Anexo 8: Homogeneidad de varianzas y análisis de varianza (ANOVA).....	86
Anexo 9: Test de linealidad y test de proporcionalidad de la linealidad del sistema.....	88
Anexo 10: Cromatogramas de linealidad del sistema	90
Anexo 11: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los residuales de la linealidad del método y planteamiento de hipótesis	93
Anexo 12: Análisis de varianza (ANOVA)	95
Anexo 13: Test de linealidad y test de proporcionalidad de la linealidad del método	96
Anexo 14: Test de Cochran .Atipicidad de los resultados de exactitud	97
Anexo 15: Prueba de normalidad (Anderson Darling) para el porcentaje de recuperación.....	98
Anexo 16: Prueba de T – 1 muestra para el rango de 97 a 103 por ciento	99
Anexo 17: Cromatogramas de exactitud	102
Anexo 18: Cálculo del estadístico de Grubbs . Atipicidad en los resultados de repetibilidad	106
Anexo 19: Cromatogramas de repetibilidad	107
Anexo 20: Cálculo del estadístico de ANOVA entre los analistas	108
Anexo 21: Cálculo del estadístico de Grubbs . Atipicidad en los resultados de precisión intermedia	109
Anexo 22: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los resultados de los dos analistas	110

Anexo 23: Prueba de T – 2. Muestras entre los dos analistas	111
Anexo 24: Prueba de F entre los dos analistas	112
Anexo 25: Cromatogramas de precisión intermedia.....	113
Anexo 26: Resultados de las muestras de robustez después de 48 horas	114
Anexo 27: Cromatogramas de robustez	115
Anexo 28: Certificado del equipo Milli-Q	116
Anexo 29: Certificado de calibración de la balanza analítica	117
Anexo 30: Certificado de calibración del medidor PH	118
Anexo 31: Certificado de calibración del termohigrómetro	119
Anexo 32: Verificación operacional del cromatógrafo líquido HPLC	120
Anexo 33: Certificado de control de calidad de la columna cromatográfica	121
Anexo 34: Constancia de la parte experimental en el laboratorio de servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia	122
Anexo 35: Fotos del desarrollo de validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250 mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	123
Anexo 36: Informe técnico.....	126
Anexo 37: Matriz de consistencia.....	127

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo validar un método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que ayude en la optimización de recursos así como en el tiempo de análisis.

El método se basa en la separación y cuantificación del principio activo por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con una columna Zorbax C18 (5µm) (150 x 4.6mm), con detección UV a 230 nm, con una fase móvil compuesta por Buffer fosfato pH 5.0: Acetonitrilo (960:40), con volumen de inyección de 10 µL y a un flujo de 1,0 mL/min. El desarrollo del método analítico incluyó cambios: en el diluyente para la preparación de estándares y muestras, longitud de columna y flujo. La validación del método se realizó según los parámetros exigidos en la categoría I y IV de la Farmacopea Americana (USP40).

Resultados. Se demostró la especificidad del método analítico, porque no se observó interferencia de los excipientes o productos de degradación del principio activo; es lineal porque se obtiene un coeficiente de correlación $r=0,995$, siendo el valor mínimo permisible 0,999 y el coeficiente de los factores de respuesta fue de 0,664%, siendo el mínimo permisible 2,0%; es precisa ya que para la repetibilidad se obtiene una RSD de 0,415%, y para la precisión intermedia se obtiene una RSD de 0,314% .Finalmente es exacto porque se obtiene un porcentaje de recuperación de 100%.

Se concluye que el método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cumple con las exigencias en todos los parámetros de la validación.

Palabras clave: validación, amoxicilina, método analítico, Cromatografía líquida de alta resolución.

ABSTRACT

The objective of this study was to validate an analytical method for the quantification of amoxicillin trihydrate 250mg / 5mL powder for oral suspension by high performance liquid chromatography (HPLC), which helps in the optimization of resources as well as in the time of analysis.

The method is based on the separation and quantification of the active ingredient by reverse phase high performance liquid chromatography with a Zorbax C18 column (5 μ m) (150 x 4.6 mm), with UV detection at 230 nm, with a mobile phase composed of Buffer phosphate pH 5.0: Acetonitrile (960: 40), with an injection volume of 10 μ L and a flow rate of 1.0 mL / min. The development of the analytical method included changes: in the diluent for the preparation of standards and samples, column length and flow. Validation of the method was carried out according to the parameters required in category I and IV of the American Pharmacopoeia (USP40).

Results The specificity of the analytical method was demonstrated, because no interference of the excipients or degradation products of the active principle was observed, it is linear because a correlation coefficient $r = 0,995$ is obtained, the minimum permissible value being 0,999 and the coefficient of the factors response was 0.664%, the minimum permissible 2.0%, is accurate since for repeatability an RSD of 0.415% is obtained, and for the intermediate precision a RSD of 0.314% is obtained and finally it is exact because it is obtained a recovery percentage of 100%.

It is concluded that the analytical method for the quantification of amoxicillin trihydrate 250mg / 5mL powder for oral suspension by high performance liquid chromatography (HPLC), meets the requirements in all parameters of validation

Key words: validation, amoxicillin, analytical method, high-resolution liquid chromatography.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica en la búsqueda de la optimización de sus recursos asume el desarrollo y mejora de procesos de fabricación y análisis de sus medicamentos, estableciendo control de calidad de los productos en cuanto a su identificación, cuantificación, entre otras y para garantizar la calidad de los mismos, utiliza métodos analíticos confiables. Para asegurar confiabilidad se someten a un proceso de validación.

Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico, sino también cumplir con las exigencias legales del país y a su vez minimiza el número de fallas y repeticiones, demostrando un alto grado de confianza y seguridad del proceso analítico, así como también en la calidad de los resultados. Entre los entes reguladores más importantes tenemos la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), y en nuestro país la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID), los mismos que a través de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y buenas prácticas de laboratorio (BPL) aseguran el cumplimiento y trazabilidad del proceso de validación.

Perú es un país que tiene alta incidencia en diferentes afecciones provocadas por microorganismos que dan origen a enfermedades como la faringitis, sinusitis, amigdalitis y otitis, para las cuales la amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral, por ser un antibiótico de amplio espectro, es muy empleada por los médicos pediatras y es clasificada como fármaco de primera elección en el Petitorio Nacional Único de medicamentos esenciales del Sector Salud. Por las razones expuestas, la amoxicilina fue el fármaco elegido para este estudio.

En el presente trabajo de investigación, se realizó la validación de un método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución, debido a que se realizó cambios significativos en la metodología de la Farmacopea Americana (USP 40 y NF 35), obteniendo un método más rápido, económico y, por supuesto,

garantizando la calidad de los resultados. El desarrollo del trabajo se realizó en el laboratorio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La presente tesis que expresa el estudio realizado se expone en cinco capítulos y anexos. En el capítulo I, se presenta el planteamiento del problema, se describen claramente los objetivos, la justificación y limitaciones de la misma; en el capítulo II; se expone el marco teórico, se detalla los antecedentes nacionales e internacionales de la investigación, las bases teóricas y legales para la comprensión del presente trabajo de investigación; en el capítulo III, se describe la metodología. La investigación se basa en el desarrollo de la validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución; en el capítulo IV, se presentan los resultados del estudio y la discusión de los resultados obtenidos; en el capítulo V, las conclusiones a las cuales se ha arribado en la investigación, y proposición de algunas recomendaciones para futuros estudios sobre temas similares. Finalmente, se presenta las referencias bibliográficas y los anexos.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La industria farmacéutica se caracteriza por ser una actividad altamente competitiva, razón por la cual ha sufrido cambios a través de la historia, cambios que están enfocados propiamente en el mejoramiento continuo de la calidad de sus productos. Ante esta necesidad la farmacopea de Estados Unidos de Norteamérica (USP), en su número 22 del año 1990, incluyó por primera vez el apartado 1225, el cual contempla la validación de métodos. Este fue el punto de partida que impulsó la generación de distintos tipos de documentos tales como: guías, normas y reglamentos, entre otros, los mismos que buscan dirigir la validación de los métodos.

Para la industria farmacéutica, asegurar la calidad de sus productos es una preocupación fundamental y permanente, ya que cualquier deficiencia puede originar problemas sanitarios y en ocasiones graves, el retiro del producto incluso el cierre del laboratorio fabricante; También impacta en el prestigio, desarrollo económico y el crecimiento de la misma. Por ello, el control analítico de un producto farmacéutico es necesario para asegurar su eficacia seguridad durante todas las etapas de su período de vida útil, un proceso que permite cumplir este fin es la validación, por este motivo que se están implementando nuevas metodologías enmarcadas en las mejoras continuas, por tanto, las exigencias analíticas son cada vez mayores; cada día se requiere métodos más rápidos, económicos y, por supuesto, sin sacrificar su exactitud, precisión y linealidad.

En el laboratorio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en búsqueda de la mejora continua de los métodos de análisis y optimización de tiempo y recursos; motivo por el cual se ha realizado cambios significativos de un método descrito en la monografía oficial, Farmacopea de los Estados Unidos (USP 40), para la cuantificación de la amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución. Para utilizar este método es necesario la validación de dicho método, esto es normado por el ente regulador, la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID).

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema general

- ¿El método analítico propuesto para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución cumplirá con los parámetros de desempeño establecidos para la validación?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Se podrá desarrollar el proceso de validación del método analítico con las exigencias de exactitud, precisión, especificidad, linealidad, rango y robustez?
- ¿Se podrá lograr la optimización del método analítico?
- ¿Será confiable la validación del método analítico del principio activo a analizar?

1.3 Objetivos de la investigación.

1.3.1 Objetivo general

- Validar el método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), establecidos en la Farmacopea de Estados Unidos (USP 40).

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar cada uno de los parámetros de desempeño de validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Optimizar el método analítico establecido.
- Demostrar la confiabilidad de la validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.4 Justificación de la investigación

Nuestra industria nacional no cuenta con toda la gama de equipos o insumos que se requieran dentro de lo solicitado en los protocolos o monografías de ensayo en el caso de los análisis, aun así, de contar con estas, puede resultar altos costos de inversión o quizá también mayor demanda en horas hombre. De aquí la necesidad de poder desarrollar nuevos métodos analíticos o realizar cambios significativos en los métodos farmacopeicos, que permitan el ahorro (costos) y optimización de tiempo, pero garantizando la calidad de los resultados emitidos.

En el área de control de calidad se ha identificado que una de las causas más importantes de obtención de resultados erróneos, es el apresuramiento; para evitarlo se ha realizado cambios significativos en el método farmacopeico (USP 40) de análisis de la amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La amoxicilina fue el fármaco elegido para este estudio por su alta demanda en el mercado farmacéutico.

Con este método analítico se busca cumplir con las exigencias analíticas para asegurar la calidad del producto y a su vez la optimización del tiempo y de los recursos.

Por tales razones, se ha decidido demostrar que el método analítico desarrollado es adecuado para el uso previsto y, además, es necesario proceder con la validación del método, en cumplimiento con las normas legales de las buenas prácticas de manufactura, las buenas prácticas de laboratorio y la ISO/IEC 17025.

1.5 Limitaciones de la investigación

La limitación principal fue el acceso al placebo del producto en estudio, ya que al no formar parte de un laboratorio farmacéutico donde se realizó el estudio, la fórmula cuali-cuantitativa es de acceso restringido, por lo que se optó por métodos alternativos para el desarrollo del parámetro de exactitud y especificidad, logrando así completar en el desarrollo de todos los parámetros.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes nacionales

Gamboa, K. (2013) realizó un estudio de la “**Vida útil de Amoxicilina tabletas 500 mg fabricadas en el Laboratorio Farmacéutico Iqfarma**”, y resume: “Se realizaron los estudios de estabilidad a largo plazo mediante regresión lineal utilizando el método estadístico de mínimos cuadrados, cuantificando el principio activo con el método por HPLC mediante la técnica desarrollado en el Laboratorio IQFARMA, para analizar los resultados usaron el software minitab 16 y las muestras fueron obtenidas durante intervalos de tiempo 0, 3 y 6 meses. Se encontró una vida útil de 53 meses”.⁽⁰¹⁾

Zavala, C. (2012) realizó el estudio de “**Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para cuantificación de amoxicilina y ácido Clavulánico en tabletas recubiertas**”, en el cual concluye: “El método utilizado es el adecuado y satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas. Dando como resultado que el ensayo de linealidad obtuvo un coeficiente de correlación menor de 0,995 para ambos activos demostrando que es lineal; asimismo es precisa ya que el Coeficiente de Variación de la repetibilidad y en precisión intermedia es menor al 2% dentro de los límites permitidos para ambos activos; también es exacta, con una recuperación media de 99.83% y 99.90 % para ácido clavulánico y amoxicilina respectivamente.”⁽⁰²⁾

Ramírez, I. y Silva, J.C. (2011) llevaron a cabo un estudio sobre “**Comparación de la estabilidad química de amoxicilina trihidrato en suspensión de 250mg/5 mL de productos, genérico e innovador**”, en el que mencionan: “Se realiza el método iodométrico, con nueve suspensiones de cada formulación que fueron sometidas a las diferentes temperaturas de 8°C, 22°C y 40°C para determinar la concentración de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a diferentes tiempos. Considerando una cinética cero se determinaron las constantes de velocidad de degradación (K_o) para ambas formulaciones y los valores de T₉₀ (días) para el producto genérico fueron: 135.46 a 8°C, 131.86 a 22°C y 64.17 a 40°C; y para el producto innovador: 179.71 a 8°C, 145.03 a 22°C y 81.34 a 40°C, concluyendo que el producto innovador es más estable que el genérico”.

(03)

2.1.2 Antecedentes internacionales

Velasteguí, J. (2011) en la Tesis “**Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC**”, menciona: “El objetivo de la investigación es validar el método analítico usado en la valoración de Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL en polvo para suspensión oral fabricado por la Empresa Farmacéutica Betapharma S.A. de la ciudad de Quito, usando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, con el fin de verificar la calidad en lo referente a dosis de principio activo, para lo cual se analizaron varios parámetros establecidos por organismos internacionales, como precisión del sistema, obteniendo una RSD de 1.11 por debajo del límite de 2.8 para la precisión del método se obtuvo un RSD de 1,33 por debajo del límite de 3,9 permitido. Referente a la precisión entre días, se obtuvo un RSD de 2,04 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Referente a la precisión entre analistas se obtuvo un RSD de 1,66 por debajo del límite permitido de 3,9. En la determinación de la linealidad se obtuvo un R² de 0,994 por arriba del 0,99 planteado inicialmente. En la determinación de la recuperación del método se obtuvo

un porcentaje de 97,94% que está dentro de los parámetros establecidos entre 97,5% y 102,5%. En cuanto a la robustez del método se obtuvo un RSD de 1,5 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Los resultados encontrados se encuentran dentro de los parámetros establecidos. En conclusión, el método analítico usado en la valoración de Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL en polvo para suspensión oral fabricado por la Empresa Farmacéutica Betapharma S.A. fue validado. Por lo tanto se recomienda su aplicación para garantizar la calidad de sus medicamentos.”⁽⁰⁴⁾

Faife, L. (2009) en su Tesis: “**Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel**”, resume: “Los resultados mostraron que el método es selectivo para los propósitos previstos, seguidamente se evaluaron los parámetros de validación como: Linealidad del sistema y del método para los cuales se obtuvieron valores cercanos a la unidad ≥ 0.999 , Precisión del sistema y del método obteniéndose valores de $\%RSD < 1\%$ es decir presentan muy buena precisión. La exactitud del método se evaluó por medio del porcentaje de recuperación ($\%R$) de Mupirocina, los cuales fueron de $100.18 \% \pm 0.535$, es decir, se confirmó la exactitud del método, luego se determinaron el límite de detección del activo obteniéndose valores de $0.66 \mu\text{g/mL}$ respectivamente y el límite de cuantificación $2.02 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, seguidamente se evaluó la Repetibilidad del método, cumpliendo con los parámetros establecidos en la USP, comprobando de esta manera la validez del método analítico”.⁽⁰⁵⁾

2.2 Bases legales y/o teóricas

2.2.1 Normas nacionales

- **Resolución Ministerial N° 055-99.SA/DM del 8 de Febrero de 1999**, que aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos.

Capítulo III - Control de Calidad

Artículo 6°: Los métodos de ensayo deben ser validados

Capítulo V - Validación

Artículo 11°: Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano. Debe prepararse y archivarse un reporte escrito que resuma los resultados y las conclusiones registrados. Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación, los cuales se sometan periódicamente a una revalidación para asegurar que con ellos se puedan seguir obteniendo los resultados deseados. Se debe prestar especial atención a la validación de los procedimientos de proceso, limpieza y de los métodos analíticos. ⁽⁰⁶⁾

- **Decreto Supremo N°001-2009-SA del 17 de Enero del 2009**, que aprueba el reglamento del artículo 50° de la ley N°26842, ley general de salud

Si la técnica analítica no corresponde a ninguna de las farmacopeas de referencia, el fabricante debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias.

- **Decreto Supremo N°028-2010-SA del 17 de Setiembre del 2010**, que regulan algunos alcances de los artículos 10 y 11 de la Ley N° 29459.

Si la técnica analítica no corresponde a ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que

acrediten la validación de las técnicas analíticas propias del producto terminado. ⁽⁰⁷⁾

De conformidad con lo establecido en el inciso 8 del artículo 118 de la Constitución Política del Perú, del Decreto Ley N° 25629, el decreto ley N°25909 y la ley N°29158, Ley orgánica del Poder Ejecutivo;

Decreta:

Artículo 1°: Aprobación del reglamento que regula la información mínima del documento que debe contener la validación de técnicas analíticas propias. ⁽⁰⁸⁾

Ley N° 27657. Ley del Ministerio de Salud.

2.2.2 Normas internacionales

Dentro de la normativa internacional tenemos:

- BPM (Industria Farmacéutica)
- Norma Internacional ISO/IEC 17025 .Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y de calibración
- Norma ISO 15189 (Acreditación de laboratorios clínicos)
- Organismos Internacionales: Administración de drogas y alimentos FDA, Farmacopea Americana (USP) y otras farmacopeas, Organización Mundial de Salud OMS, Conferencia Internacional de Armonización ICH.
- Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico Organización Mundial de la Salud OMS serie de informes técnicos, N° 902, 2002 Informe 36
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP40): Esta norma americana nos proporciona la mayoría de los alcances que se necesita para un mejor entendimiento de los análisis que pretende hacer a los productos farmacéuticos, desde la descripción y solubilidad de los principios activos a ser analizados como también el conocimiento de las formas farmacéuticas establecidos en el capítulo (1151): verificación de las técnicas farmacopeas en el capítulo (1226): el

método de cromatografía a utilizar para el análisis; en el capítulo (621): las pautas para el desarrollo de la validación; y de procedimientos farmacopeicos, en el capítulo (1225).⁽⁰⁹⁾

- Norma Internacional ISO/IEC 17025: requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
Esta norma internacional es para ser utilizada por los laboratorios cuando desarrollan los sistemas de gestión para sus actividades de la calidad, administrativas y técnicas. También puede ser utilizada por los clientes del laboratorio, las autoridades reglamentarias y los organismos de acreditación cuando confirman o reconocen la competencia de los laboratorios. Esta norma internacional no está destinada a ser utilizada como la base para la certificación de los laboratorios.⁽¹⁰⁾
- Validación de métodos analíticos (ICH) Q2: la conferencia internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano.⁽¹¹⁾

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Monografía amoxicilina trihidrato

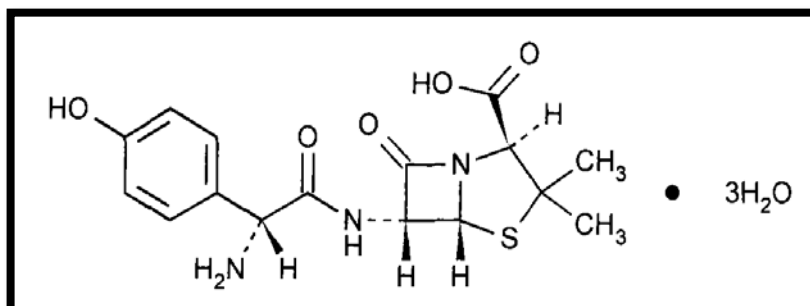


Figura 1: Fórmula estructural de la amoxicilina trihidrato.

Fuente: Farmacopea Americana (USP 40)⁽⁹⁾

Nombre IUPAC: La amoxicilina trihidrato es el ácido (2S,5R,6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico trihidratado.

Formula molecular: C₁₆ H₁₉ N₃ O₅ S

Peso molecular: 419,4 g/mol

Solubilidad: es soluble en agua, metanol, ligeramente soluble en etanol y parcialmente insoluble en tolueno.

2.3.1.1 Definición de amoxicilina trihidrato

La amoxicilina es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de un amino penicilina. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto gram-positivos como gram-negativos. Por esto se emplea a menudo como primer remedio en infecciones de diferente gravedad. Se utiliza por vía oral o parenteral, aunque la forma parenteral (intramuscular o intravenosa) no está aprobada en todos los países. La amoxicilina fue aprobada por primera vez en 1987. ⁽¹²⁾

2.3.1.2 Acción antimicrobiana y farmacocinética

Tabla 1: Acción antimicrobiana y farmacocinética de la amoxicilina

<p>Acción antimicrobiana</p>	<p>La amoxicilina es un antibiótico β-lactámico. Es bactericida y tiene un mecanismo de acción similar a la bencil penicilina, pero como una amino penicilina con un grupo amino sustituyente en la cadena lateral de la estructura básica de la penicilina, la amoxicilina es capaz de penetrar de mejor manera la membrana exterior de bacterias gram-negativas y tiene un espectro de actividad más amplio. Se ha reportado que la amoxicilina es más activa in vitro que la ampicilina contra <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Helicobacter pylori</i>, y <i>Salmonella</i> spp; pero menos activa contra <i>Shigella</i> spp.</p>
<p>Farmacocinética</p>	<p>La amoxicilina es resistente a la inactivación por ácido gástrico. Es más rápida y completamente absorbida que la ampicilina cuando es dada por vía oral. La concentración pico de amoxicilina plasmática de 5 $\mu\text{g/mL}$ se observa una a dos horas después de una dosis de 250mg, con presencias de cantidades detectables por hasta ocho horas. Duplicar la dosis puede duplicar la concentración. La presencia de alimentos en el estómago no parece disminuir la cantidad total absorbida.</p> <p>Aproximadamente 20% se une a proteínas plasmáticas y se ha reportado vida media plasmática de 1 a 1.5 horas. La vida media puede ser prolongada en neonatos, ancianos y pacientes con deterioro renal; en deterioro renal severo la vida media puede ser de 7 a 20 horas.</p> <p>La amoxicilina se distribuye ampliamente en concentraciones variadas en los tejidos y fluidos corporales. Puede cruzar la placenta; cantidades pequeñas se distribuyen en la leche materna. Poca amoxicilina pasa al fluido cefalorraquídeo, a menos que las meninges estén inflamadas. Una cantidad limitada de amoxicilina se metaboliza a ácido penicilínico el cual es excretado en la orina. Aproximadamente el 60% de la dosis oral de amoxicilina es excretada sin cambios en la orina en 6 horas por filtración glomerular y secreción tubular. Concentraciones urinarias por encima de 300 $\mu\text{g/mL}$ se han reportado después de una dosis de 250mg. La excreción renal se reduce con probenecid. La amoxicilina se extrae por hemodiálisis.</p>

Fuente: Goodman y Gilman. Manual de farmacología y terapéutica. ⁽¹³⁾

2.3.1.3 Administración usos y dosis

Tabla 2: Administración usos y dosis de la amoxicilina

Administración y usos	La amoxicilina es el 4-hidroxi análogo de la ampicilina y es usado en infecciones susceptibles similarmente.
	Estas incluyen actinomicosis, ántrax, infecciones del tracto biliar, bronquitis, endocarditis (particularmente para profilaxis), gastroenteritis (incluyendo salmonella enteritisa pero no shigellosis), gonorrea, enfermedad de Lyme, infecciones bucales, otitis media, neumonía, desórdenes biliares (profilaxis de infecciones neumocócicas), fiebre tifoidea y paratifoidea e infecciones del tracto urinario.
Administración y dosis	La amoxicilina se da por vía oral como trihidrato y por inyección como sal de sodio. la dosis se expresa en términos de cantidades equivalentes de amoxicilina; 1.06g de amoxicilina sódica y 1.15g de trihidrato de amoxicilina son equivalentes a 1 gr de amoxicilina. La dosis oral usual es de 250 a 500mg cada 8 horas, o 500 a 875mg cada 12 horas.
	Niños hasta 10 años de edad pueden tomar 125 a 250mg cada 8 horas; para aquellos por debajo de 40kg, la dosis que puede usarse es de 20 a 40mg/kg diario en dosis divididas cada 8 horas, o 25 a 45mg diarios en dosis divididas cada 12 horas; la dosis máxima para un infante menor de 3 meses de edad debe ser 30mg/kg diarios en dosis divididas cada 12 horas.

Fuente: Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. ⁽¹⁴⁾

2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía es un método físico que engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de muestras entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil.

Es incuestionable que la cromatografía de líquidos de alta presión es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son su sensibilidad, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia. ⁽¹⁵⁾

2.3.2.1. Fase estacionaria (columna cromatográficas)

La columna cromatográfica o fase estacionaria es el medio por donde se va a retener el analito de interés, todo dependerá de la polaridad de la molécula que trataremos, ósea una fase estacionaria polar retendrá a analitos polares y viceversa una fase estacionaria apolar retendrá a analitos apolares.

La fase estacionaria está conformada por silicagel con porosidad y tamaño de partícula para que así queden atrapados a los analitos por su polaridad.

Las columnas cromatográficas varían de acuerdo a la conformidad de la sílica que tienen, algunos de ellos son de sílica de 8 y 18 carbonos. Varían también de acuerdo al tamaño de la columna y diámetro. ⁽¹⁶⁾

2.3.2.2 Fase móvil (eluyente)

La fase móvil es el medio de arrastre del analito hasta la fase estacionaria; este medio debe de tener características esenciales tales como que debe de ser inerte al contacto con el analito. ⁽¹⁷⁾

2.3.3 Validación de métodos analíticos

Es el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación.

Es la prueba documentada de que un determinado proceso produce continuamente un producto con un alto grado de seguridad, el cual satisface especificaciones e indicadores de calidad previamente definidos.

El proceso de validación entonces permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método analítico y proporciona un alto nivel de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos. ⁽¹⁸⁾

Se puede afirmar que los aspectos más importantes a considerar en relación a la validación de métodos analíticos, su resumen son:

- Validación significa “hacer lo necesario”, pero evitando el exceso. Todos los parámetros críticos del método deben ser validados, pero no aquellos que sean aleatorios o que no sean esenciales.
- Lo mejor es iniciar la validación de un método por el resultado final y luego retroceder en el desarrollo del análisis hasta la primera etapa.
- La validación no puede realizarse chequeando los resultados en una lista de verificación (check list).
- No existe un análisis químico sin error (“valor real”).
- Se debe establecer el tipo y la frecuencia de los controles a realizar minimizando los costos generales del análisis, pero manteniendo el necesario aseguramiento de la calidad de los resultados.

