

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.P.5.3 Reporte de validación de la determinación cuantitativa de Ceto e Hidroxiácidos en Ketosteril tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

1. OBJETIVO

Presentar los resultados obtenidos en la validación del método analítico para el ensayo de Ceto-ácidos e Hidroxiácidos en Ketosteril tabletas recubiertas, por HPLC utilizando detección UV.

2. DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

RSD – Desviación estándar relativa

rt – Tiempo de retención

Resol. – Resolución

3. RESULTADOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA FÓRMULA

3.1.1 Sustancia activa

Aminoácidos, Ceto-ácidos e Hidroxiácidos descritos en la formulación (3.1.3)

3.1.2 Forma farmacéutica

Tabletas recubiertas

3.1.3 Formulación

- Composición de los núcleos

Componentes	Cantidad por unidad (mg)	Función
Alfa-cetoisoleucina, calcio**	67,0**	Ingrediente activo
Alfa-cetoleucina, calcio**	101,0**	Ingrediente activo
Alfa-cetofenilalanina, calcio**	68,0**	Ingrediente activo
Alfa-cetovalina, calcio**	86,0**	Ingrediente activo
Alfa-hidroximetionina, calcio**	59,0**	Ingrediente activo
Alcohol isopropil*	101,666 - 108,333 0,1295 - 0,138 ml	Solvente
Agua purificada*	0,001666 – 0,005	Solvente
Povidona	26,3	Agente de granulación
Macrogol 6000	7,8	Lubricante
Acetato de L-Lisina	105,0	Ingrediente activo
L-Treonina	53,0	Ingrediente activo
L-Triptófano	23,0	Ingrediente activo
L-Histidina	38,0	Ingrediente activo
L-Tirosina	30,0	Ingrediente activo

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Componentes	Cantidad por unidad (mg)	Función
Alcohol Isopropil*	0,0375 0,0478 ml	Solvente
Agua purificada*	0,0015	Solvente
Povidona	16,883	Agente de granulación
Macrogol 6000	5,0	Lubricante
Almidón de maíz***	Máx. 44	Relleno, agente de equilibrio
Talco	19,6	Agente de liberación
Silica coloidal anhidro	4,40	Regulador de flujo
Crospovidona	6,0	Explosivo
Estearato de magnesio	15,0	Lubricante
Total	~775	

*Eliminada durante el proceso;

**El contenido de agua individual es tenido en cuenta para alcanzar el 100% de contenido de ingrediente activo en cada lote;

***varía, al ser utilizado como agente de relleno para alcanzar un peso de núcleo constante con contenido específico continuo de ingrediente activo.

- Composición del recubrimiento

Componentes	Cantidad por unidad (mg)	Función
Alcohol isopropil*	70 89,166 ml	Solvente
Talco	9,067	Agente de liberación
Dioxido de titanio	7,40	Pigmento
Macrogol 6000	5,0	Lubricante
Agua purificada*	0,0015	Solvente
Quinolina Amarilla E 104	0,72	Pigmento
Agua purificada*	6	Solvente
Eudragit E 12,5% m/m**	47,2 (5,9 sólido)	Compuesto de revestimiento
Triacetin	0,43	Plastificante
Macrogol 6000	0,28	Lubricante
Agua purificada*	0,22	Solvente
Alcohol isopropil*	2,017 0,0025688 ml	Solvente
Total	~25	

*Eliminado durante el proceso;

**Eliminado en parte durante el proceso

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2 MÉTODO

3.2.1 Reactivos y materiales

Ácido sulfúrico 0.5 M (VWR, lote: 15I300515, validez: 30 Septiembre 2017)
Ácido sulfúrico 1 N (logbook RU2, 49/2016, página 2016)
Agua MilliQ, obtenida mediante un sistema Millipore
Alfa-Cetoleucina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 3427550206, validez: 09 Junio 2017, actividad: 89.6%)
Alfa-Cetoleucina de calcio estándar primario (Evokin, lote: 2427050102, validez: 09 de Junio 2017, actividad: 89.8%)
Alfa-Cetofenilalanina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 2428450130, validez: 09 de Junio de 2017, actividad: 93.9%)
Alfa-Cetovalina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 3428750231, validez: 09 de Junio de 2017, actividad: 91.2%)
Alfa-Hidroximetionina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 2427950205, validez: 09 de Junio 2017, actividad: 99.2%)
Povidona (Lote: 160300498, validez: 30 Junio 2018)
Magrocol 6000 (Lote: 160100494, validez: 16 Julio 2019)
Acetato de L-Lisina (Lote: 160500195, validez: 02 Febrero 2019)
L-Treonina (Lote: 160400321, validez: 11 Marzo 2022)
L-Triptofano (Lote: 16030029, validez: 26 Febrero 2018)
L-Histidina (Lote: 160400068, validez: 17 Noviembre 2018)
L-Tirosina (Lote: 160300620, validez: 29 Febrero 2020)
Almidón de maíz (Lote: 150500002, validez: 18 Febrero 2017)
Talco (Lote: 160100099, validez: 18 Junio 2018)
Sílice coloidal anhidra (Lote: 160100499, validez: 21 Octubre 2017)
Crospovidona (Lote: 160100468, validez: 28 Octubre 2018)
Estearato de Magnesio (Lote: 160100057, validez: 31 Octubre 2017)
Dióxido de Titanio (Lote: 150800228, validez: 07 Julio 2018)
Amarillo de Quinoleína E 104 (Lote: 150900495, validez: 23 Julio 2020)
Eudragit E 12.5% (Lote: 151100190, validez: 31 Enero 2018)
Triacetina (Lote: 150400580, validez: 20 Septiembre 2019)
Ketosteril tabletas (Lote: 18N1032, validez: Marzo 2019)
Matraces volumétricos, micropipetas y pipetas

3.2.2 Equipamiento

5120-II-0286: HPLC con bomba cuaternaria, autosampler, Detector de red de Diodos UV/UV-Vis y software de adquisición y tratamiento de datos.
5120-II-0417: Waters, UPCL con funcionalidad de HPLC, equipado con dos bombas binarias, autosampler, Detector de red de Diodos UV/UV-Vis y software de adquisición y distribución de datos.

3.2.3 Solución estándar madre: Linealidad de alto rango estándares de referencia de analitos

Se pesaron 212.2 mg de alfa-cetoleucina, 311.9 mg de alfa-cetoleucina, 263.1 mg de alfa-cetovalina, 191.9 mg de alfa-cetofenilalanina y 151.3 mg de alfa-hidroximetionina en un matraz volumétrico de 1000 mL. Se agregaron 40 mL de ácido sulfúrico 1 N y el volumen fue completado con agua.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.4 Solución estándar de trabajo: Linealidad de alto rango – estándares de referencia de analitos

Las soluciones estándar de trabajo fueron preparados de acuerdo a la tabla 1.

Nivel (%)	Dilución (mL solución madre estándar → mL)
50	5 → 100
80	8 → 100
90	9 → 100
100	10 → 100
110	11 → 100
120	12 → 100
150	15 → 100

Tabla 1

A cada matraz volumétrico de 100 mL se agregó 3.6 mL de ácido sulfúrico 1 N y luego se completó con agua.

3.2.5 Solución madre estándar: Linealidad de alto rango – efecto matriz

Se pesaron 212.2 mg de alfa-cetoisoleucina, 311.9 mg de alfa-cetoleucina, 263.4 mg de alfa-cetovalina, 191.8 mg de alfa-cetofenilalanina y 151.1 mg de alfa-hidroximetionina en un matraz volumétrico de 100 mL. Se agregaron 4 mL de ácido sulfúrico 1N y el volumen fue completado con agua.

3.2.6 Solución estándar de trabajo: Linealidad de alto rango – efecto matriz

Las soluciones estándar de trabajo fueron preparadas de acuerdo a la tabla 2.

Nivel (%)	Dilución (mL solución madre estándar → mL)
50	5 → 1000
80	8 → 1000
90	9 → 1000
100	10 → 1000
110	11 → 1000
120	12 → 1000
150	15 → 1000

Tabla 2

A cada matraz volumétrico de 1000 mL se agregaron cantidades de placebo correspondientes a 100% de composición y 36 mL de ácido sulfúrico 1N. El volumen fue completado con agua.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.7 Solución estándar

Se pesaron cerca de 212.1 mg de alfa-cetoisoleucina, 311.8 mg de alfa-cetoleucina, 263.2 mg de alfa-cetovalina, 191.7 mg de alfa-cetofenilalanina y 151.2 mg de alfa-hidroximetionina en un matraz volumétrico de 1000 mL. Se agregaron 40 mL de ácido sulfúrico 1N y el volumen fue completado con agua. Finalmente, se mezclaron 10 mL de la solución previa se mezclaron con 3.6 mL de ácido sulfúrico 1N y se agregó agua para lograr 100 mL de solución.

3.2.8 Solución de prueba

Se pesaron 10 tabletas de Ketosteril y se transfirieron a un matraz volumétrico de 2000 mL. Se agregaron 1800 mL de agua y 80 mL de ácido sulfúrico 1 N y la solución fue agitada hasta disolución completa de las tabletas. Luego el volumen fue completado con agua.

Finalmente, 5 mL de solución fueron mezclados con 3.8 mL de ácido sulfúrico 1 N y se agregó agua para lograr 100 mL de solución.

3.2.9 Condiciones cromatográficas

- Columna: Aminex HPX-87H, 300x7.8mm, Número de catálogo: 125-0140, Número de serie: 444205, Número interno: 0164/16
- Columna: Aminex HPX-87H, 300x7.8mm, Número de catálogo: 125-0140, Número de serie: 445098, Número interno: 0162/16 (Robustez – variación del lote de columna)
- $\lambda = 205\text{nm}$
- Fase móvil: ácido sulfúrico 0.025M – Mezcla de 50 mL de ácido sulfúrico 0.5M con 950 mL de agua.
- Fase móvil: ácido sulfúrico 0.024M – Mezcla de 48 mL de ácido sulfúrico 0.5M y 952 mL de agua (Robustez – variación de la composición de la fase móvil)
- Fase móvil: ácido sulfúrico 0.026M – Mezcla de 52 mL de ácido sulfúrico 0.5M y 948 mL de agua (Robustez – variación de la composición de la fase móvil)
- Caudal: 0.45 mL/min
- Caudal: 0.35 mL/min y 0.55 mL/min (Robustez – variación del caudal)
- Temperatura de la columna: Temperatura ambiente
- Temperatura de la columna: 15°C y 25°C (Robustez – variación de la temperatura de la columna)
- Temperatura de la bandeja de muestra: 5°C
- Volumen de inyección: 50 μL

3.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

3.3.1 Adecuación del sistema

Criterio de aceptación:

La resolución entre los cinco picos no debe ser menor a 1

La RSD entre las cinco inyecciones de solución estándar no debe ser mayor a 3.66%

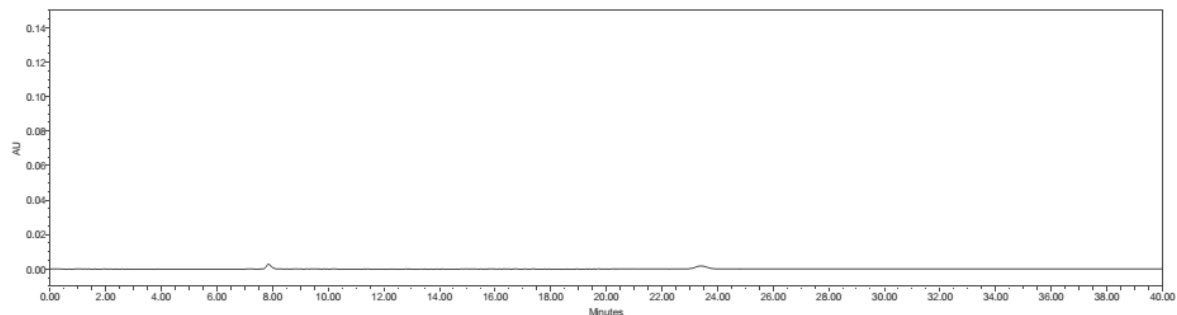
Sustancia	Resolución	RSD (%)
Alfa-Cetovalina	6.504	0.35
Alfa-Cetoisoleucina	3.233	0.30
Alfa-Cetoleucina	1.649	0.18
Alfa-Hidroximetionina	3.362	0.45

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

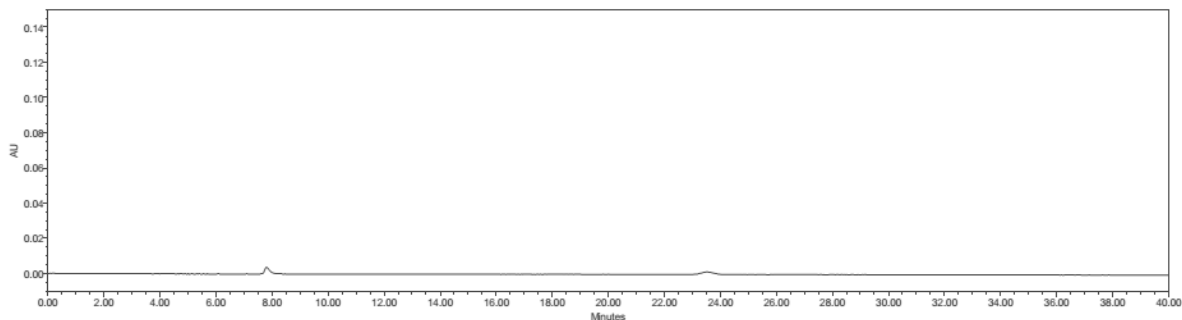
Sustancia	Resolución	RSD (%)
Alfa-cetofenilalanina	3.362	0.52

3.3.2 Selectividad

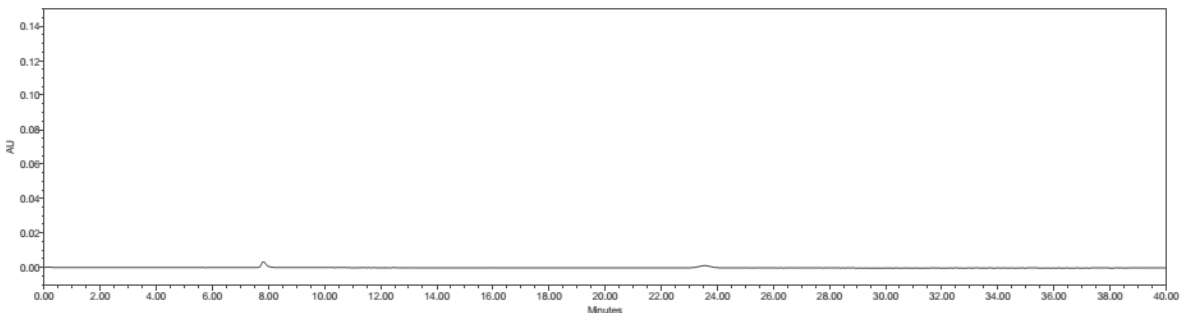
La solución placebo no interfiere en la cuantificación de Ceto e Hidroxiácidos.

