

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO QUÍMICO ANALÍTICO DE HPLC EN R**



**José José Torralvo Martínez**

**FUNDACION UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA  
BOGOTÁ D.C.**

**2017**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO QUÍMICO ANALÍTICO DE HPLC EN R**

**Químico**

**José José Torralvo Martínez**

**Trabajo de Grado para Optar por el Título de especialista en estadística aplicada**

**Director De Trabajo De Grado**

**Psicólogo**

**Especialista en medición y evaluación**

**Juan Carlos Borbón**

**Tutor – Empresa**

**Químico Farmacéutico**

**Luis José León**

**FUNDACION UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**ESPECIALIZACIÓN EN ESTADÍSTICA APLICADA**

**BOGOTÁ D.C.**

**2017**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

Informe de grado titulado “Validación de un método químico analítico de HPLC en R”

Realizado por el estudiante: José José Torralvo Martínez

Cumple con los requisitos exigidos por el departamento de ciencias básicas para optar el título de especialista en estadística aplicada y ha sido aprobado.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Firma del presidente del Jurado** \_\_\_\_\_

**Firma del Jurado** \_\_\_\_\_

**Firma del Jurado** \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia a Dios, por ser el autor de todo lo que soy.

A la Fundación Universitaria Los Libertadores y el programa de posgrado en estadística aplicada con todo el cuerpo de docentes y administrativos, por brindarme la oportunidad de formarme como profesional.

Agradezco al docente director Juan Carlos Borbón, quien fue mi director de trabajo; por su paciencia y dedicación en todo este proceso.

Del mismo modo al director técnico Luis José León por sus enseñanzas y confianza como codirector en este proyecto.

A la empresa Quasfar M&F S. A. por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones. Y en efecto a todo el personal analista del área de calidad, de esta empresa por compartirme sus conocimientos.

Sin dudar agradezco a mi familia por brindarme la motivación necesaria para afrontar cada difícil situación; por ayudarme a formar y lograr esta meta que hoy se cumple.

Es la oportunidad para agradecer a grandes personas con las que viví mis mejores momentos de estudiante; José, Aldrin, Adriana, Yeimi, Mafe, Viviana, Camilo, Nelson, Aníbal y el resto de mis compañeros. Los cuales en algún momento me regalaron fuerzas cuando ya no tenía combustible para continuar.

Y finalmente a todas las personas con las que viaje en este tren de felicidad, alegría y tristezas, y que de alguna u otra forma hicieron posible que yo cumpliera el sueño de ser especialista.

Mil gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pag.</b>
<b>DEFINICIONES</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1.1 PLANTEAMIENTO PROBLEMA	15
1.2 JUSTIFICACIÓN	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>18</b>
3.1 ESPECIFICIDAD - SELECTIVIDAD	20
3.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA	21
3.2.1 Repetibilidad	21
3.2.2 Reproducibilidad (presión intermedia)	22
3.3 EXACTITUD	22
3.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA Y LINEALIDAD DEL MÉTODO	24
3.5 LIMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	30
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
4.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE ESTÁNDAR	32
4.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE PLACEBO	32
4.3 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES	33
4.4 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES CON PLACEBO ENRIQUECIDO	33
4.5 PLACEBO	33
4.6 ESPECIFICIDAD-SELECTIVIDAD	34
4.6.1 Hidrólisis ácida	34
4.6.2 Hidrólisis alcalina	34
4.6.3 Oxidación	34
4.6.4 Termólisis	34
4.6.5 Fotólisis	34
4.7 PRECISIÓN	35
4.7.1 Repetibilidad	35
4.7.2 Repetibilidad del método	35
4.7.3 Precisión intermedia	35
4.8 EXACTITUD	35
4.9 LINEALIDAD DEL SISTEMA	35
4.10 LINEALIDAD DEL MÉTODO	35
4.11 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	36
<b>5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>40</b>
6.1. ESPECIFICIDAD-SELECTIVIDAD	40
6.1.1. Especificidad para control de calidad	40
6.1.2. Especificidad-selectividad método indicador de estabilidad	41
6.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA	42
6.2.1. Determinación del t experimental	42

6.3. EXACTITUD	43
6.3.1. Determinación del t experimental	43
6.3.2. Test de Cochram	44
6.4. LINEALIDAD DEL SISTEMA	45
6.4.1. Rango de concentración	45
6.4.2. Test para el coeficiente de correlación	47
6.4.3. Test para la pendiente y test de convergencia al origen	47
6.4.4. Análisis de varianza para la regresión y prueba de normalidad	48
6.4.5. Test de Shapiro-Wilk	50
6.4.6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto	51
6.4.7. Test de Breusch-Pagan	51
6.4.8. Test de Durbin-Watson	51
6.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO	52
6.5.1. Rango de concentración	52
6.5.2. Test para el coeficiente de correlación	54
6.5.3. Test para la pendiente y test de convergencia al origen	55
6.5.4. Análisis de varianza para la regresión y prueba de normalidad	56
6.5.5. Test de Shapiro-Wilk	58
6.5.6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto	58
6.5.7. Test de Breusch-Pagan	58
6.5.8. Test de Durbin-Watson	59
6.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN TEÓRICOS	59
6.7. PRECISIÓN INTERMEDIA	60
6.7.1. Precisión intermedia analista 1 - día 1	60
6.7.2. Precisión intermedia analista 2 - día 2	61
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE ECUACIONES

	<b>Pag.</b>
<b>Ecuación 1:</b> Ecuación general de una regresión lineal de primer orden.	25
<b>Ecuación 2:</b> Ecuación del límite de cuantificación.	30
<b>Ecuación 3:</b> Ecuación del límite de detección.	30
<b>Ecuación 4:</b> Ecuación de la linealidad del sistema.	46
<b>Ecuación 5:</b> Ecuación de la linealidad del método.	53
<b>Ecuación 6:</b> Ecuación de la recuperación de la linealidad del método.	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1:</b> Equipos.	31
<b>Tabla 2:</b> Reactivos y materiales de referencia.	32
<b>Tabla 3:</b> Materiales.	32
<b>Tabla 4:</b> Preparación de los estándares.	33
<b>Tabla 5:</b> Parámetros químicos y su determinación estadística.	37-39



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	<b>Pag.</b>
<b>Grafico 1:</b> Curva de calibrado de la linealidad del sistema.	46
<b>Grafico 2:</b> Residuales de la linealidad del sistema.	49
<b>Grafico 3:</b> Q-Q Plot de la linealidad del sistema.	50
<b>Grafico 4:</b> Curva de calibrado de la linealidad del método.	54
<b>Grafico 5:</b> Residuales de la linealidad del método.	57
<b>Grafico 6:</b> Q-Q Plot de la linealidad del método.	57

## DEFINICIONES

**MESURANDO:** Magnitud particular sometida a medición.

**CONCENTRACIÓN:** Concepto utilizado para establecer la cantidad química de un principio activo presente en una matriz o solución de interés, la más frecuente en la industria farmacéutica es (mg/mL).

**MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC):** Son controles o patrones utilizados para comprobar la calidad y la trazabilidad al validar los métodos de medición analíticos, o para la calibración de los instrumentos como referencia para una unidad de medida.

**PRINCIPIO ACTIVO:** Componente de interés que porta las cualidades farmacológicas presentes en una sustancia. El principio activo de un fármaco es aquel que permite prevenir, tratar o curar una enfermedad u otro tipo de trastorno de salud.

**ESTÁNDAR:** Es una preparación a partir de un material de referencia certificado que contiene una concentración conocida de un principio activo o elemento específico.

**PLACEBO:** Mezcla de todos los componentes y/o excipientes de la formulación exceptuando el principio activo para el cual se está validando el método analítico.

**PLACEBO ENRIQUECIDO:** Muestras de placebo a las cuales se les adiciona cantidades conocidas del principio activo para el cual se está validando el método analítico. Durante todo este procedimiento, al preparar el placebo enriquecido, se mantiene constante la cantidad de los excipientes. Esta cantidad será la correspondiente al 100% de principio activo.

**RANGO:** Intervalo comprendido entre la concentración superior e inferior del principio activo evaluado para el cual se ha demostrado precisión, exactitud y linealidad.

**SENSIBILIDAD:** Propiedad del método analítico que mide la variación de la respuesta debida a pequeños cambios en la concentración del analito, para métodos cuantitativos la sensibilidad está dada por la pendiente de la curva de calibración.

**ROBUSTEZ:** Capacidad del método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas

variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de la estabilidad del método durante su empleo en rutina.

**CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC):** Técnica o método químico instrumental utilizado para separar los componentes o principios activos de una mezcla en una matriz de interés mediante un equipo.

## RESUMEN

En este trabajo se pretende acercar posiciones entre químicos y estadísticos mediante un lenguaje accesible para ambos en la utilización de la estadística y especialmente el software R en la validación de métodos químicos por HPLC en la valoración de un principio activo como prueba de libre elección diferente al microsoft office excel, el cual debido a su fácil acceso y manejo no requiere de una alta complejidad de uso, pero aun así este se queda corto como software estadístico para llevar a cabo pruebas más robustas que requieren conocimientos más profundos de estadística y que en el software R resultan más fáciles.

El procedimiento de validación llevado a cabo para la valoración de un principio activo está sujeto en parte a los lineamientos establecidos en la guía técnica EURACHEM (2005) y de esta forma hace confiable el diseño de validación ante cualquier auditoria, ya sea interna o externa. Para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos por HPLC ( Magnusson & Örnemark, 2014).

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de mayor importancia de los laboratorios farmacéuticos colombianos es generar un servicio de análisis confiable y con la mejor calidad en la valoración de un principio activo, lo cual involucra la investigación y el conocimiento de la evolución, la composición y la dinámica del proceso, así como la identificación y el monitoreo de las diferentes etapas sujetas al mismo, con el propósito de que no haya amenazas naturales-ambientales y de salud, que restrinjan su desarrollo en el territorio colombiano. Todo esto es posible gracias a la validación de métodos químicos analíticos que es una práctica muy frecuente en los laboratorios de control de calidad y farmacéuticos en Colombia que buscan replicar y adecuar condiciones químicas bajo un soporte estadístico para la valoración e identificación de un principio activo en sus instalaciones, las cuales fueron realizadas con anterioridad en condiciones diferentes de espacio, temperatura, presión, humedad, equipos, analistas, entre otros (Sancho, Sanchez, Dorantes, & Suarez, 2016).

Es el soporte estadístico y en especial R el que hace que todo esto sea posible debido a que es un lenguaje que permite al usuario escribir códigos de manera eficiente. Al ser un lenguaje de “scripts” permite una reproducción y documentación de actividades mucho más sencilla que programas de “pinchar” como Excel. Además, obliga a pensar. De igual manera, al manejar “scripts” y tener una historia en memoria de todos los comandos empleados, es mucho más difícil cometer errores. R tiene miles de paquetes (packages en inglés) que permiten extensiones de todo tipo. Entre esos paquetes existen muchos de gráficos, que permiten dibujar gráficos preciosos. Al ser un proyecto de código abierto, han participado en él mismo estadísticos y científicos de primera línea, lo que ha generado una calidad del resultado mucho más alta que el que jamás hubiera podido conseguir una empresa comercial y la implementación de los más recientes métodos estadísticos que están explotando. Hay decenas de libros, cursos y demás medios para aprender a manejarlo, muchos de ellos gratuitos. Es un lenguaje muy elegante, explícitamente orientado a objetos y con una fuerte estructura de programación funcional que Interactúa de manera sencilla con C<sup>++</sup>. Excepto por algunas partes del diseño (como el tratamiento de las matrices), su sintaxis es intuitiva y bonita especialmente indicada para el análisis estadístico (Maroto, Jordi, Boqué, & Xavier, 1999).

A diferencia de la mayoría de los programas que solemos utilizar en nuestros ordenadores, que tienen interfaces tipo ventana, R es libre y de fácil acceso manejado a través de una consola en la que se introduce código propio de su lenguaje para obtener los resultados estadísticos deseados lo cual lo hace confiable, rápido, amigable con el usuario es decir de fácil manejo, manipulación de datos buena, calidad de gráficos y procesos excelente, robusto, se puede acceder a su código fuente y es excelente en los diversos test estadísticos necesarios para validar los parámetros químicos de calidad que al menos deben verificarse para un principio activo por HPLC como lo son la especificidad-Selectividad, precisión del sistema, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación de los resultados obtenidos por un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano (Maroto, Jordi, Boqué, & Xavier, 1999).

Sabiendo que hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados estadísticamente fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan, cualidad que tiene R a la hora de determinar un estadístico por su fácil interpretación y análisis (Social, 2013). La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar que los métodos analíticos proporcionan parámetros químicos y resultados fiables todo gracias a R como herramienta de uso estadístico. (Freijo, 2013).

## 1.1 PLANTEAMIENTO PROBLEMA

Es sabido que existen en el mercado distintos paquetes de softwares estadísticos como SPSS, Statgraphics, Minitab, Statistic, SAS y S-Plus, que cubren todas las necesidades de cualquier usuario de técnicas estadísticas, básicas o avanzadas y que tienen un costo establecido. Frente a estas opciones, en los últimos años R ha surgido con fuerza como alternativa de software libre en muy distintos ambientes docentes y de investigación. Con ello no quiero decir que esté en contra de que determinadas empresas comercialicen paquetes de software estadístico, sino que me tranquiliza que existan alternativas no económicas a estos paquetes estadístico que permitan decidir en libertad si quiero comprar o no un softwares estadísticos (Foundation, 2016)

Por tales razones y variedades de softwares estadísticos será que R es la mejor herramienta para ser utilizada en la validación de los parámetros químicos de un principio activo por HPLC para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano.

