

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.P.5.3 Reporte de validación para la determinación de aminoácidos en tabletas recubiertas de Ketosteril mediante Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC)

1. OBJETIVO

Presentar los resultados obtenidos en la validación del método analítico para el ensayo de los aminoácidos en tabletas recubiertas de Ketosteril, mediante UPLC utilizando detección UV.

2. DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

UPLC – Cromatografía Líquida de ultra Rendimiento

RSD – Desviación estándar relativa

rt – Tiempo de retención

N - Platos teóricos

Resol. – Resolución

3. RESULTADOS

3.1. Descripción de Fórmula

3.1.1. Sustancia activa

Aminoácidos, cetoácidos, hidroxiaácidos descritos en la formulación (punto 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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Componentes	Cantidad por unidad (mg)	Función
L-Tirosina	30,0	Ingrediente activo
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

*eliminado durante el proceso;

**el contenido de agua individual se tiene en cuenta a fin de lograr el 100% de contenido de ingrediente activo en cada lote;

***varia, utilizado como material de carga para lograr un peso contante del núcleo del comprimido

-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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Total	~25
-------	-----

*eliminado durante el proceso;

**eliminado en parte durante el proceso;

3.2. Método**3.2.1. Reactivos y materiales**

Eluyente AccQ- Tag Ultra A (Aguas, Lote: 01146153231, Validez: 30 Nov. 2018)

Eluyente AccQ- Tag Ultra B (Aguas, Lote: 01146142931, Validez: 31 Oct. 2018)

Kit de Reactivo AccQ- Tag Ultra (Aguas, Lote: 8218853491, Validez: 28 Feb. 2017) compuesto de viales de Borato Buffer, AccQ- Tag Ultra, Polvo Reactivo AccQ- Tag Ultra y AccQ- Tag Ultra Reactivo diluyente

0.02M Ácido Clorhídrico (logbook RU2, 50/2016, página 19)

Agua MilliQ, obtenida de un Sistema Millipore

Estándar primario acetato de L- Lisina (ChromaDex, Lote: 00012601-236, validez 04 Ago. 2017, actividad: 107.2%)

Estándar primario L- Treonina (ChromaDex, Lote: 00020261 – 55V, validez: 04 Ago. 2017, actividad: 99.5%)

Estándar primario L- Histidina (LGC Standards, Lote: 66797, validez: 31 Mayo 2017, Actividad: 99.9%)

Estándar primario de L- Tirosina (LGC Standards, Lote: 38896, validez: 18 Mayo 2017, actividad: 99.9%)

Estándar primario L- Triptofano (LGC Standards, Lote: 34753, validez 34753: 16 Mayo 2017, actividad: 99.7%)

Povidona (Lote. 160300498, validez: 30 Junio 2018)

Macrogol 6000 (Lote: 160300498, Validez 30 Junio 2018)

Alfa- Cetoisoleucina de calcio (Lote. 160400155, validez: 30 Nov. 2018)

Alfa- Cetoleucina de calcio (Lote: 150300321, validez: 31 Mayo 2017)

Alfa – Cetovalina de calcio (Lote: 160600190, validez: 28 Febrero 2018)

Alfa- Cetofoeilalanina de calcio (Lote: 150900484, validez: 30 Junio 2018)

Alfa- Hidroximetionina de calcio (Lote: 160500145, validez: 31 Octubre 2018)

Almidón de maíz (Lote. 150500002, validez: 28 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)

Triacetín (Lote: 150400580, validez: 30 Septiembre 2019)

Tabletas de Ketosteril (Lote: 18N1032, validez: Marzo 2019)

Matraces volumétricos y pipetas

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.2. Equipamiento

5120-II-0417: Waters, UPLC con funcionalidad de HPLC, equipado con dos bombas binarias, autoanalizador, detector de red de Diodos UV/UV-Vis y software de datos de adquisición y tratamiento.

5120-II-0372: Baño de agua

2951-NI-7004: Termómetro calibrado

5120-II-0316: Micropipeta 100-1000 μ L

2951-NI-1035: Micropipeta 10- 100 μ L

3.2.3. Solución madre estándar: Linealidad de alto rango – estándares de referencia de aminoácidos

Se pesaron 105.0 mg de acetato de L- Lisina, 53.1 mg de L-Treonina, 38.1 mg de L- Histidina, 30.1 mg de L- Tirosina y 23.0 mg de L- Triptófano en un matraz volumétrico de 100mL. El volumen se completó con Ácido clorhídrico 0.02M.

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

Las soluciones estándar de trabajo se prepararon de acuerdo a la tabla 1.

Nivel (%)	Dilución (mL solución madre estándar → mL)
50	2 → 20
80	4 → 25
90	1.8 → 10
100	5 → 25
110	2.2 → 10
120	2.4 → 10
150	3 → 10

Tabla 1

El volumen de cada matraz volumétrico se llevó a volumen con ácido clorhídrico 0.02M.

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

Se pesaron 105.1 mg de acetato de L- Lisina, 52.9 mg de L-Treonina, 38.0 mg de L- Histidina, 30.0 mg de L- Tirosina y 22.9 mg de L- Triptófano en un matraz volumétrico de 100mL. El volumen se completó con Ácido clorhídrico 0.02M.

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

Las soluciones estándar de trabajo se prepararon de acuerdo a la tabla 2.

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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

150	15 → 50
-----	---------

Tabla 2

A cada matraz volumétrico de 50 ml se añadieron cantidades de placebo correspondientes a la composición del 100% y el volumen se llenó con ácido clorhídrico 0,02M.

3.2.7. Solución madre estándar:

Se pesaron 105.0 mg de acetato de L- Lisina, 53.0 mg de L-Treonina, 38.0 mg de L- Histidina, 30.0 mg de L- Tirosina y 23.0 mg de L- Triptófano en un matraz volumétrico de 100mL. El volumen se completó con Ácido clorhídrico 0.02M.

Finalmente, se diluyen 5 mL de la solución previa hasta 25 mL con ácido clorhídrico 0.02M.

3.2.8. Solución de prueba

Se pesaron 10 tabletas de ketosteril y se transfirieron a un matraz volumétrico de 1000 mL, se agregó ácido clorhídrico 0.02M y se agitó la solución hasta que las tabletas se disolvieron completamente.

5mL de la solución anterior se diluyeron hasta 25mL con ácido clorhídrico 0.02M.

3.2.9. Reactivo AccQ- Tag Ultra

Se transfirió 1mL del Reactivo diluyente AccQ- Tag Ultra a un vial de reactivo en polvo AccQ- Tag Ultra, previamente golpeado de forma suave. Se mezcló el vial durante 10 segundos y se lo calentó a 55°C en un baño de agua hasta completa disolución del polvo.

3.2.10. Derivatización de solución estándar y de prueba.

Se pipetearon 40µL de solución estándar/prueba, 280µL de Borato buffer AccQ-Tag Ultra y 80 µL de Reactivo AccQ-Tag Ultra en un vial de recuperación total. Se mezcló el vial, incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se calentó hasta 55°C en baño de agua por 10 minutos.

3.2.11. Condiciones Cromatográficas

- Columna: Watres, AccQ-Tag Ultra C18, 100x2.1 mm, 1.7 µm, numero de la pieza: 186003837, Numero de serie: 02403433316092, Numero interno: 0175/16
- Columna: Waters, AccQ-Tag Ultra C18, 100x2.1mm, 1.7 µm, Numero de la pieza:186003837, Numero de serie: 02403523015810, Numero interno: 0163/16 (Robustez – variación del lote de columna)
- λ: 260 nm
- Fase móvil A: Mezcla de 50mL de Eluyente A AccQ-Tag Ultra con 950mL de agua
- Fase móvil A: Mezcla de 69mL de Eluyente A AccQ-Tag Ultra con 931mL de agua (Robustez – variación de la proporción de agua en la fase móvil A)
- Fase móvil A: Mezcla de 31mL de Eluyente A AccQ-tag Ultra con 969mL de agua (Robustez- variación de la proporción de agua en fase móvil A)
- Fase móvil B: Eluyente B AccQ-Tag Ultra
- Caudal: 0.7mL/min
- Caudal: 0.6 mL/min y 0.8mL/min (Robustez – variación de la tasa de flujo)
- Temperatura de columna: 55°C
- Temperatura de columna: 50°C a 60°C (Robustez- variación de la temperatura de columna)
- Temperatura de la bandeja de muestra: 20°C
- Volumen de inyección: 1µL
- Tabla de tiempo de gradiente:

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0.00	99.9	0.1
0.54	99.9	0.1
5.74	90.9	9.1
7.74	78.8	21.2
8.04	40.4	59.6
8.50	40.4	59.6
8.60	10.0	90.0
9.00	10.0	90.0
9.10	99.9	0.1
10.0	99.9	0.1

3.3. Parámetros de validación**3.3.1. Adecuación del sistema**

Criterio de aceptación:

- El desvío estándar relativo (RSD) entre 5 inyecciones no debe ser mayor a 3.66%
- El número de platos teóricos no debe ser menor a 2005
- La resolución entre todos los 5 picos no debe ser menor que 1.5

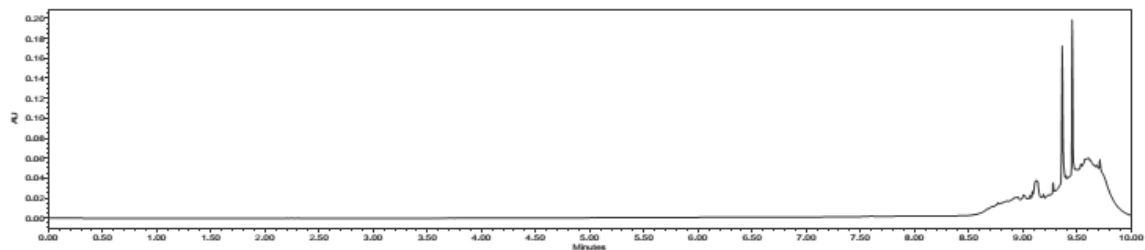
Sustancia	RSD	Platos n°	Resolución
Acetato de L- Lisina	0.08	1770587	10.945
L-Treonina	0.12	401234	48.405
L-Histidina	0.26	9712	28.409
L-Tirosina	0.21	1441871	56.777
L-Triptofano	0.09	10196398	56.777

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2. Selectividad

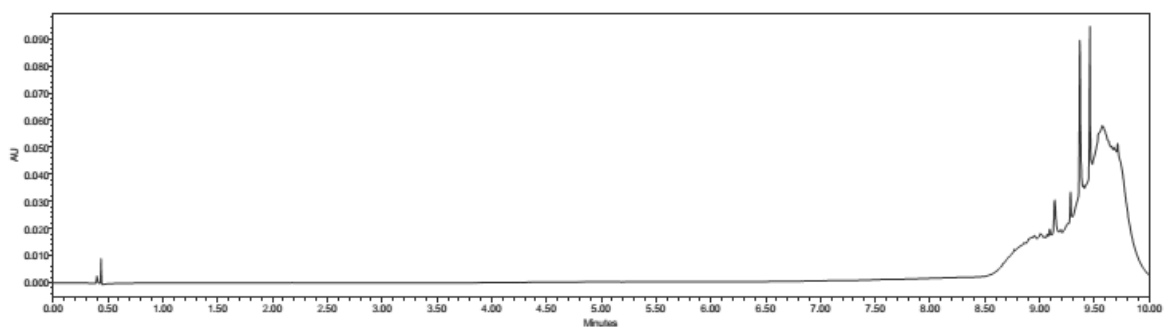
La solución placebo no interfiere en la cuantificación de aminoácidos.

3.3.2.1 Fase móvil A



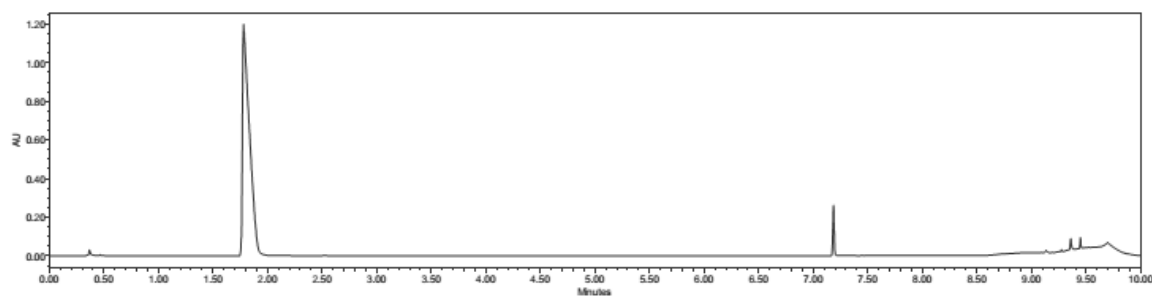
Cromatograma 1

3.3.2.2. Fase móvil B



Cromatograma 2

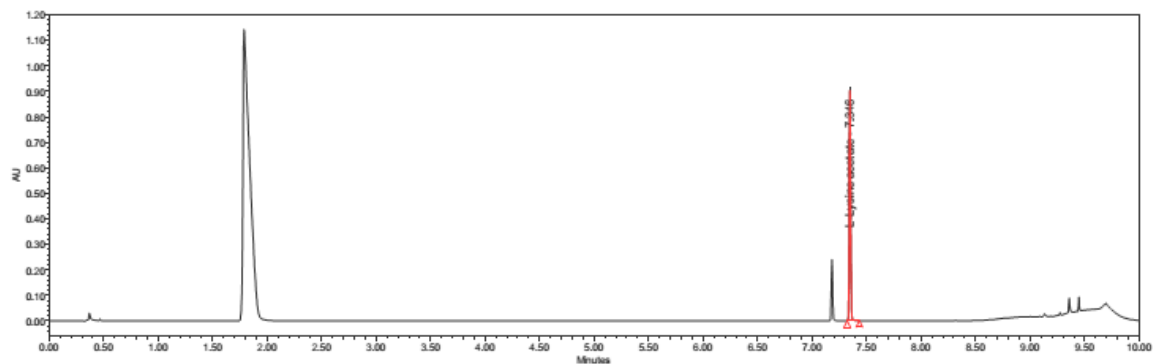
3.3.2.3. Solvente



Cromatograma 3

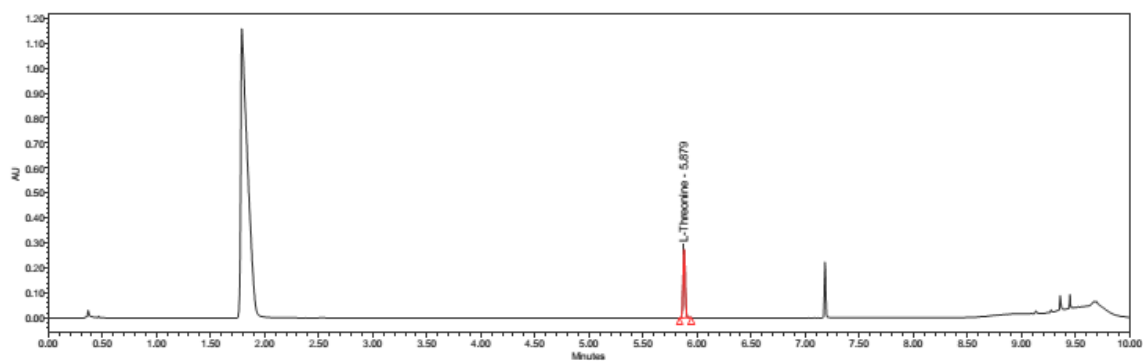
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2.4. Solución estándar de Acetato de L-Lisina