3.3.2.1 Fase móvil

Cromatograma 1

3.3.2.2 Blanco estándar

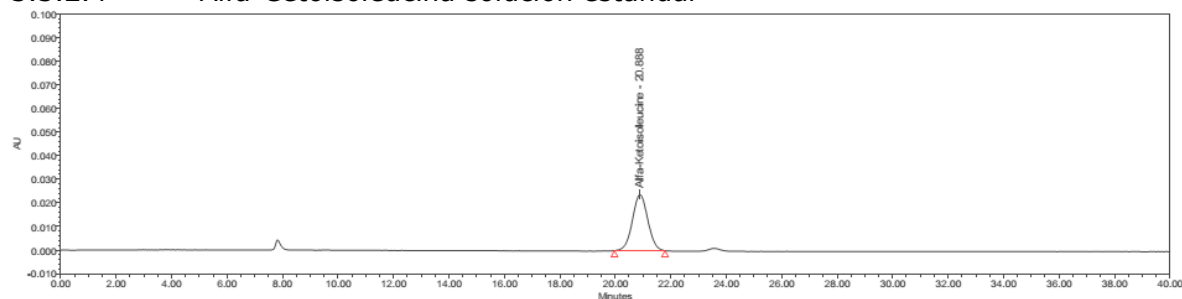
Cromatograma 2

3.3.2.3 Blanco muestra

Cromatograma 3

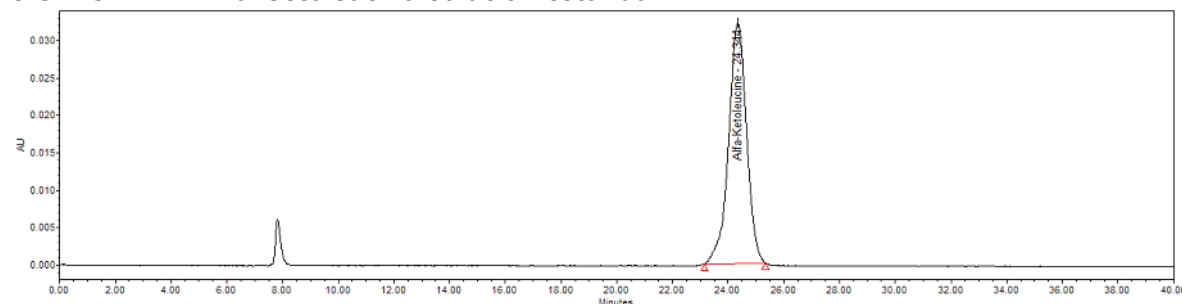
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2.4 Alfa-Cetoisoleucina solución estándar



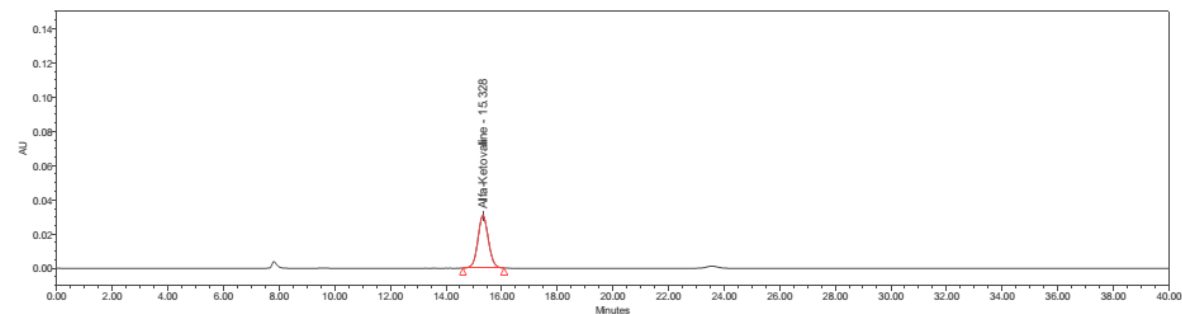
Cromatograma 4

3.3.2.5 Alfa-Cetoleucina solución estándar



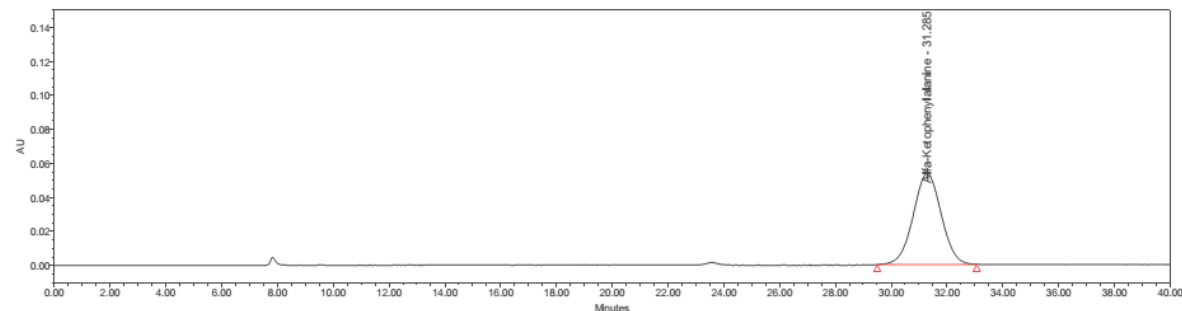
Cromatograma 5

3.3.2.6 Alfa-Cetovalina solución estándar



Cromatograma 6

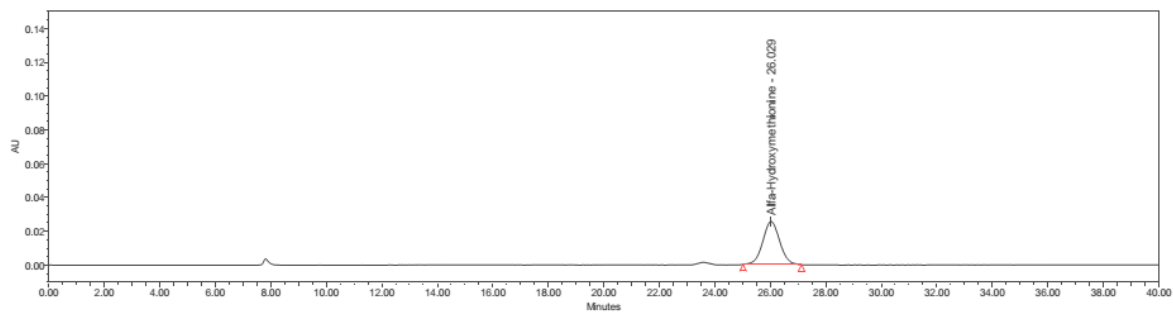
3.3.2.7 Alfa-Cetofenilalanina solución estándar



Cromatograma 7

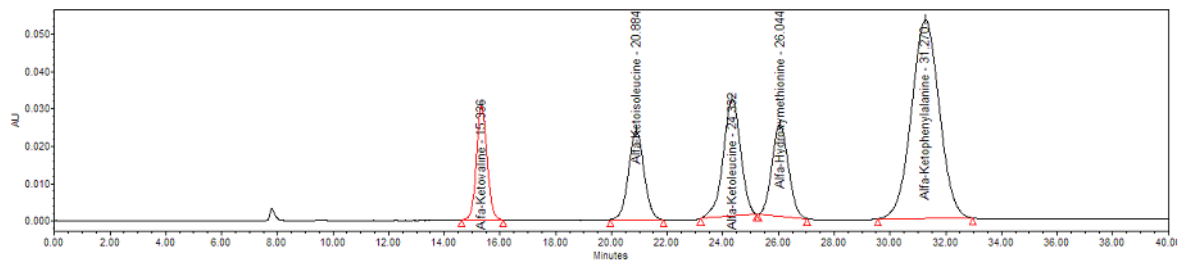
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2.8 Alfa-Hidroximetionina solución estándar



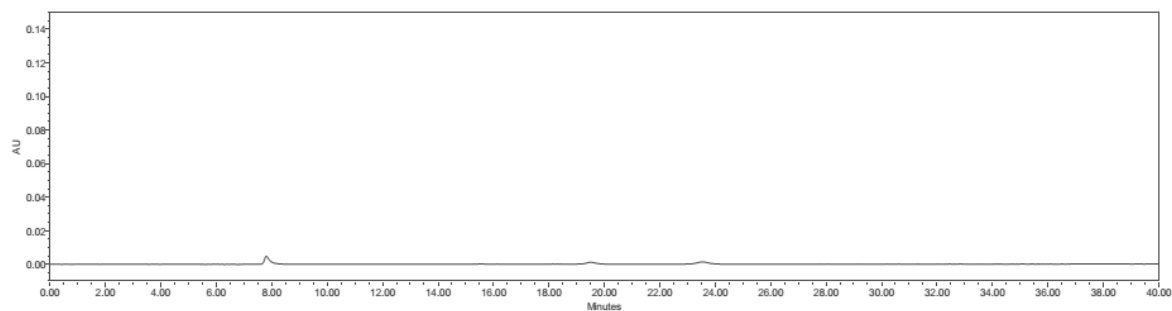
Cromatograma 8

3.3.2.9 Solución estándar



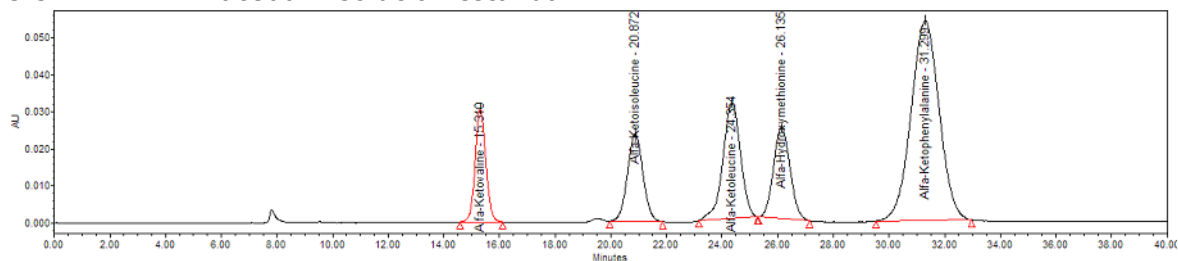
Cromatograma 9

3.3.2.10 Solución Placebo



Cromatograma 10

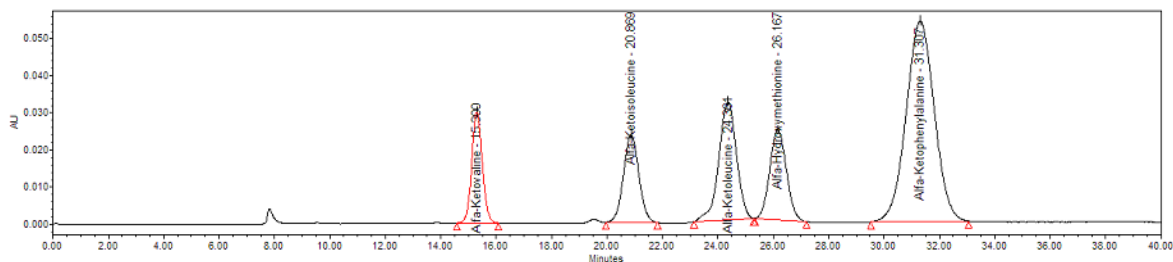
3.3.2.11 Placebo + solución estándar



Cromatograma 11

3.3.2.12 Solución de prueba

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Cromatograma 12

3.3.3 Linealidad de alto rango

a) Analitos estándares de referencia

Criterio de aceptación:

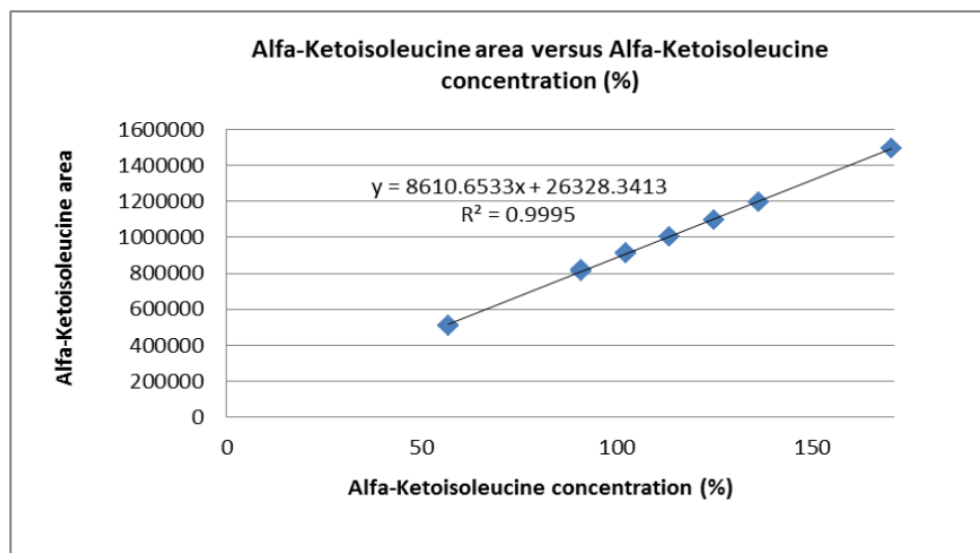
- $r \geq 0.990$
- Los residuos deben tener una distribución aleatoria y el intervalo de confianza de 95% o 99% para el término intercepto debe contener un cero.