Como se sabe la accesibilidad de R no tiene costo y este al ser un software estadístico me permite determinar, graficar y calcular regresiones lineales de primer orden, coeficiente de correlación de Pearson, pendientes, interceptó, intervalos de confianza, test de Student, test de Cochran, ANOVA, Q-Q plot, test de Shapiro – Wilk, test de Breusch-Pagan, cálculos matemáticos y estadísticos clásicos, los cuales son el soporte y fundamento para la determinación de los parámetros químicos de especificidad-selectividad, precisión del sistema, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación de un principio activo por HPLC para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano (Freijo, 2013).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

La realización de este proyecto es un aporte de conocimiento interno para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano, con importantes implicaciones en la línea de control de calidad de valoración de un principio activo por HPLC, permitiendo validar un producto con una mayor certeza en su composición química.

Todo esto tiene como fin validar un método químico en R para plantear y desarrollar un script en R de fácil ejecución para realizar el análisis estadístico clásico y pertinente de una validación e identificación de un principio activo por HPLC en un laboratorio farmacéutico colombiano, el cual es más robusto a la hora de hacerlo por microsoft office excel. Obteniendo un mayor alcance en pruebas o test estadísticos, partiendo del hecho de que esta se lleva a cabo en su gran mayoría bajo concentraciones analíticas de miligramo sobre mililitros (mg/mL).

Además que hoy en día los laboratorios según la norma ISO/IEC 17025; deben validar todos los métodos que se utilicen en el laboratorio, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas, desarrollados por otros laboratorios o los métodos de referencias los cuales no es necesario que el laboratorio realice una validación completa. Asimismo, el laboratorio debe validar todo el procedimiento analítico teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y de matrices de las muestras de rutina (ISO, 2005).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Validación de un método químico analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la identificación y valoración de un principio activo en R para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los parámetros químico analítico de HPLC para la identificación y valoración de un principio activo establecido por un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano en R.
- Validar los parámetros estadísticos establecidos por un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano como son especificidad-selectividad, precisión del sistema, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación.

### 3. MARCO TEÓRICO

La validación en el mundo de la química en un método analítico cuantitativo, se realiza con el propósito de garantizar la veracidad de los resultados que se obtengan de los análisis. Para garantizarlos se han establecido parámetros que aporten información estadística, ayudando a concluir si el método analítico es válido o no. En la actualidad la normalización y el control de calidad de los procesos ha tenido un auge en todos los sectores empresariales, entes autorizados certifican y avalan sus procesos aportando a las empresas garantía en sus resultados. En los laboratorios de ensayo y farmacéuticos se generó la necesidad de cumplir con los reglamentos nacionales e implementar sistemas de gestión de calidad como lo dicta la Norma ISO 17025, la cual solicita dentro de sus requisitos técnicos el uso de métodos validados (ISO, 2005).

Es por esto que de acuerdo a la Norma ISO 8502:1994, validación es la confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. De acuerdo a la Guía EURACHEM (2005), para químicos consiste en definir una necesidad analítica para confirmar que el método utilizado tiene la capacidad de desempeño de acuerdo a la aplicación (Magnusson & Örnemark, 2014).

En el proceso de validación está implícito que el equipo, reactivos y materiales se encuentran en especificaciones, además de estar calibrados, en el caso de los equipos. El analista que realice el estudio deberá ser técnicamente competente y con los conocimientos suficientes para tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones que realice durante el estudio. Todo esto con el propósito de que si un cliente pide un trabajo analítico a un laboratorio, se presupone que el laboratorio es técnicamente competente, con la experiencia y conocimientos para realizar el trabajo. Regularmente el cliente no posee los conocimientos que el laboratorio posee, él espera confiar en los resultados reportados y por lo general sólo los cuestiona cuando surge una controversia. De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza del cliente proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica y estadística del problema y proporcionando resultados que han demostrado ser adecuados a su propósito. Esto lleva implícito que las pruebas realizadas son apropiadas para la parte analítica del problema que el cliente desea resolver y que el informe final presenta los datos analíticos de tal manera que el cliente pueda entenderlos fácilmente y sacar conclusiones apropiadas (Administration, Analytical Procedures and Methods Validation for drugs and Biologics, 2005).

Es por estas razones que las validaciones de los métodos químicos permiten a los químicos demostrar que el método propuesto es adecuado para la aplicación analítica deseada y que la capacidad del método cumple con los estudios experimentales y documentales estadísticamente. Fundamentándose en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezca el método analítico. La clasificación de las validaciones de principios activos tienen las siguientes categorías (EMEA, 1995):

**Categoría I:** Métodos de Cuantificación de fármacos o medicamentos, incluyendo agentes de preservación.

**Categoría II:** Métodos de detección y/o cuantificación los productos de degradación y/o impurezas de un producto, incluye los ensayos cuantitativos y ensayos límite.

**Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de características específicas de la forma farmacéutica, como por ejemplo, disolución, etc.

**Categoría IV:** Pruebas de identificación.

Las etapas en la validación de metodologías analíticas independiente de la categoría de cualquier método analítico deben seguir los siguientes pasos:

- Seleccionar los materiales de referencia (MRC), considerando la composición y los tenores de los elementos presentes en las muestras.
- Recopilar y revisar documentación histórica de los procedimientos, incluyendo posibles interferencias, su eliminación y datos de calidad.
- Asegurar el buen funcionamiento de equipos, instalaciones seguras y adecuado entrenamiento del personal participante.
- Optimizar las condiciones de operación, aplicación del método para diferentes tipos de muestras, chequeo de blancos, chequeo apropiado de muestras, etc.
- Determinar parámetros estadísticos. Sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud, incertidumbre y robustez.
- Hallar las desviaciones del método.
- Tratamiento estadístico de datos generados.
- Interpretar resultados (Administration, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996).

Los parámetros estadísticos definidos y requeridos en estos momentos por la USP vigente y los laboratorios de ciencias farmacéuticas colombianos según la categoría del método I y para este trabajo son especificidad-selectividad del método, precisión del sistema, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación. Todos estos parámetros químicos son determinados estadísticamente gracias al Software R inicialmente diseñado por Robert Gentleman y Ross Ihaka, miembros del departamento de Estadística de la Universidad de Auckland, en Nueva Zelanda, del cual se conoce que es un lenguaje de programación especialmente indicado para el análisis estadístico (Convention, 2011).

### **3.1 ESPECIFICIDAD - SELECTIVIDAD**

La especificidad-selectividad es la capacidad que tiene el método analítico para obtener una respuesta a la sustancia de interés en forma inequívoca y no a otros componentes de la muestra. Indicando el grado de interferencia o la ausencia de estos en el análisis de muestras complejas. Estas interferencias pueden ser debidas a excipientes o a productos de degradación de algunos de los componentes del producto. Dependiendo de la utilización del método, es posible que solo interese demostrar que no hay interferencia debida a excipientes u otros activos presentes en la formulación (Especificidad para el control de la calidad) o ser más exigentes con el método y que además no haya interferencia debida a productos de degradación (Especificidad para la estabilidad) (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

La selectividad se aplica a métodos validados por cromatografía, puesto que proporciona respuestas para un número de compuestos químicos, que pueden o no distinguirse. Si la respuesta del analito de interés se distingue se dice que el método es selectivo (León, 2015).

La especificidad/selectividad debe ser aplicada a diferentes niveles y debe asegurar la identidad, la pureza y la valoración. Estadísticamente este parámetro es una relación de áreas en la cual se evidencian degradaciones mayores al 10,0% en la respuesta instrumental del estándar de referencia al 100,0% sometido a condiciones de estrés establecidas (León, 2015).

## 3.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Es el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar relativa (RSD) de los resultados, cuyo valor debe ser menor o igual al 2,0% para análisis por HPLC. Esta a su vez está compuesta por repetibilidad y reproducibilidad (precisión intermedia) (León, 2015).

### 3.2.1 Repetibilidad

Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes y/o desviación estándar obtenida al analizar una misma muestra varias veces, en un periodo de tiempo corto bajo las mismas condiciones, sin cambiar de procedimiento, objeto, analista, equipo de medida, reactivos o lugar (León, 2015).

Estadísticamente el parámetro de repetibilidad expresado como precisión del sistema se caracteriza por tener una prueba de test de Student desarrollada en 1899 por el químico inglés William Sealey Gosset, la cual es empleada para contrastar la hipótesis sobre medias en poblaciones pequeñas con distribución normal para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizando una estimación de la desviación típica en lugar del valor real (UPTC, 2017).

Todo lo anterior se determina con unos intervalos de confianza superior e inferior al 95,0% de confianza para el promedio sucesivo de una serie de muestras o estándares analizados varias veces, en la cual el objetivo es rechazar la hipótesis nula y que el método analítico validado es sensible a una concentración de mg/mL específica con un RSD menor al 1,5%.

Para el test de Student se calcula:

$$H_0: \mu = 0$$

$$H_a: \mu \neq 0$$

### **3.2.2 Reproducibilidad (presión intermedia)**

Es la precisión expresada como la concordancia obtenida y/o desviación estándar al analizar varias veces la muestra en el mismo laboratorio en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como el equipo, reactivos o analistas (León, 2015).

Estadísticamente el parámetro de reproducibilidad expresado como precisión intermedia se caracteriza por tener una estadística clásica de promedio y desviación estándar para el promedio de unas seis muestras analizadas, en la cual el objetivo es que el método analítico validado es sensible y específico a una concentración de mg/mL con un RSD menor al 2,0% (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

### **3.3 EXACTITUD**

La exactitud da cuenta de la proximidad o concordancia entre el resultado o datos obtenido por un método y el valor “real” considerado como verdadero o de referencia (100,0%). Como se trata de un parámetro cualitativo (un método será muy o poco exacto) para describir el error asociado a un resultado, hace falta un parámetro que permita medir la exactitud cuantitativamente. Este parámetro es el error que, según la guía para validación de métodos de la EURACHEM, se divide en dos componentes, la veracidad y la precisión. La veracidad es un parámetro que expresa la proximidad de la media de una serie de resultados obtenidos con el método al valor real. Generalmente se expresa en términos de error, definido como la diferencia entre el resultado de medida y el valor real. La precisión da cuenta de la proximidad entre sí de esta serie de resultados (Magnusson & Örnemark, 2014).

Estadísticamente el parámetro se caracteriza por tener un test de Student y un test no paramétrico llamado Cochran para tres grupos pequeños de concentraciones de tres muestras cada uno, con el objetivo de analizar la recuperación de concentraciones de mg/mL conocidas con respecto al 60,0%, 100,0% y 140,0% de la concentración de interés a validar para un principio activo. Si los grupos de concentraciones que se tienen son de tamaños distintos, deberíamos aplicar una prueba distinta como la de Bartlett, Levene o F-Max de Hartley con el propósito de establecer la misma hipótesis (Mongay, 2011).

En el test de Student se evalúa la veracidad con el objetivo de no rechazar la hipótesis nula y que el método analítico validado es sensible y específico en la recuperación de un principio activo en los grupos de concentración de mg/mL al 60,0%, 100,0% y 140,0% con una confianza del 95,0% y RSD menor al 2,0% (UPTC, 2017).

Para el test de Student se calcula:

$$H_0: \%R = 100,0 \%$$

$$H_a: \%R \neq 100,0 \%$$

$$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$$

(No existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad de analito añadido).

En el test de Cochran se evalúa la precisión, la cual permite examinar la homogeneidad de K varianzas entre poblaciones normales, pero se ajusta al caso de que todas las clases o grupos sean de igual tamaño (con v grados de libertad para cada clase), esto resulta útil para detectar si alguna varianza es mucho mayor que las restantes. La hipótesis nula es que las muestras tienen la misma varianza en cada grupo, cuando en realidad es cierto (Mongay, 2011).

Para el test de Cochran se calcula:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$$

$$H_a: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \neq \sigma_3^2$$

$$G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}(3,3)$$

$$G_{\text{exp}} = \frac{\text{el mayor } s_k^2}{\sum_{k=1}^k s_k^2}$$

Y se compara con el valor tabulado G a, K, v. Las varianzas son comparables si  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}(3,3)$ .

Con el objetivo de no rechazar la hipótesis nula y que el método analítico validado presenta una varianza homogénea en la recuperación de un principio activo en los grupos de concentración de mg/mL al 60,0%, 100,0% y 140,0% con una confianza del 95,0%.

### 3.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA Y LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad es una propiedad del método analítico dentro de un rango dado de concentraciones específicas, de obtener respuestas instrumentales que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. La linealidad se evalúa en el rango comprendido entre el 60,0% y 140,0%, que cubre los rangos aconsejados para ensayos de valoración y uniformidad (León, 2015). Para determinar el rango lineal se puede realizar una gráfica de concentración versus respuesta, donde la respuesta en el caso de cromatografía corresponde al área identificada. La función determinada por la regresión de la gráfica se conoce como función respuesta o recta de calibrado, luego de establecido el rango, se determina la curva de calibración, que incluirá los valores analizados desde el valor cero ( Magnusson & Örnemark, 2014).

Estadísticamente la linealidad del sistema y método se caracterizan por ser una regresión lineal de primer orden, las cuales se les valida sus supuestos como modelo de regresión simple con una confianza del 95,0%, demostrando que el método químico validado para el principio activo presenta regresión en un rango del 60,0% al 140,0% de la concentración de mg/mL validada y que puede ser usado para el control de calidad de productos terminados (Madrid, 2017).

Para el análisis de regresión de la linealidad del sistema y método se pueden establecer básicamente dos pasos (Molina, 2016):

- Paso 1. Estimar los parámetros del modelo de regresión. Este proceso es llamado ajuste del modelo.
- Paso 2. Chequear qué tan bueno es el modelo ajustado. Puede indicar si el modelo es razonable o si el ajuste original debe ser modificado.