Según estos principios acerca de la validación de métodos analíticos podemos concluir diciendo que la validación es un conjunto de procedimientos que debe ser establecido “a medida” (orientada a determinados objetivos) por un químico analítico y que debe estar dirigido

para asegurar (obtener y demostrar objetivamente) la calidad requerida (acordada) de los resultados de un análisis. ⁽¹⁹⁾

2.3.3.1 Grados de validación

a) Verificación

Es la confirmación mediante la aportación de evidencia de que se han cumplido los requisitos especificados. La confirmación puede comprender acciones tales como la realización de ensayo/pruebas y demostraciones.

b) Validación completa

Evaluación de todos los parámetros de desempeño de un método en la que los requisitos especificados para estos demuestran que el método es idóneo para un uso previsto. ⁽²⁰⁾

2.3.3.2 Evaluación de los métodos analíticos y sus características de desempeño analítico

La Farmacopea Americana (USP40) dentro del capítulo <1225>, hace énfasis a la validación de procedimientos, definiciones y enfoques para validar cada parámetro analítico, además, nos proporciona una tabla donde se categoriza a cada uno de los tipos de métodos en función de su uso o finalidad. La farmacopea solo contempla las categorías más comunes de las pruebas y hace mención a los datos de validación que son necesarios, las que son mencionadas a continuación:

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de un fármaco 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. Estos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño, por ejemplo: disolución, liberación de fármacos, etc.
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación. ⁽²¹⁾

En la tabla N° 3, se puede observar las características de desempeño analítico para diversos tipos de procedimientos analíticos de acuerdo con la USP 40.

Tabla 3: Datos requeridos para la validación de métodos analíticos según Farmacopea Americana USP40 <1225>

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativo	Pruebas de Limite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Fuente: Farmacopea Americana (USP 40) ⁽⁹⁾

Asimismo, la ICH propone una clasificación, contemplando los cuatro tipos más comunes de los procedimientos analíticos, los que se ilustran en la tabla 4. La discusión de la validación de procedimientos analíticos

se dirige a los cuatro tipos más comunes de los procedimientos analíticos:

- Las pruebas de identificación.
- Las pruebas cuantitativas para el contenido de impurezas.
- Pruebas de límite para el control de las impurezas.
- Pruebas cuantitativas de la fracción activa en muestras de sustancia fármaco o medicamento u otro componente seleccionado (s) en el producto farmacéuticos.

Tabla 4: Datos requeridos para la validación de métodos analíticos según la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

Tipo de Procedimiento Analítico /Características	Identificación	Pruebas para Impurezas		Valoración
		Cuantificación	Pruebas de Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+(1)	-	+(1)
Especificidad (2)	+	+	+	+
Límite de Detección	-	- (3)	+	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

(-) Característica normalmente no se evaluó. (+) Característica se evalúan normalmente.

(1) En algunos casos en que la reproducibilidad (ver glosario) ha sido realizada, la precisión intermedio no necesita ser realizado. (2) falta de especificidad de un procedimiento analítico podría ser compensada por otro procedimiento(s) analítico(s). (3) puede ser necesaria en algunos casos.

Fuente: Conferencia Internacional de Armonización ICH (11)

La extensión de los reglamentos, normas o directrices para los requisitos de validación pueden variar una a otra, pero el objetivo siempre es el mismo: “El método de ensayo debe ser apropiado para el uso previsto”.

2.3.3.3 Pre-requisitos de validación

Antes de iniciar un proceso de validación, es necesario tener en cuenta que los instrumentos con los que contamos son de la calidad suficiente y capacidad adecuada para cumplir con las exigencias de los métodos analíticos. Asimismo, contar con un sistema adecuadamente diseñado, mantenido, calibrado y probado, cuya documentación debe ser correctamente archivada.

Durante la etapa de Calificación, tenemos: calificación de equipos, calibración de instrumentos, calificación de instalación, calificación de operación y calificación de desempeño.

Calificación de diseño (D.Q.): Es la verificación documentada que demuestra que el diseño propuesto para áreas, equipamientos o sistemas, cumplen con los requerimientos establecidos.

Calificación de instalación (I.Q.): Es la verificación documentada de que todos los aspectos importantes de la instalación de sistemas auxiliares y equipos del proceso cumplan con las especificaciones del diseño y con las normas reglamentarias para que el propósito establecido sea el adecuado.

Calificación de operación (O.Q.): Es el proceso donde se demuestra que un instrumento funcionara de acuerdo a la especificación operacional en el ambiente seleccionado.

Calificación de desempeño (P.Q.): Es la etapa final del proceso de validación. En esta etapa se demuestra que cada sistema realizara la función para la cual está destinada atendiendo los parámetros y atributos de calidad especificados.

En los métodos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en la calificación de desempeño (PQ) se usa un método con una mezcla del analito bien caracterizado. Para la evaluación de estos resultados, se aplica la sección de aptitud del sistema <621> de la USP 40. ⁽²¹⁾

2.3.3.4 Parámetros de la validación

Tabla 5: *Parámetros de la validación*

Parámetros	Concepto
Especificidad	Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, de manera inequívoca el o los analitos de interés sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra o insumos.
Exactitud	Corresponde al grado de concordancia de los resultados del ensayo con el valor real o la proximidad al valor real de los resultados obtenidos por el procedimiento, es decir evalúa la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero. Matemáticamente se expresa en forma de error determinado, sistemático o sesgo, mientras menor es el sesgo mayor es la exactitud de un resultado. La exactitud de un método de ensayo debe establecerse en todo su intervalo.
Linealidad	<p>La linealidad de un método de ensayo es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.</p> <p>Se deben considerar los siguientes rangos específicos mínimos para la linealidad según su aplicación:</p> <ol style="list-style-type: none">I. Para la valoración de un Producto Farmacéutico: de 80% a 120% de la concentración de trabajo (si se declara entre 90 a 110 %);II. Para impureza declarada: desde el nivel declarado 20%;III. Para impurezas declaradas pero que no establecen límites: desde 0,1 - 2,5 %;
Precisión	<p>Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado en otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de la media.</p> <p>Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:</p> <ol style="list-style-type: none">I. Repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un periodo corto de tiempo (misma muestra, mismo analista, mismo laboratorio, mismo equipo, mismo día, etc.).II. Reproducibilidad: Se entiende como el desarrollo del procedimiento o método analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. Se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad.III. Precisión Intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio, con la misma muestra homogénea.

Fuente: Guía técnica de validación de métodos de ensayo - Chile ⁽²²⁾

2.4 Formulación de la hipótesis

2.4.1 Hipótesis general

- El método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cumple con los parámetros de validación, establecidos en la Farmacopea de Estados Unidos (USP 40)

2.4.2 Hipótesis específicas

- Se puede desarrollar el proceso de validación del método analítico con las exigencias en todos los parámetros de especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión y robustez.
- Se puede lograr la optimización del método analítico.
- El desarrollo de la validación del método analítico es confiable.

2.5 Definición de términos básicos

A continuación, presentamos un glosario relacionado con el desarrollo y validación de métodos analíticos:

- **Analito/Principio activo:** Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis. Es la sustancia dotada de un efecto farmacológico determinado.
- **Blanco (placebo, matriz de la muestra):** Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene el o los analitos en estudio, puede ser un blanco de los reactivos usados durante el análisis o blanco de la muestra (placebo).
- **Calibración:** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.
- **Calidad:** La totalidad de propiedades y características de un producto o servicio que se refieren a su capacidad para satisfacer necesidades declaradas e implícitas.
- **Cantidad declarada o nominal:** Es la cantidad o concentración teórica de un analito en el producto.
- **Cantidad estimada o calculada / Contenido:** Es la cantidad o concentración del analito hallada tras la ejecución del método analítico.
- **Curva de calibración:** Representación gráfica de la señal de medición como una función de la cantidad de analito. ⁽²³⁾
- **Desviación estándar:** Es una medida del grado de dispersión de los valores alrededor de una medida en una distribución de valores.

- **Desviación estándar relativa/ Coeficiente de variación:** Es la desviación estándar expresada como función de la media. Normalmente se expresa en porcentaje.
- **Error aleatorio:** Resultado de una medición menos la media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad.
- **Error sistemático:** Media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetitividad menos un valor verdadero del mensurando.
- **Especificaciones:** Descripción de material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- **Estabilidad analítica de la muestra:** Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, durante el tiempo comprendido entre su preparación y la finalización del análisis, especialmente cuando se utilizan equipos automáticos en donde las muestras pueden permanecer horas antes de ser analizadas.
- **Factor de retención (k):** También se le conoce como factor de capacidad (k'). En un método cromatográfico es el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna.
- **Factor de simetría o asimetría / factor de cola:** Medida de la asimetría de la señal generada por el pico cromatográfico. ⁽¹⁸⁾
- **Grados de libertad:** Número de categorías independientes que definen una muestra o una población.

- **Idoneidad del sistema (SST):** Es uno de los parámetros como parte integral de los métodos cromatográficos de líquidos y de gases. Estos se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar. Permiten verificar en el momento de utilización del método que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados.
- **Intervalo de confianza o límites de confianza:** Intervalo en torno al valor estimado que contiene el valor real con una probabilidad determinada.
- **Método de medición:** Secuencia lógica de operaciones, descrita genéricamente, utilizada en el desarrollo de las mediciones.
- **Material de referencia (MR):** Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales.
- **Material de referencia certificado (MRC):** Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.
- **Media aritmética o promedio:** Valor de centralización de una muestra o población. Equivale a la suma de todas las observaciones dividida por el número de las mismas. ⁽¹⁸⁾

- **Método analítico o ensayo:** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.
- **Método analítico desarrollado internamente:** Método desarrollado por el propio laboratorio y que no se encuentra en la literatura oficial.
- **Método analítico oficial:** Método que aparece en la literatura oficial reconocida.
- **Método analítico no oficial:** Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.
- **Número de platos teóricos:** Es una medida de la eficacia de la columna cromatográfica.
- **Parámetros de desempeño:** Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.
- **Placebo analítico:** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.
- **Producto terminado:** Producto que ha sido sometido a todas las etapas de fabricación, incluyendo el empaclado en su envase final y el etiquetado.
- **Recta de regresión o recta de calibración:** Relación entre las respuestas instrumentales que produce el analito y las concentraciones del mismo. Siempre que sea posible se buscará una respuesta lineal, cuando no lo sea podrán efectuar transformaciones matemáticas.
- **Recuperación:** Se define como eficacia en el rescate del analito de la matriz de la muestra.

- **Relación señal-ruido:** En sistemas instrumentales es la señal residual o línea de base registrada con concentración cero de analito. Es decir, es la señal ruido que proporciona un blanco o placebo.
- **Sensibilidad:** Capacidad de un método analítico de detectar pequeñas concentraciones del analito. Cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo.
- **Sesgo:** La diferencia entre el valor esperado de los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado.
- **Tiempo de retención (t_r):** Tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima.
- **Varianza:** Cuadrado de la desviación estándar. ⁽²⁴⁾

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Nivel, tipo y diseño de la investigación

- **Nivel de investigación:** Estudio aplicativo
- **Tipo de investigación:** Es experimental porque se trabajó sobre la base de una muestra de amoxicilina trihidrato 250 mg/5mL polvo para suspensión oral para efectos de validación del método analítico con fines de cuantificación del producto terminado.
- **Diseño de la investigación:** La selección de la muestra consistió en la elección de amoxicilina trihidrato 250 mg/5mL polvo para suspensión oral, producto en cuya metodología farmacopeica (USP 40), se realiza cambios significativos para la optimización de tiempo y recursos del método. La evaluación de la factibilidad, realizada en conjunto con la jefatura de control de calidad, comprobando que se cuente con las condiciones óptimas para el desarrollo de la validación.
Se tomará la recolección de datos en formato de Excel previamente diseñados para un mejor entendimiento, con cuadros lógicos para cada parámetro que se va a evaluar, así mismo se utilizará también el formato de Minitab 16 como ayuda comparativa y dándole más robustez a la evaluación.
- **Análisis de datos:** Diseñadas en hojas de cálculo Excel que se representaran a través de gráficos y tablas.
- **Área de estudio:** Se llevó acabo en el área de control de calidad del laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población de estudio estuvo conformada por el producto de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral comercializados en el Perú.

3.2.2 Muestra

Se seleccionaron 50 unidades de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral de un mismo lote de Farminindustria.

3.3 Equipos, materiales y reactivos

Para la Evaluación de la técnica se hará bajo la metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para ello se requiere los instrumentos y equipos según tabla (6).

Tabla 6: Instrumentos y equipos usados para medir los parámetros

Ítem	Nombre	Serie	Marca	Modelo	Código	Calificado Calibrado
1	Balanza Analítica	1128022236	Mettler Toledo	XS 105 DUAL RANGE	EQ-FQ-05	Conforme
2	Potenciómetro	B433931190	Mettler Toledo	SEVEN COMPACT pH/Ion S220	EQ-FQ-41	Conforme
3	HPLC	BEAB706120 DEAAC16137 DEACN17165 DEAA302924	Agilent Technologies	AT 1260 DAD	EQ-FQ-28	Conforme

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Materiales:

- Pipeta volumétrica de 2 y 5 mL
- Matraces volumétricos (fiolas) de 25, 50, 100, 200 y 1 000 mL
- Probetas de 500 y 1 000 mL
- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse L1(C18) 150 mm x 4.6 mm x 5 µm.
- Portafiltro
- Membranas PVDF 0.45 µm de porosidad.
- Viales de 2 mL para HPLC

Reactivos:

- Acetonitrilo.
- Fosfato monobásico de potasio
- Hidróxido de potasio

3.3.1 Validación de instrumentos

Los instrumentos se revisaron y calibraron para evitar errores aleatorios al análisis que se desea hacer.

3.4 Procedimiento experimental

3.4.1 Calibración, verificación y mantenimiento de equipos

Todos los equipos usados previo a la validación fueron verificados y calibrados siguiendo los procedimientos del laboratorio de control de calidad y su programa de verificación y calibración, así como también el material de vidrio fue verificado con un patrón de referencia para una trazabilidad adecuada.

3.4.2 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral.

3.4.2.1 Determinación del diluyente

El diluyente utilizado para el desarrollo del análisis de la validación fue el agua purificada tipo I que es agua para uso farmacéutico porque tiene un alto grado de pureza.

3.4.2.2 Preparación de la fase móvil

Se pesó 13.6 g de fosfato monobásico de potasio en 1900 mL de agua purificada y se ajustó a un pH 5.0 +/- 0.05 con hidróxido de potasio al 45% y se llevó a volumen hasta 2000 mL. (Solución Amortiguadora).

Se preparó una mezcla filtrada y desgasificada de Solución Amortiguadora: Acetonitrilo (960:40); se filtró a través de una membrana 0.45 µm de poro.

3.4.2.3 Preparación de estándar y muestra

Se preparó la solución de estándar y muestra, usando como diluyente agua purificada tipo I.

3.4.2.4 Preparación del estándar de referencia

Se pesó 40.0 mg de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL estándar, se transfirió a una fiola de 25 mL y se adicionó 15 mL de agua purificada, se aplicó ultrasonido hasta disolución completa y se completó a volumen con agua purificada. Se transfirió una alícuota de 4 mL a una fiola de 50 mL y se completó a volumen con agua purificada tipo I. Homogeneizar y filtrar por membrana PVDF 0.45 μ m de porosidad e inyectar.

Concentración final: 0.11 mg/mL de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

3.4.2.5 Preparación de la muestra

Reconstituir el polvo de seis frascos del producto terminado, agregando agua purificada tipo I hasta el enrase indicado en el rotulo del frasco. Hacer un pool de las muestras y pesar con exactitud alrededor de 5 mL de muestra reconstituida (equivalente amoxicilina trihidrato 250mg/5mL), transferir a una fiola de 200 mL, y se adicionó 100 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 20 minutos, enfriar y diluir a volumen con agua purificada, homogeneizar. Medir una alícuota de 5 mL de esta solución y transferir a una fiola de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada, homogeneizar. Filtrar por membrana de PVDF 0.45 μ m de porosidad e inyectar.

Concentración final: 0.11 mg/mL de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

3.4.2.6 Sistema cromatográfico

En el análisis instrumental se trabajó con las siguientes condiciones cromatográficas: cromatógrafo de líquidos de alta resolución de marca Agilent Technologies 1260 con detector DAD-UV/VIS ajustado a 230 nm. La separación se realizó empleando una columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB C-18 (150 x 4.6 mm) (5 μ m) marca Agilent, con un flujo de 1.0 mL/min, a una temperatura de 30°C y con un volumen de inyección de

10 µL. los tiempos de retención son de aproximadamente 2.4 minutos para amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

El tiempo de corrida es aproximadamente de 5.0 minutos para los estándares y 10.0 minutos para las muestras.

3.4.3 Determinación de la idoneidad del sistema – SST

Como parte de los requisitos de la validación según los criterios de la (USP40), en el capítulo (1225), se realizó un conjunto de ensayos que permitió comprobar que al momento de utilizar el método estaban en condiciones adecuadas para llevar a cabo el desarrollo de la metodología analítica.

Los parámetros de evaluación de la idoneidad del sistema (SST), según la (USP40), se pueden dividir en las siguientes categorías y criterios de aceptación.

3.4.3.1 Precisión: la desviación estándar relativa (RSD) de las inyecciones repetidas es menor a 2.0%.

3.4.3.2 Parámetros cromatográficos: el número de platos teóricos, es decir, la eficiencia de la columna (N) debe de ser mayor a 1700. Así como también el factor de asimetría (USP40 tailing) debe de ser menor a 2.0

3.4.4 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral.

La validación del método se realizó según los parámetros exigidos en la categoría I y IV de la (USP40).

3.4.4.1 Especificidad

Se evaluó mediante el estudio de las interferencias que pudieran presentarse en la determinación y cuantificación del analito de interés, se analizó de manera independiente la sustancia de referencia y las muestras de producto terminado, sometidas a diferentes degradaciones.

Para las muestras sometidas a degradación, previamente se agregó agua purificada como diluyente y se siguió como dice el cuadro, las muestras sometidas a condiciones de degradaciones son neutralizadas antes de ser colocadas en los equipos.

Tabla 7: Condiciones de degradación

Condiciones de estrés	Solución estresante	Temperatura / Tiempo de exposición
Hidrolisis ácida	5 mL de HCL 0.1 N	80°C / 120 minutos
Hidrolisis básica	5 mL de NaOH 0.1 N	80°C / 120 minutos
Oxidación con peróxido	V gotas de H ₂ O ₂ al 3%	80°C / 120 minutos
Exposición a la luz	Diluyente	Luz a UV / 5 días
Exposición al calor	Diluyente	60° C / 15 horas

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Asimismo, como parte de la evaluación, se preparó y analizó:

Muestras de estabilidad normal o natural: muestras de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral, con fecha de expira de marzo - 2019; lote 1180317; estos se compararon con estándares al 100% y se preparó cada una de las muestras por duplicado; se procedió según la metodología analítica. Los criterios de aceptación recomendables según la USP40.

- Ausencia de interferencias entre los productos de degradación forzada y el analito puro, las señales cromatográficas deben de ser distintas a la del estándar en cuanto a tiempo de retención.
- Identidad del pico cromatográfico: pureza del pico, ausencia de coelución. Factor de respuesta mayor a 98 por ciento.

3.4.4.2 Linealidad

Se determina la relación entre la concentración del analito y la respuesta analítica. Se procedió de la siguiente manera:

- **Linealidad del sistema**

Se realizó el análisis mediante 5 niveles de concentración del analito: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. Se preparó tres series de las concentraciones indicadas y se evaluó cada una por triplicado, obteniendo un total de 45 resultados individuales. El análisis de este parámetro se realizó empleando el estándar de referencia.

- **Linealidad del método**

Se realizó mediante el análisis de 3 niveles de concentración del analito a 10%, 25% y 50%. Se preparó tres series de las concentraciones indicadas y se evaluó cada uno por duplicado, obteniéndose un total de 18 resultados individuales. Para el análisis se empleó la muestra y el analito puro (estándar de referencia) y se trabajó por el método de adición del analito en muestra.

Las concentraciones establecidas para la linealidad fueron determinadas en torno a la concentración teórica de cuantificación del principio activo en la muestra (100%), con los datos obtenidos se determinó:

- Ecuación de la recta (pendiente e intercepto)
- Coeficiente de correlación “r”
- Coeficiente de determinación “r²”
- Coeficiente de variación
- Límites de confianza

3.4.4.3 Exactitud

Se realizó por el método de adición del analito a la muestra (muestra cargada), pesando cantidades de muestra y analito equivalentes a la concentración teórica.

Se prepararon muestras a las concentraciones de 10%, 25% y 50 % por triplicado.

Los criterios de aceptación son los siguientes:

- Porcentaje de recuperación: 97.0% - 103.0%
- Coeficiente de variación del porcentaje de recuperación menor a 2%

3.4.4.4 Precisión

Se determinó el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al ser analizados repetidas veces bajo diferentes condiciones.

- **Repetibilidad**

Se preparó 6 muestras de un mismo lote (1180317) de producto terminado de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral, empleando el método analítico desarrollado, con la participación del mismo analista, mismos aparatos, reactivos, en un período corto y en el mismo laboratorio.

- **Precisión Intermedia**

Se preparó 6 muestras del mismo lote (1180317) de producto terminado de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral, realizado por un segundo analista que utilizó el mismo método analítico, con las siguientes variaciones: diferente día de análisis, diferentes preparados de las fases móviles y en diferente día, pero en un mismo laboratorio.

Se calculó los intervalos de confianza para ambos analistas y se evaluó la variabilidad del método en cada una de las condiciones establecidas.

Los criterios de aceptación son los siguientes:

- Coeficiente de variación de repetibilidad: menor a 2.0%
- Coeficiente de variación de precisión intermedia: menor a 4.0%

3.4.4.5 Robustez

Se evaluó la capacidad del método analítico de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros que son susceptibles durante su utilización, se trabajó con las muestras preparadas de repetibilidad, para las que se realizó pequeñas variaciones como lo siguientes:

- Análisis después de 48 horas de la preparación de las muestras en refrigeración, comparado con un estándar preparado en el momento.

Los criterios de aceptación son los siguientes:

- Coeficiente de variación del método: menor a 2.0%
- Coeficiente de variación entre el resultado del estudio de robustez y el resultado del estudio de repetibilidad: menor a 2.0%.

3.4.4.6 Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos en cada uno de los parámetros se procedió con el tratamiento de los resultados y evaluación estadística.

Este incluyo cálculos de ecuación de regresión lineal, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, desviación estándar, coeficiente de variación, test de T-student, Test de Fischer y análisis de Anova todo en un intervalo de confianza del 95%.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Técnicas de procesamiento, análisis de datos y resultados

Para el procesamiento de datos de la evaluación de la técnica para amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral esta se realizó por separado para cada parámetro que se evaluado, de acuerdo a lo siguiente:

- Recuperación (exactitud): Se evaluó el promedio, desviación estándar, desviación estándar relativa, prueba de normalidad de los datos para saber si tiene distribución normal, T de una muestra o prueba de Wilcoxon según aplique a la normalidad de los datos.
- Precisión: Se evaluó el promedio, desviación estándar, y desviación estándar relativa, Anderson Darling (distribución normal a los datos del primer analista como al segundo analista), prueba de Cochran, prueba de Bartlett, análisis de varianza de un factor (ANOVA).
- Robustez: Se evaluó el promedio, desviación estándar, desviación estándar relativa, prueba de varianza de un factor (ANOVA).

4.1.1 Determinación de la idoneidad del sistema – SST

Se realizó la evaluación de la idoneidad del sistema en un estándar preparado al 100%. (Anexo 1)

En la tabla N° 8 se observa que la precisión del sistema, el RSD de las respuestas analíticas es menor a 2.0% (0.054%), así como el tiempo de retención permanece inalterado y con una desviación menor al 2.0% (0.034%); también se observa que se cumplió con los demás criterios de aceptación.

Los resultados obtenidos cumplen con los criterios establecidos por la USP40, AEFI y los establecidos por el usuario. (Anexo 2)

Tabla 8: *Parámetros de idoneidad del sistema para amoxicilina trihidrato 250mg/5mL – estándar de referencia*

N° de Inyecciones	Áreas	Tiempo de Retención	Platos Teóricos	Factor de Asimetría
1	9744.91602	2.414	2774	1.35021
2	9747.13477	2.413		
3	9758.89844	2.413		
4	9750.10547	2.412		
5	9749.11230	2.412		
6	9744.63184	2.412		
Promedio	9749.13314	2.413		
Desviación	5.26	0.0008		
RSD (%)	0.054%	0.034%		

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Los parámetros fueron establecidos durante la validación del método analítico, estos fueron evaluados durante el análisis de rutina.

Tabla 9: *Evaluación de parámetros de idoneidad del sistema*

Parámetros	Límites	Resultados
RSD Inyecciones	≤ 2.0 %	0.054%
Número de Platos Teóricos	>1700	2774
Factor de Asimetría	<2	1.35021

Fuente: Elaborado por el propio investigador

4.1.2 Especificidad

Se realizó la evaluación de algún posible interferente en el tiempo de retención del principio activo y muestras, ya sea a excipientes propios o impurezas del producto de degradación a la que fue sometida, las muestras fueron evaluadas por duplicado.

Análisis del estándar. Principio activo: amoxicilina trihidrato 250mg/5mL

Se observa los cromatogramas del principio activo en el (Figura N° 2), en las muestras sometidas a condiciones de hidrólisis básica y oxidación con peróxido (Figura N° 2C, 2D), apareció una degradación total del analito, en la hidrólisis ácida y degradación por luz UV (Figura N° 2B, 2F), el principio activo resulta ser un poco más estable pero evidenciándose una disminución de este, y en la degradación por calor (Figura N° 2E), se observa la aparición de algunos picos secundarios o posibles productos de degradación que interfieren con el principio activo. En los demás cromatogramas los posibles picos que sobresalen no interfieren con el analito de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

Tabla 10: Especificidad – Principio activo puro – Amoxicilina

Condición establecida	Muestra	% Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL
ST - Hidrólisis ácida	M1	70.48%
	M2	70.83%
ST - Hidrólisis básica	M1	0.00%
	M2	0.00%
ST - Oxidación con peróxido	M1	0.00%
	M2	0.00%
ST - Calor	M1	40.09%
	M2	39.03%
ST - Luz UV	M1	87.81%
	M2	87.80%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

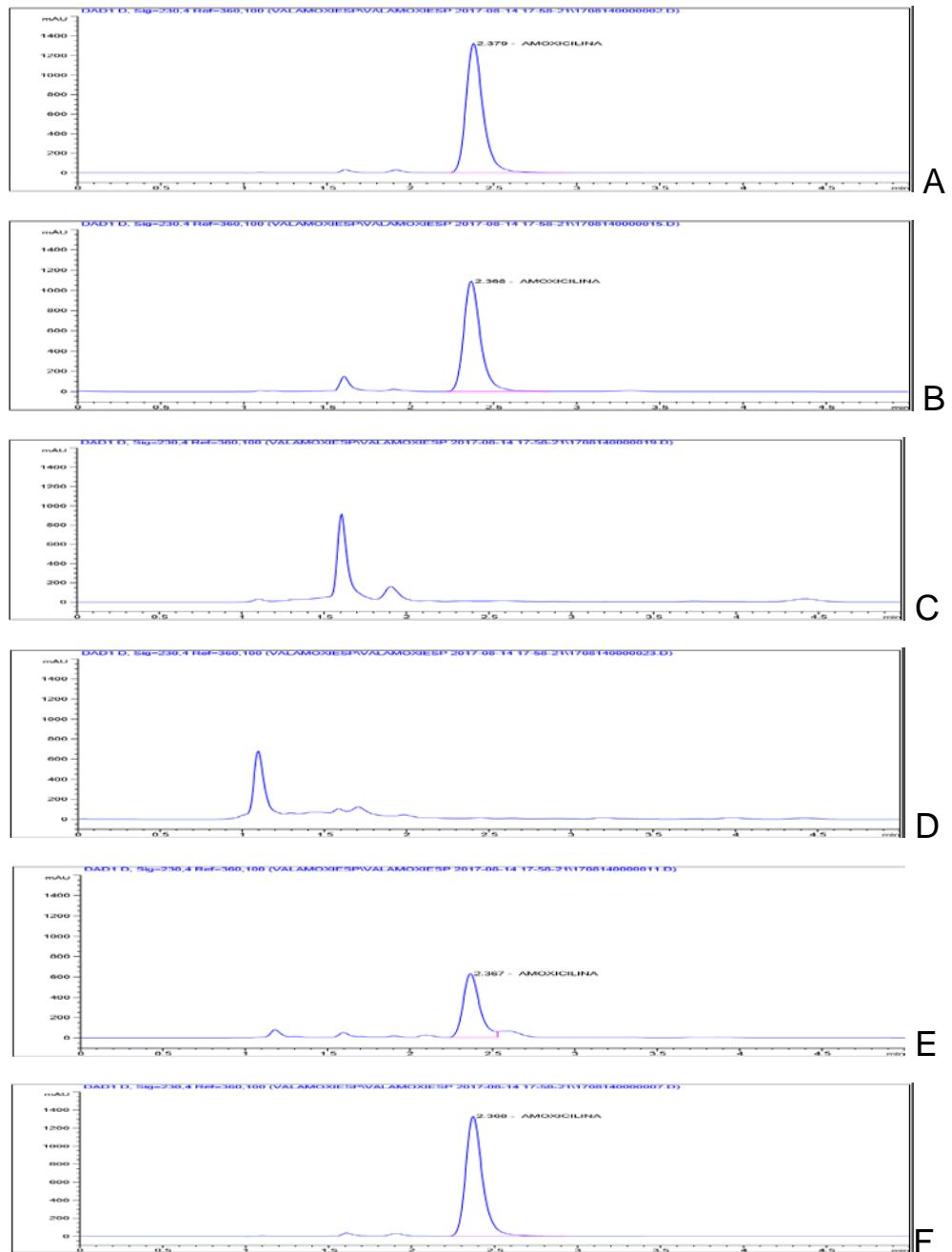


Figura 2: Cromatogramas del estudio de especificidad de amoxicilina estándar de referencia (ER).