• Alfa-Ketoisoleucina

Level (%)	Alfa-Ketoisoleucine concentration (%)	Area
50	56.756	506881
		509086
		510014
	Mean	508661
	RSD (%)	0.3
80	90.809	818635
		822732
		810591
	Mean	817320
	RSD (%)	0.8
90	102.160	915081
		912621
		911971
	Mean	913224
	RSD (%)	0.2
100	113.511	1003415
		1005376
		1000914
	Mean	1003235
	RSD (%)	0.2

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketoisoleucine concentration (%)	Area
110	124.862	1095870
		1096832
		1094636
	Mean	1095779
	RSD (%)	0.1
120	136.213	1192882
		1193868
		1193018
	Mean	1193256
	RSD (%)	0.0
150	170.267	1496835
		1494578
		1492570
	Mean	1494661
	RSD (%)	0.1



Ecuación de regresión lineal ($y = 8610.6553x + 26328.3413$)

$m = 8610.6553$
 $b = 26328.3413$
 $r = 0.9998$

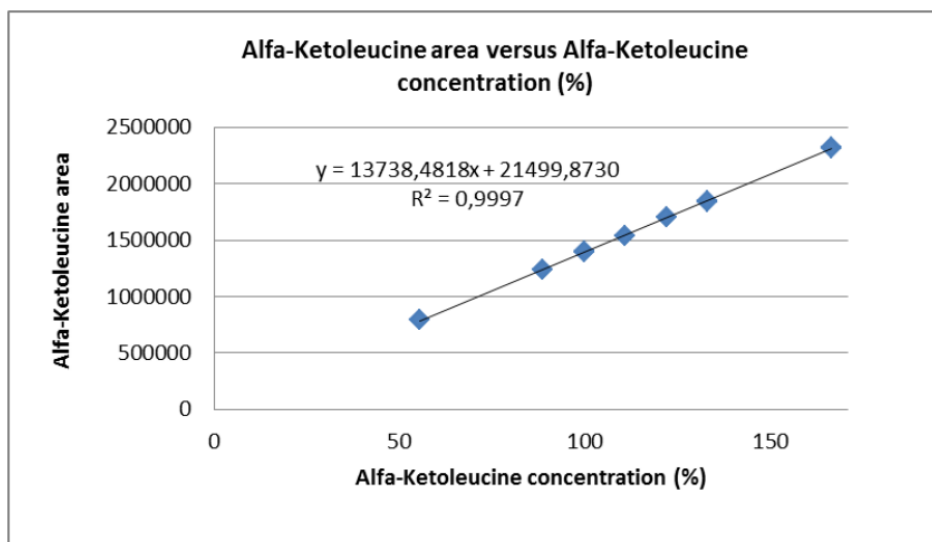
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Alfa-Cetoleucina

Level (%)	Alfa-Ketoleucine concentration (%)	Area
50	55.463	793686
		791743
		793329
	Mean	792919
	RSD (%)	0.1
80	88.740	1237791
		1239345
		1232216
	Mean	1236451
	RSD (%)	0.3
90	99.833	1390337
		1389464
		1399831
	Mean	1393211
	RSD (%)	0.4
100	110.925	1534306
		1532938
		1531932
	Mean	1533058
	RSD (%)	0.1
110	122.018	1697519
		1701470
		1702399
	Mean	1700463
	RSD (%)	0.2
120	133.110	1847734
		1839855
		1848533
	Mean	1845374
	RSD (%)	0.3
150	166.388	2318182
		2316825
		2314891

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketoleucine concentration (%)	Area
	Mean	2316633
	RSD (%)	0.1



Ecuación de regresión lineal ($y = 13738.4818x + 21499.8739$)

$m = 13738.4818$

$b = 21499.8739$

$r = 0.9998$

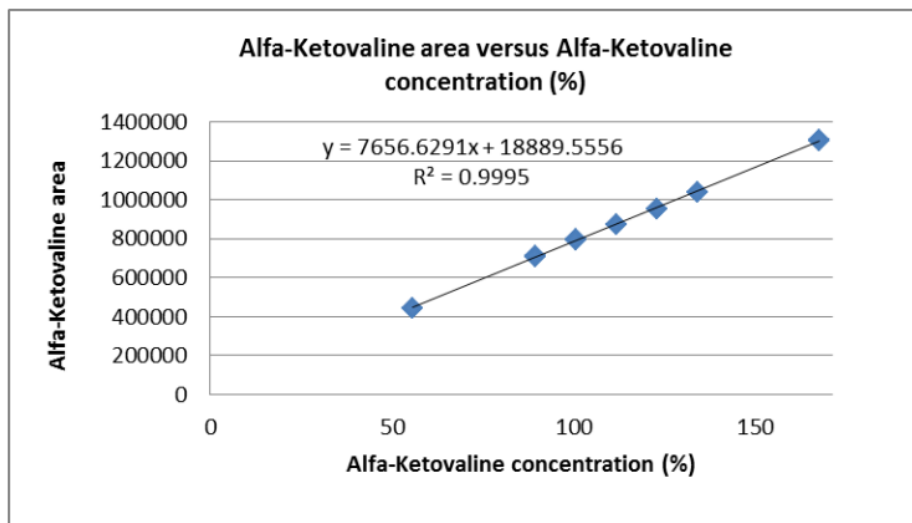
- Alfa-Cetovalina

Level (%)	Alfa-Ketovaline concentration (%)	Area
50	55.802	441234
		442690
		442597
	Mean	442173
	RSD (%)	0.2
80	89.283	709815
		709070
		704559
	Mean	707815
	RSD (%)	0.4
90	100.443	799423
		792816

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketovalline concentration (%)	Area
		793859
	Mean	795366
	RSD (%)	0.5
100	111.603	873996
		875076
		871464
	Mean	873512
	RSD (%)	0.2
110	122.764	954930
		952540
		951665
	Mean	953045
	RSD (%)	0.2
120	133.924	1039801
		1038051
		1035565
	Mean	1037805
	RSD (%)	0.2
150	167.405	1301111
		1304427
		1306606
	Mean	1304048
	RSD (%)	0.2

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de regresión lineal ($y = 7656.6291x + 18889.5556$)

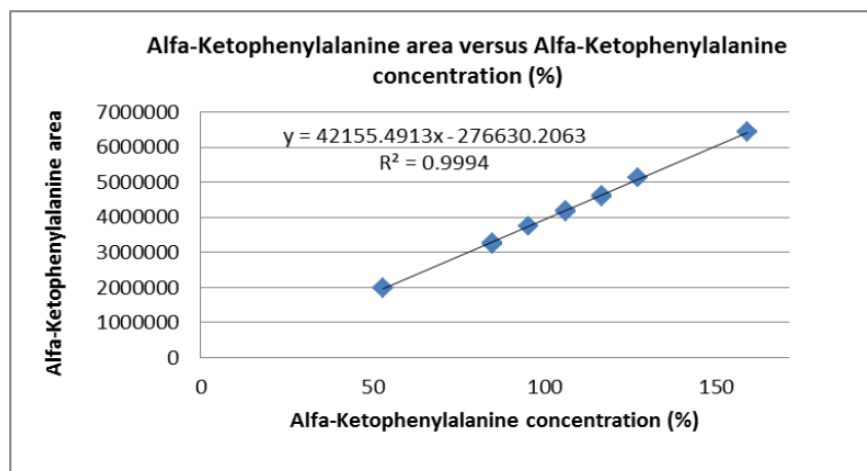
$m = 7656.6291$
 $b = 18889.5556$
 $r = 0.9998$

- Alfa-Cetofenilalanina

Level (%)	Alfa-Ketophenylalanine concentration (%)	Area
50	52.998	1979803
		1987057
		2001850
	Mean	1989570
	RSD (%)	0.6
80	84.797	3236269
		3251087
		3279540
	Mean	3255632
	RSD (%)	0.7
90	95.397	3741207
		3743493
		3759509
	Mean	3748069
	RSD (%)	0.3
100	105.997	4178936

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketophenylalanine concentration (%)	Area
		4154941
		4192039
	Mean	4175305
	RSD (%)	0.5
110	116.596	4610528
		4590835
		4649039
	Mean	4616801
	RSD (%)	0.6
120	127.196	5120988
		5134189
		5127232
	Mean	5127469
	RSD (%)	0.1
150	158.995	6420304
		6433497
		6433474
	Mean (%)	6429092
	RSD (%)	0.1



Ecuación de regresión lineal ($y = 42155.4913x + 276630.2063$)

$m = 42155.4913$

$b = 276630.2063$

$r = 0.9997$

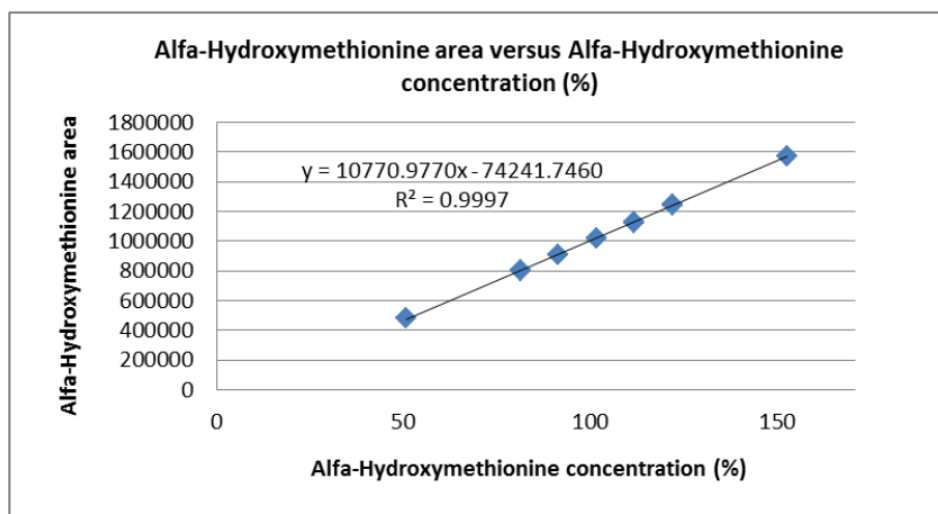
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Alfa-Hidroximetionina

Level (%)	Alfa-Hydroxymethionine concentration (%)	Area
50	50.878	480248
		481143
		479957
	Mean	480450
	RSD (%)	0.1
80	81.405	800906
		803026
		801830
	Mean	801921
	RSD (%)	0.1
90	91.580	905505
		905278
		907994
	Mean	906259
	RSD (%)	0.2
100	101.756	1018089
		1016289
		1015708
	Mean	1016695
	RSD (%)	0.1
110	111.931	1129187
		1124771
		1126862
	Mean	1126940
	RSD (%)	0.2
120	122.107	1249451
		1246906
		1242682
	Mean	1246346
	RSD (%)	0.3
150	152.633	1573928
		1573523

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Hydroxymethionine concentration (%)	Area
		1573806
	Mean	1573753
	RSD (%)	0.0



Ecuación de regresión lineal ($y = 10770.9770x + 74241.7460$)

$m = 10770.9770$

$b = 74241.7460$

$r = 0.9999$

b) Efecto matriz: placebo + analitos estándares de referencia

Criterio de aceptación:

- $r \geq 0.990$
- Los residuos deben tener una distribución aleatoria y el intervalo de confianza de 95% o 99% para el término intercepto debe contener un cero.

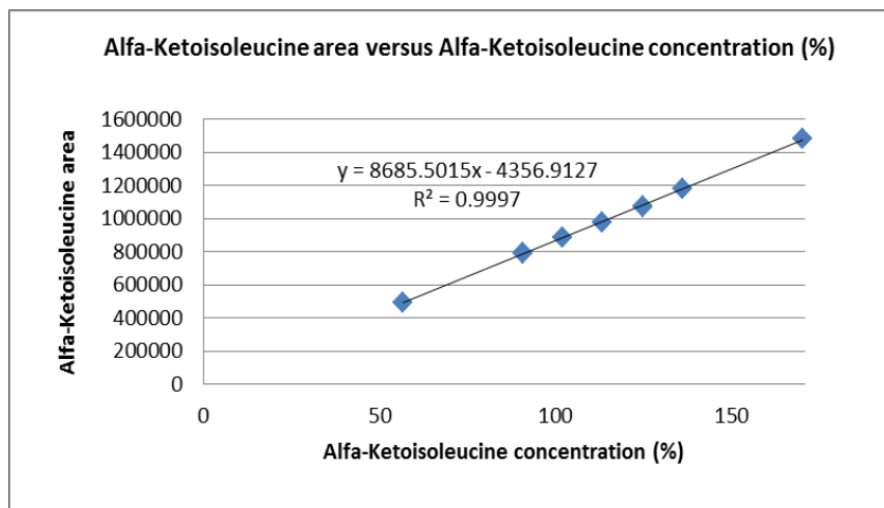
• Alfa-Cetoisoleucina

Level (%)	Alfa-Ketoisoleucine concentration (%)	Area
50	56.756	491930
		491000
		488151
	Mean	490360
	RSD (%)	0.4
80	90.809	793275
		791397

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketoisoleucine concentration (%)	Area
		785366
	Mean	790013
	RSD (%)	0.5
90	102.160	881303
		885139
		883118
	Mean	883187
	RSD (%)	0.2
100	113.511	977905
		978815
		974957
	Mean	977226
	RSD (%)	0.2
110	124.862	1074092
		1068744
		1071391
	Mean	1071409
	RSD (%)	0.3
120	136.213	1176361
		1178186
		1179525
	Mean	1178024
	RSD (%)	0.1
150	170.267	1478466
		1480248
		1483065
	Mean	1480593
	RSD (%)	0.2

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de regresión lineal ($y = 8685.5015x + 4356.9127$)

$m = 8685.5015$

$b = 4356.9127$

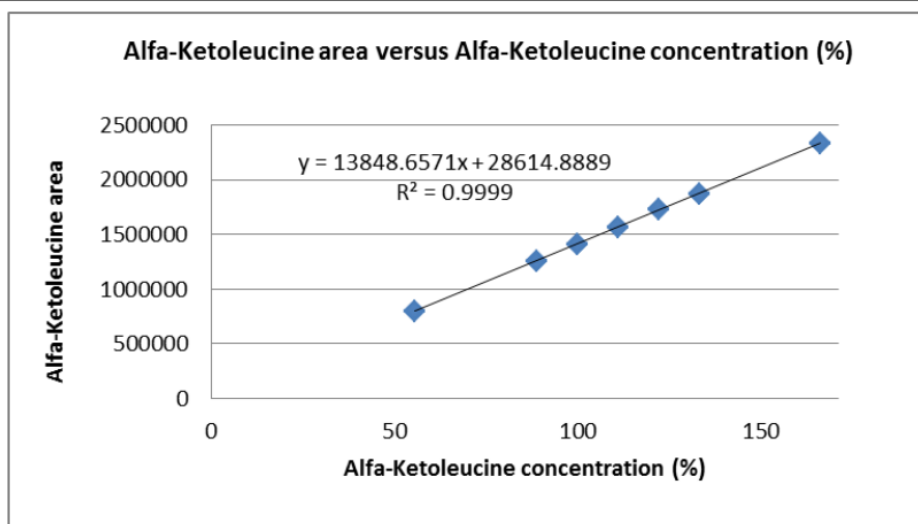
$r = 0.9998$

- Alfa-Cetoleucina

Level (%)	Alfa-Ketoleucine concentration (%)	Area
50	55.463	797671
		794044
		798243
	Mean	796653
	RSD (%)	0.3
80	88.740	1254123
		1256986
		1254317
	Mean	1255142
	RSD (%)	0.1
90	99.833	1410659
		1406038
		1409261
	Mean	1408652
	RSD (%)	0.2
100	110.925	1561419