Y se pueden distinguir dos tipos de variables (Berrendero, 2011):

- Variable predictora X (Explicativa, de entrada, represora o independiente), la cual expresa químicamente la concentración en mg/mL validada.
- Variable respuesta Y (Explicada, de salida o dependiente), la cual expresa químicamente la respuesta instrumental obtenida por la concentración en mg/mL validada.



De manera general la linealidad del sistema y método se caracteriza por presentar la siguiente ecuación (Molina, 2016):

$$Y = \beta_1 + \beta_2 X + \varepsilon_{ij}$$

**Ecuación 1:** Ecuación general de una regresión lineal de primer orden.

$\beta_1$  = Intercepto.

$\beta_2$  = Pendiente.

$\varepsilon_{ij}$  = Error.

$R$  = Coeficiente de correlación de pearson.

**Para  $\beta_1$ , se hacen los siguientes supuestos:**

- Hay convergencia al origen.
- Es estadísticamente igual cero.

El test de convergencia al origen se define por medio de un test de Student que desea probar la hipótesis nula de que el intercepto  $\beta_1$  de un modelo de regresión lineal es igual a cero. En cuyo caso la hipótesis es que hay convergencia al origen y que esta es estadísticamente igual a cero o en otras palabras que a una respuesta instrumental cero la concentración analítica es cero (Madrid, 2017).

Prueba de hipótesis para  $\beta_1$ :

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_a: \beta_1 \neq 0$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}(\alpha 0,05, n-2)$$

(No es significativamente diferente de cero, y se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ ).

**Para  $\beta_2$ , se hace el siguiente supuesto:**

- Es estadísticamente igual a cero o a uno dependiendo del caso.

El test para la pendiente la cual define la sensibilidad del método, se define por medio de un test de Student que desea probar la hipótesis nula de que la pendiente  $\beta_2$  de un modelo de regresión lineal es igual a algún valor especificado. A menudo este  $\beta_2$  toma el valor cero para la linealidad del sistema o uno para la linealidad del método, en cuyo caso la hipótesis es que las variables  $(x, y)$  no están relacionadas (Duran, 2011).

Prueba de hipótesis para  $\beta_2$ :

$$H_0: \beta_2 = 0$$

$$H_a: \beta_2 \neq 0$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}} (\alpha 0,05, n-2),$$

(Es significativamente diferente de cero, y se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ ).

Para la linealidad del sistema.

Ó

$$H_0: \beta_2 = 1$$

$$H_a: \beta_2 \neq 1$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}} (\alpha 0,05, n-2),$$

(Es significativamente diferente de uno, y se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ ).

Para la linealidad del método.

**Para  $R$  de pearson, se hace el siguiente supuesto:**

- Es estadísticamente igual a cero.

El coeficiente de correlación de Pearson, el cual se utiliza para medir el grado de relación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas, se plantea asignándole peso a los puntos  $(x_i, y_i)$  de las variables  $(x, y)$  en función de su ubicación respecto a las líneas de división que se trazan por el centroide. A medida que el punto  $(x_i, y_i)$  se alejan de las líneas, su peso sería mayor. Los puntos cerca de las líneas podrían cambiar de signo fácilmente, mientras que los puntos más alejados de las líneas pueden establecer con mayor fuerza la correlación (McGraw-Hill, 2017).

Es usual en este test usar una prueba t de Student para probar si existe una correlación significativa entre la concentración y la respuesta instrumental, en la cual se define la hipótesis nula de que no existe relación lineal entre las variables ( $x$ ,  $y$ ). Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes, pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.

Prueba de hipótesis para  $R$ :

$$H_0: R = 0,$$

(El coeficiente de correlación procede de una población cuya correlación es cero).

$$H_a: R \neq 0,$$

(El coeficiente de correlación procede de una población cuya correlación es distinta de cero).

$t_{\text{tab}}(\alpha, n-1) < t_{\text{exp}}$ , Se rechaza la hipótesis nula, las variables están relacionadas.

$t_{\text{tab}}(\alpha, n-1) \geq t_{\text{exp}}$ , Se acepta la hipótesis nula, las variables no están relacionadas.

Una vez indicada la correlación entre la variable concentración ( $x$ ) y la variable respuesta ( $y$ ) de la curva de calibración, el valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta entre ( $x$ ,  $y$ ) con una pendiente positiva. Cuando  $R = 0$ , no existe correlación alguna, independencia total de los valores ( $x$ ,  $y$ ). Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0,999.

**Para  $\varepsilon_{ij}$ , se hacen los siguientes supuestos:**

- Los errores tienen media cero.

El ANOVA es la prueba que sirve para comparar medias poblacionales estimadas de varios grupos en una variable cuantitativa y demostrar que no son diferentes entre sí para comparar. Es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal. Supuestas  $k$  poblaciones independientes, las hipótesis del contraste son las siguientes:

$$H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2 = \bar{U}_k \text{ (Las medias poblacionales son iguales)}$$

$$H_a: \bar{U}_1 \neq \bar{U}_2 \neq \bar{U}_k \text{ (Al menos dos medias poblacionales son distintas)}$$

En el ANOVA, la hipótesis nula supone que todas las muestras se extraen de una población de media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$  (desconocidas). Así pues, este análisis presupone condiciones de normalidad y homogeneidad de las varianzas de los grupos que vamos a comparar (Bakieva, Gonzalez, & Jornet, 2011).

Una vez realizado este test se caracteriza además por graficar los residuales y el Q-Q plot el cual se basa en estudiar el ajuste de los datos sobre un gráfico probabilístico en el que cada dato es un punto cuyo valor de abscisa es el valor observado de probabilidad para un valor determinado de la variable, y el de la ordenada es el valor esperado de probabilidad. En este test la  $H_0$  muestra que hay homocedasticidad en los datos (UCLM, 2014).

- Los errores tienen varianzas iguales pero desconocidas  $\sigma^2$ .

El test de Breusch-Pagan es el que me permite contrastar la hipótesis nula de que las varianzas de error son todas iguales versus la alternativa de que las varianzas de error son una función multiplicativa de uno o más variables. El contraste de Breusch-Pagan efectivamente nos servirá para aceptar o descartar la presencia de heterocedasticidad (Williams, 2015).

Al realizar el test no se rechaza  $H_0$  debido a que el P-Valor es mayor que el BP, demostrando rotundamente que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la varianzas es constante en el modelo de regresión lineal.

La hipótesis nula del contraste de Breusch-Pagan es que los errores son Homocedásticos, es decir

$$H_0: \text{Var}(\epsilon) = \sigma^2$$

$$H_a: \text{Var}(\epsilon) \neq \sigma^2$$

- Los errores no están correlacionados.

El test de Durbin-Watson es el que me permite evaluar si existe autocorrelación en una regresión lineal, sea simple o múltiple. Con ello se pretende ver si los valores presentan algún tipo de dependencia en cuanto al orden de obtención. Si fuera así se estaría incumpliendo una de las condiciones del modelo y cuando se incumplen las condiciones de un modelo de regresión lineal (normalidad, homogeneidad de varianzas, independencia de los datos) las estimaciones de los parámetros del modelo (los coeficientes del modelo) no tienen los criterios de calidad que se suponen (Pearce, 1999).

El contraste de hipótesis de Durbin-Watson tiene como hipótesis nula que la autocorrelación es cero versus la alternativa que afirma que es distinta de cero:

$$\begin{array}{ccc}
 H_0: \rho = 0 & & H_0: \rho = 0 & & H_0: \rho = 0 \\
 H_a: \rho < 0 & \quad \text{ó} & H_a: \rho > 0 & \quad \text{ó} & H_a: \rho \neq 0
 \end{array}$$

Este test lo que hace es evaluar si la disposición de los valores en función de las variables independientes es una disposición al azar o, por el contrario, si hay algún tipo de dependencia, algún tipo de conexión entre los valores.

- Los errores se distribuyen  $N(0, \sigma^2)$ .

Las pruebas de normalidad son muy recomendables para variables. “Se busca aceptar la  $H_0$ , dado que en la mayoría de los métodos estadísticos convencionales es necesaria la distribución normal de la variable de interés, pues siendo así es posible conocer los parámetros que la describen por completo, su media ( $\mu$ ), su desvío ( $\sigma$ ) y la relación entre ambos y en este sentido estos métodos son más potentes. Un valor  $P \geq 0,05$  en los tests de normalidad indicaría que no hay prueba suficiente para rechazar la normalidad de la variable” (Risk, 2003).

La prueba o test de Shapiro-Willks es la que se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos y se plantea como hipótesis nula que una muestra proviene de una población normalmente distribuida. Siendo la interpretación de la hipótesis nula que la población está distribuida normalmente, si el p-valor es menor a alfa (nivel de confianza) entonces la hipótesis nula es rechazada (se concluye que los datos no vienen de una distribución normal). Si el p-valor es mayor a alfa, no se rechaza la hipótesis y se concluye que los datos siguen una distribución normal (Freijo, 2013).

La prueba de Shapiro-Willks es la más adecuada para contrastar la normalidad de las observaciones que el test de Kolmogorov-Smirnov.

Prueba de hipótesis:

$$H_0: Y \sim N(\mu; \sigma)$$

$$H_a: Y \text{ no se distribuye } N(\mu; \sigma)$$

### 3.5 LIMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

**Límite de detección (LDD):** Es la menor concentración de la sustancia en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. De esta manera, la prueba de límite solamente fundamenta que la concentración del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza, es decir que se puede diferenciar la respuesta dado por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio (Maroto, Jordi, Boqué, & Xavier, 1999).

**Límite de cuantificación (LDC):** Es la menor concentración de la sustancia en una muestra, que puede ser cuantificada con criterios de exactitud y precisión especificados para el tipo de método.

Estadísticamente los dos parámetros se caracterizan por calcularse teóricamente teniendo en cuenta la pendiente, el intercepto y la desviación estándar de los residuales obtenida en la regresión lineal de primer orden de la linealidad del sistema con una confianza del 95,0% mediante las siguientes ecuaciones (Magnusson & Örnemark, 2014):

$$LDC = 3 \times \left( \frac{S_{xy}}{\beta_1} \right)$$

**Ecuación 2:** Ecuación del límite de cuantificación.

$$LDD = 10 \times \left( \frac{S_{xy}}{\beta_1} \right)$$

**Ecuación 3:** Ecuación del límite de detección.

#### 4. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión literaria acerca de la valoración de un principio activo por HPLC en un laboratorio farmacéutico y de los parámetros estadísticos para la validación de este principio. Se realizó y se tomaron los datos de una validación química hecha con anterioridad de un principio activo por HPLC, específicamente para el principio activo Montelukast sódico en tabletas al cual se le replicó todo el análisis estadístico en R y los que sean necesarios para validar la información.

De manera que este estudio presenta un alcance de regresión lineal y los diferentes test y análisis que se usan para la validación de los supuestos de normalidad de una regresión lineal, ya que se realizara una identificación y valoración de un principio activo mediante la validación de los parámetros estadísticos de especificidad-selectividad, precisión del sistema, exactitud, linealidad del sistema, linealidad del método, límite de detección y límite de cuantificación establecidos por un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano en R, para de esta forma poder observar el comportamiento de la concentración analítica del principio activo Montelukast sódico en tabletas bajo la respuesta instrumental del equipo de HPLC en cada uno de los parámetros estadísticos evaluados con anterioridad.

<b>EQUIPOS</b>	<b>IDENTIFICACION</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Cromatógrafo Líquido	HPLC	Agilent 1100
Balanza Analítica	Balanza	Sartorius AZ214
Ultrasonido	Ultrasonido	Branson prosonic

**Tabla 1:** Equipos.

REACTIVOS	TIPO O GRADO	LOTE
MeOH	J.T Backer HPLC	9093-03
Agua	HPLC	N.A
HCl 1N	Volumétrico	13/12/2013
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Reactivo	A0483046-304
NaOH 1N	Volumétrico	31/01/2014
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Volumétrico	15/02/2013

**Tabla 2:** Reactivos y materiales de referencia.

NOMBRE	TIPO O GRADO	OBSERVACIONES
Balón aforado de 10, 20, 25, 50, 100, 250 mL	Clase A	Certificado
Pipeta aforada de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL	Clase A	Certificado

**Tabla 3:** Materiales.

#### 4.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE ESTÁNDAR

Se preparó un estándar con una concentración correspondiente al 200,0% de la concentración de trabajo del principio activo a analizar, y de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para la preparación de las muestras.

#### 4.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE PLACEBO

Se preparó una solución de placebo con una concentración correspondiente al 1000,0% de cada excipiente, y de esta solución, se toma la alícuota correspondiente para la preparación de las muestras.



#### 4.3 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Los estándares se prepararon tomando las respectivas alícuotas de la solución stock de estándar, según la tabla 4, llevando a un balón de 10 mL y completando a volumen con el diluyente según el método analítico.

<b>Concentración</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
60,0%	3,0	10,0
80,0%	4,0	10,0
100,0%	5,0	10,0
120,0%	6,0	10,0
140,0%	7,0	10,0

**Tabla 4:** Preparación de los estándares.

#### 4.4 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES CON PLACEBO ENRIQUECIDO

Las muestras de placebo enriquecido se prepararon adicionando las respectivas alícuotas de la solución stock de estándar, según la tabla 4, y una alícuota de 1,0 mL de la solución stock de placebo a un balón aforado de 10,0 mL y completando a volumen con el diluyente del método analítico.

#### 4.5 PLACEBO

Se preparó adicionando una alícuota de 1,0 mL de la solución stock de placebo a un balón aforado de 10,0 mL y completando a volumen con el diluyente del método analítico.

