

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) DE UN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON CIPROHEPTADINA

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
MARÍA ELENA RIVAS ALAS  
SILVIA ADALIA RODRÍGUEZ ROMERO

16 DE FEBRERO  
DE 1841

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. Maria Isabel Rodríguez

Secretaria General

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

Facultad de Química y Farmacia

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

## COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

Coordinadora General

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Area de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos,  
Cosméticos y Veterinarios:

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

Asesora de Area de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos,  
Cosméticos y Veterinarios:

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

Docente Directora

Licda. Berta Ernestina Contreras Palma

Docente Director

Lic. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos de manera especial el apoyo del Laboratorio Farmacéutico Nacional, ya que nos brindó la oportunidad de realizar nuestra investigación poniendo a nuestra disposición sus instalaciones y equipos, todo el soporte técnico necesario, la formación y capacitación profesional para la realización del trabajo de investigación.

Agradecemos profundamente a nuestros queridos docentes directores Licda. Berta E. Contreras y Lic. Eliseo E. Ayala por tomar este reto y seguir hasta el final con nosotras, por compartir sus conocimientos, su experiencia, por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo y sobre todo por la amistad que ha surgido de trabajar en conjunto ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

María Elena y Silvia Adalia

## **DEDICATORIA**

A Diosito quien es nuestro soporte, por darnos vida, fuerza, fe, por no dejarnos caer, ayudarnos en todo momento , por tu luz y guía, por no desampararnos en las adversidades, por tus respuestas a las oraciones, por haber llegado hasta donde estamos, por las promesas cumplidas y sobre todo por el inmenso amor que nos brindas.

A nuestros amados padres quienes son nuestra fortaleza, nuestros guías, gracias por su amor y ejemplo que sin su ayuda este sueño no se hubiera realizado, este es nuestro regalo a sus esfuerzos, a su dedicación, al amor que día a día nos brindan, papi mami lo logramos.

A nuestras familias y amigos por creer en nosotras, y siempre ayudarnos a salir adelante, por estar con nosotras en las buenas y en las malas, por compartir nuestras tristezas y alegrías, por el inmenso cariño demostrado a pesar de las circunstancias y a pesar de nuestra ausencia siguen creyendo en nosotras.

A mi amiga y compañera de tesis por todos los buenos y malos momentos que compartimos, por tomar la decisión conmigo y llegar hasta este momento, por la paciencia, cariño y sobre todo la amistad que surgió del compartir día a día todas nuestras penas y alegrías.

María Elena y Silvia Adalia

## INDICE

Resumen	Pág
Capitulo I	
1.0 Introducción	xix
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo General	22
2.2 Objetivos Especificos	22
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Validación de Metodología Analítica	25
3.2 Tipos de Validación	26
3.3 Parámetros para la Validación de Métodos Analíticos	27
3.4 Generalidades de Cromatografía Líquida de Alta Presión	31
3.5 Generalidades de las Vitaminas	40
3.6 Generalidades de Ciproheptadina	43
Capitulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	47
4.1 Tipo de estudio	47
4.2 Investigación bibliográfica	47
4.3 Investigación de campo	47
4.4 Protocolo de Validación Vitaminas	49
4.5 Protocolo de Validación Ciproheptadina HCl	93

Capitulo V	
5.0 Resultados y Analisis de Resultados	120
5.1 Análisis de Resultados	140
Capitulo VI	
6.0 Conclusiones	145
Capitulo VII	
7.0 Recomendaciones	148
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

## INDICE DE ANEXOS

N°1 Cuadros de Resultados

N°2 Figuras de Graficas

N°3 <1225>Validacion de Metodos Farmacopeicos

## INDICE DE CUADRO

### CUADRO N°

1. Precisión del sistema para Tiamina HCl
2. Adecuabilidad del sistema para Tiamina HCl
3. Resolución cromatográfica para Tiamina HCl
4. Linealidad del sistema para Tiamina HCl
5. Exactitud para Tiamina HCl
6. Repetibilidad para Tiamina HCl
7. Linealidad del método para Tiamina HCl
8. Porcentaje de recobro para Tiamina HCl
9. Precisión del método para Tiamina HCl (día 1)
10. Precisión del método para Tiamina HCl (día 2)
11. Estabilidad analítica para Tiamina HCl
12. Robustez para Tiamina HCl
13. Tolerancia para Tiamina HCl
14. Precisión del sistema para Riboflavina
15. Adecuabilidad del sistema para Riboflavina
16. Resolución cromatográfica para Riboflavina
17. Linealidad del sistema para Riboflavina
18. Exactitud para Riboflavina
19. Repetibilidad para Riboflavina
20. Linealidad del método para Riboflavina

21. Porcentaje de recobro para Riboflavina
22. Precisión del método para Riboflavina (día 1)
23. Precisión del método para Riboflavina (día 2)
24. Estabilidad analítica para Riboflavina
25. Robustez para Riboflavina
26. Tolerancia para Riboflavina
27. Precisión del sistema para Nicotinamida
28. Adecuabilidad del sistema para Nicotinamida
29. Resolución cromatográfica para Nicotinamida
30. Linealidad del sistema para Nicotinamida
31. Exactitud para Nicotinamida
32. Repetibilidad para Nicotinamida
33. Linealidad del método para Nicotinamida
34. Porcentaje de recobro para Nicotinamida
35. Precisión del método para Nicotinamida (día 1)
36. Precisión del método para Nicotinamida (día 2)
37. Estabilidad analítica para Nicotinamida
38. Robustez para Nicotinamida
39. Tolerancia para Nicotinamida
40. Límite de detección para Nicotinamida
41. Límite de cuantificación para Nicotinamida
42. Precisión del sistema para Piridoxina HCl

43. Adecuabilidad del sistema para Piridoxina HCl
44. Resolución cromatográfica para Piridoxina HCl
45. Linealidad del sistema para Piridoxina HCl
46. Exactitud para Piridoxina HCl
47. Repetibilidad para Piridoxina HCl
48. Linealidad del método para Piridoxina HCl
49. Porcentaje de recobro para Piridoxina HCl
50. Precisión del método para Piridoxina HCl (día 1)
51. Precisión del método para Piridoxina HCl (día 2)
52. Estabilidad analítica para Piridoxina HCl
53. Robustez para Piridoxina HCl
54. Tolerancia para Piridoxina HCl
55. Precisión del sistema para Ciproheptadina HCl
56. Adecuabilidad del sistema para Ciproheptadina HCl
57. Resolución cromatográfica para Ciproheptadina HCl
58. Linealidad del sistema para Ciproheptadina HCl
59. Exactitud para Ciproheptadina HCl
60. Repetibilidad para Ciproheptadina HCl
61. Linealidad del método para Ciproheptadina HCl
62. Porcentaje de recobro para Ciproheptadina HCl
63. Precisión del método para Ciproheptadina HCl (día 1)
64. Precisión del método para Ciproheptadina HCl (día 2)

65. Estabilidad analítica para Ciproheptadina HCl
66. Robustez para Ciproheptadina HCl
67. Tolerancia para Ciproheptadina HCl
68. Límite de detección para Ciproheptadina HCl
69. Límite de cuantificación para Ciproheptadina HCl

## INDICE DE FIGURAS

### FIGURA

- N°1 Gráfica linealidad del sistema para Tiamina HCl
- N°2 Gráfica linealidad del método para Tiamina HCl
- N°3 Gráfica linealidad del sistema para Riboflavina
- N°4 Gráfica linealidad del método para Riboflavina
- N°5 Gráfica linealidad del sistema para Nicotinamida
- N°6 Gráfica linealidad del método para Nicotinamida
- N°7 Gráfica linealidad del sistema para Piridoxina HCl
- N°8 Gráfica linealidad del método para Piridoxina HCl
- N°9 Gráfica linealidad del sistema para Ciproheptadina HCl
- N°10 Gráfica linealidad del método para Ciproheptadina HCl

## ABREVIATURAS

- a = Ordenada en el origen
- B = Valor de la pendiente
- CPH = Ciproheptadina
- CV = Coeficiente de variación
- G = Cochran
- H = Altura de pico
- HPLC= Cromatografía Líquida de Alta Presión
- K = Factor de capacidad
- Ka = Constante de distribución del soluto A
- L = Longitud del empaque de la columna
- LC = Límite de Cuantificación
- LD = Límite de Detección
- M = Molar
- mAU = Milivoltios
- mg = Miligramos
- mL = Mililitros
- mM = Milimoles
- n = Número de eventos
- N = Número de platos teóricos
- psi = Unidades de presión
- r = Coeficiente de correlación

R = Resolución

$r^2$  = Coeficiente de determinación

RS = Resolución cromatográfica

RSD = Desviación estándar relativa

RTCA= Reglamento Técnico Centro Americano

S = Desviación estándar

T = Factor de cola

Tr = Tiempo de retención

VIT = Vitaminas

Vm = Volumen del soluto en la fase móvil

VPT = Validación de producto terminado

Vs = Volumen del soluto en la fase estacionaria

W = Ancho de pico

Y = Área

$\hat{Y}$  = Media aritmética

$\alpha$  = Factor selectividad

$\mu\text{g}$  = Microgramos

000 = Número correlativo del protocolo

## RESUMEN

En el presente trabajo de graduación se ha Validado el Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) para la cuantificación de un Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl, cuantificando 4 de las Vitaminas que forman parte del Complejo B las cuales son: Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina Clorhidrato), Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina), Vitamina B<sub>3</sub> (Nicotinamida), Vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina Clorhidrato) y el Estimulante del Apetito Ciproheptadina HCl. Dicho jarabe es fabricado en un Laboratorio Farmacéutico Nacional, la validación se realizó en un período de 2 meses (Octubre - Noviembre), utilizando un Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) marca MERCK Hitachi LaChrom Elite con Detector Arreglo de Diodos, dentro del Departamento de Control de Calidad. Se evaluaron 12 parámetros de desempeño por ser un método desarrollado y no oficial, los cuales fueron Precisión del Sistema, Adecuabilidad del Sistema, Linealidad del Sistema, Exactitud, Repetibilidad del Método, Linealidad del Método, Precisión del Método, Estabilidad Analítica de la Muestra, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Robustez y Tolerancia, con estos parámetros se demostró que la técnica analítica es confiable de acuerdo al estudio estadístico de los resultados obtenidos en la parte experimental para la cuantificación de los activos en estudio. La metodología analítica cumple con los criterios de aceptación para todos los parámetros evaluados a excepción de la robustez y

tolerancia con los cambios establecidos en el protocolo esto no implica que el método no sea robusto y tolerante con otro tipo de variaciones.

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una formulación y de la técnica de Análisis en el control de la calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, donde el farmacéutico descubre si la metodología analítica cumple con el propósito para lo cual fue diseñadas según las exigencias actuales con respecto a la aplicación RTCA 11.03.39.06 "Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos, publicado en el Diario Oficial el 12 de enero de 2007, se refieren a los parámetros de desempeños de procedimientos analíticos físico químicos, entre ellos la categoría I de principios activos, donde se especifica los parámetros de desempeño que aplica para la validación los cuales son: exactitud, especificidad, linealidad, intervalo de confianza. De acuerdo al reglamento, la validación realizada se cumple por lo que el método analítico utilizado para la cuantificación de Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

En la actualidad, los Laboratorios Farmacéuticos Nacionales deben cumplir con normas que incluyen una serie de procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad, por lo tanto, se necesita operar bajo un sistema de garantía de la calidad, que incluye una extensa documentación de las actividades para la producción de medicamentos de alta calidad que van a satisfacer las necesidades para lo cual se han elaborado, por ello es importante un Control de la Calidad en los medicamentos.

En esta investigación se realizó la Validación del Método Analítico de Cuantificación para un Jarabe Multivitamico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina HCl, utilizando como Método Analítico la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). La validación incluye los parámetros de desempeño y criterios de aceptación para demostrar que el Método Analítico cumple con el propósito para el cual fue diseñado, el cual es cuantificar los principios activos del Jarabe Multivitaminico con Estimulante del apetito.

Al inicio de los años 70's, los incidentes de contaminación en parenterales de gran volumen, estimuló la creación regulaciones adicionales en Estados Unidos y en otros lugares, debido a esto se da inicio a la Validación; en los años 80's la Validación de métodos analíticos se realizaba en cada país de acuerdo a sus regulaciones internas. Conforme el mundo se ha ido globalizado, dichos requerimientos se han ido armonizando entre sí, de tal forma, que se favorezca el intercambio comercial; existe hoy en día la "International

Conference on Harmonisation” (ICH), que ha emitido una serie de guías internacionales entre las que se encuentran guías para la Validación de los Métodos Analíticos, la Q<sub>2</sub>A y la Q<sub>2</sub>B. Aunque para la Industria Farmacéutica la guía de análisis es la Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopoeia, USP), se hace también uso de libros no Oficiales que ofrecen metodologías analíticas alternas.

El profesional farmacéutico es el responsable de los procesos farmacéuticos y por lo tanto de la calidad de éstos (materia prima, producto intermedio, producto a granel y producto terminado). El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no de un producto en base a las especificaciones previamente establecidas, que están dadas por los resultados obtenidos al aplicar los métodos analíticos, si estos no son farmacopéicos y no están validados, se corre el riesgo de ser una decisión errónea y afecta al usuario del producto y por ende a la misma empresa.

La finalidad de esta investigación es la Validación del Método Analítico para la cuantificación del Jarabe Multivitaminico con Estimulante del Apetito; y el cumplimiento de las exigencias de calidad de los medicamentos elaborados en un Laboratorio Farmacéutico Nacional.



## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar el Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de un Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 2.2.1 Desarrollar dos protocolos para la Validación del Método Analítico, uno para la cuantificación de Vitaminas y otro para Ciproheptadina en un Jarabe Multivitamínico con Estimulante del Apetito por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).
- 2.2.2 Cuantificar cuatro de las Vitaminas del complejo B: Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina Clorhidrato), Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina), Vitamina B<sub>3</sub> (Nicotinamida), Vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina Clorhidrato).
- 2.2.3 Cuantificar la Ciproheptadina HCl por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).
- 2.2.4 Establecer una evidencia documentada que demuestre el desempeño del método analítico de cuantificación, si es factible para la obtención de resultados reproducibles, confiables demostrados estadísticamente.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

Un Método Analítico se define como la descripción de la secuencias de actividades, recursos materiales y parámetros establecidos que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Como todo proceso de medición este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por medio del cual se demuestra por estudios de laboratorios, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.<sup>(5)</sup>

Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad en una empresa farmacéutica ya que impacta de manera directa en la calidad de análisis del producto.<sup>(3)</sup>

Los Laboratorios Farmacéuticos deben cumplir con la Garantía de Calidad que es la suma total de todas las actividades organizadas, que se adoptan con el objeto de garantizar que los productos farmacéuticos, posean la calidad requerida para el uso al que están destinados.

Para alcanzar la Garantía de Calidad es necesario el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que son un conjunto de normas y procedimientos relacionados entre sí, destinados a garantizar que los productos

tengan y mantengan la Identidad, Pureza, Potencia e Inocuidad requerida dentro de su período de vida útil. <sup>(9)</sup>

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) son normas, directrices que describen el entorno mínimo para la realización de los análisis,<sup>(9)</sup> puede decirse que además son sistemas y condiciones de trabajo bajo las cuales los análisis se planifican, realizan, controlan, registran y se presentan. Cumpliendo estas normas se pretenden proporcionar la Calidad y Validez de los datos de análisis.

### **3.1 Validación de Metodología Analítica**

La Validación de un procedimiento de medida establece, mediante análisis sistemáticos de laboratorio, que las características de dicho procedimiento cumplen las especificaciones relativas al uso previsto. El proceso de Validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. <sup>(3)</sup>

La Validación analítica, consiste en el establecimiento de una evidencia documentada que demuestre con alto grado de probabilidad, que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. <sup>(3)</sup>

### 3.2 Tipos de Validación

- **Validación Retrospectiva:** es el establecimiento de evidencia documentada de que un sistema hace lo que se pretende que debe hacer en base a la revisión y análisis de información histórica.<sup>(5)</sup>

- **Validación Prospectiva:** es el establecimiento de la evidencia documentada de que un sistema hace lo que se pretende que deben hacer en relación a un protocolo previamente planeado.<sup>(5)</sup>

- **Validación Concurrente:** es el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados obtenidos paralelamente durante la distribución del producto que involucra al proceso en cuestión.<sup>(5)</sup>

- **Validación Esbelta:** estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados que consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de calidad.<sup>(4)</sup>

- **Revalidación:** la introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del Método Analítico establecido por la Validación, podrá exigir una nueva Validación.<sup>(4,7)</sup>

**3.3 Parámetros para la Validación de Métodos Analíticos:** las características de desempeño del método analítico se expresa en función de los siguientes parámetros analíticos:

- **Linealidad:** del sistema y/o del método es la capacidad de este para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente o mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo definido. Este parámetro se expresa mediante la construcción de una curva de calibración. La pendiente de la recta de calibración debe ser constante en todo el intervalo de aplicación del procedimiento de medida. <sup>(2,3)</sup>

- **Precisión:** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa por la Desviación Estándar (S) o la Desviación Estándar Relativa (Coeficiente de Variación Cv).<sup>(3,4)</sup>

- **Repetibilidad:** es la medida de la precisión de un método realizado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el

mismo laboratorio, en los mismos equipos, reactivos en una misma secuencia de análisis realizados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.<sup>(4,7)</sup>

- **Precisión Intermedia:** es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.)<sup>(3,7)</sup>

- **Exactitud:** La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados de prueba obtenidos con el valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse ya sea durante el análisis o en el proceso de preparación de muestras.<sup>(2,3)</sup>

- **Selectividad - Especificidad:** se consideran equivalentes y se definen como la capacidad del método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas, productos de degradación, o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra.<sup>(3,4,7)</sup>

- **Límite de Detección:** es la menor concentración (o cantidad) de analito que se puede detectar con razonable certeza por un Método Analítico dado. Es un parámetro de gran importancia en los ensayos límites, análisis de trazas, y de productos de degradación del analito o contaminantes externos. Generalmente se expresa como concentración mínima de analito en la muestra.<sup>(3,4,5)</sup>

- **Límite de Cuantificación:** es la menor concentración de analito que puede ser determinada con Precisión y Exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa, al igual que el Límite de Detección como concentración de analito. Ambos límites pueden determinarse mediante la relación señal/ ruido. Este procedimiento será de aplicación en el caso de métodos instrumentales. Algunos autores señalan la variante de análisis repetidos con o sin corrección de lectura frente a un blanco en el caso de métodos espectroscópicos y cromatográficos, respectivamente.<sup>(3,4,5)</sup>

- **Tolerancia:** también conocida como fortaleza, resistencia; es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones.<sup>(3,4,5)</sup>

- **Robustez:** la robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para no resultar afectados por variaciones pequeñas pero deliberadas.<sup>(3,4)</sup>

- **Sensibilidad:** es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.<sup>(4,7)</sup>

- **Criterios de Validación a evaluar en función del tipo del método analítico:** el procedimiento de los ensayos varía de acuerdo a las determinaciones que se

quieren evaluar. Considerando esta variedad para los ensayos, es lógico que diferentes métodos requieran diferentes esquemas de validación.

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

**CATEGORÍA I:** pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.<sup>(2, 7)</sup>

**CATEGORÍA II:** pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba de cumplimiento de límite.<sup>(2,5)</sup>

**CATEGORÍA III:** pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.<sup>(2,7)</sup>

**CATEGORÍA IV:** pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un

estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.<sup>(4)</sup>

### **3.4 GENERALIDADES DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC)**

La cromatografía es una técnica de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos en una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada fase estacionaria, que se encuentra inmovilizada en una columna y la otra, llamada fase móvil, la cual se desplaza sobre la fase estacionaria.

La elusión es el proceso en el cual, se separan los solutos a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil a velocidades diferentes lo que conduce a la separación de los componentes, utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.<sup>(4)</sup>

Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.<sup>(4,6)</sup>

De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene el mayor campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante. La técnica ha mejorado considerablemente desde sus principios., actualmente se dispone de cromatógrafos que reúnen alrededor de una columna optimizada y miniaturizada (para poder separar microcantidades de muestras) todo un conjunto de accesorios destinados a asegurar la repetibilidad de las experiencias sucesivas por el perfecto control de los diferentes parámetros de separación. Para análisis sucesivos de una misma muestra, realizados en condiciones idénticas a diferentes intervalos, los tiempos de retención son reproducibles con variaciones de pocos segundos.<sup>(6)</sup>

El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

Características de los detectores:

-Sensibilidad: Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.

-Linealidad: Rango de masa o concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria.

El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

-El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección.

-El límite Superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad.

El ruido es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.

La separación efectuada se conserva en un registro individual llamado cromatograma. Un cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. Este gráfico se obtiene gracias a un detector situado a la salida de la columna.<sup>(6)</sup>

La cromatografía esta basada en el equilibrio de un soluto entre una fase estacionaria y una fase móvil, la resolución de componentes de una mezcla depende de 4 factores:

-Selectividad

-Eficiencia

-Tiempo de retención

-La columna

### - RESOLUCIÓN CROMATOGRÁFICA

Es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos A y B la resolución de cada columna queda definida como:

$$R_S = \frac{2((t_R)_B - (t_R)_A)}{W_A + W_B}$$

Donde:

$R_S$  = Resolución Cromatográfica

$t_R$  = tiempo de retención

$W$  = ancho de pico

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos teóricos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes.<sup>(6)</sup>

### - FACTOR DE CAPACIDAD (K)

Actualmente, se conoce como factor de retención ( $k$ ). El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención,  $k$  se define como:  $k = (K_A \cdot V_S) / V_M$

Donde:

$K_A$  = constante de distribución del soluto A

$V_S$  = volumen del soluto en la fase estacionaria

$V_M$  = volumen del soluto en la fase móvil. (6)

### - EFICIENCIA

La Eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) *altura del plato* "H" y (2) *cantidad de platos o número de platos teóricos* "N". Los dos están relacionados por la ecuación:  $N=L/H$

Donde:

N = número de platos teóricos

H = altura del pico

L = longitud del empaque de la columna (en cm)

La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos teóricos "N" y la altura "H" es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases: móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso mas pequeñas.

## - SELECTIVIDAD

El factor de selectividad ( $\alpha$ ) de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

Donde:

$\alpha$  = selectividad

$K_B$  = constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B.

$K_A$  = constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido.

De acuerdo con esta definición, la selectividad ( $\alpha$ ) siempre es mayor que la unidad.

La columna es el corazón de la cromatografía ya que es allí donde se efectúa la separación, la selección del tipo de columna depende de la solubilidad de la muestra, el peso molecular y la estructura de los compuestos.

La columna es un tubo estrecho que contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión.

## - INSTRUMENTACIÓN

Los componentes básicos de un sistema para el Cromatografo Líquido de Alta Presión (HPLC) son:

- Depósitos para la fase móvil (disolventes)
- Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- Sistema de inyección de muestras
- Columna cromatográfica
- Termostátos para las columnas
- Detectores
- Sistema para el tratamiento de datos y registrador

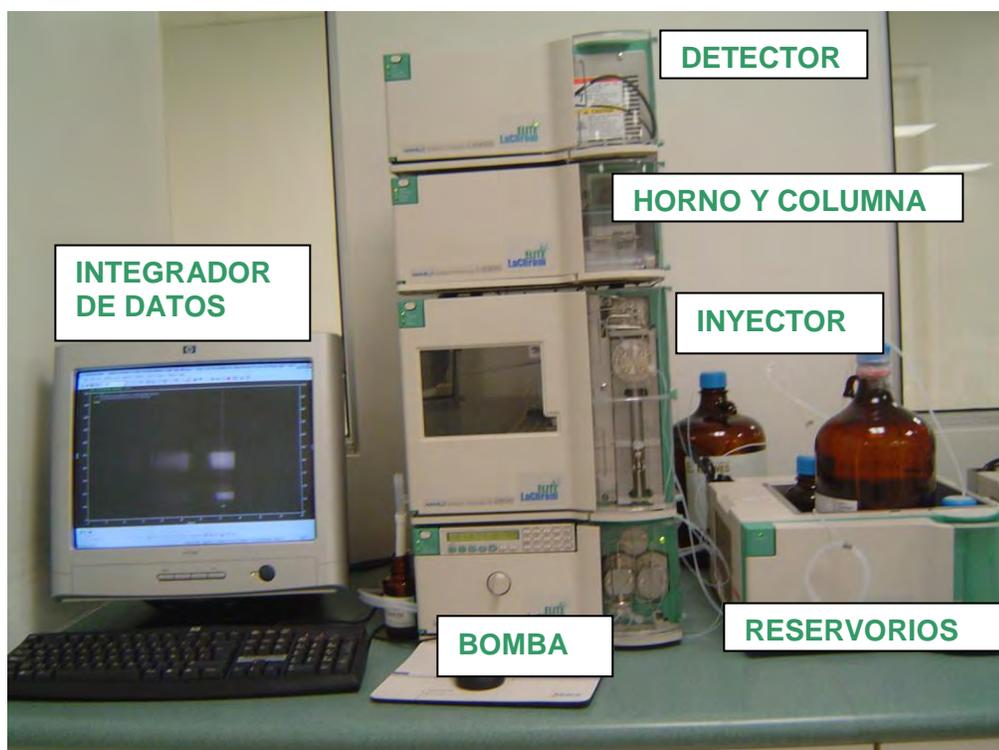


Fig1. Componentes básicos de un sistema para HPLC.

Como algunas de las fases móviles usadas en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable.

Los disolventes más usados en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), son agua, soluciones tampón acuosas (Buffer) y solventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el Helio, utilizando ultra sonidos, en línea o al vacío.

La muestra después de ser desgasificada y filtrada por filtro de 45 micras es inyectada en el sistema por la válvula de inyección. La bomba pasa el eluyente a través del loop (tubería que dosifica la muestra), barriendo la muestra hacia y a través de la columna, los componentes se detectan como picos, los picos se pueden identificar por su tiempo de retención y se cuantifican por su área bajo la curva.

Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 mL/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

El material exterior de las columnas cromatográficas suele ser de acero y el material interior puede estar compuesto de una fase inversa, fase normal, intercambio iónico y exclusión por tamaño que provee diferente selectividad, la longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10  $\mu\text{g}$ .

Las columnas son de alto costo y se degradan con facilidad por eso se protege la entrada de la columna con otra más corta llamada pre-columna la cual retiene por adsorción la impurezas de forma irreversible.<sup>(7)</sup>

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con hornos que regulan la temperatura de la columna.

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. Se pueden clasificar de la forma siguiente:

Detectores más utilizados es el de absorbanza ultravioleta. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.<sup>(8)</sup>

### **3.5 GENERALIDADES DE LAS VITAMINAS**

#### **TIAMINA CLORHIDRATO**

**Formula Química:**  $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$

**Peso Molecular:** 337,27

**Nombre Químico:** Thiazolium 3-[(4-amino-2 methyl-5-pyrimidinyl) methyl]-5- 2-hydroxyethyl) – 4 - methyl-, chloride, monohydrochloride.