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketoleucine concentration (%)	Area
		1569346
		1569588
	Mean	1566784
	RSD (%)	0.3
110	122.018	1717169
		1728040
		1728011
	Mean	1724406
	RSD (%)	0.4
120	133.110	1878862
		1868882
		1866590
	Mean	1871445
	RSD (%)	0.4
150	166.388	2336088
		2322742
		2332308
	Mean	2330380
	RSD (%)	0.3



Ecuación de regresión lineal ($y = 13848.6571x + 28614.8889$)

$m = 13848.6571$

$b = 28614.8889$

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

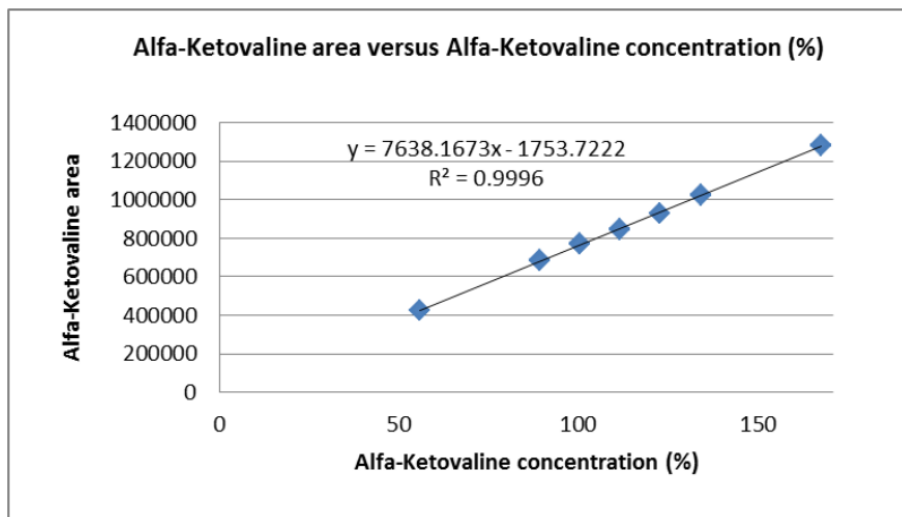
r = 0.9999

- Alfa-Cetovalina

Level (%)	Alfa-Ketovaline concentration (%)	Area
50	55.865	426281
		426857
		424926
	Mean	426021
	RSD (%)	0.2
80	89.384	687510
		684029
		683557
	Mean	685032
	RSD (%)	0.3
90	100.558	772658
		767491
		766610
	Mean	768920
	RSD (%)	0.4
100	111.731	849507
		844420
		845980
	Mean	846636
	RSD (%)	0.3
110	122.904	929747
		930888
		925071
	Mean	928569
	RSD (%)	0.3
120	134.077	1023461
		1025236
		1022609
	Mean	1023769
	RSD (%)	0.1
150	167.596	1278288

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketovaline concentration (%)	Area
		1285969
		1283835
		1282697
	Mean	1282697
	RSD (%)	0.3



Ecuación de regresión lineal ($y = 7638.1673x - 1753.7222$)

$m = 7638.1673$

$b = 1753.7222$

$r = 0.9998$

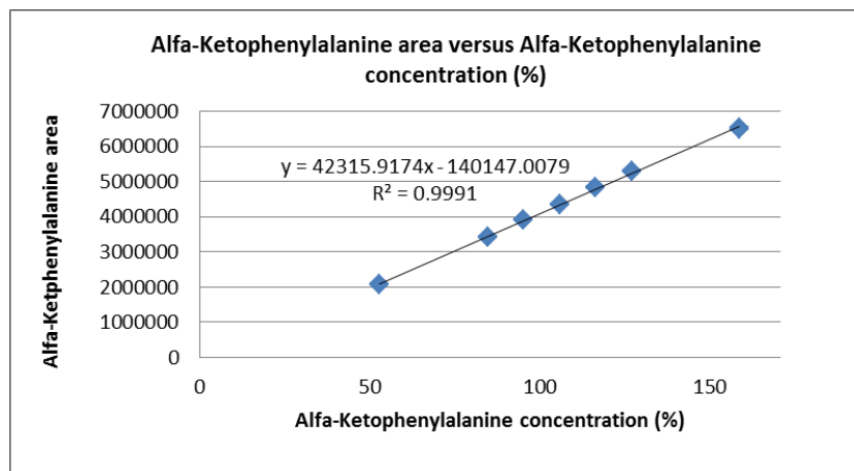
- Alfa-Cetofenilalanina

Level (%)	Alfa-Ketophenylalanine concentration (%)	Area
50	52.971	2058594
		2085593
		2082713
	Mean	2075633
	RSD (%)	0.7
80	84.753	3407244
		3414757
		3429535
	Mean	3417179
	RSD (%)	0.3
90	95.347	3889091

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Ketophenylalanine concentration (%)	Area
		3913459
		3922159
	Mean	3908236
	RSD (%)	0.4
100	105.941	4343959
		4362224
		4365262
	Mean	4357148
	RSD (%)	0.3
110	116.535	4825104
		4822749
		4844006
	Mean	4830620
	RSD (%)	0.2
120	127.130	5304283
		5279204
		5284234
	Mean	5289240
	RSD (%)	0.3
150	158.912	6552149
		6523121
		6490537
	Mean	6521935
	RSD (%)	0.5

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de regresión lineal ($y=42315.9174x - 140147.0079$)

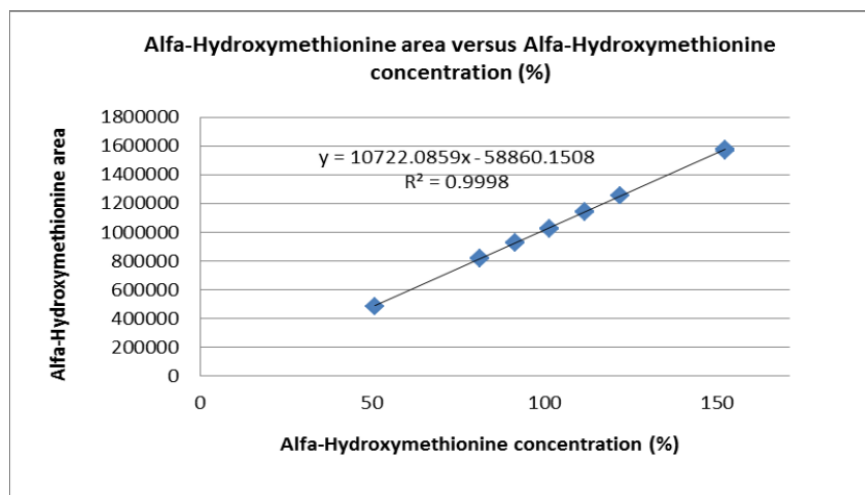
$m = 42315.9174$
 $b = 140147.0079$
 $r = 0.9995$

- Alfa - Hidroximetionina

Level (%)	Alfa-Hydroxymethionine concentration (%)	Area
50	50.811	480852
		481665
		483077
	Mean	481865
	RSD (%)	0.2
80	81.297	817129
		816837
		815100
	Mean	816355
	RSD (%)	0.1
90	91.459	927453
		925593
		924907
	Mean	925984
	RSD (%)	0.1
100	101.621	1020391

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Alfa-Hydroxymethionine concentration (%)	Area
		1025707
		1029098
	Mean	1025065
	RSD (%)	0.4
110	111.783	1137860
		1141255
		1144551
	Mean	1141222
	RSD (%)	0.3
120	121.945	1251360
		1256853
		1250558
	Mean	1252924
	RSD (%)	0.3
150	152.432	1563725
		1576174
		1575197
	Mean	1571699
	RSD (%)	0.4



Ecuación de regresión lineal ($y = 10722.0859x - 58860.1508$)

$m = 10722.0859$

$b = -58860.1508$

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

$r = 0.9999$

c) Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con asistencia del software estadístico JMP Statistical Discovery de SAS, versión 12 y XLSTAT 2016.

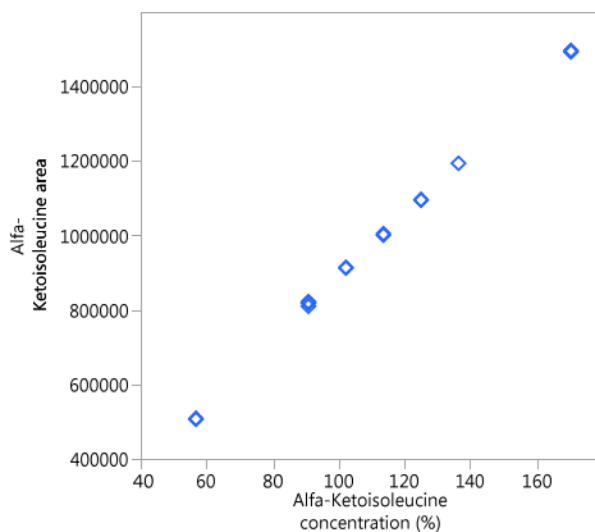
Alfa-Cetoisoleucina

Gráficos de dispersión

Para evaluar si hay una relación lineal entre la Concentración (%) y el Área del analito, se construyeron dos gráficos de dispersión, uno en el cual el analito es el único componente de la muestra, y otro en el cual el analito se encuentra en una matriz compleja con otros componentes.

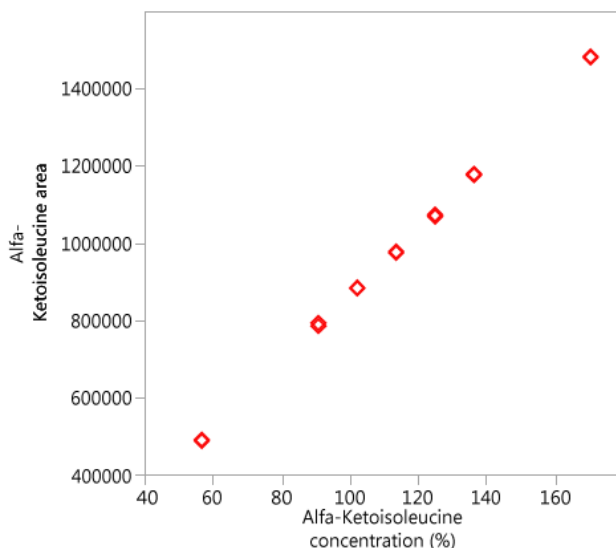
Se observaron 3 áreas diferentes para cada una de las siete concentraciones.

En el caso en que el analito es el único componente de la muestra, el siguiente gráfico de dispersión muestra una relación lineal casi perfecta.



También se observa una relación lineal casi perfecta entre Área y Concentración (%) cuando el analito es contenido una matriz compleja.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Coeficiente de correlación de Pearson

Considerando la correlación revelada en los dos gráficos de dispersión, los coeficientes de correlación de Pearson fueron estimados para comprender si estos eran mayores que el mínimo aceptable, 0.990, lo cual fue verificado. Cuando el analito es el único componente en la muestra, $r = 0.9998$; y cuando el analito es contenido en una matriz compleja $r = 0.9998$.

Ajuste de las líneas de regresión lineal utilizando el método de los Mínimos Cuadrados

Luego de haber verificado la relación lineal entre las dos variables, mediante el gráfico de dispersión y su coeficiente de correlación de Pearson ($r \geq 0.990$), dos líneas de regresión lineal fueron estimadas, una cuando el analito es el único componente e la muestra,

$$\text{Área} = a_1 + b_1 \times \text{Concentración (\%)}$$

Y otra cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

$$\text{Área} = a_2 + b_2 \times \text{Concentración (\%)}$$

Los interceptos a_1 y a_2 , y las *pendientes* b_1 y b_2 estimadas fueron obtenidas del método de los mínimos cuadrados.

En el primer caso,

	Coefficients	Std. Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	26328,341	5205,659	5,058	0,000	15432,772	37223,910
Conc. (%)	8610,653	44,013	195,640	0,000	8518,533	8702,773

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

En el segundo caso,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-4356,913	4328,321	-1,007	0,327	-13416,192	4702,366
Conc. (%)	8685,502	36,595	237,340	0,000	8608,907	8762,096

Por lo tanto, tenemos:

$$a_1 = 26238.341, b_1 = 8610, 653$$

$$a_2 = -4356.913, b_2 = 8685.502$$

Estos estimados asumen que el error en los valores de *Concentración (%)* es constante, es decir, se asume que existe homocedasticidad. Esto quiere decir que todos los puntos *Área x Concentración (%)* tienen igual peso en el cálculo de los estimados. Debajo, se aplicará la prueba de Cochran para determinar si esta suposición es válida.

Prueba C de Cochran

Con el objetivo de evaluar la igualdad de varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado, Área, se aplicó la prueba C de Cochran. Esta prueba fue aplicada en forma separada cuando:

- El analito es el único componente de la muestra, habiéndose obtenido un valor $p = 0.005 < 0.05$, conllevando a rechazar la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. El riesgo de rechazar la hipótesis nula H_0 cuando es real es menor a 0.51%.

C (Observed value)	0,700
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,005
alfa	0,05

- El analito es contenido en una matriz compleja, habiéndose obtenido un valor $p = 0.360 > 0.05$, lo cual no rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

C (Observed value)	0,390
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,360
alfa	0,05

De esta prueba se concluye que sólo en el caso que el analito es el único componente de la muestra, el Intercepto y Pendiente estimados de la regresión lineal deben ser obtenidos nuevamente, pero esta vez utilizando el método de los Mínimos Cuadrados Pesados.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Ajuste de las líneas de regresión lineal utilizando el método de los Mínimos Cuadrados Pesados

Utilizando la prueba C de Cochran se concluyó que la heterocedasticidad existe en el caso donde el analito es el único componente de la muestra, lo cual conduce a la necesidad para, en este caso, utilizar el método de los mínimos cuadrados pesados para re-estimar el Intercepto y la Pendiente de la regresión lineal. Mediante este método se asignan diferentes pesos a las observaciones, cuando se determina el estimado de los coeficientes de la regresión lineal. Así, los nuevos estimados son los siguientes:

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	24570,318	4976,357	4,937	0,000	14154,683	34985,954
Conc. (%)	8589,312	38,558	222,763	0,000	8508,609	8670,016

Los estimados, cuando el analito es contenido en una matriz compleja, permanecen iguales:

$$a_1 = 26238.341, b_1 = 8610, 653$$

$$a_2 = -4356.913, b_2 = 8685.502$$

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo de ANOVA, análisis de varianza, es evaluar si la regresión lineal ajustada explica de forma satisfactoria la relación entre Área y Concentración (%). En ANOVA, la prueba F es utilizada para probar si las pendientes de cada línea estimada, b_1 y b_2 , difieren de cero. El coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de variabilidad en los datos que es correctamente explicada por la regresión lineal.