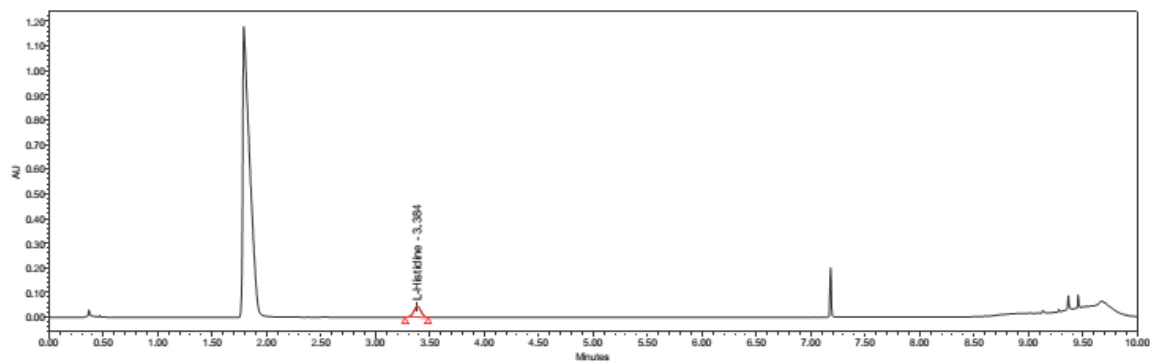
Cromatograma 4

3.3.2.5. Solución estándar de L-Treonina



Cromatograma 5

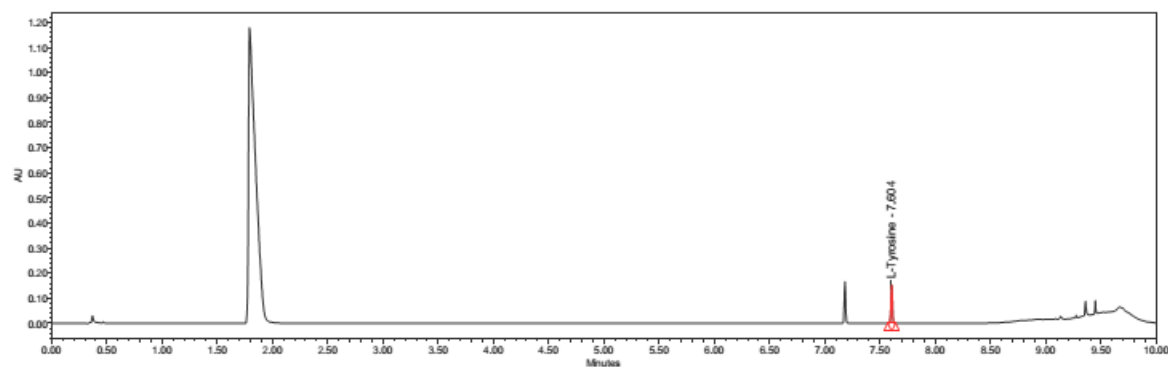
3.3.2.6. Solución estándar de L- Histidina



Cromatograma 6

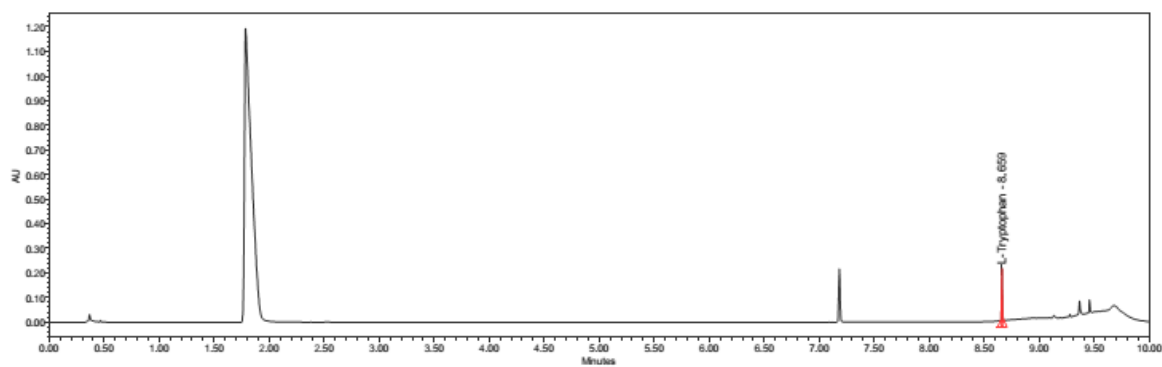
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2.7. Solución estándar de L-Tirosina



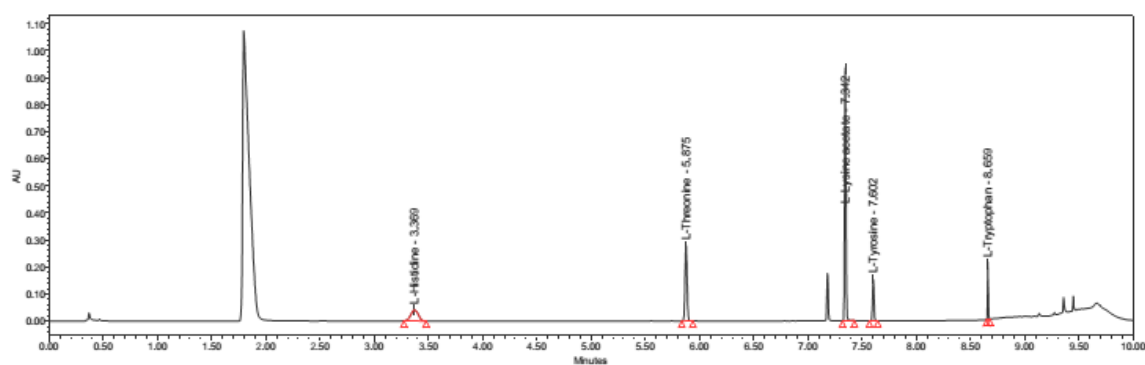
Cromatograma 7

3.3.2.8. Solución estándar de L- Triptofano



Cromatograma 8

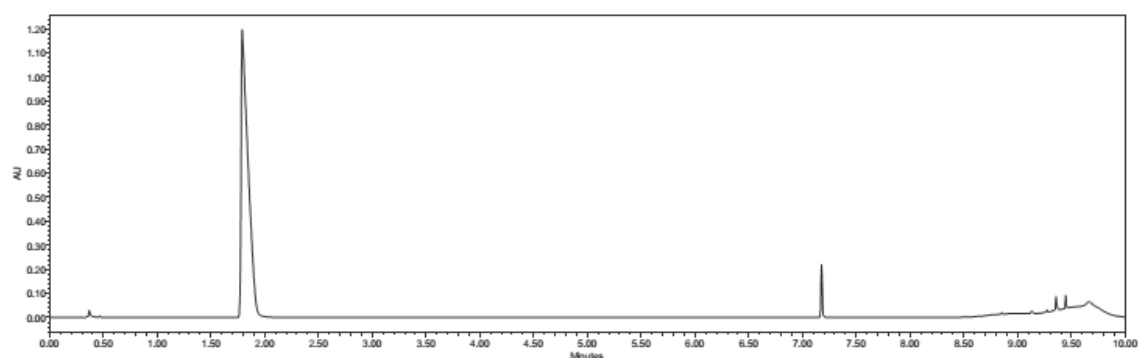
3.3.2.9 Solución estándar



Cromatograma 9

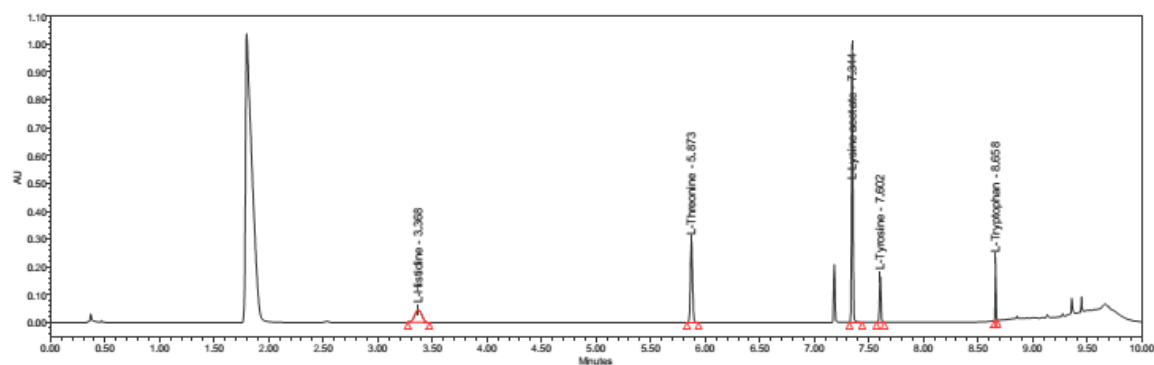
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.3.2.10. Solución Placebo



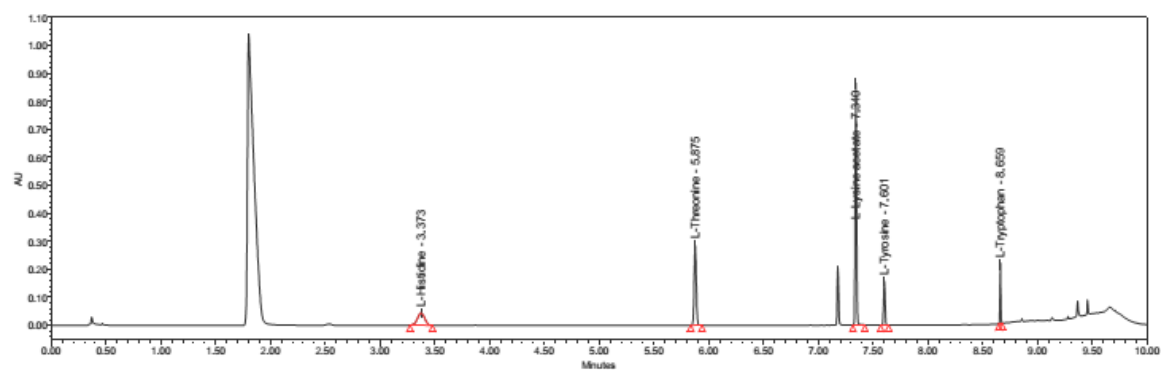
Cromatograma 10

3.3.2.11. Solución estándar + Placebo



Cromatograma 11

3.3.2.12. Solución de prueba



Cromatograma 12

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)**3.3.3. Linealidad de alto rango****a) estándares de referencia de aminoácidos**

Criterio de aceptación:

- $r \geq 0.990$

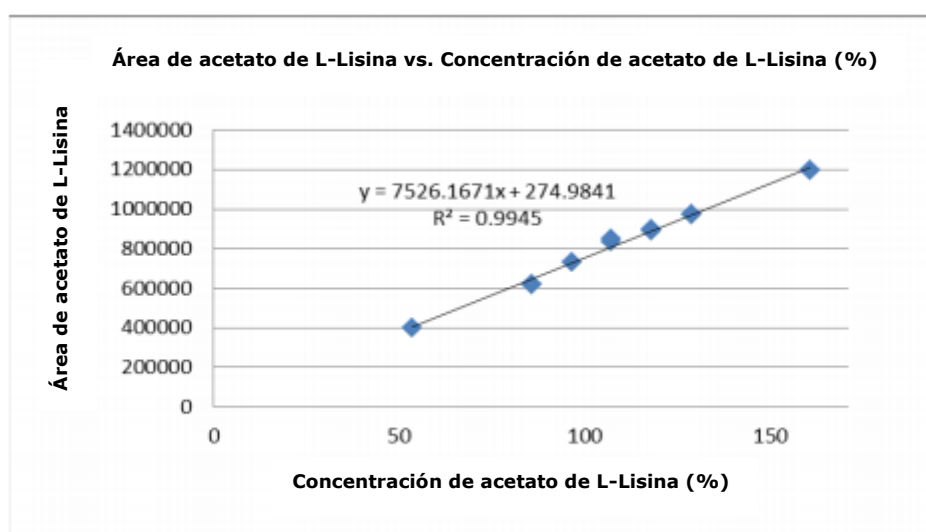
- Los residuos deben tener una distribución aleatoria y el intervalo de confianza del 95% o 99% para el término intercepto debe contener un cero.