»La solución oral de Tiamina Clorhidrato contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 250,0 por ciento de Tiamina Clorhidrato ( $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ ), declarada en la etiqueta.«<sup>(4)</sup>

**Envasado y almacenamiento:** Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz.<sup>(4)</sup>

**Descripción:** polvo cristalino o cristales de color blanco, por lo general con un color leve característico. Cuando se expone al aire, el producto anhidro adsorbe rápidamente aproximadamente 4 % de agua. Funde aproximadamente 248°C, con algo de descomposición.<sup>(4)</sup>

**Solubilidad:** fácilmente soluble en agua, soluble en glicerina, poco soluble en alcohol, insoluble en éter y benceno.<sup>(4)</sup>

La Tiamina Clorhidrato (Vitamina B<sub>1</sub>), fue el primer miembro que se identificó del Complejo B, la falta de Tiamina produce un tipo de Neuritis conocida como Beriberi.

**Aplicaciones Terapéuticas:** el único uso terapéutico establecido de la Tiamina Clorhidrato es en el tratamiento o la profilaxia de la deficiencia de la misma.<sup>(1)</sup>

## **RIVOFILAVINA**

**Formula Química:**  $C_{17}H_{20}N_4NaO_9 \cdot 2H_2O$

**Peso Molecular:** 514,36

«La solución oral de Riboflavina contiene no menos del 90,0 por ciento y no más del 150,0 por ciento de Riboflavina ( $C_{17}H_{20}N_4NaO_9 \cdot 2H_2O$ ), declarada en la etiqueta.» <sup>(4)</sup>

**Descripción:** polvo cristalino fino de color amarillo a naranja leve.<sup>(4)</sup>

**Solubilidad:** moderadamente soluble en agua, cuando está seco, la luz difusa no la afecta, pero cuando está en solución la luz induce a un fácil deterioro. Es higroscópico.<sup>(4)</sup>

**Envasado y Almacenamiento:** Conservar en envases impermeables, resistentes a la luz.<sup>(4)</sup>

**Aplicación Terapéutica:** la única aplicación terapéutica establecida de la Rivoflavina es el tratamiento de la enfermedad causada por deficiencia que es la aparición de mal de garganta, estomatitis, dermatitis seborreica de la cara y anemia.<sup>(1)</sup>

## **NICOTINAMIDA**

**Formula Química:**  $C_6H_6N_2O$

**Peso Molecular:** 122.17

« La solución oral de Nicotinamida contiene no menos del 90 por ciento y no más del 150 por ciento de Nicotinamida ( $C_6H_6N_2O$ ), declarada en la etiqueta»

**Descripción:** polvo cristalino o cristales de color blanco es inodoro o con olor leve, funde aproximadamente  $235^{\circ}C$ .<sup>(4)</sup>

**Solubilidad:** Moderadamente soluble en agua; fácilmente soluble en agua hirviendo, en alcohol en ebullición y en soluciones de hidroxidos y carbonatos alcalinos, prácticamente insoluble en eter.<sup>(4)</sup>

El Ácido Nicotínico también se conoce como Nicotinamida, termino introducido para evitar confusión entre la Vitamina y la Nicotina alcaloide.

**Aplicación Terapéutica:** se utiliza en la profilaxia de la D Pelagra y terapéutica de la misma.<sup>(1)</sup>

### **PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

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

**Peso Molecular:** 205,64

**Nombre Químico:** [3,4-Pyridinedimethanol, 5-hydroxy-6-methyl-hydrochloride  
Clorhidrato de piridoxol.

» La solución oral de Clorhidrato de Piridoxina contiene no menos del 90,0 por ciento y no más de 150,0 por ciento de la cantidad de Clorhidrato de Piridoxina ( $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ), declarada en la etiqueta .«<sup>(4)</sup>

**Envasado y almacenamiento:** conservar en envases resistentes a la luz.<sup>(4)</sup>

**Descripción:** polvo cristalino o cristales de color blanco o prácticamente blanco. Es estable al aire y es afectado lentamente al exponerse a la luz solar. Sus soluciones tienen un pH de aproximadamente 3.<sup>(4)</sup>

**Solubilidad:** fácilmente soluble en agua, poco soluble en alcohol, insoluble en eter.<sup>(4)</sup>

**Aplicaciones Terapéuticas:** es esencial en la nutrición de los seres humanos.<sup>(1)</sup>

### **3.6 GENERALIDADES DE LA CIPROHEPTADINA**

**Nombre Químico:** 4-(5H-Dibenzo[a,d]ciclohepten-5-ilidene)-1-metil piperidina hidrocioruro sesquihidrato.

**Fórmula Molecular :**  $C_{21}H_{21}N \cdot 1^{1/2}H_2O$ .

**Peso Molecular:** 350,9.

»La solución oral de Ciproheptadina Clorhidrato contiene no menos del 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad de Ciproheptadina base  $C_{21}H_{22}N$  declarada en la etiqueta. «(4)

**Descripción:** polvo cristalino, blanco o ligeramente amarillento, prácticamente inodoro.

**Solubilidad:** una parte de Ciproheptadina es soluble en 275 partes de agua, en 35 de etanol, en 26 de cloroformo y en 1,5 de metanol. Prácticamente es insoluble en éter.(4)

**Empaque y almacenamiento:** Se debe proteger de la luz y la humedad.

**Mecanismo de acción:** la Ciproheptadina es un potente antagonista de la histamina, la acetilcolina y la serotonina. También posee efecto bloqueante de canales de calcio. Un aumento de la actividad neuronal en el hipotálamo lateral, sugiere que este fármaco actúa directamente a ese nivel, produciendo probablemente una alteración de la actividad de la serotonina en el centro del apetito. En varios estudios, se ha demostrado que el tratamiento con Ciproheptadina produce un aumento del apetito y una ganancia de peso, tanto en niños como en adultos. El aumento de peso se produce rápidamente durante las primeras semanas de tratamiento, pero se pierde al interrumpirlo.(1)

**Usos clínicos:** La Ciproheptadina es un potente antihistamínico y como tal es muy eficaz para aliviar los signos y síntomas de la urticaria, el prurito, el angioedema, la dermatitis atópica y la rinoconjuntivitis alérgica. La Ciproheptadina se ha utilizado ampliamente como estimulante del apetito (a una dosis de 12 mg/24 h en adultos) en pacientes con distintas enfermedades como anorexia nerviosa, caquexia neoplásica, tuberculosis, etc.<sup>(1)</sup>

**Efectos adversos y precauciones:** el principal efecto adverso de la Ciproheptadina es la sedación, aunque también puede aparecer excitación o inquietud, más frecuentemente en niños. La ganancia de peso es un efecto adverso que se suele utilizar con fines terapéuticos. Otros efectos adversos son náuseas, vómitos, ictericia, sequedad de boca, visión borrosa y erupción cutánea.<sup>(1)</sup>

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## **4.0 DISEÑO METODOLOGICO**

**4.1 Tipo de Estudio Experimental:** se realizó en un Laboratorio Farmacéutico Nacional donde es fabricado el jarabe y el tiempo en el cual se realizó la parte práctica del proceso de validación fue en un período de cinco días y los análisis estadísticos de los resultados fue en 25 días, durante los meses de Octubre a Noviembre de 2006. La evaluación se realizó utilizando blancos, placebos analíticos, estándar fortificado, por pesada individual.

### **4.2 Investigación Bibliográfica**

Para el desarrollo del presente trabajo de graduación la investigación bibliográfica se llevo a cabo en:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Biblioteca del Laboratorio, donde se llevo a cabo la parte experimental.
- Internet.
- Junta de Vigilancia de la Profesión Químico Farmacéutico.

### **4.3 Investigación de campo**

Universo: Metodología Analítica de Cuantificación de un Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl.

Muestra: Cuatro de las Vitaminas del complejo B: Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina Clorhidrato), Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina), Vitamina B<sub>3</sub> (Nicotinamida), Vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina Clorhidrato) y Ciproheptadina HCl.

La Validación fue prospectiva, la cual es requerida, particularmente para aquellos productos que han sido introducidos en los últimos 7 u 8 años, o para aquellos en los cuales se han hecho cambios en el proceso de fabricación.<sup>(5)</sup>

El desarrollo del Programa de Validación incluyó un Protocolo de Validación, que consistió en un plan escrito que indica cómo la validación fue conducida, incluyendo los parámetros de prueba, las características del producto, equipo de análisis, y puntos de decisión en lo que constituye un resultado de prueba aceptable (criterios de aceptación).

Este documento se revisó y autorizó antes de ser ejecutado. Una vez finalizado el estudio, el protocolo y los resultados sirvieron de base para documentar que la Metodología Analítica se comporta según lo previsto.

El protocolo fue estructurado en orden secuencial, donde debe seguirse paso a paso las indicaciones establecidas.

#### 4.4 PROTOCOLO DE VALIDACION VITAMINAS

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 1 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :	Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL
	Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL
	Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL
	Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

##### 1-Alcance:

Metodología Analítica para la cuantificación de cuatro de las Vitaminas del Complejo B, en Jarabe Multivitaminico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), elaborado en un Laboratorio Farmacéutico Nacional.

##### 2-Objetivo:

Demostrar la eficacia del método analítico para la cuantificación de cuatro de las Vitaminas del Complejo B las cuales son Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>), Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>), Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>), Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) en Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl.

##### 3-Responsabilidades:

- Es responsabilidad del Gerente de Control de Calidad la autorización del protocolo para su ejecución.
- Es obligación del Coordinador de Validación velar por el cumplimiento del protocolo de validación.
- Cada analista realizará los pasos establecidos en este protocolo.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 2 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

- El analista deberá reportar los datos obtenidos por medio de un análisis estadístico.
- El analista debe preparar las soluciones a utilizar así como también la fase móvil, y asegurarse que las condiciones de operación del equipo sean adecuadas antes de utilizarlo.

#### 4-Características a evaluar del Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl:

Líquido transparente color amarillo, con aroma a piña, contenido en un frasco P.V.C. color ámbar.

Se analizará el ensayo de potencia de cada una de las vitaminas en el Jarabe Multivitaminico:

»La solución oral de Clorhidrato de Tiamina contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 250,0 por ciento de Clorhidrato de Tiamina (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>OS·HCl), declarada en la etiqueta. «<sup>(4)</sup>

«La solución oral de Riboflavina contiene no menos del 90,0 por ciento y no más del 150,0 por ciento de Riboflavina (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>·2H<sub>2</sub>O), declarada en la etiqueta. » <sup>(4)</sup>

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 3 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

« La solución oral de Nicotinamida contiene no menos del 90,0 por ciento y no más del 150,0 por ciento de Nicotinamida (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O), declarada en la etiqueta»

» La solución oral de Clorhidrato de Piridoxina contiene no menos del 90,0 por ciento y no más de 150,0 por ciento de la cantidad de Clorhidrato de Piridoxina (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> · HCl), declarada en la etiqueta. «<sup>(4)</sup>

### 5-Parámetros a Evaluar

- Precisión del Sistema
- Adecuabilidad del Sistema
- Linealidad del Sistema
- Exactitud
- Reproducibilidad del Método
- Linealidad del Método
- Precisión del Método
- Estabilidad Analítica de la Muestra
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Robustez
- Tolerancia

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 4 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 6-Recursos a utilizar:

### 6.1-Equipo General

- Balanza analítica, Mettler Toledo<sup>®</sup> modelo AX205, Delta Range<sup>®</sup>
- Ultra sonido, Branson modelo 221DR-MTH.
- Bomba al vacío, General Electric, modelo 5KH330N16HX.
- Cabina de extracción de gases LABCONCO, para manipulación y preparación de reactivos.

### 6.2-Equipo Analítico

- pH-metro Digital Orion<sup>®</sup> modelo 520<sup>a</sup> con electrodo combinado de vidrio, con sensor de temperatura.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) Merck Hitachi LaChrom Elite, Detector Arreglo de Diodos L-2450, Horno L1300, Automuestreador L2200, Bomba L2130.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 5 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 7- Materiales

### 7.1-Material General:

- Vaso de precipitado con capacidad de 30 mL, 100 mL, 500mL,1000 mL, 1500 mL
- Probeta de 250 mL y 1000 mL
- Micro espátula
- Embudo cónico
- Papel filtro Whatman # 1
- Filtro Membrana de Nylon 0.2 µm 47 mm Whatman
- Filtro de Nylon Acrodisc 0.2 µm
- Jeringa con capacidad de 10 mL
- Papel glassin

### 7.2-Material Volumétrico Clase A:

- Pipetas Volumétricas de 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL,
- Balones volumétricos de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL, (todo material de vidrio lavado antes de cada uso con jabón alcalino, agua desmineralizada)

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 6 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 8-Reactivo de Uso General.

- Agua Desmineralizada
- Acido Fosfórico 3 M
- Fosfato de sodio monobásico
- Metanol HPLC
- Agua HPLC
- Acetonitrilo HPLC
- Heptano Sulfonado de Sodio

### 9-Estándares de Trabajo

- Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub> )
- Riboflavina 5-fosfato (Vit. B<sub>2</sub>)
- Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>)
- Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>)

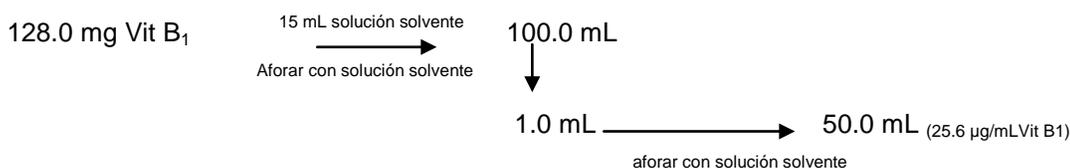
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 7 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 10-Preparación de Soluciones con Estándares

### 10.1-Solución Madre I (80%) de Tiamina:

Pesar un equivalente a 128.0 mg de Tiamina Clorhidrato ( Vit. B<sub>1</sub> ), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre I (80%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 25.6 µg/mL de Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>).

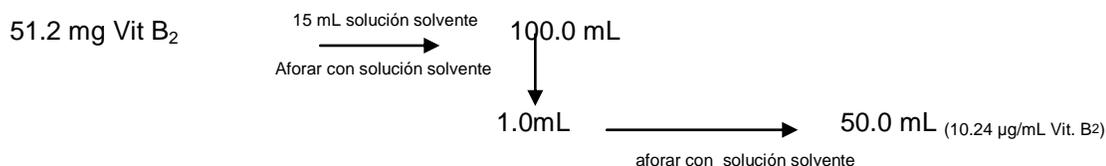


### 10.2-Solución Madre I (80%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 51.2 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 8 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

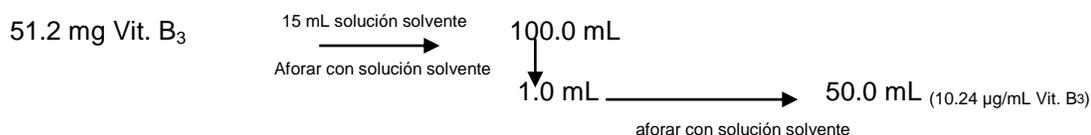
Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre I (80%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 10.24 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).



### 10.3-Solución Madre I (80%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 51.2 mg de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre I (80%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 10.24µg/mL de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>).

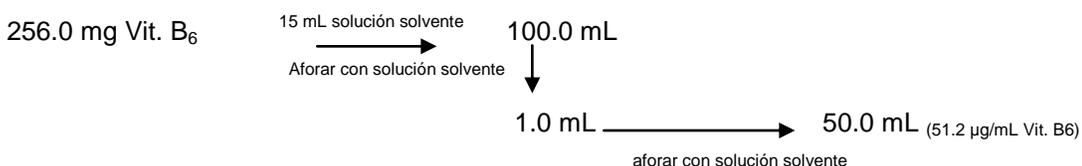


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 9 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

#### 10.4-Solución Madre I (80%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 256.0 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre I (80%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 51.2 µg/mL Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>)

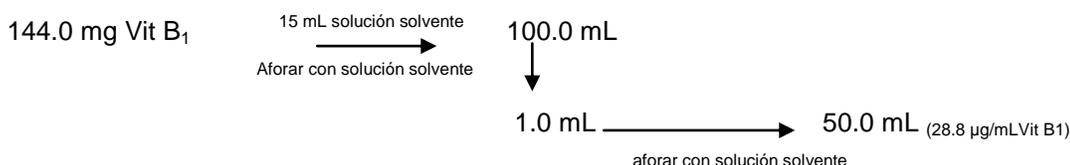


#### 10.5-Solución Madre II (90%) de Tiamina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 144.0 mg de Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre II (90%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 28.8µg/mL de Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>)

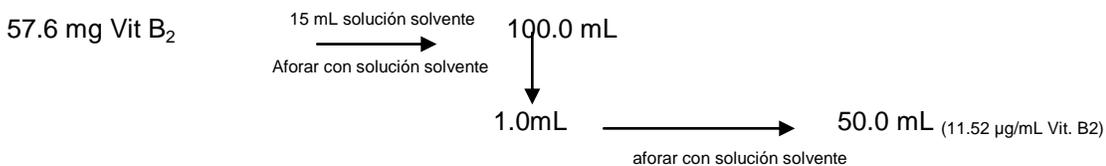
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 10 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		



### 10.6-Solución Madre II (90%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 57.6 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre II (90%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 11.52 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).

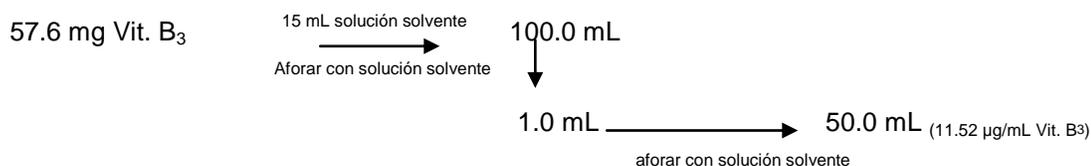


### 10.7-Solución Madre II (90%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 57.6 mg de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 11 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

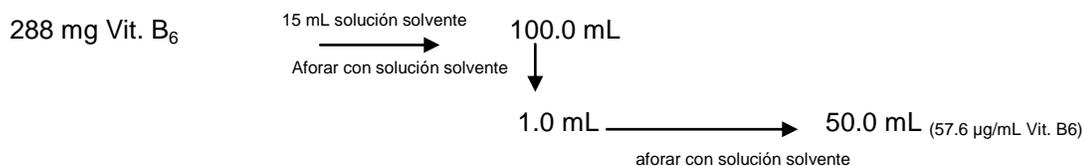
Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre II (90%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 11.52 µg/mL de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>).



### 10.8-Solución Madre II (90%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 288.0 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre II (90%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 57.6 µg/mL Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>).

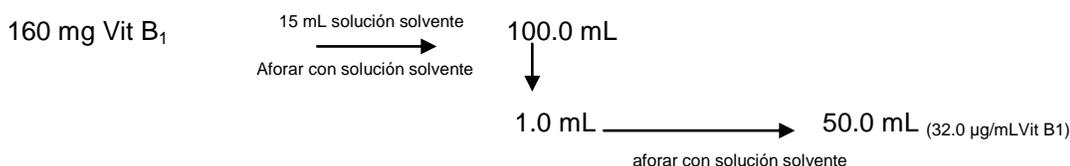


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 12 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 10.9-Solución Madre III (100%) de Tiamina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 160 mg de Tiamina Clorhidrato ( Vit. B<sub>1</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III (100%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 32.0 µg/mL de Tiamina Clorhidrato ( Vit. B<sub>1</sub>)

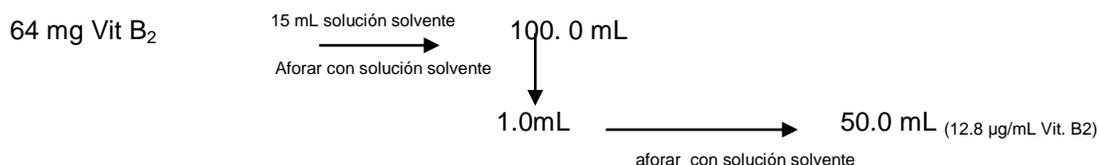


### 10.10-Solución Madre III (100%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 64.0 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III (100%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 12.8 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).

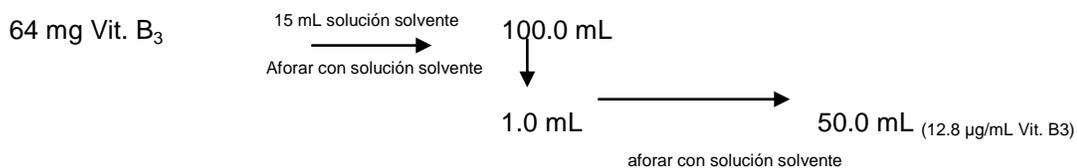
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 13 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		



### 10.11-Solución Madre III (100%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 64.0 mg de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III (100%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 12.8 µg/mL de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>).

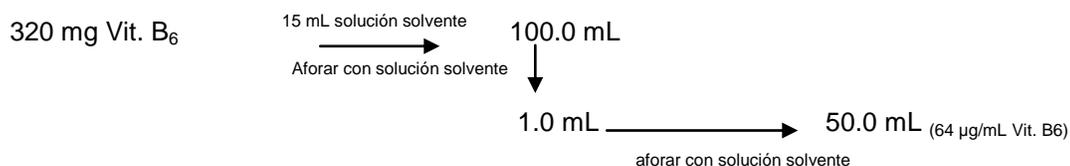


### 10.12-Solución Madre III (100%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 320.0 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 14 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

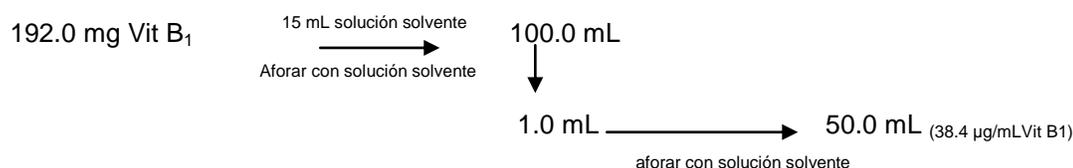
Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III (100%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 64 µg/mL Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>).



#### 10.13-Solución Madre IV (120%) de Tiamina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 192.0 mg de Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III (100%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 38.4 µg/mL de Tiamina Clorhidrato (Vit. B<sub>1</sub>).

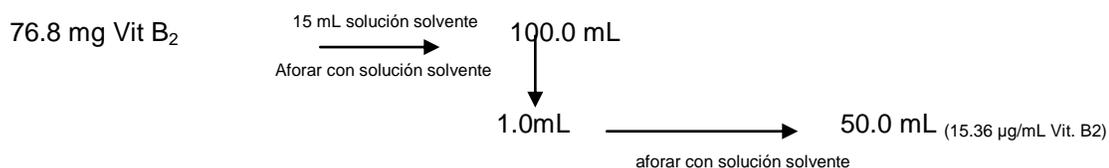


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 15 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

#### 10.14-Solución Madre IV (120%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 76.8 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre IV (120%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 15.36 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).



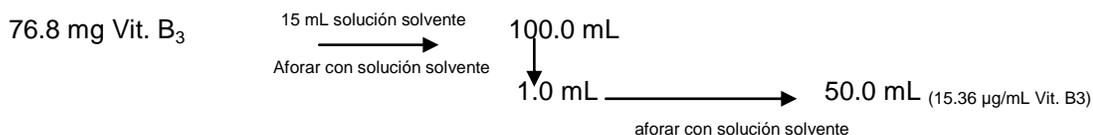
#### 10.15-Solución Madre IV (120%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 76.8 mg de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre IV (120%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente,

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 16 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

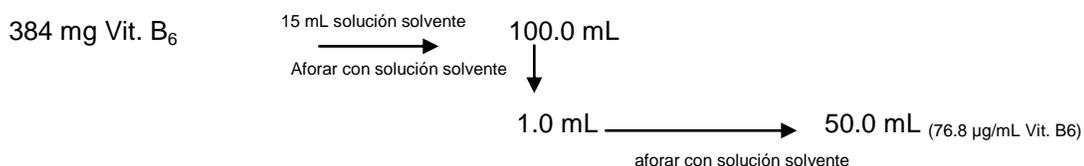
esta solución tiene una concentración de 15.36 µg/mL de Nicotinamida ( Vit. B<sub>3</sub>).



#### 10.16-Solución Madre IV (120%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 384.0 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre IV (120%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 76.8 µg/mL Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>)

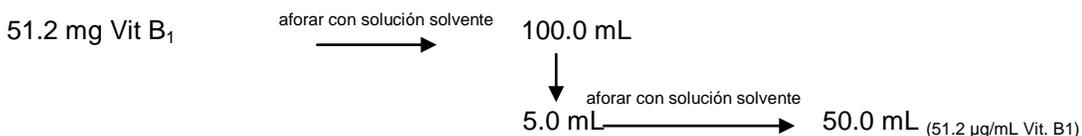


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 17 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTVIT001	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 10.17-Solución Madre V (160%) de Tiamina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 51.2 mg de Tiamina Clorhidrato ( Vit. B<sub>1</sub> ), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente.

Se Tomará una alícuota de 5.0 mL de la Solución Madre V (160%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 51.2 µg/mL de Tiamina HCl ( Vit. B<sub>1</sub> )

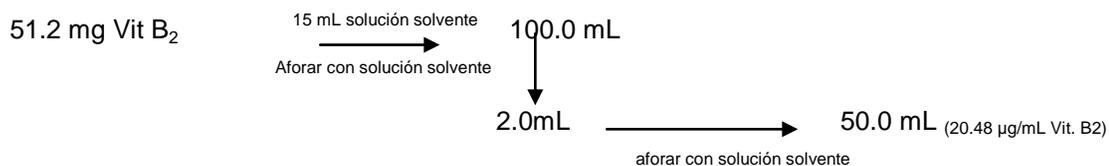


### 10.18-Solución Madre V (160%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 51.2 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre V (160%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 20.48 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).

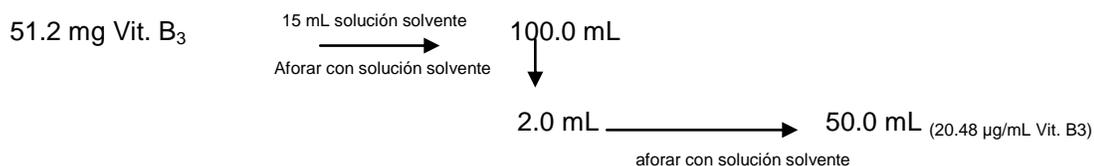
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 18 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		



#### 10.19-Solución Madre V (160%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 51.2 mg de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre V (160%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 20.48 µg/mL de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>).

