



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional**

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



AT 2025-FFBB-052

CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

**Validación de método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) - 2023**

Presentado por:

**PURILLA DE LA CRUZ ALONSO JOSE**

**Bachiller** del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es 10% por el cual se otorga el calificativo de:

**APROBADO**, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Con Código de Matricula: 20156150

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 10 de junio de 2025

Dr. PEÑA GALINDO JULIO JOSE  
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Título

Validación de método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato  
2.5 mg tableta recubierta por método de cromatografía líquida de  
alta resolución (HPLC) - 2023

Línea de investigación

Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

**INFORME FINAL DE TESIS**

Autor:

BACH. PURILLA DE LA CRUZ ALONSO JOSÉ

**Ica - Perú**

**2024**

## **Dedicatoria**

A mis padres, por su incondicional apoyo,  
por su guía y consejos, se los dedico  
con amor y gratitud

## **Agradecimiento**

Agradecerle a mi casa de estudios y a mis docentes por transmitirme los conocimientos necesarios para desenvolverme exitosamente en el campo de industria farmacéutica actualmente.

## Índice de contenidos

Dedicatoria .....	i
Agradecimiento .....	ii
Índice de contenidos.....	iii
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras.....	vii
Índice de gráficos .....	viii
Resumen .....	ix
Abstract .....	x
<b>I. Introducción .....</b>	<b>11</b>
<b>II. Planteamiento del problema.....</b>	<b>13</b>
2.1. Descripción del problema .....	13
2.2. Formulación del problema .....	13
2.3. Justificación del problema .....	14
2.4. Objetivos de la investigación .....	14
<b>III. Bases teóricas.....</b>	<b>15</b>
3.1. Antecedentes de la investigación .....	15
3.2. Marco teórico.....	16
<b>IV. Estrategia metodológica .....</b>	<b>21</b>
4.1. Objetivo del método analítico .....	21
4.2. Tipo, Nivel y diseño de Investigación.....	21
4.3. Hipótesis .....	21
4.4. Variables.....	23
4.5. Justificación.....	25
4.6. Calificación instrumental .....	25
4.7. Validación del método analítico.....	28
4.7.1. Tipo de método analítico.....	28
4.7.2. Descripción del método analítico .....	28

4.7.3.	Flujograma de método analítico .....	28
4.7.4.	Recursos utilizados .....	30
4.7.5.	Determinación de los parámetros a evaluar .....	30
4.7.6.	Criterios de aceptación .....	37
4.7.7.	Criterios de verificación .....	38
4.7.8.	Desviaciones .....	38
<b>V.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>39</b>
5.1.	Tratamiento estadístico .....	39
5.2.	Informe técnico .....	59
<b>VI.</b>	<b>Discusión de resultados.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>70</b>
<b>IX.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>71</b>
<b>X.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>73</b>
	Anexo N° 1. Matriz de consistencia.....	73
	Anexo N° 2. Consentimiento informado.....	75
	Anexo N° 3. Validez de Instrumento .....	76
	Anexo N° 4. Fotos .....	77

## Índice de tablas

TABLA N° 1. Cuadro de operacionalización de variables.....	23
TABLA N° 2. Equipos e instrumentos. ....	26
TABLA N° 3. Reactivos.....	30
TABLA N° 4. Parámetros Cromatográficos .....	31
TABLA N° 5. Secuencia de preparación de muestras para Especificidad .....	33
TABLA N° 6. Linealidad del Método de Valoración .....	35
TABLA N° 7. Linealidad del Sistema de Valoración .....	35
TABLA N° 8. Criterios de aceptación.....	37
TABLA N° 9. Estadístico de Linealidad del sistema .....	39
TABLA N° 10. Áreas de muestras de Linealidad del sistema .....	40
TABLA N° 11. Homocedasticidad (Linealidad del sistema) .....	42
TABLA N° 12. ANOVA (Linealidad del sistema).....	43
TABLA N° 13. Áreas de las Muestras de Repetibilidad .....	45
TABLA N° 14. Resultados de Precisión Intermedia.....	46
TABLA N° 15. Áreas de las Muestras de Linealidad de Método .....	47
TABLA N° 16. Estadístico de Linealidad de Método.....	48
TABLA N° 17. Homocedasticidad (Linealidad de Método).....	50
TABLA N° 18. ANOVA (Linealidad de Método).....	51
TABLA N° 19. Área de muestras de Exactitud .....	53
TABLA N° 20. Resultados de Exactitud .....	54
<b>ROBUSTEZ (CAMBIO DE FILTRO)</b>	
TABLA N° 21. Determinación de los Factores a estudiar .....	55
TABLA N° 22. Definición de valores nominales y alternativos de los factores .....	55
TABLA N° 23. Cálculo de la diferencia entre promedios.....	55
<b>ROBUSTEZ (CAMBIO DE FLUJO)</b>	
TABLA N° 24. Determinación de los Factores a estudiar .....	55

<b>TABLA N° 25.</b> Definición de valores nominales y alternativos de los factores .....	56
<b>TABLA N° 26.</b> Cálculo de la diferencia entre promedios.....	56
<b>ESTABILIDAD (12 HORAS)</b>	
<b>TABLA N° 27.</b> Determinación de los Factores a estudiar .....	56
<b>TABLA N° 28.</b> Definición de valores nominales y alternativos de los factores .....	56
<b>TABLA N° 29.</b> Áreas del estándar (TIEMPO CERO DE ANÁLISIS).....	56
<b>TABLA N° 30.</b> Áreas del estándar (TIEMPO 12 HORAS).....	57
<b>TABLA N° 31.</b> Áreas del estándar (TIEMPO 12 HORAS).....	57
<b>TABLA N° 32.</b> Áreas de Muestras (TIEMPO 12 HORAS).....	57
<b>TABLA N° 33.</b> Cálculo de la diferencia entre promedios.....	58
<b>TABLA N° 34.</b> Informe Técnico (Parte 1) .....	60
<b>TABLA N° 35.</b> Informe Técnico (Parte 2) .....	62
<b>TABLA N° 36.</b> Informe Técnico (Parte 3) .....	64
<b>TABLA N° 37.</b> Informe Técnico (Parte 4) .....	66