A: Estándar de amoxicilina; **B:** Estándar sometido a hidrólisis ácida; **C:** Estándar sometido a hidrólisis básica; **D:** Estándar sometido a oxidación con peróxido; **E:** Estándar sometido a calor (60° C); **F:** Estándar sometido a luz UV (5 días).

Análisis de muestra de producto terminado: Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

Se observa los cromatogramas del principio activo de la muestra en el (Figura N° 3), en las muestras sometidas a condiciones de oxidación con peróxido (Figura N° 3D), apareció una degradación total del analito, en la hidrólisis ácida, básica y en las degradaciones por calor y luz UV (Figura N° 3B, 3C, 3E y 3F), el principio activo resulta ser un poco más estable pero evidenciándose una disminución de este, se observa la aparición de algunos picos secundarios o posibles productos de degradación que no interfieren con el analito de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL.

Tabla 11: Especificidad – muestra de producto terminado amoxicilina trihidrato 250mg/5mL

Condición Establecida	Muestra	% Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL
Normal	M1	98.61%
	M2	98.81%
MP - Hidrólisis ácida	M1	95.48%
	M2	93.98%
MP - Hidrólisis básica	M1	92.98%
	M2	90.97%
MP - Oxidación con peróxido	M1	0.00%
	M2	0.00%
MP - Calor	M1	75.61%
	M2	73.85%
MP - Luz UV	M1	86.32%
	M2	87.43%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

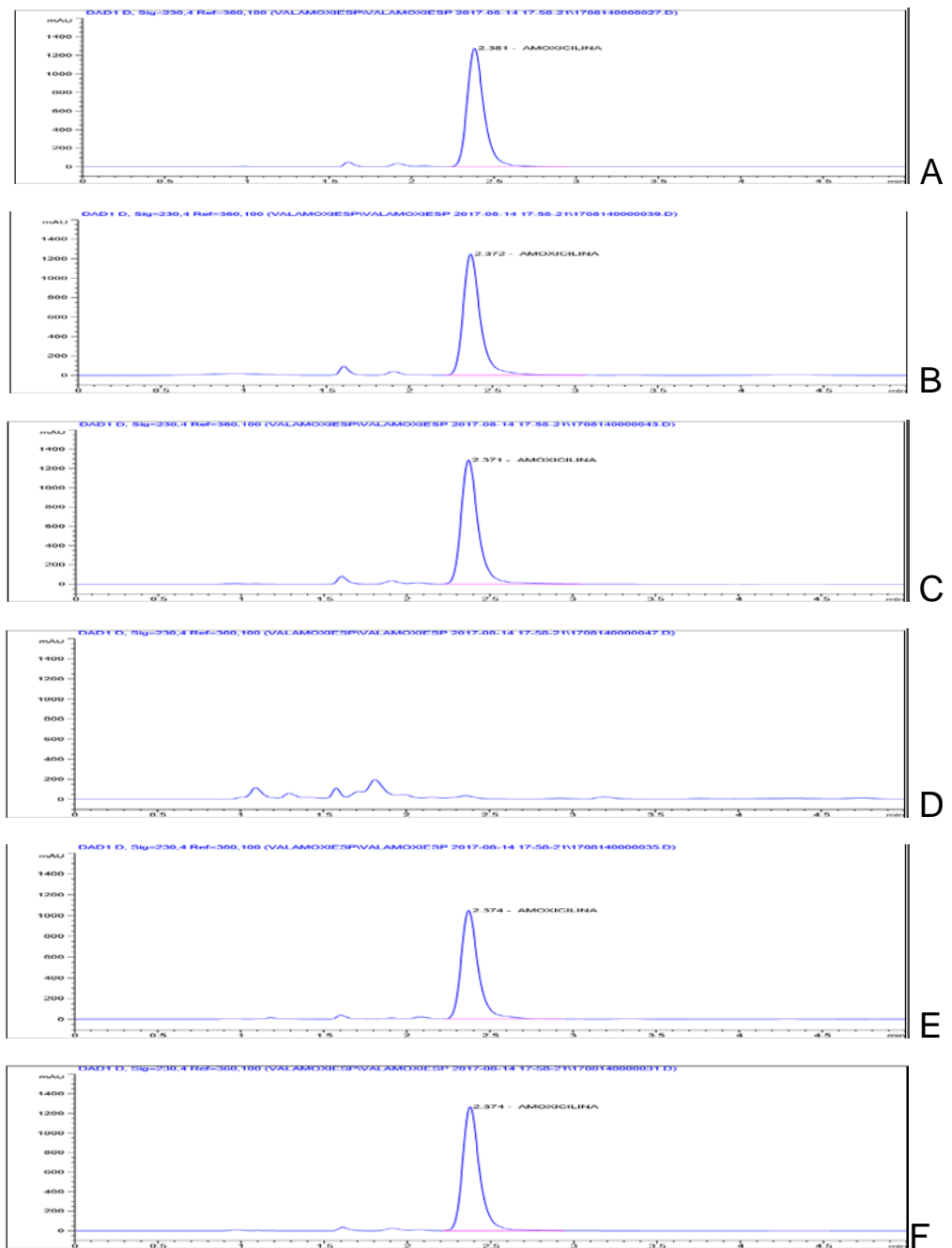


Figura 3: Cromatogramas del estudio de especificidad de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL muestra problema (MP).

A: Muestra de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL; **B:** Muestra sometido a hidrólisis ácida; **C:** Muestra sometido a hidrólisis básica; **D:** Muestra sometido a oxidación con peróxido; **E:** Muestra sometido a calor (60° C); **F:** Muestra sometido a luz UV (5días).

4.1.3 Linealidad

Linealidad del sistema. Se trabajó en el intervalo de concentración de 0.0557, 0,0827, 0,1102, 0,1367 y 0.1641 mg/mL, correspondientes a 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de las concentraciones de trabajo.

En la tabla N°12 se reportan los resultados obtenidos del análisis de Linealidad del Sistema.

Tabla 12: Resultados de linealidad del sistema

Muestras	Concentración mg/mL (x)	Área de las respuestas (y)	Factor de respuesta (x/y)
50% - M1	0.0557	4964.07129	89121.567145
50% - M2	0.0557	4976.36865	89342.345661
50% - M3	0.0557	4995.84521	89692.014602
75% - M1	0.0827	7420.88265	89732.559210
75% - M2	0.0827	7391.68359	89379.487223
75% - M3	0.0827	7384.60189	89293.855945
100% - M1	0.1102	9863.51367	89505.568693
100% - M2	0.1102	9665.99544	97713.207290
100% - M3	0.1102	9834.08105	89238.485057
125% - M1	0.1367	12207.43333	89300.902219
125% - M2	0.1367	12116.53333	88635.942453
125% - M3	0.1367	12174.46667	89059.741526
150% - M1	0.1641	14507.30000	88405.240707
150% - M2	0.1641	14443.00000	88013.406459
150% - M3	0.1641	14603.10000	88989.03179
Promedio			89028.22368
RSD			0.66%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

En las figuras 4 y 5 podemos observar la respuesta lineal para los 5 niveles de concentración establecidos.

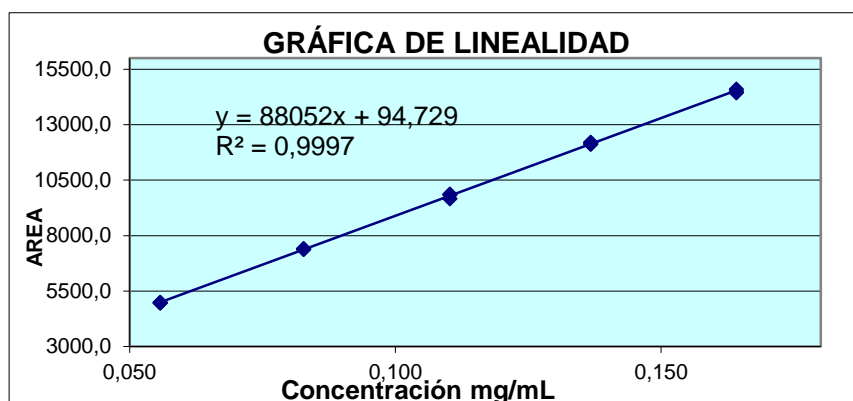


Figura 4: Gráfica de linealidad del sistema

Se evidencia en la figura 5 la linealidad a la longitud de 230 nm.

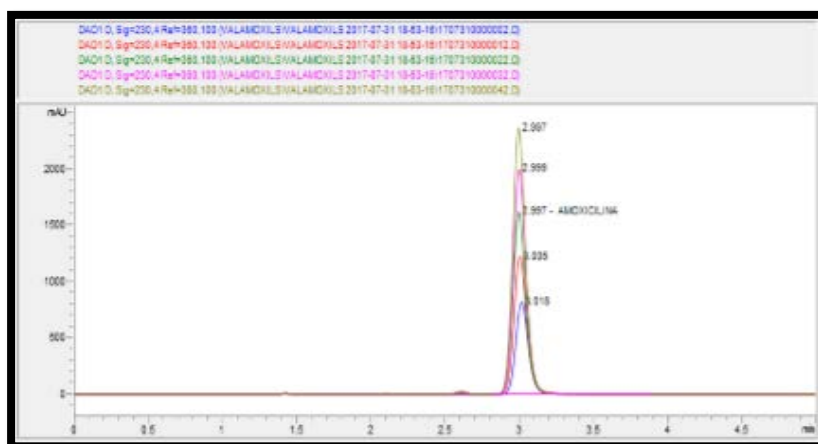


Figura 5: Cromatogramas de linealidad del sistema

Con los resultados obtenidos se calculó la ecuación de la recta con todos los puntos individuales para amoxicilina trihidrato 250mg/5mL ($y = 88052.3832x + 94.729$), a partir de allí se determinó los coeficientes de correlación "r" y coeficiente de determinación "r²". Estos fueron:

- Coeficiente de Correlación "r" fue de 0.9990
- Coeficiente de Determinación "r²" fue de 0.9997
- Coeficiente de Variación (RSD) fue de 0.664%

Se realizó la prueba de homocedasticidad (varianza residual constante), mediante la evaluación del test de Bondad y ajuste de Anderson Darling (Prueba de normalidad de los datos), para los residuos de la linealidad (Anexo 7).

El test de normalidad a los residuos de la linealidad obtuvo un P value de (0.355) es mayor a 0.05, lo que indica que los residuos tienen una distribución normal de los datos y no presentan tendencia como se puede ver en la figura 6.

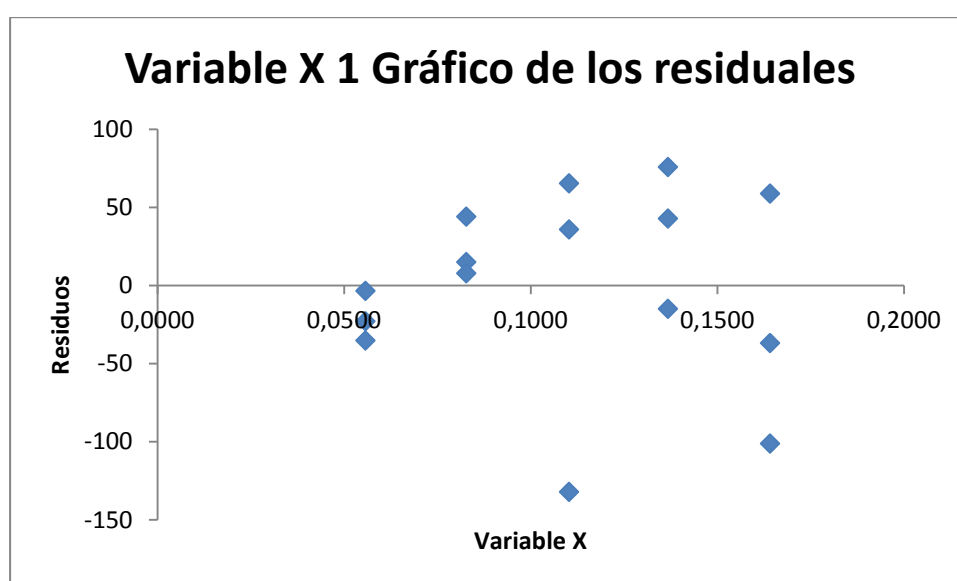


Figura 6: Gráfico de residuales

Se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas bajo el test de Cochran, donde se obtuvo el C_{exp} (0.66) que es menor al $C_{critico}$ (0.68), lo que nos indica que las varianzas son homogéneas (Anexo 8).

Se realizó el análisis de varianza, mediante el estadístico de regresión de mínimos cuadrados, donde se obtuvo que el F_{exp} fue de 44402.045 es mayor que el F_{tablas} que fue de 4.667, lo que nos indica que el modelo lineal sí proporciona un buen ajuste a los datos (Anexo 8).

Se realizó la evaluación de estadística de la linealidad, mediante el test de linealidad para la pendiente “b” y el test de Proporcionalidad para la variable independiente (intercepto) “a” (Anexo 9).

Para el test de linealidad para la variable dependiente “b” se obtuvo que el T_{exp} (210.718) es mayor que el T_{tabla} (2.160), lo que indica que la pendiente “b” es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$), para una probabilidad ($\alpha = 0.05$) y grados libertad ($gl = n-2$).

De igual manera se realizó la prueba de proporcionalidad para la variable independiente “a” donde se obtuvo que el T_{exp} (1.948) es menor que el T_{tabla} (2.160), lo que indica que el intercepto es estadísticamente similar a cero ($a = 0$), para una probabilidad ($\alpha = 0.05$) y grados libertad ($gl = n-2$).

Linealidad del método: Se trabajó en el intervalo de concentración de 0.0112 y 0.0559 mg/mL, correspondientes al 10%, 25% y 50% de la concentración de trabajo.

En la tabla 13 se reportan los resultados obtenidos del análisis de linealidad del método.

Tabla 13: Resultados de linealidad del método

Muestras	Concentración mg/mL (x)	Área de las respuestas (y)	Factor de respuesta (y/x)
10% - M1	0.0112	1029.15552	91888.88571
10% - M2	0.0112	986.47351	88077.99196
10% - M3	0.0112	995.88867	88918.63125
25% - M1	0.0280	2507.56104	89555.75143
25% - M2	0.0280	2525.54077	90197.88464
25% - M3	0.0280	2528.30811	90296.71821
50% - M1	0.0559	4939.62500	88365.38462
50% - M2	0.0559	4977.31982	89039.71055
50% - M3	0.0559	4967.15869	88857.93721
Promedio			89466.54395
RSD			1.32%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

En las figuras 7 y 8 podemos observar la respuesta lineal para los 3 niveles de concentración establecidos.

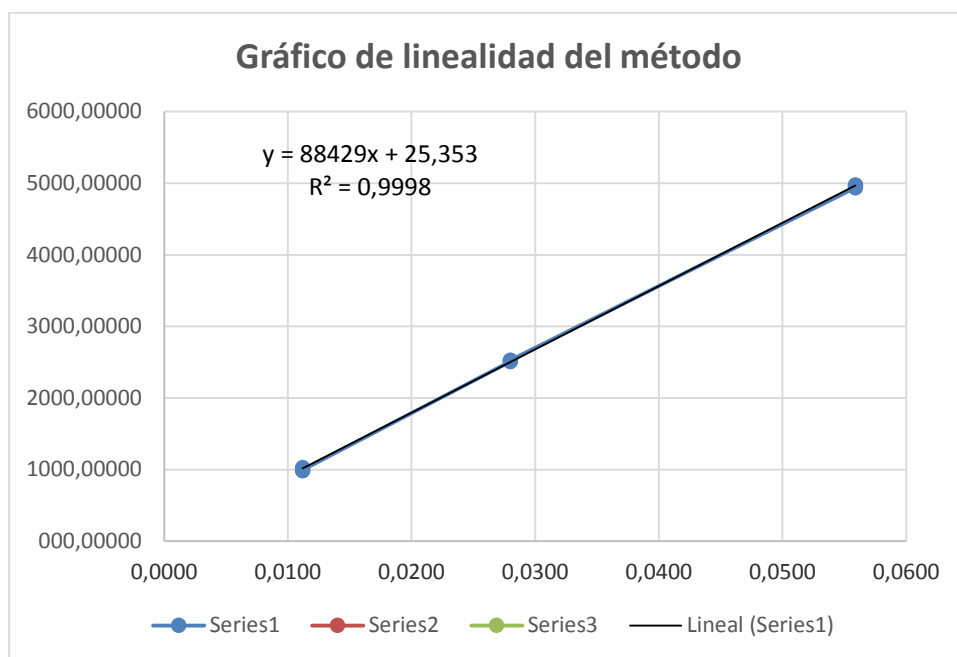


Figura 7: Gráfica de linealidad del método

Se evidencia en la figura 8 la linealidad a la longitud de 230 nm.

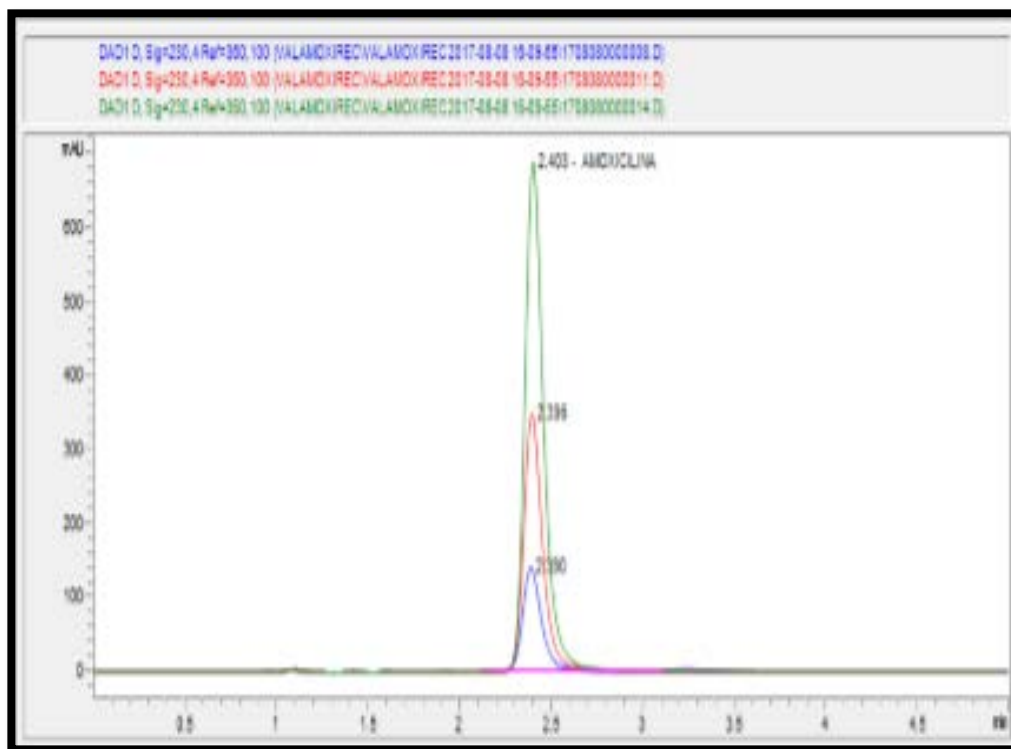


Figura 8: Cromatogramas de linealidad del método

Con los resultados obtenidos se calculó la ecuación de la recta con todos los puntos individuales para amoxicilina trihidrato 250mg/5mL ($y = 88429.2144x + 25.3529$), a partir de allí se determinó los coeficientes de correlación "r" y coeficiente de determinación "r²". Estos fueron:

- Coeficiente de Correlación "r" fue de 0.9990
- Coeficiente de Determinación "r²" fue de 0.9980
- Coeficiente de Variación (RSD) fue de 1.32%

Se realizó la prueba de homocedasticidad (varianza residual constante), mediante la evaluación del test de Bondad y ajuste de Anderson Darling (Prueba de normalidad de los datos), para los residuos de la linealidad del método (Anexo 11).

El test de normalidad a los residuos de la linealidad obtuvo un P value de 0.379 es mayor a 0.05, lo que indica que los residuos tienen una distribución normal de los datos y no presentan tendencia como se puede observar en la figura 9.

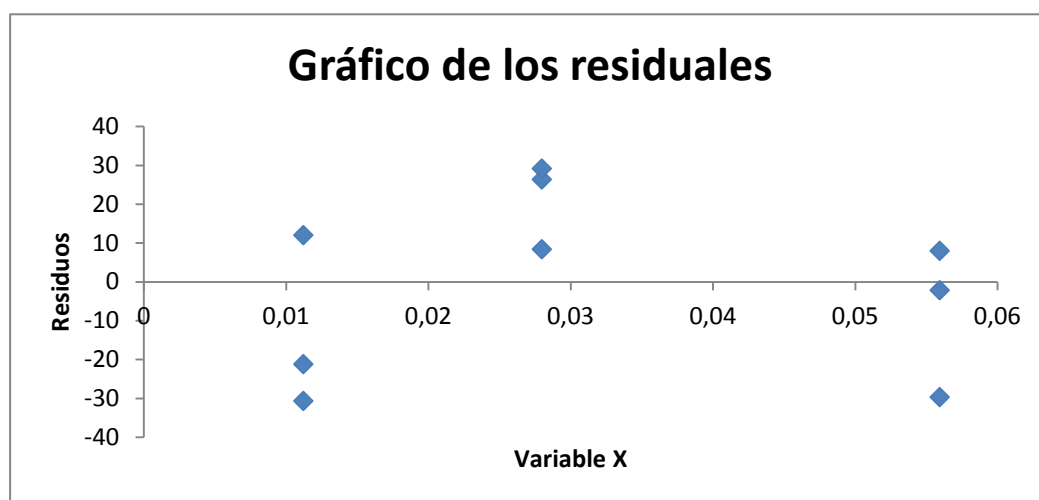


Figura 9: Gráfico de residuales

Se realizó el análisis de varianza, mediante el estadístico de regresión de mínimos cuadrados, donde se obtuvo que el F_{exp} fue de 45306.862 es mayor que el F_{tablas} que fue de 5.591, lo que nos indica que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos (Anexo 12).

Se realizó la evaluación de estadística de la linealidad, mediante el test de linealidad para la pendiente "b" y el test de proporcionalidad para la variable independiente (Intercepto) "a" (Anexo 13)

Para el test de linealidad para la variable dependiente "b" se obtuvo que el T_{exp} (212.854) es mayor que el T_{tabla} (2.365), lo que indica que la pendiente "b" es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$), para una probabilidad ($\alpha = 0.05$) y grados libertad ($gl = n-2$).

De igual manera se realizó la prueba de proporcionalidad para la variable independiente "a" donde se obtuvo que el T_{exp} (1.664) es menor que el T_{tabla} (2.365), lo que indica que el intercepto es estadísticamente similar a cero ($a = 0$), para una probabilidad ($\alpha = 0.05$) y grados libertad ($gl = n-2$).

4.1.4 Exactitud

Se trabajó las muestras a concentraciones de 10%, 25% y 50% por triplicado, los resultados se encuentran en la tabla 14.

Tabla 14: Resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación

Muestra	Cantidad Agregada (mg/mL)	Cantidad Encontrada (mg/mL)	% Recuperación	
			Por Nivel	Promedio
10% - M1	0.01171	0.01167	102.17	101.17
10% - M2	0.01122	0.01148	100.48	
10% - M3	0.01133	0.01152	100.86	
25% - M1	0.02853	0.02839	99.01	99.23
25% - M2	0.02873	0.02848	99.33	
25% - M3	0.02876	0.02849	99.36	
50% - M1	0.05620	0.05569	98.67	98.48
50% - M2	0.05663	0.05586	98.97	
50% - M3	0.05651	0.05520	97.79	
Promedio				99.63
Desviación Estándar				1.39
RSD				1.39

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Se realizaron las pruebas estadísticas para asegurar que la metodología es exacta y no es afectado por errores sistemáticos de forma significativa, para esto se aplicó el estadístico de Cochran, para comprobar si la variación de la concentración produce diferencias significativas en los resultados, se obtuvo que el C_{exp} (0.701) fue menor que el $C_{crítico}$, al 5% (0.707), para un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$), por lo tanto las varianzas son equivalentes, lo que nos indica que la concentración no influye en la variabilidad de la respuesta medida. (Anexo 14).

Se procedió a realizar la prueba de normalidad de Anderson Darling, para saber si los datos para cada nivel de recuperación guardan una distribución normal de los datos, si esto fuese así se hace el estadístico de T-1 muestra, demostrando que los resultados estén dentro del rango de recuperación (97.0% - 103.0%), en caso contrario, si la distribución de los datos fuese no normal se hace el estadístico de Wilcoxon, tomando el mismo rango de recuperación. (Anexos 15 y 16)

La prueba de normalidad se realizó a cada nivel de recuperación siendo los resultados expresados en la tabla 15.

Tabla 15: Resultados de recuperación en el rango establecido

Muestra	Prueba de Normalidad	Estadístico usado	P value 97%	P value 103%	Rango (97.0%-103.0%)
10%	P value = 0.202	T-1 muestra	0.000	0.004	Conforme
25%	P value = 0.773	T-1 muestra	0.000	0.000	Conforme
50%	P value = 0.118	T-1 muestra	0.000	0.000	Conforme

Fuente: Elaborado por el propio investigador

En los cromatogramas obtenidos (Figura 10) se puede ver que no existe la presencia de picos cercanos en el tiempo de retención del principio activo y muestra, esto nos indica que los excipientes no causan ningún tipo de interferencia en la determinación y cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, esto es evidenciado en la recuperación dentro del rango de 97.0% - 103.0%, así obteniendo resultados conformes en este parámetro.