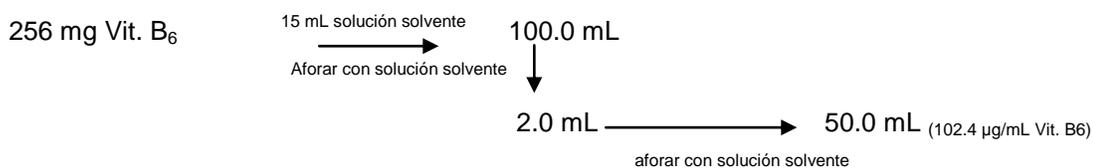


#### 10.20-Solución Madre V (160%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 256.0 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 19 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

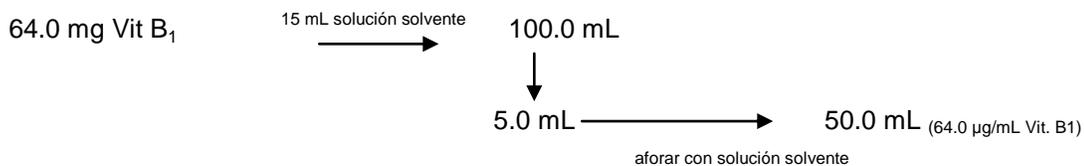
Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre V (160%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 102.4 µg/mL Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>)



#### 10.21-Solución Madre VI (200%) de Tiamina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 64.0 mg de Tiamina Clorhidrato (Vit B<sub>1</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente.

Se Tomará una alícuota de 5.0 mL de la Solución Madre VI (200%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 64.0 µg/mL de Tiamina Clorhidrato (Vit B<sub>1</sub>).

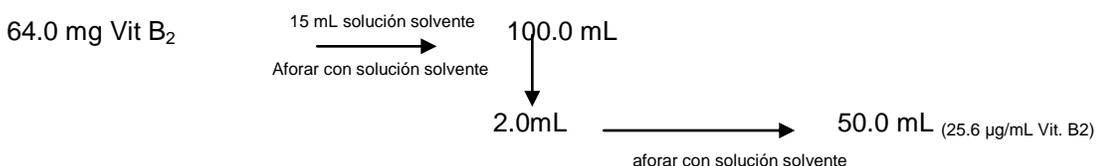


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 20 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 10.22-Solución Madre VI (200%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 64.0 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre VI (200%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 25.6 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).



### 10.23-Solución Madre VI (200%) de Nicotinamida:

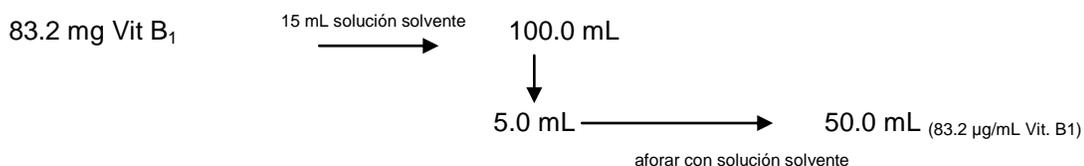
Pesar un equivalente a 64.0 mg de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre VI (200%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 25.6 µg/mL de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>).



PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 22 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

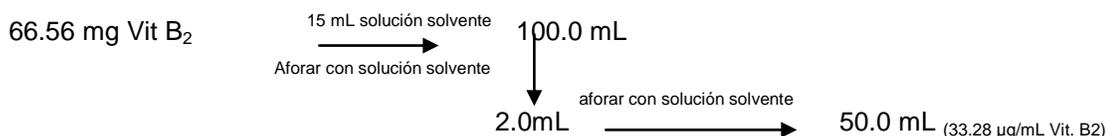
Se Tomará una alícuota de 5.0 mL de la Solución Madre VII (260%) de Tiamina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 83.2 µg/mL de Tiamina Clorhidrato (Vit B<sub>1</sub>).



#### 10.26-Solución Madre VII (260%) de Riboflavina:

Pesar un equivalente a 66.56 mg de Riboflavina, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre VII (260%) de Riboflavina y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 33.28 µg/mL de Riboflavina (Vit B<sub>2</sub>).

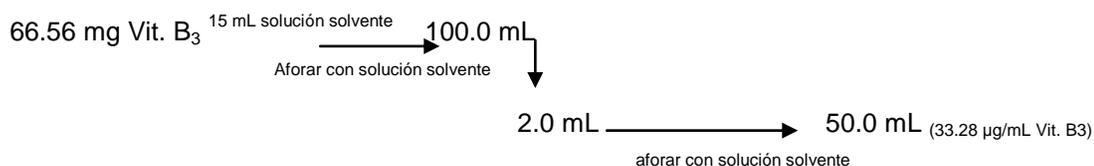


PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 23 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 10.27-Solución Madre VII (260%) de Nicotinamida:

Pesar un equivalente a 66.56 mg de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>), transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 2.0 mL de la Solución Madre VII (260%) de Nicotinamida y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 33.28 µg/mL de Nicotinamida (Vit. B<sub>3</sub>).

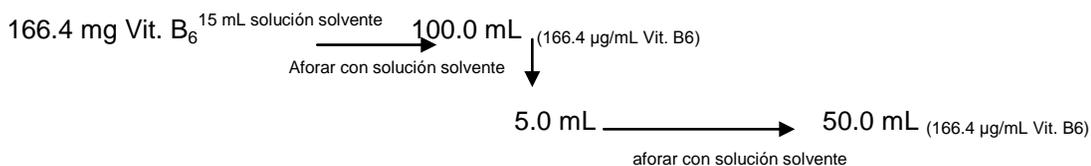


### 10.28-Solución Madre VII (260%) de Piridoxina Clorhidrato:

Pesar un equivalente a 166.4 mg Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>) transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de solución solvente y agitar por 10 minutos, aforar con solución solvente (descrita posteriormente).

Se Tomará una alícuota de 5.0 mL de la Solución Madre VII (260%) de Piridoxina Clorhidrato y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solución solvente, esta solución tiene una concentración de 166.4 µg/mL de Piridoxina Clorhidrato (Vit. B<sub>6</sub>).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 24 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		



Los estándares de trabajo hay que ajustarlos ya que no se encuentran al 100%, se debe de secar en el desecador un día antes de ser utilizados y guardarlo en un desecador. Las cantidades de las concentraciones finales se determinaron en base a la resolución de los picos de cada una de las Vitaminas.

**10.29 Blanco:** consiste en la mezcla de solventes que son utilizados en la preparación de las muestras.

**10.30 Placebo:** contiene todos los componentes de la formulación del jarabe incluyendo la Ciproheptadina Clorhidrato sin tomar en cuenta las vitaminas.

**10.31 Placebo Analítico:** consiste en el placebo más una cantidad equivalente al 100% de la concentración declarada de cada una de las vitaminas.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 25 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 11-Preparación de Soluciones

### 11.1-Buffer Fosfato pH 2.5 10mM:

Pesar exactamente 1.3799 g de fosfato de sodio monobásico, transferir a un balón volumétrico de 1000 mL , agregar 500 mL de agua destilada, disolver con agitación magnética por 10 minutos, hasta disolución completa, aforar con agua destilada, transferir esta solución a un beaker con capacidad de 1500 mL , verificar el pH y si es necesario ajustar hasta un pH de 2.5 con acido fosfórico 3M.

### 11.2-Solución Solvente Metanol:Buffer Fosfato pH 2.5 10mM (25:75)

Para 1000 mL de la solución, colocar en un beaker de 1000 mL, adicionar 250 mL de metanol y 750 mL de buffer fosfato pH 2.5 10mM y homogenizar la solución con agitación mecánica.

### 11.3-Buffer fosfato pH:2.5, 10mM conteniendo Heptano sulfonado de sodio 5 mM:

Pesar exactamente 1.3799 g de fosfato de sodio y 1.01125 g de heptano sulfonado de sodio , transferir a un balón volumétrico de 1000 mL , adicionar

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 26 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

500 mL de agua grado HPLC , disolver por 10 minutos con agitación magnética, aforar con agua grado HPLC, transferir a un beaker de 1500 mL y ajustar el pH 2.5 con gotas de ácido fosfórico.

#### **11.4-Fase móvil para la cuantificación de las vitaminas: Metanol: Buffer fosfato 10mM pH 2.5 conteniendo Heptano sulfonado de sodio 5 mM.**

Para 1000 mL de fase móvil colocar en un beaker de 1000 mL, 250 mL de Metanol grado HPLC y adicionar 700 mL de buffer fosfato 10 mM contiendo heptano sulfonado de sodio 5 mM, homogenizar la solución con agitación mecánica, filtrar esta solución por medio de un filtro Membrana de Nylon 0.2 µm 47 mm Whatman, con ayuda de una bomba al vacío, verter la solución filtrada en un frasco con capacidad de 1000 mL y colocar en el ultrasonido por 10 minutos para desgasificar.

## **12- Parámetros a Evaluar**

### **12.1-Precisión del Sistema**

Se prepara por separado seis muestras a partir de la Solución madre III (ver preparación de soluciones), tomando seis alícuotas individuales de 1.0 mL de cada una de las vitaminas y aforar a 50.0 mL, se inyectan por separado.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 27 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Con los datos de los resultados obtenidos se calcula la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (CV) utilizando un programa en Excel con las siguientes fórmulas de:

$\bar{y}$  = Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

S = Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

CV = Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y = Áreas (las áreas se trabajan individualmente para cada una de las vitaminas).

*Criterio de Aceptación*

$$CV \leq 1.5 \%$$

## 12.2-Adecuabilidad del Sistema

Se inyectan cinco replicas de la solución III para la adecuabilidad (ver preparación de soluciones descritas anteriormente). Se reporta la respuesta del

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 28 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

analito de cada una de las vitaminas, calculando el Coeficiente de Variación (CV).

En los cromatogramas obtenidos se determinará el factor de cola (T), la resolución (R) y la precisión de la inyección (CV). Los cálculos se realizarán en un programa de Excel con las siguientes fórmulas:

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{N}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y = Área de Pico

*Criterio de Aceptación*

CV ≤ 2 %

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 29 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.3-Linealidad del Sistema.

Para el estudio de la linealidad del sistema se usará una curva de calibración en un intervalo de concentración (80-260 % de la cantidad teórica declarada para cada una de las vitaminas), que incluye 5 concentraciones diferentes. El análisis se realizará con tres replicas.

Se prepararán tres replicas a siete niveles de concentración (80%, 90%, 100%, 120% 160%, 200%, 260%) de la solución de referencia por pesadas independientes (ver preparación de soluciones). Se medirá la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, se reportará la relación concentración vrs. respuesta analítica.

Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada en el origen (a), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ), los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas :

Pendiente

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de eventos (concentración – respuesta del analito)

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 30 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo : Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Ordenada al Origen

$$a = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{[(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}) (\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})]}}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b \pm t_{0.975, n-2} S_b$$

$$S_{b1} = S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy + b_0 \sum y}{n - 2}}$$

*Criterio de Aceptación*

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

IC( $\beta_1$ ), no debe incluir el cero.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 31 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 12.4-Exactitud

Preparar tres muestras seleccionando tres concentraciones dentro del rango de la linealidad (80%,100%,160%), se analizarán las muestras por tres replicas. Calcular el media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y Test de Student, los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas:

Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{N}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y =Área de Pico

*Criterios de aceptación:*

Si el  $t_{exp} < t_{tabla}$  significa que el método analítico tiene la exactitud requerida.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 32 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.5- Repetibilidad del Método

Preparar cinco placebos al 100% de lo rotulado de cada una de las vitaminas (Solución Madre III), por un mismo analista, a las mismas condiciones usando como referencia la sustancia empleada a la adición del placebo analítico.

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la solución madre (Solución Madre III) y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solvente, inyectar por separado las muestras.

Placebo analítico	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	Porcentaje de recobro

Calcular el media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), intervalo de confianza para la medida poblacional IC( $\mu$ ) del porcentaje de recobro,

*Criterios de aceptación:*

$$CV < 2\%$$

El Intervalo de Confianza para la media poblacional IC( $\mu$ ), debe de incluir el 100%.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 33 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.6-Linealidad del Método e Intervalo de confianza.

Para el estudio de este parámetro se hará la preparación de muestras con diferentes niveles de cada una de las vitaminas, que representan el 80%, 90%, 100%, 120% y 160%, 200% y 260% de la concentración teórica del principio activo en el jarabe, según la formulación propuesta. Simultáneamente, se analizará la linealidad del método y el intervalo. El análisis se realizará con tres replicas de cada Solución Madre I, II, III, IV, V, IV Y IIV (anteriormente descritas)

#### *Criterios de aceptación:*

Cantidad adicionada vrs cantidad recuperada  $r^2 \geq 0.98$

El Intervalo de Confianza para la pendiente IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad.

El Intervalo de Confianza para el punto de origen IC( $\beta_0$ ), debe incluir el cero.

El IC( $\mu$ ) debe incluir sólo el 100%.

El CV del porcentaje de recuperación no debe ser mayor al 2% para método cromatográficos.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 34 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.7-Precisión del método (Precisión Intermedia)

Este estudio se deberá realizar a partir de la preparación de cinco muestras a diferentes niveles de concentración, que representan el 80%, 90%, 100%, 120% y 160 % de la concentración teórica de cada una de las vitaminas. El análisis se realizará con tres replicas de cada Solución Madre I, II, III, IV y V (anteriormente descritas) se efectuará las valoraciones por 2 analistas en 2 días diferentes.

Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV), los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas:

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{N}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 35 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

n = número de eventos

y =Área de Pico

*Criterios de aceptación:*

CV ≤ 2%

### 12.8-Estabilidad Analítica de la muestra:

Se debe analizar una muestra homogénea con tres replicas, fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de interés, procesar tres muestras para cada condición de almacenamiento hasta la etapa pre-establecida. Analizar las muestras al término de cada condición de almacenaje; 0, 6, 24, 36 horas, utilizando una solución al 100.0%

Se Tomará una alícuota de 1.0 mL de la Solución Madre III y transferir a un balón de 50.0 mL aforar con solvente, inyectar por separado tres muestras.

Calcular la media aritmética y su diferencia absoluta al análisis inicial y de cada condición de almacenaje.

*Criterios de aceptación:*

/di/ ≤ 2%

/di/ = diferencia absoluta de la media

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 36 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.9-Limite de Detección del analito:

El analista debe determinar la cuantificación de las muestras del blanco y de los placebos analíticos, las respuestas de estas muestras deben estar en un intervalo de concentración del analito. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de 3 a 1 esto corresponde a la concentración asociada al límite de detección.

Muestra	Señal analítica (áreas)
Blanco o ruido	+
3 veces el ruido	+

+ Áreas de picos

Analito (µg/mL)	Señal analítica (áreas)
0.10	+
0.20	+
0.30	+
0.40	+
0.50	+

*Criterios de aceptación:*

LD se estima en "X" µg/mL que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a tres veces el ruido.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 37 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )		5.0 mg / 5mL
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )		2.0 mg / 5mL
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )		2.0 mg / 5mL
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )		10.0 mg / 5mL
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.10-Limite de Cuantificación:

Determinar la señal de muestra (blanco) y la señal analítica de muestras (placebo analítico) a concentraciones conocidas del analito, determinar la cantidad del analito cuya señal sea similar o mayor de la muestra blanco en una porción de 10 a 1 lo que corresponde a la cantidad asociada del limite de cuantificación.

Muestra	Señal analítica (áreas)
Blanco o ruido	+
10 veces el ruido	+

Analito (µg/mL)	Señal analítica (áreas)
0.5	+
1.0	+
1.5	+
2.0	+
2.5	+

#### *Criterios de aceptación:*

LC se estima en "X" µg/mL que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a diez veces el ruido.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 38 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.11-Robustez:

Preparar tres diferentes proporciones de fase (baja, normal y alta) en cada condición de operación se analiza la misma muestra con tres replicas.

Reportar el contenido de potencia del analito para las muestras de condición normal de operación, y para las muestras de las otras condiciones de operación expresadas por porcentaje.

	Condición		
	Baja	Normal	Alta
Muestra	72%	75%	78%
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+

Calcular la media aritmética y diferencia absoluta

*Criterios de aceptación:*

$$|di| \leq 2\%$$

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 39 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo : Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina ( Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl ( Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 12.12-Tolerancia

Se fijarán 2 condiciones de uso (cambio de reactivos y cambio de columna) y se analizará una misma muestra por duplicado o triplicado a cada condición. Se reportará el contenido del analito de todas las muestras.

Muestra	Columna 1	Columna 2	Muestra	Reactivo 1	Reactivo 2
1	+	+	1	+	+
2	+	+	2	+	+
3	+	+	3	+	+

Se calculará la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido del analito. los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas :

Media Aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de eventos de contenido

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 40 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### *Criterio de Aceptación*

CV ≤ 2%

## **13-Técnica de análisis para Jarabe Multivitaminico con estimulante del apetito (Cuantificación de Vitaminas)**

### **13.1-Preparación del Estándar de Multivitaminas**

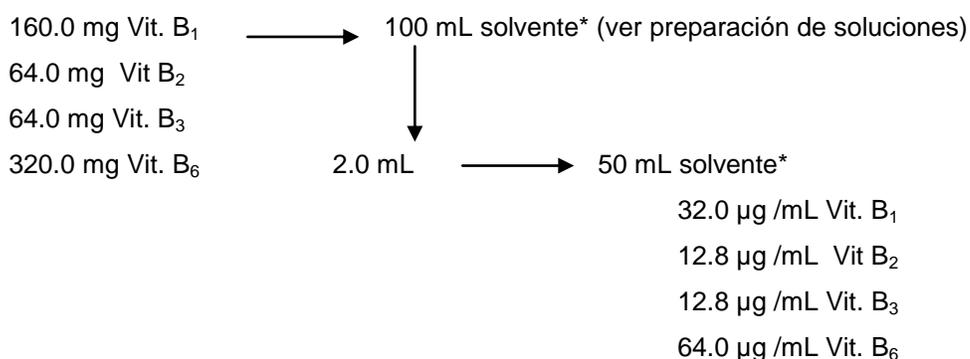
Pesar exactamente 160.0 mg de Vitamina B<sub>1</sub>, 64.0 mg de Vitamina B<sub>2</sub>, 320.0 mg de Vitamina B<sub>6</sub>, 64.0 mg Nicotinamida, transferir cada una a un mismo balón volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL del solvente y colocar el balón en ultrasonido por 15 minutos hasta disolución completa, aforar con solvente. De esta solución tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y transferir a un balón de 50 mL, aforar con solvente, filtrar con filtro 0.2 µm.

Esta solución contiene 32.0 µm de Vitamina B<sub>1</sub>, 12.8 µg de vitamina B<sub>2</sub>, 64.0 µg de Vitamina B<sub>6</sub>, 12.8 µg de Nicotinamida.

Los estándares deben de ajustarse al 100% para cada una de las vitaminas

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 41 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### Esquema de Preparación de Estándar de Multivitaminas



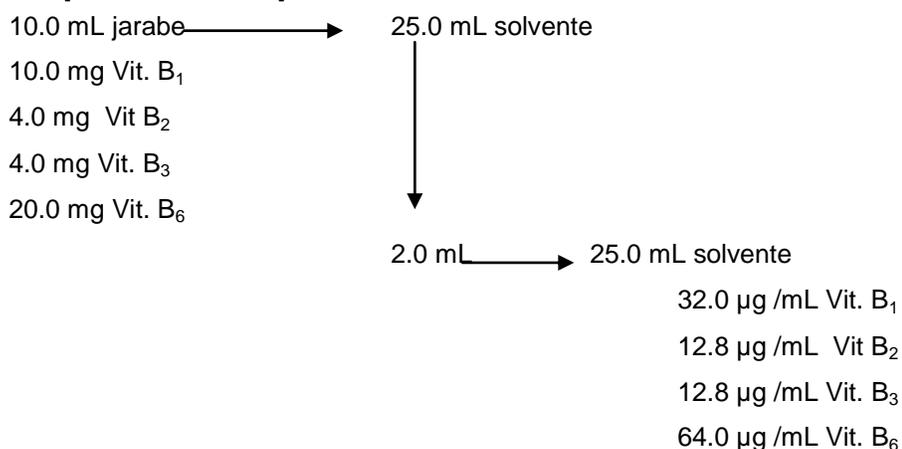
### 13.2-Preparación de Muestra para la cuantificación de las multivitaminas en Jarabe Multivitaminico con estimulante del apetito

Tomar una alícuota de 10.0 mL de jarabe multivitaminico, adicionar a un balón de 25.0 mL, y aforar con solvente. De esta solución pipetear 2.0 mL y transferir a un balón de 25.0 mL aforar con solvente, filtrar con filtro 0.2 µm.

Esta solución contiene 32.0 µg de Vitamina B<sub>1</sub>, 12.8 µg de vitamina B<sub>2</sub>, 12.8 µg de Vitamina B<sub>6</sub>, 64 µg de Nicotinamida.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 42 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### Esquema de Preparación de muestra de Jarabe Multivitaminico



### 13.3-Condiciones Cromatográficas

Columna: Selec B y precolumna Selec B

Longitud de onda 280 nm

Temperatura ambiente

Flujo 1.5 mL/min.

Volumen de Inyección 20 µL

### 13.4-Procedimiento General

-Después de la preparación de las soluciones que se van a inyectar se debe de acondicionar el equipo.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 43 de 44
<b>Nombre del Producto :</b> Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		<b>Fecha : 11-2006</b>
		<b>Código:VPTVIT001</b>
		<b>Tipo de Validación: Prospectiva</b>
<b>Nombre del Activo :</b> Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
<b>Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado</b>		

- Se debe asegurar de que los frascos de solventes estén llenos, y se programa el equipo para purgar las líneas.
- Adecuar las condiciones del Cromatógrafo líquido de Alta Presión (HPLC), según las especificaciones.
- Escoger el método de Multivitaminas con Estimulante y programar el método según el tiempo de retención y el tiempo de las corridas.
- Colocar las muestras previamente filtradas en viales de 2 mL y taparlos, colocarlos en una bandeja con capacidad para 200 muestras, el orden dentro de la bandeja depende de la programación en el método identificándolas en una tabla de muestras.
- Inyectar el estándar por medio de una corrida de prueba, para hacer los ajustes en el método, si fuese necesario.
- Programar el equipo para inyectar por medio del automuestreador cada una de las soluciones.
- El programa del equipo graficara los cromatogramas y resultados de las inyecciones de cada una de las diferentes soluciones.
- El reporte que el equipo proporciona dará la concentración de las soluciones, numero de platos teóricos, la asimetría del pico entre otros datos.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 44 de 44
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina		Fecha : 11-2006
		Código:VPTVIT001
		Tipo de Validación: Prospectiva
Nombre del Activo :Tiamina HCl ( Vit. B <sub>1</sub> )	5.0 mg / 5mL	
Riboflavina (Vit B <sub>2</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Nicotinamida ( Vit. B <sub>3</sub> )	2.0 mg / 5mL	
Piridoxina HCl (Vit. B <sub>6</sub> )	10.0 mg / 5mL	
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 13-Referencia bibliográfica:

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Validación de Métodos Analíticos, AEFI, sección Catalana.
- Diplomado de Buenas Practicas de Laboratorio en la Industria Farmacéutica, Validación de Métodos Analíticos, Martha Elena Polanco, Abril 2006.
- The United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia of the United States of America,(USP) 29 Edición en español 2006, Twinbrook, Parkway, Roekvill
- ICH Harmonized Tripartite Guideline, Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A, 27 October 1994.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline, Text on Validation of Analytical Procedures, Methodology Q2S, 6 November 1996.

## 4.5 PROTOCOLO DE VALIDACION CIPROHEPTADINA

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 1 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 1-Alcance:

Metodología Analítica para la cuantificación de Ciproheptadina como estimulante del apetito en un Jarabe Multivitamínico por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), elaborado en un Laboratorio Farmacéutico Nacional.

### 2-Objetivo:

Demostrar que la metodología analítica es eficaz para la cuantificación de Ciproheptadina en un Jarabe Multivitamínico.

### 3-Responsabilidades:

- Es responsabilidad del Gerente de Control de Calidad la autorización del protocolo para su ejecución.
- Es obligación del Coordinador de Validación velar por el cumplimiento del protocolo de validación.
- Cada analista realizará los pasos establecidos en este protocolo.
- El analista debe de preparar las soluciones a utilizar así como también la fase móvil, y asegurarse que las condiciones de operación del equipo sean adecuadas antes de utilizarlo.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 2 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

- El analista deberá reportar los datos obtenidos por medio de un análisis estadístico.

#### **4-Características a evaluar de Jarabe Multivitaminico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina:**

Líquido transparente color amarillo, con aroma a piña, contenido en un frasco P.V.C. color ámbar.

Se realizará el ensayo de potencia para cuantificar la cantidad de Ciproheptadina en el Jarabe Multivitaminico:

» La Solución Oral de Ciproheptadina Clorhidrato ( $C_{21}H_{22}N.HCl$ ) contiene no menos de 90 por ciento y no más de 110 por ciento de la cantidad de Ciproheptadina base ( $C_{21}H_{22}N$ ) declarada en la etiqueta «

#### **5-Parámetros a Evaluar**

- Precisión del Sistema
- Adecuabilidad del Sistema
- Linealidad del Sistema
- Exactitud
- Reproducibilidad del Método

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 3 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

- Linealidad del Método
- Precisión del Método
- Estabilidad Analítica de la Muestra
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Robustez
- Tolerancia

## 6-Recursos a utilizar:

### 6.1-Equipo General

- Balanza analítica, METTLER TOLEDO® modelo AX205, Delta Range®
- Ultra sonido, BRANSON modelo 221DR-MTH.
- Bomba al vacío, GENERAL ELECTRIC, modelo 5KH330N16HX.
- Cabina de extracción de gases LABCONCO, para manipulación y preparación de reactivos.

### 6.2-Equipo Analítico

- pH-metro DIGITAL ORION® modelo 520<sup>a</sup> con electrodo combinado de vidrio y sensor de temperatura.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 4 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

- Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) MERCK Hitachi LaChrom Elite, Detector Arreglo de Diodos L-2450, Horno L1300, Automuestreador L2200, Bomba L2130.

## 7-Materiales:

### 7.1-Material General:

- Vasos de precipitado con capacidad de 30 mL, 100 mL, 500mL
- Probeta de 250 mL, 1000 mL
- Papel filtro Whatman # 1
- Filtro Membrana de Nylon 0.2 µm 47 mm Whatman
- Filtro de Nylon Acrodisc 0.2 µm
- Jeringa con capacidad de 10 mL
- Papel glassin.

### 7.2-Material Volumétrico Clase A:

- Pipetas Volumétricas de 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL,
- Balones volumétricos de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL, (todo material de vidrio lavado antes de cada uso con jabón alcalino, agua destilada).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 5 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 8-Reactivo de Uso General.