## Índice de figuras

<b>FIGURA N° 1.</b> Estructura química del bisoprolol fumarato.....	20
<b>FIGURA N° 2.</b> Flujograma de Método Analítico.....	29
<b>FIGURA N° 3.</b> Esquema de Linealidad del sistema.....	36
<b>FIGURA N° 4.</b> Preparación de muestras.....	77
<b>FIGURA N° 5.</b> Colocación de columna cromatográfica .....	78
<b>FIGURA N° 6.</b> Uso del equipo HPLC.....	79

## Índice de gráficos

<b>GRÁFICO N° 1.</b> Estructura química del bisoprolol fumarato .....	41
<b>GRÁFICO N° 2.</b> Flujograma de Método Analítico .....	42
<b>GRÁFICO N° 3.</b> Introducción .....	49
<b>GRÁFICO N° 4.</b> Introducción .....	50

## RESUMEN

La validación de métodos analíticos forma parte integral del sistema de control de calidad, siendo un proceso crítico en las industrias farmacéutica, garantizar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos. En este trabajo presentamos la validación de un método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance establecido en la USP 2023. Entre los parámetros estadísticos usados en la presente validación se encuentran: La linealidad; se producen resultados proporcionales a la concentración del analito, queda demostrado por un coeficiente de correlación de  $r= 0.999$ , (valor mínimo permisible = 0.997). La exactitud mide la cercanía de los resultados conseguidos por esta metodología y el valor real. Empleando el test de student para demostrar la exactitud del método analítico se obtuvo un  $t_{exp}$  (-0.097) que es menor al  $t$  de las tablas (2.306); por lo tanto, no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de recuperación del analito es muy cercano al 100%. La precisión del método analítico indica grado de concordancia o dispersión de resultados de la prueba. Los valores de RSD obtenidos, (0.65% para repetibilidad y 0.93% para precisión intermedia), demuestran la precisión del método analítico (valor máximo permitido, RSD = 2.0%). El método es específico, como tampoco se detectó presencia de productos de degradación del Bisoprolol fumarato al someter al principio activo a diferentes procedimientos de degradación forzada, por lo tanto, el método es selectivo.

**Palabras clave:** validación, precisión, exactitud, método.

## ABSTRACT

The validation of analytical methods is an integral part of the quality control system, being a critical process in the pharmaceutical industries to ensure the quality and safety of pharmaceutical products. In this work we present the validation of an analytical method for titration of Bisoprolol fumarate 2.5 mg coated tablet, using the high-performance liquid chromatography technique established in USP 2023. Among the statistical parameters used in the present validation are: Linearity; results are produced proportional to the concentration of the analyte, is demonstrated by a correlation coefficient of  $r=0.999$ , (minimum permissible value = 0.997). Accuracy measures the closeness of the results achieved by this methodology and the true value. Using the student's test to demonstrate the accuracy of the analytical method, a  $t_{exp} (-0.097)$  was obtained, which is lower than the  $t$  of the tables (2.306); therefore, there is no significant difference between the average recovery and the added amount of analyte, that is to say the percentage recovery of the analyte is very close to 100%. The precision of the analytical method indicates the degree of agreement or dispersion of test results. The RSD values obtained (0.65% for repeatability and 0.93% for intermediate precision) demonstrate the precision of the analytical method (maximum allowable value, RSD = 2.0%). The method is specific, as the presence of degradation products of Bisoprolol fumarate was not detected when the active principle was subjected to different forced degradation procedures, therefore, the method is selective.

**Key words:** validation, precision, accuracy, method.

## I. INTRODUCCIÓN

Muchos compuestos nuevos son sintetizados por compañías farmacéuticas, universidades, laboratorios de investigación que muestren actividad potencial para el tratamiento o prevención de enfermedades. Una vez que un fármaco candidato muestra actividad potencial en líneas celulares, se lo considera más a fondo para su formulación y estudios clínicos. Durante el proceso de desarrollo del fármaco, es altamente importante contar con un método analítico de nuevos fármacos candidatos para identificar y cuantificar medicamentos durante diversos estudios de investigación y desarrollo. Según el ICH directriz Q2(R1), "El procedimiento analítico se refiere a la forma de realizar el análisis". (1) Se puede definir como el desarrollo de técnicas donde podemos determinar cualitativa y cuantitativamente el analito de interés. El desarrollo de un método analítico también debería poder detectar otras impurezas dentro de la formulación, como degradante de IFA y excipiente presente en el producto farmacéutico.

La validación del método analítico se lleva a cabo con el propósito de asegurar que una técnica de análisis sea exacta, específica, reproducible y confiable dentro del intervalo de medición determinado para la evaluación de un compuesto. La validación del método proporciona una garantía de confiabilidad durante el uso normal y, a veces, se la denomina "el proceso de proporcionar evidencia documentada de que el método hace lo que pretende hacer". Los laboratorios regulados deben realizar la validación de métodos para cumplir con las normas de su ente regulador, en nuestro caso DIGEMID.

En el proceso de validación de métodos analíticos, son usadas diversas técnicas analíticas para el análisis de drogas, tales como cromatografía, espectroscopia, métodos electroquímicos, métodos electroforéticos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de análisis de fármacos popular y común debido a que permite la separación, la identificación, purificación y cuantificación de numerosos compuestos para estudio en la industria farmacéutica, así como otras industrias, incluidas la cosmética, la alimentaria y la energética, se realizan habitualmente utilizando la tecnología HPLC. Para fines analíticos, se utiliza con mayor frecuencia HPLC de fase inversa (RP-HPLC).

Para la validación de métodos farmacéuticos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), las directrices de la FDA, la Farmacopea de los EE.UU. (USP) y la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) proporcionan un marco para realizar dicha validación. La validación de métodos ha recibido considerable atención en la literatura y las agencias reguladoras. La FDA ha propuesto agregar la Sección 211.222 sobre validación de métodos a las regulaciones actuales de Buenas Prácticas de Fabricación (BPM). Esto requeriría que el fabricante establezca y documente la exactitud, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y cualquier otro atributo necesario para validar los métodos de prueba. Desafortunadamente, no existe una fuente

única ni una guía final sobre la validación de métodos analíticos. La validación se personaliza eligiendo las pruebas necesarias y los criterios de aceptación para un método determinado. La amplitud de este tipo de validación se basa en el tipo de método y sus requisitos.