- Acetato de L-Lisina

Nivel (%)	Concentración de Acetato de L-Lisina	Área
50	53.600	400672
		399999
		400722
	Media	400464
	RSD (%)	0.1
80	85.760	616864
		618338
		619290
	Media	618164
	RSD (%)	0.2
90	96.480	731545
		733041
		732220
	Media	732269
	RSD (%)	0.1
100	107.200	833652
		834320
		848556
	Media	838843
	RSD (%)	1.0
110	117.920	900630
		889145
		890155
	Media	893310
	RSD (%)	0.7

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de Acetato de L-Lisina	Área
120	128.640	974853
		969889
		969374
	Media	971372
	RSD (%)	0.3
150	160.800	1196407
		1194458
		1194552
	Media	1195139
	RSD (%)	0.1



Ecuación de la recta: ($y = 7526.1671x + 274.9841$)

$m = 7526.1671$

$b = 274.9841$

$r = 0.9972$

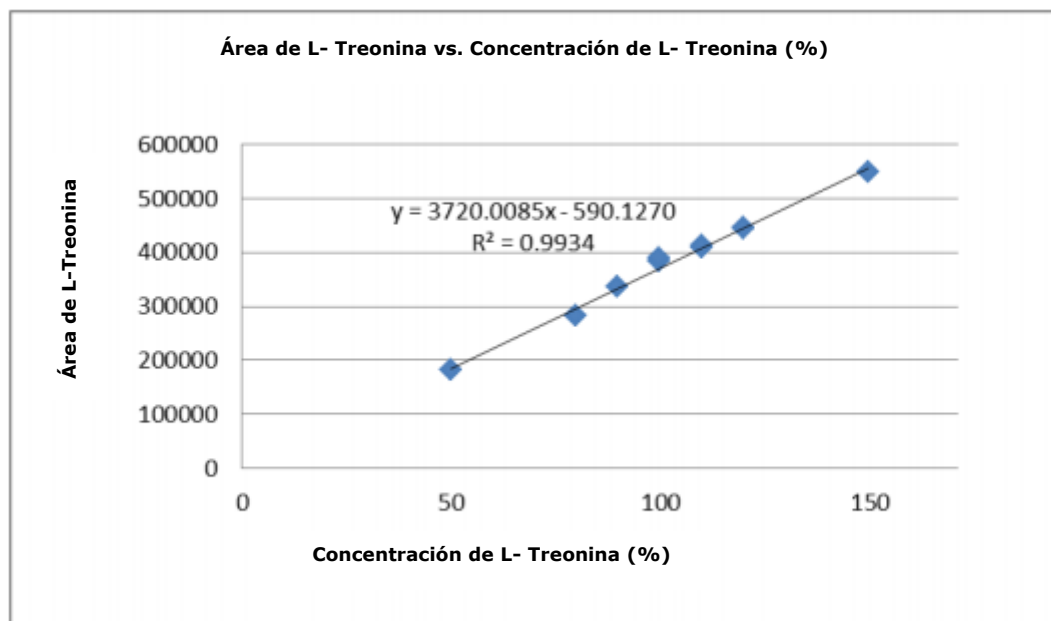
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- L- Treonina

Nivel (%)	Concentración de L- Treonina	Área
50	49.844	183068
		182677
		183008
	Media	182918
	RSD (%)	0.1
80	79.750	282376
		282845
		283049
	Media	282757
	RSD (%)	0.1
90	89.719	335462
		336302
		335883
	Media	335882
	RSD (%)	0.1
100	99.688	384141
		384552
		391247
	Media	386647
	RSD (%)	1.0
110	109.657	413842
		408298
		408050
	Media	410063
	RSD (%)	0.8
120	119.625	447201
		444962
		444266
	Media	445476
	RSD (%)	0.3
150	149.532	548465

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L- Treonina	Área
		547790
		547747
		548000
	Media	548000
	RSD (%)	0.1



Ecuación de la recta ($y = 3720.0085x - 590.1270$)

$m = 3720.0085$

$b = -590.1270$

$r = 0.9967$

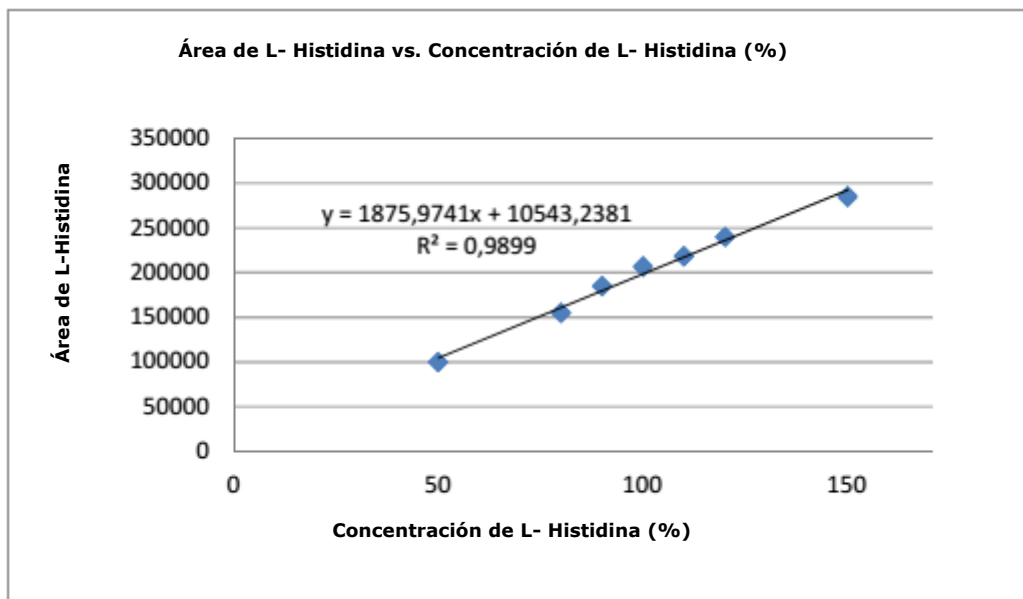
- L- Histidina

Nivel (%)	Concentración de L- Histidina	Área
50	50.081	100272
		99949
		99962
	Media	100061
	RSD (%)	0.2
80	80.130	154786
		154952
		155386

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L- Histidina	Área
90		155041
	RSD (%)	0.2
	90.147	184557
		184403
		184717
	Media	184559
	RSD (%)	0.1
100	100.163	205861
		206377
		207481
	Media	206573
	RSD (%)	0.4
110	110.179	218769
		218018
		217660
	Media	218149
	RSD (%)	0.3
120	120.195	239939
		239716
		239831
	Media	239829
	RSD (%)	0.1
150	150.244	285939
		284886
		283910
	Media	284912
	RSD (%)	0.4

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 1875.9741x + 10543.2381$)

$m = 1875.9741$

$b = 10543.2381$

$r = 0.9949$

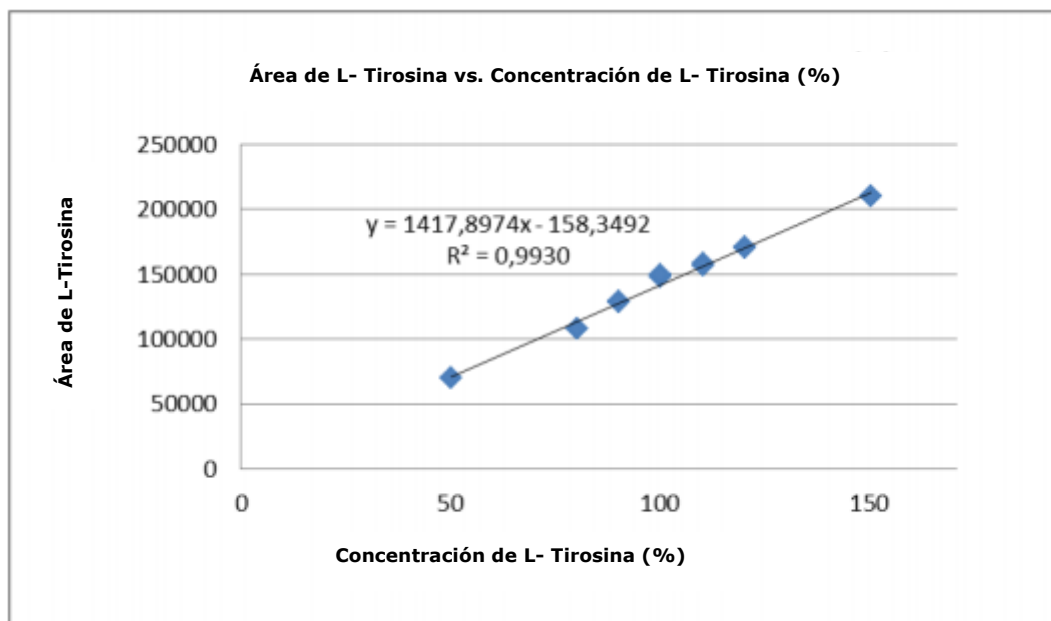
- L- Tirosina

Nivel (%)	Concentración de L-Tirosina	Área
50	50.117	70058
		69976
		70184
	Media	70073
	RSD (%)	0.2
80	80.186	108501
		108192
		108457
	Media	108383
	RSD (%)	0.2
90	90.210	128191
		128868
		129025
	Media	128694

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L-Tirosina	Área
	RSD (%)	0.3
100	100.233	147663
		147854
		150264
	Media	148594
	RSD (%)	1.0
110	110.256	158517
		156499
		156544
	Media	157187
	RSD (%)	0.7
120	120.280	171525
		170696
		170427
	Media	170882
	RSD (%)	0.3
150	150.350	210049
		209843
		209864
	Media	209919
	RSD (%)	0.1

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 1417.8974x - 158.3492$)

$m = 1417.8974$

$b = -158.3492$

$r = 0.9965$

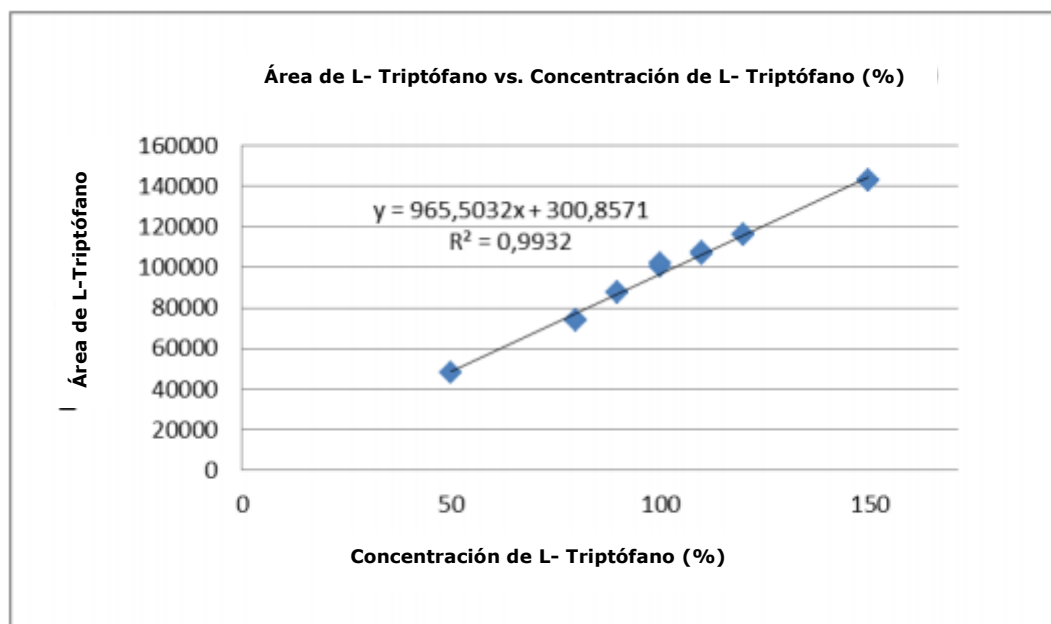
- L- Triptófano

Nivel (%)	Concentración de L-Triptofano	Área
50	49.850	47914
		47835
		47926
	Media	47892
	RSD (%)	0.1
80	79.760	73750
		73860
		73936
	Media	73849
	RSD (%)	0.1
90	89.730	87509
		87715
		87664
	Media	87629

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L-Triptofano	Área
	RSD (%)	0.1
100	99.700	100321
		100413
		102201
	Media	100978
	RSD (%)	1.1
110	109.670	107804
		106271
		106410
	Media	106829
	RSD (%)	0.8
120	119.640	116514
		115938
		115799
	Media	116084
	RSD (%)	0.3
150	149.550	142923
		142378
		142711
	Media	142671
	RSD (%)	0.2

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y=965.5032x + 300.8571$)

$m= 965.5032$

$b= 300.8571$

$r= 0.9966$

b) Efecto matriz: placebo + estándares de referencia de aminoácidos

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 cero.

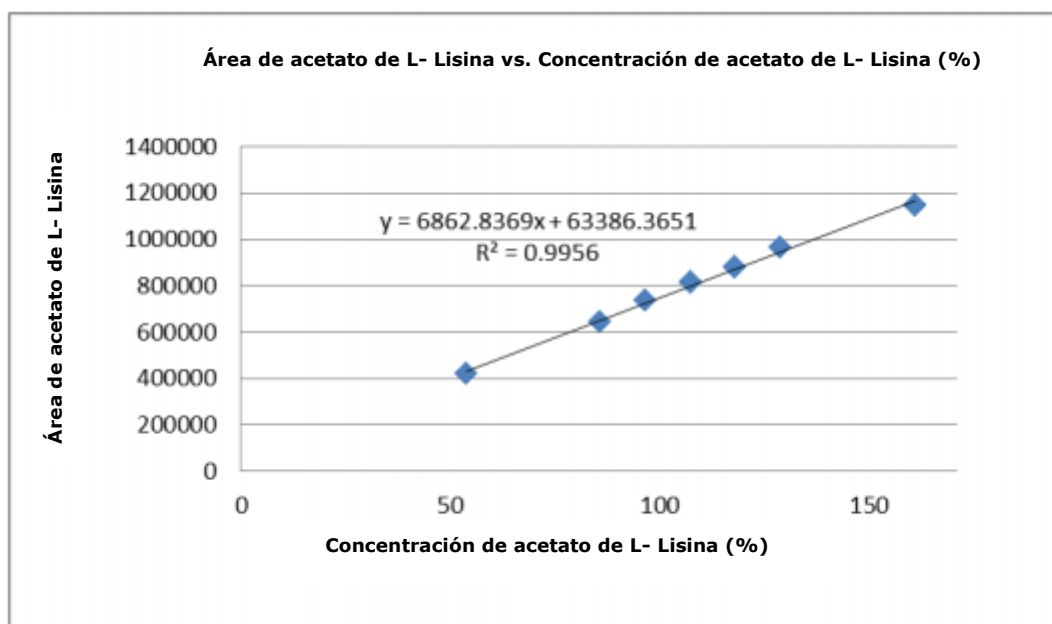
- Acetato de L-Lisina

Nivel (%)	Concentración de acetato de L-Lisina (%)	Área
50	53.651	418173
		420014
		418319
	Media	418835
	RSD (%)	0.2
80	85.842	641275
		642061
		641068
	Media	641468