- Agua Desmineralizada
- Acido Fosfórico 3 M
- Fosfato de potasio monobásico
- Metanol HPLC
- Agua HPLC
- Acetonitrilo HPLC

#### 8.1-Estándares de Trabajo

- Clorhidrato de Ciproheptadina

### 9-Preparación de Soluciones con estándares

Todas las soluciones deben de ser de preparación reciente.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 6 de 27
Nombre del Producto : Multivitámico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

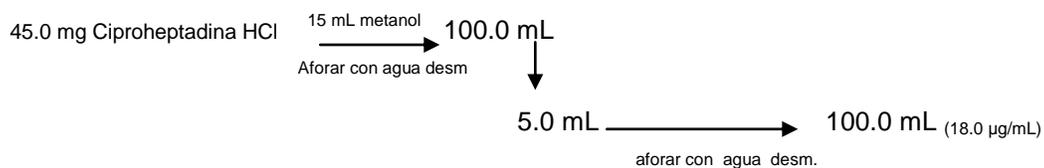
### 9.1-Solución Madre I (80%):

Pesar un equivalente a 40.0 mg de Ciproheptadina Clorhidrato estándar de trabajo, transferir a un balón volumétrico de 100 mL adicionar 15 mL de Metanol y agitar por 10 minutos, aforar con agua desmineralizada, tomar una alícuota de 4.0 mL de la Solución anterior y transferir a un balón volumétrico de 100 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 16.0  $\mu\text{g/mL}$ .



### 9.2-Solución Madre II (90%) :

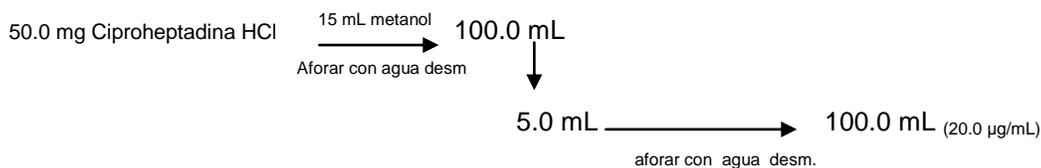
Pesar un equivalente a 45.0 mg de Ciproheptadina Clorhidrato estándar de trabajo, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de Metanol y agitar por 10 minutos, aforar con agua desmineralizada, tomar una alícuota de 4.0 mL de la Solución anterior y transferir a un balón de 100.0 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 18.0  $\mu\text{g/mL}$ .



PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 7 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

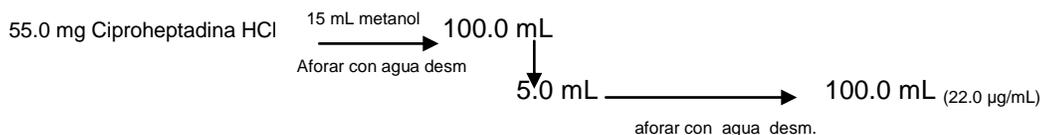
### 9.3-Solución Madre III (100%):

Pesar un equivalente a 50.0 mg de Ciproheptadina Clorhidrato estándar de trabajo, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de Metanol y agitar por 10 minutos, aforar con agua desmineralizada, tomar una alícuota de 4.0 mL de la Solución anterior y transferir a un balón de 100.0 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 20.0 µg/mL.



### 9.4-Solución Madre IV (110%):

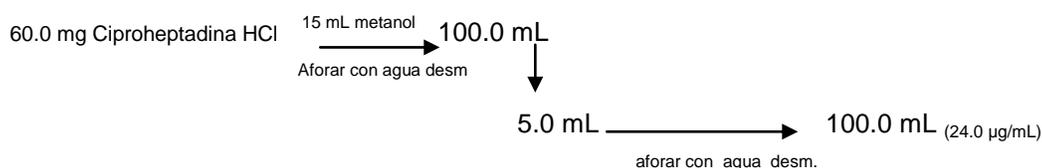
Pesar un equivalente a 55.0 mg de Ciproheptadina Clorhidrato estándar de trabajo, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de Metanol y agitar por 10 minutos, aforar con agua desmineralizada, tomar una alícuota de 4.0 mL de la Solución anterior y transferir a un balón de 100.0 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 22.0 µg/mL.



PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 8 de 27
Nombre del Producto : Multivitámico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 9.5-Solución Madre V (120%):

Pesar un equivalente a 60.0 mg de Ciproheptadina Clorhidrato estándar de trabajo, transferir a un balón de 100.0 mL adicionar 15 mL de Metanol y agitar por 10 minutos, aforar con agua desmineralizada, tomar una alícuota de 4.0 mL de la Solución anterior y transferir a un balón de 100.0 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 24.0 µg/mL.



El estándar de trabajo hay que ajustarlo ya que no se encuentra al 100%, se debe de secar en la estufa a 60°C por 2 horas un día antes de ser utilizado y guardarlo en un desecador.

## 10-Preparación de soluciones

### 10.1-Preparación Buffer fosfato pH 3.8

Pesar exactamente 1.36 g de Fosfato Potásico monobásico y transferir a un balón volumétrico de 1000 mL y agitar con agitador magnético por 5 minutos, y aforar con Agua HPLC, ajustar el pH con ácido fosfórico 3M.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 9 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 10.2-Fase móvil para la cuantificación de Ciproheptadina:Buffer fosfato pH

### 3.8: Acetonitrilo (50:50)

Para la preparación de 1000.0 mL de solución de fase móvil, medir 500 mL de buffer fosfato pH 3.8 y adicionarle 500 mL de acetonitrilo y agitar para homogenizar la solución, filtrar esta solución por medio de un filtro Membrana de Nylon 0.2  $\mu\text{m}$  47 mm, con ayuda de una bomba al vacío, verter la solución filtrada en un frasco de vidrio con capacidad de 1000.0 mL y colocar en el equipo HPLC.

Las soluciones no son desgasificadas antes de colocarlas en el equipo ya que el equipo esta provisto con un desgasificador automático.

## 11- Parámetros

### 11.1-Precisión del Sistema

Se preparan por separado seis muestras a partir de la Solución madre III (ver preparación de soluciones), tomando seis alícuotas individuales de 4.0 mL y aforarlas a 100.0 mL, las cuales tendrán una concentración de 20.0  $\mu\text{g/mL}$ , se inyectaran por separado.

N° muestra	Concentración	Porcentaje	Áreas
6	20.0 $\mu\text{g/mL}$	100 %	*

\*áreas de picos

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 10 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Con los datos de los resultados obtenidos se calculará la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (CV), los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas :

$\bar{y}$  = Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

S = Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

CV = Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y = Áreas de picos

*Criterio de Aceptación*

$$CV \leq 1.5 \%$$

### 11.2-Adecuabilidad del Sistema

Se inyectará cinco replicas de la Solución Madre III (20.0 µg/mL) de adecuabilidad. Reportará la respuesta del analito, calculando el Coeficiente de Variación (CV).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 11 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

N° muestra	Concentración	Porcentaje	Áreas
1	20.0 µg/mL	100 %	*
2	20.0 µg/mL	100 %	*
3	20.0 µg/mL	100 %	*
4	20.0 µg/mL	100 %	*
5	20.0 µg/mL	100 %	*

\* áreas de picos

En los cromatogramas obtenidos se determinará el factor de cola (T), la resolución (R) y la precisión de la inyección (Coeficiente de variación). Los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas :

Media aritmética

$$\bar{Y} = \frac{\sum y}{N}$$

N

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y =Área de Pico

*Criterio de Aceptación*

CV ≤ 2 %

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 12 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 11.3-Linealidad del Sistema.

Para el estudio de la Linealidad del Sistema se usará una curva de calibración en un intervalo de concentración desde 16.0 hasta 24.0 µg/mL (80-120 % de la cantidad teórica declarada), que incluye 5 concentraciones diferentes( 80%, 90%, 100%, 110%, 120 %). El análisis se realizará con tres replicas.

N° muestra	Concentración	Porcentaje	Replicas
1	16.0 µg/mL	80 %	3
2	18.0 µg/mL	90 %	3
3	20.0 µg/mL	100 %	3
4	22.0 µg/mL	110 %	3
5	24.0 µg/mL	120 %	3

Se medirá la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, se reportará la relación concentración vrs respuesta analítica.

Calcular el valor de la pendiente ( $b_1$ ), la ordenada en el origen ( $b_0$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ), los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas :

Pendiente

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de eventos (concentración – respuesta del analito)

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 13 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Ordenada en el Origen

$$a = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sqrt{\sum(x-x)^2 \sum(y-y)^2}}$$

Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Desviación estándar de regresión

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy + b_0 \sum y}{n - 2}}$$

*Criterio de Aceptación*

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

IC( $\beta_1$ ), no debe incluir el cero.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 14 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

#### 11.4-Exactitud

Preparar tres muestras seleccionando tres concentraciones dentro del rango de la linealidad (80%,100%,120%), se analizarán las muestras por tres replicas.

Calcular el media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y Test de Student, los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas:

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$Cv = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y =Área de Pico

*Criterios de aceptación:*

Si el  $t_{exp} < t_{tabla}$  significa que el método analítico tiene la exactitud requerida.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 15 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 11.5-Repetibilidad del Método

Preparar cinco placebos al 100% de lo rotulado (Solución Madre III), por un mismo analista, a las mismas condiciones usando como referencia la sustancia empleada a la adición del placebo analítico.

Calcular el media aritmética ( $\bar{y}$ ) desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV), intervalo de confianza para la medida poblacional IC( $\mu$ ) del porcentaje de recobro. Los cálculos se realizarán en un programa de Excel empleando las siguientes fórmulas:

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de eventos

y =Área de Pico

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 16 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

*Criterios de aceptación:*

$$CV < 2\%$$

El Intervalo de Confianza para la media poblacional IC( $\mu$ ), debe de incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo 98-102% para método cromatográfico.

#### **11.6-Linealidad del Método e Intervalo de Confianza.**

Para el estudio de este parámetro se hará la preparación de muestras con diferentes niveles de Ciproheptadina, que representan el 80%, 90%, 100%, 110% y 120 % de la concentración teórica del principio activo en el jarabe, según la formulación propuesta. Simultáneamente, se analizará la linealidad del método y el intervalo de confianza. El análisis se realizará con tres replicas de cada Solución Madre I, II, III, IV y V (anteriormente descritas).

N° muestra	Concentración	Porcentaje	Replicas
1	16.0 $\mu\text{g/mL}$	80 %	3
2	18.0 $\mu\text{g/mL}$	90 %	3
3	20.0 $\mu\text{g/mL}$	100 %	3
4	22.0 $\mu\text{g/mL}$	110 %	3
5	24.0 $\mu\text{g/mL}$	120 %	3

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 17 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S_{y/x} \times 100}{\bar{y}}$$

*Criterios de aceptación:*

Coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0.98$

El Intervalo de Confianza para la pendiente IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad.

El Intervalo de Confianza para el punto de origen IC( $\beta_0$ ), debe incluir el cero.

El IC( $\mu$ ) debe incluir solo el 100%

El CV del porcentaje de recuperación no debe ser mayor al 2% para método cromatográficos.

### 11.7-Precisión del método (Precisión Intermedia)

Este estudio se realizará a partir de la preparación de cinco muestras a diferentes niveles de Ciproheptadina, que representan el 80%, 90%, 100%, 110% y 120 % de la concentración teórica del principio activo en el jarabe, según la formulación propuesta. El análisis se realizará con tres replicas de cada Solución Madre I, II, III, IV y V (anteriormente descritas) se efectuará las valoraciones por 2 analistas en 2 días diferentes .

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 18 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Analista	Día	N° muestra	Concentración	Porcentaje	# Replicas
A	1°	1	16.0 µg/mL	80%	3
			18.0 µg/mL	90%	
			20.0 µg/mL	100%	
	2°	1	22.0 µg/mL	110%	3
			24.0 µg/mL	120%	
			16.0 µg/mL	80%	
B	1°	1	18.0 µg/mL	90%	3
			20.0 µg/mL	100%	
			22.0 µg/mL	110%	
	2°	1	24.0 µg/mL	120%	3
			16.0 µg/mL	80%	
			18.0 µg/mL	90%	
			20.0 µg/mL	100%	
			22.0 µg/mL	110%	
			24.0 µg/mL	120%	

Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ) desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV), los cálculos se realizarán en un programa de Excel y con ayuda de las siguientes fórmulas :

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de Variación

$$Cv = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

$\bar{y}$

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 19 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

n = número de eventos

y =Área de Pico

*Criterios de aceptación:*

CV ≤ 2%

### 11.8-Estabilidad Analítica de la muestra:

Se analizará una muestra homogénea con tres replicas, fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de interés, procesar tres muestras para cada condición de almacenaje hasta la etapa pre-establecida, Analizar las muestras al termino de cada condición de almacenaje;

0, 6, 24,36 horas, utilizando una solución al 100.0%

Se Tomará una alícuota de 4.0 mL de la Solución Madre III y transferir a un balón de 100.0 mL aforar con agua desmineralizada, esta solución tiene una concentración de 20.0 µg/mL, inyectar por separado tres muestras.

Muestra	Tiempo de almacenamiento en el inyector			
	0 horas	6 horas	24 horas	36 horas
1	*	*	*	*
2	*	*	*	*
3	*	*	*	*

\* Porcentajes de concentración

Calcular la media aritmética y su diferencia absoluta al análisis inicial y de cada condición de almacenaje.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 20 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

*Criterios de aceptación:*

$/di/ \leq 2\%$

$/di/$  = diferencia absoluta de la media

### 11.9-Limite de Detección del analito:

El analista debe determinar la cuantificación de las muestras del blanco y de los placebos analíticos, las respuestas de estas muestras deben estar en un intervalo de concentración del analito. Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de 3 a 1 esto corresponde a la concentración asociada al límite de detección.

Muestra	Señal analítica (áreas)
Blanco o ruido	+
3 veces el ruido	+

Analito ( $\mu\text{g/mL}$ )	Señal analítica (áreas)
0.2	+
0.4	+
0.6	+
0.8	+
1.0	+

*Criterios de aceptación:*

Límite de Detección se estima en "X"  $\mu\text{g/mL}$  que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a tres veces el ruido.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 21 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 11.10-Limite de Cuantificación:

Determinar la señal de muestra (blanco) y la señal analítica de muestras (placebo analítico) a concentraciones conocidas del analito, determinar la cantidad del analito cuya señal sea similar o mayor que la muestra blanco, en una porción de 10 a 1 lo que corresponde a la cantidad asociada del limite de cuantificación.

Muestra	Señal analítica (áreas)
Blanco o ruido	+
10 veces el ruido	+

Analito (µg/mL)	Señal analítica (áreas)
0.4	+
0.8	+
1.2	+
1.6	+
2.0	+

#### *Criterios de aceptación:*

Límite de Cuantificación se estima en "X" µg/mL que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a diez veces el ruido.

### 11.11-Robustez:

Preparar tres diferentes proporciones de fase (baja, normal y alta, en base a la proporción de los solventes en la fase especificados en la metodología

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 22 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

analítica) en cada condición de operación se analiza la misma muestra con tres replicas. Reportar el contenido de potencia del analito para las muestras de condición normal de operación, y para las muestras de las otras condiciones de operación expresadas en porcentaje.

	Baja	Normal	Alta
Muestra	48:52	50:50	52:48
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+

Calcular la media aritmética y diferencia absoluta

*Criterios de aceptación:*

$|di| \leq 2\%$

### 11.12-Tolerancia.

Se fijará 2 condiciones de uso (cambio de REACTIVO I : Fosfato de potasio dibasico anhidro, REACTIVO II : Fosfato de potasio monobásico, y cambio de COLUMNA I : LiChroCART 250 - 4 LiChrospher 60 RP-Selecc B( 5 mcm), COLUMNA II : LiChroCART 250 - 4 LiChrospher 100 RP- 18 ( 5 mcm). Se analizará una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Se reportará el contenido del analito de todas las muestras.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 23 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

Muestra	Columna 1	Columna 2	Muestra	Reactivo 1	Reactivo 2
1	+	+	1	+	+
2	+	+	2	+	+
3	+	+	3	+	+

Calcular la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido del analito. Por medio de un programa en Excel empleando las siguientes fórmulas:

Media Aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

n= número de eventos de contenido

Coeficiente de Variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

*Criterio de Aceptación*

$$CV \leq 2\%$$

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 24 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

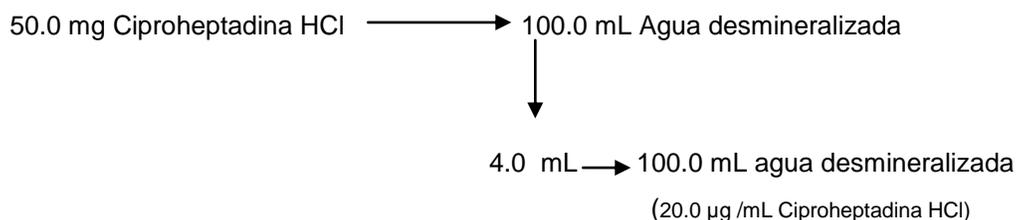
## 12-Técnica de análisis para Jarabe Multivitamínico con Estimulante del Apetito (Cuantificación de Ciproheptadina)

### 12.1 Preparación del Estándar de Ciproheptadina

Pesar exactamente 50.0 mg de estándar de Ciproheptadina HCl (ajuste al 100% el estándar de trabajo), transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL, agregar 15 mL de metanol y colocar el balón en ultrasonido por 10 minutos hasta disolución completa, aforar con agua desmineralizada . De esta solución tomar una alícuota de 4.0 mL con pipeta volumétrica y transferir a un balón de 100.0 mL, aforar con metanol, filtrar con filtro de jeringa nylon de 0.2 µg.

Esta solución contiene 20.0 µg/mL de Ciproheptadina HCl.

### Esquema de Preparación de Estándar de Ciproheptadina Clorhidrato



PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 25 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

## 12.2-Preparación de Muestra para la cuantificación de Ciproheptadina Clorhidrato en Jarabe Multivitaminas con Estimulante del Apetito

Tomar una alícuota de 5.0 mL de Jarabe Multivitamínico, adicionar a un balón de 100.0 mL, y aforar con agua desmineralizada, filtrar con filtro de jeringa nylon de 0.2 µm. Esta solución contiene 20.0 µg/mL de Ciproheptadina Clorhidrato.

### Esquema de Preparación de muestra de Jarabe Multivitaminico



### 12.3-Condiciones Cromatográficas

Columna: Selec B y precolumna selec B

Longitud de onda 250 nm

Temperatura: 30°C

Flujo 1.0 mL/min.

Volumen de Inyección 20 µg/L.

### 12.4-Procedimiento General

-Después de la preparación de las soluciones que se van a inyectar, se debe acondicionar el equipo.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 26 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl    2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

- Se debe asegurar que los frascos de solventes estén llenos, y se programa el equipo para purgar las líneas.
- Adecuar las condiciones del Cromatógrafo líquido de Alta Presión (HPLC), según las especificaciones.
- Escoger el método de Ciproheptadina y programar el método según el tiempo de retención y el tiempo de las corridas.
- Colocar las muestras previamente filtradas en viales de 2 mL y taparlos, colocarlos en una bandeja con capacidad para 200 muestras, el orden dentro de la bandeja depende de la programación en el método identificándolas en una tabla de muestras.
- Inyectar el estándar por medio de una corrida de prueba, para hacer los ajustes en el método, si fuese necesario.
- Programar el equipo para inyectar por medio del automuestreador cada una de las soluciones.
- El programa del equipo graficará los cromatogramas y resultados de las inyecciones de cada una de las diferentes soluciones.
- El reporte que el equipo proporciona, dará la concentración de las soluciones, número de platos teóricos, la asimetría del pico entre otros datos.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 27 de 27
Nombre del Producto : Multivitamínico con Estimulante del Apetito a base de Ciproheptadina	Fecha : 11-2006	
	Código:VPTCPH002	
	Tipo de Validación: Prospectiva	
Nombre del Activo :Ciproheptadina HCl 2 mg / 5 mL		
Referencia Bibliográfica : USP 29 – NF 24, Método Adaptado		

### 13-Referencia bibliográfica:

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Validación de Métodos Analíticos, AEFI, sección Catalana.
- Diplomado de Buenas Practicas de Laboratorio en la Industria Farmacéutica, Validación de Métodos Analíticos, Martha Elena Polanco, Abril 2006.
- The United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia of the United States of America,(USP) 29 Edición en español 2006, Twinbrook, Parkway, Roekvill
- ICH Harmonized Tripartite Guideline, Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A, 27 October 1994.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline, Text on Validation of Analytical Procedures, Methodology Q2S, 6 November 1996.

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

## **5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

En este capítulo se plasma por medio de cuadros los resultados obtenidos en la Validación del Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de un Jarabe Multivitamínico con Ciproheptadina, detallando cada uno de los analitos en estudio y el análisis de los resultados.

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**TIAMINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Sistema</b>			
Media Aritmética	979543	---	CUMPLE
Desviación Estándar ( S )	12873.18	---	
Coeficiente de Variación ( CV )	1.31	CV ≤ 1.5 %	
<b>Adecuabilidad del Sistema</b>			
Coeficiente de Variación ( CV )	1.85	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Factor de Capacidad	21.61	---	
Resolución	2.58	---	
Asimetría	0.96	---	
<b>Linealidad del Sistema</b>			
Pendiente	10127	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.51	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9999	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9998	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	20676.04 -1558.64	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE
<b>Exactitud</b>			
Desviación Estándar ( S )	0.94	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.89	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.8519	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.1687	Si t exp < t tabla el método analítico tiene la exactitud requerida	CUMPLE
<b>Repetibilidad del Método</b>			
Media Aritmética	100.39	---	---
Desviación Estándar ( S )	0.9312	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.9312	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.80 99.20	Debe estar entre el intervalo 98-102 %	CUMPLE
<b>Linealidad del Método</b>			
Pendiente	9906.2	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.54	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9981	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9963	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para punto de origen (IC (β <sub>0</sub> ))	7761.58 54405.58	IC (β <sub>0</sub> ), debe incluir el cero	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.14 97.68	IC (μ), debe incluir el 100 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	10104.14 9708.25	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**TIAMINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Método</b>			
Desviación Estándar ( S )	1.33	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.33	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.2965	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	1.71	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>			
Diferencia absoluta /di/ cero horas	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 6 horas	0.48	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 24 horas	3.35	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 36 horas	7.16	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
<b>Robustez</b>			
Diferencia absoluta /di/ baja	3.02	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ normal	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	
Diferencia absoluta /di/ alta	3.90	/di/ ≤ 2.0 %	
<b>Tolerancia</b>			
Media Aritmética	4139586	---	---
Desviación Estándar ( S )	42534.59	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	4.45	CV ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
G Cochran	0.7970	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.00062	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE

Efectuado por: María Elena Rivas

fecha: Mar-07

Verificado por: Silvia Adalia Rodríguez

fecha: Mar-07

Ver anexo 1 y anexo 2

Código:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**TIAMINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

**INFORME DE DESVIACIONES**

Parámetro: Robustez

Desviación: Se obtuvo una diferencia absoluta de un 3.02 y 3.90 %

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Tiamina Clorhidrato no acepta variaciones en los porcentajes de las fases.

Parámetro: Estabilidad analítica

Desviación: Las lecturas tomadas después de 6 horas de analizada la muestra, varía con un aumento significativo.

Justificación de la aceptación: El análisis no debe durar más de 6 horas ya que tiempos más prolongados no se asegura la obtención de buenos resultados.

Parámetro: Tolerancia

Desviación: Se obtuvo un coeficiente de variación de 4.45 %

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Tiamina Clorhidrato no es tolerante a cambio de reactivos y/o fase estacionaria .

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**TIAMINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

## INFORME DE VALIDACION DEL ENSAYO

Resultados: Conforme a los establecido

Dictamen: La metodologia analitica para la cuantificación de Tiamina

Clorhidrato, bajo las condiciones establecidas está VALIDADO

Redactado por: Maria Elena Rivas f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Aprobado: Silvia Adalia Rodríguez f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**RIBOFLAVINA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Sistema</b>			
Media Aritmética	905374	---	CUMPLE
Desviación Estándar ( S )	20816.45	---	
Coeficiente de Variación ( CV )	2.30%	CV ≤ 1.5 %	
<b>Adecuabilidad del Sistema</b>			
Coeficiente de Variación ( CV )	1.66%	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Factor de Capacidad	4.64	---	
Resolución	1.14	---	
Asimetría	0	---	
<b>Linealidad del Sistema</b>			
Pendiente	9558.7	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.71	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9997	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9993	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	20676.04 -1558.64	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE
<b>Exactitud</b>			
Desviación Estándar ( S )	1.01	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.02	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.4424	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	1.0936	Si t exp < t tabla el método analítico tiene la exactitud requerida	CUMPLE
<b>Repetibilidad del Método</b>			
Media Aritmética	100.61	---	---
Desviación Estándar ( S )	0.9184	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.91	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.78 99.21	Debe estarentre el intervalo 98-102 %	CUMPLE
<b>Linealidad del Método</b>			
Pendiente	9462.1	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.35	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9986	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9973	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para punto de origen (IC (β <sub>0</sub> ))	325380.27 -335548.27	IC (β <sub>0</sub> ), debe incluir el cero	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.80 98.25	IC (μ), debe incluir el 100 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	11569.67 7354.53	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**RIBOFLAVINA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Método</b>			
Desviación Estándar ( S )	1.59	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.59	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.37	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.84	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>			
Diferencia absoluta /di/ cero horas	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 6 horas	0.64	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 24 horas	4.53	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 36 horas	7.52	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
<b>Robustez</b>			
Diferencia absoluta /di/ baja	0.63	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ normal	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	
Diferencia absoluta /di/ alta	1.60	/di/ ≤ 2.0 %	
<b>Tolerancia</b>			
Media Aritmética	975278	---	---
Desviación Estándar ( S )	74734.32	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	2.30	CV ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
G Cochran	0.55	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.00377	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE

Efectuado por: Maria Elena Rivas

fecha: Mar-07

Verificado por: Silvia Adalia Rodríguez

fecha: Mar-07

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**RIBOFLAVINA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

**INFORME DE DESVIACIONES**

Parámetro: Presición del sistema

Desviación: Se obtuvo un coeficiente de variación de 2.30%

Justificación de la aceptación: aplicando la distribución t de Student se demuestra que la t experimental es menor a la t de tablas, indicando que no hay diferencia significativa en los resultados.

Parámetro: Estabilidad analítica

Desviación: Las lecturas tomadas después de 6 horas de analizada la muestra, varía con un aumento significativo.

Justificación de la aceptación: El análisis no debe durar más de 6 horas ya que tiempos más prolongados no se asegura la obtención de buenos resultados.

Parámetro: Tolerancia

Desviación: Se obtuvo un coeficiente de variación de 2.30%

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Riboflavina no es tolerante a cambio de reactivos y/o fase estacionaria .