El presente estudio se realizó con la finalidad de recapitular todo el proceso que conlleva el realizar una validación de un método analítico, el cual es de suma importancia para el análisis de productos farmacéuticos que proporcionan tratamiento, prevención o diagnóstico de enfermedades a la población.

La validación del método analítico por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) para la valoración de bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta, se llevó a cabo en laboratorios GABBLAN S.A.C. en el departamento de Control de Calidad y Desarrollo en el período del mes Mayo a Noviembre 2023. Se llevó a cabo una evaluación exhaustiva de los parámetros cromatográficos que definen el buen desempeño de este método para certificar la calidad de este producto farmacéutico y así garantizar la protección la salud de los consumidores.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 2.1. Descripción del problema

La Industria farmacéutica actualmente necesita alcanzar altos niveles de calidad para cumplir con las rigurosas normativas vigentes, es así que a lo largo del tiempo se han desarrollado procedimientos que han evolucionado con una reglamentación estricta acorde a este progreso por conseguir altos estándares de calidad, es aquí donde es requerido el término de validación.

Recientemente los laboratorios farmacéuticos vienen realizando el desarrollo y validación de metodologías analíticas, para así cumplir con los estándares de calidad por parte de aseguramiento de la calidad, las buenas prácticas de manufactura y el ente regulador (DIGEMID), de esta manera aseguran la fiabilidad de los resultados analíticos para cumplir con las especificaciones requeridas, favoreciendo a avalar la calidad del producto farmacéutico. De tal manera se recalca la necesidad problemática de plantear nuevos métodos analíticos y su validación pertinente.

### 2.2. Formulación del problema

#### Problema general

¿El método analítico para la valoración del Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) cumplirá con los parámetros de desempeño de validación?

#### Problemas específicos.

**PE1:** ¿Es posible identificar la Aptitud del Sistema conforme a parámetros establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)?

**PE2:** ¿El método utilizado cumple con el parámetro de Especificidad para la Cuantificación de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta?

**PE3:** ¿El método utilizado cumple con los parámetros de Linealidad del sistema, Precisión Intermedia para determinar Coeficiente de Determinación, Factor de Respuesta?

**PE4:** ¿El método utilizado cumple con los parámetros de Exactitud, Repetibilidad del método cromatográfico para determinar porcentaje de recuperación de Bisoprolol fumarato?

**PE5:** ¿El método utilizado cumple con los parámetros de Estabilidad y Robustez de método cromatográfico para determinar el comportamiento del activo de bisoprolol fumarato ante parámetros determinados?

### **2.3. Justificación del problema.**

El desarrollo de medicamentos por la industria farmacéutica peruana ha crecido sustancialmente en los últimos años, uno de los medicamentos que se plantean tanto para promover el crecimiento de ventas por la industria y también se plantea como alternativa para enfermedades crónicas como hipertensión arterial y problemas cardiovasculares es el Bisoprolol fumarato. Este betabloqueante selectivo ha demostrado sustancial eficacia en prevención de accidentes cerebrovasculares, ataques cardíacos y problemas renales. Presenta un mayor grado de selectividad por los receptores  $\beta_1$  en comparación con otros fármacos bloqueadores selectivos de los receptores  $\beta_1$ , incluidos el metoprolol, el betaxolol y el atenolol. Además, es beneficioso en el tratamiento de la hipertensión arterial y la angina de pecho.

Asimismo, el consumo de Bisoprolol fumarato está en constante crecimiento año tras año, un ejemplo de eso es que su participación en mercado mundial en Europa es del 70%. Es por ello que en el presente trabajo busca validar un método analítico para el análisis cuantitativo de Bisoprolol fumarato con la finalidad de trazar directrices para la inscripción y venta del producto farmacéutico en el mercado peruano en aras de proporcionar un medicamento eficaz, seguro y que cumpla con los estándares de calidad requeridos.

### **2.4. Objetivos de la investigación.**

#### **Objetivo general.**

Validar el método analítico para la valoración del Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), 2023.

#### **Objetivos específicos.**

**OE1:** Identificar la Aptitud del Sistema conforme a parámetros establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

**OE2:** Evaluar la Especificidad del método utilizado para la cuantificación de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.

**OE3:** Evaluar Linealidad del sistema, Precisión Intermedia y del método cromatográfico para determinar Coeficiente de Determinación, Factor de Respuesta.

**OE4:** Evaluar la Exactitud, Repetibilidad del método cromatográfico para determinar porcentaje de recuperación de Bisoprolol fumarato.

**OE5:** Evaluar la Estabilidad y Robustez del método cromatográfico para determinar el comportamiento del activo de Bisoprolol fumarato ante parámetros determinados.

### III. BASES TEÓRICAS

#### 3.1. Antecedentes de la investigación

##### 3.1.1. Antecedentes internacionales

En el ámbito internacional, Piponski M, Balkanov T, Looyda L, en el año 2019, (1) procedente de la Universidad Médica Estatal Horbachevsky Ternopil, Ucrania, publicó un estudio titulado: Método eficiente validado de HPLC para determinar enalapril en combinado forma farmacéutica que contiene Enalapril y Bisoprolol y disolución in vitro estudios. Teniendo por objetivo desarrollar un método HPLC rápido y reproducible para la determinación de enalapril en formas farmacéuticas combinadas experimentales que contienen bisoprolol y enalapril y para estudios de disolución de fármacos. Se desarrolló un método HPLC rápido y sencillo para la determinación simultánea de bisoprolol y enalapril en formas farmacéuticas sólidas, con simetrías de pico perfectas que eluyen a 4,7 y 5,2 minutos, con una fase móvil compuesta de metanol y ácido perclórico diluido bombeados con 1 ml/min en una columna Zorbax Rx C8 de 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m termostatizada a 42 °C, y Señal UV monitoreada a 214 nm. La fase móvil estaba compuesta por 55% de metanol y 45% de ácido perclórico (0,07% v/v). El uso de la presencia de aniones perclóricos mostró un papel muy útil en la forma del pico y la vista del cromatograma, debido a la distinción características caotrópicas de aniones perclorato en moléculas que contienen átomos de nitrógeno en estructuras moleculares de analitos, en un ambiente de pH ácido. La linealidad fue examinada y probada en diferentes niveles de concentración en el rango de concentración de trabajo de bisoprolol (20 a 200  $\mu$ g/ml) y enalapril (20 a 200  $\mu$ g/ml). Los métodos alcanzaron muy buenos parámetros de validación, con resultados determinados LOQ de aproximadamente 0,032 mg/ml y LOD de aproximadamente 0,003 mg/ml para bisoprolol, y LOQ de aproximadamente 0,045 mg/ml y LOD de 0,005 mg/ml para enalapril. El alto valor de las recuperaciones obtenidas para bisoprolol y enalapril indica que se encontró que el método propuesto era preciso.