## **4.6 ESPECIFICIDAD-SELECTIVIDAD**

Para determinar su estabilidad frente a condiciones extremas de análisis, se analizó por duplicado muestras de estándar al 100,0%, placebo solo y placebo enriquecido al 100,0% sometida a las siguientes condiciones críticas:

### **4.6.1 Hidrólisis ácida**

Se sometió una solución del 100,0% con adición de 1,0 mL de solución de HCl 1N a ebullición durante 1 hora a 90°C.

### **4.6.2 Hidrólisis alcalina**

Se sometió una solución del 100,0% con adición de 1,0 mL de solución de NaOH 1N a ebullición durante 1 hora a 90°C.

### **4.6.3 Oxidación**

Se sometió una solución del 100,0% con adición de 1,0 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 10,0% a ebullición durante 1 hora a 90°C.

### **4.6.4 Termólisis**

Se sometió una solución del 100,0% a ebullición durante 1 hora a 90°C.

### **4.6.5 Fotólisis**

Se sometió una solución del 100,0% a 48 horas de luz solar a temperatura ambiente o a lámpara de luz UV (254nm) durante 4 horas.

## **4.7 PRECISIÓN**

Esta está compuesta por:

### **4.7.1 Repetibilidad**

Esta se realizó mediante el análisis (seis veces) de un estándar de 100,0%.

### **4.7.2 Repetibilidad del método**

Se calculó con base en los resultados obtenidos para la exactitud. La repetibilidad se determinó midiendo el coeficiente de variación (C.V.) obtenido entre las determinaciones independientes realizadas en un día por un mismo analista y en el mismo equipo.

### **4.7.3 Precisión intermedia**

Se realizó mediante el análisis por triplicado de muestras del producto a validar, el análisis se realizó por dos analistas diferentes, en días diferentes en el mismo equipo.

## **4.8 EXACTITUD**

Se realizó mediante el análisis por triplicado de los placebos enriquecidos con el activo al 60,0%, 100,0% y 140,0% preparados según se explica en la tabla 4.

## **4.9 LINEALIDAD DEL SISTEMA**

Se prepararon estándares por duplicado en concentraciones de 60,0%, 80,0%, 100,0%, 120,0% y 140,0%, preparados según se explica en la tabla 4.

### **4.10 LINEALIDAD DEL MÉTODO**

Se realizó mediante el análisis por duplicado de los placebos enriquecidos con el activo de 60,0%, 80,0%, 100,0%, 120,0% y 140,0% preparados según se explica en la tabla 4.

#### **4.11 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Este parámetro se evaluó teniendo en cuenta los resultados de la pendiente y desviación estándar de la pendiente obtenidos de la linealidad del sistema.

Todos los cálculos en la determinación de los parámetros de validación química se realizaron mediante R según el parámetro a determinar. Los parámetros químicos y su evaluación estadística se llevaron a cabo de la siguiente manera:

PARAMETRO	CALCULOS	ESTADIGRAFO	ESPECIFICACION
Especificidad.	N.A	N.A	No se deben presentar interferencias, debidas a productos de degradación, compuestos relacionados o auxiliares de formulación.
Repetibilidad.	Desviación estándar y Promedio.	RSD $t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$	RSD < al especificado (1,5%). $H_a: \mu \neq 0$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$
Precisión Intermedia.	Desviación estándar y Promedio.	RSD	RSD < 2,0%.
Exactitud.	% Recuperación, Promedio, Desviación estándar y test de Cochran.	RSD $t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$ $G_{\text{tab}}(3,3)$	$H_0: \%R = 100,0 \%$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$ RSD < 2,0%. $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$ $G_{\text{exp}} < G_{\text{tab}}(3,3)$
Linealidad del sistema.	Intercepto, Pendiente, Coeficiente de correlación y Desviación estándar del intercepto y la pendiente.	$Y = \beta_1 + \beta_2 X + \varepsilon_{ij}$ $t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$	<b>Coef. Corr.:</b> $H_a: R \neq 0$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$ <b>Intercepto:</b> $H_0: \beta_1 = 0$ $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$ <b>Pendiente:</b> $H_0: \beta_2 = 0$ $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}(\alpha, n-1)$

<p>Linealidad del sistema.</p>	<p>Sumatoria de cuadrados, residuales, Q-Q plot, test de Shapiro-Wilk, test de Breusch-Pagan y test de Durbin-Watson.</p>	<p>ANOVA :  <math>F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math>  <math>F2_{tab (\alpha, v1, v2)}</math></p> <p>SHAPIRO-WILK:  P-Valor</p> <p>BREUSCH-PAGAN:  P-Valor  BP</p> <p>DURBIN-WATSON:  P-Valor  D-W</p>	<p><b>ANOVA</b>  <math>H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2 = \bar{U}_k</math>  <b>Regresión:</b> Hay correlación  <math>F1_{Exp} &gt; F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math>  <b>Falta de ajuste:</b> No hay desvío de la linealidad  <math>F2_{Exp} &lt; F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math></p> <p><b>SHAPIRO-WILK</b>  <math>H_0: Y \sim N(\mu; \sigma)</math>  P-Valor <math>&gt; (\alpha = 0,05)</math></p> <p><b>BREUSCH-PAGAN</b>  <math>H_0: Var(\epsilon) = \sigma^2</math>  P-Valor <math>&gt; BP</math></p> <p><b>DURBIN-WATSON</b>  <math>H_0: \rho = 0</math>  (D-W) = 2 o próximo a 2.</p>
<p>Linealidad del Método (Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada).</p>	<p>Intercepto, Pendiente, Coeficiente de correlación y Desviación estándar del intercepto y la pendiente.</p>	<p><math>Y = \beta_1 + \beta_2 X + \epsilon_{ij}</math>  <math>t_{tab (\alpha, n-1)}</math></p>	<p><b>Coef. Corr.:</b> <math>H_a: R \neq 0</math>  <math>t_{exp} &gt; t_{tab (\alpha, n-1)}</math>  <b>Intercepto:</b> <math>H_0: \beta_1 = 0</math>  <math>t_{exp} &lt; t_{tab (\alpha, n-1)}</math>  <b>Pendiente:</b> <math>H_0: \beta_2 = 1</math>  <math>t_{exp} &lt; t_{tab (\alpha, n-1)}</math></p>

<p>Linealidad del Método Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada).</p>	<p>Sumatoria de cuadrados, residuales, Q-Q plot, test de Shapiro-Wilk, test de Breusch-Pagan y test de Durbin-Watson.</p>	<p>ANOVA : <math>F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math> <math>F2_{tab (\alpha, v1, v2)}</math></p> <p>SHAPIRO-WILK: P-Valor &gt; (<math>\alpha = 0,05</math>)</p> <p>BREUSCH-PAGAN: P-Valor &gt; BP</p> <p>DURBIN-WATSON: (D-W) = 2 o próximo a 2.</p>	<p><b>ANOVA</b> <math>H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2 = \bar{U}_k</math> <b>Regresión:</b> Hay correlación <math>F1_{Exp} &gt; F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math> <b>Falta de ajuste:</b> No hay desvío de la linealidad <math>F2_{Exp} &lt; F1_{tab (\alpha, v1, v2)}</math></p> <p><b>SHAPIRO-WILK</b> <math>H_0: Y \sim N(\mu; \sigma)</math> P-Valor &gt; (<math>\alpha = 0,05</math>)</p> <p><b>BREUSCH-PAGAN</b> <math>H_0: Var(\epsilon) = \sigma^2</math> P-Valor &gt; BP</p> <p><b>DURBIN-WATSON</b> <math>H_0: \rho = 0</math> (D-W) = 2 o próximo a 2.</p>
<p>Límite de Detección y Cuantificación.</p>	<p>Pendiente y Desviación estándar de la pendiente de la linealidad del sistema.</p>	$Y = \beta_1 + \beta_2 X + \epsilon_{ij}$ $S_{xy}$	$LDC = 3 \times \left( \frac{S_{xy}}{\beta_1} \right)$ $LDD = 10 \times \left( \frac{S_{xy}}{\beta_1} \right)$

**Tabla 5:** Parámetros químicos y su determinación estadística.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados estadísticos obtenidos en R para la validación de un método químico analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la identificación y valoración de un principio activo para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano fueron los siguientes.

### 6.1. ESPECIFICIDAD-SELECTIVIDAD

Susceptible a degradación variaciones mayores al 10,0% en la respuesta instrumental respecto al estándar.

#### 6.1.1. Especificidad para control de calidad

```
> #FORMA FARMACEUTICA:Tabletas
> #PRINCIPIO ACTIVO:Montelikast Sodico
> #METODO ANALITICO: HPLC
>
> #ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD
>
> #ESPECIFICIDAD PARA CONTROL DE CALIDAD
>
> #PLACEBO:
>
> PLACEBO=c(0)
> Placebo=c((PLACEBO-(PLACEBO*0.1)),(PLACEBO+(PLACEBO*0.1)))
> Placebo
[1] 0 0
>
> Placebo_Mas_Hidrólisis_Acida=c(0)
> Placebo_Mas_Hidrólisis_Acida=if(Placebo_Mas_Hidrólisis_Acid
No se degrada>
> Placebo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=c(0)
> Placebo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=if(Placebo_Mas_Hidrólisis_A
No se degrada>
> Placebo_Mas_Oxidación=c(0)
> Placebo_Mas_Oxidación=if(Placebo_Mas_Oxidación ==0) cat("No
No se degrada>
> Placebo_Mas_Termica_Humedad=c(0)
> Placebo_Mas_Termica_Humedad=if(Placebo_Mas_Termica_Humedad
No se degrada>
> Placebo_Mas_Fotolisis=c(0)
> Placebo_Mas_Fotolisis=if(Placebo_Mas_Fotolisis ==0) cat("No
No se degrada> |
```

El placebo no exhibe picos (Respuesta instrumental obtenida por el instrumento HPLC) característicos que interfieran en la identificación y cuantificación del principio activo evaluado.



## 6.1.2. Especificidad-selectividad método indicador de estabilidad

```
> #PRINCIPIO ACTIVO:
>
> STD=c(12720588)
> Activo=c((STD-(STD*0.1)), (STD+(STD*0.1)))
> Activo
[1] 11448529 13992647
>
> Activo_Mas_Hidrólisis_Acida=c(4288299)
> Activo_Mas_Hidrólisis_Acida=if(STD+(STD*0.1) > A
Error: Se degrada
>
> Activo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=c(12499902)
> Activo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=if(STD+(STD*0.1)
No se degrada>
> Activo_Mas_Oxidación=c(0)
> Activo_Mas_Oxidación=if(STD+(STD*0.1) > Activo_M
Error: Se degrada
>
> Activo_Mas_Termica_Humedad=c(12065799)
> Activo_Mas_Termica_Humedad=if(STD+(STD*0.1) > Ac
No se degrada>
> Activo_Mas_Fotolisis=c(0)
> Activo_Mas_Fotolisis=if(STD+(STD*0.1) > Activo_M
Error: Se degrada

> #PRINCIPIO ACTIVO MAS PLACEBO:
>
> PRODUCTO=c(13136228)
> Activo_Mas_Placebo=c((PRODUCTO-(PRODUCTO*0.1)), (PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1)))
> Activo_Mas_Placebo
[1] 11822605 14449851
>
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Hidrólisis_Acida=c(3805360)
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Hidrólisis_Acida=if(PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1) > Acti
Error: Se degrada
>
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=c(12261680)
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Hidrólisis_Alcalina=if(PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1) > Ac
No se degrada>
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Oxidación=c(0)
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Oxidación=if(PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1) > Activo_Mas_I
Error: Se degrada
>
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Termica_Humedad=c(11986732)
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Termica_Humedad=if(PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1) > Activ
No se degrada>
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Fotolisis=c(0)
> Activo_Mas_Placebo_Mas_Fotolisis=if(PRODUCTO+(PRODUCTO*0.1) > Activo_Mas_I
Error: Se degrada
|
```

Los posibles productos de degradación no interfieren en la identificación y cuantificación del principio activo.

El placebo y los posibles compuestos de degradación obtenidos en el ensayo de degradación forzada no interfieren en la identificación y cuantificación del principio activo evaluado. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de especificidad/selectividad.

## 6.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA

```
> PS2
      [,1]      [,2]
[1,] 0.02 12786299
[2,] 0.02 12814390
[3,] 0.02 12887557
[4,] 0.02 12906175
[5,] 0.02 12817853
[6,] 0.02 12821767
> Promedio=c(sprintf("%.1f", as.numeric(mean(PS))))
> Promedio
[1] "12839006.8"
> Desviacion_Estandar=c(sd(PS))
> Desviacion_Estandar
[1] 46898.79
> RSD=sprintf("%.3f", as.numeric(sd(PS)/mean(PS)*100))
> RSD
[1] "0.365"
> n=length(PS)
> n
[1] 6
```

Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de precisión, el RSD obtenido fue de 0,365% y es menor al 1,5% establecido para una validación de un método químico analito por HPLC.

### 6.2.1. Determinación del t experimental

```
> t.test(PS)

      One Sample t-test

data:  PS
t = 670.572, df = 5, p-value = 1.4e-13
alternative hypothesis: true mean is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 12789790 12888224
sample estimates:
mean of x
 12839007
```

Se rechaza ( $H_0: \mu = 0$ ) ya que el P-Valor es menor que el ( $\alpha = 0,05$ ) y no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el promedio es igual a cero. El promedio es diferente de cero con un valor de (12839007) para la concentración de (0,020 mg/mL) del principio activo con un límite de confianza de (12789790 a 12888224) al 95%, comprobando que el método analítico cumple con el parámetro de precisión.