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**RIBOFLAVINA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

## INFORME DE VALIDACION DEL ENSAYO

Resultados: Conforme a los establecido

Dictamen: La metodología analítica para la cuantificación de Riboflavina, bajo las condiciones establecidas está VALIDADO

Redactado por: Maria Elena Rivas      f. \_\_\_\_\_      fecha: Marzo-07

Aprobado: Silvia Adalia Rodríguez      f. \_\_\_\_\_      fecha: Marzo-07

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**NICOTINAMIDA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Sistema</b>			
Media Aritmética	439546	---	CUMPLE
Desviación Estándar ( S )	5307.92	---	
Coeficiente de Variación ( CV )	1.21%	CV ≤ 1.5 %	
<b>Adecuabilidad del Sistema</b>			
Coeficiente de Variación ( CV )	1.90%	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Factor de Capacidad	6.25	---	
Resolución	3.40	---	
Asimetría	0.97	---	
<b>Linealidad del Sistema</b>			
Pendiente	4491.8	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.57	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9999	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9998	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β1))	9967.68 -984.10	IC (β1), no debe incluir el cero	CUMPLE
<b>Exactitud</b>			
Desviación Estándar ( S )	0.84	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.84	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.7489	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.0357	Si t exp < t tabla el método analítico tiene la exactitud requerida	CUMPLE
<b>Repetibilidad del Método</b>			
Media Aritmética	99.79	---	---
Desviación Estándar ( S )	0.7156	---	CUMPLE
Coeficiente de Variación ( CV )	0.72	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.41 99.20	Debe estar entre el intervalo 98-102 %	CUMPLE
<b>Linealidad del Método</b>			
Pendiente	4365.5	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.29	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coeficiente de correlación ( r )	0.9987	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9973	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para punto de origen (IC (β0))	5625.29 -28438.19	IC (β0), debe incluir el cero	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	98.11 95.97	IC (μ), debe incluir el 100 %	NO CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β1))	4474.1 4256.86	IC (β1), no debe incluir el cero	CUMPLE

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**NICOTINAMIDA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Método</b>			
Desviación Estándar ( S )	1.43	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.42	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.2333	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	2.16	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>			
Diferencia absoluta /di/ cero horas	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 6 horas	1.56	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 24 horas	3.81	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 36 horas	6.51	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
<b>Robustez</b>			
Diferencia absoluta /di/ baja	1.48	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ normal	0	/di/ ≤ 2.0 %	
Diferencia absoluta /di/ alta	0.68	/di/ ≤ 2.0 %	
<b>Tolerancia</b>			
Media Aritmética	455643.25	---	---
Desviación Estándar ( S )	24750.29	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	2.88	CV ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
G Cochran	0.72	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.00	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Limite de Detección</b>			
Concentración en mcg/mL	0.10	LD es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 3 veces el ruido	CUMPLE
<b>Limite de Cuantificación</b>			
Concentración en mcg/mL	0.50	LC es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el ruido	CUMPLE

Efectuado por: Maria Elena Rivas

fecha: Mar-07

Verificado por: Silvia Adalia Rodríguez

fecha: Mar-07

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**NICOTINAMIDA EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO****INFORME DE DESVIACIONES**

Parámetro: Estabilidad analítica

Desviación: Las lecturas tomadas después de 6 horas de analizada la muestra varía con un aumento significativo.

Justificación de la aceptación: El analisis no debe durar más de 6 horas ya que tiempos más prolongados no se asegura la obtención de buenos resultados.

Parámetro: Tolerancia

Desviación: Se obtuvo un coeficiente de variación de 2.88%

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Nicotinamida no es tolerante a cambio de reactivos y/o fase estacionaria .

**INFORME DE VALIDACION DEL ENSAYO**

Resultados: Conforme a los establecido

Dictamen: La metodologia analitica para la cuantificación de Nicotinamida, bajo las condiciones establecidas está VALIDADO

Redactado por: Maria Elena Rivas f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Aprobado: Silvia Adalia Rodríguez f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**PIRIDOXINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Sistema</b>			
Media Aritmética	798689	---	CUMPLE
Desviación Estándar ( S )	10824.17	---	
Coficiente de Variación ( CV )	1.36%	CV ≤ 1.5 %	
<b>Adecuabilidad del Sistema</b>			
Coficiente de Variación ( CV )	1.63%	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Factor de Capacidad	8.98	---	
Resolución	3.39	---	
Asimetría	0.92	---	
<b>Linealidad del Sistema</b>			
Pendiente	8060.3	---	---
Coficiente de Variación ( CV )	0.49	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coficiente de correlación ( r )	0.9998	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9996	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	17919.49 -1798.89	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	
<b>Exactitud</b>			
Desviación Estándar ( S )	0.98	---	---
Coficiente de Variación ( CV )	0.91	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.8648	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.03297	Si t exp < t tabla el método analítico tiene la exactitud requerida	CUMPLE
<b>Repetibilidad del Método</b>			
Media Aritmética	99.97	---	---
Desviación Estándar ( S )	0.7573	---	---
Coficiente de Variación ( CV )	0.13	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.62 99.32	Debe estar entre el intervalo 98-102 %	CUMPLE
<b>Linealidad del Método</b>			
Pendiente	8132.0	---	CUMPLE
Coficiente de Variación ( CV )	1.54	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
Coficiente de correlación ( r )	0.9988	r ≥ 0.99	CUMPLE
Coficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9974	r <sup>2</sup> ≥ 0.98	CUMPLE
Intervalo de confianza para punto de origen (IC (β <sub>0</sub> ))	107950.23 -163106.23	IC (β <sub>0</sub> ), debe incluir el cero	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	100.113 97.987	IC (μ), debe incluir el 100 %	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	8996.35 7267.65	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**PIRIDOXINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Método</b>			
Desviación Estándar ( S )	1.73	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	1.73	CV ≤ 2.0 %	CUMPLE
G Cochran	0.3797	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	1.016	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>			
Diferencia absoluta /di/ cero horas	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 6 horas	0.61	/di/ ≤ 2.0 %	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 24 horas	3.60	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 36 horas	6.31	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
<b>Robustez</b>			
Diferencia absoluta /di/ baja	3.13	/di/ ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ normal	0.00	/di/ ≤ 2.0 %	
Diferencia absoluta /di/ alta	3.40	/di/ ≤ 2.0 %	
<b>Tolerancia</b>			
Media Aritmética	3378230	---	---
Desviación Estándar ( S )	51313.30	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	3.30	CV ≤ 2.0 %	NO CUMPLE
G Cochran	0.57	Si G exp < G tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.00174	Si t exp < t tabla el método analítico	CUMPLE

Efectuado por: Maria Elena Rivas

fecha: Mar-07

Verificado por: Silvia Adalia Rodríguez

fecha: Mar-07

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**PIRIDOXINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

INFORME DE DESVIACIONES

Parámetro: Robustez

Desviación: Se obtuvo una diferencia absoluta de un 3.13 y 3.40 %

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Piridoxina Clorhidrato no acepta variaciones en los porcentajes de las fases.

Parámetro: Estabilidad analítica

Desviación: Las lecturas tomadas después de 6 horas de analizada la muestra varía con un aumento significativo.

Justificación de la aceptación: El analisis no debe durar más de 6 horas ya que tiempos más prolongados no se asegura la obtención de buenos resultados.

Parámetro: Tolerancia

Desviación: Se obtuvo un coeficiente de variación de 3.30%

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Piridoxina Clorhidrato no es tolerante a cambio de reactivos y/o fase estacionaria .

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**PIRIDOXINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

INFORME DE VALIDACION DEL ENSAYO

Resultados: Conforme a los establecido

Dictamen: La metodología analítica para la cuantificación de Piridoxina Clorhidrato, bajo las condiciones establecidas está VALIDADO

Redactado por: Maria Elena Rivas      f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Aprobado: Silvia Adalia Rodríguez      f. \_\_\_\_\_ fecha: Marzo-07

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Sistema</b>			
Media Aritmética	4000613	---	CUMPLE
Desviación Estándar ( S )	38374.71	---	
Coefficiente de Variación ( CV )	0.96	$CV \leq 1.5 \%$	
<b>Adecuabilidad del Sistema</b>			
Coefficiente de Variación ( CV )	0.88	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
Factor de Capacidad	26.69	---	
Resolución	2.64	---	
Asimetría	0.98	---	
<b>Linealidad del Sistema</b>			
Pendiente	47872	---	---
Coefficiente de Variación ( CV )	0.82	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
Coefficiente de correlación ( r )	0.9969	$r \geq 0.99$	CUMPLE
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9939	$r^2 \geq 0.98$	CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	205187.06 -120171.06	no debe incluir el cero	CUMPLE
<b>Exactitud</b>			
Desviación Estándar ( S )	0.67	---	---
Coefficiente de Variación ( CV )	0.70	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
G Cochran	0.488	Si $G_{exp} < G$ tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	1.9192	Si $t_{exp} < t$ tabla el método analítico tiene la exactitud requerida	CUMPLE
<b>Repetibilidad del Método</b>			
Media Aritmética	101.44	---	---
Desviación Estándar ( S )	0.5373	---	---
Coefficiente de Variación ( CV )	0.53	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	101.89 100.98	Debe estar entre el intervalo 98-102 %	CUMPLE
<b>Linealidad del Método</b>			
Pendiente	40209.0	---	---
Coefficiente de Variación ( CV )	0.56	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
Coefficiente de correlación ( r )	0.9980	$r \geq 0.99$	CUMPLE
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9961	$r^2 \geq 0.98$	CUMPLE
Intervalo de confianza para punto de origen (IC (β <sub>0</sub> ))	3374576.82 -3119192.82	IC (β <sub>0</sub> ), debe incluir el cero	CUMPLE
Intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ))	103.58 102.52	Debe estar entre el intervalo 98-102 %	NO CUMPLE
Intervalo de confianza para la pendiente (IC (β <sub>1</sub> ))	72357.95 8060.05	IC (β <sub>1</sub> ), no debe incluir el cero	CUMPLE

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

PARÁMETROS EVALUADOS	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	DICTAMEN
<b>Precisión del Método</b>			
Desviación Estándar ( S )	0.63	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.63	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
G Cochran	0.3057	Si $G_{exp} < G$ tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	0.009	Si $t_{exp} < t$ tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Estabilidad Analítica de la Muestra</b>			
Diferencia absoluta /di/ cero horas	0.00	/di/ $\leq 2.0 \%$	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 6 horas	1.75	/di/ $\leq 2.0 \%$	CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 24 horas	2.62	/di/ $\leq 2.0 \%$	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ 36 horas	3.67	/di/ $\leq 2.0 \%$	NO CUMPLE
<b>Robustez</b>			
Diferencia absoluta /di/ baja	9	/di/ $\leq 2.0 \%$	NO CUMPLE
Diferencia absoluta /di/ normal	0	/di/ $\leq 2.0 \%$	
Diferencia absoluta /di/ alta	9	/di/ $\leq 2.0 \%$	
<b>Tolerancia</b>			
Media Aritmética	15511917.67	---	---
Desviación Estándar ( S )	19714.25	---	---
Coeficiente de Variación ( CV )	0.89	$CV \leq 2.0 \%$	CUMPLE
G Cochran	0.50	Si $G_{exp} < G$ tabla el método analítico tiene homogeneidad de varianzas	CUMPLE
Test de Student	1.60	Si $t_{exp} < t$ tabla el método analítico	CUMPLE
<b>Limite de Detección</b>			
Concentración en mcg/mL	0.40	LD es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 3 veces el ruido	---
<b>Limite de Cuantificación</b>			
Concentración en mcg/mL	1.20	LD es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el ruido	---

Efectuado por: María Elena Rivas

fecha: Mar-07

Verificado por: Silvia Adalia Rodríguez

fecha: Mar-07

Ver anexo 1 y anexo 2

Codigo:VPTVIT001

Fecha:15/03/07

**CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO EN JARABE MULTIVITAMINICO  
CON ESTIMULANTE DEL APETITO**

**INFORME DE DESVIACIONES**

Parámetro: Robustez

Desviación: Se obtuvo una diferencia absoluta de un 9 %

Justificación de la aceptación: La metodología de análisis para la cuantificación de Ciproheptadina Clorhidrato no acepta variaciones en los porcentajes de las fases.

Parámetro: Estabilidad analítica

Desviación: Las lecturas tomadas después de 6 horas de analizada la muestra varía con un aumento significativo.

Justificación de la aceptación: El analisis no debe durar más de 6 horas ya que tiempos más prolongados no se asegura la obtención de buenos resultados.

**INFORME DE VALIDACION DEL ENSAYO**

Resultados: Conforme a los establecido

Dictamen: La metodologia analitica para la cuantificación de Ciproheptadina Clorhidrato, bajo las condiciones establecidas está VALIDADO

Redactado por: Maria Elena Rivas      f. \_\_\_\_\_      fecha: Marzo-07

Aprobado: Silvia Adalia Rodríguez      f. \_\_\_\_\_      fecha: Marzo-07

## 5.1 ANALISIS DE RESULTADOS

- 5.1.1 La técnica de análisis cumple con la precisión del sistema para Tiamina Clorhidrato, Nicotinamida, Piridoxina Clorhidrato y Ciproheptadina Clorhidrato ya que los resultados demuestran una estrechez de concordancia entre la serie de mediciones de la misma muestra con un coeficiente de variación menor al 2 %; sin embargo para Riboflavina presenta un grado de dispersión entre la serie de mediciones de la misma muestra con un CV = 2.3 %; aplicando la distribución t de student se demostró que la  $t_{exp} < t_{tabla}$ , indicando que no hay diferencia significativa en los resultados, la diferencia de 0.3 % encontrada se vuelve insignificante, concluyendo que el método cumple con la precisión.
- 5.1.2 Cumple con la precisión del método para todos los analitos en estudio y no demuestra diferencia significativa entre los resultados obtenidos siendo estos menores al Coeficiente de Variación que debe ser menores a 2 %.
- 5.1.3 En la adecuabilidad el sistema opera correctamente, dado que la resolución y repetibilidad del sistema cromatográfico son adecuadas para el análisis, obteniendo resultados con un Coeficiente de Variación menor

a un 2 %, esto asegura la confiabilidad en los resultados del método analítico.

5.1.4 La linealidad del sistema y del método se cumple dentro del rango de concentración establecido en el protocolo para cada uno de los analitos en estudio, los resultados obtenidos en el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 % y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 %, por lo que el método de cuantificación es satisfactorio y tiene la capacidad de obtener resultados que demuestran que la señal del analito es directamente proporcional a la concentración del mismo en la matriz.

5.1.5 La exactitud se cumple para todos los analitos en estudio, obteniendo resultados con un coeficiente de variación menor al 2 %, se utilizó la distribución t student, resultando un  $t_{exp} < t_{tablas}$  determinando que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación y el 100%; se aplicó la prueba de G de Cochran para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados para la determinación de exactitud, a 3 concentraciones establecidas en el protocolo, obteniendo una  $G_{exp} < G_{tabla}$ , por lo que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

- 5.1.6 En la estabilidad analítica de la muestra, dado que los analitos evaluados se encuentran en un diluyente volátil (Metanol), con el paso del tiempo tienden a concentrarse por lo que se evapora el solvente dando resultados de porcentaje más elevados con diferencia significativa al porcentaje inicial de la muestra, su estabilidad esta limitada a un periodo de 6 horas aproximadamente, donde el coeficiente de variación no excede al 2 % para todos los analitos en estudio.
- 5.1.7 Cumple la robustez para Riboflavina, sin embargo para los demás analitos en estudio no cumple, la diferencia absoluta entre los resultados es mayor a 2 %, lo cual podría estar influenciado por cambios en el ambiente que no son controlados, por lo tanto no implica que el método no sea robusto con otro tipo de variaciones.
- 5.1.8 La metodología de análisis para las vitaminas no es tolerante a cambio de marca de reactivo y/o cambio de fase estacionaria (Columna), los resultados de las pruebas realizadas, muestran un coeficiente de variación mayor a 2 %, sin embargo la metodología analítica para Ciproheptadina Clorhidrato es tolerante, no muestra cambios significativos entre los resultados en ambas condiciones de cambio.

5.1.9 El límite de detección para la metodología analítica de las vitaminas es de 0.2 mcg/mL y el límite de cuantificación es de 0.5 mcg/mL de Nicotinamida, para Ciproheptadina Clorhidrato el límite de detección es de 0.40 mcg/mL y el límite de cuantificación es de 1.20 mcg/mL, dado que a esta concentración la señal del analito no se confunde con la señal ruido y no hay interferencia de los excipientes (matriz).

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

6. 1 Para la cuantificación del Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina, no puede modificarse las condiciones normales de operación establecidas en la metodología analítica ya que presenta variabilidad en los resultados con pequeños cambios en la fase móvil.
6. 2 El tiempo de duración del análisis no tiene que exceder seis horas, debido a la estabilidad analítica de la muestra ya que a tiempos más prolongados los resultados no son confiables.
6. 3 La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una formulación y de la técnica de Análisis en el control de la calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, donde el farmacéutico descubre si la metodología analítica cumple con el propósito para lo cual fue diseñada.
6. 4 Según las exigencias actuales con respecto a la aplicación RTCA 11.03.39.06 "Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos, se encuentran parámetros de desempeños de procedimientos analíticos físico químicos, se encuentra la categoría I de principios activos; donde se especifica los parámetros de desempeño que aplica para la

validación. Dentro de la validación realizada se han cumplido por lo que se concluye que el método analítico utilizado para la cuantificación de Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

- 7.1 Se debe trabajar en las condiciones normales de operación establecidas en el protocolo en cuanto a la fase móvil, debido a que los activos Piridoxina Clorhidrato y Ciproheptadina Clorhidrato presentan variabilidad al cambio de proporciones en la fase móvil.
- 7.2 Que el análisis para la cuantificación de los activos del Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl; el tiempo de duración del análisis no sobrepase las 6 horas, para la estabilidad de la muestra, no debe almacenarse en el equipo por más del tiempo establecido, por lo que a tiempos más prolongados no se asegura la obtención de resultados adecuados por la volatilidad del solvente de preparación de la muestra.
- 7.3 Que la Validación debe ejecutarse por un equipo multidisciplinario que aporte la destreza y la facilidad para la adecuada interpretación de resultados y lo requerido como son los Procedimientos Estándares de Operación (PEO's), especificaciones bien establecidas, plan maestro de validación bien definido, protocolos y reportes de calificación, así como los protocolos y reportes de validación, para que los resultados obtenidos sean lo suficientemente confiables.

- 7.4 Que la técnica de validación del Jarabe Multivitaminico con Ciproheptadina HCl, sea revalidada en un período de dos años; y, a menos que sea reformulado el producto la metodología analítica deberá ser nuevamente revalidada.

## BIBLIOGRAFIA

1. Goodman, Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Decima Edición. México D.F. 2003, Mc Graw Hill, vol 2, p. 1773-1781.
2. Gascon, Sebastia M.C. Validacion de Metodos Analiticos, Comisión de Normas de Buenas Fabricación y Control de Calidad. p. 19,29,38,43,47,51
3. Soberón M.A. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Ed 2002, Colegio Nacional de Químicos Farmacéutico Biólogos, México p. 8-11, 20-21, 23-24, 30-32, 34, 38, 40.
4. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia of the United States of America,(USP) 29 Edición en español 2006, Twinbrook, Parkway, Roekville. p. 1909-2091, 3895-3898.
5. Terra Farma S.A. de C.V. Validación de Métodos Analíticos (módulo 2/2006/Hotel Holiday In), Diplomado de Buenas Prácticas de Laboratorio en la Industria Farmacéutica, San Salvador, El Salvador, p. 3, 4, 6, 8, 19, 25, 31, 36, 43, 44, 47-48.
6. <http://www.uam.es>
7. <http://www.bsv.slg.cu/revistas/far/>.
8. <http://www.hup.es/ecl/far/vol6n8.html>
9. <http://www.tesisdigitales.com>

## GLOSARIO

**Anorexia Nerviosa:** consiste en un alteración grave de la percepción de la propia imagen, con un temor morboso a la obesidad, lo que condiciona una alteración.<sup>(1)</sup>

**Beriberi:** es una enfermedad producida por carencia de vitamina B1 (tiamina), presenta dos cuadros clínicos distintos uno en hijos recién nacidos de madres con deficiencia en vitamina B1 y otro en adultos.<sup>(6)</sup>

**Caquexia Neoplásica:** es una de las consecuencias de las alteraciones metabólicas del paciente con cáncer a lo que contribuye una inadecuada ingesta, demandas extraordinarias, asociadas al tumor y fuertes terapias aplicadas.<sup>(1)</sup>

**Higroscópico:** se refiere a todos los compuestos que atraen agua en forma de vapor o de líquido de su ambiente. <sup>(7)</sup>

**Ictericia:** es la coloración amarillenta de la piel y mucosas debida a un aumento de la bilirrubina (valores normales de 0,3 a 1 mg/dl) que se acumula en los tejidos, sobre todo aquellos con mayor número de fibras elásticas (paladar, conjuntiva) <sup>(4)</sup>

**Loop:** parte del Cromatografo liquido, en el cual se dosifica el volumen de inyección de la muestra. <sup>(5)</sup>

**Miscible:** Que se puede mezclar, especialmente referido a líquidos solubles [el aceite no es m.]. (miscible) <sup>(7)</sup>

***Pelagra:*** es una enfermedad causada por una dieta deficiente o insuficiencia del organismo para absorber la niacina (una de las vitaminas del complejo B) ó el triptófano (un aminoácido). <sup>(1)</sup>

***Placebo:*** contiene todos los componentes de la formulación del jarabe sin tomar en cuenta el analito a estudiar. <sup>(3)</sup>

## **ANEXOS**

**ANEXO 1**

**CUADROS DE RESULTADOS**

**CUADRO # 1: PRECISI3N DEL SISTEMA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	100.52	984636	969508052496	<b>979543</b>	<b>12873.18</b>	<b>1.31</b>
100.00	99.90	978536	957532703296			
100.00	97.83	958321	918379139041			
100.00	99.76	977232	954982381824			
100.00	101.90	998122	996247526884			
100.00	100.09	980408	961199846464			
	<b></b>	<b>5877255</b>	<b>5757849650005</b>			

**CUADRO # 2: ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	98.46	937577	879050630929	<b>952269</b>	<b>17589.62</b>	<b>1.85</b>
100.00	97.71	930502	865833972004			
100.00	101.11	962794	926972286436			
100.00	102.11	972337	945439241569			
100.00	100.62	958136	918024594496			
	<b></b>	<b>4761346</b>	<b>4535320725434</b>			

**CUADRO # 3: RESOLUCI3N CROMATOGRAFCA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

REAS	ALTURA	BASE	FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCI3N	RESOLUCI3N	ASIMETRÍA	PLATOS TE3RICOS
937577	45437	1.71	21.57	9.02	2.96	0.970	4679.31
930502	44453	1.82	21.58	9.03	2.91	0.960	4674.76
962794	45402	1.70	21.60	9.04	2.43	0.970	4641.90
972337	45428	1.63	21.63	9.05	2.34	0.960	4613.37
958136	44630	1.80	21.68	9.07	2.25	0.940	4604.65
<b>952269</b>	<b>45070</b>	<b>1.73</b>	<b>21.61</b>	<b>9.04</b>	<b>2.58</b>	<b>0.96</b>	<b>4642.80</b>

**CUADRO # 4: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	775403	6400	601249812409	62032240	1.04
80	791513	6400	626492829169	63321040	
80	785775	6400	617442350625	62862000	
90	888440	8100	789325633600	79959600	0.96
90	889130	8100	790552156900	80021700	
90	874124	8100	764092767376	78671160	
100	978095	10000	956669829025	97809500	0.40
100	975921	10000	952421798241	97592100	
100	970475	10000	941821725625	97047500	
120	1172030	14400	1373654320900	140643600	0.37
120	1178007	14400	1387700492049	141360840	
120	1169634	14400	1368043693956	140356080	
160	1582031	25600	2502822084961	253124960	0.09
160	1582226	25600	2503439115076	253156160	
160	1584588	25600	2510919129744	253534080	
200	1978172	40000	3913164461584	395634400	0.21
200	1984093	40000	3936625032649	396818600	
200	1986242	40000	3945157282564	397248400	
260	2605828	67600	6790339565584	677515280	0.48
260	2621328	67600	6871360483584	681545280	
260	2596569	67600	6742170571761	675107940	
<b>3030</b>	<b>29969624</b>	<b>516300</b>	<b>50885465137382</b>	<b>5125362460</b>	<b>0.51</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>95</sub> )
10127.0	-34026	0.9999	0.9998	636987.71	20676.04 -1558.64

**CUADRO # 5: EXACTITUD PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS	MEDIA	S	S <sup>2</sup>	CV
80	98.87	9775.28	775403.00	100.0000	1.04	1.09	1.04
80	100.93	10186.86	791513.00				
80	100.20	10040.04	785775.00				
100	100.33	10066.11	978095.00	99.9967	0.40	0.16	0.40
100	100.11	10022.01	975921.00				
100	99.55	9910.20	970475.00				
160	101.73	10348.99	1610288.00	100.14	1.37	1.89	1.37
160	99.31	9862.48	1572009.00				
160	99.39	9878.37	1573380.00				
<b>Σ</b>	<b>900.42</b>	<b>90090.35</b>			<b>0.94</b>	<b>1.05</b>	<b>0.89</b>

t Student experimental: 0.1687

t Student tabla: 2.365

G Cochran experimental: 0.8519

G Cochran tabla : 0.8709

**CUADRO # 6: REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

% PLACEBO ANALÍTICO	CANTIDAD ADICIONADA (mcg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>μ</sub> )
100.00	32.00	32.12	100.39	10078.15	100.39	0.9312	0.9312	100.80 99.20
100.00	32.00	32.05	100.16	10032.03				
100.00	32.00	31.87	99.60	9920.16				
100.00	32.00	32.34	101.06	10213.12				
100.00	32.00	32.14	100.43	10086.18				
100.00	32.00	31.47	98.36	9674.69				
		<b>Σ</b>	<b>600.00</b>	<b>60004.34</b>				

**CUADRO # 7: LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS (mAU)	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	797102	6400	635371598404	63768160	2.30
80	832776	6400	693515866176	66622080	
80	805403	6400	648673992409	64432240	
90	871012	8100	758661904144	78391080	0.70
90	882727	8100	779206956529	79445430	
90	880333	8100	774986190889	79229970	
100	1000618	10000	1001236381924	100061800	2.97
100	951918	10000	906147878724	95191800	
100	949987	10000	902475300169	94998700	
120	1125229	14400	1266140302441	135027480	1.26
120	1128962	14400	1274555197444	135475440	
120	1151635	14400	1326263173225	138196200	
160	1524086	25600	2322838135396	243853760	0.00
160	1524007	25600	2322597336049	243841120	
160	1523967	25600	2322475417089	243834720	
200	1932213	40000	3733447077369	386442600	1.43
200	1963856	40000	3856730388736	392771200	
200	1908617	40000	3642818852689	381723400	
260	2527837	67600	6389959898569	657237620	2.09
260	2622008	67600	6874925952064	681722080	
260	2621602	67600	6872797046404	681616520	
<b>3030</b>	<b>29525895</b>	<b>516300.000</b>	<b>49305824846843</b>	<b>5043883400</b>	<b>1.54</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>B1</sub> )
9906.2	-23322	0.9981	0.9963	624202.05	22164.09 -1558.64

**CUADRO # 8 : PORCENTAJE DE RECOBRO**

X = CONCENTRACIÓN (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y ^2
25.60	101.64	10330.69
25.60	106.19	11276.32
25.60	102.69	10545.24
28.80	98.54	9710.13
28.80	99.87	9974.02
28.80	99.60	9920.16
32.00	102.64	10534.97
32.00	97.65	9535.52
32.00	97.45	9496.50
38.40	95.91	9198.73
38.40	96.23	9260.21
38.40	98.16	9635.39
51.20	96.28	9269.84
51.20	96.28	9269.84
51.20	97.27	9461.45
64.00	97.45	9496.50
64.00	99.04	9808.92
64.00	96.26	9265.99
83.20	96.93	9395.42
83.20	100.54	10108.29
83.20	100.53	10106.28
<b>Σ</b>	<b>2077.15</b>	<b>205600.41</b>