Zaki, MM; Abdelwahab, NS; Ali, AA; Sharkawi, SMZ, en el 2019, en Egipto, (3) publicaron un estudio titulado: Determinación simultánea de fumarato de bisoprolol y rosuvastatina cálcica en una nueva formulación combinada mediante HPLC validada. Se desarrolló y validó un método RP-HPLC simple, específico y preciso para la determinación simultánea de fumarato de bisoprolol (BIS) y calcio de rosuvastatina (ROS) en comprimidos de nueva formulación. El método RP-HPLC desarrollado dependía de la separación cromatográfica utilizando una columna C 18 (150x4,6 mm, 0,5  $\mu$ m) con fase móvil compuesta por acetonitrilo y solución acuosa al 0,05 de ácido ortofosfórico en una proporción de 65:35 % (v:v) con un caudal de 1 ml/min y la detección UV se llevó a cabo

a 230 nm. Se estudiaron y optimizaron los factores que afectan a los métodos desarrollados y se encontró que los tiempos de retención para BIS y ROS eran 2,758 y 4,974 min, respectivamente. Se observó linealidad del método propuesto en un rango de concentración de 0,2-50 µg/mL para cada uno de BIS ( $r = 0,9999$ ) y ROS ( $r = 0,9998$ ). El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de los fármacos estudiados en su polvo a granel, mezclas preparadas en laboratorio y en los comprimidos formulados. El método desarrollado es el primer método cromatográfico para la determinación de esos fármacos y no mostró diferencias significativas en comparación con los métodos informados.

### **3.1.2. Antecedentes Nacionales**

En el aspecto nacional, no se encontró estudios específicos en el IFA Bisoprolol Fumarato pero si se logró compilar estudios referentes a validación de métodos analíticos. Acosta M (4) publicó un estudio titulado: Validación del método analítico para la valoración de paracetamol más ibuprofeno en tabletas recubiertas por HPLC en laboratorios Vitapharma S.A.C., Lima 2021; cuyo objetivo fue Validar el método analítico para la valoración de paracetamol más ibuprofeno en tabletas recubierta por HPLC. Se utilizó una metodología para cromatografía líquida de alta performance con las siguientes condiciones: Columna cromatográfica: Lichrospher 100 RP-18 (relleno L1) de 125 mm x 4 mm (5µm), Flujo: 0,6mL/minuto, temperatura: 25°C, Longitud de onda: 230nm, Volumen de inyección 25µL, Fase móvil: Buffer Fosfato de Potasio pH 4,0: Acetonitrilo (35:65). Se logró desarrollar los parámetros de Especificidad necesarios demostrando que no hay diferencia significativa de la respuesta de los principios activos (IFA) en presencia de la matriz, de Linealidad obteniendo Coeficientes de correlación mayores a 0,999 de exactitud con porcentajes de recuperación superiores a 98,0% y cumpliendo con el límite de sesgo asignado, de Precisión y robustez, obteniendo valores dentro de los rangos establecidos con coeficientes de variación menores a 2,00%, cumpliendo así con todos los parámetros establecidos por Normas Oficiales, se dio por concluida la validación de la metodología analítica.

## **3.2. Marco Teórico**

### **3.2.1. ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

Una validación está diseñada para mostrar evidencia suficiente de que la metodología analítica cumple sus objetivos estandarizados trazados por la USP. Estos objetivos se describen con un conjunto adecuado de características de desempeño y criterios de rendimiento relacionados, que pueden variar según el uso previsto del procedimiento

analítico y la tecnología específica seleccionada.

### **3.2.2. Criterios de eficiencia para un método analítico.**

#### **Especificidad/Selectividad**

La especificidad o selectividad de un procedimiento analítico puede demostrarse mediante la ausencia de interferencia, comparación de resultados con un procedimiento ortogonal o puede estar inherentemente dada por los principios científicos subyacentes del procedimiento analítico. Algunos experimentos pueden ser combinado con estudios de precisión. La capacidad de selección se manifestará en casos en los que el método de análisis no sea preciso. Sin embargo, es necesario realizar una prueba para detectar o medir un analito cuando hay interferencias potenciales. Esta prueba debe reducir al mínimo dichas interferencias y probar que es apropiada para el propósito previsto. Cuando un procedimiento analítico no proporciona suficiente discriminación, se puede utilizar una combinación de dos o más procedimientos para alcanzar el nivel necesario de selectividad. (1)

#### **Exactitud**

La exactitud de un método analítico expresa lo más cercano a un acuerdo entre el valor que es aceptado no como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. La precisión debe ser determinada en toda la gama de reporte de un proceso analítico y generalmente se evidencia al comparar los resultados obtenidos con un valor de referencia. La exactitud debe demostrarse en condiciones de prueba regulares del procedimiento analítico. (p. ej., en presencia de una matriz de muestra y utilizando los pasos de preparación de muestra descritos). La precisión generalmente se verifica mediante uno de los estudios que se describen a continuación. (1)

#### **Linealidad**

Cómo se relaciona la respuesta con la concentración se describe a través del modelo de calibración. (una desviación del modelo representa un bias) Se prepararon tres curvas de calibración con cinco concentraciones correspondientes al: 50, 80, 100, 120 y 150 % de la concentración teórica. Se analizó cada una tres veces y con los resultados, se realizaron los análisis siguientes: regresión lineal, prueba de linealidad y prueba de proporcionalidad. El método es lineal en el intervalo de concentración evaluado si se obtienen los resultados siguientes: 6-9 Análisis de regresión lineal: coeficiente de correlación  $(r) \geq 0,99$  y de determinación  $(r^2) \geq 0,98$ .