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de acetato de L-Lisina (%)	Área
	RSD (%)	0.1
90	96.572	735445
		735740
		735970
	Media	735718
	RSD (%)	0.0
100	107.302	813077
		814217
		815063
	Media	814119
	RSD (%)	0.1
110	118.032	879403
		879697
		880495
	Media	879865
	RSD (%)	0.1
120	128.763	963495
		963008
		964532
	Media	963678
	RSD (%)	0.1
150	160.953	1142579
		1149799
		1142016
	Media	1144798
	RSD (%)	0.4

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 6862.8369x + 63386.3651$)

$m = 63386.3651$

$b = 63386.3651$

$r = 0.9978$

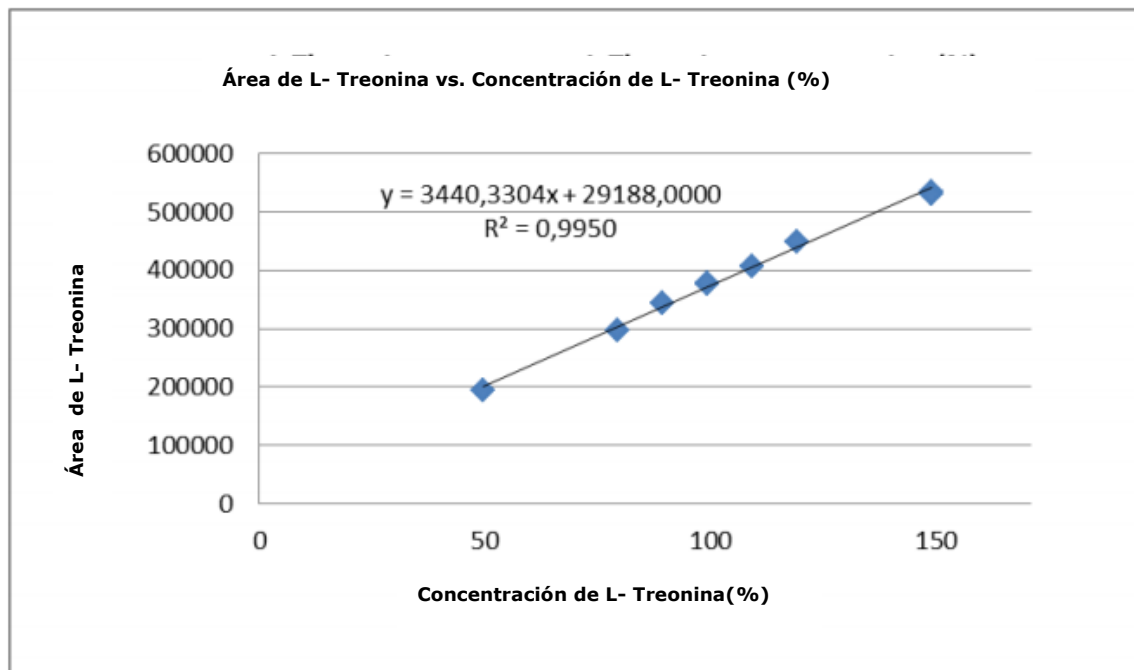
- L - Treonina

Nivel (%)	Concentración de L- Treonina (%)	Área
50	49.656	193933
		194464
		193454
	Media	193950
	RSD (%)	0.3
80	79.450	296169
		296659
		296426
	Media	296418
	RSD (%)	0.1
90	89.381	342996
		343072
		343641
	Media	343237

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L- Treonina (%)	Área
	RSD (%)	0.1
100	99.312	376570
		377220
		377258
	Media	377016
	RSD (%)	0.1
110	109.243	406838
		407143
		407330
	Media	407104
	RSD (%)	0.1
120	119.175	447674
		447328
		447579
	Media	447527
	RSD (%)	0.0
150	148.968	529331
		533569
		529301
	Media	530733
	RSD (%)	0.5

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 3440.3304x + 29188.0000$)

$m = 3440.3304$

$b = 29188.0000$

$r = 0.9975$

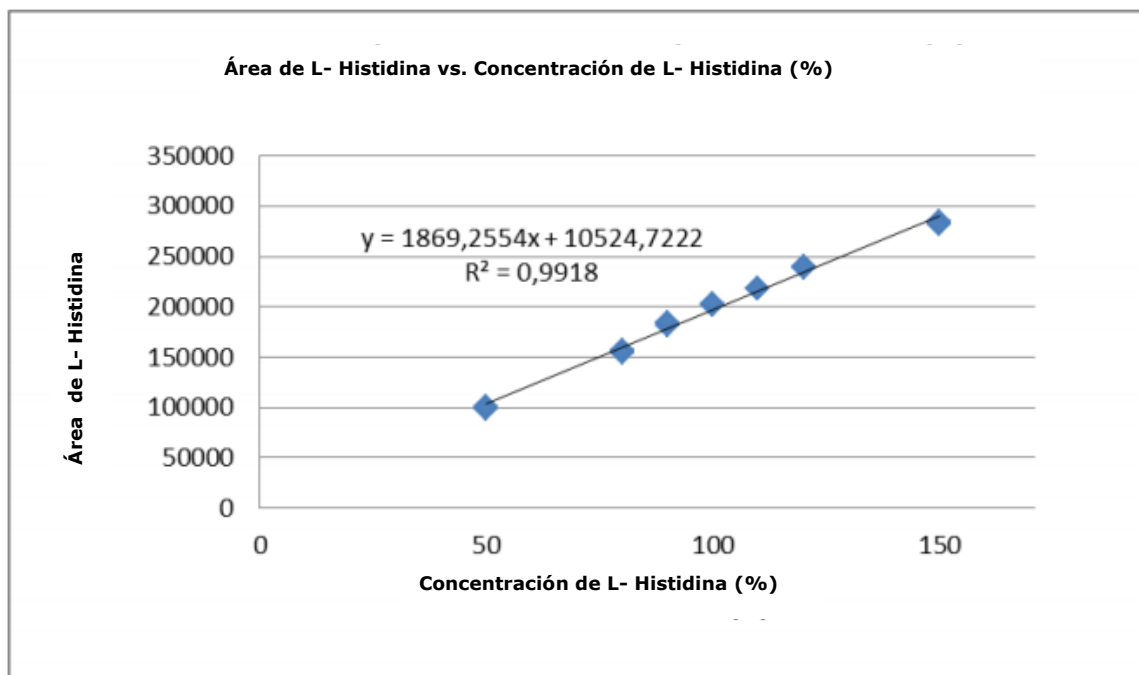
- L – Histidina

Nivel (%)	Concentración de L-Histidina (%)	Área
50	49.950	98264
		100471
		100160
	Media	99632
	RSD (%)	1.2
80	79.920	154164
		156230
		155413
	Media	155269
	RSD (%)	0.7
90	89.910	181670
		184196
		184032
	Media	183299

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L-Histidina (%)	Área
	RSD (%)	0.8
100	99.900	202309
		201907
		202506
	Media	202241
	RSD (%)	0.2
110	109.890	217543
		217796
		218475
	Media	217938
	RSD (%)	0.2
120	119.880	239297
		238798
		239739
	Media	239278
	RSD (%)	0.2
150	149.850	282307
		284940
		282313
	Media	283187
	RSD (%)	0.5

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 1869.2554x + 10524.7222$)

$m = 1869.2554$

$b = 10524.722$

$r = 0.9959$

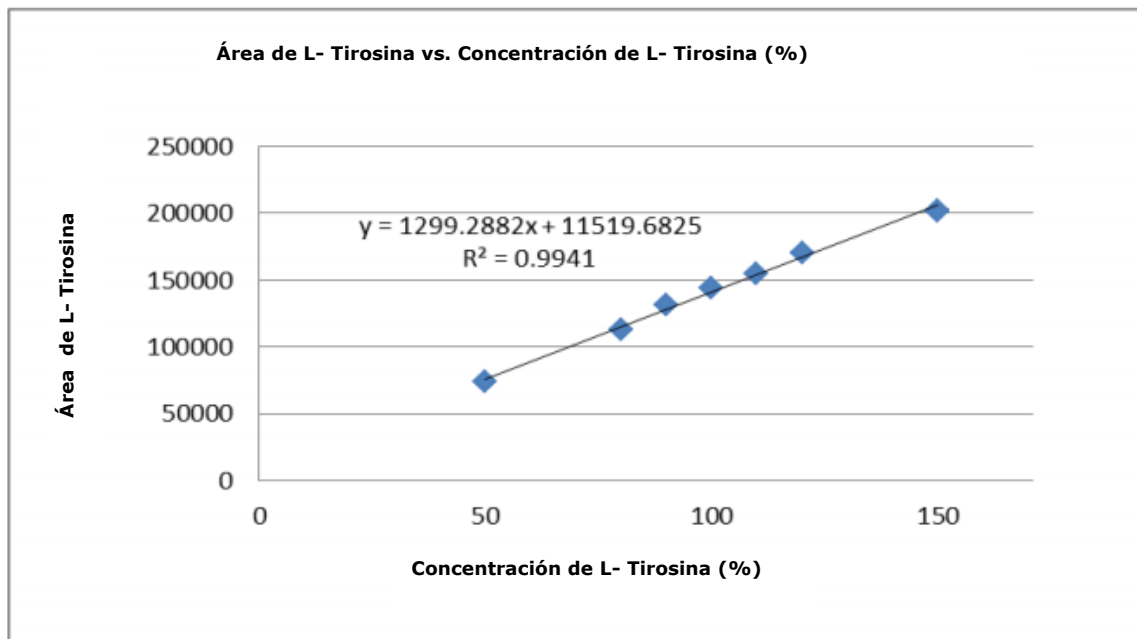
- L- Tirosina

Nivel (%)	Concentración de L- Tirosina (%)	Área
50	49.950	73680
		74102
		73827
	Media	73870
	RSD (%)	0.3
80	79.920	112675
		112941
		112710
	Media	112775
	RSD (%)	0.1
90	89.910	131310
		131338
		131437
	Media	131362

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L- Tirosina (%)	Área
	RSD (%)	0.1
100	99.900	143779
		144029
		144247
	Media	144018
	RSD (%)	0.2
110	109.890	154757
		154879
		155028
	Media	154888
	RSD (%)	0.1
120	119.880	170404
		170340
		170675
	Media	170473
	RSD (%)	0.1
150	149.850	201536
		202754
		201242
	Media	201844
	RSD (%)	0.4

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 1299.2882x + 11519.6825$)

$m = 1299.2882$

$b = 11519.6825$

$r = 0.9971$

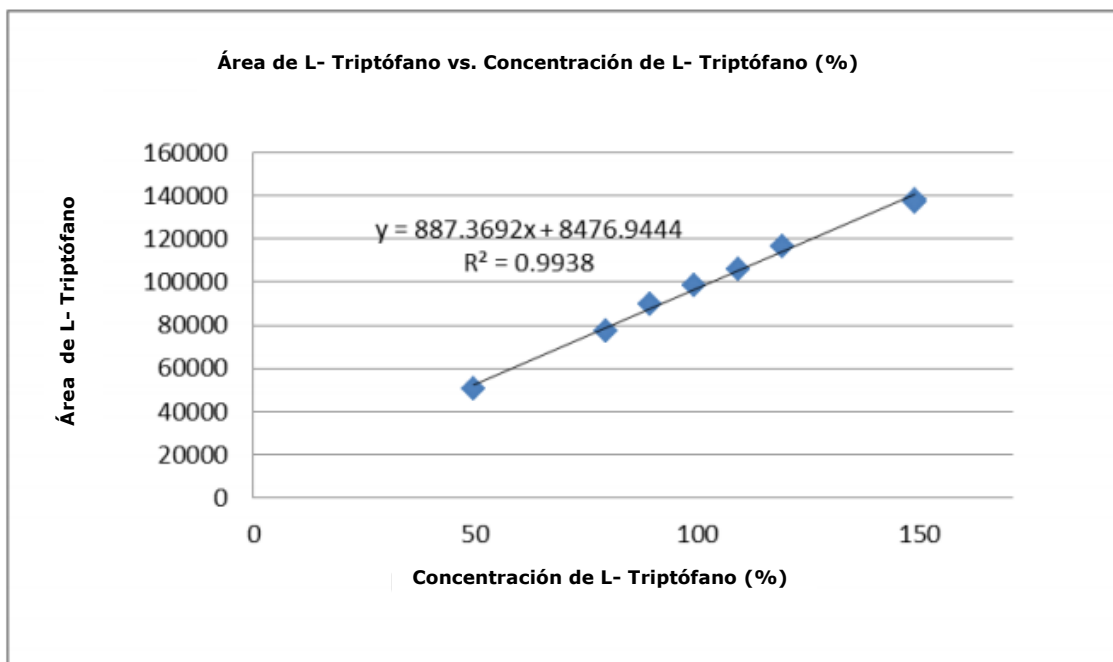
- L- triptófano

Nivel (%)	Concentración de L- Triptofano (%)	Área
50	49.633	50624
		50820
		50672
	Media	50705
	RSD (%)	0.2
80	79.413	77156
		77284
		77100
	Media	77180
	RSD (%)	0.1
90	89.340	89850
		89853
		89936
	Media	89880

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Nivel (%)	Concentración de L- Triptofano (%)	Área
	RSD (%)	0.1
100	99.267	98387
		98541
		98647
	Media	98525
	RSD (%)	0.1
110	109.193	105636
		105708
		105778
	Media	105707
	RSD (%)	0.1
120	119.120	116364
		116266
		116513
	Media	116381
	RSD (%)	0.1
150	148.900	201536
		202754
		201242
	Media	201844
	RSD (%)	0.4

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



Ecuación de la Recta ($y = 887.3962x + 8476.9444$)

$m = 887.3692$

$b = 8476.9444$

$r = 0.9969$

c) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con asistencia de software estadístico JMP Statistical Discovery de SAS, versión 12 y XLSTAT 2016.