MEDIA ARITMÉTICA	IC(B1)	IC(B0)	IC(μ)
98.91	10104.14 9708.25	7761.58 54405.58	100.14 97.68

**CUADRO # 9: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA TIAMINA CLORHIDRATO (DÍA 1)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	98.87	9775.28	775403	784230.33	8165	1.04
80	100.93	10186.86	791513			
80	100.2	10040.04	785775			
90	100.51	10102.26	888440	883898.00	8472	0.96
90	100.59	10118.35	889130			
90	98.89	9779.23	874124			
100	100.33	10066.11	978095	974830.33	3925	0.40
100	100.11	10022.01	975921			
100	99.55	9910.20	970475			
120	99.89	9978.01	1172030	1173223.67	4312	0.37
120	100.41	10082.17	1178007			
120	99.69	9938.10	1169634			
160	101.73	10348.99	1610288	1585225.67	21715	1.37
160	99.31	9862.48	1572009			
160	99.39	9878.37	1573380			
<b>Σ</b>	<b>1500.40</b>	<b>150088.46</b>				<b>0.83</b>

**CUADRO # 10: PRECISI3N DEL M3TOD0 PARA TIAMINA CLORHIDRATO (D3A 2)**

% TE3RICO	Y = % RECUPERACI3N	Y^2	3REAS (mAU)	MEDIA ARITM3TICA	S	CV
80	103.66	10745.40	812994	803164.00	15162	1.89
80	100.19	10038.04	785703			
80	103.39	10689.49	810795			
90	101.05	10211.10	893203	894708.33	4228	0.47
90	101.76	10355.10	899483			
90	100.85	10170.72	891439			
100	101	10201.00	984636	973831.00	13774	1.41
100	100.38	10076.14	978536			
100	98.31	9664.86	958321			
120	100.33	10066.11	1177140	1189786.67	16298	1.37
120	102.98	10604.88	1208179			
120	100.92	10184.85	1184041			
160	99.4	9880.36	1573380	1568328.00	15586	0.99
160	97.97	9598.12	1550843			
160	99.86	9972.02	1580761			
$\Sigma$	<b>1512.05</b>	<b>152458.18</b>				<b>1.23</b>

<b>COEFICIENTE DE VARIACI3N GLOBAL:</b>	<b>1.33</b>
<b>DESVIACI3N EST3NDAR GLOBAL:</b>	<b>1.33</b>
<b>G COCHRAN EXPERIMENTAL:</b>	<b>0.2965</b>
<b>G COCHRAN TABLAS:</b>	<b>0.6020</b>
<b>t STUDENT EXPERIMENTAL:</b>	<b>1.709</b>
<b>t STUDENT TABLAS:</b>	<b>2.048</b>

**CUADRO # 11 : ESTABILIDAD ANAL3TICA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

HORAS	3REAS	% RECUPERACI3N	/di/	MEDIA ARITM3TICA
0	959243	97.96	0.00	100.00
	1002910	102.42		
	975600	99.63		
6	964418	98.49	0.48	99.52
	973108	99.37		
	986102	100.7		
24	1034152	105.61	3.35	103.35
	1014482	103.6		
	987609	100.85		
36	1022036	104.37	7.16	107.160
	1073931	109.67		
	1060246	107.44		

**CUADRO # 12 : ROBUSTEZ PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	MEDIA ARITMÉTICA	/di/
BAJA (72:28)	1126936	99.03	97	3.02
	1080448	94.94		
NORMAL (75:25)	1058776	98.45	100	0.00
	1092102	101.55		
ALTA (78:22)	1065443	93.62	96	3.90
	1121914	98.58		

**CUADRO # 13 : TOLERANCIA PARA TIAMINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	% RECUPERACIÓN	ÁREAS	S	CV	MEDIA ARITMÉTICA
REACTIVO I	99.18	977232	11256.59	1.14	985254
	101.31	998122			
	99.51	980408			
REACTIVO II	111.00	1263214	109685.03	9.64	1138031
	93.04	1058776			
	95.96	1092102			
COLUMNA I	99.18	977232	11256.59	1.14	985254
	101.31	998122			
	99.51	980408			
COLUMNA II	103.75	1069775	37940.16	3.68	1031048
	99.84	1029421			
	96.40	993947			
<b>Σ</b>	<b>1199.99</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>42534.59</b>	<b>4.45</b>	<b>4139586</b>

t Student experimental: 0.00062

G Cochran experimental: 0.7970

t Student tabla: 2.2280

G Cochran tabla : 0.9065

**CUADRO # 14 : PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA RIBOFLAVINA**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	102.43	903859	816961091881	905374	20816	2.30
100.00	100.08	883117	779895635689			
100.00	100.00	882410	778647408100			
100.00	104.31	920447	847222679809			
100.00	106.03	935578	875306194084			
100.00	102.77	906834	822347903556			
	<b>Σ</b>	<b>5432245</b>	<b>4920380913119</b>			

**CUADRO # 15 : ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA RIBOFLAVINA**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y=ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	102.93	908239	824898081121	895663	14911.03	1.66
100.00	98.65	870842	758365788964			
100.00	101.34	894248	799679485504			
100.00	102.63	905642	820187432164			
100.00	101.92	899342	808816032964			
	<b>Σ</b>	<b>4478313</b>	<b>4011946820717</b>			

**CUADRO # 16 : RESOLUCIÓN CROMATOGRÁFICA PARA RIBOFLAVINA**

ÁREAS	ALTURA	BASE	FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	RESOLUCIÓN	ASIMETRÍA	PLATOS TEÓRICOS
908239	113012	0.57	4.65	2.26	1.14	0.000	1957.89
870842	109955	0.55	4.63	2.25	1.16	0.000	1981.35
894248	112407	0.56	4.63	2.25	1.16	0.000	1976.40
905642	112700	0.57	4.65	2.26	1.12	0.000	1973.86
899342	111568	0.55	4.63	2.25	1.12	0.000	1928.92
<b>895663</b>	<b>111928</b>	<b>0.56</b>	<b>4.64</b>	<b>2.25</b>	<b>1.14</b>	<b>0.000</b>	<b>1963.68</b>

**CUADRO # 17: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA RIBOFLAVINA**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X^2	Y^2	XY	CV
80	705020	6400	497053200400	56401600	1.20
80	720553	6400	519196625809	57644240	
80	706821	6400	499595926041	56545680	
90	830226	8100	689275211076	74720340	0.56
90	821156	8100	674297176336	73904040	
90	827002	8100	683932308004	74430180	
100	877469	10000	769951845961	87746900	0.50
100	885869	10000	784763885161	88586900	
100	883826	10000	781148398276	88382600	
120	1069382	14400	1143577861924	128325840	0.82
120	1086723	14400	1180966878729	130406760	
120	1075396	14400	1156476556816	129047520	
160	1502613	25600	2257845827769	240418080	1.11
160	1470397	25600	2162067337609	235263520	
160	1481013	25600	2193399506169	236962080	
200	1861602	40000	3465562006404	372320400	0.06
200	1863741	40000	3473530515081	372748200	
200	1863036	40000	3470903137296	372607200	
260	2406522	67600	5791348136484	625695720	0.72
260	2439723	67600	5952248316729	634327980	
260	2432220	67600	5915694128400	632377200	
<b>3030</b>	<b>27810310</b>	<b>516300.000</b>	<b>44062834786474</b>	<b>4768862980</b>	

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>95</sub> )
9558.7	-54889	0.9997	0.9993	601399.53	20676.04 -1558.64

**CUADRO # 18 : EXACTITUD PARA RIBOFLAVINA**

% AGREGADO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS	MEDIA	S	S <sup>2</sup>	CV
80	99.18	9836.67	705020	99.9967	1.20	1.43	1.20
80	101.37	10275.88	720553				
80	99.44	9888.31	706821				
100	99.44	9888.31	877469	99.9967	0.50	0.25	0.50
100	100.39	10078.15	885869				
100	100.16	10032.03	883826				
160	99.58	9916.18	1478537	98.89	1.10	1.20	1.11
160	97.63	9531.62	1449542				
160	99.47	9894.28	1476811				
<b>Σ</b>	<b>896.66</b>	<b>89341.43</b>	<b>9184448</b>	<b>Promedio</b>	<b>1.01</b>	<b>0.96</b>	<b>1.02</b>

t Student experimental: 1.0936

G Cochran experimental: 0.4424

t Student tabla: 2.3650

G Cochran tabla : 0.8709

**CUADRO # 19 : REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA RIBOFLAVINA**

% PLACEBO ANALÍTICO	CANTIDAD ADICIONADA (mcg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>μ</sub> )
100.00	12.80	12.71	100.58	10116.34	100.61	0.9184	0.91	100.78 99.21
100.00	12.80	12.83	100.39	10078.15				
100.00	12.80	12.80	100.16	10032.03				
100.00	12.80	13.09	102.43	10491.90				
100.00	12.80	12.79	100.08	10016.01				
100.00	12.80	12.78	100.00	10000.00				
		<b>Σ</b>	<b>603.64</b>	<b>60734.43</b>				

**CUADRO # 20 : LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA RIBOFLAVINA**

<b>X = % AGREGADO</b>	<b>Y = ÁREAS</b>	<b>X^2</b>	<b>Y^2</b>	<b>XY</b>	<b>CV</b>
80	738353	6400	545165152609	59068240	0.50
80	735646	6400	541175037316	58851680	
80	731110	6400	534521832100	58488800	
90	809435	8100	655185019225	72849150	1.17
90	798656	8100	637851406336	71879040	
90	817531	8100	668356935961	73577790	
100	920263	10000	846883989169	92026300	2.17
100	882734	10000	779219314756	88273400	
100	892325	10000	796243905625	89232500	
120	1051943	14400	1106584075249	126233160	1.47
120	1067820	14400	1140239552400	128138400	
120	1083260	14400	1173452227600	129991200	
160	1415377	25600	2003292052129	226460320	1.80
160	1403795	25600	1970640402025	224607200	
160	1452776	25600	2110558106176	232444160	
200	1829822	40000	3348248551684	365964400	0.19
200	1832489	40000	3358015935121	366497800	
200	1825513	40000	3332497713169	365102600	
260	2377808	67600	5653970884864	618230080	2.15
260	2475057	67600	6125907153249	643514820	
260	2460803	67600	6055551404809	639808780	
<b>3030</b>	<b>27602516</b>	<b>516300.000</b>	<b>43383560651572</b>	<b>4731239820</b>	<b>1.35</b>

<b>PENDIENTE</b>	<b>INTERCEPTO</b>	<b>COEFICIENTE DE CORRELACIÓN</b>	<b>COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
9462.1	-5084	0.9986	0.9973	595930.41

**CUADRO # 21 : PORCENTAJE DE RECOBRO PARA RIBOFLAVINA**

X = CONCENTRACIÓN (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y ^2
10.24	103.88	10791.05
10.24	103.49	10710.18
10.24	102.85	10578.12
11.52	97.98	9600.08
11.52	96.66	9343.16
11.52	98.66	9733.80
12.80	104.29	10876.40
12.80	100.04	10008.00
12.80	101.13	10227.28
15.36	97.66	9537.48
15.36	99.13	9826.76
15.36	100.56	10112.31
20.48	95.33	9087.81
20.48	94.55	8939.70
20.48	97.85	9574.62
25.60	98.23	9649.13
25.60	98.37	9676.66
25.60	98.00	9604.00
33.28	98.01	9605.96
33.28	102.01	10406.04
33.28	101.43	10288.04
Σ	<b>2090.11</b>	<b>208176.59</b>

MEDIA ARITMÉTICA	IC(B1)	IC(B0)	IC(μ)
99.53	11569.67 7354.53	325380.27 -335548.27	100.80 98.25

**CUADRO # 22: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA RIBOFLAVINA (DÍA 1)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	99.18	9836.67	705020	710798.00	8496	1.20
80	101.37	10275.88	720553			
80	99.44	9888.31	706821			
90	100.49	10098.24	830226	826128.00	4598	0.56
90	99.40	9880.36	821156			
90	100.11	10022.01	827002			
100	99.44	9888.31	877469	882388.00	4381	0.50
100	100.39	10078.15	885869			
100	100.16	10032.03	883826			
120	99.28	9856.52	1069382	1077167.00	8805	0.82
120	100.89	10178.79	1086723			
120	99.83	9966.03	1075396			
160	99.58	9916.18	1478537	1464966.67	14580	1.00
160	97.63	9531.62	1449552			
160	99.47	9894.28	1466811			
Σ	<b>1496.66</b>	<b>149343.38</b>				<b>0.81</b>

**CUADRO # 23: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA RIBOFLAVINA (DÍA 2)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	102.91	10590.47	731460	723976.33	10744	1.48
80	100.12	10024.01	711666			
80	102.53	10512.40	728803			
90	96.40	9292.96	796414	804201.33	6749	0.84
90	97.78	9560.93	807833			
90	97.85	9574.62	808357			
100	102.43	10491.90	903859	889795.33	12185	1.37
100	100.08	10016.01	883117			
100	100.00	10000.00	882410			
120	99.89	9978.01	1076042	1083832.00	10709	0.99
120	101.75	10353.06	1096044			
120	100.21	10042.04	1079410			
160	98.80	9761.44	1466811	1455271.00	24069	1.65
160	96.16	9246.75	1427605			
160	99.11	9822.79	1471397			
Σ	<b>1496.02</b>	<b>149267.40</b>				<b>1.27</b>

COEFICIENTE DE VARIACIÓN GLOBAL:	<b>1.59</b>
DESVIACIÓN ESTÁNDAR GLOBAL:	<b>1.59</b>
G COCHRAN EXPERIMENTAL:	<b>0.3700</b>
G COCHRAN TABLAS:	<b>0.6020</b>
t STUDEN EXPERIMENTAL:	<b>0.840</b>
t STUDEN EXPERIMENTAL:	<b>2.048</b>

**CUADRO # 24 : ESTABILIDAD ANALÍTICA PARA RIBOFLAVINA**

HORAS	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	/di/	MEDIA ARITMÉTICA
0	953944	100.02	0.00	100.00
	960321	100.69		
	947074	99.30		
6	942078	98.77	0.64	99.36
	939908	98.55		
	961103	100.77		
24	1016694	106.60	4.53	104.53
	989803	103.78		
	984400	103.21		
36	1000938	104.94	7.52	107.527
	1034627	108.48		
	1041182	109.16		

**CUADRO # 25: ROBUSTEZ PARA RIBOFLAVINA**

CONDICIÓN	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	MEDIA ARITMÉTICA	/di/
BAJA (72:28)	979596	100.80	101	0.63
	976226	100.45		
NORMAL (75:25)	935285	97.68	100	0.00
	979659	102.32		
ALTA (78:22)	951396	97.90	98	1.60
	961283	98.91		

**CUADRO # 26 : TOLERANCIA PARA RIBOFLAVINA**

CONDICIÓN	% RECUPERACIÓN	ÁREAS	S	CV	MEDIA ARITMÉTICA
REACTIVO I	99.94	920447	14378.68	1.56	920953
	101.59	935578			
	98.47	906834			
REACTIVO II	102.96	1000573	33339.09	3.43	971839
	96.24	935285			
	100.80	979659			
COLUMNA I	99.94	920447	14378.68	1.56	920953
	101.59	935578			
	98.47	906834			
COLUMNA II	103.40	1124377	38433.20	3.53	1087365
	100.25	1090065			
	96.38	1047653			
$\Sigma$	<b>1200.03</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>74734.32</b>	<b>2.30</b>	<b>975278</b>

t Student experimental: 0.00377

G Cochran experimental: 0.5519

t Student tabla: 2.2280

G Cochran tabla : 0.9065

**CUADRO # 27: PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA NICOTINAMIDA**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	100.54	442115	195465673225	439546	5307.92	1.21
100.00	99.65	438181	192002588761			
100.00	98.55	433371	187810423641			
100.00	99.47	437423	191338880929			
100.00	102.06	448777	201400795729			
100.00	99.47	437411	191328382921			
	$\Sigma$	<b>2637278</b>	<b>1159346745206</b>			

**CUADRO #28 : ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA NICOTINAMIDA**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	97.80	430071	184961065041	423619	8029.78	1.90
100.00	93.40	410756	168720491536			
100.00	95.69	420821	177090314041			
100.00	97.25	428768	183841997824			
100.00	97.25	427679	182909327041			
	<b>Σ</b>	<b>2118095</b>	<b>897523195483</b>			

**CUADRO # 29: RESOLUCIÓN CROMATOGRÁFICA PARA NICOTINAMIDA**

ÁREAS	ALTURA	BASE	FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	RESOLUCIÓN	ASIMETRÍA	PLATOS TEÓRICOS
430071	61564	0.55	6.25	2.90	3.38	0.970	4434.66
410756	59640	0.54	6.25	2.90	3.43	0.960	4440.27
420821	60742	0.52	6.25	2.90	3.43	0.950	4423.16
428768	61092	0.52	6.25	2.90	3.38	0.980	4357.12
427679	60474	0.50	6.25	2.90	3.39	0.970	4321.12
<b>423619</b>	<b>60702</b>	<b>0.53</b>	<b>6.25</b>	<b>2.90</b>	<b>3.40</b>	<b>0.97</b>	<b>4395.27</b>

**CUADRO # 30 : LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA NICOTINAMIDA**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	347807	6400	120969709249	27824560	1.19
80	356136	6400	126832850496	28490880	
80	351513	6400	123561389169	28121040	
90	397236	8100	157796439696	35751240	0.44
90	400191	8100	160152836481	36017190	
90	397095	8100	157684439025	35738550	
100	438392	10000	192187545664	43839200	0.44
100	441929	10000	195301241041	44192900	
100	438883	10000	192618287689	43888300	
120	526583	14400	277289655889	63189960	0.94
120	531933	14400	282952716489	63831960	
120	522074	14400	272561261476	62648880	
160	707875	25600	501087015625	113260000	0.27
160	706694	25600	499416409636	113071040	
160	704139	25600	495811731321	112662240	
200	886317	40000	785557824489	177263400	0.10
200	884767	40000	782812644289	176953400	
200	884875	40000	783003765625	176975000	
260	1155295	67600	1334706537025	300376700	0.60
260	1163390	67600	1353476292100	302481400	
260	1169217	67600	1367068393089	303996420	
<b>3030</b>	<b>13412341</b>	<b>516300.000</b>	<b>10162848985563</b>	<b>2290574260</b>	<b>0.57</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>95</sub> )
4491.8	-9419	0.9999	0.9998	282543.45	9967.68 -984.10

**CUADRO # 31 : EXACTITUD PARA NICOTINAMIDA**

% AGREGADO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS	MEDIA ARITMÉTICA	S	S <sup>2</sup>	CV
80	98.86	9773.30	347807	100.00	1.18	0.90	1.18
80	101.22	10245.49	356136				
80	99.91	9982.01	351513				
100	99.69	9938.10	438392	99.99	0.43	0.18	0.43
100	100.49	10098.24	441929				
100	99.80	9960.04	438883				
160	101.27	10255.61	718254	100.00	1.12	3.24	1.12
160	99.53	9906.22	705860				
160	99.19	9838.66	703441				
<b>Σ</b>	<b>899.96</b>	<b>89997.66</b>	<b>4502215</b>	<b>Promedio</b>	<b>0.84</b>	<b>1.44</b>	<b>0.84</b>

t Student experimental: 0.0357

G Cochran experimental: 0.7489

t Student tabla: 2.365

G Cochran tabla : 0.8709

**CUADRO # 32 : REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA NICOTINAMIDA**

% PLACEBO ANALÍTICO	CANTIDAD ADICIONADA (mcg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>μ</sub> )
100.00	12.80	12.79	99.69	9938.10	99.79	0.7156	0.72	100.41 99.20
100.00	12.80	12.89	100.50	10100.25				
100.00	12.80	12.80	99.80	9960.04				
100.00	12.80	12.90	100.54	10108.29				
100.00	12.80	12.78	99.65	9930.12				
100.00	12.80	12.64	98.58	9718.02				
		<b>Σ</b>	<b>598.76</b>	<b>59754.82</b>				

**CUADRO # 33 : LINEALIDAD DEL METODO PARA NICOTINAMIDA**

X = %	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	350409	6400	122786467281	28032720	0.77
80	345086	6400	119084347396	27606880	
80	348247	6400	121275973009	27859760	
90	376161	8100	141497097921	33854490	1.46
90	370069	8100	136951064761	33306210	
90	381039	8100	145190719521	34293510	
100	446212	10000	199105148944	44621200	2.23
100	428212	10000	183365516944	42821200	
100	430843	10000	185625690649	43084300	
120	504233	14400	254250918289	60507960	1.22
120	513930	14400	264124044900	61671600	
120	515821	14400	266071304041	61898520	
160	663991	25600	440884048081	106238560	0.33
160	665963	25600	443506717369	106554080	
160	668407	25600	446767917649	106945120	
200	856970	40000	734397580900	171394000	0.83
200	866513	40000	750844779169	173302600	
200	852586	40000	726902887396	170517200	
260	1106447	67600	1224224963809	287676220	2.16
260	1152121	67600	1327382798641	299551460	
260	1144609	67600	1310129762881	297598340	
<b>3030</b>	<b>12987869</b>	<b>516300.000</b>	<b>9544369749551</b>	<b>2219335930</b>	<b>1.29</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
4365.5	-11407	0.9987	0.9973	274932.99

**CUADRO # 34 : PORCENTAJE DE RECOBRO DE NICOTINAMIDA**

<b>X = CONCENTRACIÓN</b>	<b>Y = % RECUPERACIÓN</b>	<b>Y ^2</b>
10.24	100.75	10150.56
10.24	99.22	9844.61
10.24	100.13	10026.02
11.52	94.47	8924.58
11.52	92.94	8637.84
11.52	95.70	9158.49
12.80	101.47	10296.16
12.80	97.38	9482.86
12.80	97.98	9600.08
15.36	95.70	9158.49
15.36	97.55	9516.00
15.36	97.90	9584.41
20.48	94.02	8839.76
20.48	94.30	8892.49
20.48	94.64	8956.73
25.60	96.80	9370.24
25.60	97.88	9580.49
25.60	96.30	9273.69
33.28	95.17	9057.33
33.28	99.10	9820.81
33.28	98.45	9692.40
<b>Σ</b>	<b>2037.85</b>	<b>197864.06</b>

<b>MEDIA ARITMÉTICA</b>	<b>IC(β1)</b>	<b>IC(β0)</b>	<b>IC(μ)</b>
97.04	4474.1 4256.86	5625.29 -28438.19	98.11 95.97

**CUADRO # 35: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA NICOTINAMIDA (DIA 1)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	98.86	9773.30	347807	351818.67	4173	1.19
80	101.23	10247.51	356136			
80	99.91	9982.01	351513			
90	99.76	9952.06	397236	398174.00	1748	0.44
90	100.51	10102.26	400191			
90	99.73	9946.07	397095			
100	99.69	9938.10	438392	439734.67	1916	0.44
100	100.50	10100.25	441929			
100	99.81	9962.04	438883			
120	99.95	9990.00	526583	526863.33	4935	0.94
120	100.96	10192.92	531933			
120	99.09	9818.83	522074			
160	101.70	10342.89	718254	709185.00	7947	1.12
160	99.95	9990.00	705860			
160	99.60	9920.16	703441			
<b>Σ</b>	<b>1501.25</b>	<b>150258.40</b>				<b>0.82</b>

**CUADRO # 36: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA NICOTINAMIDA (DIA 2)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	103.85	10784.82	365367	363146.67	5752	1.58
80	101.36	10273.85	356615			
80	104.44	10907.71	367458			
90	100.45	10090.20	399956	403081.00	2771	0.69
90	101.77	10357.13	405237			
90	101.47	10296.16	404050			
100	100.54	10108.29	442115	437889.00	4379	1.00
100	99.65	9930.12	438181			
100	98.55	9712.10	433371			
120	100.80	10160.64	531093	536035.67	7077	1.32
120	103.28	10666.76	544143			
120	101.14	10229.30	532871			
160	99.60	9920.16	703441	702030.33	6996	1.00
160	98.33	9668.79	694437			
160	100.30	10060.09	708213			
<b>Σ</b>	<b>1515.53</b>	<b>153166.14</b>				<b>1.12</b>

<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN GLOBAL:</b>	<b>1.42</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR GLOBAL:</b>	<b>1.43</b>
<b>G COCHRAN EXPERIMENTAL:</b>	<b>0.2333</b>
<b>G COCHRAN TABLAS:</b>	<b>0.6020</b>
<b>t STUDEN EXPERIMENTAL:</b>	<b>2.16</b>
<b>t STUDEN TABLA:</b>	<b>2.048</b>

**CUADRO # 37: ESTABILIDAD ANALÍTICA PARA NICOTINAMIDA**

HORAS	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	/di/	MEDIA ARITMÉTICA
0	431740	98.85	0.00	100.00
	445978	102.11		
	432587	99.04		
6	441447	101.07	1.56	101.56
	440439	100.84		
	448888	102.77		
24	460896	105.52	3.81	103.81
	453871	103.92		
	445478	101.99		
36	452237	103.54	6.51	106.51
	472438	108.17		
	470969	107.83		

**CUADRO # 38 : ROBUSTEZ PARA NICOTINAMIDA**

CONDICION	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	MEDIA ARITMÉTICA	/di/
BAJA (72:28)	480814	98.31	98.52	1.48
	482876	98.73		
NORMAL (75:25)	464010	97.78	100.00	0.00
	485058	102.22		
ALTA (78:22)	488077	99.80	100.68	0.68
	496223	101.56		

**CUADRO # 39 : TOLERANCIA PARA NICOTINAMIDA**

CONDICIÓN	% RECUPERACIÓN	ÁREAS	S	CV	MEDIA ARITMÉTICA
REACTIVO I	99.14	437423	6558.70	1.49	441203.67
	101.72	448777			
	99.14	437411			
REACTIVO II	105.95	518151	27292.90	5.58	489073.00
	94.88	464010			
	99.18	485058			
COLUMNA I	99.14	437423	6558.70	1.49	441203.67
	101.72	448777			
	99.14	437411			
COLUMNA II	103.35	466218	14330.02	3.18	451092.67
	99.61	449341			
	97.03	437719			
<b>Σ</b>	<b>1200.00</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>24750.29</b>	<b>2.88</b>	<b>455643.25</b>

t Student experimental: 0.00  
t Student tabla: 2.2280

G Cochran experimental: 0.7188  
G Cochran tabla : 0.9065

**CUADRO # 40: LIMITE DE DETECCIÓN PARA NICOTINAMIDA**

Muestra	Área
Blanco	2044
B x 3 veces	6132

Concentración mcg/mL	Áreas
0.10	9470
0.20	11880
0.30	14703
0.40	20345
0.50	26491

**CUADRO# 41: LIMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA NICOTINAMIDA**

Muestra	Área
Blanco	2044
B x 10 veces	20440

Concentración mcg/mL	Áreas
0.50	31945
1.00	36164
1.50	62974
2.00	49315
2.50	54688