Cuando el analito es el único componente de la muestra, ANOVA fue conducido considerando el método de los mínimos cuadrados pesados,

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	817230938493	1	817230938493	49623,31	0,000
Residual	312905097	19	16468689		
Total	817543843590	20			

Regression Statistics

R Square	0,9996
Adjusted R Square	0,9996
Standard Error	4058,16
Observations	21

Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otro lado, la línea puede explicar el 99.96% de la variabilidad en los datos.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Cuando el analito es contenido en una matriz compleja, ANOVA fue conducido considerando el método de los mínimos cuadrados ordinario,

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	1749602787503	1	1749602787503	56330,51	0,000
Residual	590132308	19	31059595		
Total	1750192919811	20			

Regression Statistics

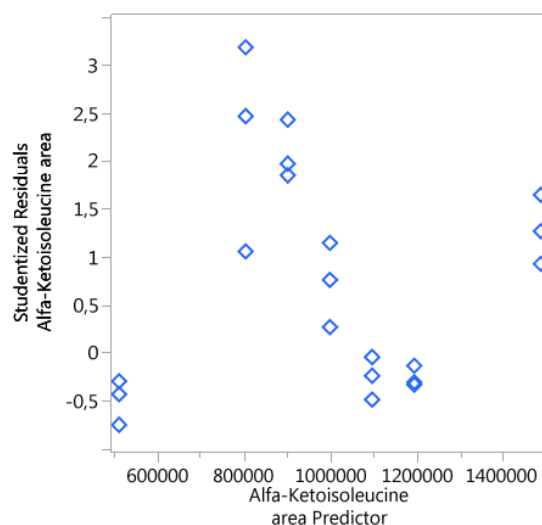
R Square	0,9997
Adjusted R Square	0,9996
Standard Error	5573,11
Observations	21

Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otro lado, la línea puede explicar el 99.97% de la variabilidad de los datos.

Residuos

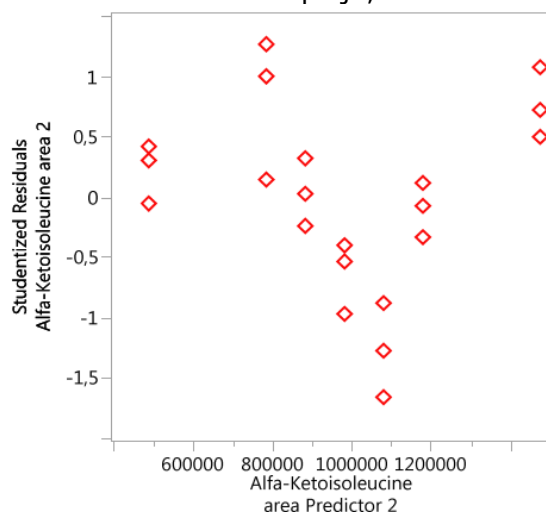
Los residuos son extremadamente útiles para controlar si un modelo de regresión lineal particular es apropiado para los datos. Por lo tanto debe construirse un gráfico de dispersión en el cual se cruzan los residuos y valores predictivos de Área. Para que la regresión lineal sea apropiada es necesario que el gráfico de dispersión no produzca un patrón marcado.

- El analito es el único componente de la muestra,



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es contenido en una matriz compleja,



Se concluye que las líneas son apropiadas para los datos y los estimados obtenidos de éstas son confiables. Así hay una buena calidad de ajuste de las regresiones lineales.

Prueba de Paralelismo F

El objetivo de la prueba de paralelismo es probar la hipótesis nula de la igualdad de las pendientes de las dos regresiones lineales estimadas. La intención es probar la hipótesis nula $b_1 = b_2$ versus la hipótesis alternativa $b_1 \neq b_2$. Si la hipótesis nula no es rechazada, se puede concluir que el efecto de los componentes de la matriz no es significativo.

Los estimados obtenidos son:

$$b_1 = 8589.312 \text{ y } b_2 = 8685.502$$

El resultado obtenido por aplicación de la prueba es,

<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
971939017,50	902626184,81	1	38	2,918	0,096

Así, de la prueba de Paralelismo F, se concluyó que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.096 > 0.05$; lo cual permite expresar que no hay evidencia estadística (a nivel 5%) para afirmar que la matriz tiene un efecto significativo.

Alfa-Cetoleucina

Gráficos de dispersión

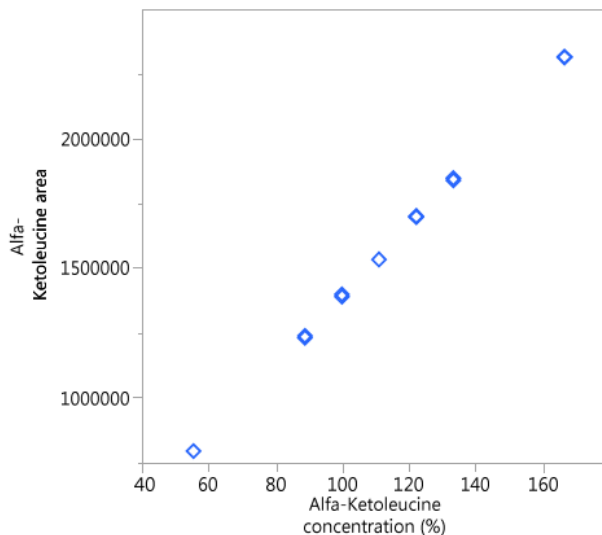
Para evaluar si hay una relación lineal entre la Concentración (%) y el Área del analito se construyeron dos gráficos de dispersión, uno en el cual el analito es el único

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

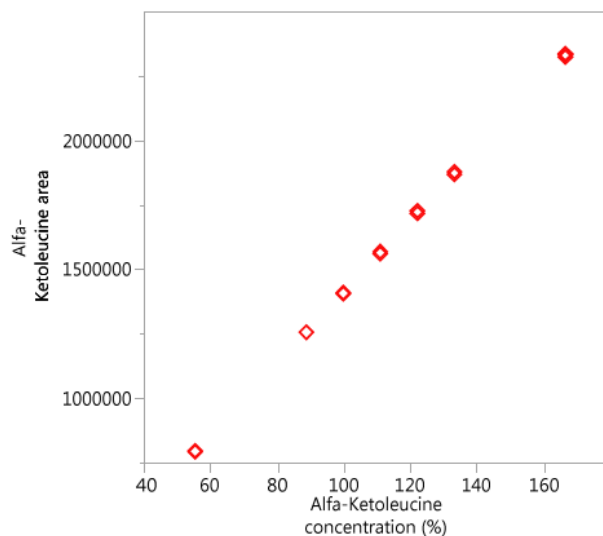
componente de la muestra, y otro en el cual el analito se encuentra en una matrix compleja con otros componentes.

Tres áreas diferentes fueron observadas para cada una de las siete concentraciones.

En el caso donde el analito es el único componente de la muestra, el siguiente gráfico de dispersión muestra una relación lineal casi perfecta.



También se observa una relación lineal casi perfecta entre Área y Concentración (%) cuando el analito es contenido en una matrix compleja.



Coefficiente de correlación de Perason

Considerando la correlación revelada en los dos gráficos de dispersión, los coeficientes de correlación de Pearson, fueron estimados para comprender si éstos resultaron mayores que el mínimo aceptable, 0.990, lo cual fue verificado. Así, se encontró que en ambos casos esta suposición es satisfactoria porque cuando el analito es el único componente de la muestra $r = 0.9998$ y cuando se encuentra en una matrix compleja con otros componentes $r = 0.9999$.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Ajuste de las líneas de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados

Luego de haber verificado una correlación lineal entre las dos variables, mediante un gráfico de dispersión y su coeficiente de correlación de Pearson ($r \geq 0.990$), se estimaron dos líneas de regresión lineal, una cuando el analito es el único componente de la muestra,

$$\text{Área} = a_1 + b_1 \times \text{Concentración (\%)}$$

Y otra cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

$$\text{Área} = a_2 + b_2 \times \text{Concentración (\%)}$$

Los *Interceptos* a_1 y a_2 y *Pendientes* b_1 y b_2 estimados fueron obtenidos del método de los mínimos cuadrados.

En el primer caso,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	21499,873	6403,126	3,358	0,003	8097,976	34901,770
Conc. (%)	13738,482	55,399	247,990	0,000	13622,530	13854,434

En el segundo caso,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	28614,889	4001,802	7,151	0,000	20239,021	36990,757
Conc. (%)	13848,657	34,623	399,982	0,000	13776,190	13921,124

Por lo tanto, tenemos:

$$a_1 = 21499.873, b_1 = 13738.482 \quad a_2 = 28614.889, b_2 = 13848.657$$

Estos estimados asumen que el error en los valores de *Concentración (%)* es constante, es decir, se asume que existe homocedasticidad. Esto significa que todos los puntos *Área x Concentración (%)* tienen igual peso en el cálculo de los estimados. Debajo, se aplicará la prueba de Cochran para determinar si esta suposición es válida.

Prueba C de Cochran

La prueba C de Cochran fue aplicada con el objetivo de evaluar la igualdad de varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado, *Área*. En ambas situaciones, si el analito es el único componente de la muestra o se encuentra en una matriz compleja, la hipótesis de homocedasticidad no fue rechazada, respectivamente, $p = 0.317$ y $p = 0.910$.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Por lo tanto se concluye que los estimados encontrados con el método de los mínimos cuadrados ordinario, son válidos. Las siguientes tablas muestran los resultados:

- En el primer caso

C (Observed value)	0,403
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,317
alfa	0,05

- En el segundo caso

C (Observed value)	0,288
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,910
alfa	0,05

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo de ANOVA, análisis de varianza, es evaluar si la regresión lineal ajustada explica en forma satisfactoria la relación entre Área y Concentración (%). En ANOVA, la prueba F es utilizada para probar si las pendientes de cada línea estimada, b_1 y b_2 difieren de cero. El coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de variabilidad de los datos que es correctamente explicada por la regresión lineal.

Para el analito siendo el único componente:

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	4180330786400	1	4180330786400	61499,22	0,000
Residual	1291500708	19	67973721		
Total	4181622287108	20			

Regression Statistics

R Square	0,9997
Adjusted R Square	0,9997
Standard Error	8244,62
Observations	21

Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de la pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otro lado, la línea puede explicar el 99.97% de la variabilidad en los datos.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

En el caso en que el analito es contenido en una matriz compleja, ANOVA fue conducido considerando el método de los mínimos cuadrados ordinario,

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	4247647690869	1	4247647690869	159985,4	0,000
Residual	504454237	19	26550223		
Total	4248152145107	20			

Regression Statistics

R Square	0,9999
Adjusted R Square	0,9999
Standard Error	5152,69
Observations	21

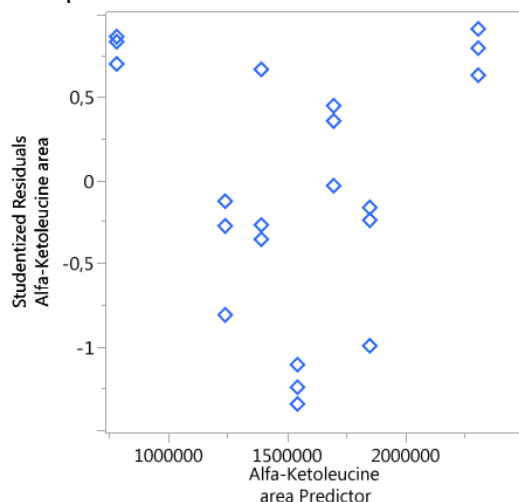
Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de la pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y en por otra parte, la línea puede explicar el 99,99% de la variabilidad de los datos.

Residuos

Los residuos son extremadamente útiles para controlar si un modelo de regresión lineal particular es apropiado para los datos. Por lo tanto debe construirse un gráfico de distribución en el cual se crucen los residuos y valores predictivos de Área. Para que la regresión lineal sea apropiada es necesario que el gráfico de distribución no produzca un patrón marcado.

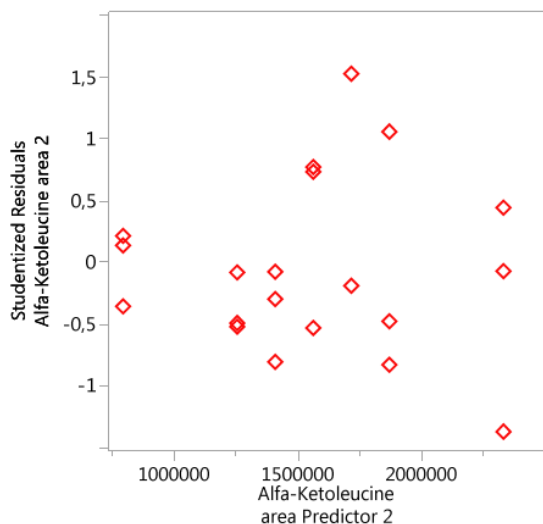
Los gráficos de distribución para las dos regresiones lineales estimadas son:

- el analito es el único componente de la muestra



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es contenido en una matriz compleja



Los gráficos de distribución muestran que hay una buena calidad de ajuste de las regresiones lineales.

Prueba de Paralelismo F

El objetivo de la prueba de paralelismo es probar la hipótesis nula de igualdad de pendientes de las dos regresiones lineales estimadas. La intención es probar la hipótesis nula $b_1 = b_2$ versus la hipótesis alternativa $b_1 \neq b_2$. Si la hipótesis nula no es rechazada, se puede concluir que el efecto de la matriz de componentes no es significativo.

Los estimados obtenidos son:

$$b_1 = 13738.482, b_2 = 13846.657$$

La siguiente tabla indica los resultados de la prueba,

<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
1929450165,60	1795031104,60	1	38	2,846	0,100

Estos resultados muestran que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.100 > 0.05$, por esto, no existe evidencia estadística a un nivel de 5% para demostrar que la matriz tiene un efecto significativa.

Alfa-Cetoalana

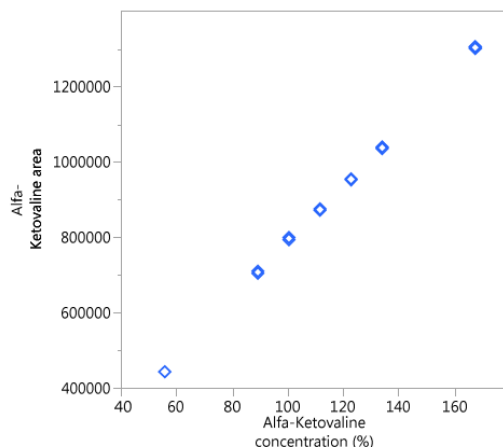
Gráficos de distribución

También para este analito fue evaluada la existencia de una relación lineal entre la Concentración (%) y el Área a través de la construcción de dos gráficos de distribución donde uno dirige el caso donde el analito es el único componente de la muestra y el otro donde es contenido en una matriz compleja.