Acetato de L-Lisina

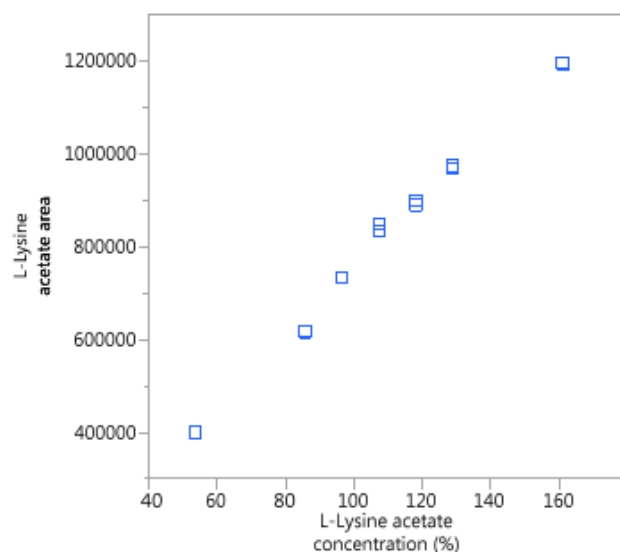
Gráfico de dispersión

Con el fin de evaluar si existe una relación directa entre la Concentración (%) y el Área del analito se construyeron dos gráficos de dispersión, uno en el que el analito es el único componente de la muestra, y el otro en el que el analito está en una matriz compleja con otros constituyentes.

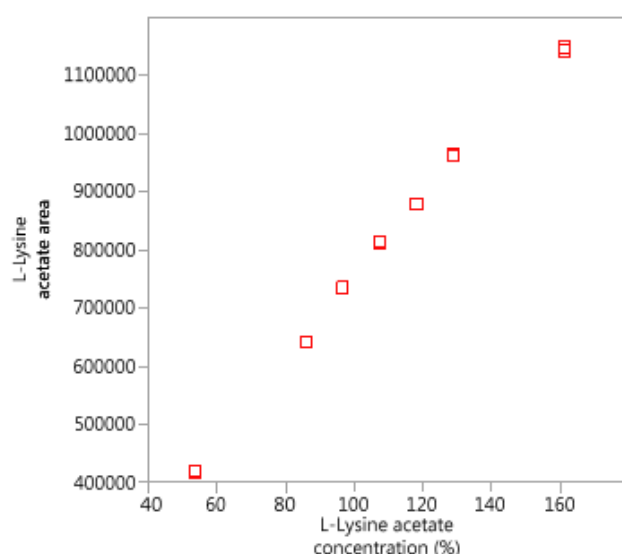
Se observaron tres áreas diferentes para cada una de las siete concentraciones.

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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



También se observó una relación linear casi perfecta entre el Área y la Concentración (%) cuando el analito se encuentra en una matriz compleja,



Coeficiente de correlación de Pearson

Considerando la correlación revelada en los dos gráficos, los coeficientes de correlación de Pearson se estimaron para entender si estos eran mayores que los mínimos aceptables, 0.990, lo cual fue verificado. Así, se encontró que en ambos casos se satisface esta suposición porque cuando el analito es el único componente de la muestra $r = 0.9972$ y cuando se encuentra en una matriz compleja con otros componentes $r = 0.9978$.

Ajuste de líneas de regresión lineal utilizando el método de Mínimos cuadrados

Luego de ser verificada la correlación lineal entre las dos variables, a través de 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 en la muestra,

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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

y otra cuando el analito está 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>Coeficientes</i>	<i>Error std.</i>	<i>Stad. t</i>	<i>valor-P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Sobre 95%</i>
Intersección	274,984	14376,981	0,019	0,985	-29816,382	30366,350
Conc. (%)	7526,167	128,711	58,473	0,000	7256,772	7795,562

En el segundo caso,

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error std.</i>	<i>Stad. t</i>	<i>valor-P</i>	<i>Bajo 95%</i>	<i>Sobre 95%</i>
Intersección	63386,365	11756,899	5,391	0,000	38778,893	87993,838
Conc. (%)	6862,837	105,154	65,264	0,000	6642,747	7082,927

Por lo tanto, tenemos:

$$a_1 = 274,984 \quad b_1 = 7526,167 \quad a_2 = 63386,365 \quad b_2 = 6862,837$$

Estas estimaciones 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 las estimaciones. Se aplicará la prueba de Cochran para determinar si esta suposición es válida.

Prueba C de Cochran

Se aplicó la prueba C de Cochran con el objetivo de evaluar la igualdad de las varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado, Área.

En ambas situaciones, si el analito es el único componente o está contenido en una matriz, la hipótesis de homocedasticidad fue rechazada, respectivamente, $p = 0.043$ y $p = 0.000$.

Por lo tanto, se concluye que los estimados determinados con el método ordinario de los mínimos cuadrados no son válidos. Las siguientes tablas muestran los resultados:

- En el primero caso,

C (Observed value)	0,572
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,043
alfa	0,05

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- En el segundo caso

C (Observed value)	0,851
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,000
alfa	0,05

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

Utilizando la prueba C de Cochran se concluyó que la heterocedasticidad existe para ambos casos, cuando el analito es el único componente de la muestra y cuando es contenido en una matriz compleja, lo cual conduce a la necesidad de 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 determinan los estimados de los coeficientes de la regresión lineal.

Así, los nuevos estimados de Interceptos, a_1 y a_2 , y Pendientes, b_1 y b_2 , son los siguientes:

- 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	777,419	4686,242	0,166	0,870	-9030,997	10585,835
Conc. (%)	7463,750	57,800	129,130	0,000	7342,772	7584,727

- el analito es contenido en una matrix 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	33247,079	10411,306	3,193	0,005	11455,965	55038,193
Conc. (%)	7227,698	104,233	69,341	0,000	7009,535	7445,862

En breve,

$$a_1 = 777.419, b_1 = 7463.750$$

$$a_2 = 33247.079, b_2 = 7227.698$$

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo del análisis de varianza, ANOVA, 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 una de las líneas estimadas, b_1 y b_2 , difieren de cero. El coeficiente de determinación, R^2 , da la proporción de variabilidad en los datos que es adecuadamente explicada por la regresión lineal. En ambos casos, ANOVA fue conducida considerando el método de los mínimos cuadrados pesados.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Para el analito siendo el único componente tenemos:

ANOVA					
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	1244537445246	1	1244537445246	16674,47	0,000
Residual	1418108872	19	74637309		
Total	1245955554118	20			

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9989
Adjusted R Square	0,9988
Standard Error	8639,29
Observations	21

Esto conduce a la conclusión que la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otro lado, la línea puede explicar el 99.89% de la variabilidad de los datos.

En el caso en que el analito está contenido en una matriz compleja,

ANOVA					
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	244632035757	1	244632035757	4808,235	0,000
Residual	966676762	19	50877724		
Total	245598712519	20			

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9961
Adjusted R Square	0,9959
Standard Error	7132,86
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 99.61% de la variabilidad en los datos.

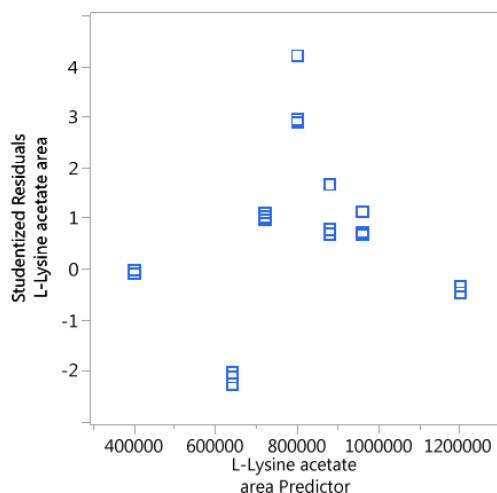
Residuos

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

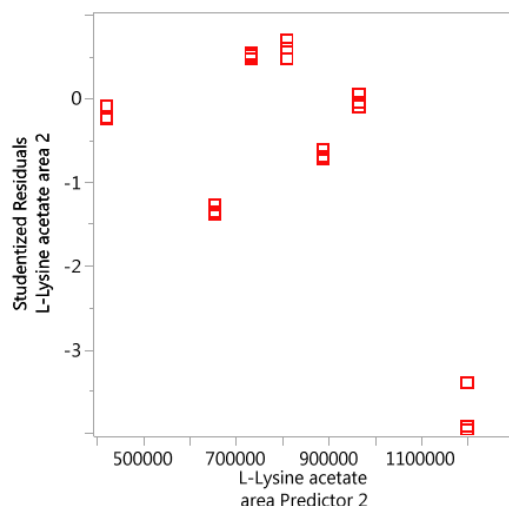
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

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

- el analito es el único componente de la muestra,



- el analito es contenido en una matriz compleja,



Los 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 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:

$$b_1 = 7463.750 \quad b_2 = 7227.698$$

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Las siguientes tablas indican los resultados,

<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
2599835094,40	2384318081	1	38	3,435	0,072

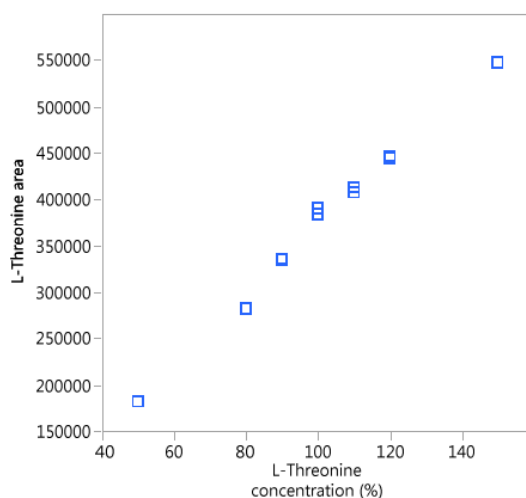
Estos resultados muestran que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.072 > 0.05$; por lo tanto, no existe evidencia estadística al nivel de 5% para afirmar que la matriz tiene un efecto significativo.

L - Treonina

Gráficos de dispersión

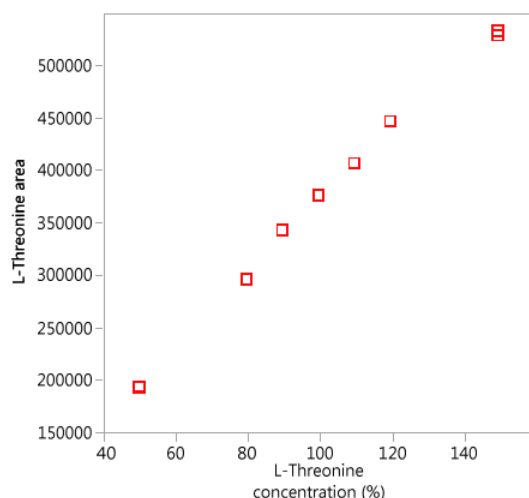
También para este analito se evaluó la existencia de una relación lineal entre la Concentración (%) y Área a través de la construcción de dos gráficos de dispersión, uno dirigido al caso donde el analito es el único componente de la muestra, y el otro cuando está contenido en una matriz compleja.

Similarmente, se observaron tres áreas diferentes para cada una de las siete concentraciones. En el primer caso el siguiente gráfico de dispersión revela una relación lineal casi perfecta,



3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Lo mismo corre para el segundo caso



Coefficiente de correlación de Pearson

Teniendo en cuenta la correlación revelada en las dos figuras anteriores, se determina el coeficiente de correlación de Pearson para ambos casos. Cuando el analito es el único componente de la muestra, $r = 0.9967$ y cuando está contenido en una matriz, $r = 0.9975$. Los dos coeficientes estimados se encuentran por arriba 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, se estimaron dos regresiones lineales, una cuando el analito es el único componente de la muestra,

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

Y otra cuando el analito está 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 , estimados fueron obtenidos del método de los mínimos cuadrados.

- Cuando el analito es el único componente de la muestra, se obtuvieron los siguientes resultados del ajuste de la línea recta de regresión,

	<i>Coefficients</i>	<i>Std. Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-590,127	7201,193	-0,082	0,936	-15662,397	14482,143
Conc. (%)	3720,008	69,327	53,659	0,000	3574,905	3865,112

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Cuando el analito está 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	29188,000	5800,638	5,032	0,000	17047,124	41328,876
Conc. (%)	3440,330	56,055	61,374	0,000	3323,006	3557,655

Los estimados son:

$$a_1 = -590.127, b_1 = 3720.008$$

$$a_2 = 29188.000, b_2 = 3440.330$$

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

Prueba C de Cochran

Como en los analitos anteriores, aquí también se evaluó la igualdad de varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado y se aplicó la prueba C de Cochran como se indica en la tabla debajo.

Cuando el analito es aislado en la muestra, la hipótesis de homocedasticidad no fue rechazada, $p = 0.067$. En este caso se puede decir que los estimados determinados por el método ordinario de los mínimos cuadrados son válidos. Cuando el analito es contenido en una matriz, la hipótesis de homocedasticidad fue rechazada, $p = 0.000$. Por lo tanto, se concluye, en este caso, que los estimados determinados por el método de los mínimos cuadrados no son válidos. Las siguientes tablas presentan los resultados de las pruebas.