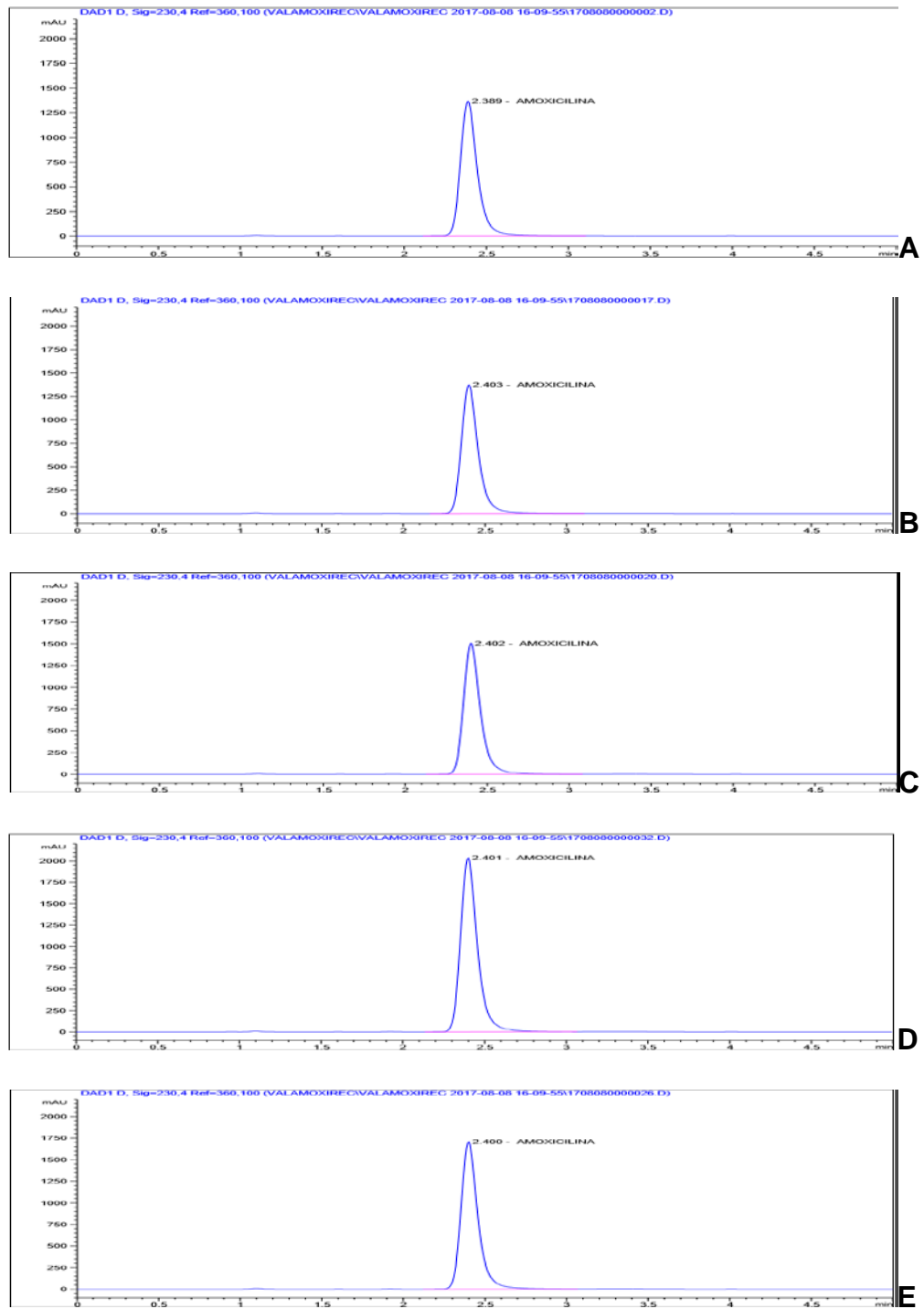


Figura 10: Cromatogramas de la exactitud del método

A: Estándar de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL; **B:** Muestra de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL; **C:** Muestra más estándar al 10%; **D:** Muestra más estándar al 25%; **E:** Muestra más estándar al 50%.

4.1.5 Precisión

Se determinó el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al ser analizadas repetidas veces bajo las condiciones establecidas.

Repetibilidad: Se evaluó la concordancia de los resultados. Los resultados están reportados en la tabla 16.

Se determinó la variabilidad mediante el cálculo de coeficiente de variación RSD (0.415%) menor al 2.0% establecido, lo cual evidencian que el método es repetible en las condiciones del laboratorio.

Tabla 16: Resultados del estudio de repetibilidad

Muestra	Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL	% Obtenido
REP- M1	245.96	98.38
REP-M2	245.33	98.13
REP-M3	245.92	98.37
REP-M4	243.80	97.52
REP-M5	244.54	97.82
REP-M6	246.55	98.62
Promedio	245.35	98.14
Desviación	1.017	0.407
RSD	0.415%	0.415%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Se evaluó la atipicidad de los resultados, mediante el estadístico de Grubbs; obteniéndose como resultado G_{\min} (1.52) y el G_{\max} (0.20), siendo estos datos menores que el $G_{\text{crítico}}$ al 5% (1.887). Esto significa que los datos obtenidos no presentan valores atípicos (diferentes). (Anexo 18).

Precisión intermedia: Se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos dentro del mismo laboratorio, un segundo analista realizó los análisis y los resultados están expresados en la tabla 17.

Se evaluó la reproducibilidad bajo las condiciones de precisión intermedia, y se determinó la variabilidad de los dos analistas, obteniéndose un promedio de 98.19% y un coeficiente de variación (RSD) de 0.314% menores a lo establecido 2.0%. (Anexo 20).

Tabla 17: Resultados del estudio de precisión intermedia

Muestra	Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL	% Obtenido
P.INT- M1	245.74	98.29
P.INT -M2	245.56	98.22
P.INT -M3	245.07	98.03
P.INT -M4	245.36	98.14
P.INT -M5	246.46	98.58
P.INT -M6	245.29	98.11
Promedio	245.58	98.23
Desviación	0.488	0.195
RSD	0.199%	0.199%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Se evaluó la atipicidad de los resultados, mediante el estadístico de Grubbs; obteniéndose como resultado G_{min} (1.046) y el G_{max} (1.799), siendo estos datos menores que el $G_{crítico}$ al 5% (1.887). Esto significa que los datos obtenidos no presentan valores atípicos (diferentes). (Anexo 21)

Se procedió al análisis de los dos analistas para saber si trabajan de la misma forma y que entre sus resultados no presenten diferencias significativas, entonces se procedió a evaluar el análisis de ANOVA para saber si hay diferencias en las varianzas, teniendo los siguientes

resultados; el F_{exp} (0.247) menor al $F_{crítico}$ (4.964) y un P value de 0.63 mayor a 0.05; resultando que las varianzas son iguales entre sí. (Anexo 20)

Se prosiguió con el estadístico de T- 2 muestras para demostrar que las medias de los analistas son iguales, teniendo en cuenta que los datos presentan una distribución normal, teniendo como resultado un P value de 0.634 mayor a 0.05, es decir, que los analistas tienen igual media. (Anexos 22 y 23).

Y por último para asegurar que no haya diferencia significativa entre ambos analistas se hizo el estadístico de Fischer para demostrar que la varianza de los analistas son iguales, obteniéndose un P value de 0.132 mayor a 0.05. (Anexo 24).

En los cromatogramas obtenidos se evidencia que no existe diferencia en el tiempo de retención en repetibilidad como en precisión intermedia, demostrando que la metodología es entendible por los analistas y que puede ser considerado como método de rutina. (Figura 11).

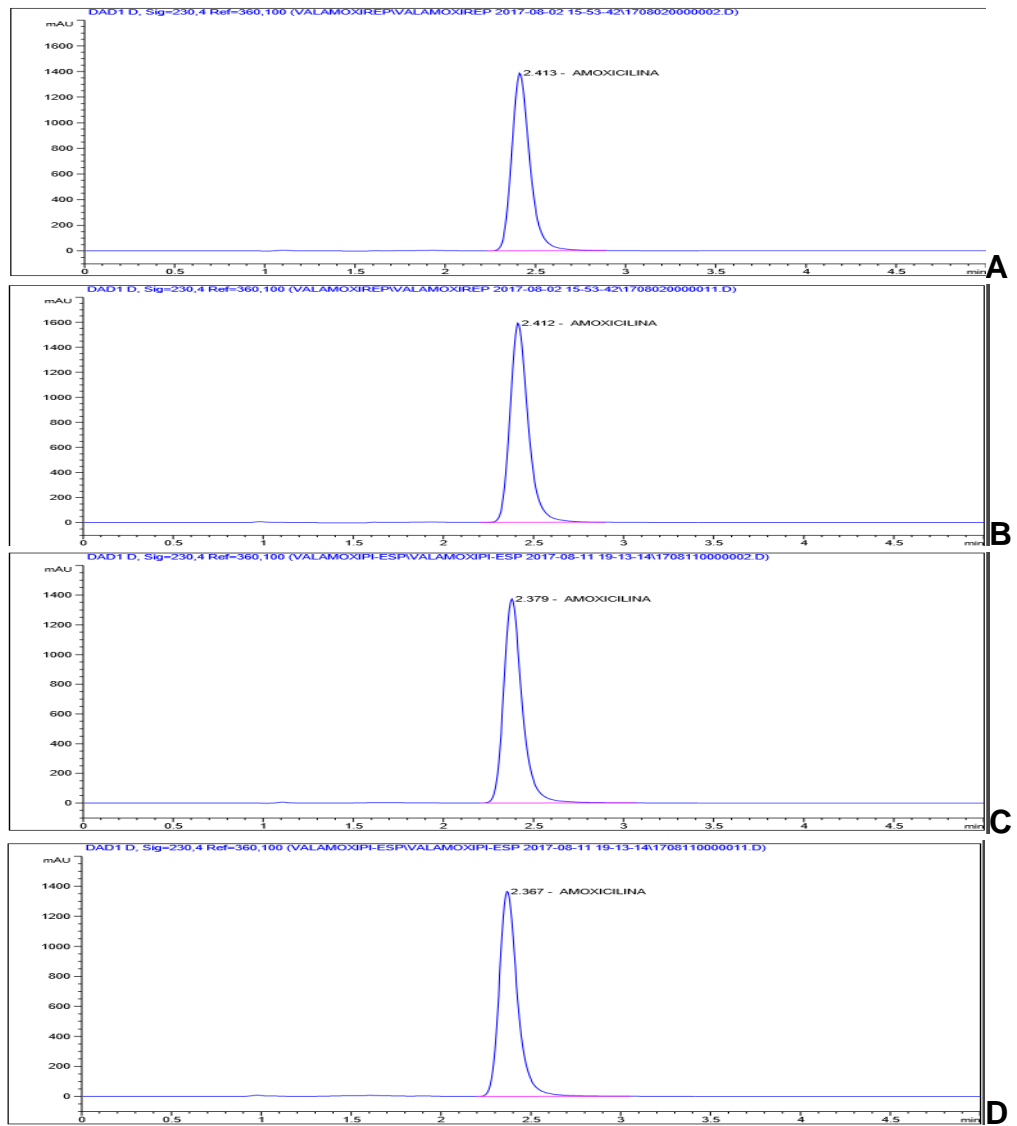


Figura 11: Cromatogramas del estudio de precisión

A: Estándar de repetibilidad; **B:** Muestra de repetibilidad;
C: Estándar de precisión intermedia; **D:** Muestra de precisión intermedia.

4.1.6 Robustez

Se realizó una modificación en el método analítico y se evaluó la reproducibilidad de los resultados para conocer el grado de confianza ante las posibles variaciones que pudieran ocurrir en el transcurso del análisis rutinario.

Los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18: Resultado de la robustez del método

Factor Evaluado	Amoxicilina trihidrato 250mg/5mL		
	Resultado %	% RSD del Método	% RSD entre Estudio
Análisis normal	98.14%	0.415%	-----
Análisis 48 horas	97.04%	0.415%	0.707%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Durante el análisis de esta variable, se pudo demostrar que los parámetros de idoneidad del sistema (SST) cumplieron con lo establecido en la validación del método analítico.

Con los resultados obtenidos se observó que el coeficiente de variación para este factor evaluado es menor al 2.0%, por lo tanto el método es robusto ante la modificación realizada. (Anexo 26).

En los cromatogramas se observan que no hubo variación en la corrida cromatográfica en el cambio de factor, demostrando que el factor de refrigeración de 48 horas no altera los resultados en la determinación de la concentración. (Figura 12).

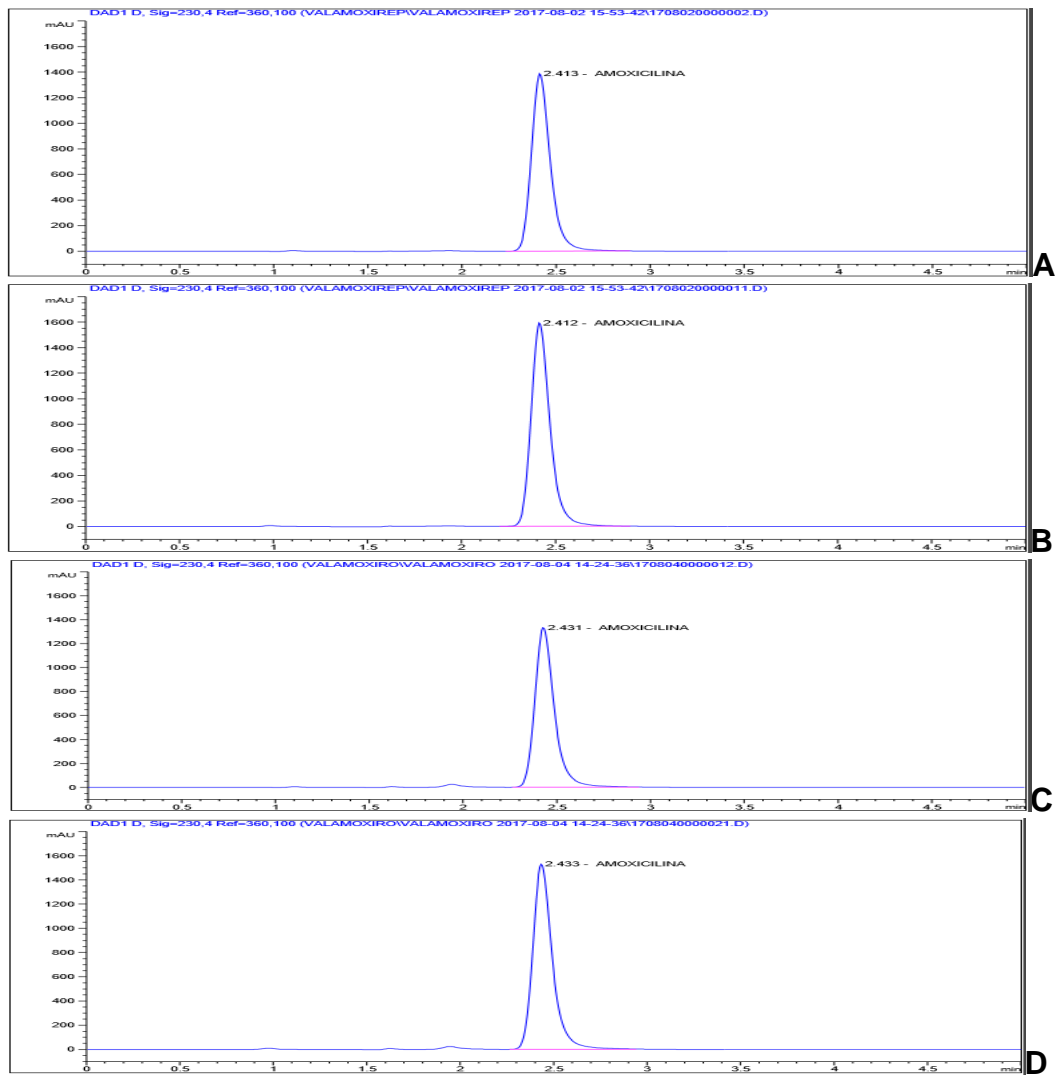


Figura 12: Cromatogramas del estudio de robustez

A: Estándar de repetibilidad; **B:** Muestra de repetibilidad;
C: Estándar de robustez; **D:** Muestras de robustez.

Es recomendable analizar la estabilidad de los productos farmacéuticos para asegurar que las muestras mantengan sus características, ya que muchas veces en el laboratorio, por la carga de análisis, estas tienen que esperar a ser analizadas. Considerando esta necesidad se procedió a guardar las muestras a 48 horas en el refrigerador para así saber si se conservan como en un análisis en tiempo real.

Los resultados conllevan a que las muestras no sufren ningún tipo de degradación, por lo tanto, los resultados obtenidos son fiables.

4.2 Discusión de los resultados

1. La idoneidad del sistema permitió obtener la precisión con una desviación estándar relativa de 0.054%, así como el tiempo de retención permanece inalterado y con una desviación de 0.034%. Por tanto, se observa que se cumplió con los criterios de evaluación.

Los resultados obtenidos cumplen con los criterios establecidos por la farmacopea americana (USP 40) y Asociación Española de Farmacéuticos de La Industria (AEFI) (ver tabla 8 y 9).

El método desarrollado resultó ser lineal, los resultados cumplieron con los criterios de aceptación: coeficientes de correlación y de determinación (linealidad de sistema: $r = 0.9998$ y $r^2 = 0.9997$; linealidad de método: $r = 0.9999$ y $r^2 = 0.9998$). (Gamboa, k)⁽¹⁾

El método desarrollado resultó ser exacto, se obtuvo un porcentaje de recuperación media igual a 99.63% (CV = 1.39%), con lo que podemos demostrar la capacidad del método de brindar resultados exactos y precisos. (Zavala. C)⁽²⁾

Se determinó la adecuada precisión del método, cumpliendo con los criterios de aceptación para el parámetro de precisión: repetibilidad (CV = 0.415%) y precisión intermedia (CV = 0.314%).

El método desarrollado resultó ser específico y selectivo, ya que no se observó interferente por parte de la matriz, productos de degradación del principio activo o por reactivos que se emplean en el ensayo

Como parte de la robustez del sistema se evaluó la estabilidad de las muestras, para el cual se obtuvo un CV < 2,0%, lo que nos indica que las muestras son estables durante el tiempo de espera estudiado, y que los resultados son confiables después de este periodo.

2. Para la evaluación de los parámetro de selectividad y especificidad, el principal objetivo fue evaluar la capacidad del método en dar respuesta proporcionada por el analito de interés, pudiendo existir algunos interferentes producido por el placebo o reactivos utilizados, los cuales fueron sometidos a evaluación con estos parámetros. De observarse productos de degradación, estos no deben interferir en los tiempos de retención del principio activo de interés, esta posible interferencia puede ocasionar la identificación de falsos positivos, para lo cual se recomienda el estudio del principio activo, placebo y muestras del producto terminado sometidas a condiciones de degradación forzadas. En el presente estudio se comprobó que el nuevo método es capaz de discriminar cualquier tipo de interferentes o impurezas de degradación. Las condiciones cromatográficas no fueron modificadas para este estudio, por lo que se comprobó su adecuada selección.

Para la evaluación de la exactitud del método desarrollado, la farmacopea americana (USP 40) y las guías ICH, nos mencionan diversos métodos para evaluarlo, como son: placebo cargado con analito, muestra problema cargada con el analito o, comparación con un método exacto. Zavala C. *et al* ⁽²⁾, utilizó en sus investigaciones el método de placebo cargado con analito, ya que es el procedimiento que mejor refleja las características del producto en las concentraciones reales. Para nuestro caso, se hizo muestra cargada con el analito que es una buena opción cuando no se puede obtener el placebo del producto en estudio; es así que se decidió trabajar con este método para que los análisis realizados a las muestras reflejen mejor las características y comportamiento del producto en la matriz del producto. En cuanto al desarrollo y evaluación la USP40 e ICH, recomiendan un mínimo de 9 determinaciones utilizando mínimo 3 concentraciones por triplicado dentro del rango establecido, por lo que se trabajó con 3 concentraciones, por triplicado con 3 réplicas de cada una, obteniendo un total de 27 determinaciones, con los que se realizaron las evaluaciones estadísticas como la T de Student, para evaluar si el porcentaje de recuperación está dentro del rango de recuperación que es de 97.0 por ciento y 103.0 por ciento siempre y cuando los datos para cada recuperación presenten una

distribución normal de los datos, caso contrario, se hace el estadístico de Wilcoxon, asimismo el Test de Cochran y el ANOVA, permitió comprobar si la concentración del analito y/o placebo produce alguna diferencia significativa tanto de manera individual o por niveles de concentración.

3. En la evaluación de la precisión del método, se debe tener en cuenta todas fuentes de variación posibles: equipos, analistas, reactivos, es así que la precisión fue evaluada bajo los niveles de precisión establecidos, según la USP40 e ICH: repetibilidad, precisión intermedia. Según las guías de referencia, la repetibilidad se puede evaluar con un mínimo de 9 determinaciones dentro del rango de trabajo (3 concentraciones por triplicado) o con 6 determinaciones al 100% de la concentración de trabajo, en ambos casos se pueden trabajar con el método de adición de analito al placebo o con muestras individuales obtenidas de una muestra homogénea (producto terminado). Zavala C. *et al* ⁽²⁾, recomiendan trabajar muestras obtenidas de una muestra homogénea; ya que evitamos variabilidad en la muestra producto de la manipulación, de manera que con el producto terminado tenemos una muestra más homogénea, en cuanto al criterio de aceptación para este parámetro la AEFI establece un CV 2%, y para el caso de la reproducibilidad aplicaría el mismo tratamiento de las muestras, con las variaciones correspondientes para el parámetro, con diferente analista, equipo, entre otros. Para la evaluación estadística a través de la prueba de Grubbs para la determinación si los datos reportados para la repetibilidad y precisión intermedia no tengan ninguna atipicidad, es decir que guarden una homogeneidad de los resultados, se hizo el estadístico de Anova para demostrar que las varianzas de los dos analistas son iguales y que se trabaja de manera igual sin presentar desviaciones.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Los resultados de la validación del método analítico cumple con las exigencias en todos los parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.)
2. Se ha optimizado el método analítico para la cuantificación amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.)
3. Los resultados estadísticos obtenidos de cada parámetro demuestran la confiabilidad de la validación del método analítico.

5.2 Recomendaciones

1. Cualquier modificación en el método analítico para la amoxicilina trihidrato 250 mg /5mL polvo para suspensión oral, significa una revalidación de dicho proceso.
2. Se recomienda seguir los pasos establecidos, según la validación del método analítico, de modo que los resultados sean reproducibles.
3. Se recomienda el uso de este método por la optimización de tiempo de análisis y recursos

Referencias bibliográficas

1. Gamboa, K. "Vida útil de amoxicilina tabletas 500 mg fabricadas en el Laboratorio Farmacéutico Iqfarma" 2013. Disponible en:
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1282>
2. Zavala, C. "Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para cuantificación de amoxicilina y ácido clavulánico en tabletas recubiertas". 2012. Disponible en:
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1938>
3. Ramírez, I. y Silva, J.C. "Comparación de la estabilidad química de amoxicilina trihidrato en suspensión de 250mg/5 mL de productos, genérico e innovador". 2011. Disponible en:
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4564>
4. Velasteguí, J. Tesis "Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC". Ecuador. 2011. Disponible en:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1584/1/56T00267.pdf>
5. Faife .L. Tesis "Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la cuantificación de Mupirocina 2 % ungüento en Laboratorio Ceguel" Nicaragua 2009. Disponible en:
<http://repositorio.unan.edu.ni/20/1/42251.pdf>
6. Ministerio de salud. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Dirección general de medicamentos, Insumos y drogas. DIGEMID. 1999. Lima – Perú. Disponible en:
<http://bvcenadim.digemid.minsa.gob.pe/lildbi/textcomp/PUBDIGEMID0007.pdf>

7. Ley General de Salud N° 26842 y su reglamento aprobado por Decreto Supremo N° 010-97-SA. Disponible en:
<http://www.minsa.gob.pe/renhice/documentos/normativa/Ley%2026842-1997%20-%20Ley%20General%20de%20Salud%20Concordada.pdf>
8. Reglamento que regula la información mínima del documento que debe contener la Validación de Técnicas analíticas Propias. Disponible en:
http://www.digemid.minsa.gob.pe/Upload/UpLoaded/PDF/Publicaciones/DocumentosConsulta/P08_2016-07-14.pdf
9. United States Pharmacopeia Convention Inc., United States Pharmacopeia 40 NF-35, 2017.
10. ISO/IEC 17025:1999 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Disponible en:

http://www.medicinalaboraldevenezuela.com.ve/archivo/otras-normas/iso_17025_es.pdf
11. International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). (2005). Disponible en http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/
12. Martindale. The Complete Drug Reference. V.1 35 Ed. Pharmaceutical Press. London: UK.2007. pág. 179
13. Goodman y Gilman. Manual de farmacología y terapéutica. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. 2009. pág. 738.
14. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Decima Edición V. II McGraw Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. 2003. pág. 1219,1221

15. Quattrocchi O., Abelaira de Andrizzi S., Laba E. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica. Editorial Universitaria de Buenos Aires; Buenos Aires, 1992.
16. Rojas, M. "validación de método analítica para test de disolución con objetivo de realizar estudio de bioexención de levofloxacino comprimidos recubiertos de 500 y 750 mg". Tesis. 2015. Disponible en:
<http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/133065?show=full>
17. Remington Farmacia, Cromatografía; editorial Panamericana 17ava edición; Buenos aires, 1987; cap 33, pág. 809
18. Castro, M., gascón, F., Pujol, M., Joseph, M., Sans, R., Pla, V. Validación de Métodos Analíticos. Monografía AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria). Barcelona, España. 2001. Disponible en:
<https://es.scribd.com/doc/79379169/Validacion-de-Metodos-Analiticos-Asociacion-Espanola-de-Farmaceuticos-de-la-Industria>
19. A laboratory guide to method validation and related topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide. Guía para la validación de Métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05. 2009. Disponible en:
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
20. HARRIS, Daniel. Análisis químico cuantitativo. 3ª ed. Barcelona. Reverté, 2006.pág 723.
21. International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). (2005). Disponible en:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/

22. Guía técnica para la realización de la validación de métodos de ensayo
Resolución N°86 22-01-2015 Disponible en:
http://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2015/01/resoluci%C3%B3n_exenta_201_2015.pdf

23. WHO Expert Comité on Specifications for Pharmaceutical Preparativos. Reporte 32. Genova, World Health Organization, 1992. (Who Technical Report Series, N°823, 1992)
http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/2_Anexo_5_informe_32.pdf

24. Buenas Prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico
Informe 36 Ginebra Organización Panamericana de salud
OMS Serie, N°902, 2002.
http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_36_Anexo_3.pdf

ANEXOS

Anexo 1: Evaluación de la Aptitud del Sistema (SST)

APTITUD DEL SISTEMA

Estándar : Amoxicilina Trihidrato
Peso : 40.0 mg
Potencia : 86.10% T/C Amoxicilina base
Lote : 1180317
Fecha de expira : Marzo 2 019

APTITUD DEL SISTEMA

Lectura N°	Area de Amoxicilina	Tr (min)
M1	9 744.91602	2.414
M2	9 747.13477	2.413
M3	9 758.89844	2.413
M4	9 750.10547	2.412
M5	9 749.11230	2.412
M6	9 744.63184	2.412
Promedio	9 749.13314	2.413
Desviación	5.26016	0.00082
RSD	0.054%	0.034%

Anexo 2: Cromatogramas de aptitud del sistema (SST) – Parámetros establecidos por la (USP 40)