Prueba de linealidad: coeficiente de variación de los factores respuesta ( $CV_f \leq 5\%$ ) y la desviación de la pendiente ( $S_b < 2\%$ ). Prueba de proporcionalidad: intercepto ( $a$ ) no es significativamente diferente de cero si  $t_{exp.} \leq t_{tabla} [0,05, f(n - 1)]$ . (1)

### **Precisión**

Indica cuan cerca están los resultados entre sí y comúnmente se evalúa por medio del valor de la desviación estándar (dispersión de los errores aleatorios). La validación de pruebas para ensayo y determinación cuantitativa de impurezas o pureza incluye una investigación de precisión. La precisión debe investigarse utilizando muestras auténticas y homogéneas o preparadas artificialmente muestras (por ejemplo, mezclas de matrices enriquecidas con cantidades relevantes del analito en cuestión). si un No se dispone de una muestra homogénea, entonces se utilizan muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra puede ser usado. (9)

### **Repetibilidad**

La repetibilidad se deberá evaluar empleando:

- a) un mínimo de 9 determinaciones que cubran el rango reportable para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones/3 réplicas cada una);
- b) un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración de prueba. (9)

### **Precisión intermedia**

La determinación de cuánta precisión intermedia se necesita está sujeta a las condiciones debajo de las cuales se planea emplear el método. El solicitante debe establecer los efectos de eventos aleatorios sobre la precisión del procedimiento analítico. Variaciones típicas a estudiar incluir diferentes días, condiciones ambientales, analistas y equipos, según corresponda. Idealmente, Las variaciones probadas deben basarse y justificarse mediante el uso de un procedimiento analítico, comprensión desde el desarrollo y la evaluación de riesgos (ICH Q14). (9)

### **Reproducibilidad**

La reproducibilidad puede ser evaluada mediante un ensayo inter-laboratorios. Investigación de reproducibilidad no se requiere para la presentación regulatoria, pero debe considerarse en casos de estandarización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para la inclusión de procedimientos en farmacopeas. (9)

### **Robustez**

La evaluación de la idoneidad del procedimiento analítico dentro del objetivo operativo previsto. El entorno debe considerarse durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento en estudio. Las pruebas de robustez muestran la confiabilidad de un método analítico cuando es sometida a variaciones deliberadas con diferentes parámetros. (1)

### **3.2.3. Cromatografía**

Las técnicas de separación cromatográfica son procedimientos de separación de varias etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede ser empaquetado en una columna, extendido como una capa, o distribuido como una película, etc. La fase móvil puede ser gaseosa o líquido o fluido supercrítico. La separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición), ion. intercambio, etc., o puede basarse en diferencias en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas tales como tamaño, masa, volumen, etc. (4)

### **3.2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

El término "cromatografía líquida" (LC), tal como se utiliza en los compendios, es sinónimo de alta presión cromatografía líquida y cromatografía líquida de alta resolución. LC es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. (4)

### **3.2.5. Tipos de HPLC**

#### **Fase normal:**

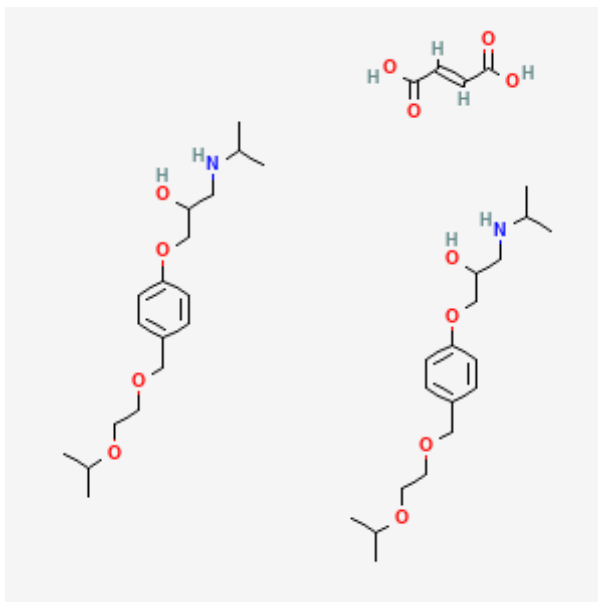
El empaque de la columna es polar (por ejemplo, sílice) y la fase móvil es apolar. Se utiliza para compuestos sensibles al agua, isómeros geométricos, isómeros cis-trans y compuestos quirales.

#### **Fase inversa:**

El relleno de la columna es no polar (por ejemplo, C18), la fase móvil es agua + disolvente miscible (por ejemplo, metanol). Puede utilizarse para muestras polares, no polares, ionizables e iónicas. (4)

### 3.2.6. Bisoprolol Fumarato

El fumarato de bisoprolol es la sal de fumarato de un antagonista sintético de los receptores beta-1 adrenérgicos cardioselectivo derivado del fenoxi-2-propanol con actividades antihipertensivas y cardioprotectoras potenciales. El bisoprolol, que carece de actividad simpaticomimética intrínseca, se une de manera selectiva y competitiva a los receptores beta-1 adrenérgicos del corazón y los bloquea, lo que disminuye la contractilidad y la frecuencia cardíacas, reduce el gasto cardíaco y disminuye la presión arterial. Además, este agente puede exhibir actividad antihipertensiva a través de la inhibición de la secreción de renina por las células epitelioides yuxtaglomerulares (JGE) en el riñón, inhibiendo así la activación del sistema renina-angiotensina (RAS). Se ha demostrado que el bisoprolol es cardioprotector en modelos animales. (2)



**FIGURA N° 1.** Estructura química del bisoprolol fumarato

## IV. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 4.1. Objetivo del método analítico

Demostrar que la técnica de Cuantificación de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), cumple con las exigencias dadas por la USP en todos los parámetros de la validación.

### 4.2. Tipo, nivel y diseño de investigación.

#### Tipo de investigación.

El tipo de investigación, según el enfoque es experimental, dado que su principal objetivo se basa en determinar los factores asociados a la adherencia terapéutica de los pacientes hipertensos, planteando medidas para la resolución de la problemática de falta de adherencia, con un margen de generalización limitado.

#### Nivel de investigación

El nivel de este estudio es investigativo correlacional, ya que se pretende identificar la magnitud con la que se relacionan las variables involucradas en el problema a fin.