- El analito es el único componente de la muestra

C (Observed value)	0,540
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,067
alfa	0,05

- El analito está contenido en una matriz compleja

C (Observed value)	0,898
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,000
alfa	0,05

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 en que el analito está contenido en una matriz compleja, lo cual conduce a la necesidad de, sólo en este caso, utilizar el método de los mínimos cuadrados pesados para re-estimar el intercepto y

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

la pendiente de la regresión lineal. Mediante este método se asignan diferentes pesos a las observaciones, cuando se determinan los estimados 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	7675,864	4229,467	1,815	0,085	-1176,512	16528,239
Conc. (%)	3683,189	40,915	90,020	0,000	3597,552	3768,826

Los estimados, cuando el analito es el único componente en la muestra, permanecen iguales:

$$a_1 = -590.127, b_1 = 3720.008$$

$$a_2 = 7675.864, b_2 = 3683.189$$

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 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 explicada por la regresión lineal estimada. En el caso del analito siendo 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	247539111729	1	247539111729	2879,241	0,000
Residual	1633501207	19	85973748		
Total	249172612936	20			

Regression Statistics

R Square	0,9934
Adjusted R Square	0,9931
Standard Error	9272,20
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 99.34% de la variabilidad en los datos.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Cuando el analito está contenido en una matriz compleja,

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	106299132158	1	106299132158	8103,561	0,000
Residual	249234077	19	13117583		
Total	106548366235	20			

Regression Statistics

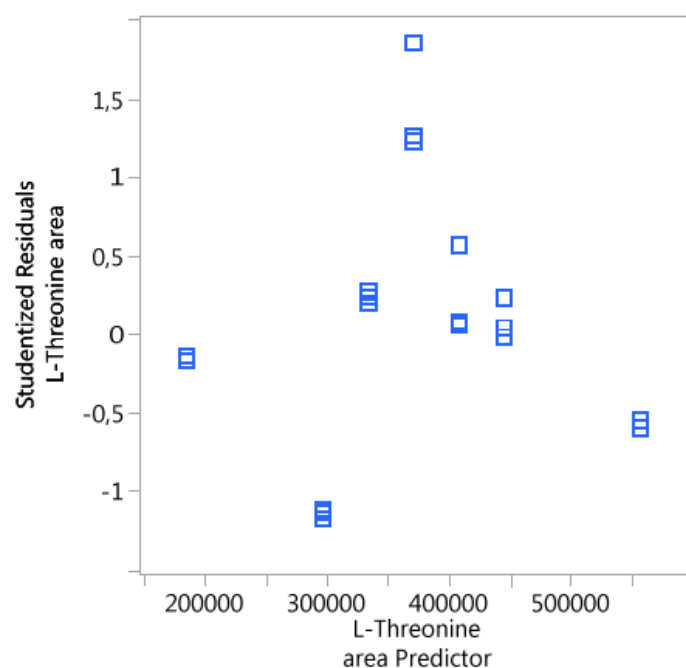
R Square	0,9977
Adjusted R Square	0,9975
Standard Error	3621,82
Observations	21

Por lo tanto, la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y la línea representa el 99.77% de la variabilidad en los datos.

Residuos

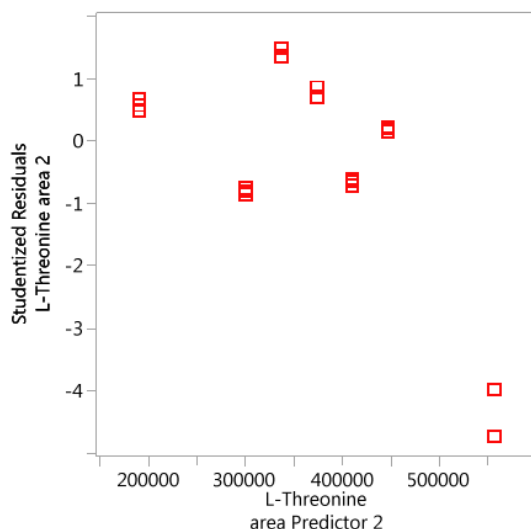
Los residuos son extremadamente útiles para controlar si un modelo de regresión lineal particular es apropiado para los datos. Por lo tanto debe construirse un gráfico de dispersión en el cual los residuos y los valores predictivos de Áreas se crucen. Para que la regresión lineal sea apropiada es necesario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

- El analito es el único componente en la muestra,



3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- El analito es contenido en una matriz compleja,



Como en los analitos anteriores, 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 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 obtenidos son:

$$b_1 = 3720.008 \quad b_2 = 3683.189$$

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>
1890017015,20	1882629844,80	1	38	0,149	0,702

Estos resultados muestran que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.702 > 0.05$; por lo tanto, no existe evidencia estadística al nivel de 5% para afirmar que la matriz tiene efecto significativo.

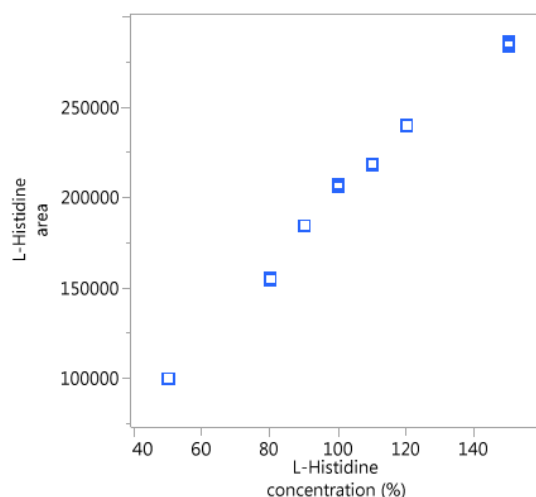
L – Histidina

Gráficos de dispersión

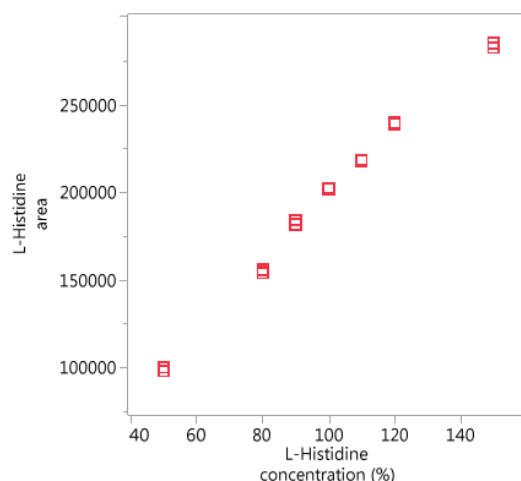
Para evaluar si hay una relación lineal entre la Concentración (%) y el Área del analito, se construyeron dos gráficos de dispersión, uno en el cual el analito es el único componente de la muestra, y otro en el cual el analito está en una matriz compleja con otros componentes. Se observaron tres áreas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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)



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



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, 0.9900, lo cual fue verificado. Cuando el analito es el único componente de la muestra, $r = 0.9949$; y cuando el analito es contenido en una matriz compleja, $r = 0.9959$.

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

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

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

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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Los interceptos, a_1 y a_2 , y las 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	10543,238	4540,115	2,320	0,032	1040,773	20045,911
Conc. (%)	1875,974	43,501	43,120	0,000	1784,927	1967,026

- 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	10524,722	4057,307	2,590	0,018	2032,681	19016,764
Conc. (%)	1869,255	38,978	47,960	0,000	1787,674	1950,836

Por lo tanto, tenemos:

$$a_1 = 10543.238, b_1 = 1875.974 \qquad a_2 = 10524.722, b_2 = 1859.255$$

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 C de Cochran para determinar si esta suposición es válida.

Prueba C de Cochran

Con el objetivo de evaluar la igualdad de las varianzas de la variable dependiente del modelo ajustado, Área, se aplicó la prueba C de Cochran.

En ambas situaciones, cuando el analito es aislado en la muestra, y cuando está inserto en una matriz, la hipótesis de homocedasticidad no fue rechazada, respectivamente $p = 0.159$ y $p = 0.734$.

Las siguientes tablas presentan los resultados de las pruebas:

- El analito es el único componente de la muestra,

C (Observed value)	0,468
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,159
alfa	0,05

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- El analito es contenido en una matriz compleja,

C (Observed value)	0,313
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,734
alfa	0,05

Por lo tanto, se concluye que los estimados determinados por el método ordinario de los mínimos cuadrados son válidos.

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo del análisis de varianza, ANOVA, 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 una de las líneas estimadas, 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 explicado por la regresión lineal.

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

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	63553648436	1	63553648436	1859,7	0,000
Residual	649299590	19	34173663		
Total	64202948026	20			

Regression Statistics

R Square	0,9899
Adjusted R Square	0,9894
Standard Error	5845,82
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 98.99% de la variabilidad en los datos.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

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

ANOVA

	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	62768355983	1	62768355983	2299,9	0,000
Residual	518544833	19	27291833		
Total	63286900817	20			

Regression Statistics

R Square	0,9918
Adjusted R Square	0,9914
Standard Error	5224,16
Observations	21

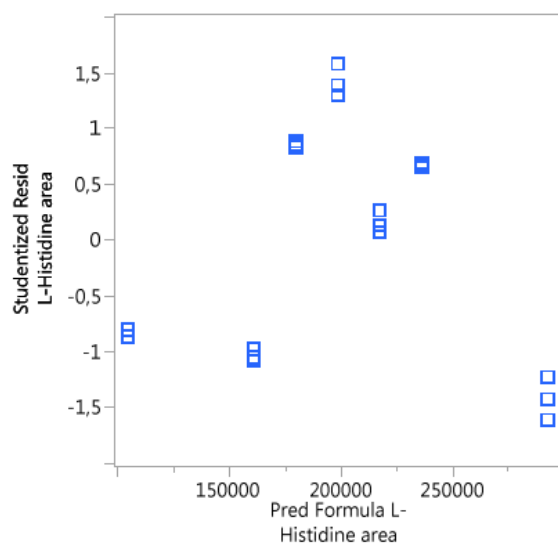
Esto conduce a la conclusión de que la hipótesis de pendiente cero es rechazada $p = 0.000 < 0.05$, y por otro lado, la línea puede explicar el 99.18% de la variabilidad de los datos.

Residuos

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

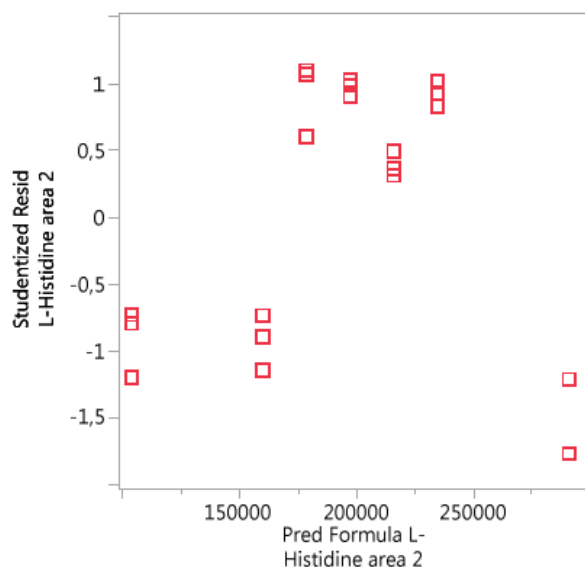
Los gráficos de dispersión para las dos regresiones lineales estimadas son:

- El analito es el único componente de la muestra,



3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- El analito está 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 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.

Los estimados obtenidos son:

$$b_1 = 1875.974 \text{ y } b_2 = 1869.255$$

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>
1168251237,00	1167844422,80	1	38	0,013	0,909

Así, de la prueba de Paralelismo F, se concluye que la igualdad de las pendientes de las regresiones lineales no es rechazada, $p = 0.909 > 0.005$; lo cual permite expresar que no hay evidencia estadística (al nivel 5%) para afirmar que la matriz tiene un efecto significativo.

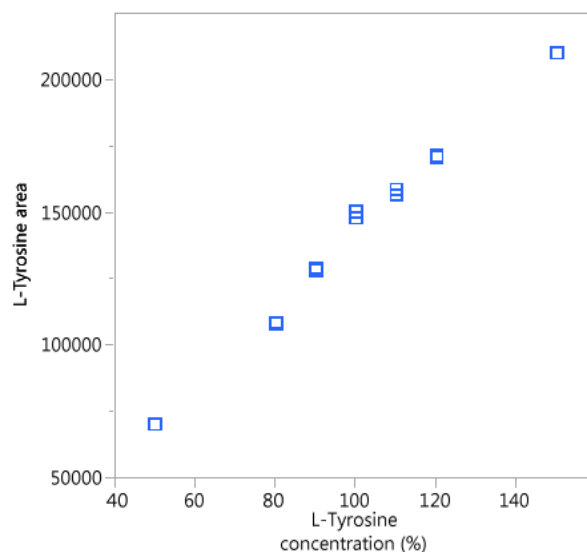
L-Tirosina

Gráficos de dispersión

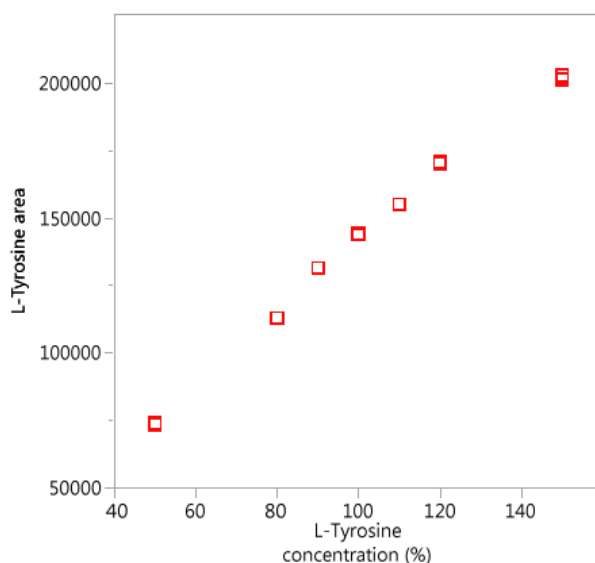
Similar a lo que fue hecho para los analitos anteriores, la existencia de una relación lineal entre Área y Concentración (%) fue evaluada a través de la construcción de dos gráficos de dispersión, donde uno está dirigido al caso donde el analito es el único componente de la muestra, y el otro cuando está contenido en una matriz compleja. Nuevamente, se observaron 3 áreas diferentes para cada una de las siete concentraciones.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Escenario del 1^{er} caso: el gráfico de dispersión revela una relación lineal casi perfecta,



Escenario del 2^{do} caso: también hay una relación lineal casi perfecta,



Coeficiente de correlación de Pearson

Teniendo en cuenta la correlación revelada en las dos figuras anteriores, se determinan los coeficientes de correlación de Pearson para ambos casos. Cuando el analito es el único componente de la muestra, $r = 0.9965$ y cuando está contenido en una matriz compleja, $r = 0.9971$. Los dos coeficientes estimados se encuentran por encima del valor mínimo aceptable, 0.990.

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

Como la correlación lineal entre las dos variables fue observada a través de 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 en la muestra,

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

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Y otra cuando el analito está 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 , estimados fueron obtenidos del método de los mínimos cuadrados.

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

- El analito es el único componente en 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	-158,349	2856,951	-0,055	0,956	-6138,016	5821,318
Conc. (%)	1417,897	27,355	51,834	0,000	1360,643	1475,152

- 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	11519,683	2387,116	4,826	0,000	6523,391	16515,974
Conc. (%)	1299,288	22,932	56,657	0,000	1251,290	1347,286

En breve,

$$a_1 = -158.39, b_1 = 1417.897 \quad a_2 = 11519.683, b_2 = 1299.288$$

Estos estimados asumen que el error en los valores de Concentración (%) es constante, por lo tanto existe homocedasticidad. Lo que significa que todos los puntos **Área x Concentración (%)** tienen igual peso en el cálculo de los estimados.