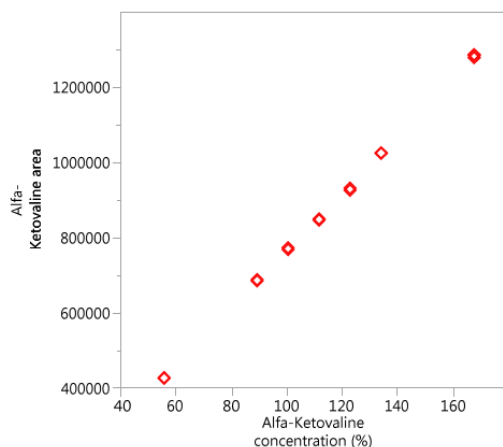
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Similarmente tres áreas diferentes fueron observadas para cada una de las siete concentraciones.

En el primer caso el siguiente gráfico de dispersión revela una relación lineal casi perfecta,



Lo mismo corre para el segundo caso,



Coeficiente de correlación de Pearson

Teniendo en cuenta la correlación revelado en las dos figuras anteriores determinamos el coeficiente de correlación de Pearson para ambos casos. Cuando el analito es el único componente de la muestra, $r = 0.9998$ y cuando es contenido en la matriz, $r = 0.9998$. Los dos coeficientes estimados están por debajo del valor mínimo aceptable, 0.990.

Ajuste de las líneas de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados

Luego de haber verificado la correlación lineal entre las dos variables, a través de un gráfico de dispersión y su coeficiente de correlación de Pearson ($r \geq 990$), dos líneas de regresión lineal fueron estimadas, una cuando el analito es el único componente de la muestra,

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

$$\text{Área} = a_1 + b_1 \times \text{Concentración (\%)}$$

Y otro cuando el analito es contenido es una matriz completa,

$$\text{Área} = a_2 + b_2 \times \text{Concentración (\%)}$$

Los *Interceptos* a_1 y a_2 y las *pendientes* b_1 y b_2 estimadas fueron obtenidos del método de los mínimos cuadrados.

Cuando el analito es el único componente en la muestra se obtuvieron los siguientes resultados del ajuste de la regresión lineal,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	18889,556	4504,537	4,193	0,000	9461,451	28317,660
Conc. (%)	7656,629	38,736	197,662	0,000	7575,554	7737,705

Cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-1753,722	4081,396	-0,430	0,672	-10296,181	6788,737
Conc. (%)	7638,167	35,057	217,877	0,000	7564,792	7711,543

Los estimados son:

$$a_1 = 18889.556, b_1 = 7656.629$$

$$a_2 = -1753.722, b_2 = 7638.167$$

Los estimados obtenidos anteriormente asumen que el error en los valores de Concentración (%) es constante, por esto existe homocedasticidad. Así, para tener en cuenta estos estimados, la prueba C de Cochran debe aplicarse para evaluar si la suposición de homogeneidad no es violada.

Prueba C de Cochran

Como en el analito anterior, aquí también se evaluó la igualdad de varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado y la prueba C de Cochran fue aplicada como se indica en la tabla debajo. En ambas situaciones, cuando el analito es aislado en la muestra, y cuando es insertado en una matriz, la hipótesis de homocedasticidad no fue rechazada, respectivamente $p = 0.713$ y $p = 0.732$.

Por lo tanto, se concluye que los estimados encontrados mediante el método de los mínimos cuadrados ordinario son válidos. Las siguientes tablas presentan los resultados de las pruebas:

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- El analito es el único componente de la muestra

C (Observed value)	0,317
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,713
alfa	0,05

- El analito es contenido en una matriz compleja

C (Observed value)	0,314
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,732
alfa	0,05

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo del análisis de varianza, ANOVA, es evaluar si la regresión lineal ajustada explica satisfactoriamente la relación entre Área y Concentración (%). En este análisis de varianza, la prueba F es aplicada para probar si la pendiente de cada una de las líneas estimadas, b_1 y b_2 , difieren de cero. Mientras tanto, el coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de la variabilidad de los datos observados que es correctamente explicado por la regresión lineal estimada. En el caso de que el analito sea el único componente de la muestra tenemos,

ANOVA					
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	1314323198253	1	1314323198253	39070,13	0,000
Residual	639161885	19	33640099		
Total	1314962360138	20			

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9995
Adjusted R Square	0,9995
Standard Error	5800,01
Observations	21

Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de la pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otra parte, la línea puede explicar el 99.95% de la variabilidad de los datos.

Cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

ANOVA					
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	1310977207284	1	1310977207284	47470,17	0,000
Residual	524720375	19	27616862		
Total	1311501927659	20			

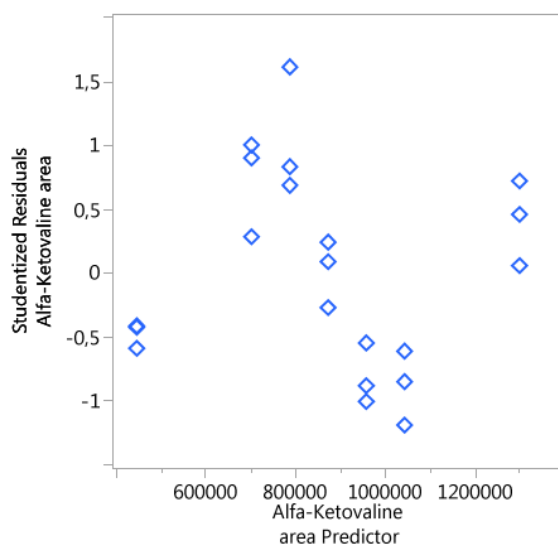
<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9996
Adjusted R Square	0,9996
Standard Error	5255,17
Observations	21

Por lo tanto, la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y la línea representa el 99.96% de la variabilidad de los datos.

Residuos

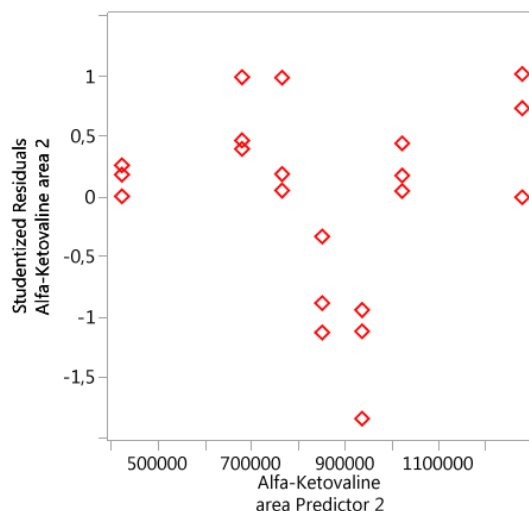
Los residuos son extremadamente útiles para controlar si un modelo de regresión lineal particular es apropiado para los datos. Por lo tanto debe construirse un gráfico de dispersión en el cual se crucen los residuos y valores predictivos de Área. Para que la regresión lineal sea apropiada es necesario que el gráfico de dispersión no produzca un patrón marcado.

- el analito es el único componente de la muestra,



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es contenido en una matriz compleja,



Como en el analito anterior, los dos gráficos de dispersión muestran que hay una buena calidad de ajuste de las regresiones lineales.

Prueba de Paralelismo F

El objetivo de la prueba de paralelismo es probar la hipótesis nula de igualdad de las pendientes de las dos regresiones lineales estimadas. La intención es mostrar la hipótesis nula $b_1 = b_2$ versus la hipótesis alternativa $b_1 \neq b_2$. Si la hipótesis nula no es rechazada, puede concluirse que el efecto de los componentes de la matriz no es significativo.

Los estimados obtenidos son:

$$b_1 = 7656.629 \quad y \quad b_2 = 7638.167$$

La siguiente tabla indica los resultados de las pruebas,

<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
1168038041,50	1164186912,80	1	38	0,126	0,725

Estos resultados muestran que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.725 > 0.05$; por lo tanto, no existe evidencia estadística a nivel de 5% para afirmar que la matriz tiene un efecto significativo.

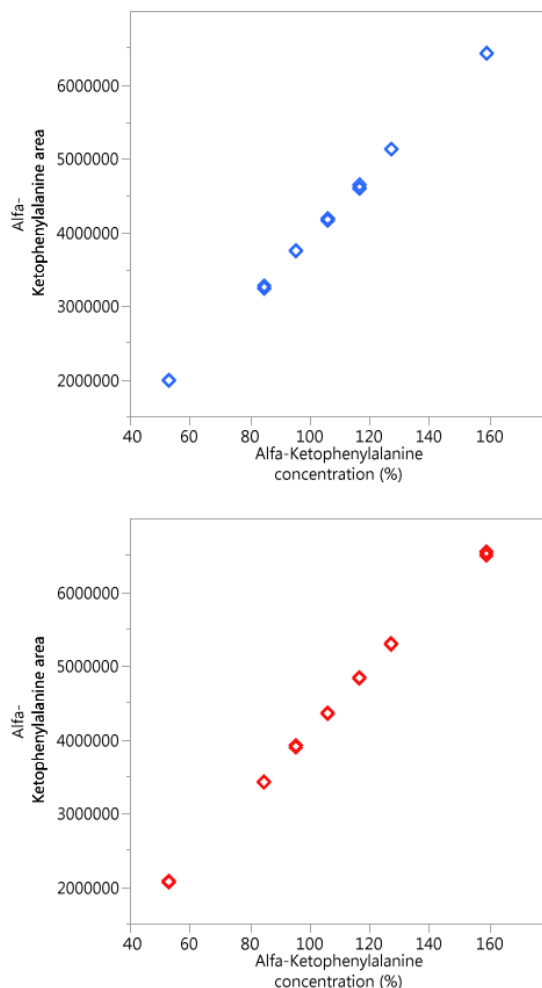
Alfa-Cetofenilalanina

Gráficos de dispersión

La primera etapa es evaluar la existencia de una relación lineal entre la Concentración (%) y el Área del analito. Para esto, se construyeron dos gráficos de dispersión, uno para cada caso.

Tres áreas diferentes fueron observadas por cada una de las siete concentraciones.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Anteriormente podemos ver que en ambos casos los gráficos de dispersión revelan una relación lineal casi perfecta.

Coeficiente de correlación de Pearson

Teniendo en cuenta el éxito de la relación visual anterior entre variables, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson para comprender si esta proporción es mayor que el mínimo aceptable, 0.990, lo cual fue encontrado:

El analito es el único componente de la muestra: $r = 0.9997$

El analito es contenido en una matriz: 0.9995

Ajuste de la regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados

Luego de haber verificado la correlación lineal entre las dos variables, a través de un gráfico de dispersión y su coeficiente de dispersión de Pearson ($r \geq 0.990$), se estimaron dos regresiones lineales, una cuando el analito es el único componente de la muestra,

$$\text{Área} = a_1 + b_1 \times \text{Concentración (\%)}$$

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Y otra cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

$$\text{Área} = a_2 + b_2 \times \text{Concentración (\%)}$$

Los *interceptos* a_1 y a_2 y *pendientes* b_1 y b_2 estimados fueron obtenidos del método de los mínimos cuadrados.

En las siguientes dos tablas tenemos los resultados,

- el analito es el único componente de la muestra

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-276630,20	25297,169	-10,935	0,000	-329577,79	-223682,62
Conc. (%)	42155,491	229,046	184,048	0,000	41676,093	42634,890

- el analito es contenido en una matriz compleja,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-140147,00	32643,363	-4,293	0,000	-208470,35	-71823,66
Conc. (%)	42315,917	295,714	143,097	0,000	41696,981	42934,854

Donde los siguientes estimados fueron extraídos,

$$a_1 = -276630.20, b_1 = 42155.491 \quad a_2 = -140147.00, b_2 = 42315.917$$

Los estimados obtenidos anteriormente asumen que el error en los valores de Concentración (%) es constante, por lo tanto existe homocedasticidad. Lo cual significa que todos los puntos Área x Concentración (%) tienen igual peso en el cálculo de los estimados. Sin embargo, debe aplicarse la prueba C de Cochran para evaluar si la suposición de homogeneidad no es violada.

Prueba C de Cochran

Como en los analitos anteriores esta prueba fue aplicada cuando:

- el analito es el único componente de la muestra

C (Observed value)	0,429
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,242
alfa	0,05

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es contenido en una matriz compleja

C (Observed value)	0,466
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,162
alfa	0,05

Como la prueba de Cochran no rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianzas, $p = 0.242$ y $p = 0.162$, se concluye que los estimados obtenidos con el método ordinario de los mínimos cuadrados son válidos para ambos casos.

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo de estos análisis es evaluar si la regresión lineal ajustada explica satisfactoriamente la relación entre Área y Concentración (%). En este análisis de varianza, la prueba F se aplica para probar si la pendiente de cada una de las líneas estimadas, b_1 y b_2 , difieren de cero. Mientras tanto, el coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de variabilidad de los datos observados que es correctamente explicado por la regresión lineal estimada.

Los resultados de ANOVA para los dos casos se dan en las siguientes tablas:

ANOVA					
	SS	df	MS	F	p-value
Regression	35938844321344	1	35938844321344	33873,75	0,000
Residual	20158323689	19	1060964405		
Total	35959002645033	20			

ANOVA					
	SS	df	MS	F	p-value
Regression	36175169513017	1	36175169513017	20476,88	0,000
Residual	33566057748	19	1766634618		
Total	36208735570765	20			

Los estimados difieren significativamente de cero, $p = 0.000 < 0.05$, ambos en el caso del analito siendo el único componente de la muestra y también cuando es contenido en una matriz compleja.

También es importante señalar que el coeficiente de determinación, R^2 , el cual nos da la proporción de variabilidad de los datos observados, es correctamente explicado por la regresión lineal estimada.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

El valor de R^2 para el caso donde el analito es aislado es 0.9994.

Regression Statistics	
R Square	0,9994
Adjusted R Square	0,9994
Standard Error	32572,45
Observations	21

En el caso en que está contenido en una matriz compleja es 0.9991.

Regression Statistics	
R Square	0,9991
Adjusted R Square	0,9990
Standard Error	42031,35
Observations	21

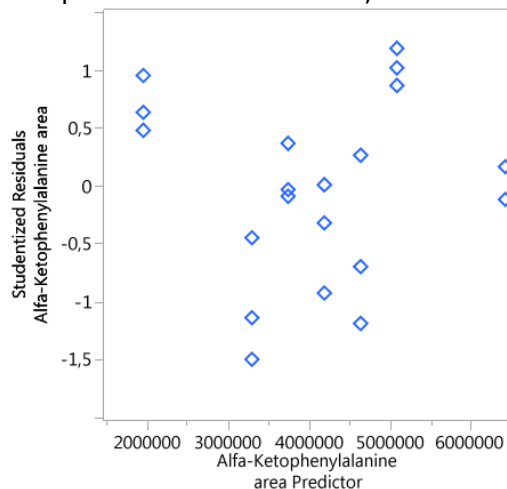
Esto significa que, en el primer caso, 99.94% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea; mientras que en el segundo caso el porcentaje es 99.91%, el cual es un valor excepcional.