#### Diseño de estudio.

Diseño de estudio cuantitativo experimental sincrónico aplicado en el año 2023.

En términos farmacéuticos es una validación prospectiva para el diseño de la metodología analítica de cromatografía por HPLC de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.

### 4.3. Hipótesis.

#### 4.3.1. Hipótesis nula

El método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución cumple con todos los parámetros de validación y criterios de aceptación exigidos por la USP vigente fijados para la valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.

#### 4.3.2. Hipótesis alterna

El método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución no cumple con todos los parámetros de validación y criterios de aceptación exigidos por la USP vigente fijados para la valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.

#### 4.4. Variables.

##### Operacionalización de variables

**Tabla N° 1.** Cuadro de operacionalización de variables.

Indicadores	Variable dependiente	Niveles	Variable independiente	Escala de medición	Escala valorativa
<b>Aptitud del sistema</b>	Asimetría de pico	Asimetría	Preparación del estándar para evaluación de aptitud del sistema	Factor de Asimetría: No más de 2,0	Cumple No Cumple
	Porcentaje promedio de Desviación Estándar Relativa (RSD) Áreas del Estándar	RSD (Áreas)		RSD < 2%, áreas.	
	Porcentaje promedio de Desviación Estándar Relativa (RSD) Tiempo de retención del Estándar	RSD (Tiempo de retención)		RSD < 2%, tiempo de retención.	
	Valor de resolución	Resolución		Resolución: No menos de 7,0	
<b>Especificidad (Degradación)</b>	Área del pico Porcentaje de degradación	Luz	Degradaciones de placebo, analito, analito + placebo y producto terminado	a) Interferencia < 2%. valoración b) La degradación no es mayor que el 20%	
		Calor húmedo			
		Calor seco			
		Hidrólisis Ácida			
		Hidrólisis Alcalina			
Oxidación					
<b>Linealidad Sistema</b>	Área del pico	80%, 90%, 100%, 110%, 120% en concentración	Rango de concentraciones	a) Regresión Lineal: Ecuación de la recta $y = bx + a$ b) Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) Coeficiente de correlación (r) debe ser mayor 0,999 Coeficiente de determinación (r <sup>2</sup> ) debe ser mayor 0,998 c) Varianza Residual Constante (Homocedasticidad)	

				<p>d) Análisis de la Varianza: Anova Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran): <math>G_{exp} &lt; G_{tablas}</math> ANOVA: <math>F_{exp} &gt; F_{tablas}</math> e) Test de Linealidad: El coeficiente de variación de los factores de Respuesta “f” <math>RSD &lt; 2.0\%</math> Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente: Intervalo de confianza de la Pendiente “b”; No incluye el cero <math>t_{experimental} &gt; t_{tablas}</math> f) Test de proporcionalidad: Intervalo de confianza del Intercepto “a”; Incluye el cero <math>t_{experimental} &lt; t_{tablas}</math></p>	
<b>Precisión Intermedia</b>	Área del pico Desviación Estándar Relativa (RSD) entre analistas	100%, en concentración (Analista A y B)	Cambio de Analista	<p>a) Aptitud del Sistema : <math>DSR \leq 2.0\%</math> b) Repetibilidad de Método : <math>DSR \leq 2.0\%</math> c) Precisión intermedia : <math>DSR \leq 2.0\%</math></p>	
<b>Linealidad de Método (Exactitud)</b>	Área del pico	50%, 100%, 150% en concentración	Rango de concentraciones	<p>a) El porcentaje de recuperación debe estar entre 98% – 102% y su DSR no mayor de 2% b) Test de t de student experimental <math>&lt; t_{tablas}</math> c) Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran): <math>G_{exp} &lt; G_{tablas}</math></p>	
<b>Robustez cambio de filtro</b>	Área del pico Desviación Estándar Relativa (RSD) entre ambos cambios analíticos	Filtro PVDF 0,45 $\mu\text{m}$ y PVDF 0,22 $\mu\text{m}$	Cambio de filtro	Cambio de filtro : $RSD \leq 2.0\%$	
<b>Robustez cambio de flujo</b>	Área del pico Desviación Estándar Relativa (RSD) entre ambos cambios analíticos	Flujo 0,5 mL/min y 1,0 mL/min	Cambio de flujo	Cambio de flujo : $RSD \leq 2.0\%$	
<b>Robustez por Estabilidad</b>	Área del pico Desviación Estándar Relativa (RSD) entre tiempo 0 y tiempo 12 horas	Tiempo: 0-12 horas	Estabilidad de muestras	Estabilidad 12 horas : $RSD \leq 2.0\%$	

#### **4.5. Justificación.**

La técnica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es una técnica que de acuerdo con su naturaleza resulta fiable, específica, selectiva y de exactitud adecuada por lo que se hace necesaria su validación.

#### **4.6. Calificación instrumental**

**Tabla N° 2.** Equipos e instrumentos.

<b>ITEM</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>SERIE</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>	<b>CODIGO</b>	<b>CALIFICADO CALIBRADO</b>
1	HPLC	Bomba: 1864-020 Inyector automático: 1861T-015 Horno: 1873-010 Detector DAD: 1848-017 Software: OpenLab	Hitachi	Chromaster	(CDC-089)	Conforme
2	HPLC	Bomba: 1864-020 Inyector automático: 1861T-015 Horno: 1873-010 Detector DAD: 1848-017 Software: OpenLab	Hitachi	Chromaster	(CDC-096)	Conforme
3	HPLC	Bomba: 2081-013 Inyector automático: 2072T-005 Horno: 2087-028 Detector DAD: 2057-028 Software: OpenLab D7F3BCC019	Hitachi	Chromaster	(CDC-106)	Conforme
4	Balanza analítica	15104369	AND	GH-252	(BAL-CDC-008)	Conforme
5	Balanza analítica	B516847585	Mettler Toledo	XPE205DR	(BAL-CDC-019)	Conforme
6	Balanza analítica	B518885100	Mettler Toledo	XS3DU	(BAL-CDC-020)	Conforme