**CUADRO # 42: PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	100.76	799919	639870406561	798689	10824.17	1.36
100.00	99.99	793762	630058112644			
100.00	98.69	783490	613856580100			
100.00	100.91	799919	639870406561			
100.00	102.89	816781	667131201961			
100.00	100.56	798262	637222220644			
	Σ	4792133	3828008928471			

**CUADRO # 43: ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	100.09	794613	631409819769	793147	12914.08	1.63
100.00	97.49	773948	598995506704			
100.00	101.92	809106	654652519236			
100.00	100.59	798511	637619817121			
100.00	99.43	789558	623401835364			
	Σ	3965736	3146079498194			

**CUADRO # 44: RESOLUCIÓN CROMATOGRÁFICA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

ÁREAS	ALTURA	BASE	FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	RESOLUCIÓN	ASIMETRÍA	PLATOS TEÓRICOS
794613	91888	0.99	8.98	3.99	4.000	0.910	5371.45
773948	89522	0.81	8.98	3.99	5.300	0.900	5323.35
809106	91358	0.97	8.97	3.98	3.530	0.930	5202.56
798511	90876	0.83	8.98	3.99	2.480	0.930	5193.15
789558	898412	0.88	8.98	3.99	1.640	0.920	5203.15
<b>793147</b>	<b>252411</b>	<b>0.90</b>	<b>8.98</b>	<b>3.99</b>	<b>3.39</b>	<b>0.92</b>	<b>5258.73</b>

**CUADRO # 45: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	633287	6400	401052424369	50662960	0.98
80	645805	6400	417064098025	51664400	
80	638840	6400	408116545600	51107200	
90	727451	8100	529184957401	65470590	0.32
90	729793	8100	532597822849	65681370	
90	725073	8100	525730855329	65256570	
100	791487	10000	626451671169	79148700	0.49
100	798328	10000	637327595584	79832800	
100	791718	10000	626817391524	79171800	
120	951643	14400	905624399449	114197160	0.66
120	956658	14400	915194528964	114798960	
120	944272	14400	891649609984	113312640	
160	1287102	25600	1656631558404	205936320	0.13
160	1289558	25600	1662959835364	206329280	
160	1286311	25600	1654595988721	205809760	
200	1588719	40000	2524028060961	317743800	0.30
200	1588864	40000	2524488810496	317772800	
200	1596956	40000	2550268465936	319391200	
260	2082935	67600	4338618214225	541563100	0.57
260	2097541	67600	4399678246681	545360660	
260	2106393	67600	4436891470449	547662180	
<b>3030</b>	<b>24258734</b>	<b>516300</b>	<b>33164972551484</b>	<b>4137874250</b>	<b>0.49</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>95</sub> )
8060.3	7809	0.9998	0.9996	507041.48	17919.49 -1798.89

**CUADRO # 46: EXACTITUD PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	Y= % RECUPERACIÓ N	Y^2	ÁREAS	MEDIA ARITMÉTICA	S	S^2	CV
80	99.02	9805.0	633287	99.98	1.00	0.99	1.00
80	101.01	10203.0	645805				
80	99.92	9984.0	638840				
100	99.70	9940.1	791487	100.00	0.49	0.24	0.49
100	100.56	10112.3	798328				
100	99.73	9946.1	791718				
160	101.56	10314.4	1298871	100.06	1.44	2.09	1.44
160	99.93	9986.0	1275667				
160	98.68	9737.7	1262049				
<b>Σ</b>	<b>900.11</b>	<b>90028.64</b>	<b>8136052</b>	<b>Promedio</b>	<b>0.98</b>	<b>1.11</b>	<b>0.91</b>

t Student experimental: 0.03297

G Cochran experimental: 0.8648

t Student tabla: 2.3650

G Cochran tabla : 0.8709

**CUADRO # 47 : REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

% PLACEBO ANALÍTICO	CANTIDAD ADICIONADA (mcg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>μ</sub> )
100.00	64.00	63.87	99.70	9940.09	99.97	0.7573	0.13	100.62 99.32
100.00	64.00	64.42	100.56	10112.31				
100.00	64.00	63.88	99.73	9946.07				
100.00	64.00	64.55	100.76	10152.58				
100.00	64.00	64.05	100.36	10072.13				
100.00	64.00	63.22	98.70	9741.69				
		<b>Σ</b>	<b>599.81</b>	<b>59964.87</b>				

**CUADRO # 48 : LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	659484	6400	434919146256	52758720	1.36
80	643892	6400	414596907664	51511360	
80	644622	6400	415537522884	51569760	
90	702366	8100	493317997956	63212940	1.92
90	693112	8100	480404244544	62380080	
90	719783	8100	518087567089	64780470	
100	816015	10000	665880480225	81601500	2.46
100	782492	10000	612293730064	78249200	
100	781800	10000	611211240000	78180000	
120	914369	14400	836070668161	109724280	1.58
120	938351	14400	880502599201	112602120	
120	941020	14400	885518640400	112922400	
160	1233677	25600	1521958940329	197388320	0.59
160	1238776	25600	1534565978176	198204160	
160	1248192	25600	1557983268864	199710720	
200	1594948	40000	2543859122704	318989600	0.90
200	1604397	40000	2574089733609	320879400	
200	1576295	40000	2484705927025	315259000	
260	2061769	67600	4250891409361	536059940	1.94
260	2133073	67600	4550000423329	554598980	
260	2132237	67600	4546434624169	554381620	
<b>3030</b>	<b>24060670</b>	<b>516300.000</b>	<b>32812830172010</b>	<b>4114964570</b>	<b>1.54</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
8132.0	-27578	0.9988	0.9974	512123.48

**CUADRO # 49 : PORCENTAJE DE RECOBRO**

<b>X = CONCENTRACIÓN</b>	<b>Y = % RECUPERACIÓN</b>	<b>Y ^2</b>
51.20	103.15	10639.92
51.20	100.72	10144.52
51.20	100.83	10166.69
57.60	96.55	9321.90
57.60	95.28	9078.28
57.60	98.95	9791.10
64.00	102.79	10565.78
64.00	98.60	9721.96
64.00	98.48	9698.31
76.80	96.16	9246.75
76.80	98.68	9737.74
76.80	98.97	9795.06
102.40	95.81	9179.56
102.40	96.20	9254.44
102.40	96.93	9395.42
128.00	100.22	10044.05
128.00	100.81	10162.66
128.00	99.04	9808.92
166.40	98.38	9678.62
166.40	101.79	10361.20
166.40	101.75	10353.06
<b>Σ</b>	<b>2080.09</b>	<b>206145.95</b>

<b>MEDIA ARITMÉTICA</b>	<b>IC(β1)</b>	<b>IC(β0)</b>	<b>IC(μ)</b>
99.05	8996.35 7267.65	107950.23 -163106.23	100.113 97.987

**CUADRO # 50 : PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO (DIA 1)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	99.06	9812.88	633287	639310.67	6272	0.98
80	101.01	10203.02	645805			
80	99.93	9986.00	638840			
90	100.00	10000.00	727451	727439.00	2360	0.32
90	100.32	10064.10	729793			
90	99.67	9934.11	725073			
100	99.70	9940.09	791487	793844.33	3885	0.49
100	100.56	10112.31	798328			
100	99.73	9946.07	791718			
120	100.08	10016.01	951643	950857.67	6230	0.66
120	100.61	10122.37	956658			
120	99.31	9862.48	944272			
160	100.87	10174.76	1298871	1279165.67	18213	1.42
160	99.07	9814.86	1275677			
160	98.08	9619.69	1262949			
<b>Σ</b>	<b>1498.00</b>	<b>149608.76</b>				<b>0.77</b>

**CUADRO # 51 : PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO (DIA 2)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	104.57	10934.88	668514	662894.00	10546	1.59
80	101.78	10359.17	650728			
80	104.71	10964.18	669440			
90	100.01	10002.00	727533	732426.33	4306	0.59
90	101.13	10227.28	735635			
90	100.92	10184.85	734111			
100	100.76	10152.58	799919	792390.33	8300	1.05
100	100.00	10000.00	793762			
100	98.69	9739.72	783490			
120	100.90	10180.81	959444	969219.67	12028	1.24
120	103.34	10679.16	982651			
120	101.55	10312.40	965564			
160	98.01	9605.96	1262049	1258854.00	10257	0.81
160	96.87	9383.80	1247380			
160	98.41	9684.53	1267133			
<b>Σ</b>	<b>1511.65</b>	<b>152411.31</b>				<b>1.06</b>

<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN GLOBAL:</b>	<b>1.73</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR GLOBAL:</b>	<b>1.73</b>
<b>G COCHRAN EXPERIMENTAL:</b>	<b>0.3797</b>
<b>G COCHRAN TABLAS:</b>	<b>0.602</b>
<b>t STUDENT EXPERIMENTAL:</b>	<b>1.016</b>
<b>t STUDENT TABLAS:</b>	<b>2.048</b>

**CUADRO # 52 : ESTABILIDAD ANALÍTICA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

HORAS	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	/di/	MEDIA ARITMÉTICA
0	803292	98.63	0.00	100.00
	834588	102.47		
	805498	98.9		
6	808360	99.25	0.61	100.61
	820572	100.75		
	829312	101.82		
24	855253	105.01	3.60	103.60
	847127	104.01		
	828929	101.78		
36	840280	103.17	6.31	106.307
	881873	108.28		
	875276	107.47		

**CUADRO # 53 : ROBUSTEZ PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	MEDIA ARITMETICA	/di/
BAJA (72:28)	865417	96.40	97	3.13
	873995	97.35		
NORMAL (75:25)	847049	97.43	100	0.00
	891815	102.57		
ALTA (78:22)	931205	103.72	103	3.40
	925296	103.07		

**CUADRO # 54 : TOLERANCIA PARA PIRIDOXINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	% RECUPERACIÓN	ÁREAS	S	CV	MEDIA ARITMÉTICA
REACTIVO I	99.47	801071	9980.38	1.24	805371
	101.42	816781			
	99.12	798262			
REACTIVO II	106.31	954428	53936.12	6.01	897764
	94.35	847049			
	99.34	891815			
COLUMNA I	99.47	801071	9980.38	1.24	805371
	101.42	816781			
	99.12	798262			
COLUMNA II	104.65	910143	39628.72	4.56	869723
	99.81	868091			
	95.54	830936			
	<b>1200.02</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>51313.30</b>	<b>3.30</b>	<b>3378230</b>

t Student experimental: 0.001740

G Cochran experimental: 0.5716

t Student tabla: 2.2280

G Cochran tabla : 0.9065

**CUADRO # 55 : PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	100.38	4015858	16127115476164	4000613	38374.71	0.96
100.00	101.12	4045597	16366855086409			
100.00	100.55	4022766	16182646290756			
100.00	99.70	3988467	15907869010089			
100.00	98.33	3933854	15475207293316			
100.00	99.91	3997138	15977112191044			
	<b>Σ</b>	<b>24003680</b>	<b>96036805347778</b>			

**CUADRO # 56 : ADECUABILIDAD DEL SISTEMA PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	% RECUPERADO	Y= ÁREAS (mAU)	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
100.00	101.21	3857131	14877459551161	3844050	33805.56	0.88
100.00	101.66	3885067	15093745594489			
100.00	100.34	3802785	14461173756225			
100.00	101.25	3859227	14893633037529			
100.00	100.55	3816039	14562153649521			
		<b>19220249</b>	<b>73888165588925</b>			

**CUADRO # 57 : RESOLUCION CROMATOGRAFICA PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

ÁREAS	ALTURA	BASE	FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	RESOLUCIÓN	ASIMETRÍA	PLATOS TEÓRICOS
3857131	307083	1.54	26.65	5.53	0.000	0.98	4795.68
3885067	309726	1.73	26.67	5.53	3.150	0.98	4817.87
3802785	305158	1.70	26.70	5.53	2.760	0.98	4897.60
3859227	308418	1.61	26.70	5.53	3.430	0.98	4853.01
3816039	304612	1.61	26.72	5.53	3.880	0.98	4819.18
<b>3844050</b>	<b>306999</b>	<b>1.64</b>	<b>26.69</b>	<b>5.53</b>	<b>2.64</b>	<b>0.98</b>	<b>4836.67</b>

**CUADRO # 58: LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

X = % AGREGADO	Y = ÁREAS	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY	CV
80	3086719	6400	9527834184961	246937520	0.91
80	3044828	6400	9270977549584	243586240	
80	3034393	6400	9207540878449	242751440	
90	3415898	8100	11668359146404	307430820	0.38
90	3442077	8100	11847894073929	309786930	
90	3426177	8100	11738688835329	308355930	
100	3988467	10000	15907869010089	398846700	0.86
100	3933854	10000	15475207293316	393385400	
100	3997138	10000	15977112191044	399713800	
110	4447845	12100	19783325144025	489262950	1.17
110	4391922	12100	19288978854084	483111420	
110	4345531	12100	18883639671961	478008410	
120	4997335	14400	24973357102225	599680200	0.80
120	4977882	14400	24779309205924	597345840	
120	4921000	14400	24216241000000	590520000	
<b>1500</b>	<b>59451066</b>	<b>153000.000</b>	<b>242546334141324</b>	<b>6088723600</b>	<b>0.82</b>

PENDIENTE	INTERCEPTO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>B1</sub> )
47872.0	-823829	0.9969	0.9939	702938.61	205187.06 -120171.06

**CUADRO # 59: EXACTITUD PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

% AGREGADO	Y =% RECUPERACIÓN	Y^2	ÁREAS	MEDIA ARITMÉTICA	S	S^2	CV
80	101.03	10207.06	3086719	100.00	0.91	0.83	0.91
80	99.65	9930.12	3044828				
80	99.31	9862.48	3034393				
100	100.25	10050.06	3804326	99.99	0.24	0.06	0.24
100	99.77	9954.05	3785964				
100	99.96	9992.00	3793185				
120	100.76	10152.58	4694134	100.00	0.96	0.92	0.96
120	100.32	10064.10	4673666				
120	98.92	9785.17	4608189				
<b>Σ</b>	<b>899.97</b>	<b>89997.62</b>		<b>100.00</b>	<b>0.67</b>	<b>0.60</b>	<b>0.70</b>

t Student experimental: 1.9192  
t Student tabla: 2.3650

G Cochran experimental: 0.4880  
G Cochran tabla : 0.8709

**CUADRO # 60: REPETIBILIDAD DEL MÉTODO PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

% PLACEBO ANALÍTICO	CANTIDAD ADICIONADA (mcg/mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV	INTERVALO DE CONFIANZA (IC <sub>μ</sub> )
100.00	20.00	20.06	101.62	10326.62	101.44	0.5373	0.53	101.89 100.98
100.00	20.00	20.09	101.71	10344.92				
100.00	20.00	20.22	102.13	10430.54				
100.00	20.00	20.02	101.49	10300.22				
100.00	20.00	19.90	101.12	10225.25				
100.00	20.00	19.72	100.57	10114.32				
		<b>Σ</b>	<b>608.64</b>	<b>61741.88</b>				

**CUADRO # 61: LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CIPROHEPTADINA HCl**

<b>X = % AGREGADO</b>	<b>Y = ÁREAS</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Y<sup>2</sup></b>	<b>XY</b>	<b>CV</b>
80	3345312	6400	11191112377344	267624960	0.47
80	3314608	6400	10986626193664	265168640	
80	3323473	6400	11045472781729	265877840	
90	3772436	8100	14231273374096	339519240	1.08
90	3728654	8100	13902860651716	335578860	
90	3692131	8100	13631831321161	332291790	
100	4174368	10000	17425348199424	417436800	0.42
100	4209529	10000	17720134401841	420952900	
100	4194664	10000	17595206072896	419466400	
110	4553266	12100	20732231266756	500859260	0.49
110	4598068	12100	21142229332624	505787480	
110	4573458	12100	20916518077764	503080380	
120	4897486	14400	23985369120196	587698320	0.33
120	4924175	14400	24247499430625	590901000	
120	4927301	14400	24278295144601	591276120	
<b>1500</b>	<b>62228929</b>	<b>153000</b>	<b>263032007746437</b>	<b>6343519990</b>	<b>0.56</b>

<b>PENDIENTE</b>	<b>INTERCEPTO</b>	<b>COEFICIENTE DE CORRELACIÓN</b>	<b>COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
40209.0	127692	0.9980	0.9961	589755.85

**CUADRO # 62: PORCENTAJE DE RECOBRO DE CIPROHEPTADINA**

X = CONCENTRACIÓN (mcg/mL)	Y = % RECUPERACIÓN	Y ^2
16.00	103.81	10776.52
16.00	102.86	10580.18
16.00	103.13	10635.80
18.00	104.06	10828.48
18.00	102.85	10578.12
18.00	101.84	10371.39
20.00	103.63	10739.18
20.00	104.50	10920.25
20.00	104.13	10843.06
22.00	102.76	10559.62
22.00	103.77	10768.21
22.00	103.22	10654.37
24.00	101.32	10265.74
24.00	101.87	10377.50
24.00	101.94	10391.76
$\Sigma$	<b>1545.69</b>	<b>159290.17</b>

MEDIA ARITMÉTICA	IC(B1)	IC(B0)	IC( $\mu$ )
103.05	72357.95 8060.05	3374576.82 -3119192.82	103.58 102.52

**CUADRO # 63: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA CIPROHEPTADINA HCl (DÍA 1)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y^2	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	101.31	10263.7161	3346224	3302950.33	38347	1.16
80	99.59	9918.1681	3289440			
80	99.09	9818.8281	3273187			
90	99.90	9980.0100	3759898	3763593.67	33212	0.88
90	100.93	10186.8649	3798499			
90	99.17	9834.6889	3732384			
100	100.40	10080.1600	4154051	4137111.00	19831	0.48
100	99.47	9894.2809	4115298			
100	100.12	10024.0144	4141984			
110	101.20	10241.4400	4562174	4508087.00	47318	1.05
110	99.55	9910.2025	4487748			
110	99.25	9850.5625	4474339			
120	100.61	10122.3721	5089304	5058671.00	33110	0.65
120	100.09	10018.0081	5063165			
120	99.30	9860.4900	5023544			
$\Sigma$	<b>1499.98</b>	<b>150003.81</b>				<b>0.85</b>

**CUADRO # 64: PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA CIPROHEPTADINA HCl (DÍA 2)**

% TEÓRICO	Y = % RECUPERACIÓN	Y <sup>2</sup>	ÁREAS (mAU)	MEDIA ARITMÉTICA	S	CV
80	100.53	10106.2809	3345312	3327797.67	15802	0.47
80	99.60	9920.1600	3314608			
80	99.87	9974.0169	3323473			
90	101.11	10223.2321	3772436	3731073.67	40207	1.08
90	99.93	9986.0049	3728654			
90	98.96	9793.0816	3692131			
100	99.56	9912.1936	4174368	4192853.67	17650	0.42
100	100.40	10080.1600	4209529			
100	100.04	10008.0016	4194664			
110	99.53	9906.2209	4553266	4574930.67	22437	0.49
110	100.51	10102.2601	4598068			
110	99.97	9994.0009	4573458			
120	99.62	9924.1444	4897486	4916320.67	16386	0.33
120	100.16	10032.0256	4924175			
120	100.22	10044.0484	4927301			
<b>Σ</b>	<b>1500.01</b>	<b>150005.83</b>				<b>0.56</b>

<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN GLOBAL:</b>	<b>0.63</b>
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR GLOBAL:</b>	<b>0.63</b>
<b>G COCHRAN EXPERIMENTAL:</b>	<b>0.3057</b>
<b>G COCHRAN TABLAS:</b>	<b>0.6020</b>
<b>t STUDENT EXPERIMENTAL:</b>	<b>0.009</b>
<b>t STUDENT TABLA:</b>	<b>2.048</b>

**CUADRO # 65: ESTABILIDAD ANALÍTICA PARA CIPROHEPTADINA HCl**

HORAS	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	/di/	MEDIA ARITMÉTICA
0	4025900	99.95	0.00	100.28
	4059146	100.55		
	4041977	100.35		
6	4124761	102.4	1.75	102.04
	4134020	102.63		
	4071652	101.08		
24	4131167	102.56	2.62	102.90
	4179996	103.77		
	4123962	102.38		
36	4175716	103.67	3.67	103.950
	4185055	103.9		
	4200578	104.28		

**CUADRO # 66: ROBUSTEZ PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	ÁREAS	% RECUPERACIÓN	MEDIA ARITMÉTICA	/di/
BAJA (72:28)	3444954	85.52	86	9
	3446963	85.57		
	3446827	85.57		
NORMAL (75:25)	3811690	94.63	94	0
	3827214	95.01		
	3767804	93.54		
ALTA (78:22)	3440670	85.42	85	9
	3415415	84.79		
	3427599	85.09		

**CUADRO # 67: TOLERANCIA PARA CIPROHEPTADINA CLORHIDRATO**

CONDICIÓN	% RECUPERACIÓN	ÁREAS	S	CV	MEDIA ARITMÉTICA
REACTIVO I	99.82	3882749	16933.34	0.43	3894983
	99.82	3887890			
	100.50	3914309			
REACTIVO II	98.33	3906952	14375.82	0.37	3906323
	98.67	3920374			
	97.94	3891643			
COLUMNA I	100.69	3874306	28791.43	0.75	3847655
	100.10	3851542			
	99.21	3817118			
COLUMNA II	100.51	3882752	18756.43	0.49	3862957
	99.55	3845449			
	99.94	3860669			
<b>Σ</b>	<b>1195.07</b>	<b>GLOBAL</b>	<b>19714.25</b>	<b>0.89</b>	<b>15511918</b>

t Student experimental: 1.60  
t Student tabla: 2.2280

G Cochran experimental: 0.4950  
G Cochran tabla : 0.9065

**CUADRO # 68: LIMITE DE DETECCIÓN  
PARA CIPROHEPTADINA HCl**

Muestra	Área
Blanco	16264
B x 3 veces	48792

Concentración mcg/mL	Áreas
0.20	35809
0.40	74645
0.60	116220
0.80	143122
1.00	198235

**CUADRO# 69: LIMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA  
CIPROHEPTADINA HCl**

Muestra	Área
Blanco	16264
B x 10 veces	162640

Concentración mcg/mL	Áreas
0.40	74877
0.80	149294
1.20	206225
1.60	313194
2.00	423990

**ANEXO 2**  
**FIGURAS DE GRAFICAS**

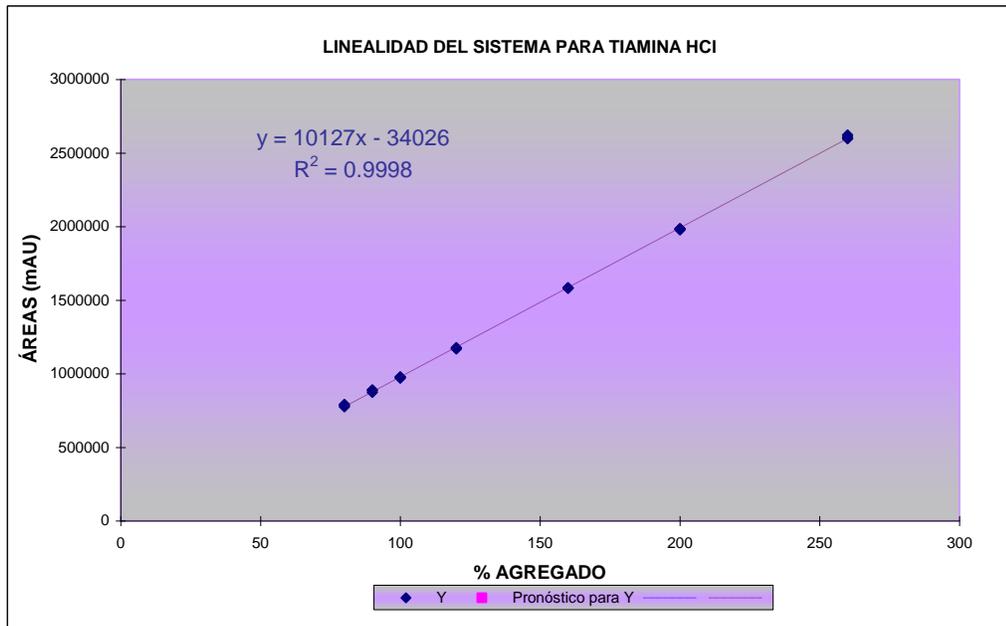


FIGURA N°1 GRAFICA LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA TIAMINA HCl

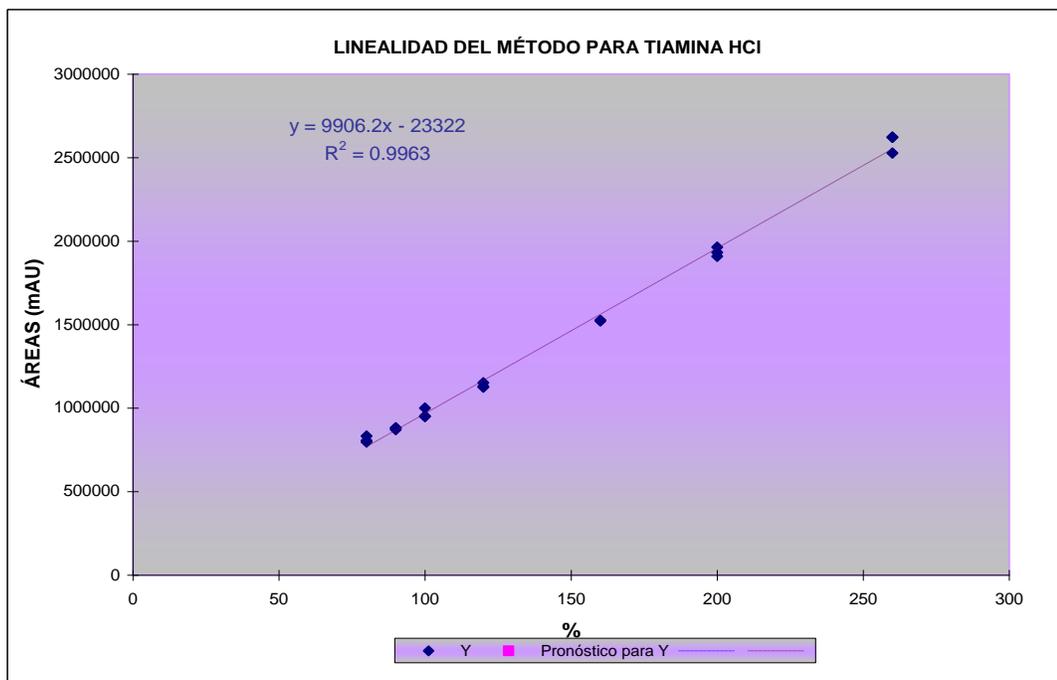


FIGURA N°2 GRAFICA DE LINEALIDAD DEL METODO PARA TIAMINA HCl

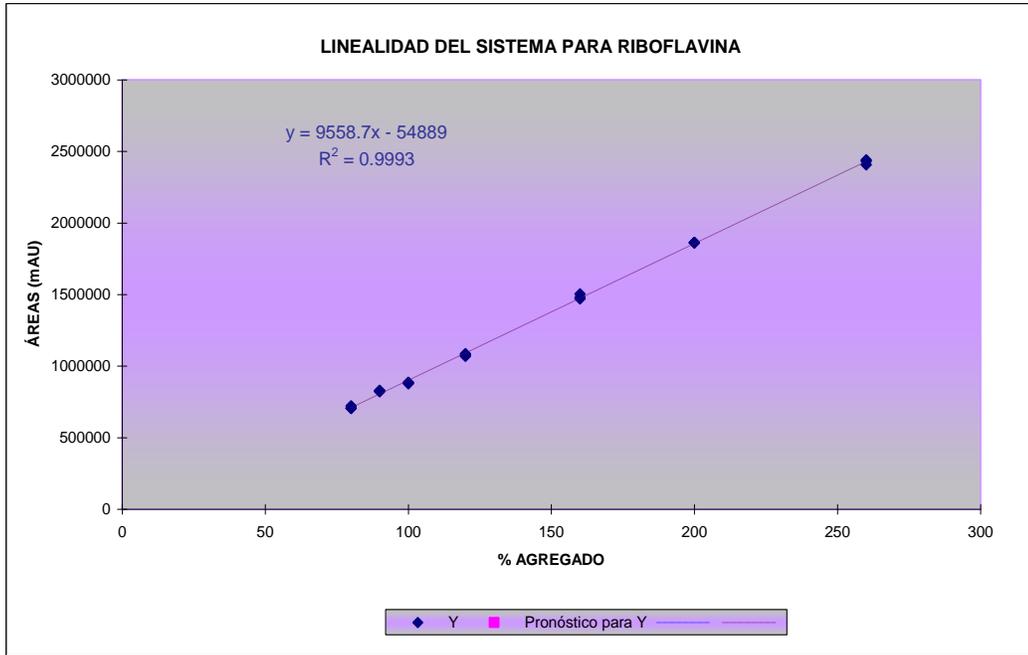


FIGURA N°3 GRAFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA RIBOFLAVINA