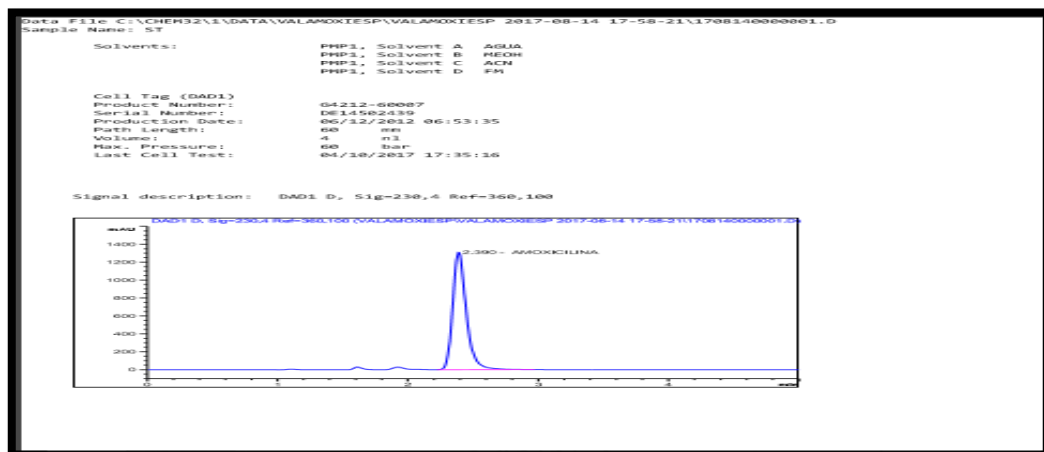
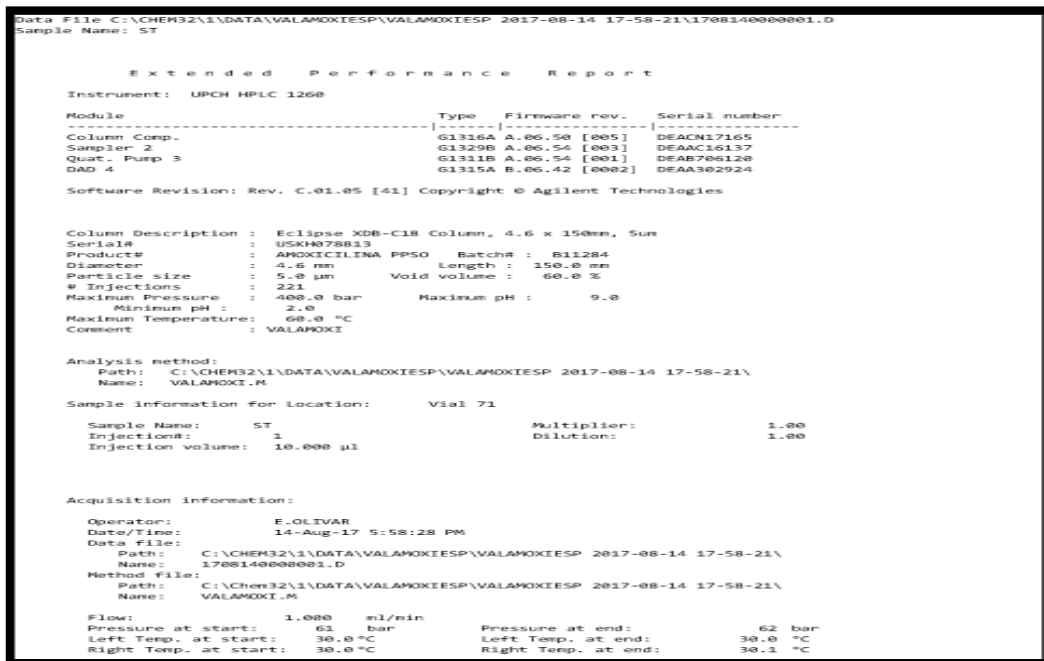


Figura 13: Cromatograma de aptitud del sistema

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 3: Cálculo del producto terminado sin degradaciones

1 ESPECIFICIDAD

A. DOSAJE DEL PRODUCTO (ANTES DE DEGRADACIONES)

Producto : AMOXICILINA polvo Para Suspensión Oral 250 mg/5 mL
 Lote : 1180317
 Peso específico : 1,2467
 Amoxicilina 250,00 mg/5 mL

Estándar : Amoxicilina Trihidrato
 Peso Estándar : 40,6 mg
 Potencia : 86,10% T/C Amoxicilina base
 Analista : Jamely
 Equipo : HPLC 1260-DAD

Peso Muestra-1 : 5,4187 g
 Peso Muestra-2 : 5,2761 g

Áreas de estándar

Estándar	Amoxicilina
Áreas	9 454,78711
	9 441,05664
	9 480,83691
	9 433,53613
	9 428,19434
	9 428,05078
Media	9 444,41032
RSD	0,217%

Áreas de las Muestras:

Muestra N°	Amoxicilina
M1	9 056,01465
	9 038,27930
M2	8 817,40625
	8 835,05371

- Fórmula para calcular el % de Amoxicilina en el producto:

$$\text{Amoxicilina \%} = \frac{A}{A_{St}} \times \frac{W_{St}}{25} \times \frac{4}{50} \times \text{Pot St} \times \frac{200}{W M} \times \frac{50}{5} \times 5 \times \text{p.e.} \times \frac{100}{250}$$

$$F_{St} = W_{St} \times \text{Pot St} = 34,9566$$

$$F_d = \frac{1}{25} \times \frac{4}{50} \times \frac{200}{1} \times \frac{50}{5} \times 5 \times \text{p.e.} \times \frac{100}{250} = 15,9578$$

Muestra N°	Amoxicilina
M1	98,61%
M2	98,81%
Media	98,71%
RSD	0,138%

Anexo 4: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales

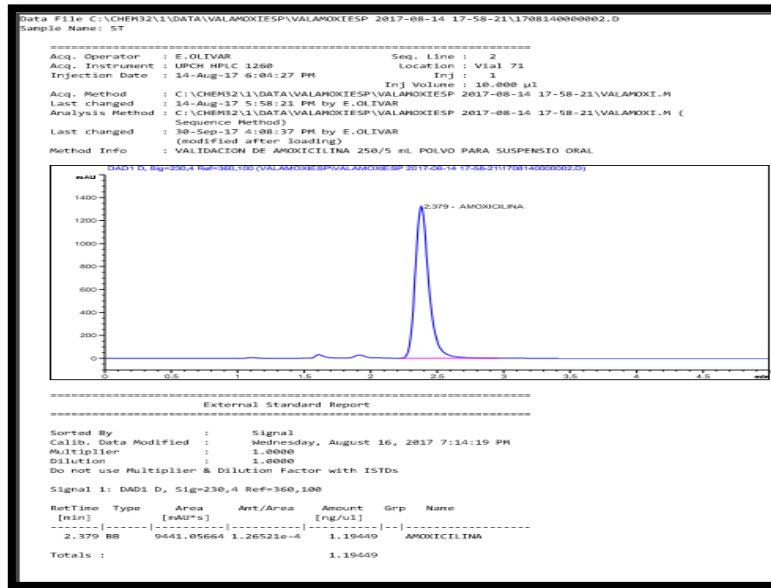


Figura 14: Cromatograma del estándar amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

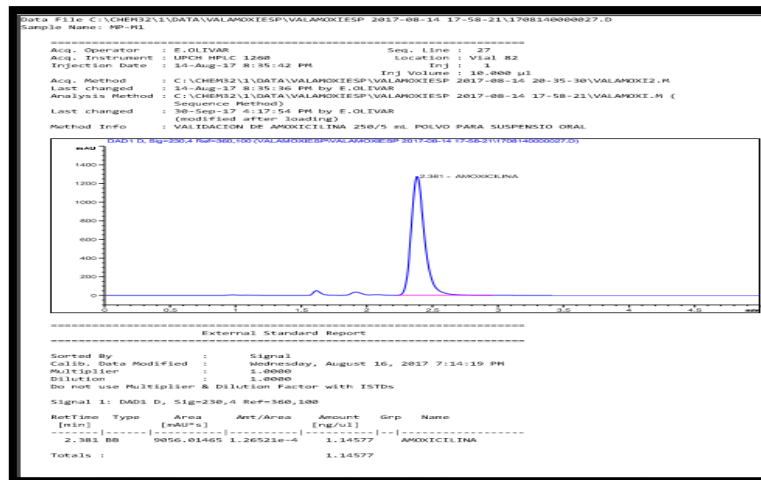


Figura 15: Cromatograma de muestra amoxicilina trihidrato 250mg/5mL a condiciones normales

Fuente: cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 5: Cromatograma del estándar

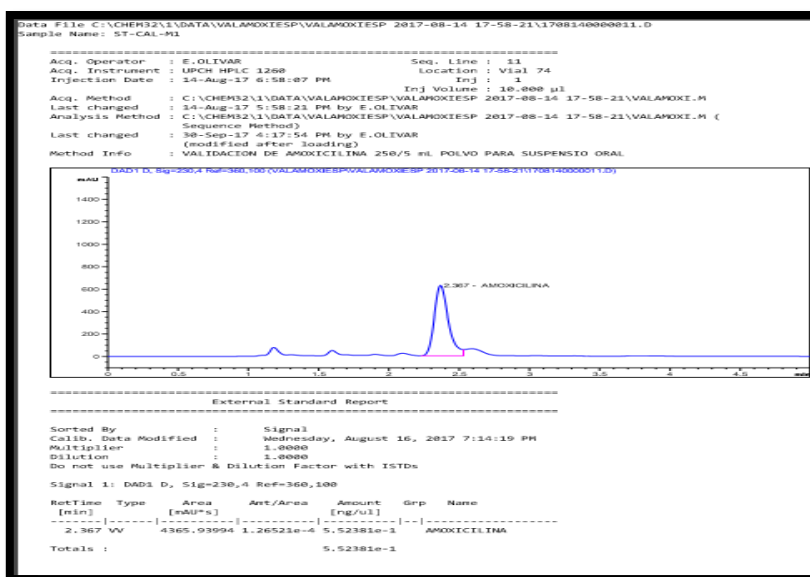


Figura 16: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a degradaciones de calor

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

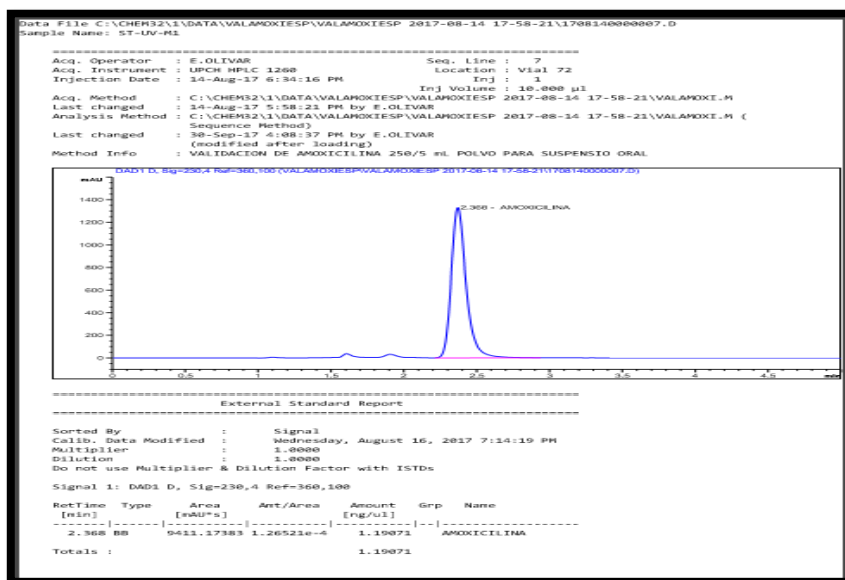


Figura 17: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a luz UV

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

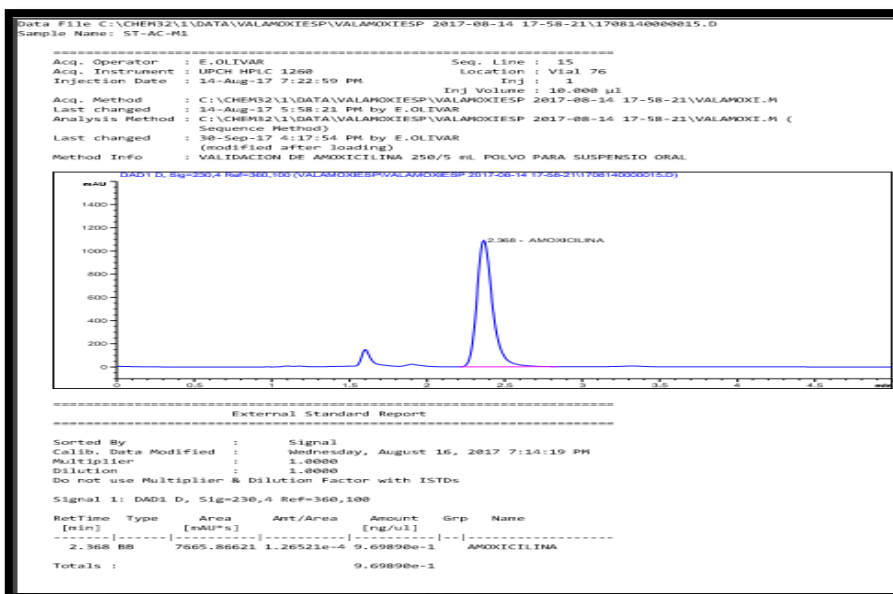


Figura 18: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis ácida

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

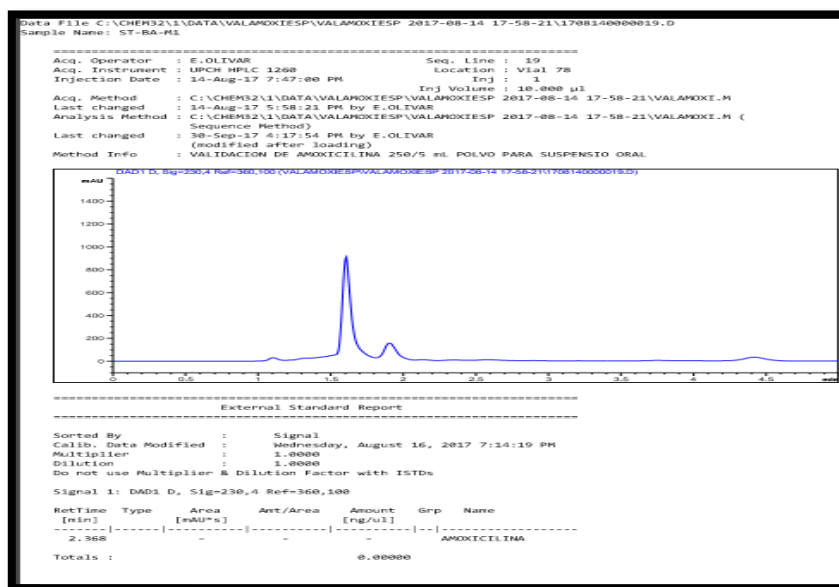


Figura 19: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a hidrólisis básica

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

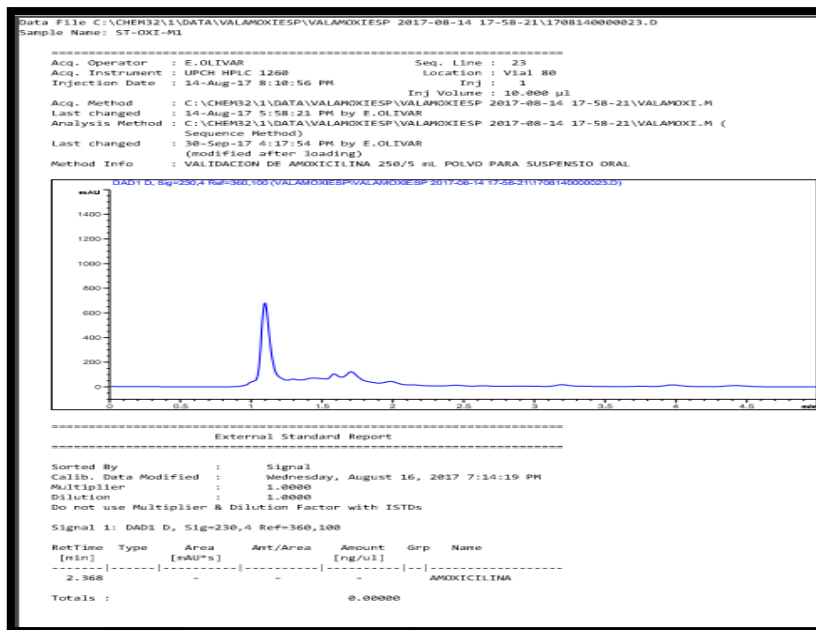


Figura 20: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a oxidación con peróxido

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 6: Cromatograma de la muestra

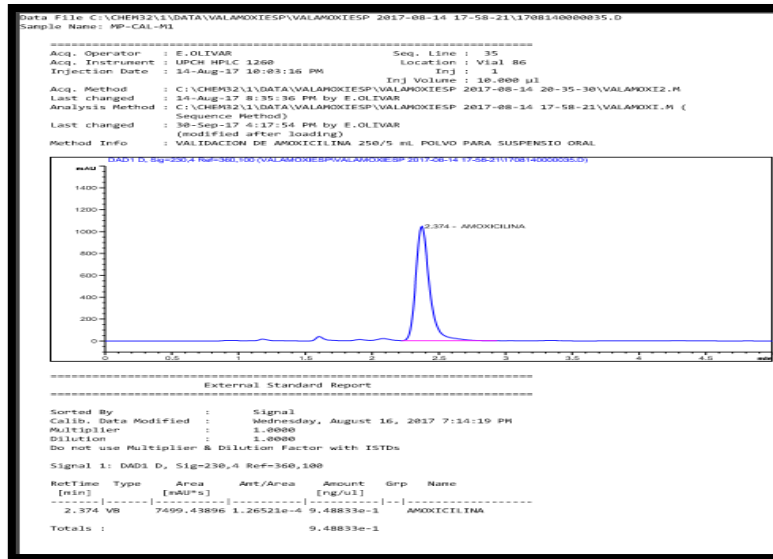


Figura 21: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a degradaciones de calor

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

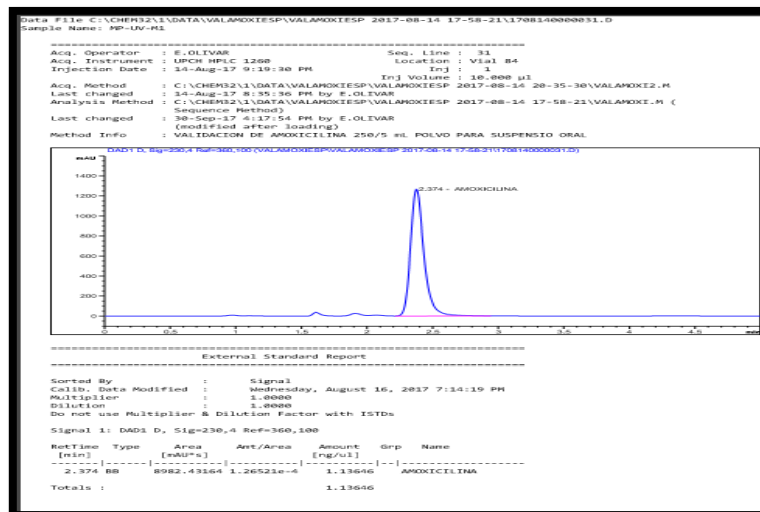


Figura 22: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a luz UV

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

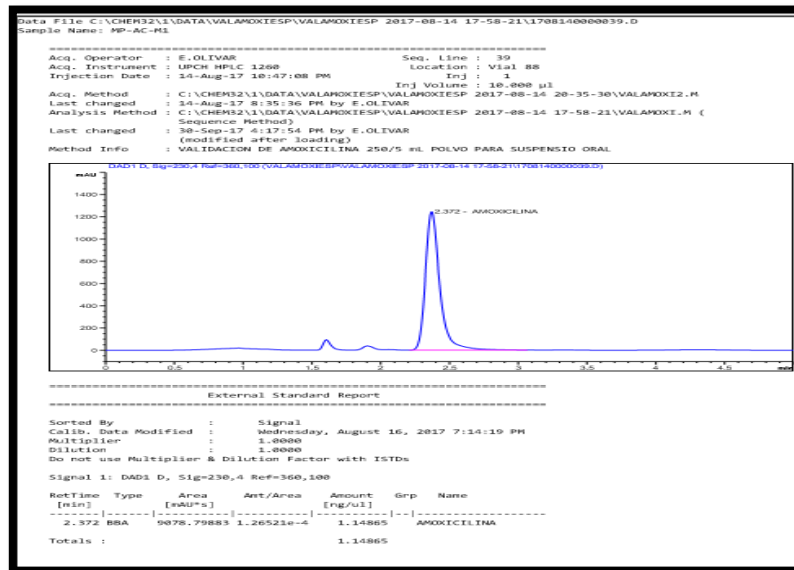


Figura 23: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a Hidrólisis ácida

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

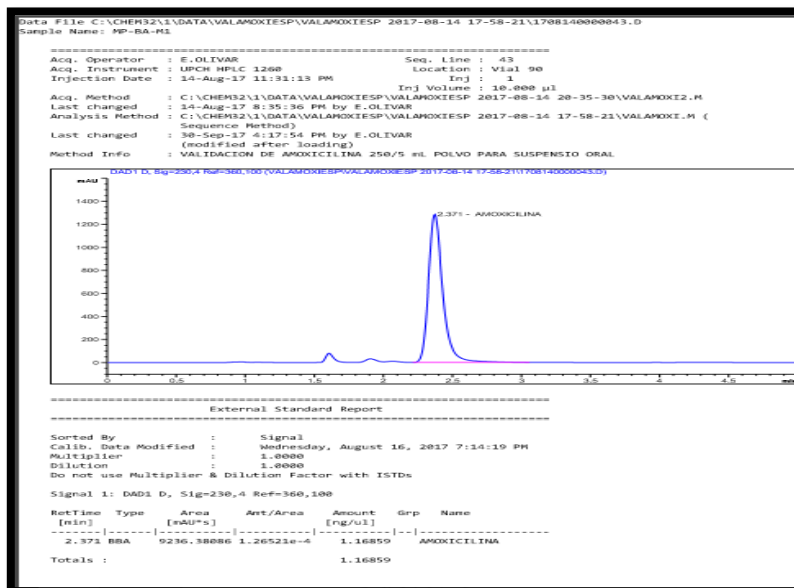


Figura 24: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a Hidrólisis básica

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

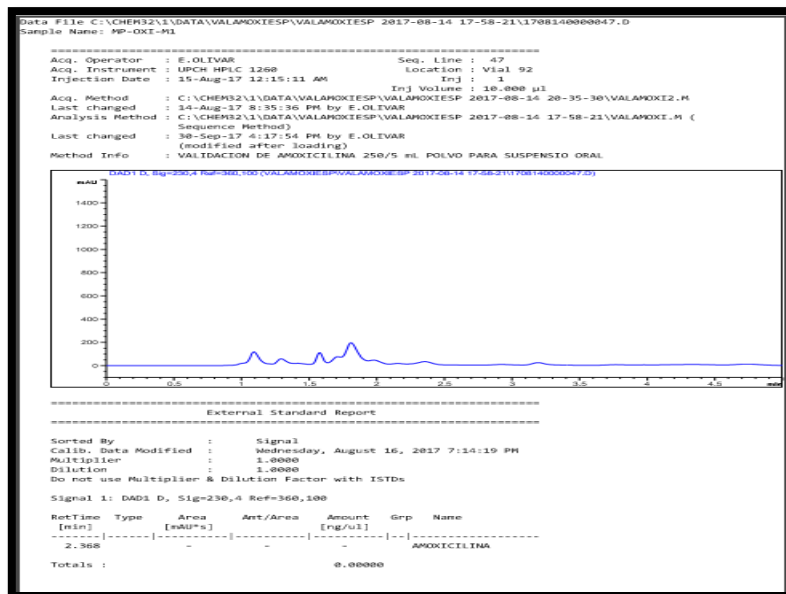


Figura 25: Cromatograma de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL expuesto a oxidación con peróxido

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 7: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los residuales de la linealidad del sistema y planteamiento de hipótesis

LINEALIDAD DEL SISTEMA					
Conc.	Dato (n)	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
50%	1	0.0557	4964.07129	89 121.567145	82 736.97032
	2	0.0557	4976.36865	89 342.345661	
	3	0.0557	4995.84521	89 692.014602	
75%	1	0.0827	7420.88265	89 732.559210	54075.51639
	2	0.0827	7391.68359	89 379.487223	
	3	0.0827	7384.60189	89 293.855945	
100%	1	0.1102	9 863.51367	89 505.568693	935 060.88966
	2	0.1102	9 665.99544	87 713.207290	
	3	0.1102	9 834.08105	89 238.485057	
125%	1	0.1367	12 207.43333	89 300.902219	113 322.60408
	2	0.1367	12 116.53333	88 635.942453	
	3	0.1367	12 174.46667	89 059.741526	
150%	1	0.1641	14 507.30000	88 405.240707	241 031.44550
	2	0.1641	14 443.00000	88 013.406459	
	3	0.1641	14 603.10000	88 989.031079	
SUMA	15				1426 227.42596

Análisis de los residuales		
Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	4999.247	-35.17570967
2	4999.247	-22.87834633
3	4999.247	-3.401786335
4	7376.661345	44.22130187
5	7376.661345	15.02224854
6	7376.661345	7.940541872
7	9798.101881	65.4117885
8	9798.101881	-132.1064382
9	9798.101881	35.97917184
10	12131.49004	75.94329829
11	12131.49004	-14.95670171
12	12131.49004	42.97663162
13	14544.12533	-36.82533344
14	14544.12533	-101.1253334
15	14544.12533	58.97466656

Planteamiento de la hipótesis

H₀ : Los residuos de la linealidad si presentan distribución normal

H₁: Los residuos de la linealidad no presentan distribución normal

Criterio de aceptación:

Si P_{Value} > 0.05, se rechaza la H₁

Demostrando que los residuos de linealidad presentan distribución normal

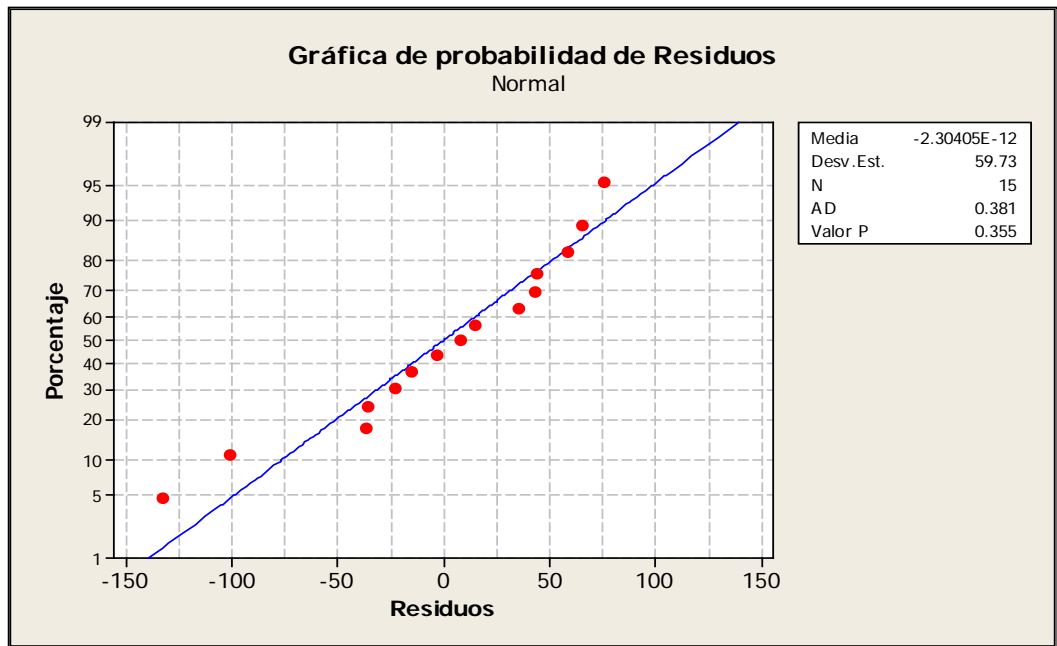


Figura 26: Gráfica de probabilidad de residuos normal

Resultado:

Como $P_{\text{value}} > 0.05$, se acepta la H_0 ,
 Los resultados presentan distribución normal

Anexo 8: Homogeneidad de varianzas y análisis de varianza (ANOVA)

Análisis de la varianza: ANOVA

a) Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

H₀: Las varianzas son semejantes

H₁: Las varianzas son diferentes

Criterio de aceptación:

Si $C_{exp} < C_{tablas}$ para una probabilidad del 95%, se acepta la H₀ demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

$$C_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$C_{exp} = 0.66$$

$$C_{tablas} = 0.68$$

Resultado: Como $C_{exp} < C_{tablas}$, se acepta la H₀; las varianzas son homogéneas.

b) ANOVA (análisis de varianza)

Hipótesis:

H₀: $\beta = 0$ El modelo lineal no proporciona un buen ajuste a los datos

H₁: $\beta \neq 0$ El modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si $F_{exp} > F_{tablas}$ para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos .

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{exp}	p-valor	F_{tablas}
Regresión	1	170573555.044	170574284.044	44 402.045	2.34E-24	4.667
Residuos	13	49940.407	3841.570			
Total	14	170623495.451				

Resultado :

Como $F_{exp} > F_{tablas}$, no se acepta la H_0 ; el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos.

Anexo 9: Test de linealidad y test de proporcionalidad de la linealidad del sistema

test de linealidad

Test de Hipótesis para la pendiente b:

H_0 = "b" es estadísticamente igual a cero

H_1 = "b" es estadísticamente diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp} \geq t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p=0.05$) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Pendiente (b)	88052.383	417.868	210.718	2.33542E-24	87149.633	88955.133

$$t_{exp} = \mathbf{210.718}$$

$$t_{tabla} = 2.160$$

Resultado:

$t_{exp} \geq t_{tabla}$ para $p = 0.05$ y (n-2) grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

Test de proporcionalidad

Test de Hipótesis para el Intercepto a :

H_0 = "a" es estadísticamente igual a cero

H_1 = "a" es estadísticamente diferente de cero

criterio de aceptación:

Si $t_{exp} < t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p=0.05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se acepta la Hipótesis nula (H_0), entonces "a" es estadísticamente igual a cero.
El intervalo de confianza incluye el cero.

	Coeficiente	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (a)	94.72926	48.62435	1.94819	0.07331	-10.31727	199.77579

$$t_{exp} = 1.948$$

$$t_{tabla} = 2.160$$

Resultado:

$t_{exp} < t_{tabla}$ para $p=0.05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0),
Concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.

Este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

Anexo 10: Cromatogramas de linealidad del sistema

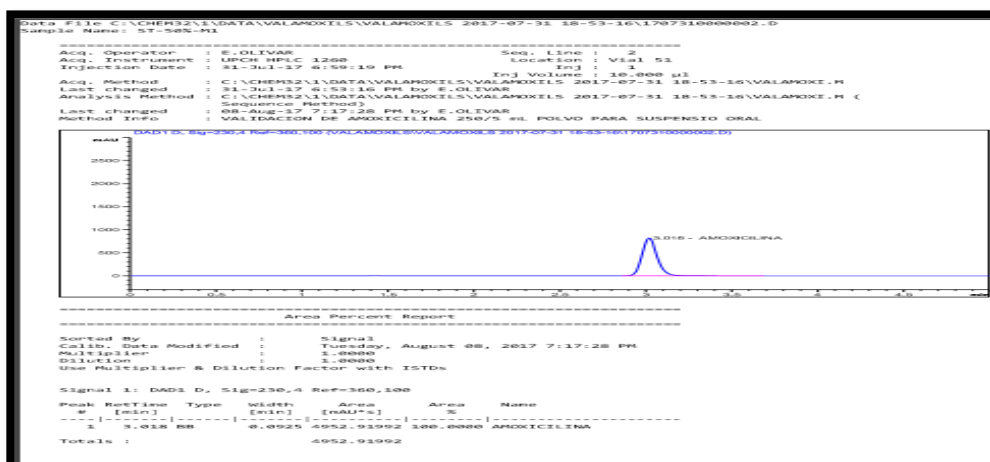


Figura 27: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de ER al 50 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

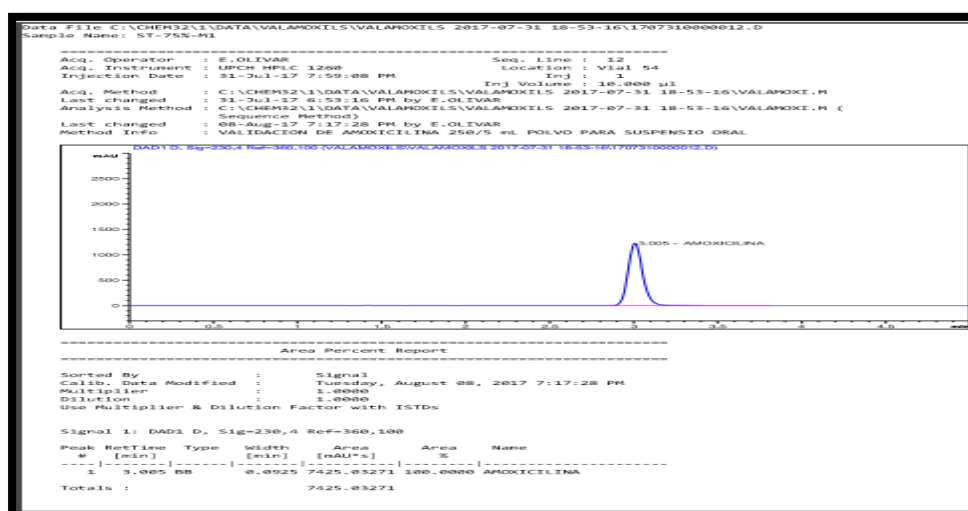


Figura 28: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de ER al 75 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

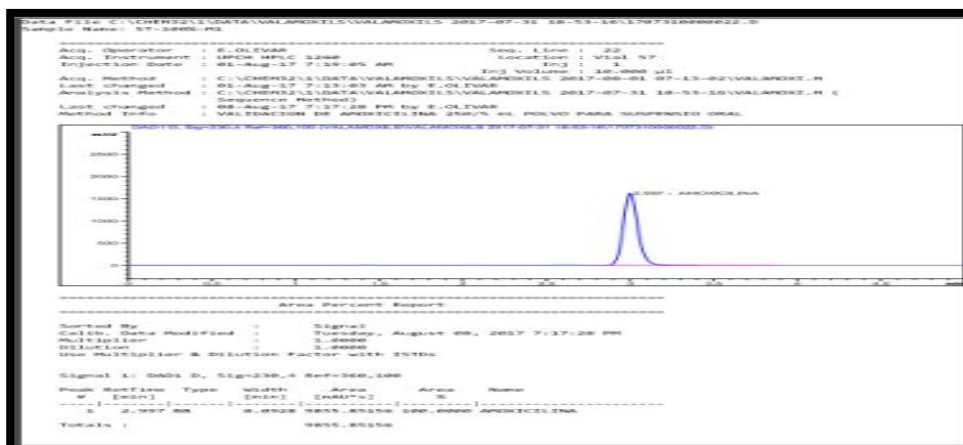


Figura 29: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de ER al 100 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

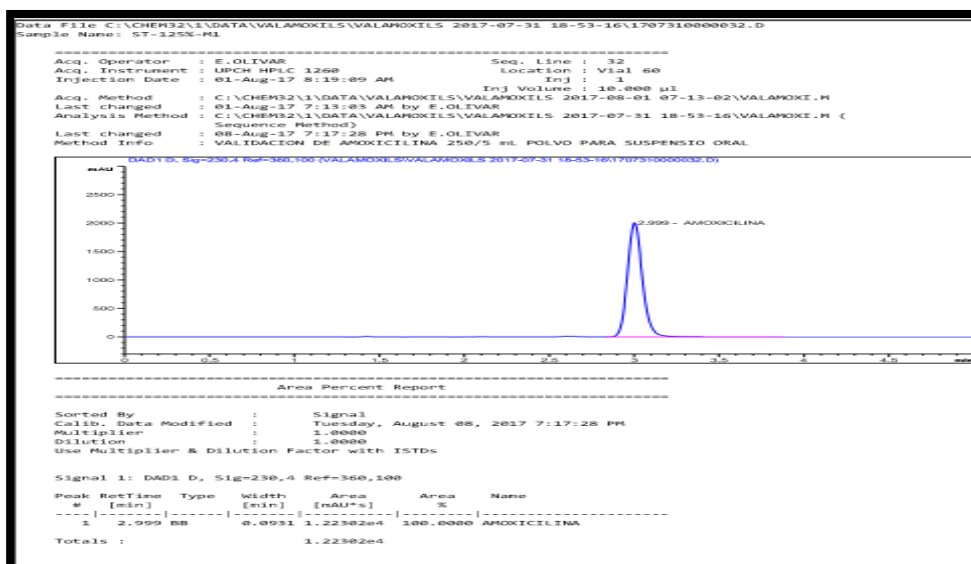


Figura 30: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de ER al 125 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

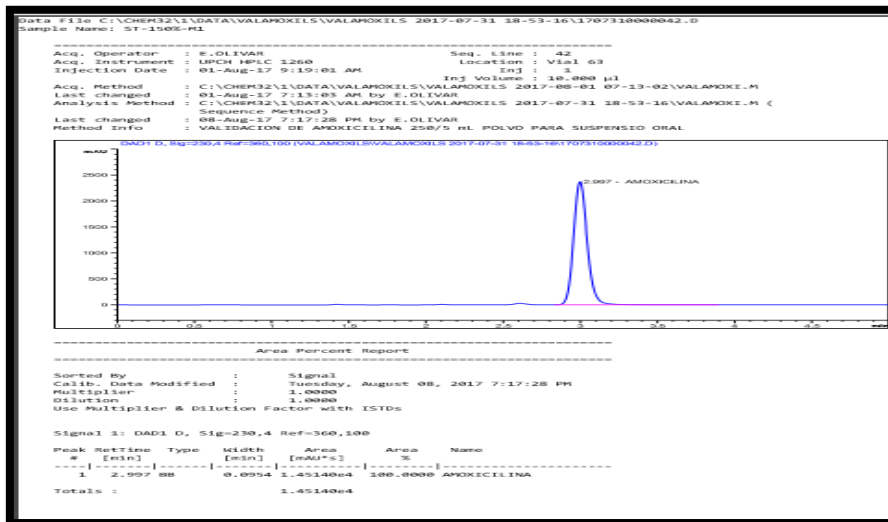


Figura 31: Cromatograma de linealidad del sistema a concentración de ER al 150 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 11: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los residuales de la linealidad del método y planteamiento de hipótesis

Linealidad del Método					
Conc.	Dato (n)	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
10%	1	0.0112	1029.15552	91 888.88571	4008666.19418
	2	0.0112	986.47351	88 077.99196	
	3	0.0112	995.88867	88 918.63125	
25%	1	0.0280	2507.56104	89 555.75143	161855.81954
	2	0.0280	2525.54077	90 197.88464	
	3	0.0280	2528.30811	90 296.71821	
50%	1	0.0559	4 939.62500	88 365.38462	121727.51318
	2	0.0559	4 977.31982	89 039.71055	
	3	0.0559	4 967.15869	88 857.93721	
SUMA	9				4292 249.52690

$$b = 88\,429.2144$$

$$a = 25.3529$$

Ecuación obtenida: $y = 88\,429.2144 x + 25.3529$

Análisis de los residuales		
Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	1015.760118	13.39540165
2	1015.760118	-29.28660835
3	1015.760118	-19.87144835
4	2501.370921	6.190118998
5	2501.370921	24.169849
6	2501.370921	26.937189
7	4968.546004	-28.92100399
8	4968.546004	8.773816014
9	4968.546004	-1.387313986

Planteamiento de la hipótesis

H₀ : Los residuos de la linealidad si presentan distribución normal

H₁: Los residuos de la linealidad no presentan distribución normal

Criterio de aceptación:

Si P_{Value} > 0.05, se rechaza la H₁

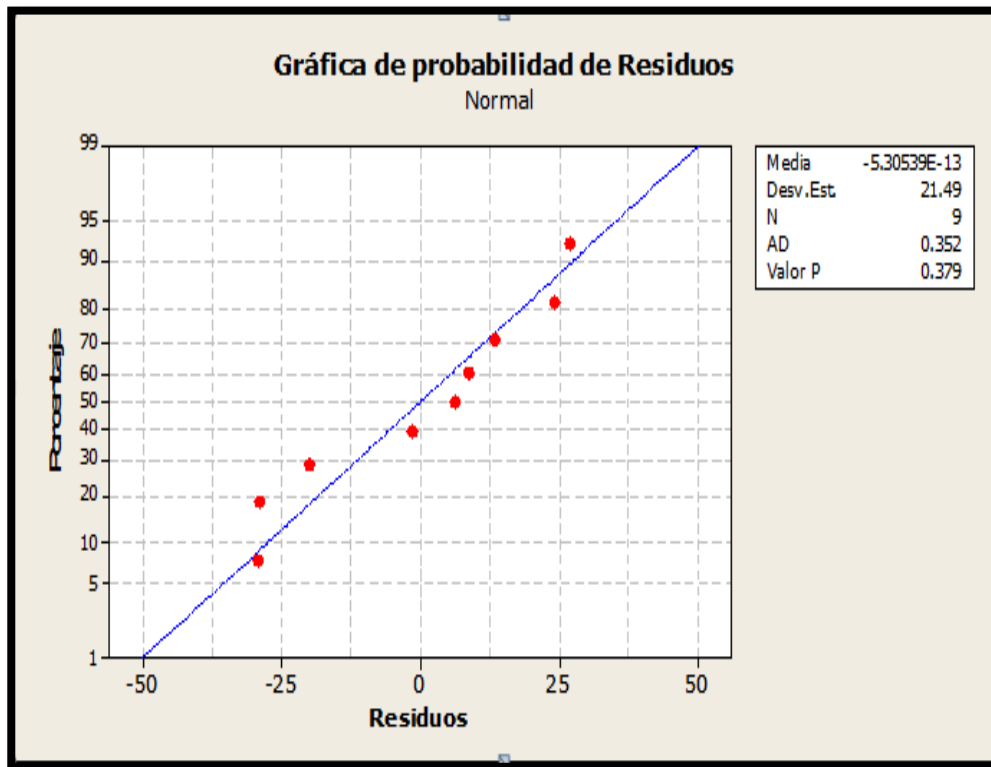


Figura 32: Gráfica de prueba de Probabilidad de residuos normal

Resultado:

Como $P_{\text{value}} > 0.05$, se acepta la H_0 ,
 los resultados presentan distribución normal

Anexo 12: Análisis de varianza (ANOVA)

ANOVA

* Planteamiento de la Hipótesis

$H_0: \beta = 0$ El modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1: \beta \neq 0$ El modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de Aceptación:

Si $F_{exp} > F_{tablas}$ para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{exp}	p-valor	F_{tablas}
Regresión	1	23918508,60478320	23918508,60478320	45 306,862	1,33E-14	5,591
Residuos	7	3695,45695719	527,92242245			
Total	8	23922204,06174040				

Resultado :

Como $F_{exp} > F_{tablas}$, no se acepta la H_0 ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Anexo 13: Test de linealidad y test de proporcionalidad de la linealidad del método

Test de Linealidad

Test de Hipótesis para la Pendiente b:

H_0 = "b" es estadísticamente igual a cero
 H_1 = "b" es estadísticamente diferente de cero.

Criterio de aceptación:
 Si $t_{exp} > t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p=0.05$) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.
 El intervalo de confianza no incluye el cero.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Pendiente (b)	88429,21444	415,4452261	212,854	1,33E-14	87446,842587	89411,586301

$t_{exp} = 212,854$
 $t_{tabla} = 2,365$

Resultado:
 $t_{exp} > t_{tabla}$ para $p = 0.05$ y (n-2) grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero

Test de Proporcionalidad

Test de Hipótesis para el Intercepto a :

H_0 = "a" es estadísticamente igual a cero
 H_1 = "a" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación:
 Si $t_{exp} < t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p=0.05$) y (n-2) grados de libertad, se acepta la Hipótesis nula (H_0), entonces "a" es estadísticamente igual a cero.
 El intervalo de confianza incluye el cero.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción (a)	25,3529166	15,2347225	1,664	1,40E-01	-10,671478	61,377311

$t_{exp} = 1,664$
 $t_{tabla} = 2,365$

Resultado:
 $t_{exp} < t_{tabla}$ para $p = 0.05$ y (n-2) grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.
 Este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

Anexo 14: Test de Cochran – Atipicidad de los resultados de exactitud

Áreas de Estándares para la Fortificación en muestra

Área de Amoxicilina al 10%		
	Area St 10%	mg/mL
M1	1029.15552	0.01171
M2	986.47351	0.01122
M3	995.88867	0.01133
Promedio		0.01142
Promedio ppm		11.42063
S		0.00026

Área de Amoxicilina al 25%		
	Area St 25%	mg/mL
M1	2507.56104	0.02853
M2	2525.54077	0.02873
M3	2528.30811	0.02876
Promedio		0.02868
Promedio ppm		28.67527
S		0.000128

Área de Amoxicilina al 50%		
	Area St 50%	mg/mL
M1	4939.62500	0.05620
M2	4977.31982	0.05663
M3	4967.15869	0.05651
Promedio		0.05645
Promedio ppm		56.44525
S		0.000222

Área de Amoxicilina al MP		
	Area MP	mg/mL
M1	9889.33301	0.11168
M2	9908.82129	0.11190
M3	9927.75977	0.11211
Promedio		0.11190
Promedio ppm		111.89712
S		0.000217

Resultado de Recuperación al 10%	Resultado de Recuperación al 25%	Resultado de Recuperación al 50%
103.14	98.68	98.27
101.19	99.35	99.06
100.18	99.62	99.02
100.78	99.04	98.92
101.36	99.56	97.80
100.35	99.16	97.79

Varianza	1.143499489	0.124792304	0.36188807
Varianza Max.	1.143499489		
Suma de Varianzas	1.630179864		
C exp	0.701		
C tabla 1%	0.793		
C tabla 5%	0.707		

* Planteamiento de la Hipótesis para Cochran

H_0 : Los Tratamientos son igualmente efectivos

H_1 : Existe una diferencia en la eficacia entre los tratamientos

Criterio de aceptación:

Si $C_{exp} < C_{critico}$ al 5%, se rechaza la H_0 , demostrando que los tratamientos son igualmente efectivos.

Resultado:

Como C_{exp} es $< C_{critico}$, se acepta la hipótesis H_0 demostrando que los tratamientos son igualmente efectivos entre los analistas

Anexo 15: Prueba de normalidad (Anderson Darling) para el porcentaje de recuperación

Se procede a hacer la prueba de normalidad a los resultados de las recuperaciones.

Si, la prueba es normal (P value > 0.05), se hace el Test (T de 1 muestra)

Si, la prueba es no normal (P value < 0.05), se hace el Test (Wilcoxon de 1 muestra)

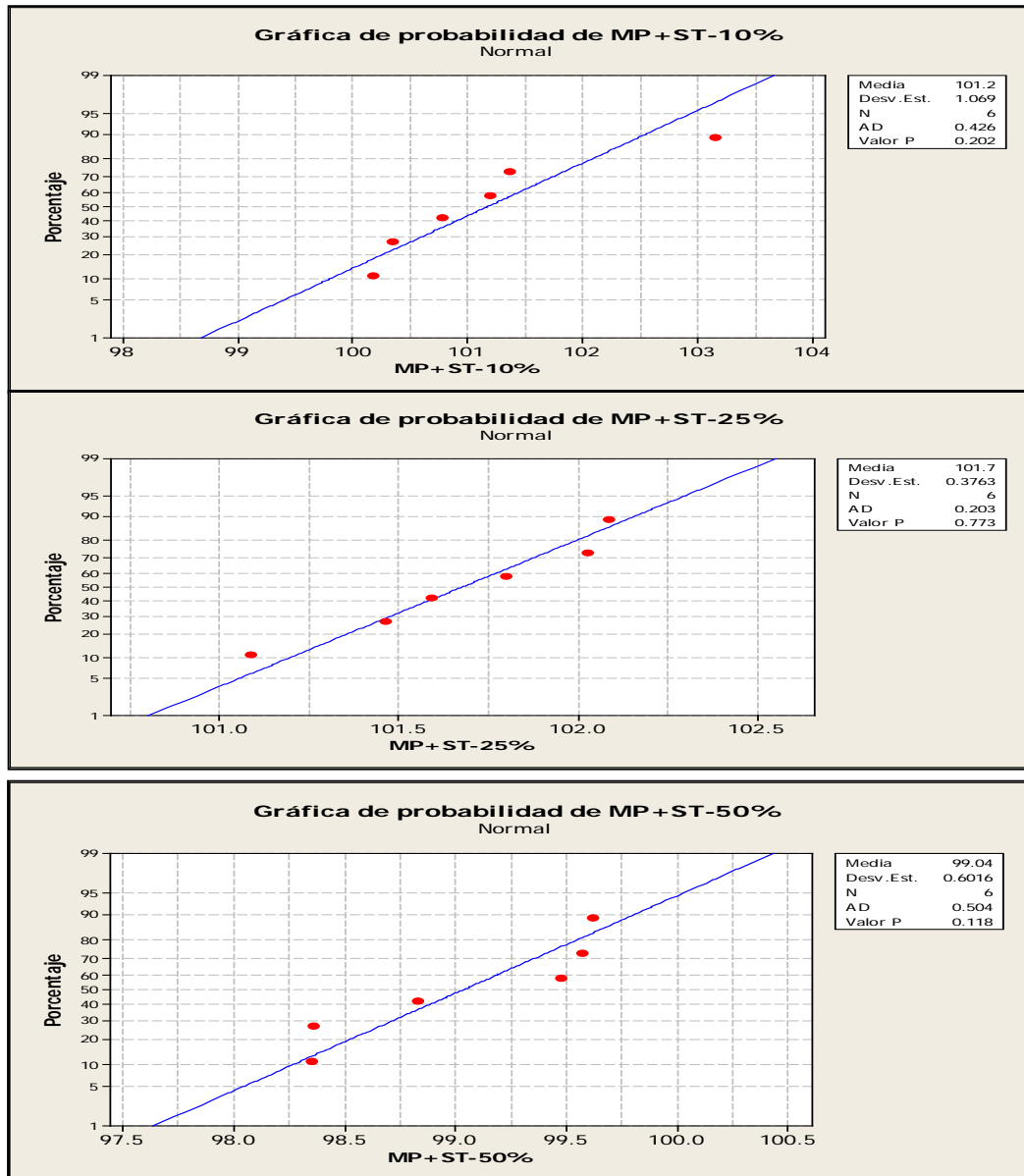


Figura 33: Gráfico de probabilidad normal de muestra problema más estándar al 10 %, 25% y 50 %

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Resultado: Los datos son normales, P value > 0.05, se hace el test de T de 1 muestra

Anexo 16: Prueba de T – 1 Muestra para el rango de 97.0% a 103.0%

Tabla de recuperaciones esperadas

Table 5: Illustration of method criteria for levels of interest at increasing orders of magnitude:

concentration unit	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	1 g/kg	10 g/kg
Concentration ratio	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²
Recovery (%) *	40 - 120	60 - 115	80 - 110	80-110	80 - 110	90 - 107	95 - 105	97 - 103

* Other guidelines are available for expected recovery ranges in specific areas of analysis. In cases where recoveries have been shown to be a function of the matrix other specified requirements may be applied.

NordVal Protocol No. 2, Approved 26 May 2010 - Guide in Validation of Alternative Proprietary Chemical Methods

La recuperación al 10% de fortificación tiene que estar en un rango de 97% a 103%

según la tabla correspondiente:

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 97%

H₀ : Los resultados obtenidos son iguales al 97% de recuperación

H₁: Los resultados obtenidos son mayores al 97% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H₁, demostrando que los resultados son mayores que el 97 % de recuperación

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 103%

H₀ : Los resultados obtenidos son iguales al 103% de recuperación

H₁: Los resultados obtenidos son menores al 103% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H₀, demostrando que los resultados son menores que el 103% de recuperación

T de una muestra: ST-10%							
Prueba de mu = 97 vs. > 97							
Variable	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	95% Limite inferior	T	P
ST-10%	6	101.168	1.069	0.437	100.288	9.55	0.000

T de una muestra: ST-10%							
Prueba de mu = 103 vs. < 103							
Variable	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	Limite superior 95%	T	P
ST-10%	6	101.168	1.069	0.437	102.047	-4.20	0.004

* La recuperación al 25% de Fortificación tiene que estar en un rango de 97% a 103% según la tabla correspondiente:

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 97%

H_0 : Los resultados obtenidos son iguales al 97% de recuperación

H_1 : Los resultados obtenidos son mayores al 97% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H_1 , demostrando que los resultados son mayores que el 97% de recuperación

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 103%

H_0 : Los resultados obtenidos son iguales al 103% de recuperación

H_1 : Los resultados obtenidos son menores al 103% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H_0 , demostrando que los resultados son menores que el 103% de recuperación

T de una muestra: MP+ST-25%							
Prueba de mu = 97 vs. > 97							
Variable	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	95% Limite inferior	T	P
MP+ST-25%	6	101.677	0.376	0.154	101.368	30.45	0.000

T de una muestra: MP+ST-25%							
Prueba de mu = 103 vs. < 103							
Variable	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	Limite superior 95%	T	P
MP+ST-25%	6	101.677	0.376	0.154	101.987	-8.61	0.000

La recuperación al 50% de fortificación tiene que estar en un rango de 97% a 103% según la tabla correspondiente

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 97%

H₀ : Los resultados obtenidos son iguales al 97% de recuperación

H₁: Los resultados obtenidos son mayores al 97% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H₁, demostrando que los resultados son mayores que el 97% de recuperación

* Planteamiento de la hipótesis para el rango de 103%

H₀ : Los resultados obtenidos son iguales al 103% de recuperación

H₁: Los resultados obtenidos son menores al 103% de recuperación

Criterio de aceptación:

Si P value < 0.05, se acepta la H₀, demostrando que los resultados son menores que el 103% de recuperación

```
T de una muestra: MP+ST-50%
Prueba de mu = 97 vs. > 97

Variable      N      Media  Desv.Est.  Error estándar de la media  95% Limite inferior  T      P
MP+ST-50%    6      99.039    0.602      0.246      98.544      8.30    0.000

T de una muestra: MP+ST-50%
Prueba de mu = 103 vs. < 103

Variable      N      Media  Desv.Est.  Error estándar de la media  Limite superior 95%  T      P
MP+ST-50%    6      99.039    0.602      0.246      99.534     -16.13  0.000
```

Resultados:

Todos los resultados son mayores que 97.0 % y menores que 103.0 %, lo cual estaría dentro del rango establecido.