7	Centrifuga	0023547-03	Mettler Toledo	Seven Excellence	(CDC-053)	Conforme
8	Equipo Sonicador (Ultrasonido)	BIG091872590B	BRANSON	CPX8800	(CDC-097)	Conforme
9	Equipo Sonicador (Ultrasonido)	EPC04131359G	BRANDSONIC	8510E-DTH	(CDC-050)	Conforme
10	Estufa de Secado	1002551	HINOTEK	DHP9052	(CDC-063)	Conforme
11	Baño María	L511.0972	Memmert	WNB22	(CDC-036)	Conforme

#### **4.7. Validación del método analítico.**

##### **4.7.1 TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO:**

Metodología Analítica USP por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

##### **4.7.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Método analítico –Valoración.

##### **4.7.3 FLUJOGRAMA DE MÉTODO ANALÍTICO – Valoración**

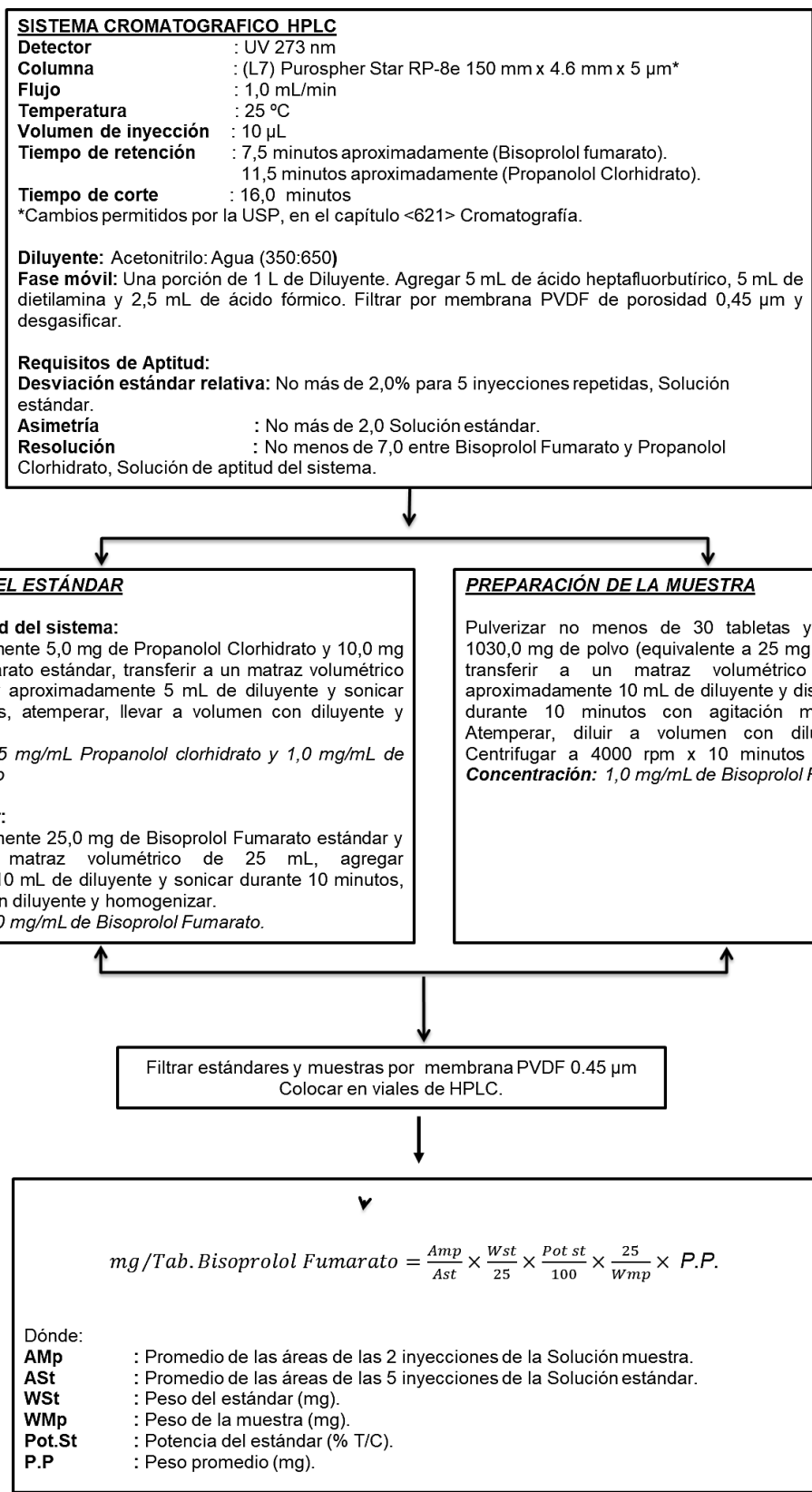


FIGURA N° 2. Flujoograma de Método Analítico

#### 4.7.4 Recursos Utilizados

##### 4.7.4.1. Materiales

- Pipetas volumétricas de 5 mL y 10 mL.
- Matraces volumétricos (fiolas) de 10 mL y 25 mL.
- Beaker de 1000 mL y 2000 mL
- Probetas de 500mL y 1000 mL.
- Filtro de Membrana de Polyvinylidene fluoride PVDF 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Filtro de Membrana de Polyvinylidene fluoride PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Columna cromatográfica: Purospher STAR RP-8e (L7); 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$

##### 4.7.4.2. Reactivos

Tabla N° 3. Reactivos.

REACTIVOS	MARCA	LOTE
Agua purificada	-	-
Acetonitrilo	Merck	I1221830
Ácido Heptafluorbutírico	Merck	S8236543
Dietilamina	Merck	S8173910
Ácido Fórmico	Schlarlau	20542102
Ácido clorhídrico	Merck	E25W40
Hidróxido de sodio	Macron	0000285680
Peróxido de hidrógeno	Merck	K50671810

#### 4.7.5 Determinación de los parámetros a evaluar

Considerando la validación del método analítico del tipo de Determinación Cuantitativa (Valoración), de un componente en un producto terminado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se desarrollarán los siguientes parámetros:

**Tabla N° 4.** Parámetros cromatográficos.

<b>PARÁMETRO A ESTUDIAR</b>			
• Precisión Instrumental	√	• Precisión:	
• Especificidad	√	Repetibilidad de método	√
• Linealidad:		Precisión Intermedia	√
Linealidad del método	√	• Robustez	√
• Exactitud	√		

#### **4.7.5.1. ESPECIFICIDAD**

##### **I. Determinación de posibles interferencias:**

Examinar el placebo con la metodología analítica implica que el análisis del placebo no arroje un resultado que sea cuantificable (es decir, inferior al 2% de la respuesta del estándar). Esto significa que los componentes inactivos no afectan la determinación del compuesto analizado.