Prueba C de Cochran

La prueba C de Cochran debe ser aplicada para evaluar si la suposición de homogeneidad no es violada. Como en analitos anteriores esta prueba fue aplicada cuando:

- El analito es el único componente en la muestra,

C (Observed value)	0,525
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,081
alfa	0,05

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- Cuando el analito está contenido en una matriz compleja,

C (Observed value)	0,785
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,001
alfa	0,05

Como la prueba C de Cochran no rechaza la hipótesis de homogeneidad de las varianzas cuando el analito es el único componente en la muestra, $p = 0.081 > 0.05$, pero rechaza cuando el analito está contenido en una matriz compleja, $p = 0.001 < 0.05$.

Se concluye que los estimados determinados por el método ordinario de los mínimos cuadrados son válidos sólo para el primer caso. Para el segundo caso, los coeficientes debe estimarse nuevamente pero ahora con el método de los mínimos cuadrados pesados.

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

Utilizando la prueba C de Cochran se concluye que existe heterocedasticidad en el caso donde el analito está contenido en una matriz compleja, lo cual conduce a la necesidad de, sólo en este caso, utilizar el método de los mínimos cuadrados pesados para re-estimar el Intercepto y Pendiente de la regresión lineal. Mediante este método se asignan diferentes pesos a las observaciones, cuando se determinan los estimados 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	7764,491	2748,664	2,825	0,011	2011,472	13517,510
Conc. (%)	1358,258	29,372	46,243	0,000	1296,782	1419,734

Los estimados, cuando el analito es el único componente de la muestra, permanecen iguales:

$$a_1 = -158.349, b_1 = 1417.897 \quad a_2 = 7764.491, b_2 = 1358.258$$

ANOVA y el Coeficiente de Determinación (R^2)

El objetivo de estos análisis es evaluar la regresión lineal ajustada explica satisfactoriamente la relación entre Área y Concentración (%). En estos 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 , difiere 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. Esto es indicado en las siguientes tablas de ANOVA:

ANOVA	OLS method				
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	36356626768	1	36356626768	2686,712	0,000
Residual	257108290	19	13532015		
Total	36613735058	20			

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

ANOVA	WLS method				
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	9178947838	1	9178947838	2138,453	0,000
Residual	81554300	19	4292332		
Total	9260502138	20			

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

El valor de R^2 es 0.9930 para el caso donde el analito está aislado, significando que el 99.30% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea.

El valor de R^2 es 0.9912 considerando el otro caso, significando que el 99.12% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea:

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9930
Adjusted R Square	0,9926
Standard Error	3678,59
Observations	21

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9912
Adjusted R Square	0,9907
Standard Error	2071,79
Observations	21

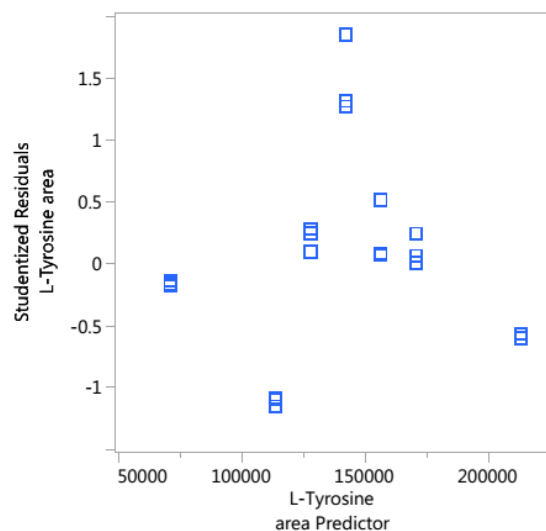
Residuos

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

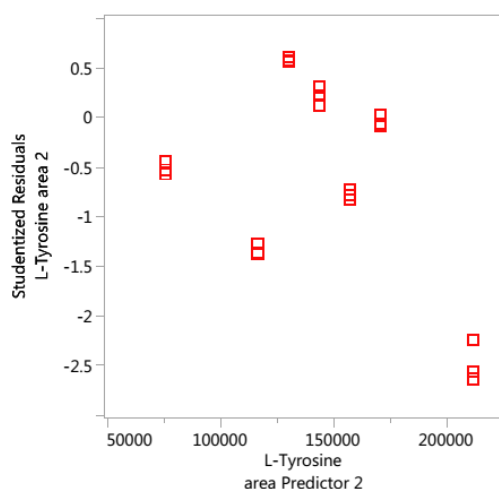
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

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

- El analito es el único componente de la muestra



- El analito es contenido en una matriz compleja,



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

Prueba de Paralelismo F

Como ya se ha mencionado, el propósito 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. Los estimados que se han encontrado son:

$$b_1 = 1417.897 \quad b_2 = 1358.258$$

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Los resultados de la prueba de Paralelismo F son:

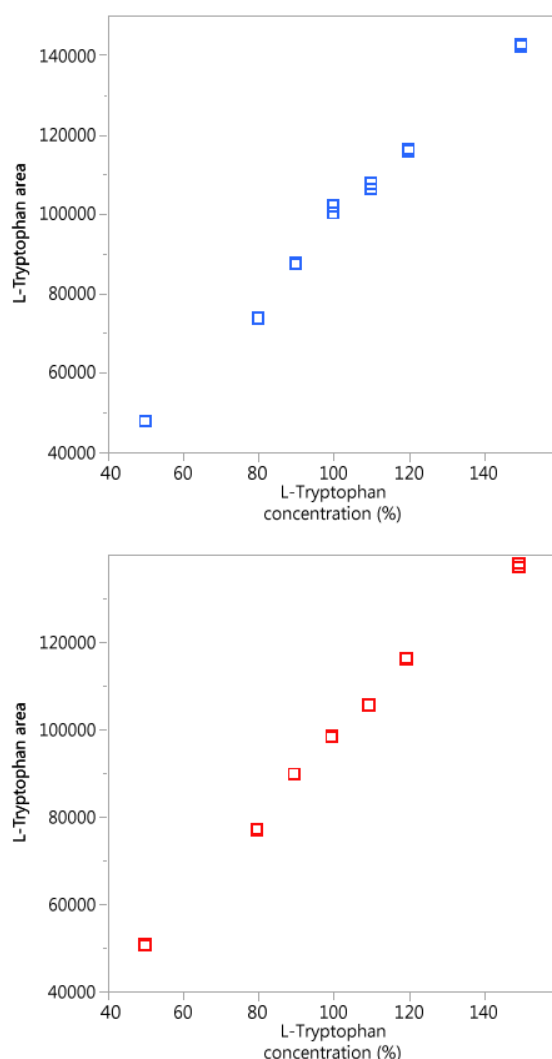
<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
352523208,89	338651246,96	1	38	1,557	0,220

Al 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, $p = 0.220 > 0.05$; lo que significa que no hay evidencia estadística para decir que la matriz tiene efecto significativo.

L-Triptofano

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



Arriba se puede ver que en ambos casos los gráficos de dispersión revelan una relación lineal casi perfecta.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Coefficiente 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: $r = 0.9966$

El analito es contenido en una matriz: $r = 0.9969$

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 ($r \geq 0.990$), 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 las pendientes, b_1 y b_2 , estimados fueron obtenidos por el método de los mínimos cuadrados.

En las dos tablas siguientes tenemos los resultados,

- El analito es el único componente en 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	300,857	1907,762	0,158	0,876	-3692,135	4293,850
Conc. (%)	965,503	18,364	52,575	0,000	927,067	1003,940

- 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	8476,944	1668,551	5,080	0,000	4984,628	11969,261
Conc. (%)	887,369	16,132	55,008	0,000	853,605	921,133

De donde se extrajeron los siguientes estimados:

$$a_1 = 300.875, b_1 = 965.503$$

$$a_2 = 8476.944, b_2 = 887.369$$

Los estimados obtenidos 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, la prueba C de Cochran debe ser aplicada para evaluar si la homogeneidad asumida no es violada.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Prueba C de Cochran

Como en analitos anteriores esta prueba fue aplicada cuando:

- El analito es el único componente de la muestra,

C (Observed value)	0,539
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,067
alfa	0,05

- El analito es contenido en una matriz compleja,

C (Observed value)	0,833
C (Critical value)	0,561
p-value (unilateral)	0,000
alfa	0,05

Como la prueba C de Cochran no rechaza la hipótesis de homogeneidad de varianzas cuando el analito es el único componente en la muestra, $p = 0.067 > 0.05$; pero sí rechaza cuando el analito está contenido en una matriz compleja, $p = 0.000 < 0.05$. Se concluye que los estimados encontrados por el método ordinario de los mínimos cuadrados son válidos sólo para el primer caso. Para el segundo caso, los coeficientes deben ser estimados nuevamente, pero ahora con el método de los Mínimos Cuadrados Pesados.

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 está contenido en una matriz compleja, lo cual conduce a la necesidad de, sólo 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	5424,208	1641,218	3,305	0,004	1989,099	8859,316
Conc. (%)	930,453	17,661	52,685	0,000	893,489	967,418

Los estimados, cuando el analito es el único componente de la muestra, permanecen iguales:

$$a_1 = 300.857, b_1 = 965.503$$

$$a_2 = 5424.208, b_2 = 930.453$$

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 estos 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 variabilidad de los datos observados que es correctamente explicada por la regresión lineal estimada.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

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

ANOVA	OLS method				
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	16679008705	1	16679008705	2764,17	0,000
Residual	114646044	19	6034002		
Total	16793654749	20			

ANOVA	WLS method				
	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regression	5957766750	1	5957766750	2775,679	0,000
Residual	40781941	19	2146418		
Total	5998548690	20			

Los estimados difieren significativamente de cero, $p = 0.000 < 0.05$, tanto en el caso del analito siendo el único componente de la muestra como cuando está 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.

El valor de R^2 para el caso en que el analito está aislado es 0.9932

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9932
Adjusted R Square	0,9928
Standard Error	2456,42
Observations	21

En el caso donde está contenido en una matriz es 0.9932

<i>Regression Statistics</i>	
R Square	0,9932
Adjusted R Square	0,9928
Standard Error	1465,07
Observations	21

Esto significa que, en el primer caso, el 99.32% de la variabilidad de los datos es explicada por la línea; mientras que en el segundo caso el porcentaje es 99.32%, el cual es un valor excepcional.

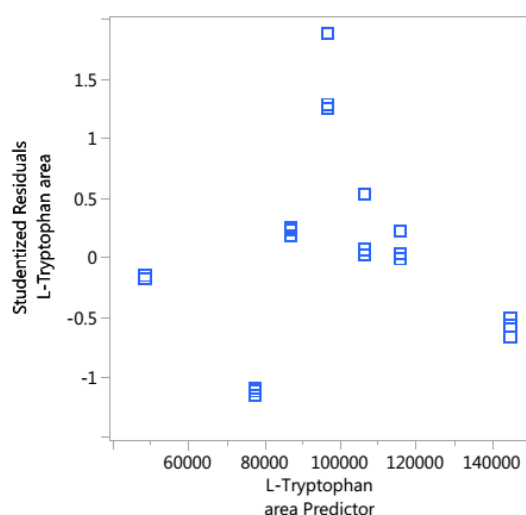
3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Residuos

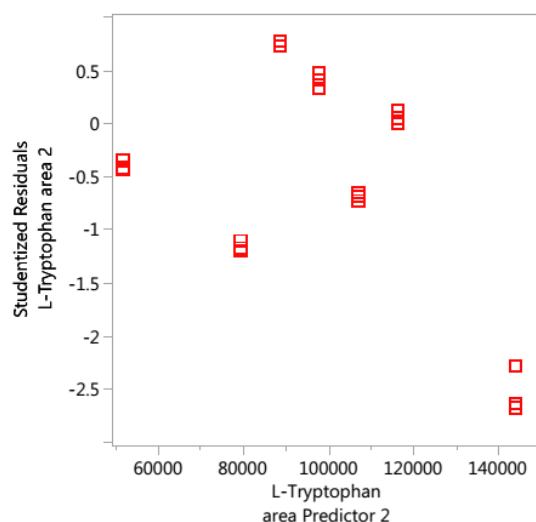
Los residuos permiten controlar la calidad del ajuste de un modelo de regresión lineal. Por lo tanto debe construirse un gráfico de dispersión en el cual los residuos y valores predictivos de Área se crucen. La regresión lineal está bien ajustada cuando el gráfico no produce un patrón marcado.

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

- El analito es el único componente en la muestra,



- El analito está 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 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 tiene efecto significativo.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Los estimados obtenidos anteriormente son:

$$b_1 = 965.503 \quad b_2 = 930.453$$

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

<i>Paralell Fit SSE</i>	<i>Full SSE</i>	<i>NDF</i>	<i>DDF</i>	<i>F Ratio</i>	<i>Prob > F</i>
161531778,21	155423052,21	1	38	1,494	0,229

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, $p = 0.229 > 0.05$; lo cual significa que no 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 mediciones 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 dos analitos no debe ser estadísticamente diferente (*Prueba t*)

- Acetato de L-Lisina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A1	96.3	96.0
A2	95.7	94.4
A3	96.0	96.7
A4	96.6	97.9
A5	95.7	96.9
A6	95.1	98.4
Average (%)	95.9	96.7
RSD (%)	0.5	1.5

Media entre analistas: 96.3%

RSD entre analistas: 1.2%

Prueba t

|t estadística| = -1.276024

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, el promedio entre los dos analistas no es estadísticamente diferente.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- L-Treonina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A1	100.5	101.3
A2	99.9	99.2
A3	100.4	101.8
A4	100.9	103.1
A5	100.1	101.8
A6	99.2	104.1
Average (%)	100.2	101.9
RSD (%)	0.6	1.6

Media entre analistas: 101.0%

RSD entre analistas: 1.5%

Prueba t

|t estadística| = -2.270574

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística ≤ t Crítica dos colas, el promedio entre los dos analistas no es estadísticamente diferente.