Residuos

Los residuos permiten controlar la calidad del ajuste de un modelo de regresión lineal. Por lo tanto se debe construir un gráfico de dispersión en el cual los residuos y valores predictivos estén cruzados. La regresión lineal está bien ajustada cuando el gráfico no produce un patrón marcado.

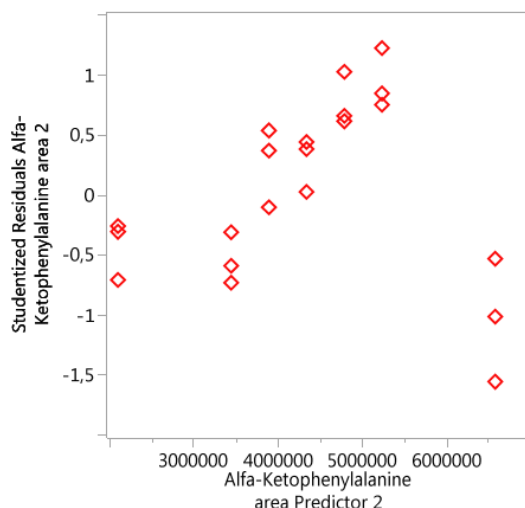
Los gráficos de dispersión para las dos regresiones lineales estimadas son:

- el analito es el único componente de la muestra,



3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es contenido en una matriz compleja



De los gráficos anteriores se concluye que hay una buena calidad de ajuste de las regresiones lineales.

Prueba de Paralelismo F

El objetivo de la prueba de paralelismo fue probar la hipótesis nula de igualdad de las pendientes de las dos regresiones lineales estimadas. La intención fue probar la hipótesis nula $b_1 = b_2$ versus la hipótesis alternativa $b_1 \neq b_2$. Si la hipótesis nula no es rechazada, puede concluirse que el efecto de los componentes de la matriz no es significativo.

Los estimados previamente obtenidos son:

$$b_1 = 42155.491 \quad b_2 = 42315.917$$

EL resultado de la prueba de Paralelismo F se da en la siguiente tabla:

Paralell Fit SSE	Full SSE	NDF	DDF	F Ratio	Prob > F
53987140666	53726270477	1	38	0,185	0,670

Al nivel de significancia de 5%, puede concluirse por el método de Paralelismo F que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.670 > 0.05$; lo cual quiere decir que no hay evidencia estadística para decir que la matriz tiene un efecto significativo.

Alfa-Hidroximetionina

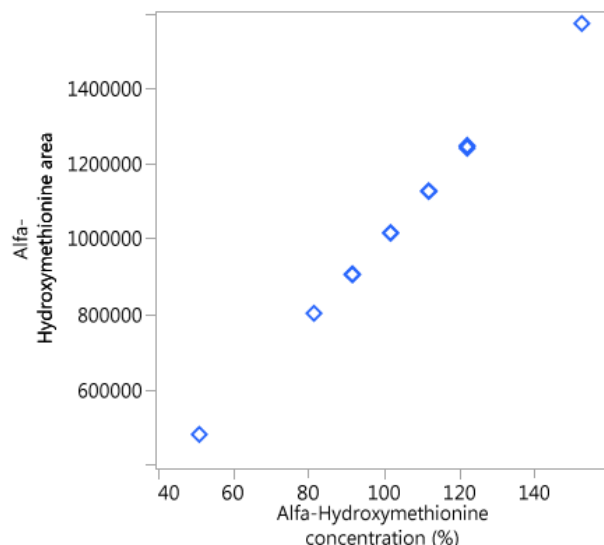
Gráficos de dispersión

En forma similar a como se hizo para los analitos anteriores, la existencia de una relación lineal entre la concentración (%) y el Área fue evaluada a través de la construcción de dos gráficos de dispersión donde uno se dirige al caso donde el analito es el único componente de la muestra, y el otro cuando está contenido en una matriz

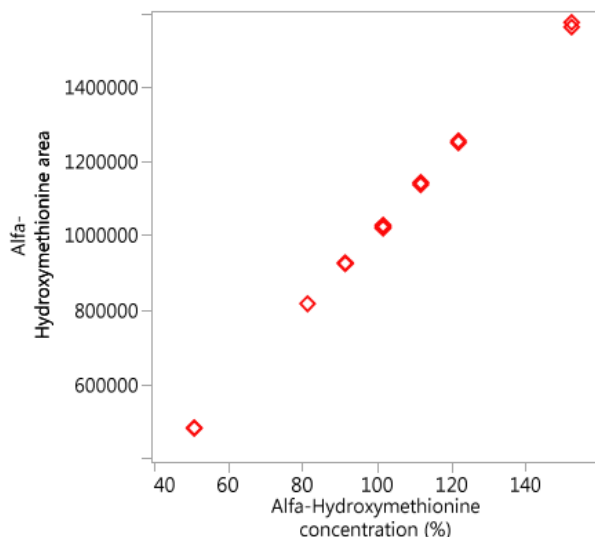
3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

compleja. Nuevamente, se observaron 3 áreas diferentes para cada una de las siete concentraciones.

Escenario del primer caso: el gráfico de dispersión revela una relación lineal casi perfecta.



Segundo escenario: también hay una relación lineal casi perfecta,



Coeficiente de correlación de Pearson

Teniendo en cuenta la correlación revelada en las dos figuras anteriores, determinamos los coeficientes de correlación de Pearson para ambos casos. Cuando el analito es el único componente de la muestra, $r = 0.9999$ y cuando es contenido en una matriz, $r = 0.9999$. Los dos coeficientes estimados se encuentran por debajo de valor mínimo aceptable, 0.990.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Ajuste de las líneas de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados

Como la correlación lineal de las dos variables fue observada a través de un gráfico de dispersión y su coeficiente de correlación de Pearson ($r \geq 0.9990$), dos regresiones lineales fueron estimadas, una cuando el analito es el único componente de la muestra,

$$\text{Área} = a_1 + b_1 \times \text{Concentración (\%)}$$

Y otra cuando el analito es contenido en una matriz compleja,

$$\text{Área} = a_2 + b_2 \times \text{Concentración (\%)}$$

Los interceptos a_1 y a_2 y pendientes b_1 y b_2 estimados fueron obtenidos por el método de los mínimos cuadrados.

Se obtuvieron los siguientes resultados del ajuste de la línea recta de regresión:

- el analito es el único componente de la muestra:

	Coefficients	Std. Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-74241,746	4194,556	-17,700	0,000	-83021,053	-65462,439
Conc. (%)	10770,977	39,561	272,261	0,000	10688,174	10853,780

- el analito es contenido en una matriz compleja:

	Coefficients	Std. Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-58860,151	4107,124	-14,331	0,000	-67456,460	-50263,842
Conc. (%)	10722,086	38,788	276,429	0,000	10640,902	10803,270

En breve,

$$a_1 = -74241.746, b_1 = 10770.977 \quad a_2 = -58860.151, b_2 = 10722.086$$

Estos estimados asumen que el error en los valores de Concentración (%) es constante, por lo tanto existe homocedasticidad. Lo cual quiere decir que todos los puntos $\text{Área} \times \text{Concentración (\%)}$ tienen igual peso en el cálculo de los estimados.

Prueba C de Cochran

La prueba C de Cochran debe aplicarse para evaluar si la suposición de homogeneidad no es violada. Como en escenarios anteriores, esta prueba fue aplicada teniendo en cuenta las dos situaciones ya descritas, y confirmó que la hipótesis nula de homocedasticidad no es rechazada, $p = 0.073$ y $p = 0.099$, de acuerdo con los siguientes resultados:

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- el analito es el único componente de la muestra

C (Observed value)	0,533
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,073
alfa	0,05

- el analito es contenido en una matriz compleja

C (Observed value)	0,508
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,099
alfa	0,05

De esta conclusión los estimados obtenidos por el método de los mínimos cuadrados para los parámetros de ambas regresiones lineales son aceptables.

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo de este análisis es evaluar si la regresión lineal ajustada explica satisfactoriamente la relación entre Área y Concentración (%). En este análisis de varianza, la prueba F es aplicada para probar si la pendiente de cada una de las líneas estimadas, b_1 y b_2 , difieren de cero.

Los estimados difieren significativamente de cero, $p = 0.000 < 0.05$, tanto cuando el analito es un componente simple, como cuando está inserto en una matriz. Se indica en la siguiente tabla de ANOVA:

ANOVA

	SS	df	MS	F	p-value
Regression	2162219926512	1	2162219926512	74126,06	0,000
Residual	554220445	19	29169497		
Total	2162774146957	20			

ANOVA

	SS	df	MS	F	p-value
Regression	2136974295515	1	2136974295515	76412,91327	0,000
Residual	531356676	19	27966141		
Total	2137505652191	20			

Mientras tanto, el coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de variabilidad de los datos observados que es correctamente explicado por la regresión lineal estimada.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

El valor de R^2 es 0.9997 para el caso donde el analito es aislado, significando que el 99.97% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea.

El valor de R^2 es 0.9998 considerando el otro caso, significando que el 99.98% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea:

Regression Statistics	
R Square	0,9997
Adjusted R Square	0,9997
Standard Error	5400,88
Observations	21

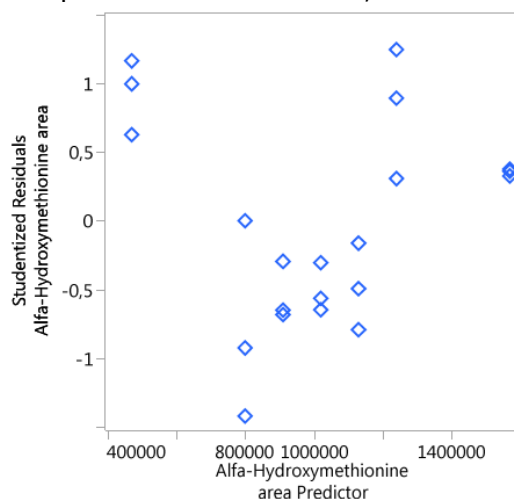
Regression Statistics	
R Square	0,9998
Adjusted R Square	0,9997
Standard Error	5288,30
Observations	21

Residuos

Los residuos permiten controlar la calidad del ajuste de un modelo de regresión lineal. Por lo tanto debe construirse un gráfico de dispersión en el cual los residuos y valores predictivos de Área de crucen. La regresión lineal está bien ajustada cuando el gráfico no produce un patrón marcado.

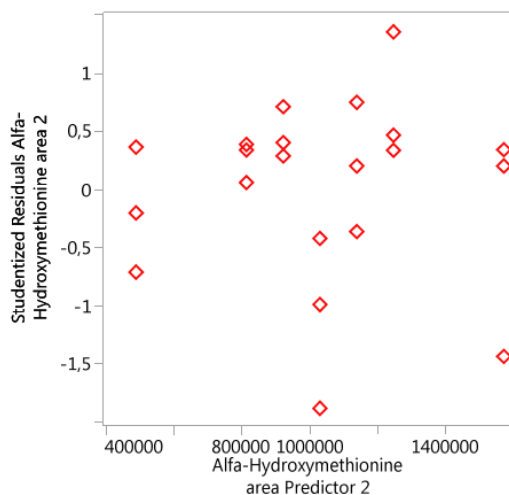
Los gráficos de dispersión para las dos regresiones lineales estimadas son:

- el analito es el único componente de la muestra,



- el analito está contenido en una matriz compleja,

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Los gráficos anteriores muestran una buena calidad del ajuste de las regresiones lineales.

Prueba de Paralelismo F

Como ya se mencionó, el objetivo de la prueba paralela es probar la hipótesis nula de igualdad de las pendientes de las dos regresiones lineales estimadas. La intención es probar la hipótesis nula $b_1 = b_2$ versus la hipótesis alternativa $b_1 \neq b_2$. Si la hipótesis nula no es rechazada, puede concluirse que el efecto de los componentes de la matriz no es significativo.

Estimados encontrados:

$$b_1 = 10770.977 \text{ y } b_2 = 10722.086$$

Los resultados de la prueba de Paralelismo F son:

Paralell Fit SSE	Full SSE	NDF	DDF	F Ratio	Prob > F
1108113557,60	1085834500,50	1	38	0,780	0,383

A un nivel de significancia de 5% puede concluirse por la prueba de Paralelismo F, que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.383$; lo que quiere decir que no hay evidencia estadística para decir que la matriz tiene un efecto significativo.

3.3.4 Precisión

3.3.4.1 Precisión intermedia

Criterio de aceptación:

- RSD para las determinaciones de un analista no debe ser mayor a 3.7%
- RSD entre los resultados de los dos analistas no debe ser mayor a 3.7%
- El promedio de los dos analistas no debe ser estadísticamente diferente (*Prueba t*)

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Alfa-Cetoisoleucina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 20 June 2016 Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 22 June 2016 Assay (%)
A1	100.8	102.6
A2	100.8	99.7
A3	100.5	99.0
A4	99.7	101.4
A5	99.8	100.2
A6	100.4	99.6
Average (%)	100.3	100.4
RSD (%)	0.5	1.3

Media entre analistas: 100.4%

RSD entre analistas: 1.0%

Prueba t

|t estadística| = -0.141888

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística ≤ t Crítica dos colas, los promedios entre los dos analistas no son estadísticamente diferente

- Alfa-Cetoleucina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 20 June 2016 Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 22 June 2016 Assay (%)
A1	101.5	101.8
A2	102.5	102.4
A3	102.4	102.3
A4	102.0	102.0
A5	101.8	102.0
A6	102.8	101.9
Average (%)	102.2	102.1
RSD (%)	0.5	0.2

Media entre analistas: 102.1%

RSD entre analistas: 0.4%

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Prueba t

t estadística = 0.577350

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, los promedios entre los dos analistas no son estadísticamente diferentes.

- Alfa-Cetoalana

Sample	Analyst 1: SMP Date: 20 June 2016 Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 22 June 2016 Assay (%)
A1	99.5	102.3
A2	99.7	99.4
A3	99.1	99.5
A4	98.4	100.9
A5	98.5	100.2
A6	98.9	99.5
Average (%)	99.0	100.3
RSD (%)	0.5	1.1

Media entre analistas = 99.7%

RSD entre analistas = 1.1%

Prueba t

|t estadística| = -2.531744

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, los promedios entre los dos analistas no son estadísticamente diferentes.