## 6.3. EXACTITUD

### 6.3.1. Determinación del t experimental

```
> EXA
      [,1] [,2]      [,3]
[1,] "60" "7700743" "100.0"
[2,] "60" "7742639" "100.5"
[3,] "60" "7760958" "100.7"
[4,] "100" "13087736" "101.9"
[5,] "100" "12918911" "100.6"
[6,] "100" "12713630" "99.0"
[7,] "140" "18367699" "102.2"
[8,] "140" "18301478" "101.8"
[9,] "140" "17760203" "98.8"
> Promedio=c(sprintf("%.1f", as.numeric(mean(RECUPERACION))))
> Promedio
[1] "100.6"
> Desviacion_Estandar=c(sd(RECUPERACION))
> Desviacion_Estandar
[1] 1.220596
> RSD=sprintf("%.3f", as.numeric(sd(RECUPERACION)/mean(RECUPERACION)*100))
> RSD
[1] "1.213"
> n=length(EXACTITUD)
> n
[1] 9
> t_Tab=(qt(0.975,length(EXACTITUD)-1))
> t_Tab
[1] 2.306004
> t_Exp=(abs((mean(RECUPERACION)-100)*(sqrt(length(EXACTITUD))/(sd(RECUPERACION)/mean(RECUPERACION)*100))))
> t_Exp
[1] 1.543689
> CONCLUSION=if(t_Exp < t_Tab) cat("Si cumple") else stop("No cumple \n")
Si cumple> #INTERVALO DEL % DE RECUPERACIÓN 97,0-103,0%
> CONCLUSION=if(mean(RECUPERACION) < 103 & mean(RECUPERACION) > 97) cat("Si cumple") else stop("No cumple \n")
Si cumple> |
```

No se rechaza ( $H_0$ : %R = 100,0%) ya que el porcentaje de recuperación no es significativamente diferente del 100,0% en la exactitud entre replicas y niveles de las concentraciones del 60,0%, 100,0% y 140,0% al 95% de confianza. Se comprueba bajo la evidencia experimental que el método analítico cumple con el parámetro de exactitud con un resultado de 100,6% el cual se encuentra también entre la especificación de 97,0% y 103,0% para principios activos farmacéuticos.

### 6.3.2. Test de Cochran

```
> Varianzas
[1] 952784467 35099578137 111069206080
> G_Exp=max(Varianzas)/sum(Varianzas)
> G_Exp
[1] 0.7549485
> G_Tab=0.871
> library(outliers)
> cochran.test(Varianzas,c(3,3,3))

Cochran test for outlying variance

data: Varianzas
C = 0.7549, df = 3, k = 3, p-value = 0.1802
alternative hypothesis: Group 3 has outlying variance
sample estimates:
      1          2          3
952784467 35099578137 111069206080

>
> CONCLUSION=if(G_Exp < G_Tab) cat("Si cumple") else stop("No cumple \n")
Si cumple> |
```

No se rechaza ( $H_0$ :  $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2$ , El grupo tiene una varianza homogénea) ya que el P-Valor es mayor que el ( $\alpha = 0,05$ ) y no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el nivel de los grupos de concentraciones del 60,0%, 100,0% y 140,0% no afectan el porcentaje de recuperación de la concentración del principio activo y no existe diferencia estadísticamente significativa entre varianzas a un nivel del 95,0% de confianza. Se comprueba bajo la evidencia experimental que el método analítico cumple con el parámetro de exactitud.

## 6.4. LINEALIDAD DEL SISTEMA

### 6.4.1. Rango de concentración

```
> #LINEALIDAD DEL SISTEMA
>
> Concentracion_mg_Sobre_mL=c(0.020)
> RANGO_mg_Sobre_mL=c((Concentracion_mg_Sobre_mL*0.6), (Concentracion_mg_Sobre_mL*1.4))
> RANGO_mg_Sobre_mL
[1] 0.012 0.028
```

La validación se realizó en un rango de concentración de (0,012 a 0,028 mg/mL) del principio activo, obteniendo una curva de calibración de cinco puntos con concentraciones del 60,0%, 80,0%, 100,0%, 120,0% y 140,0% de la concentración nominal del 100,0% que es 0,020 mg/mL.

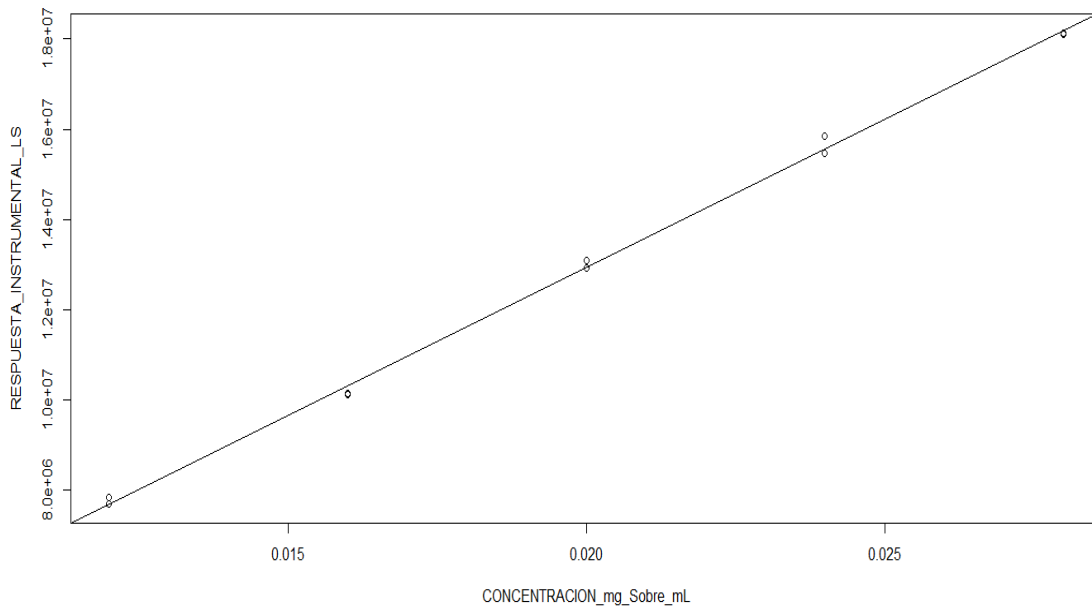
```
> LS
- - - - -
      [,1]      [,2]
[1,] 0.012 7852516
[2,] 0.012 7698321
[3,] 0.016 10111043
[4,] 0.016 10143060
[5,] 0.020 13090380
[6,] 0.020 12915094
[7,] 0.024 15849840
[8,] 0.024 15460556
[9,] 0.028 18132008
[10,] 0.028 18102959
> regresionLS=lm(formula(Respuesta_Instrumental_LS ~ Concentracion_mg_Sobre_mL, data = LS))
> regresionLS

Call:
lm(formula = formula(Respuesta_Instrumental_LS ~ Concentracion_mg_Sobre_mL,
  data = LS))

Coefficients:
      (Intercept)  Concentracion_mg_Sobre_mL
           -170561              655306912

> Intercepto_LS=c(sprintf("%.1f", as.numeric(regresionLS$coefficients[1])))
> Intercepto_LS
[1] "-170560.5"
> Pendiente_LS=c(sprintf("%.1f", as.numeric(regresionLS$coefficients[2])))
> Pendiente_LS
[1] "655306912.5"
> Coeficiente_De_Correlacion_LS=cor(LS)
> Coeficiente_De_Correlacion_LS
      [,1]      [,2]
[1,] 1.0000000 0.9991882
[2,] 0.9991882 1.0000000
> Nivel_De_confianza_Alfa=c(0.05)
```

La regresión lineal obtenida para la linealidad del sistema por las concentraciones del 60,0%, 80,0%, 100,0%, 120,0% y 140,0% de la concentración es satisfactoria al 95,0% de confianza. Esta se complementa mediante el siguiente gráfico.



**Grafico 1:** Curva de calibrado de la linealidad del sistema.

El grafico 1, nos muestra la siguiente información:

Tipo de Curva de primer orden.

Coefficiente de correlación R: 0,9991, satisfactorio.

$$\text{Respuesta Instrumental} = 655306912,5 \times \left( \text{Concentracion} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right) - 170560,5$$

**Ecuación 4:** Ecuación de la linealidad del sistema.

## 6.4.2. Test para el coeficiente de correlación

```
> t_Tab=qt(0.975,length(Respuesta_Instrumental_LS)-2)
> t_Tab
[1] 2.306004
> cor.test((LS)[,1],(LS)[,2], method = "pearson", alternative = "two.sided", exact = NULL, conf.level = 0.95)

Pearson's product-moment correlation

data: (LS)[, 1] and (LS)[, 2]
t = 70.1527, df = 8, p-value = 1.898e-12
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.9964331 0.9998154
sample estimates:
 cor
0.9991882
```

Al realizar el test para el coeficiente de correlación se obtuvo un R de (0,9991) por lo cual se rechaza ( $H_0: R = 0$ ), además que el P-Valor es menor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la respuesta instrumental no explica bien a la concentración (mg/mL) de principio activo. Se comprueba bajo la evidencia experimental y estadística que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

## 6.4.3. Test para la pendiente y test de convergencia al origen

```
> summary(regresionLS)

Call:
lm(formula = formula(Respuesta_Instrumental_LS ~ CONCENTRACION_mg_Sobre_mL,
  data = LS))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-203307  -90956  -33254   117401   293035

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    -170561    194152  -0.878   0.405
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL 655306913    9341155  70.153 1.9e-12 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 167100 on 8 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9984,    Adjusted R-squared:  0.9982
F-statistic: 4921 on 1 and 8 DF,  p-value: 1.898e-12
```

Al realizar los test se obtuvo que la pendiente es estadísticamente diferente de cero con un valor próximo de (655306913) por lo cual se rechaza ( $H_0: \beta_2 = 0$ ), además el P-Valor es menor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la pendiente es significativamente igual a cero. Se confirma además que el t experimental (70,153) es mayor que la t de tabla (2,306) obtenida anteriormente con una confianza del 95,0%.

Por otra parte se obtuvo que el intercepto tiene un valor próximo de (-170561) por lo cual no se rechaza ( $H_0: \beta_1 = 0$ ) debido a que el t experimental (-0,878) es menor que la t de tabla (2,306) obtenida anteriormente por lo cual el intercepto no es significativamente y estadísticamente diferente de cero. Con esto se demuestra que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el intercepto converge al origen con una confianza del 95,0% y que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema con un  $R^2$  de (0,9982).

#### 6.4.4. Análisis de varianza para la regresión y prueba de normalidad

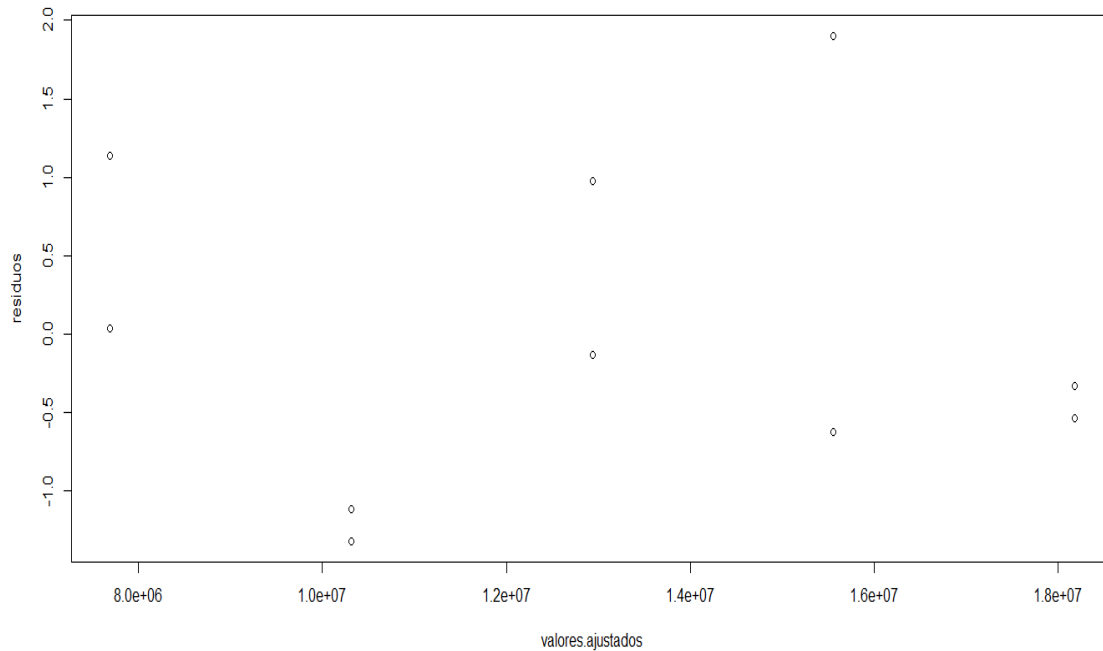
```
> anova(regresionLS)
Analysis of Variance Table

Response: RESPUESTA_INSTRUMENTAL_LS
          Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL  1 1.3742e+14 1.3742e+14  4921.4 1.898e-12 ***
Residuals                  8 2.2338e+11 2.7922e+10
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2$ ) debido a que se obtuvo un F experimental (4921,4) mayor a su P-Valor (1,898e-12) por lo cual se demuestra primero que no hay diferencias significativas entre las réplicas de un mismo nivel de concentración y segundo que si hay diferencias significativas entre los diferentes niveles de concentración, lo cual muestra que la linealidad del sistema es un modelo que representa muy bien la correlación entre la respuesta instrumental y la concentración (mg/mL) sin desvió de la linealidad con una confianza del 95,0%.

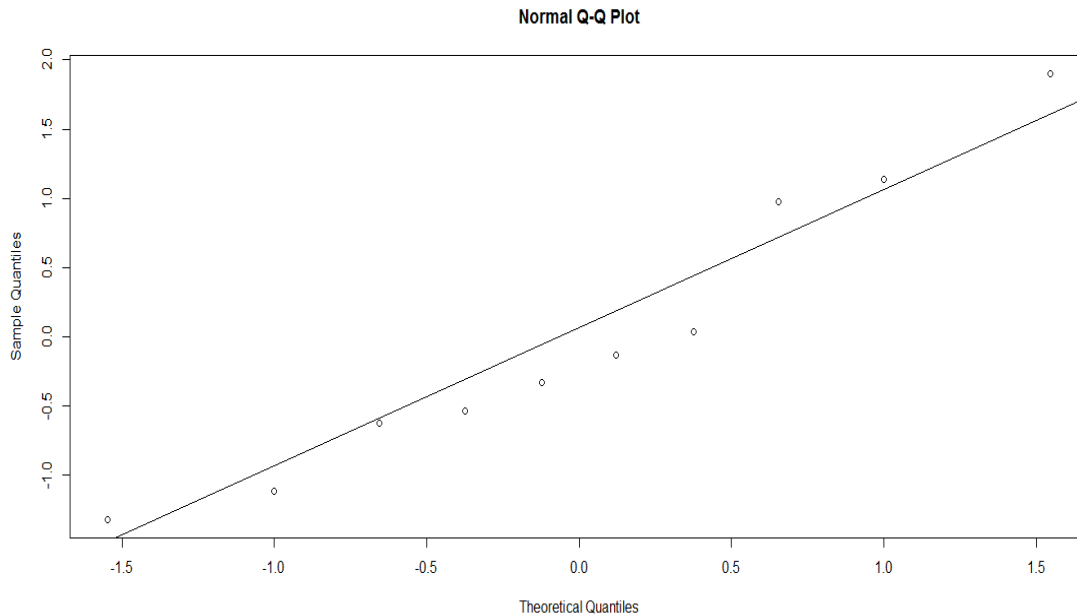


Por otra parte también se puede reafirmar del ANOVA que al tener un F experimental (4921,4) mayor a su P-Valor ( $1,898e-12$ ) se rechaza ( $H_0: \beta_2 = 0$ ) demostrando que la pendiente es estadísticamente diferente de cero con una confianza del 95,0%. Luego el gráfico de los residuales es:



**Gráfico 2:** Residuales de la linealidad del sistema.

El gráfico 2, nos muestra que los residuos de la regresión lineal del sistema no tienen un patrón especial por lo que la homocedasticidad de la linealidad resulta una hipótesis razonable.



**Grafico 3:** Q–Q Plot de la linealidad del sistema.

El grafico 3, nos muestra cuan cerca y alineados estan los datos de la regresion lineal del sistema de distribuirse normales.

#### 6.4.5. Test de Shapiro-Wilk