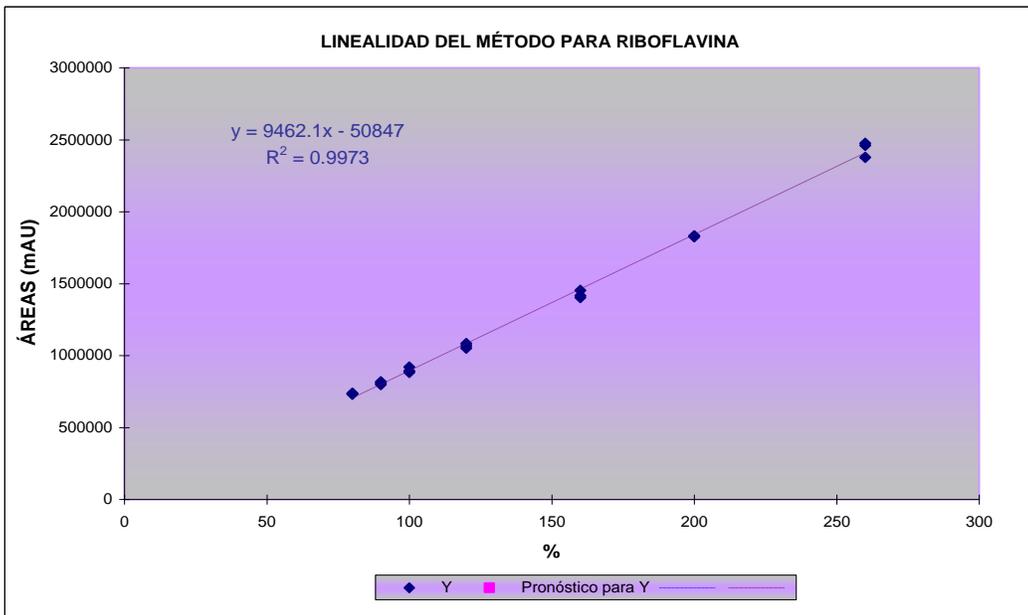


FIGURA N°4 LINEALIDAD DEL METODO PARA RIBOFLAVINA

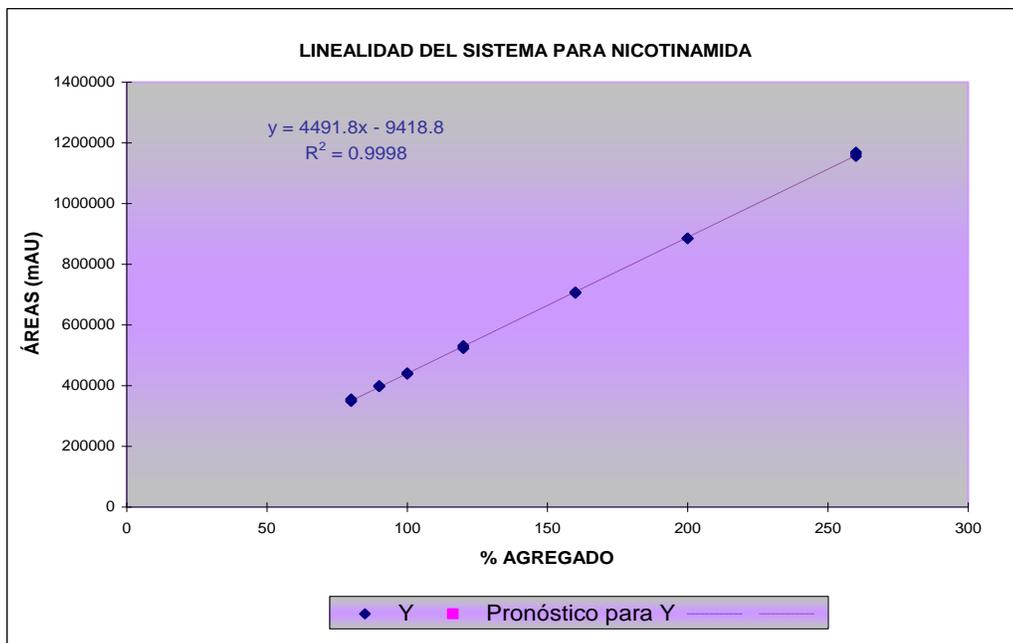


FIGURA N°5 GRAFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA NICOTINAMIDA

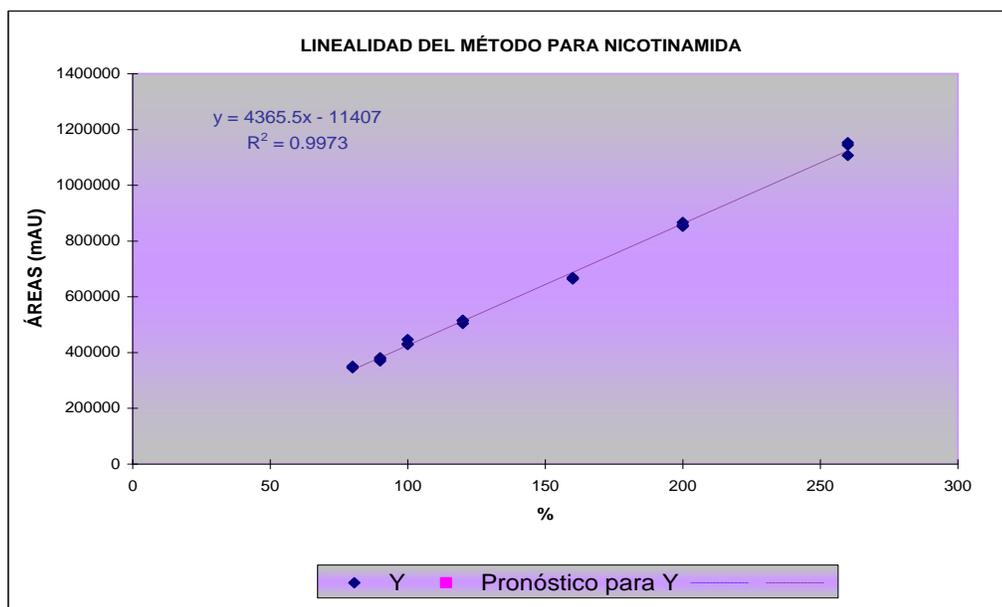


FIGURA N°6 GRAFICA LINEALIDAD DEL METODO PARA NICOTINAMIDA

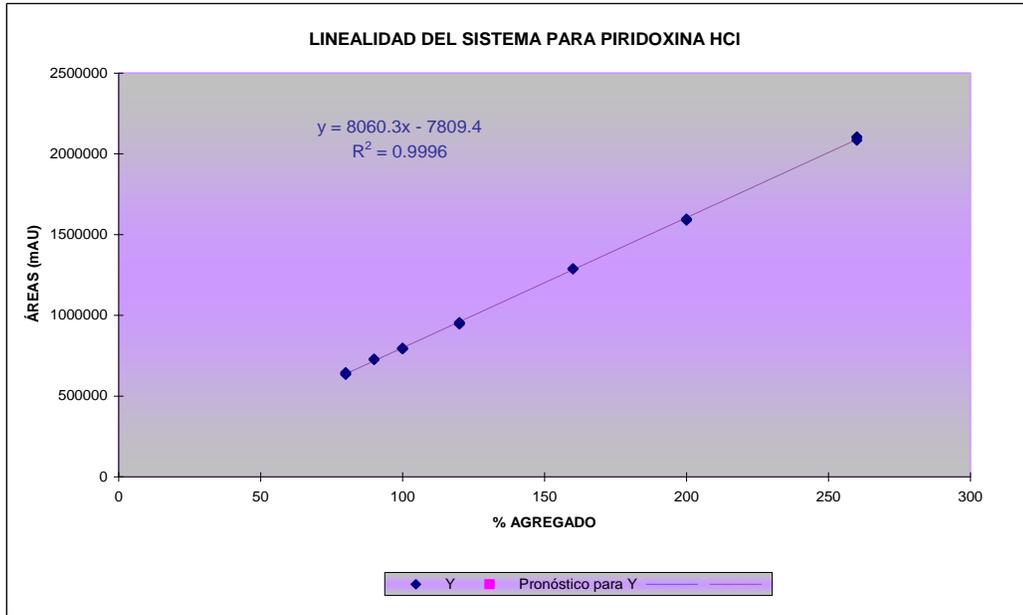


FIGURA N°7 GRAFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA PIRIDOXINA HCl

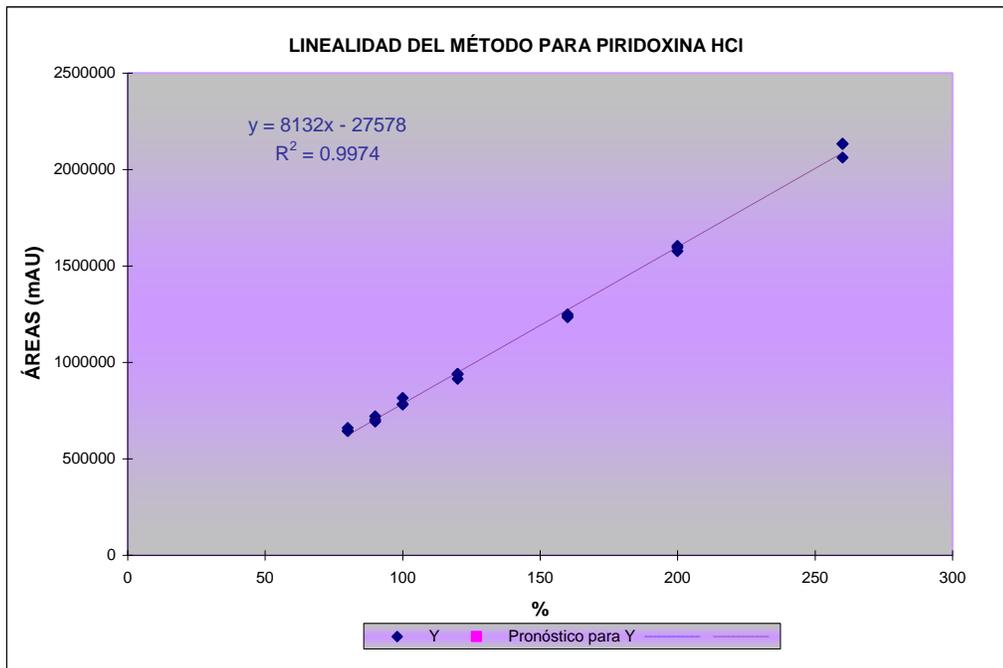


FIGURA N°8 GRAFICA LINEALIDAD DEL METODO PARA PIRIDOXINA HCl

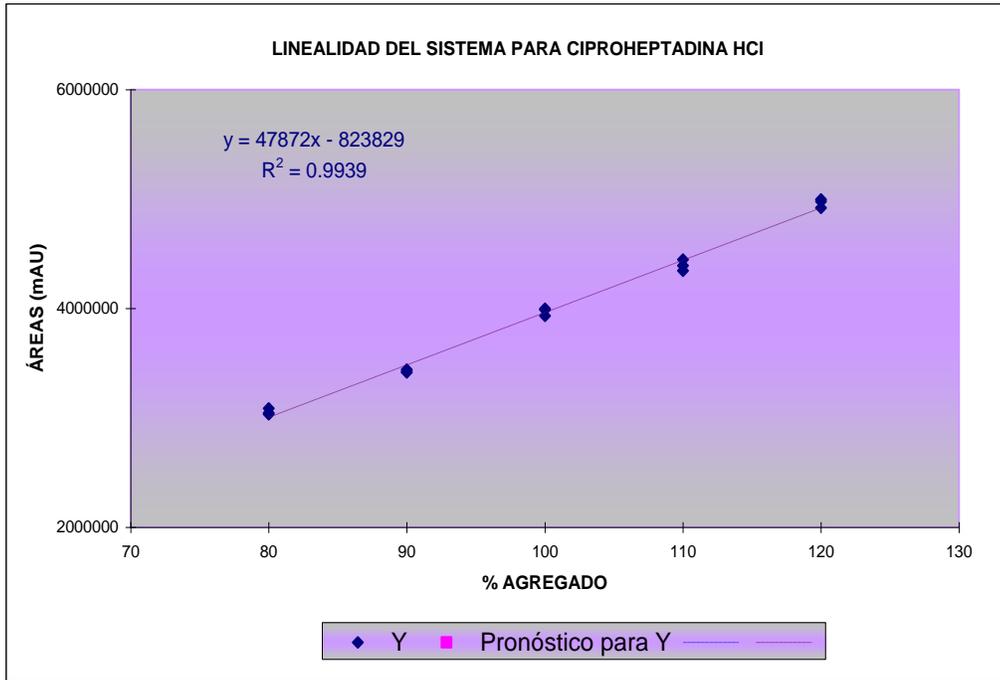


FIGURA N°9 GRAFICA DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA CIPROHEPTADINA HCl

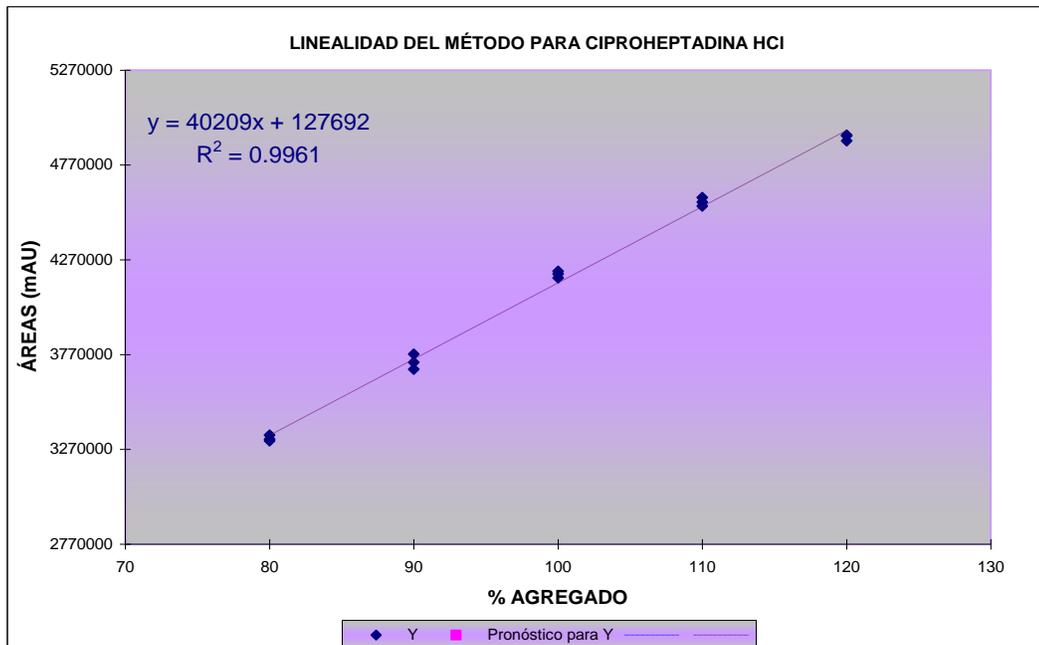


FIGURA N°10 GRAFICA LINEALIDAD DEL METODO PARA CIPROHEPTADINA HCl

## **ANEXO 3**

**<1225> VALIDACION DE METODOS FARMACOPEICOS**

## {1225} VALIDACIÓN DE MÉTODOS FARMACOPEICOS

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los productos farmacéuticos están sujetos a diversos requisitos. Según el Artículo 501 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los análisis y especificaciones de las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional constituyen normas legales. Los reglamentos sobre Principios de Buenas Prácticas de Fabricación Vigentes [21 CFR 211.194(a)] requieren que los métodos de prueba, que se utilizan para evaluar el cumplimiento de los productos farmacéuticos con las especificaciones establecidas, cumplan normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. Sin embargo, según esta normativa [21 CFR 211.194(a)(2)] no se exige que los usuarios de los métodos analíticos descritos en la USP y en el NF validen la exactitud y confiabilidad de estos métodos, sino que solamente comprueben su aptitud bajo las condiciones concretas de uso. Al reconocer el carácter legal de las normas USP y NF, es esencial que las propuestas para adoptar los métodos analíticos farmacopeicos nuevos o solicitar la revisión de los ya existentes, estén respaldadas por suficientes datos de laboratorio que documenten su validez.

El texto de este capítulo informativo ha sido armonizado, en la medida de lo posible, con los documentos *Validación de Procedimientos Analíticos* y el texto suplementario *Metodología*, ambos de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH), que tratan sobre procedimientos analíticos incluidos como parte de las solicitudes de registro presentadas en la UE, Japón y EE.UU. Algunos aspectos (disolución, liberación del fármaco), que forman parte de este capítulo, se tratan sólo brevemente en los documentos de ICH y deberán tratarse en el futuro. Una completa armonización no ha sido posible, en parte debido a las distintas utilidades de terminología. Por ejemplo, la utilización de "procedimiento" por parte de la ICH presenta dificultades, puesto que este término tiene una utilización específica y diferente en USP-NF.

### PRESENTACIÓN A LOS COMPENDIOS

Las presentaciones de métodos analíticos, nuevos o revisados, a los compendios de la USP deben contener información suficiente como para permitir que los miembros del Comité de Revisión de la USP evalúen los méritos relativos de los procedimientos propuestos. En la mayor parte de los casos, se evalúa si la descripción del método analítico es entendible y completa; se determina la necesidad de los métodos y se evalúa la documentación que sustenta que los métodos han sido validados adecuadamente. La información puede variar dependiendo del tipo de método del que se trate. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la documentación presentada constará de las siguientes secciones.

**Justificación**—Esta sección debe identificar la necesidad del método y describir la capacidad del método específico propuesto y por qué se lo prefiere sobre otros tipos de determinaciones. Para procedimientos revisados, debe proporcionarse una comparación de las limitaciones del método farmacopeico actual y las ventajas ofrecidas por el método propuesto.

**Procedimiento Analítico Propuesto**—Esta sección debe incluir una descripción completa del método analítico lo suficientemente detallada como para permitir que expertos en la técnica puedan repetirlo. La reseña debe incluir todos los parámetros operativos importantes e instrucciones específicas, tales como la preparación de reactivos, realización de pruebas de aptitud del sistema, descripción de blancos utilizados, precauciones y fórmulas explícitas para el cálculo de los resultados de las pruebas.

**Datos**—Esta sección debe proporcionar una documentación minuciosa y completa de la validación del método analítico. Debe incluir resúmenes de los datos y cálculos experimentales que fundamenten cada una de las características de desempeño o rendimiento analítico aplicables. Estas características se describen en la sección que se indica a continuación.

## VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos en este documento se indican en la *Tabla 1*. Dado que las opiniones pueden diferir respecto a la terminología y al uso, cada una de las características de desempeño se define en la sección siguiente de este capítulo, junto con un esbozo de un método o métodos típicos mediante los cuales puede medirse.

**Tabla 1. Características Analíticas Típicas Utilizadas para la Validación de Métodos**

Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de Detección
Límite de Cuantificación
Linealidad
Intervalo

En el caso de métodos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación a la USP de un método analítico revisado o utilización de un método general establecido con un nuevo producto o materia prima (ver más adelante en *Datos Necesarios para Validación de Análisis*).

Los documentos de ICH aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

#### Exactitud—

**Definición**—La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.

**Determinación**—En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un análisis de pureza conocida (por ejemplo, un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método. Si no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico ("spike"), como la comparación de los resultados con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un método independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco; pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta) debe ser utilizado siempre que se lo conozca.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

#### **Precisión—**

**Definición—**La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. Una 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. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo. En la mayoría de los casos, la repetibilidad es el criterio de mayor interés en los procedimientos analíticos de la USP, aunque la reproducibilidad entre laboratorios o la precisión intermedia puede considerarse durante la normalización de un procedimiento antes de presentarlo a la Farmacopea.

**Determinación—**La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas.

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba).

#### **Especificidad—**

**Definición—**Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. [NOTA—Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC) han preferido el término "selectividad," reservando "especificidad" para procedimientos que resulten completamente selectivos.] Para los métodos de prueba o valoración que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes consecuencias:

**PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN—**garantizan la identidad del analito.

**PRUEBAS DE PUREZA—**garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, límite de impurezas volátiles orgánicas).

**VALORACIONES—**proporcionan un resultado exacto, que permita una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

**Determinación—**En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia

conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuadas.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños.

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo, luz, calor, humedad, hidrólisis ácida y alcalina, oxidación). En una valoración, deben compararse los resultados; en pruebas de impureza cromatográfica, deben compararse los perfiles de impurezas.

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente.

#### **Límite de Detección—**

**Definición—**El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

**Determinación—**Para métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales. En el caso de métodos presentados como candidatos a métodos farmacopeicos oficiales, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. Por el contrario, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo para el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de detección requerido. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza con una concentración del 0,1%, debería demostrarse que el procedimiento detectará de modo confiable la impureza a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.

**Límite de Cuantificación—**

**Definición—**El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

**Determinación—**Para métodos no instrumentales, el límite cuantitativo se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales. En el caso de métodos presentados como candidatos a métodos farmacéuticos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Por el contrario, debe mostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación requerido. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0,1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificará de modo confiable el analito a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos ICH describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de cuantificación debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas a este límite.

**Linealidad e Intervalo—**

**Definición de Linealidad—**La linealidad de un método analítico 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.

**Definición de Intervalo—**El intervalo de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el método analítico.

**Determinación de Linealidad e Intervalo—**La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, puede que haya que someter los datos de la prueba a una transformación matemática. Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo del método se valida verificando que el método analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

VALORACIÓN DE UN FÁRMACO (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.

DETERMINACIÓN DE UNA IMPUREZA: de 50% a 120% de la especificación.

PARA UNIFORMIDAD DEL CONTENIDO: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (por ejemplo, inhaladores de dosis fija).

PARA PRUEBAS DE DISOLUCIÓN:  $\pm 20\%$  por encima del intervalo especificado (por ejemplo, si las especificaciones de un producto de liberación controlada cubren una región que varía de 20% después de 1 hora a 90% después de 24 horas, el intervalo validado sería de 0% a 110% del valor especificado en la etiqueta).

**Tolerancia, también conocida como Fortaleza o Resistencia (Ruggedness)—**

**Definición—**La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperaturas de valoración o días. La tolerancia se expresa normalmente como la carencia de influencia de las variables operativas y ambientales del método analítico sobre los resultados de las pruebas. La tolerancia es una medida de la reproducibilidad de los resultados de las pruebas sometidas a la variación de condiciones que se esperarían normalmente entre distintos laboratorios o distintos analistas.

**Determinación—**La tolerancia de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden ser diferentes pero que continúan encontrándose dentro de los parámetros especificados del análisis. El grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba se determina entonces como una función de las variables del análisis. Esta reproducibilidad se puede comparar a la precisión de la valoración en condiciones normales para obtener una medida de la resistencia del método analítico.

**Robustez—**

**Definición—**La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

**Aptitud del Sistema—**Si las mediciones son susceptibles a variaciones en condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o incluirse en el método una declaración preventiva. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez sería el establecimiento de una serie de parámetros de aptitud del sistema que garantizan que se mantenga la validez del método analítico siempre que se utilice. Las variaciones típicas son la estabilidad de las soluciones y equipo analítico, y de los analistas. En la cromatografía líquida, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo.

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un método específico dependen del tipo de método que se está evaluando. Son especialmente importantes en el caso de métodos cromatográficos y las presentaciones a la USP deberán tener en cuenta los requisitos indicados en la sección *Aptitud del Sistema* en el capítulo de pruebas generales *Cromatografía* (621).

### DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UNA DETERMINACIÓN

Los procedimientos de las determinaciones farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad de determinaciones, es lógico que diferentes métodos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Este capítulo cubre sólo las categorías más habituales para las que se exigen datos de validación. Estas categorías se indican a continuación.

**Categoría I:** Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

**Categoría II:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

**Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

**Categoría IV:** Pruebas de identificación.

Para cada categoría de análisis, se requiere diferente información analítica. En la *Tabla 2* se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de análisis.

Los métodos generales de prueba y valoración ya establecidos (por ejemplo, método volumétrico de determinación de agua, prueba de endotoxinas bacterianas) deben revalidarse para comprobar su exactitud (y la ausencia de posibles interferencias) cuando se utilizan para un producto nuevo o materia prima nueva.

La validez de un método analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la finalización con éxito de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un método es adecuado para sus aplicaciones previstas. Cualquier propuesta de procedimientos farmacopeicos analíticos nuevos o revisados debe ir acompañada de la documentación adecuada.

Tabla 2. Datos Requeridos para la Validación de los Análisis

Características de Desempeño Analítico	Categoría I de Valoración	Categoría II de Valoración		Categoría III de Valoración	Categoría IV de Valoración
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
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.