Anexo 17: Cromatogramas de exactitud

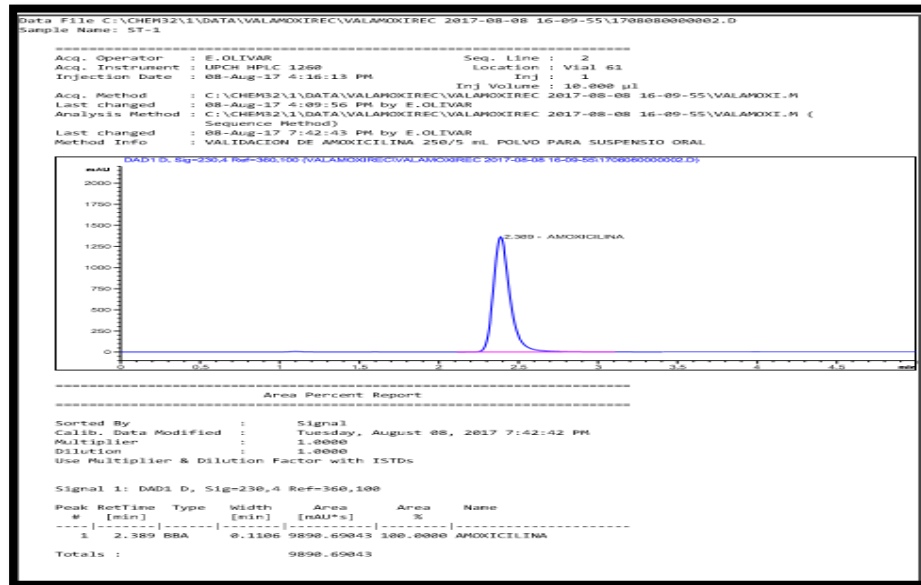


Figura 34: Cromatograma del estándar a 100% en exactitud

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

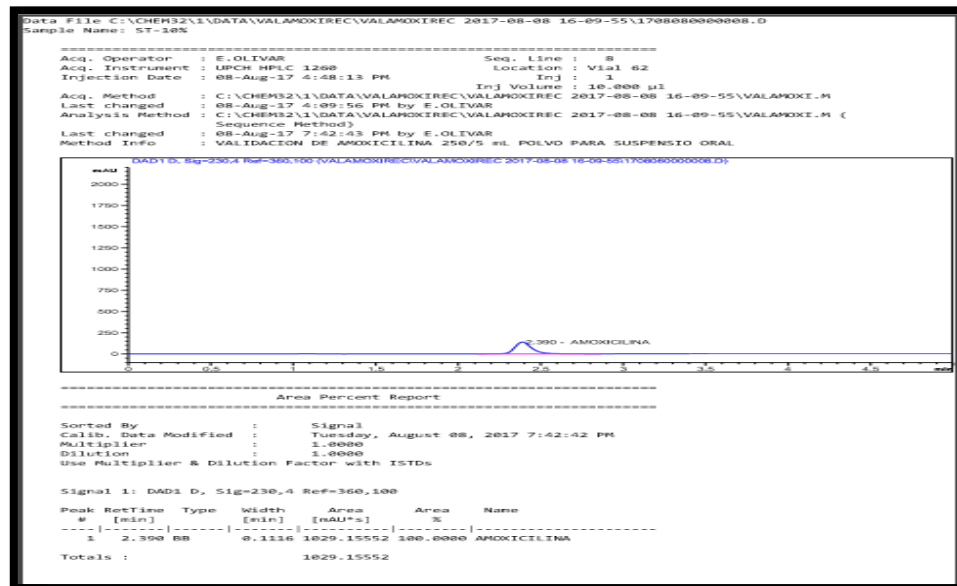


Figura 35: Cromatograma del estándar a 10% en exactitud

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

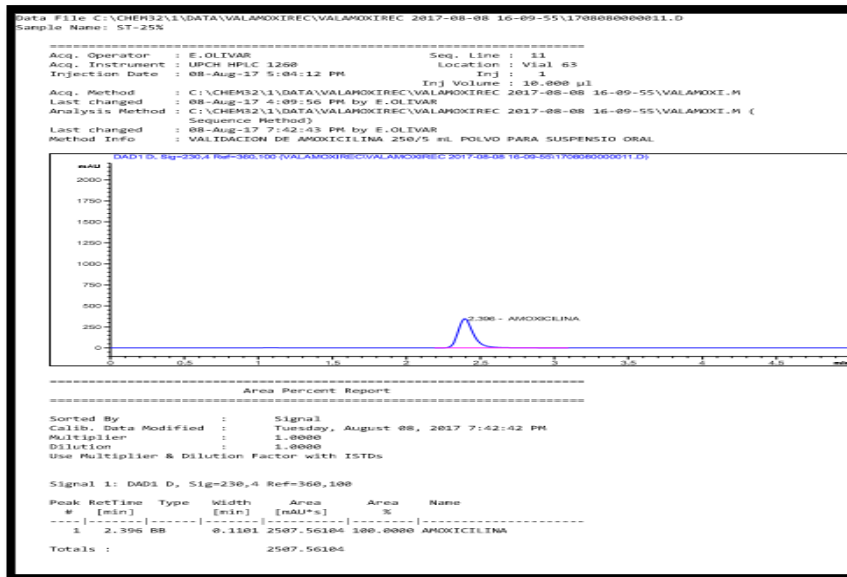


Figura 36: Cromatograma del estándar a 25% en exactitud
Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

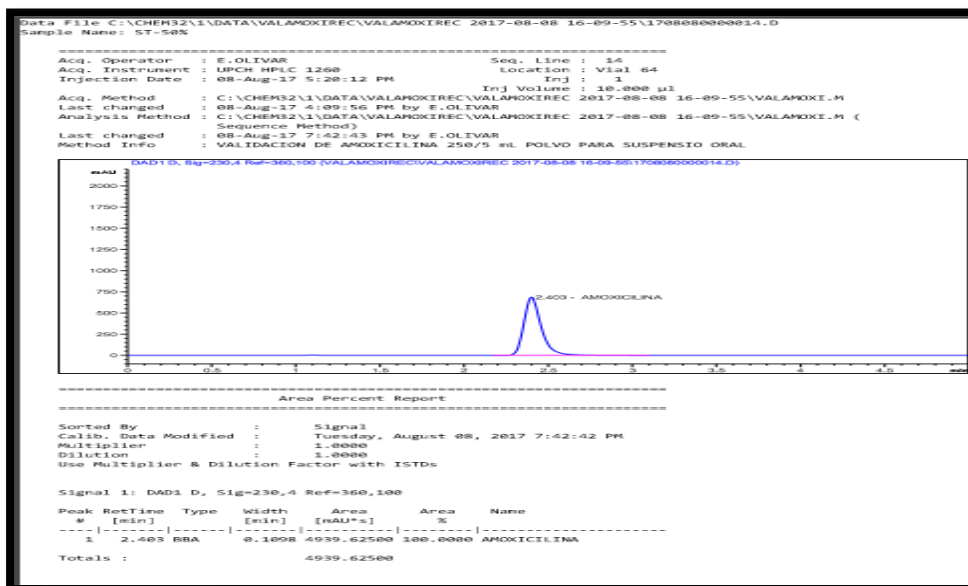


Figura 37: Cromatograma del estándar a 50% en exactitud
Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

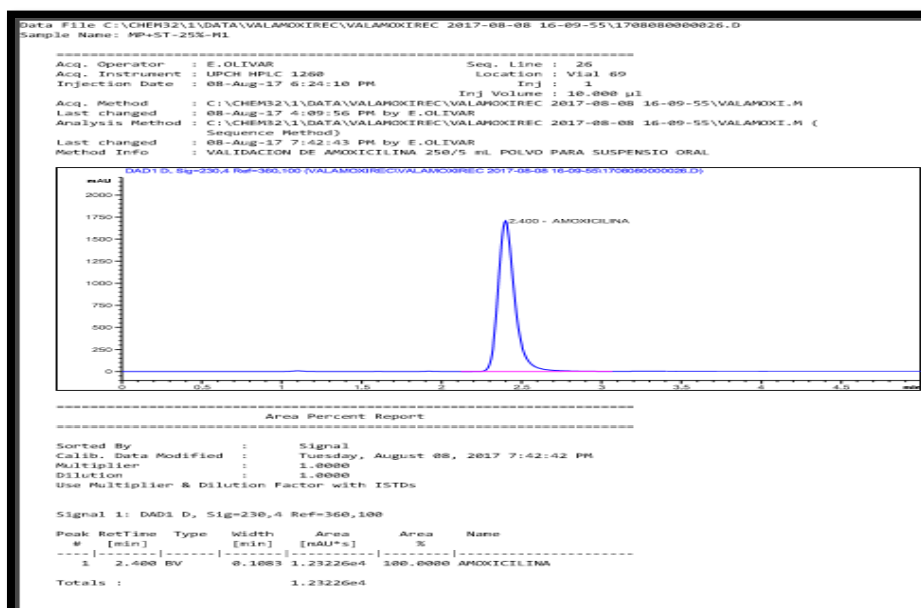


Figura 40: Cromatograma de la muestra más el estándar al 25% en exactitud

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

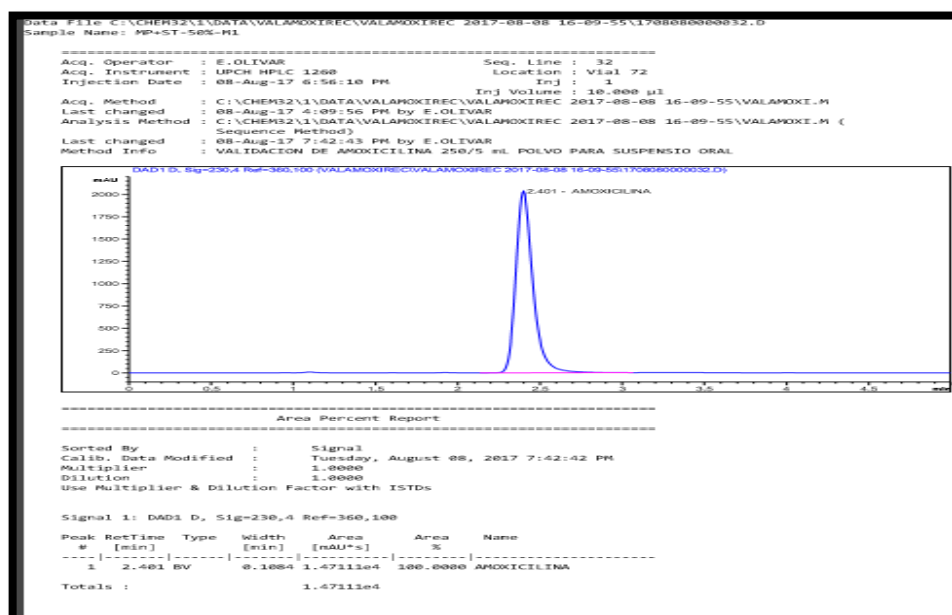


Figura 41: Cromatograma de la muestra más el estándar al 50% en exactitud

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 18: Cálculo del estadístico de Grubbs – Atipicidad en los resultados de repetibilidad

RESULTADOS DE REPETIBILIDAD

Muestra N°	Peso (g)	Areas	Amoxicilina mg/5 mL	%
M1	6.4267	11166.66667	245.96	98.38
M2	6.3315	10973.00000	245.33	98.13
M3	6.3428	11019.06667	245.92	98.37
M4	6.2416	10750.06667	243.80	97.52
M5	6.2087	10725.60000	244.54	97.82
M6	6.3517	11062.80000	246.55	98.62

Planteamiento de la Hipótesis para Grubbs

H_0 : No hay presencia de valores atípicos.

H_1 : Si hay presencia de valores atípicos.

Criterio de aceptación :

Si $G_{exp} \leq G_{5\%}$, no hay presencia de valores atípicos

Si $G_{exp} > G_{1\%}$ y $G_{exp} > G_{5\%}$, el ítem es rezagado

Si $G_{exp} > G_{1\%}$, existe presencia de valores atípicos

Promedio	98.13959
S	0.40697
Maximo	98.61916
Mínimo	97.52174
G Maximo	1.17840
G mínimo	1.51815
G crítico 1%	1.97300
G crítico 5%	1.88700

Conclusión:

No se evidencia valores atípicos puesto que el

$G_{experimental}$ es $<$ al $G_{critico 5\%}$

Anexo 20: Cálculo del estadístico de ANOVA entre los analistas

Resultados de comparación de los dos analistas

Muestra N°	Analista 1	Analista 2
M1	98,38%	98,29%
M2	98,13%	98,22%
M3	98,37%	98,03%
M4	97,52%	98,14%
M5	97,82%	98,58%
M6	98,62%	98,11%

Análisis de varianza de un factor

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.51882E-06	1	2.51882E-06	0.24732397	0.629717876	4.964602744
Dentro de los grupos	0.000101843	10	1.01843E-05			
Total	0.000104362	11				

Media: 98,19%

RSD: 0,314%

Criterio de aceptación: C.V de Precisión Intermedia < 4% AEFI

Planteamiento de la Hipótesis para el ANOVA

H₀ : Todas las medias son iguales (DESVIACIONES SON NULAS)

Anexo 21: Cálculo del estadístico de Grubbs – Atipicidad en los resultados de precisión intermedia

RESULTADOS DE PRECISION INTERMEDIA

Muestra N°	Peso (g)	Areas	Amoxicilina mg/5 mL	%
M1	5.4957	9 636.43782	245.74	98.29
M2	5.3765	9 420.66830	245.56	98.22
M3	5.3660	9 383.38151	245.07	98.03
M4	5.5015	9 631.78125	245.36	98.14
M5	5.3491	9 406.80957	246.46	98.58
M6	5.3327	9 333.46680	245.29	98.11

Planteamiento de la Hipótesis para Grubbs

H_0 : No hay presencia de valores atípicos.

H_1 : Si hay presencia de valores atípicos.

Criterio de aceptación :

Si $G_{exp} < G_{5\%}$, no hay presencia de valores atípicos

Si $G_{exp} < G_{1\%}$ y $G_{exp} > G_{5\%}$, el ítem es rezagado

Si $G_{exp} > G_{1\%}$, existe presencia de valores atípicos

Promedio	98.23122
S	0.19509
Maximo	98.58237
Mínimo	98.02714
G Maximo	1.79993
G mínimo	1.04608
G crítico 1%	1.97300
G crítico 5 %	1.88700

Conclusión:

No se evidencia valores atípicos puesto que el

$G_{experimental}$ es < al $G_{critico 5\%}$

Anexo 22: Prueba de normalidad (Anderson Darling) a los resultados de los dos analistas

Se procede a hacer la prueba de normalidad a los resultados de las recuperaciones.

Si, la prueba es normal (P value > 0.05), se hace el test (T de 1 muestra)

Si, la prueba es no normal (P value < 0.05), se hace el test (Wilcoxon de 1 muestra)

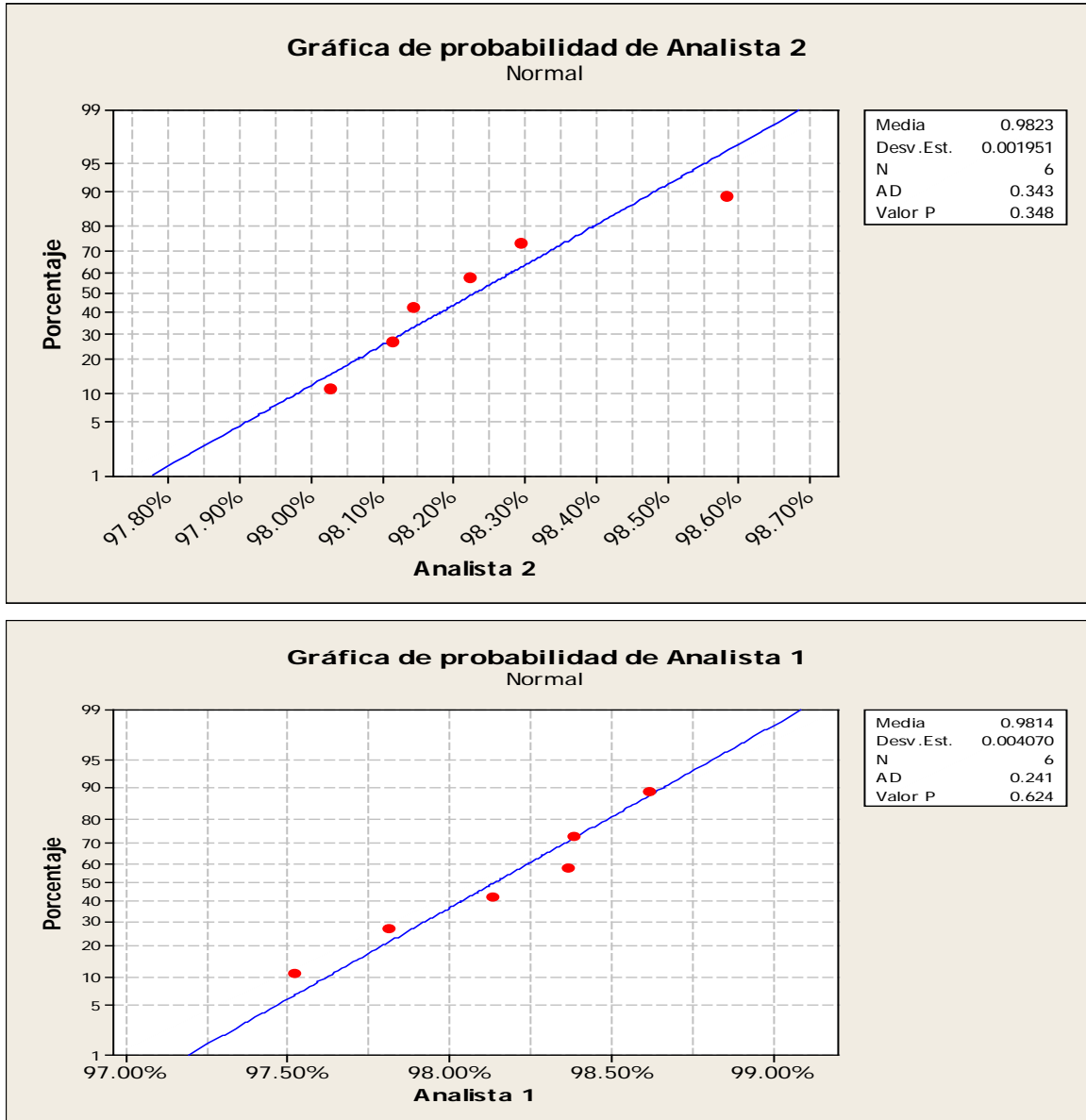


Figura 44: Gráfica de probabilidad normal del analista 1 y analista 2

Resultado: Los datos son Normales, P value > 0.05,

Anexo 23: Prueba de T – 2 Muestras entre los dos analistas

Prueba T e IC de dos muestras: Analista 1, Analista 2

T de dos muestras para Analista 1 vs. Analista 2

	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
Analista 1	6	0.98140	0.00407	0.0017
Analista 2	6	0.98231	0.00195	0.00080

|

Diferencia = mu (Analista 1) - mu (Analista 2)
Estimado de la diferencia: -0.00092
IC de 95% para la diferencia: (-0.00527, 0.00344)
Prueba T de diferencia = 0 (vs. no =): Valor T = -0.50 Valor P = 0.634 GL = 7

Planteamiento de la Hipótesis para prueba T 2 Muestras

H_0 : Las medias son iguales entre los dos analistas

H_1 : Las medias no son iguales entre los analistas

Criterio de aceptación :

Si $P \text{ value} > 0.05$, se rechaza la H_1 , demostrando que las medias de los analistas son iguales.

Resultado:

Como $P \text{ value} > 0.05$, se acepta la hipótesis H_0
Demostrando que las medias son iguales entre los analistas.

Anexo 24: Prueba de F entre los dos analistas

Prueba e IC para dos varianzas: Analista 1, Analista 2						
Método						
Hipótesis nula	Sigma (Analista 1) / Sigma (Analista 2) = 1					
Hipótesis alterna	Sigma (Analista 1) / Sigma (Analista 2) not = 1					
Nivel de significancia	Alfa = 0.05					
Estadísticas						
Variable	N	Desv.Est.	Varianza			
Analista 1	6	0.004	0.000			
Analista 2	6	0.002	0.000			
Relación de desviaciones estándar = 2.086						
Relación de varianzas = 4.352						
Intervalos de confianza de 95%						
Distribución de los datos	IC para relación de Desv.Est.		IC para relación de varianza			
Normal	(0.780, 5.577)		(0.609, 31.098)			
Continuo	(0.609, 26.433)		(0.371, 698.680)			
Pruebas						
Método	GL1	GL2	Estadística de prueba		Valor P	
Prueba F (normal)	5	5	4.35		0.132	
Prueba de Levene (cualquiera continua)	1	10	2.52		0.143	

Planteamiento de la hipótesis para prueba F

H_0 : Las varianzas son iguales entre los dos analistas

H_1 : Las varianzas no son iguales entre los analistas

Criterio de aceptación :

Si $P \text{ value} > 0.05$, se rechaza la H_1 , demostrando que las varianzas de los analistas son iguales.

Resultado:

Como $P \text{ value} > 0.05$, se acepta la hipótesis H_0
 Demostrando que las varianzas son iguales entre los analistas.

Anexo 25: Cromatogramas de precisión intermedia

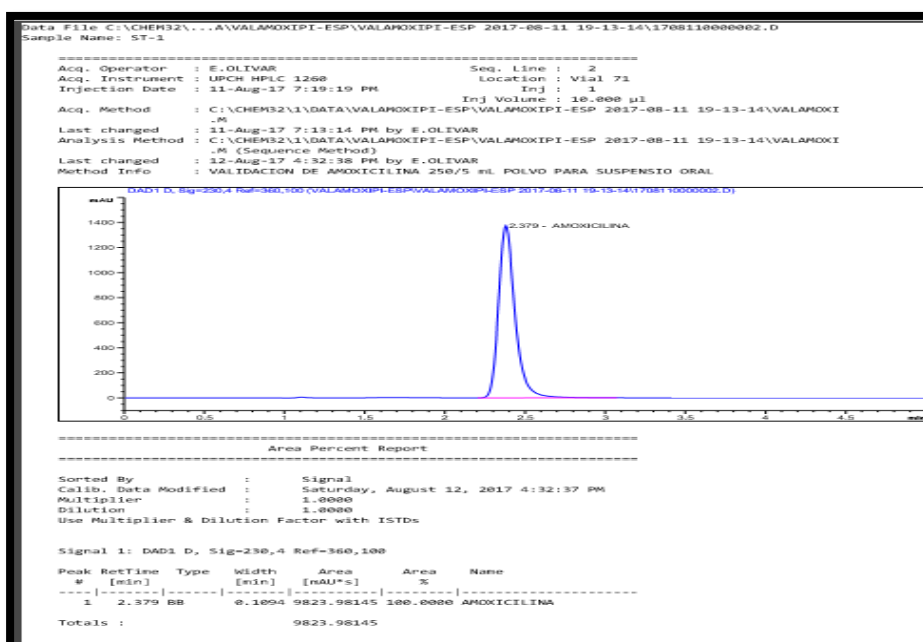


Figura 45: Cromatograma del estándar de precisión intermedia

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

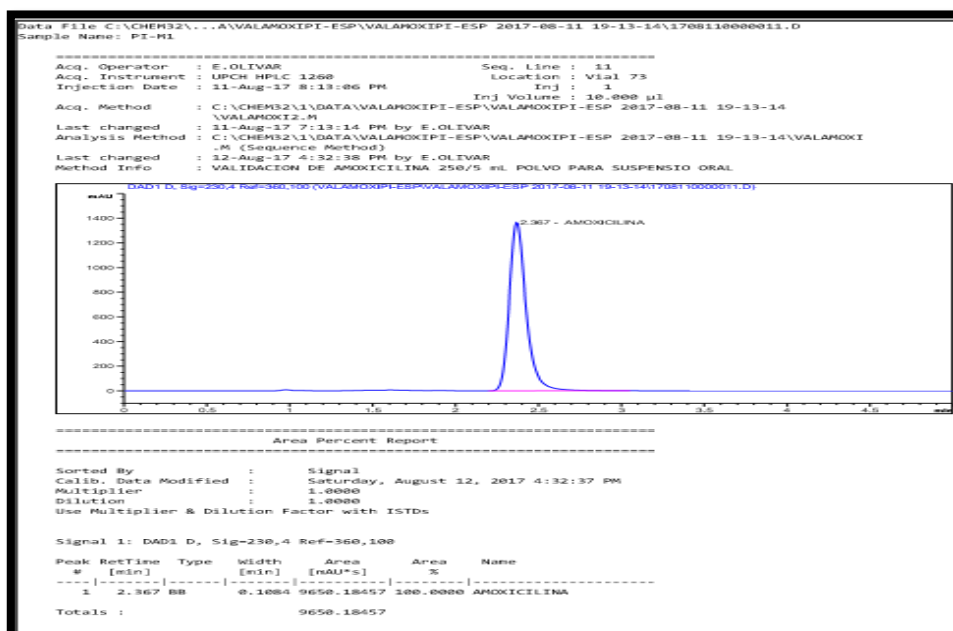


Figura 46: Cromatograma de la muestra de precisión intermedia

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 26: Resultados de las muestras de robustez después de 48 horas

**RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS
DESPUES DE 48 HORAS EN REFRIGERACION**

Muestra N°	Dosaje (%)		Diferencia
	Inicio	Final	
M1	98.38	96.91	1.47%
M2	98.13	97.23	0.90%
M3	98.37	97.37	1.00%
M4	97.52	96.30	1.22%
M5	97.82	97.10	0.71%
M6	98.62	97.35	1.27%
Media	98.14	97.04	1.095%
	y_0	y_1	$ d_1 $
RSD	0.707%		

Anexo 27: Cromatogramas de robustez

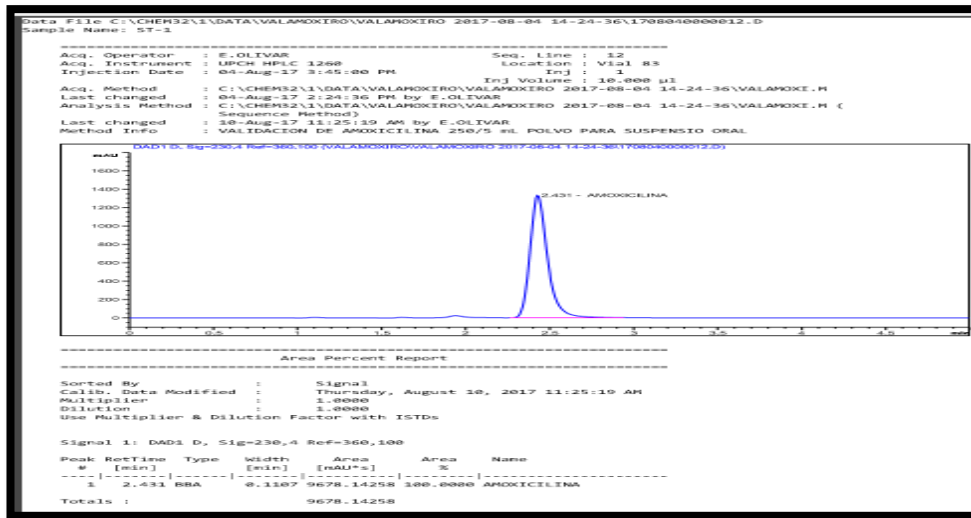


Figura 47: Cromatograma del estándar de robustez

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

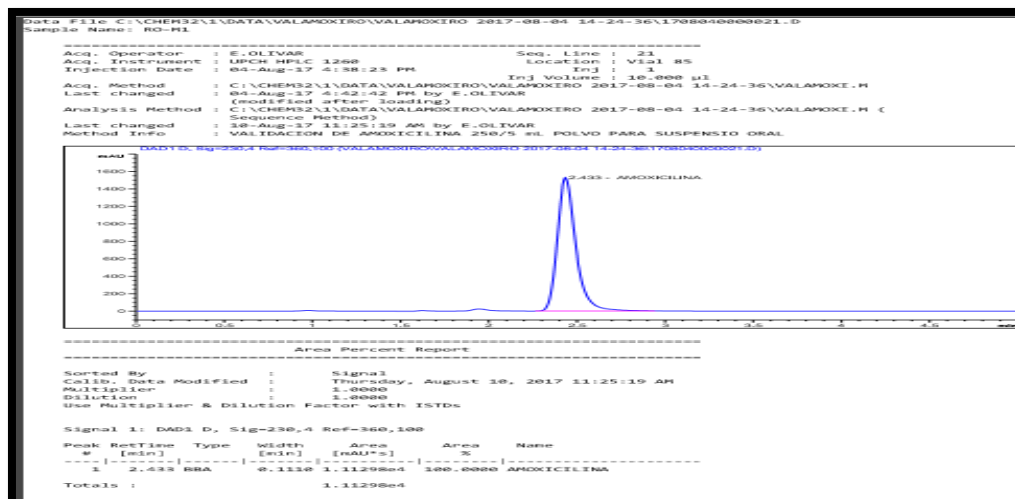


Figura 48: Cromatograma de la muestra de robustez

Fuente: Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo 28: Certificado del equipo Milli-Q

REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO MERCK

Servicio Técnico (region):	Tipo de Intervención:	n.º de la Orden:
Jose Muñoz	Preventive Maintenance	WO-01290118
Fecha de aviso:	Fecha de Intervención:	Técnico de Servicio:
05/07/2017	05/07/2017 11:00 AM	Jose Muñoz
Nº Pedido Cliente: Cobrado	Número Pedido MERCK:	Código FSE:
Responsable de Ventas:	Tag Cliente:	

DIRECCION DE ENVIO	
Calle: Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.	País: Peru
Ciudad: LIMA	Código Postal:
Edo./dpto./reg./prov.: Lima	

DIRECCION DE LA INTERVENCIÓN	
Compañía: UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA	Contacto: Carlita Leisy Casas Ramos
Calle: Av. Honorio Delgado 430 Urbanización Ingeniería	n.º Teléfono: 483-2188
Localización: Universidad Peruana Cayetano	Email: control.calidad@oficinas-upch.pe
Ciudad: Lima	Usuario: Carlita Casas Ramos
Edo./dpto./reg./prov./Lima Zip:	n.º Teléfono Usuario: 483-2188
Edificio:	Planta:
Puerta:	

Informaciones del Sistema		
Número de catálogo	Número de Serie	Descripción
ZRXQ005T0	F4JAS8464B	Milli-Q® Integral 5

REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO MERCK

Listado de Trabajo				
Número Catálogo	Descripción	Cant.	Precio unit	SubTotal
ZFA10UVM1	A10 UV LAMP	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
TANKMPK01	PE TANK MILLIPAK FILTER	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
MPG094001	Millipak® Express 40 Filter (1/box)	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
PRPK00001US	PREPAK 1 PRETREATMENT PACK 2/BOX W/O	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
QTUM07EX1	QUANTUM TEX CARTRIDGE (1/9K)	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
				Cant Total: PEN 0.00

Trabajo a realizar
Mantenimiento Preventivo Milli q

Trabajo Realizado
Se realizó el mantenimiento preventivo al purificador de agua, efectuando las acciones descritas en el formato de mantenimiento preventivo adjunto. Conforme.
Se realizó el cambio de consumibles indicados en el cuadro superior. Conforme
Luego se realiza pruebas finales de funcionamiento.
Equipo queda operativo. Cumple especificaciones técnicas.
Adquirir:
-(01) Cartucho progard T2 PROG0T0S2US
-(01) Lámpara de 185 nm ZMQUVLP01
-(01) Lámpara de 254 nm ZLXUVLP01
Ambas lámparas solicitarán cambio en 151 días.
Se recomienda tener los consumibles cambiados en stock.