```
> shapiro.test(regresionLS$residuals)

Shapiro-Wilk normality test

data: regresionLS$residuals
W = 0.94, p-value = 0.5533
```

Al realizar el test se obtuvo que el P-Valor es mayor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que los datos de la regresion lineal del sistema se distribuyen normal con una confianza del 95,0% por lo cual no se rechaza ( $H_0: Y \sim N(\mu; \sigma)$ ). Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

#### 6.4.6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto

```
> confint(regresionLS)
                2.5 %      97.5 %
(Intercept)      -618276.5    277155.4
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL 633766170.7 676847654.3
> confint(regresionLS, level = 0.9)
                5 %      95 %
(Intercept)      -531596    190474.9
CONCENTRACION mg Sobre mL 637936586 672677238.7
```

#### 6.4.7. Test de Breusch-Pagan

```
> bptest(regresionLS)

studentized Breusch-Pagan test

data: regresionLS
BP = 0.0094, df = 1, p-value = 0.9226
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: V_{ar}(\epsilon) = \sigma^2$ ) debido a que el P-Valor es mayor que el BP, demostrando rotundamente que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la varianza es constante en el modelo de la regresión lineal del sistema con una confianza del 95,0%. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del sistema.

#### 6.4.8. Test de Durbin-Watson

```
> durbinWatsonTest(regresionLS, max.lag=2)
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
1 -0.09585755 2.052747 0.790
2 -0.09037210 2.032172 0.956
Alternative hypothesis: rho[lag] != 0
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: \rho = 0$ ), demostrando rotundamente que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que no hay ausencia de correlación en los residuos del modelo de regresión del sistema, debido a que D-W toma valores próximos a 2 con una confianza del 95,0%.

## 6.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO

### 6.5.1. Rango de concentración

```
' > #LINEALIDAD DEL METODO
>
> Concentracion_mg_Sobre_mL=c(0.020)
> RANGO_mg_Sobre_mL=c((Concentracion_mg_Sobre_mL*0.6), (Concentracion_mg_Sobre_mL*1.4))
> RANGO_mg_Sobre_mL
[1] 0.012 0.028
```

La validación se realizó en un rango de adición y recuperación de concentraciones de (0,012 a 0,028 mg/mL) del principio activo, obteniendo una curva de calibración de cinco puntos con concentraciones a recuperar del 60,0%, 80,0%, 100,0%, 120,0% y 140,0% de la concentración nominal del 100,0% que es 0,020 mg/mL.

```
> LM
      [,1]      [,2]      [,3]
[1,] 0.012  7792038  0.01215095
[2,] 0.012  7666062  0.01195871
[3,] 0.016 10189400  0.01580933
[4,] 0.016 10261117  0.01591877
[5,] 0.020 12939423  0.02000587
[6,] 0.020 12761378  0.01973417
[7,] 0.024 15528249  0.02395642
[8,] 0.024 15430705  0.02380757
[9,] 0.028 18184392  0.02800970
[10,] 0.028 18272178  0.02814367
>
> LM2=t(matrix(c(mg_Sobre_mL_ADICIONADO, RESPUESTA_INSTRUMENTAL_LM), nrow=2,byrow=10))
> regresionLM2=lm(formula(RESPUESTA_INSTRUMENTAL_LM ~ mg_Sobre_mL_ADICIONADO, data = LM2))
> regresionLM2

Call:
lm(formula = formula(RESPUESTA_INSTRUMENTAL_LM ~ mg_Sobre_mL_ADICIONADO,
  data = LM2))

Coefficients:
      (Intercept)  mg_Sobre_mL_ADICIONADO
          -223850             656317212

> Coeficiente_De_Correlacion_LM=cor(LM2)
> Coeficiente_De_Correlacion_LM
      [,1]      [,2]
[1,] 1.0000000  0.9997329
[2,] 0.9997329  1.0000000
```

La regresion de la respuesta instrumental frente a la cantidad adicionada de principio activo nos confirma una una curva de primer orden, con coeficiente de correlación R (0,9997) satisfactorio y ecuacion:

$$\text{Respuesta Instrumental} = 656317212 \times \left( \text{Adicion} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right) - 223850$$

**Ecuación 5:** Ecuación de la linealidad del método.

```
> regresionLM

Call:
lm(formula = formula(mg_Sobre_mL_RECUPERADO ~ mg_Sobre_mL_ADICIONADO,
  data = LM3))

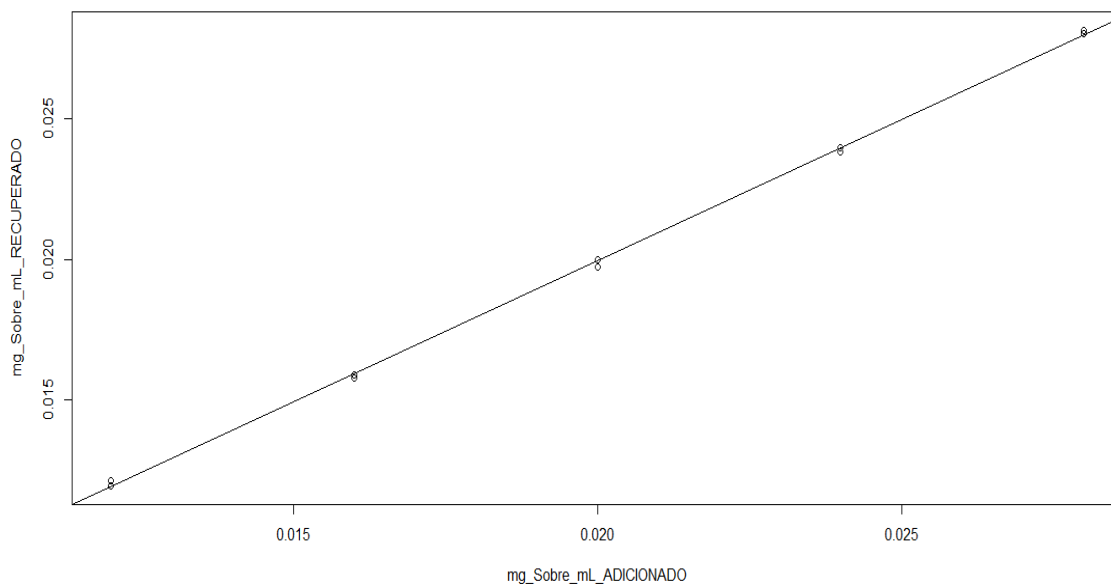
Coefficients:
      (Intercept)  mg_Sobre_mL_ADICIONADO
      -8.132e-05           1.002e+00

> Intercepto_LM=c(sprintf("%.8f", as.numeric(regresionLM$coefficients[1])))
> Intercepto_LM
[1] "-0.00008132"
> Pendiente_LM=c(sprintf("%.3f", as.numeric(regresionLM$coefficients[2])))
> Pendiente_LM
[1] "1.002"
> Coeficiente_De_Correlacion_LM=cor(LM3)
> Coeficiente_De_Correlacion_LM
      [,1]      [,2]
[1,] 1.0000000 0.9997329
[2,] 0.9997329 1.0000000
> Nivel_De_confianza_Alfa=c(0.05),
```

Por otra parte la regresion de la cantidad recuperada de principio activo frente a la cantidad adicionada de principio activo nos confirma una curva de primer orden, ver el grafico 4, coeficiente de correlación R (0,9997) satisfactorio con una confianza del 95,0% y ecuacion:

$$\left( \text{Recuperacion} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right) = 1,002 \times \left( \text{Adicion} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right) - 0,00008132$$

**Ecuación 6:** Ecuación de la recuperacion de la linealidad del método.



**Gráfico 4:** Curva de calibrado de la linealidad del método.

### 6.5.2. Test para el coeficiente de correlación

```

> n=length(Respuesta_Instrumental_LM)
> n
[1] 10
> t_Tab=qt(0.975,length(Respuesta_Instrumental_LM)-2)
> t_Tab
[1] 2.306004
> cor.test((LM3)[,1],(LM3)[,2], method = "pearson", alternative = "two.sided", exact = NULL, conf.level = 0.95)

Pearson's product-moment correlation

data: (LM3)[, 1] and (LM3)[, 2]
t = 122.3441, df = 8, p-value = 2.22e-14
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.9988252 0.9999393
sample estimates:
 cor
0.9997329

```

Al realizar el test para el coeficiente de correlación se obtuvo un R de (0,9997) por lo cual se rechaza ( $H_0: R = 0$ ), además que el P-Valor es menor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la cantidad recuperada de principio activo no es igual a la cantidad adicionada de principio activo. Se comprueba bajo la evidencia experimental y estadística que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del método.

### 6.5.3. Test para la pendiente y test de convergencia al origen

```
> summary(regresionLM)

Call:
lm(formula = formula(mg_Sobre_mL_RECUPERADO ~ mg_Sobre_mL_ADICIONADO,
  data = LM3))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.153e-04 -1.067e-04  1.113e-05  5.423e-05  2.138e-04

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  -8.132e-05  1.701e-04  -0.478   0.645
mg_Sobre_mL_ADICIONADO  1.002e+00  8.186e-03  122.344 2.23e-14 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.0001464 on 8 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9995,    Adjusted R-squared:  0.9994
F-statistic: 1.497e+04 on 1 and 8 DF,  p-value: 2.227e-14
```

Al realizar los test se obtuvo que la pendiente es estadísticamente igual a uno con un valor próximo de (1,002) por lo cual no se rechaza ( $H_0: \beta_2 = 1$ ), además el P-Valor es menor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que no hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la pendiente es significativamente diferente de uno. Se confirma además que el t experimental (122,344) es mayor que la t de tabla (2,306) obtenida anteriormente con una confianza del 95,0%.

Por otra parte se obtuvo que el intercepto tiene un valor próximo de (-0,00008132) por lo cual no se rechaza ( $H_0: \beta_1 = 0$ ) debido a que el t experimental (-0,478) es menor que la t de tabla (2,306) obtenida anteriormente por lo cual el intercepto no es significativamente y estadísticamente diferente de cero. Con esto se demuestra que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el intercepto converge al origen con una confianza del 95,0% y que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del método con un  $R^2$  de (0,9994).

#### 6.5.4. Análisis de varianza para la regresión y prueba de normalidad

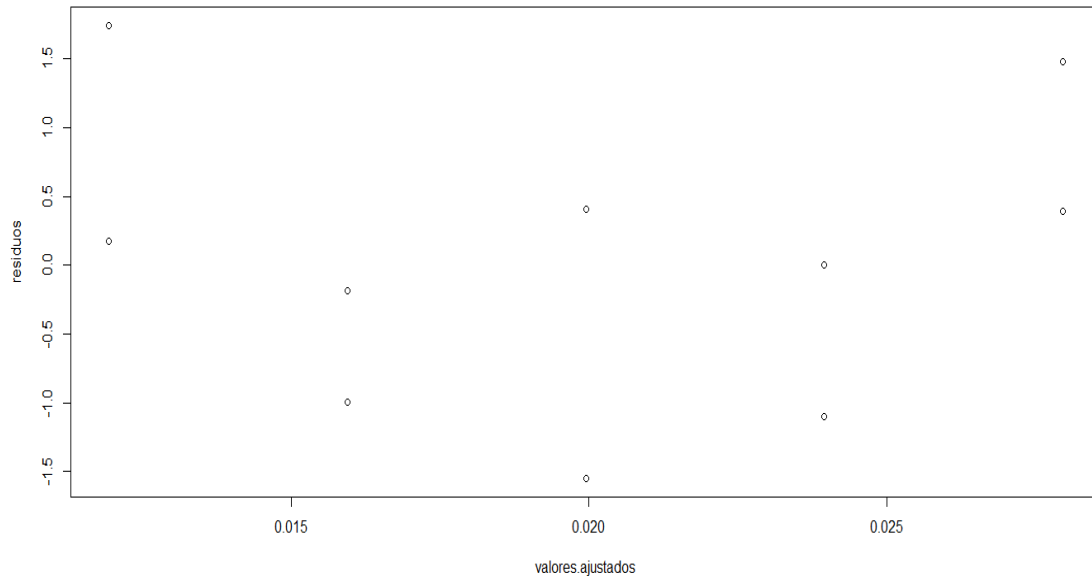
```
> anova(regresionLM)
Analysis of Variance Table

Response: mg_Sobre_mL_RECUPERADO
      Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
mg_Sobre_mL_ADICIONADO  1 0.00032099 0.00032099   14968 2.227e-14 ***
Residuals                8 0.00000017 0.00000002
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2$ ) debido a que se obtuvo un F experimental (14968) mayor a su P-Valor ( $2,227e-14$ ) por lo cual se demuestra primero que no hay diferencias significativas entre las réplicas de un mismo nivel de concentración y segundo que si hay diferencias significativas entre los diferentes niveles de concentración, lo cual muestra que la linealidad del método es un modelo que representa muy bien la correlación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de principio activo sin desvió de la linealidad con una confianza del 95,0%.