- Alfa-Cetofenilalanina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 20 June 2016 Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 22 June 2016 Assay (%)
A1	101.4	98.8
A2	102.3	103.4
A3	101.9	101.1
A4	102.1	100.3
A5	102.1	100.9
A6	103.3	101.9
Average (%)	102.2	101.0
RSD (%)	0.6	1.5

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Media entre analistas: 101.6%

RSD entre analistas: 1.2%

Prueba t

t estadística = 2.194423

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, los promedios entre los dos analistas no son estadísticamente diferentes.

- Alfa-Hidroximetionina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 20 June 2016 Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 22 June 2016 Assay (%)
A1	101.4	98.8
A2	101.9	102.7
A3	101.9	101.3
A4	101.6	100.5
A5	101.9	101.0
A6	102.3	101.1
Average (%)	101.8	100.9
RSD (%)	0.3	1.3

Media entre analistas: 101.4%

RSD entre analistas: 1.0%

Prueba t

t estadística = 2.088157

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, los promedios entre los dos analistas no son estadísticamente diferentes.

3.3.4.2 Repetitividad

Criterio de aceptación: RSD para 6 mediciones no debe ser mayor a 3.7%

- Alfa-Cetoisoleucina

Sample	Assay (%)
A1	100.8
A2	100.8
A3	100.5
A4	99.7
A5	99.8

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Sample	Assay (%)
A6	100.4
Average (%)	100.3
RSD (%)	0.5

- Alfa-Cetoleucina

Sample	Assay (%)
A1	101.5
A2	102.5
A3	102.4
A4	102.0
A5	101.8
A6	102.8
Average (%)	102.2
RSD (%)	0.5

- Alfa-Cetoalana

Sample	Assay (%)
A1	99.5
A2	99.7
A3	99.1
A4	98.4
A5	98.5
A6	98.9
Average (%)	99.0
RSD (%)	0.5

- Alfa-Cetofenilalanina

Sample	Assay (%)
A1	101.4
A2	102.3
A3	101.9
A4	102.1
A5	102.1

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Sample	Assay (%)
A6	103.3
Average (%)	102.2
RSD (%)	0.6

- Alfa-Hidroximetionina

Sample	Assay (%)
A1	101.4
A2	101.9
A3	101.9
A4	101.6
A5	101.9
A6	102.3
Average (%)	101.8
RSD (%)	0.3

3.3.4.3 Repetitividad instrumental

Criterio de aceptación: RSD entre áreas de 10 inyecciones no debe ser mayor a 3.7%.

Injection	Alfa-Ketoisoleucine Area	Alfa-Ketoleucine Area	Alfa-Ketovaline Area
1	920611	1246778	801057
2	916065	1243664	802438
3	918256	1245349	799059
4	911661	1242787	800174
5	915412	1240923	799771
6	915778	1238366	796902
7	910728	1244465	795308
8	916360	1247626	797267
9	913075	1244754	796291
10	910032	1247196	794273
Average	914798	1244191	798254
RSD (%)	0.4	0.2	0.3

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Injection	Alfa-Ketophenylalanine Area	Alfa-Hydroxymethionine Area
1	3830985	1024696
2	3840727	1024525
3	3842200	1024779
4	3875800	1022751
5	3870039	1025497
6	3878309	1021805
7	3890728	1019418
8	3894505	1032149
9	3899089	1030446
10	3914252	1027431
Average	3873664	1025350
RSD (%)	0.7	0.4

3.3.5 Exactitud

Criterio de aceptación:

- El porcentaje de recupero debe estar entre 97% y 103%
- RSD entre los resultados para tres determinaciones de cada nivel debe ser menor o igual a 3.7%
- Alfa-Cetoisoleucina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	81.309	79.935	98.311
	81.309	80.081	98.490
	82.379	80.032	97.152
	Mean (%)		97.984
	RSD (%)		0.741
100	101.636	98.969	97.376
	102.171	99.329	97.218
	102.171	99.396	97.284
	Mean (%)		97.293
	RSD (%)		0.082
120	121.963	121.003	99.213
	122.498	121.869	99.486
	122.498	121.161	98.908

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
	Mean (%)		99.202
	RSD (%)		0.291

- Alfa-Cetoleucina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	79.309	78.342	98.782
	79.664	79.995	100.415
	80.020	79.803	99.729
	Mean (%)		99.642
	RSD (%)		0.823
100	99.225	99.547	100.325
	99.580	100.494	100.918
	99.580	98.852	99.268
	Mean (%)		100.170
	RSD (%)		0.834
120	119.852	119.615	99.802
	119.852	119.361	99.591
	119.496	118.763	99.387
	Mean (%)		99.593
	RSD (%)		0.209

- Alfa-Cetovalina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	81.868	81.225	99.215
	81.444	81.202	99.703
	81.444	81.173	99.668
	Mean (%)		99.528
	RSD (%)		0.274
100	102.229	100.978	98.776
	101.805	101.588	99.787
	102.229	101.367	99.157
	Mean (%)		99.240

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
	RSD (%)		0.514
120	122.590	122.601	100.009
	122.166	122.238	100.059
	122.166	122.106	99.952
	Mean (%)		100.007
	RSD (%)		0.054

- Alfa-Cetofenilalanina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	80.091	77.968	97.349
	79.539	78.886	99.179
	78.986	77.572	98.209
	Mean (%)		98.246
	RSD (%)		0.932
100	99.424	99.256	99.831
	99.976	99.364	99.388
	99.424	98.302	98.872
	Mean (%)		99.364
	RSD (%)		0.483
120	119.308	116.322	97.497
	118.756	116.107	97.769
	118.756	115.473	97.235
	Mean (%)		97.501
	RSD (%)		0.274

- Alfa-Hidroximetionina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	80.705	79.483	98.485
	80.033	78.176	97.680
	80.705	78.750	97.577
	Mean (%)		97.914
	RSD (%)		0.508

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
100	100.881	98.440	97.580
	100.881	99.006	98.141
	101.554	99.777	98.250
	Mean (%)		97.990
	RSD (%)		0.367
120	121.058	120.362	99.425
	121.058	118.616	97.983
	122.403	121.426	99.202
	Mean (%)		98.870
	RSD (%)		0.785

3.3.6 Robustez

3.3.6.1 Estabilidad de muestra y soluciones estándar

Criterio de aceptación: La muestra y soluciones estándar son considerados estables si la RSD entre las áreas de inyecciones de la muestra y el estándar es menor a 2.5% en el período probado.

→ Solución muestra

- Alfa-Cetoisoleucina

Time point	Area
0 hour	921159
24 hours	917932
48 hours	919618
Average (0–48 hours)	920389
RSD (0–48 hours)	0.1 %

- Alfa-Cetoleucina

Time point	Area
0 hour	1338724
24 hours	1322010
48 hours	1314621
Average (0–48 hours)	1326673
RSD (0–48 hours)	1.3 %

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Alfa-Cetoalvalina

Time point	Area
0 hour	794921
24 hours	792962
48 hours	793388
Average (0–48 hours)	794155
RSD (0–48 hours)	0.1 %

- Alfa-Cetofenilalanina

Time point	Area
0 hour	3664608
24 hours	3735276
48 hours	3734956
Average (0–48 hours)	3699782
RSD (0–48 hours)	1.3 %

- Alfa-Hidroximetionina

Time point	Area
0 hour	1056621
24 hours	1067130
48 hours	1068656
Average (0–48 hours)	1062639
RSD (0–48 hours)	0.8 %

La solución muestra es estable por 48 horas luego de la preparación.

→ **Solución estándar**

- Alfa-Cetoisoleucina

Time point	Area
0 hour	914274
24 hours	919764
48 hours	917657
Average (0–48 hours)	915966

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Time point	Area
RSD (0–48 hours)	0.3 %

- Alfa-Cetoleucina

Time point	Area
0 hour	1296259
24 hours	1282257
48 hours	1276364
Average (0–48 hours)	1284960
RSD (0–48 hours)	0.8 %

- Alfa-Cetoalinalina

Time point	Area
0 hour	792624
24 hours	794295
48 hours	794998
Average (0–48 hours)	793811
RSD (0–48 hours)	0.2 %

- Alfa-Cetofenilalanina

Time point	Area
0 hour	3643037
24 hours	3713741
48 hours	3716470
Average (0–48 hours)	3679754
RSD (0–48 hours)	1.4 %

- Alfa-Hidroximetionina

Time point	Area
0 hour	1051077
24 hours	1057673
48 hours	1065652
Average (0–48 hours)	1058365
RSD (0–48 hours)	1.0 %

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

La solución estándar es estable durante 48 horas luego de la preparación.

3.3.6.2 Variación de la composición de la fase móvil

La composición de la fase móvil fue modificada en el rango de 0.024M a 0.026M de ácido sulfúrico ($0.025\text{M} \pm 0.001\text{M}$), determinando su influencia en los tiempos de retención y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

Variation of mobile phase composition	0.025 M sulfuric acid (method conditions)		0.024 M sulfuric acid		0.026 M sulfuric acid	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Alfa-Ketoleucine	20.810	3.233	20.721	2.163	20.931	2.360
Alfa-Ketoleucine	24.323	1.649	24.206	1.281	24.555	1.311
Alfa-Ketovalline	15.260	6.504	15.256	4.342	15.274	4.619
Alfa-Ketophenylalanine	31.230	3.362	31.206	2.272	31.451	2.347
Alfa-Hydroxymethionine	26.186	3.362	26.328	2.272	26.599	2.347
Comment	-----		Not critical: slight variation of retention times and decrease of resolution (in particular for ketovalline), nevertheless the acceptance criteria (not less than 1) is fulfilled.		Not critical: slight variation of retention times and decrease of resolution (in particular for ketovalline), nevertheless the acceptance criteria (not less than 1) is fulfilled.	

3.3.6.3 Variación del caudal

El caudal fue modificado en el rango de 0.35 mL/min a 0.55 mL/min ($0.45\text{ mL/min} \pm 0.1\text{ mL/min}$), determinando su influencia en los tiempos de retención y resolución cuando se compara con las condiciones original del método.

Variation of flow rate	0.45 mL/min (method conditions)		0.35 mL/min		0.55 mL/min	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Alfa-Ketoleucine	20.810	3.233	26.834	3.354	17.094	2.975
Alfa-Ketoleucine	24.323	1.649	31.289	1.667	19.915	1.478
Alfa-Ketovalline	15.260	6.504	19.682	6.789	12.555	6.106
Alfa-Ketophenylalanine	31.230	3.362	40.205	3.695	25.568	3.251
Alfa-Hydroxymethionine	26.186	3.362	33.597	3.695	21.355	3.251

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Variation of flow rate	0.45 mL/min (method conditions)		0.35 mL/min		0.55 mL/min	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Comment	-----		Not critical: increase of retention times and slight increase of resolution.		Not critical: decrease of retention times and slight decrease of resolution, nevertheless the acceptance criteria (not less than 1) is fulfilled.	

3.3.6.4 Variación del lote de columna

El lote de la columna fue modificado, determinando su influencia en los tiempos de retención y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

Variation of column batch	Column internal n° 0164/16		Column internal n° 0162/16	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Alfa-Ketoleucine	20.810	3.233	21.318	3.357
Alfa-Ketoleucine	24.323	1.649	24.949	1.828
Alfa-Ketovaline	15.260	6.504	15.586	6.676
Alfa-Ketophenylalanine	31.230	3.362	32.173	3.392
Alfa-Hydroxymethionine	26.186	3.362	27.013	3.392
Comment	-----		Not critical: slight increase of retention times and resolution.	

3.3.6.5 Variación de temperatura de la columna

La temperatura de la columna fue modificada en el rango de 15°C a 25°C, determinando su influencia en los tiempos de retención y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

Variation of column temperature	Room temperature (method conditions)		15°C		25°C	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Alfa-Ketoleucine	20.810	3.233	20.206	2.562	20.625	2.405
Alfa-Ketoleucine	24.323	1.649	24.491	2.130	24.189	1.364
Alfa-Ketovaline	15.260	6.504	14.497	4.645	15.081	4.810
Alfa-Ketophenylalanine	31.230	3.362	31.391	1.381	31.068	2.371
Alfa-Hydroxymethionine	26.186	3.362	28.278	1.381	26.295	2.371

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Variation of column temperature	Room temperature (method conditions)		15°C		25°C	
	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.	rt (min)	Resol.
Comment	-----		Not critical: slight variations on retention times and resolution, nevertheless the acceptance criteria (not less than 1) is fulfilled.		Not critical: slight variations on retention times and decrease of resolution nevertheless the acceptance criteria (not less than 1) is fulfilled.	

3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.4.1 Ensayo de Ceto e Hidroxiácidos

3.4.1.1 Alfa-Cetoisoleucina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como único componente de la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 56.8% y 170.3%. Los análisis estadísticos demuestran la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de la muestra no interfiere en la cuantificación de alfa-cetoisoleucina.

El porcentaje medio de recupero obtenido en la prueba de exactitud es 98.0%, 97.3% y 99.2% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la precisión intermedia de la prueba, la media y la RSD entre los resultados de los dos analistas son respectivamente 100.4% y 1.0%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.2 Alfa-Cetoleucina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como único componente de la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 55.5 a 166.4%. Los análisis estadísticos demuestran la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de alfa-cetoleucina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 99.6%, 100.2% y 99.6% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y RSD entre los resultados de los dos analistas son respectivamente 102.1% y 0.4%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.3 Alfa-Cetovalina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como único componente de la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 55.8 a 167.4%. Los análisis estadísticos demuestran la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de la muestra no interfiere en la cuantificación de alfa-cetovalina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 99,5%, 99.2% y 100.0% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y RSD entre los resultados de los analistas son respectivamente 99.7% y 1.1%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.4.1.4 Alfa-Cetofenilalanina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como único componente de la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 53.0 a 159.0%. Los análisis estadísticos demuestran la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de la muestra no interfiere en la cuantificación de alfa-cetofenilalanina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 98,2%, 99.4% y 97.5% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y RSD entre los resultados de los analistas son respectivamente 101.6% y 1.2%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.5 Alfa-Hidroximetionina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como único componente de la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 50.9 a 152.6%. Los análisis estadísticos demuestran la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de la muestra no interfiere en la cuantificación de alfa-hidroximetionina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 97,9%, 98.0% y 98.9% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y RSD entre los resultados de los analistas son respectivamente 101.4% y 1.0%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.2 Robustez

La muestra y las soluciones estándar son estables durante 48 horas luego de la preparación.

Las variaciones probadas en la composición de la fase móvil, caudal, lote de columna y temperatura de columna demuestran que estos no son críticos cuando se compara con las condiciones del método, probando la robustez del método.

3.4.3 Conclusión

El método es selectivo, lineal, preciso exacto y robusto, por lo que es válido para realizar la determinación cuantitativa de Ceto e Hidroxiácidos en Jetosteril tabletas recubiertas.