Cliente: _____ **Date:** 05/07/2017 07:10 PM

Form. T-07-01 Orden de Servicio, 05/11/2016

Anexo 29: Certificado de calibración de la balanza analítica

DIVISIÓN DE METROLOGÍA			
 Kossodo el mejor EQUIPO para su laboratorio	LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LC - 006	 INACAL DA - Perú Organismo de Acreditación	
<h1 style="font-style: italic;">Certificado de Calibración</h1> <h2 style="font-style: italic;">Calibration Certificate</h2>			
N° BD17-C-0290			
Cliente: <small>Customer</small> Dirección: <small>Address</small> Objeto calibrado: <small>Calibrated object</small> Marca: <small>Brand</small> Modelo: <small>Model</small> Número de Serie: <small>Serial Number</small> Identificación: <small>Identification</small> Lugar de Calibración: <small>Place of Calibration</small> Orden de Trabajo: <small>Service Work</small> Fecha de Calibración: <small>Date of Calibration</small> Fecha de Emisión: <small>Date of Issue</small>	UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA Honorio Delgado 430 Uro, Ingeniería (Lima/Lima/San Martín de Porres) Balanza Electrónica METTLER TOLEDO XS 105 Dual Range 1128022236 EQ-FQ-05 (*) Ambiente de Balanzas y Estándares OT-01700386 2017-06-11 2017-06-15	Este Certificado de Calibración documenta la trazabilidad a los patrones Nacionales o Internacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). KOSSODO S.A.C. - División de Metrología mantiene y calibra sus patrones de referencia para garantizar la cadena de trazabilidad de las mediciones que realiza, así mismo realiza certificaciones metrológicas a solicitud de los interesados y brinda asistencia técnica en temas relacionados al campo de la metrología en la industria peruana. Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario debería recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.	
<p style="font-size: small;">This Calibration Certificate documents the traceability to national or international standards, which include the units of measurement according to the International System of Units (SI). KOSSODO S.A.C. - Metrology Division supports and calibrates its standards of reference to guarantee the chain of traceability of the measurements realized, as well as the metrological certifications made at the request of the interested parties and offers technical assistance in topics related to the metrology field in the Peruvian industry. In order to assure the quality of measurements the user should recalibrate his instruments at appropriate intervals.</p>			
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DEL OBJETO CALIBRADO <small>Technical characteristics of the object calibrated</small>			
Capacidad Máxima (Max): <small>Maximum Capacity</small> División de escala real (d): <small>Divisor from real scale</small>	41 g / 120 g 0,0001 g / 0,0001 g	Cap. Mínima (Min): <small>Minimum Load</small> División de verificación de escala (e): <small>Divisor verification of scale</small>	0,001 g (*) 0,001 g / 0,001 g (*)
		Número de Divisiones (n): <small>Number of Scale Intervals</small> Clase de Exactitud: <small>Accuracy Class</small>	41000 / 120000 I (*)
MÉTODO DE CALIBRACIÓN <small>Calibration Method</small>			
<p style="font-size: x-small;">La calibración se realizó por comparación directa entre las indicaciones de lectura de la balanza y las cargas aplicadas mediante pesas patrón; siguiendo el procedimiento P-CAL-01 "Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático" (Versión 00) basado en el PC-011 "Procedimiento para la calibración de balanzas de funcionamiento no automático clase I y II" (Edición 04) del SNM- INDECOPI, este procedimiento cumple con los ensayos realizados a las balanzas de funcionamiento no automático de acuerdo a la recomendación internacional OIML-R-76:2006.</p> <p style="font-size: x-small;">Calibration was performed by direct comparison between the indications of the scale reading and the loads applied by standard weights, following the procedure P-CAL-01 "Calibration Procedure non-automatic scales" (Version 00) based on PC-011 "Procedure for the calibration of non-automatic scales class I and II" (Edition 04) of the SNM-INDECOPI, this procedure meets the tests performed on non-automatic scales agree to the international recommendation OIML-R-76:2006.</p>			
 Director de Metrología <small>Metrology Director</small>  Ernesto Rodríguez Morón		Supervisor de Laboratorio <small>Laboratory Supervisor</small>  Samuel Quipe Rahucho	

Anexo 30: Certificado de Calibración del medidor de PH

DIVISIÓN DE METROLOGÍA	
 <p>Kossodo el mejor EQUIPO para su laboratorio</p>	<p>LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LC - 006</p>
	
<h1>Certificado de Calibración</h1> <h2>Calibration Certificate</h2>	
<p>N° PH16-C-0228</p>	
<p>Cliente: <small>Customer</small></p> <p>Dirección: <small>Address</small></p> <p>Instrumento de Medición: <small>Measuring Instrument</small></p> <p>Marca: <small>Brand</small></p> <p>Modelo: <small>Model</small></p> <p>Número de serie: <small>Serial Number</small></p> <p>Identificación: <small>Identification</small></p> <p>Lugar de Calibración: <small>Place of Calibration</small></p> <p>Orden de Trabajo: <small>Work Order</small></p> <p>Fecha de Calibración: <small>Date of Calibration</small></p> <p>Fecha de Emisión: <small>Date of Issue</small></p>	<p>UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA</p> <p>Honorio Delgado N° 433 Urb. Ingeniería (Lima/Lima/San Martín de Porres)</p> <p>MEDIDOR DE PH</p> <p>Mettler Toledo</p> <p>Seven Compact pH161 S 220</p> <p>B 433931190</p> <p>EQ-FQ-41 (*)</p> <p>Área de Análisis Físicos y Químicos</p> <p>OT-01901264</p> <p>2016-11-11</p> <p>2016-11-17</p>
<p>Este Certificado de Calibración documenta la trazabilidad a los patrones Nacionales o Internacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).</p> <p>KOSSODO S.A.C. - División de Metrología mantiene y calibra sus patrones de referencia para garantizar la cadena de trazabilidad de las mediciones que realiza, así mismo realiza certificaciones metrologías a solicitud de los interesados y brinda asistencia técnica en temas relacionados al campo de la metrología en la industria peruana.</p> <p>Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario deberá recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.</p>	
<p>The Calibration Certificate documents the traceability to national or international standards, which realize the units of measurement according to the International System of Units (SI).</p> <p>KOSSODO S.A.C. - Metrology Division supports and calibrates its standards of reference to guarantee the chain of traceability of the measurements realized, as well as the metrological certifications realize at the request of the interested parties and offers technical assistance in topics related to the metrology field in the Peruvian industry.</p> <p>In order to assure the quality of measurements the user should recalibrate his instruments at appropriate intervals.</p>	
<p>ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL OBJETO CALIBRADO <small>Technical specifications of the calibrated object</small></p>	
<p>Intervalo de Indicación: <small>Indication interval</small></p> <p>Resolución: <small>Resolution</small></p> <p>Exactitud: <small>Accuracy</small></p>	<p>Modelo de Electrodo: <small>Electrode model</small></p> <p>Serie del Electrodo: <small>Electrode serial</small></p>
<p>-2,00 pH a 20,00 pH</p> <p>0,01 pH</p> <p>± 0,002 pH</p>	<p>Routine Pro</p> <p>4466028</p>
<p>MÉTODO DE CALIBRACIÓN <small>Calibration Method</small></p>	
<p>La calibración se realizó por comparación de la indicación del instrumento con valores asignados a materiales de referencia de pH certificados; siguiendo el procedimiento, PC-020 "Procedimiento para la Calibración de Mediciones de pH", primera edición del SNN-INDECOPI.</p> <p>Calibration was performed by comparison the indicator of the instrument with assigned values to reference materials. Certified pH, following the procedure, the PC-020 "Calibration Procedure for pH Meters", first edition from SNN-INDECOPI.</p>	
	
<p>Director de Metrología <small>Metrology Director</small></p> <p><i>[Signature]</i></p> <p>Emilio Rodríguez Marín</p>	
<p>Supervisor de Laboratorio <small>Laboratory Supervisor</small></p> <p><i>[Signature]</i></p> <p>Olga Toro Sayas</p>	
<p>F-MET-06 Versión: 00 Aprobado el 2016-10-18</p> <p>Prohibida la reproducción total o parcial de este documento sin la autorización de Kossodo S.A.C. Este documento carece de validez sin sello y firmas correspondientes.</p>	
<p>Página 1 de 3</p>	

Anexo 31: Certificado de calibración del termohigrómetro



**LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN
INACAL - DA CON REGISTRO N° LC - 001**



Registro N° LC - 001

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN N° T-0782-2017

Expediente N° : 05400
Página 1 de 2

Fecha de emisión: 2017-03-28

- Solicitante** : UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
- Dirección** : Av. Honorio Delgado N° 430 Urb. Ingeniería - San Martín De Porras
- Instrumento calibrado** : TERMHIGRÓMETRO
 - Marca / Fabricante** : TRACEABLE / CONTROL COMPANY
 - Identificación** : EQ-FQ-83 (*)
 - Serie** : 160359577
 - Modelo** : 4040
 - Alcance temperatura** : 0 °C a 50 °C
 - Resolución** : 0,1 °C
 - Alcance humedad relativa** : 20 % H.R. a 90 % H.R.
 - Resolución** : 1 % H.R.
 - Procedencia** : China
 - Ubicación** : No indica
- Lugar de calibración** : En el Laboratorio de Temperatura y Humedad de METROIL S.A.C.
- Fecha de calibración** : Del 2017-03-25 al 2017-03-27
- Método de calibración**
La calibración se realizó por comparación directa según el PC-MT-002 Rev. 06 "Procedimiento de Calibración de Termohigrómetros de METROIL S.A.C."
- Trazabilidad**
Los resultados de la calibración realizada tienen trazabilidad a los patrones nacionales del INACAL - DM, en concordancia con el Sistema Internacional de Unidades de Medida (SI) y el Sistema Legal de Unidades de Medida del Perú (SLUMP)

Los resultados del certificado son válidos sólo para el objeto calibrado y se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones y no deben utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

Se recomienda al usuario receptor el instrumento a intervalos adecuados los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado, el mantenimiento, conservación y el tiempo de uso del instrumento.

METROIL S.A.C. no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este instrumento o equipo después de su calibración, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Este certificado de calibración es trazable a patrones nacionales o internacionales, los cuales relacionan las unidades de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

Este certificado de calibración no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización previa por escrito de METROIL S.A.C.

El certificado de calibración no es válido sin la firma del responsable técnico de METROIL S.A.C.


CHRISTIAN ASTUMILLER VALENTÍN
 Jefe del Laboratorio 1


Ing. GERARDO A. GOICOCHEA DE LA CRUZ
 Gerente Técnico
 C.I.P. : 171505

Código	Instrumento Patrón	Certificado de Calibración
IT-349	Termohigrómetro con incertidumbre del Orden de 2,8 %H.R.	T-3453-2016 / METROIL S.A.C.
IT-350	Termohigrómetro con incertidumbre del Orden de 2,8 %H.R.	T-3454-2016 / METROIL S.A.C.
IT-357	Termohigrómetro con incertidumbre del Orden de 2,6 %H.R.	T-0039-2017 / METROIL S.A.C.
IT-333	Termómetro digital con incertidumbre del Orden de 0,07 °C	T-3459-2016 / METROIL S.A.C.
IT-332	Termómetro digital con incertidumbre del Orden de 0,07 °C	T-3458-2016 / METROIL S.A.C.



**LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN
INACAL - DA CON REGISTRO N° LC - 001**



Registro N° LC - 001

Certificado de Calibración N° T-0782-2017
Página 2 de 2

- Condiciones de calibración**
 - Temperatura ambiental : Inicial : 21,4 °C Final : 22,8 °C
 - Humedad relativa : Inicial : 61,0 % H.R. Final : 66,0 % H.R.
- Resultados**

PARA EL TERMÓMETRO

INDICACIÓN DEL TERMÓMETRO (°C)	CORRECCIÓN (°C)	TCV (°C)	INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN (°C)
14,5	0,5	15,0	0,3
19,5	0,5	20,0	0,3
30,0	0,0	30,0	0,3

Temperatura Convencionalmente Verdadera (TCV) = Indicación del termómetro + Corrección

PARA EL HIGRÓMETRO

INDICACIÓN DEL HIGRÓMETRO (%H.R.)	CORRECCIÓN (%H.R.)	HRCV (%H.R.)	INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN (%H.R.)
57	-2,0	55,0	3,5
61	-1,0	60,0	4,2
66	-3,0	63,0	3,4

Humedad Relativa Convencionalmente Verdadera (HRCV) = Indicación del higrómetro + Corrección
- Observaciones**
 - Se colocó una etiqueta autoadhesiva con la indicación "CALIBRADO".
 - Antes de la calibración no se realizó ningún tipo de ajuste.
 - La incertidumbre de la medición ha sido calculada para un nivel de confianza aproximadamente del 95 % con un factor de cobertura k=2.
 - (*) Código de identificación indicado en una etiqueta adherida al instrumento.

FIN DEL DOCUMENTO




Anexo 32: Verificación operacional del cromatógrafo líquido HPLC

CERTIFICADO DE OPERATIVIDAD

Declaración del resultado obtenido en la verificación operacional del Sistema de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento UPCH HPLC 1260 DAD-FLD-RID (EQ-FQ-28) de Agilent Technologies.

- ✓ El sistema de HPLC evaluado cumple con las especificaciones establecidas por Agilent Technologies para cada módulo.
- ✓ La verificación operacional fue superada en modo cuaternario.
- ✓ Se usó el estándar de Cafeína Lote N080945
- ✓ Se usó el estándar de Glicerina Lote N081896

<u>Módulo</u>	<u>Modelo</u>	<u>Nº de Serie</u>
Bandeja	N/A	N/A
Bomba Cuaternaria	G1311B	DEAB706120
Automuestreador Líquido	G1329B	DEAAC16137
Compart. Termostatzado	G1316A	DEACN17165
Detector Arreglo de Diodos	G4212B	DEAA302924
Detector Índice de Refracción	G1362A	DEAA603106
Detector de Fluorescencia	G1321B	DEABO02684

Software de Control	Versión
OPEN LAB	Rev. C.01.05 [41]

Compañía : Universidad Peruana Cayetano Heredia
Servicio de Control de Calidad

Ubicación : Sala Instrumental 1

Nombre y Firma del Cliente : Msc. León Villegas Vilchez

Nombre del Responsable de Servicio : Elio Misaico

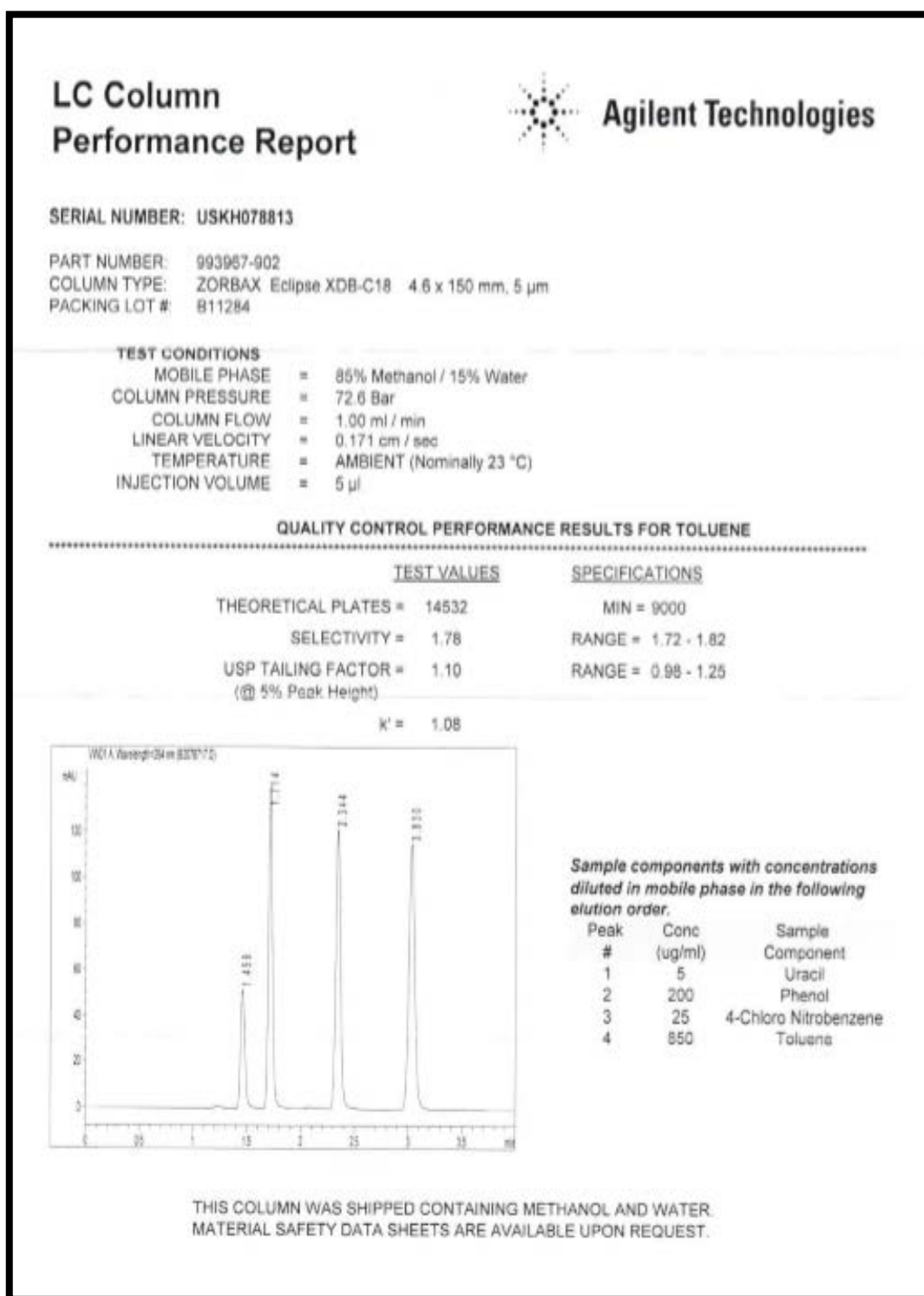
Fecha : Abril 12, 2017

Firma del Responsable del Servicio :



Elio Misaico
Elio Misaico
Elio Misaico

Anexo 33: Certificado de control de calidad de la columna cromatográfica



Anexo 34: Constancia de la parte experimental en el laboratorio de servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Servicio de Control de Calidad

Lima, 28 de Julio del 2017

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

S.D.

Mediante la presente se pone en conocimiento lo siguiente:

La Bachiller **Levaton Osorio, Jeanelly Milagros y Carbajal rosales, Erika isabel**, egresada de la facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la prestigiosa Universidad Inca Garcilaso de la Vega; está haciendo su tesis de Investigación en "Desarrollo y Validación de una Técnica Analítica para cuantificar Amoxicilina polvo para suspensión oral 250 mg/5 mL por Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)" en los laboratorios del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,



Q.F. ERIK OLIVAR GALLEGOS
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado N° 400, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P. O. Box 4304, Lima 100
Directo: (511) 485-2788 / Central: (511) 319-0900 anexos: 2424 o 2427 / Fax: (511) 382-0321
e-mail: controlcalidad@ufcvher.pe / leon.villalobos@upch.pe
Página Web: www.upch.pe

Anexo 35: Fotos del desarrollo de validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250 mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)



Figura 49: Analizando amoxicilina trihidrato Polvo para suspensión oral 250 mg/5mL

Fuente. Elaborado por el propio investigador

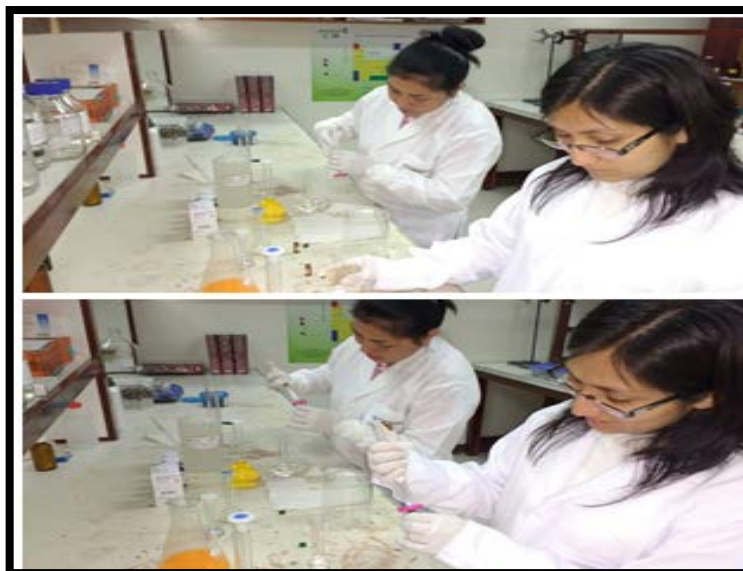


Figura 50: Fotos de los tesistas filtrando la muestra para ser llevado al cromatógrafo líquido (HPLC)

Fuente. Elaborado por el propio investigador



Figura 51: Fotos de los tesistas preparando la muestra problema

Fuente: Elaborado por el propio investigador



Figura 52: Fotos de los tesistas pesando la muestra problema en la balanza analítica

Fuente. Elaborado por el propio investigador



Figura 53: Fotos de los tesistas poniendo las muestras en el cromatógrafo líquido (HPLC)

Fuente. Elaborado por el propio investigador

Anexo 36: Informe técnico

Producto: amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión

Método: Cromatografía líquida de alta resolución

Parámetro	Límite	Resultados
<u>Especificidad:</u>		
Interferencia debido a degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
<u>Linealidad:</u>		
a) Sistema	$y = bx + a$	77 330.4706 x 99.9044
Ecuación de la Recta:	Mayor a 0.995	0.9999
Coefficiente de Correlación	Mayor a 0.990	0.9997
Coefficiente de Determinación	$F_{exp} > F_{tabla}$	45 059.994 > 4.667
Test de ANOVA		
Test de Linealidad:		
Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0.664%
Intervalo de confianza de la pendiente "b":	$b \pm t_{tabla} \cdot S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$	87149.633 ± 88955.133 210.718 > 2.160
Intervalo de confianza del Intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \cdot S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	-10.317270 ± 199.775786 1.948 < 2.160
<u>Exactitud:</u>		
Porcentaje de Recuperación:	97% - 103%	100.00%
<u>Precisión:</u>		
Precisión Instrumental:	$RSD \leq 2\%$	0.034%
De los Tiempos de retención	$RSD \leq 2\%$	0.054%
De las Áreas		
<u>Repetibilidad:</u>	$RSD \leq 2\%$	0.415%
-Intervalo de Confianza del 95% Individual	$X \pm t_{tabla} \cdot S$	245.35 ± 2.62 245.35 ± 1.07
-Intervalo de Confianza del 95% de la Media	$X \pm t_{tabla} \cdot S$ \sqrt{n}	
<u>Precisión Intermedia:</u>	$RSD \leq 4\%$	0.314%
<u>Robustez:</u>		
Estabilidad de la muestra después de 48 horas en refrigeración	$RSD \leq 2\%$ $ d_i \leq 2\%$	0.707% 1.095%

Fuente: Elaborado por el propio investigador

Anexo 37: Matriz de consistencia

“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO 250MG/5ML POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)”

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Problema general:</p> <p>¿El método analítico propuesto para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución cumplirá con los parámetros de desempeño para la validación.</p> <p>Específicos:</p> <p>¿Se podrá desarrollar el proceso de validación del método analítico con las exigencias de exactitud, precisión, especificidad, linealidad, rango y robustez?</p> <p>¿Se podrá lograr la optimización del método analítico?</p> <p>¿Será confiable la validación del método analítico del principio activo a analizar?</p>	<p>Objetivo general</p> <p>Validar el método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), establecidos en la Farmacopea de Estados Unidos (USP 40).</p> <p>Específicos:</p> <p>Evaluar cada uno de los parámetros de desempeño de validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</p> <p>Optimizar el método analítico establecido.</p> <p>Demostrar la confiabilidad de la validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</p>	<p>Hipótesis general.</p> <p>El método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cumple con los parámetros de validación establecidos en la Farmacopea de Estados Unidos (USP 40).</p> <p>Específicos:</p> <p>Se puede desarrollar el proceso de validación del método analítico con las exigencias en todos los parámetros de especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión y robustez.</p> <p>Se puede lograr la optimización del método analítico.</p> <p>El desarrollo de la validación del método analítico es confiable.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral.</p> <p>Variable dependiente</p> <p>validación del método analítico</p>	<p>Indicadores:</p> <p>Parámetros:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Especificidad • Linealidad y rango • Exactitud • Precisión • Robustez 	<p>Nivel de investigación:</p> <p>Estudio aplicativo</p> <p>Tipo:</p> <p>Experimental</p> <p>Enfoque:</p> <p>Cuantitativo</p> <p>Población:</p> <p>La población de estudio va a hacer conformada por el producto de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral comercializados en el Perú</p> <p>Muestras:</p> <p>Se seleccionarán 50 unidades de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral de un mismo lote de Farmindustria.</p> <p>Técnica:</p> <p>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa</p> <p>Instrumento:</p> <p>Cromatógrafo de líquido El software de Mintab 16 Excell</p>