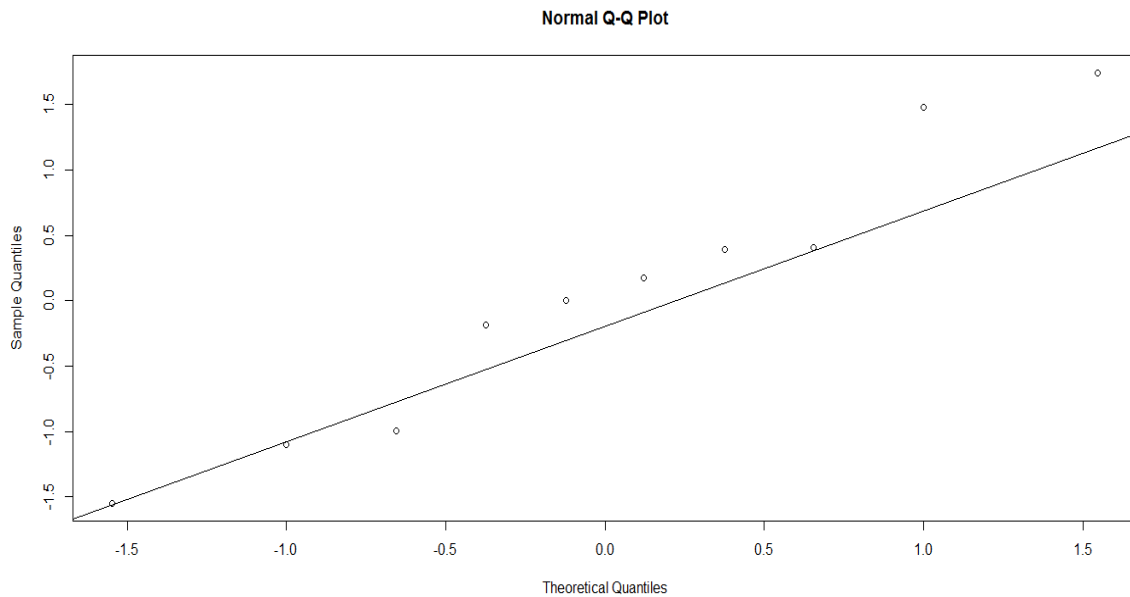
Por otra parte también se puede reafirmar del ANOVA que al tener un F experimental (14968) mayor a su P-Valor ( $2,227e-14$ ) no se rechaza ( $H_0: \beta_2 = 1$ ) demostrando que la pendiente es estadísticamente igual a uno con una confianza del 95,0%. Luego el gráfico de los residuales es:





**Grafico 5:** Residuales de la linealidad del método.

El grafico 5, nos muestra que los residuos de la regresion lineal del método no tienen un patron especial por lo que la homocedasticidad de la linealidad resulta una hipótesis razonables.



**Grafico 6:** Q–Q Plot de la linealidad del método.

El grafico 6, nos muestra cuan cerca y alineados estan los datos de la regresion lineal del método de distribuirse normales.

### 6.5.5. Test de Shapiro-Wilk

```
> shapiro.test(regresionLM$residuals)

Shapiro-Wilk normality test

data: regresionLM$residuals
W = 0.9573, p-value = 0.7547
```

Al realizar el test se obtuvo que el P-Valor es mayor que el ( $\alpha = 0,05$ ) demostrando que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que los datos de la regresion lineal del método se distribuyen normal con una confianza del 95,0% por lo cual no se rechaza ( $H_0: Y \sim N(\mu; \sigma)$ ). Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del método.

### 6.5.6. Límites de confianza para la pendiente y el intercepto

```
> confint(regresionLM)
                2.5 %      97.5 %
(Intercept)    -0.0004736828 0.000311043
mg_Sobre_mL_ADICIONADO 0.9826641506 1.020419290
> confint(regresionLM, level = 0.9)
                5 %      95 %
(Intercept)    -0.000397719 0.0002350792
mg_Sobre_mL_ADICIONADO 0.986318960 1.0167644804
```

### 6.5.7. Test de Breusch-Pagan

```
> bptest(regresionLM)

studentized Breusch-Pagan test

data: regresionLM
BP = 0.0519, df = 1, p-value = 0.8198
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: V_{ar}(\epsilon) = \sigma^2$ ) debido a que el P-Valor es mayor que el BP, demostrando rotundamente que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que la varianza es constante en el modelo de regresion lineal del método con una confianza del 95,0%. Se comprueba que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad del método.

### 6.5.8. Test de Durbin-Watson

```
> durbinWatsonTest(regresionLM, max.lag=2)
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
1 -0.04177106 1.624498 0.286
2 -0.15385119 1.832608 0.820
Alternative hypothesis: rho[lag] != 0
```

Al realizar el test no se rechaza ( $H_0: \rho = 0$ ), demostrando rotundamente que hay suficiente evidencia estadística para afirmar que no hay ausencia de correlación en los residuos del modelo de regresión del método, debido a que D-W toma valores próximos a 2 con una confianza del 95,0%.

### 6.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN TEÓRICOS

```
> #LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION
>
> n=length(Respuesta_Instrumental_LS)
> n
[1] 10
> Intercepto_LS=regresionLS$coefficients[1]
> Intercepto_LS
(Intercept)
-170560.5
> Pendiente_LS=regresionLS$coefficients[2]
> Pendiente_LS
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL
655306912
> Desviacion_Estandar_De_Los_Residuales_LS=sqrt(
> Desviacion_Estandar_De_Los_Residuales_LS
[1] 167099.7
> Coeficiente_Limite_De_Deteccion=c(3)
> Coeficiente_Limite_De_Cuantificacion=c(10)
>
> Limite_De_Deteccion_mg_Sobre_ml=c(Coeficiente_Limite_De_Deteccion*
> Limite_De_Deteccion_mg_Sobre_ml
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL
0.0007649835
>
> Limite_De_Cuantificacion_mg_Sobre_ml=c(Coeficiente_Limite_De_Cuantificacion*
> Limite_De_Cuantificacion_mg_Sobre_ml
CONCENTRACION_mg_Sobre_mL
0.002549945
```

El método químico analítico validado por HPLC para la identificación y valoración del principio activo Montelukast sódico en tabletas por R para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano, presenta como mínima concentración instrumental detectable (0,0007649835 mg/mL).

Por otra parte la mínima concentración instrumental cuantificable con un criterio de exactitud y presión es de (0,002549945 mg/mL). Se comprueba bajo la evidencia experimental y estadística que el método analítico cumple con el parámetro de límite de detección y límite de cuantificación.

## 6.7. PRECISIÓN INTERMEDIA

### 6.7.1. Precisión intermedia analista 1 - día 1

```
> Peso_Estándar_Montelukast_En_mg=c(10.1)
> Potencia_estandar_Montelukast_B.H=c(99.4)
> Factor_de_dilució=c((50*10/1)/(10*50/1))
> Peso_Promedio_mg_Sobre_tab=c(225.8)
> Peso_muestra_1_mg=c(226.2)
> Peso_muestra_2_mg=c(225.1)
> Peso_muestra_3_mg=c(226.8)
> Factor_conversion_Motelukast_Sodico_a_Mon
> Cantidad_Etiquetada_mg=c(10)
> #Lote_estándar_Montelukast=FOJ342
```

De acuerdo a las anteriores condiciones se obtuvo que la valoración del principio activo por el analista uno en el día uno arrojó los siguientes resultados:

```
> Promedio_mg_Sobre_tab=c((mg_Sobre_tab_1+mg_Sobre_tab_2+mg_Sobre_
> Promedio_mg_Sobre_tab
[1] 10.04423
> A1= data.frame(M1_Porcentaje,M2_Porcentaje,M3_Porcentaje)
> Promedio_Porcentaje=mean(as.numeric(A1))
> Promedio_Porcentaje
[1] 100.4423
> RSD=sprintf("%.1f", as.numeric(sd(A1)/Promedio_Porcentaje*100))
> RSD
[1] "0.7"
```

De los resultados se comprueba bajo la evidencia experimental y estadística para el análisis de tres muestras que la valoración del principio activo obtenida es de (10,0442 mg/mL) equivalente a un 100,4% con un RSD de 0,7%, el cual es menor al 2,0% establecido como máximo para un principio activo farmacéutico en un laboratorio colombiano.

## 6.7.2. Precisión intermedia analista 2 - día 2

```
> Peso_Estándar_Montelukast_En_mg=c(10.1)
> Potencia_estandar_Montelukast_B.H=c(99.4)
> Factor_de_dilución=c((50*10/1)/(10*50/1))
> Peso_Promedio_mg_Sobre_tab=c(225.8)
> Peso_muestra_4_mg=c(226.8)
> Peso_muestra_5_mg=c(226.0)
> Peso_muestra_6_mg=c(226.0)
> Factor_conversion_Motelukast_Sodico_a_Mont
> Cantidad_Etiquetada_mg=c(10)
> #Lote estándar Montelukast=FOJ342
```

De acuerdo a las anteriores condiciones se obtuvo que la valoración del principio activo por el analista dos en el día dos arrojo los siguientes resultados:

```
- -
> Promedio_mg_Sobre_tab_Global=c((mg_Sobre_tab_4+mg_Sobre_tab_5+m
> Promedio_mg_Sobre_tab_Global
[1] 10.0259
> A2= data.frame(M4_Porcentaje,M5_Porcentaje,M6_Porcentaje)
> Promedio_Porcentaje=mean(as.numeric(A2))
> Promedio_Porcentaje
[1] 100.259
> RSD=sprintf("%.1f", as.numeric(sd(A2)/Promedio_Porcentaje*100))
> RSD
[1] "1.8"
```

De los resultados se comprueba bajo la evidencia experimental y estadística para el análisis de tres muestras que la valoración del principio activo obtenida es de (10,0259 mg/mL) equivalente a un 100,3% con un RSD de 1,8%, el cual es menor al 2,0% establecido como máximo para un principio activo farmacéutico en un laboratorio colombiano.

## 6. CONCLUSIONES

- El método analítico validado cumple con los criterios estadísticos establecidos. Por lo tanto, se evidencia que el método es apto para la identificación y valoración del principio activo en dicho producto en el control de calidad y en estudios de estabilidad para laboratorios de ciencias farmacéuticas colombiano.
- El método analítico validado se degrada bajo las condiciones acida, oxidativa y fotolisis, ver numeral (6.1.2). Evidenciando que hay variación en el tiempo de retención y en la identificación del principio activo en dicho producto, comprobando que el método validado es específico.
- La precisión del sistema es diferente de cero y presenta un RSD menor al 1,5%, comprobando que el método validado es selectivo, ver numeral (6.2).
- El método validado se comprueba que es significativo y estadísticamente exacto por presentar una recuperación de 100,6%, la cual se complementa mediante un test de Student, ver numeral (6.3.1) y Cochram con varianza homogénea para los tres grupos de concentraciones de 60,0%, 100,0%, y 140,0% evaluados, ver numeral (6.3.2).
- La linealidad del sistema y método presento un rango de concentraciones de (0,012 a 0,028 mg/mL) del principio activo, ver numeral (6.4.1 y 6.5.1), con una regresión lineal de orden uno aceptable para cada caso con un coeficiente de correlación mayor a (0,995) y con convergencia al origen con una confianza del 95,0%, ver gráfico 1 y 4.
- La linealidad del sistema y método presento cada una en su modelo de regresión lineal datos normales, con varianza constante e independenciam. Los cuales fueron comprobados estadística y significativamente mediante el análisis de ANOVA, ver numeral (6.4.4 y 6.5.4), grafico 3 y 6 de Q-Q plot, grafico 2 y 5 de residuales, test de Shapiro-Wilk numeral (6.4.5 y 6.5.5), test de Breusch-Paga numeral (6.4.7 y 6.5.7) y test de Durbin-Watson numeral (6.4.8 y 6.5.8) con una confianza del 95,0%.

- El límite de detección y límite de cuantificación son satisfactorios, ya que estos arrojaron una concentración muy baja de detección y cuantificación del orden de (mg/mL) lo cual hace que el método químico analítico validado para un laboratorio de ciencias farmacéuticas colombiano sea muy selectivo y sensible, ver numeral (6.6).
- La precisión intermedia comprobó que se obtuvo un RSD menor al 2,0% establecido, teniendo en cuenta las variaciones de personal, tiempo y condiciones ambientales del laboratorio en el cual se validó el método, ver numeral (6.7.1 y 6.7.2).

## 7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el análisis estadístico en R ya no para una valoración de un principio activo, sino para la valoración de una gastroresistencia, valoración de dos activos y/o valoraciones con estándar interno.
- Se recomienda un manejo de número de cifras significativas en los resultados ya que muchos de los test y comandos individuales arrojan valores próximos y otros con una cifra decimal o más.



## BIBLIOGRAFÍA

- Administration, U. F. (1996). *Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Hampshire: Silver Spring.
- Administration, U. F. (2005). *Analytical Procedures and Methods Validation for drugs and Biologics*. Hampshire: Silver Spring. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration.
- Bakieva, M., Gonzalez, j., & Jornet, J. (2011). *SPSS: ANOVA de un Factor*. Valencia: InnovaMIDE.
- Berrendero, J. (03 de Febrero de 2011). *Universidad Autonoma de Madrid*. Obtenido de Universidad Autonoma de Madrid: [https://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/joser/paginaR/regresion.html](https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/joser/paginaR/regresion.html)
- Convention, U. S. (2011). *USP35 NF30, 2012: U. S. Pharmacopoeia National Formulary The United States pharmacopeia, ISSN 0195-7996*. Estados Unidos: United States Pharmacopeial.
- Duran, J. (03 de Noviembre de 2011). *Instituto Tecnológico Autónomo de México*. Obtenido de Instituto Tecnológico Autónomo de México: <https://piensaama.files.wordpress.com/2011/11/03-modelos-lineales.pdf>
- EMA, (1995). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Londres: EMA.
- Foundation, (12 de Septiembre de 2016). *r-project.org*. Obtenido de r-project.org: <https://www.r-project.org/about.html>
- Freijo, J. (01 de Octubre de 2013). *El paquete estadístico R*. Madrid: CIS. Obtenido de LIBROS / BOOK REVIEWS: [https://libreria.cis.es/static/pdf/CM\\_48\\_RIS\\_72.pdf](https://libreria.cis.es/static/pdf/CM_48_RIS_72.pdf)
- ISO, O. I. (15 de Mayo de 2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. *Norma*. Suiza: ISO copyright office.
- León, L. (15 de Enero de 2015). Validación de Métodos Analíticos Quasfar M&F SA. *Validación de Métodos Analíticos Quasfar M&F SA*. Bogotá, Bogotá DC, Colombia: Quasfar M&F SA.
- Madrid, U. C. (11 de Marzo de 2017). *Universidad Carlos III de Madrid*. Obtenido de Universidad Carlos III de Madrid : <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Categor/Tema3Cate.pdf>
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (01 de Enero de 2014). *Euachem*. Obtenido de Euachem : [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)
- Maroto, A., Jordi, R., Boqué, R., & Xavier, R. (1999). Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Elsevier*, 173-185.
- McGraw-Hill. (10 de Enero de 2017). *McGraw-Hill Education*. Obtenido de McGraw-Hill Education: [http://www.mcgraw-hill.com.mx/pye01e/cap13/13analisis\\_de\\_correlacion\\_y\\_regresion.pdf](http://www.mcgraw-hill.com.mx/pye01e/cap13/13analisis_de_correlacion_y_regresion.pdf)
- Molina, U. N. (12 de Enero de 2016). *Universidad Nacional Agraria la Molina*. Obtenido de Universidad Nacional Agraria la Molina: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu/index-filer/academic/metodos1/Regresion.pdf>

- Mongay, C. (2011). *Quimiometría*. Valencia: Universitat de València.
- Pearce, D. (1999). *Diccionario Akal de Economía Moderna*. Europa: Ediciones AKAL.
- Risk, M. (2003). *Cartas sobre Estadística*. Buenos Aires: Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.
- Sancho, A., sanchez, L., Dorantes, A., & Suarez, S. (02 de Septiembre de 2016). *U.S. Food and Drug Administration*. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200634.htm>
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Santa Fe: Cengage Learning Editores.
- Social, M. d. (17 de Septiembre de 2013). Resolución 003619 . *Resolución 003619 de 2013*. Bogotá, Bogota DC , Colombia: Imprenta Nacional .
- UCLM, (13 de Enero de 2014). *Universidad de Castilla*. Obtenido de Universidad de Castilla: [https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS\\_PruebasNoParametricas.pdf](https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS_PruebasNoParametricas.pdf)
- UPTC, (11 de Marzo de 2017). *virtual.uptc.edu.co*. Obtenido de virtual.uptc.edu.co: <http://virtual.uptc.edu.co/ova/estadistica/docs/libros/tstudent.pdf>
- Williams, R. (30 de Enero de 2015). *University of Notre Dame*. Obtenido de University of Notre Dame: <https://www3.nd.edu/~rwilliam/stats2/125.pdf>

## ANEXOS

**Promedio o media aritmética:**

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

**Varianza:**

$$S^2 = \sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

**Covarianza:**

$$S_{xy} = \frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

**Desviación estándar o típica:**

$$S = \sigma = \sqrt{S^2}$$

**Coefficiente de variación:**

$$CV = \frac{S}{\bar{x}}$$

**RSD:**

$$\% RSD = (CV \times 100) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

**Recuperación o exactitud:**  $\omega$  = Valor de referencia o “real” Considerado como verdadero

$$\% R = 100 - \left| \frac{\bar{x} - \omega}{\omega} \right|$$

El estadístico de prueba con distribución **t** con (n-1) grados de libertad es,

$$t_{exp} = \left| \left( \left( \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n R_i \right) - 100 \right) \times \sqrt{\frac{n}{\%RSD}} \right) \right|$$

**Cochran:**

$$\hat{C}_{Cochran} = G_{Exp} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots + S_k^2} = \frac{\text{el mayor } S_k^2}{\sum_{k=1}^k S_k^2}$$

Las varianzas de un conjunto de **k** grupos del mismo tamaño **p** y  $v = p-1$ , al nivel de significación prefijado ( $\alpha = 0,05$ ) y  $G$  ( $k = 3$ ,  $p = 3$ ).

**Valores críticos para el estadístico  $\hat{C}_{Cochran}$**   
(Nivel de significación  $\alpha = 0,05$ )

		$\nu = p - 1$												
$k$	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>16</i>	<i>36</i>	<i>144</i>	$\infty$
<i>2</i>	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
<i>3</i>	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
<i>4</i>	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
<i>5</i>	0,8412	0,6838	0,5981	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
<i>6</i>	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4184	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
<i>7</i>	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3259	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
<i>8</i>	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
<i>9</i>	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
<i>10</i>	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
<i>12</i>	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
<i>15</i>	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
<i>20</i>	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
<i>24</i>	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1286	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
<i>30</i>	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
<i>40</i>	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
<i>60</i>	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0623	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
<i>120</i>	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
$\infty$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Mínimos Cuadrados:**

<i>Medicion</i>	$x_i$	$y_i$	$x_i^2$	$y_i^2$	$x_i y_i$
A	$x_a$	$y_a$	$x_a^2$	$y_a^2$	$x_a y_a$
B	$x_b$	$y_b$	$x_b^2$	$y_b^2$	$x_b y_b$
C	$x_c$	$y_c$	$x_c^2$	$y_c^2$	$x_c y_c$
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
<i>n</i>	$\sum x_i$	$\sum y_i$	$\sum x_i^2$	$\sum y_i^2$	$\sum x_i y_i$
<i>Promedio</i>	$\bar{x}$	$\bar{y}$	-	-	-
<i>Desviacion estandar</i>	$S_{xx}$	$S_{yy}$	-	-	$S_{xy}$

**Linealidad:**

$$Y = \beta_1 + \beta_2 X + \varepsilon_{ij}$$

**Coefficiente de correlación de pearson:**

$$R_{xy} = \frac{\sum_i x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) S_x S_y} = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \sqrt{n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2}} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} S_{yy}}}$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n-1) S_x S_y}$$

El estadístico de prueba con distribución **t** con (n-2) grados de libertad es,

$$t_{exp} = \frac{R}{\sqrt{\frac{1-R^2}{n-2}}}$$

**Pendiente:**

$$\beta_2 = \frac{\sum y_i \sum x_i - n \sum x_i y_i}{(\sum x_i)^2 - n \sum x_i^2} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

El estadístico de prueba con distribución **t** con (n-2) grados de libertad es,

$$t_{exp} = \frac{\beta_2}{S_{\beta_2}} = \frac{\beta_2}{\sqrt{\frac{\left( \left( \sum y_i^2 \right) - \left( \beta_1 \sum y_i \right) - \left( \beta_2 \sum x_i y_i \right) \right)}{(n-2)}}}{\sqrt{\frac{\left( \sum x_i^2 \right) - \left( \sum x_i \sum x_i \right)}{n}}}$$

**Intercepto:**

$$\beta_1 = \frac{\sum y_i - \beta_2 \sum x_i}{n} = \bar{y} - \beta_2 \bar{x}$$

El estadístico de prueba con distribución **t** con (n-2) grados de libertad es,

$$t_{exp} = \frac{\beta_1}{S_{\beta_1}} = \frac{\beta_1}{\sqrt{\left( \frac{(S_{\beta_2})^2 \times (\sum x_i^2)}{n} \right)}}$$

**Error:**

$$s_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}$$

$$s_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - n \bar{x}^2$$

**Residual:**

$$e_i = y_i - Y$$

$$\sum_{i=1}^n e_i = 0$$

**Suma de cuadrados de la regresión:**

$$SCR = \sum_{i=1}^n (Y - \bar{y})^2$$

**Suma de cuadrados de los residuales:**

$$SCE = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2$$

**Suma de cuadrados totales:**

$$SCT = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = SCR + SCE$$

**Cuadrados medios de la regresión:**

$$CM_{Reg} = \frac{\sum_{i=1}^n (Y - \bar{y})^2}{1}$$

**Cuadrados medios de los residuales o Error:**

$$CM_{Res} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}{n - 2}$$

**F de Fisher-Snedecor:**

$$F = \frac{CM_{Reg}}{CM_{Res}}$$

**ANOVA:**

Causa de variacion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Regresion	1	SCR	$[(CM)]_{Reg}$	$[(CM)]_{Reg} / [(CM)]_{Res}$
Residual	n-2	SCE	$[(CM)]_{Res}$	-
Total	n-1	SCT	-	-

**Intervalos de confianza para la pendiente e Intercepto:**

$$\widehat{\beta}_2 - t_{n-2, \frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{CM_{Res}}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \leq \beta_2 \leq \widehat{\beta}_2 + t_{n-2, 1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{CM_{Res}}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\widehat{\beta}_1 - t_{n-2, \frac{\alpha}{2}} \sqrt{CM_{Res} \left( \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right)} \leq \beta_1 \leq \widehat{\beta}_1 + t_{n-2, 1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{CM_{Res} \left( \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right)}$$

Donde,

$\widehat{\beta}_2$  = Valor estimado del parametro  $\beta_2$

$\widehat{\beta}_1$  = Valor estimado del parametro  $\beta_1$

$t_{n-2, \frac{\alpha}{2}}$  = Valor teórico de la distribución T con  $(n - 2)$  grados de libertad

**Shapiro-Wilk:** El estadístico de prueba con distribución **W** con  $(\alpha = 0,05)$  es,

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_i)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$x_i$  = Es el número que ocupa la  $i$  - ésima posición en la muestra.

$$a_i = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{\frac{1}{2}}}$$

$$m = (m_1 \cdots m_n)^T$$

Siendo  $(m_1 \dots m_n)$ , los valores medios del estadístico ordenado, de variables aleatorias independientes e idénticamente distribuidas, muestreadas de distribuciones normales.  $V$  es la matriz de covarianzas de ese estadístico de orden.

La hipótesis nula se rechazará si  $W$  es demasiado pequeño. El valor de  $W$  puede oscilar entre 0 y 1.

**Test de Breusch-Pagan:** El modelo se examina haciendo un ANOVA y una regresión de los residuos al cuadrado respecto de la variable independiente, empleando una ecuación de la forma:

$$\widehat{\varepsilon}_{ij}^2 = \gamma_1 + \gamma_2 X + \vartheta$$

Esta es la base del test. Si el test-F confirma que las variables independientes son significativas, entonces se puede rechazar la hipótesis nula de homocedasticidad.

El estadístico de prueba para los residuos con distribución **BP** con  $(\alpha = 0,05)$  es,

$$BP = \frac{\frac{SCR}{2}}{\left(\frac{SCE}{n}\right)^2}$$

**Test de Durbin-Watson:** El estadístico de prueba para los residuos con distribución **D-W** con  $(\alpha = 0,05)$  es,

$$DW = d = \frac{\sum_{t=2}^n (e_t - e_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n e_t^2}$$

Donde  $n$  es el número de observaciones. Puesto que  $d$  es aproximadamente igual a  $2(1 - r)$ , donde  $r$  es la autocorrelación de la muestra de los residuos,  $d = 2$  indica que no hay autocorrelación.

$$r = \frac{\sum e_t e_{t-1}}{\sum e_t^2}$$

**Límite de detección:**

$$LDD = 10 \times \left(\frac{S_{xy}}{\beta_1}\right)$$

**Límite de cuantificación:**

$$LDC = 3 \times \left(\frac{S_{xy}}{\beta_1}\right)$$