- L-Histidina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A1	101.6	101.4
A2	101.1	98.8
A3	101.3	101.6
A4	102.2	103.0
A5	101.3	101.7
A6	100.2	104.8
Average (%)	101.3	101.9
RSD (%)	0.7	1.9

Media entre analistas: 101.6%

RSD entre analistas: 1.4%

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)*Prueba t*

|t estadística| = -0.654394

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, el promedio entre los dos analistas no es estadísticamente diferente.

- L-Tirosina

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A1	101.2	101.8
A2	100.5	98.8
A3	101.0	102.0
A4	101.6	103.2
A5	100.8	101.7
A6	99.9	104.4
Average (%)	100.8	102.0
RSD (%)	0.6	1.8

Media entre analistas: 101.4%

RSD entre analistas: 1.4%

Prueba t

|t estadística| = -1.417509

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística $\leq$ t Crítica dos colas, el promedio entre los dos analistas no es estadísticamente diferente.

- L-Triptofano

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A1	99.8	101.4
A2	99.4	98.3
A3	99.7	101.4
A4	100.8	102.5

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Sample	Analyst 1: SMP Date: 12 Sep. 2016 Assay (%)	Analyst 2: JP Date: 09 Sep. 2016 Assay (%)
A5	99.6	100.9
A6	98.8	104.0
Average (%)	99.7	101.4
RSD (%)	0.7	1.8

Media entre analistas: 100.6%

RSD entre analistas: 1.6%

Prueba t

|t estadística| = -2.109573

t Crítica dos colas = 2.570582

t estadística ≤ t Crítica dos colas, el promedio entre los dos analistas no es estadísticamente diferente.

3.3.4.2 Repetitividad

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

- Acetato de L-Lisina

Sample	Assay (%)
A1	96.3
A2	95.7
A3	96.0
A4	96.6
A5	95.7
A6	95.1
Average (%)	95.9
RSD (%)	0.5

- L-Treonina

Sample	Assay (%)
A1	100.5
A2	99.9
A3	100.4
A4	100.9

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Sample	Assay (%)
A5	100.1
A6	99.2
Average (%)	100.2
RSD (%)	0.6

- L-Histidina

Sample	Assay (%)
A1	101.6
A2	101.1
A3	101.3
A4	102.2
A5	101.3
A6	100.2
Average (%)	101.3
RSD (%)	0.7

- L-Tirosina

Sample	Assay (%)
A1	101.2
A2	100.5
A3	101.0
A4	101.6
A5	100.8
A6	99.9
Average (%)	100.8
RSD (%)	0.6

- L-Triptófano

Sample	Assay (%)
A1	99.8
A2	99.4
A3	99.7

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Sample	Assay (%)
A4	100.8
A5	99.6
A6	98.8
Average (%)	99.7
RSD (%)	0.7

3.3.4.3 Repetitividad del instrumental

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

Injection	L-Lysine acetate Area	L-Threonine Area	L-Histidine Area
1	763549	361877	192693
2	765302	362105	189921
3	764886	361286	187231
4	763886	361033	184936
5	762549	360724	189203
6	763809	360890	189069
7	762690	360935	190933
8	762876	360700	188201
9	761655	360390	187243
10	761977	360834	185902
Average	763318	361077	188533
RSD (%)	0.2	0.2	1.2

Injection	L-Tyrosine Area	L-Tryptophan Area
1	140317	96570
2	140512	96583
3	140428	96567
4	140228	96470
5	140156	96391
6	140389	96580
7	140237	96479
8	140007	96405

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Injection	L-Tyrosine Area	L-Tryptophan Area
9	140049	96363
10	139982	96344
Average	140230	96475
RSD (%)	0.2	0.1

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%

- Acetato L-Lisina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	85.760	87.177	101.653
	85.760	87.898	102.493
	86.015	88.975	103.411
	Mean (%)		102.529
	RSD (%)		0.872
100	107.200	108.764	101.459
	107.200	106.153	99.023
	106.945	104.874	98.064
	Mean (%)		99.515
	RSD (%)		1.759
120	128.640	128.723	100.065
	128.895	130.012	100.866
	128.640	131.218	102.004
	Mean (%)		100.978
	RSD (%)		0.965

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)• L-Treonina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	80.257	81.727	101.831
	79.318	81.461	102.702
	80.257	82.590	102.907
	Mean (%)		102.480
	RSD (%)		0.557
100	99.500	101.907	102.419
	99.969	100.636	100.667
	99.500	99.475	99.974
	Mean (%)		101.020
	RSD (%)		1.247
120	119.682	119.317	99.695
	119.212	120.560	101.131
	118.743	121.754	102.536
	Mean (%)		101.121
	RSD (%)		1.404

• L-Histidina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	80.183	81.661	101.844
	80.183	81.296	101.388
	80.183	81.471	101.606
	Mean (%)		101.613
	RSD (%)		0.225
100	99.243	102.018	102.796
	99.900	101.963	102.066
	100.557	100.051	99.496
	Mean (%)		101.453
	RSD (%)		1.708
120	118.960	120.734	101.492
	119.617	122.192	102.152

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
	119.617	122.501	102.411
	Mean (%)		102.018
	RSD (%)		0.465

- L-Tirosina

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	79.920	80.890	101.213
	80.753	82.625	102.318
	80.753	81.722	101.262
	Mean (%)		101.598
	RSD (%)		0.615
100	99.900	101.224	101.325
	99.900	99.015	99.114
	100.733	98.398	97.683
	Mean (%)		99.374
	RSD (%)		1.846
120	120.713	118.455	98.130
	119.048	120.476	101.200
	120.713	122.175	101.212
	Mean (%)		100.181
	RSD (%)		1.773

- L-Triptófano

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	81.277	83.849	103.164
	80.193	82.498	102.874
	79.110	80.052	101.191
	Mean (%)		102.410
	RSD (%)		1.041
100	100.784	102.059	101.266

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
	99.700	98.573	98.870
	100.784	100.433	99.652
	Mean (%)		99.929
	RSD (%)		1.223
120	118.123	115.798	98.032
	119.207	119.239	100.028
	118.123	120.547	102.052
	Mean (%)		100.037
	RSD (%)		2.010

3.3.6 Robustez**3.3.6.1 Estabilidad de la muestra y soluciones estándar****→ Solución muestra**

- Acetato de L-Lisina

Time point	Area
0 hour	681650
12 hours	690651
24 hours	694196
Average (0–24 hours)	687923
RSD (0–24 hours)	1.3%

- L-Treonina

Time point	Area
0 hour	356592
12 hours	360635
24 hours	361900
Average (0–24 hours)	359246
RSD (0–24 hours)	1.0%

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

- L-Histidina

Time point	Area
0 hour	192852
12 hours	193174
24 hours	194972
Average (0–24 hours)	193912
RSD (0–24 hours)	0.8%

- L-Tirosina

Time point	Area
0 hour	136054
12 hours	137312
24 hours	138088
Average (0–24 hours)	137071
RSD (0–24 hours)	1.0%

- L-Triptófano

Time point	Area
0 hour	93920
12 hours	94911
24 hours	95317
Average (0–24 hours)	94619
RSD (0–24 hours)	1.0%

La solución muestra es estable durante 24 horas luego de la preparación.

➔ **Solución estándar**

- Acetato de L-Lisina

Time point	Area
0 hour	804077
12 hours	815964
24 hours	820028

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Time point	Area
Average (0–24 hours)	812053
RSD (0–24 hours)	1.4%

- L-Treonina

Time point	Area
0 hour	374904
12 hours	380972
24 hours	381808
Average (0–24 hours)	379228
RSD (0–24 hours)	1.0%

- L-Histidina

Time point	Area
0 hour	204535
12 hours	207455
24 hours	207181
Average (0–24 hours)	205858
RSD (0–24 hours)	0.9%

- L-Tirosina

Time point	Area
0 hour	142788
12 hours	144362
24 hours	145689
Average (0–24 hours)	144239
RSD (0–24 hours)	1.4%

- L-Triptófano

Time point	Area
0 hour	97819
12 hours	99421

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Time point	Area
24 hours	98809
Average (0–24 hours)	98314
RSD (0–24 hours)	0.7%

La solución muestra es estable durante 24 horas luego de la preparación.

3.3.6.2 Variación de temperatura de la columna

La temperatura de la columna fue modificada en el rango de 50°C a 60°C (55°C $\pm$ 5°C), determinando su influencia en los tiempos de retención, número de platos teóricos (N) y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

Variation of column temperature	55°C (method conditions)			50°C			60°C		
	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.
L-Lysine	7.350	1770587	10.945	7.349	1829936	12.050	7.303	1754821	10.200
L-Threonine	5.889	401234	48.405	5.955	587312	51.622	5.837	418494	49.492
L-Histidine	3.406	9712	28.409	3.875	25842	32.398	3.449	11568	28.944
L-Tyrosine	7.615	1441871	56.777	7.626	1732143	58.127	7.549	1447252	58.257
L-Tryptophan	8.659	10196398	56.777	8.663	8825815	58.127	8.644	8568785	58.257
Comment	-----			Not critical: slight variation of retention times and theoretical plates. Slight increase and resolution.			Not critical: slight variation of retention times, theoretical plates and resolution.		

3.3.6.3 Variación del lote de la columna

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

Variation of column batch	Column internal n° 0175/16			Column internal n° 0163/16		
	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.
L-Lysine acetate	7.350	1770587	10.945	7.264	1242470	8.730
L-Threonine	5.889	401234	48.405	5.724	444840	50.360
L-Histidine	3.406	9712	28.409	3.044	12364	37.473
L-Tyrosine	7.615	1441871	56.777	7.499	1219476	50.312

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Variation of column batch	Column internal n° 0175/16			Column internal n° 0163/16		
	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.
L-Tryptophan	8.659	10196398	56.777	8.636	3880515	50.312
Comment	-----			Not critical: slight variation of retention times, theoretical plates and resolution.		

3.3.6.4 Variación del caudal

El caudal fue modificado en el rango de 0.6 mL/min a 0.8 mL/min (0.7 mL/min $\pm$ 0.1 mL/min), determinando su influencia en los tiempos de retención, número teórico de platos (N) y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

Variation of the flow rate	0.7 mL/min (method conditions)			0.6 mL/min			0.8 mL/min		
	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.
L-Lysine acetate	7.350	1770587	10.945	7.528	1752852	11.857	7.178	1772184	10.325
L-Threonine	5.889	401234	48.405	6.213	571141	46.212	5.634	453643	54.744
L-Histidine	3.406	9712	28.409	4.003	14373	27.326	3.324	10714	28.702
L-Tyrosine	7.615	1441871	56.777	7.813	1666066	53.953	7.418	1551530	62.089
L-Tryptophan	8.659	10196398	56.777	8.814	8566856	53.953	8.538	8750615	62.089
Comment	-----			Not critical: slight increase of retention times. Slight variation of theoretical plates and resolution.			Not critical: slight decrease of retention times. Slight variation of theoretical plates and resolution.		

3.3.6.5 Variación de la proporción de agua en la fase móvil A

La porción de agua en la fase móvil A fue modificada en $\pm$ 2% (950 ml $\pm$ 19 ml) ajustando también la cantidad de AccQ-Tag Ultra Eluyente A (para obtener un total de 1000 mL de fase móvil A), determinando su influencia en los tiempos de retención, número teórico de platos (N) y resolución cuando se compara con las condiciones originales del método.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Variation of water proportion in mobile phase A	950 mL water + 50mL AccQ-Tag Ultra Eluent A (method conditions)			931 mL water + 69mL AccQ-Tag Ultra Eluent A			969 mL water + 31mL AccQ-Tag Ultra Eluent A		
	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.	rt (min)	N	Resol.
L-Lysine acetate	7.350	1770587	10.945	7.329	1868144	10.604	7.312	1750739	12.131
L-Threonine	5.889	401234	48.405	5.848	486386	52.783	5.936	523584	48.878
L-Histidine	3.406	9712	28.409	3.326	12364	32.947	3.825	23303	31.245
L-Tyrosine	7.615	1441871	56.777	7.575	1601769	59.748	7.595	1665414	59.173
L-Tryptophan	8.659	10196398	56.777	8.659	8834416	59.748	8.654	9045898	59.173
Comment	-----			Not critical: slight variation of retention times, theoretical plates and resolution.			Not critical: slight variation of retention times and theoretical plates. Slight increase of resolution.		

3.4 Análisis de los resultados**3.4.1 Ensayo de aminoácidos****3.4.1.1 Acetato de L-Lisina**

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como un componente simple en la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 53.6% a 160.8% El análisis estadístico demuestra la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de L-Lisina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 102.5%, 99.5% y 101.0% 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 dos analistas son respectivamente 96.3% y 1.2%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.2 L-Treonina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como un componente simple en la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 49.8% a 149.5%. El análisis estadístico demuestra la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de L-Treonina.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 102.5%, 101.0% y 101.1% 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 101.0% y 1.5%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.2.P.5.3 Validación de Procedimiento Analítico (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.4.1.3 L-Histidina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como un componente simple en la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 50.1% a 150.2%. El análisis estadístico demuestra la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de L-Histidina.

El porcentaje de recuperado medio obtenido en la prueba de exactitud es 101.6%, 101.5% y 102.0% 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 dos analistas con respectivamente 101.6% y 1,4%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.4 L-Tirosina

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como un componente simple en la muestra y en la matriz de muestra en el rango de 50.1% a 150.4%. El análisis estadístico demuestra la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de L-Tirosina.

El porcentaje de recuperado medio obtenido en la prueba de exactitud es 101.6%, 99.4% y 100.2% 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 101.4% y 1.4%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.1.5 L-Triptófano

La linealidad del método fue demostrada utilizando el analito como un componente simple de la muestra y en una matriz de muestra en el rango de 49.9% y 149.6%. El análisis estadístico demuestra la equivalencia de las regresiones lineales, probando que la matriz de muestra no interfiere en la cuantificación de L-Triptófano.

El porcentaje de recuperado medio obtenido en la prueba de exactitud es 102.4%, 99.9% y 100.0% para el nivel 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y RSD de los resultados entre los dos analistas son respectivamente 100.6% y 1,6%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.4.2 Robustez

La muestra y soluciones estándar son estables durante 24 horas luego de la preparación.

Las variaciones probadas en la temperatura de la columna, lote de columna, caudal y proporción de agua en la composición de la fase móvil A demuestran que éstas no son críticas cuando se comparan 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 tanto válido para realizar la determinación cuantitativa de Aminoácidos en Ketosteril tabletas recubiertas.