Preparar una muestra de placebo con el principio activo al 100%. Realizar el análisis correspondiente comparando la respuesta del análisis con la de un patrón. Determinar la especificidad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con 2% del teórico.

##### **A. BISOPROLOL FUMARATO:**

Para Valoración: (Evaluar por duplicado)

- Estándar

Se procederá según preparación de la solución estándar del método analítico del producto.

- Placebo

Pesar aproximadamente 1000,5 mg de placebo en un matraz volumétrico de 25 mL. Continuar según preparación de la solución muestra del método analítico del producto.

- Placebo + Estándar

Pesar aproximadamente 25,0 mg de Bisoprolol Fumarato y 1005,0 mg de Placebo en un matraz volumétrico de 25 mL, Continuar según preparación de la solución muestra del método analítico del producto.

- Muestra

Pesar aproximadamente 1030,0 mg de muestra pulverizada (equivalente a 25,0 mg de Bisoprolol Fumarato) en un matraz volumétrico de 25 mL. Continuar según preparación de la solución muestra del método analítico del producto.

## **II. Determinación de interferencia de productos de degradación:**

### **A. Para Valoración:**

Tratar el placebo, principio activo y la muestra por duplicado con los siguientes métodos de degradación. Continuar según preparación del método analítico del producto correspondiente.

**Tabla N° 5.** Secuencia de preparación de muestras para Especificidad

Muestra	Cantidad	HCl 0.1 N	NaOH 0.1 N	H2O2 al 3%	Baño María	HCl 0.1 N	NaOH 0.1 N	Luz	Estufa	N° Muestra	N° Lecturas por muestra
Diluyente	-----	----- -	-----	-----	-----	-----	-----	----- -	-----	1	1
Fase Móvil										1	1
Placebo	1005,0 mg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2	2
Placebo + St Bisoprolol Fumarato	1005,0 mg  25,0 mg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	2 mL	-----	-----	60°C x 2 horas	-----	2 mL	----- -	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	----- -	2 mL	-----	60°C x 2 horas	2 mL	-----	----- -	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	-----	-----	2 mL	60°C x 2 horas	-----	-----	----- -	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	----- -	-----	-----	60°C x 2 horas	-----	-----	----- -	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	----- -	-----	-----	-----	-----	-----	x 24 horas	-----	2	2
Placebo	1005,0 mg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- -	(60°C x 24 horas)	2	2

Producto terminado	1030.0 mg	2 mL	-----	-----	60°C x 2 horas	-----	2 mL	----- -	-----	2	2
Producto terminado	1030.0 mg	----- -	2 mL	-----	60°C x 2 horas	2 mL	-----	----- -	-----	2	2
Producto terminado	1030.0 mg	-----	-----	2 mL	60°C x 2 horas	-----	-----	----- -	-----	2	2
Producto terminado	1030.0 mg	----- -	-----	-----	60°C x 2 horas	-----	-----	----- -	-----	2	2
Producto terminado	1030.0 mg	----- -	-----	-----	-----	-----	-----	x 24 horas	-----	2	2
Producto terminado	1030.0 mg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- -	60°C x 24 horas	2	2

**Nota:** Preparar cada muestra por duplicado.

Proceder según preparación de la solución muestra del método analítico del producto.

#### 4.7.5.2. LINEALIDAD

##### I. Linealidad de Método

Para la concentración nominal de trabajo en rango establecido. Usaremos placebo y estándares que se trabajarán como se indica en el siguiente cuadro:

**Tabla N° 6.** Linealidad de Método de Valoración

Concentración	Principio Activo	Cantidad (mg)	N° Muestra
50%	Bisoprolol Fumarato	12,50 mg	3
	Placebo	1000,5 mg	
100%	Bisoprolol Fumarato	25,00 mg	3
	Placebo	1000,5 mg	
150%	Bisoprolol Fumarato	37,50 mg	3
	Placebo	1000,5 mg	

**Nota:** Preparar cada muestra por triplicado e inyectar por duplicado cada una de ellas. Analizar todas las muestras de acuerdo a la solución estándar del método analítico del producto.

##### II. Linealidad del Sistema

Para la concentración nominal de trabajo en rango establecido. Usaremos estándares que se trabajarán como se indica en el siguiente cuadro:

**Tabla N° 7.** Linealidad del Sistema de Valoración

Concentración	Principio Activo	Cantidad (mg)	N° Muestra
80%	Bisoprolol Fumarato	20,00 mg	3
90%	Bisoprolol Fumarato	22,00 mg	3
100%	Bisoprolol Fumarato	25,00 mg	3
110%	Bisoprolol Fumarato	27,50 mg	3
120%	Bisoprolol Fumarato	30,00 mg	3

**Nota:** Preparar cada muestra por triplicado e inyectar por duplicado cada una de ellas. Analizar todas las muestras de acuerdo al esquema de validación (ver Figura N° 3. Esquema de Linealidad del sistema).

#### 4.7.5.3. EXACTITUD

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la Linealidad del Método y se prepararan por duplicado solución estándar al 100% (estándar de trabajo (stw) y estándar de control (stc))

$$\% R = \frac{XH \times 100}{XA}$$

Donde:

XH = Cantidad de analito hallado

XA = Cantidad del analito añadido

#### 4.7.5.4. PRECISIÓN

##### I. Repetibilidad:

Analizar 6 muestras independientes de un lote fabricado. Según método analítico de Valoración (Ver Figura 2. Flujograma de Método Analítico).

Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD).

##### II. Precisión Intermedia:

Un nuevo analista llevará a cabo, en una fecha distinta, en diferente equipo, el examen del mismo grupo de muestras utilizado en el estudio de repetibilidad, empleando el mismo procedimiento analítico.

Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD).

#### 4.7.5.5. ROBUSTEZ

Se lleva acabo el análisis del mismo lote utilizado en la prueba de repetibilidad empleando cambios en determinadas variables (Cambio de filtro, Cambio de flujo, Estabilidad 12h), utilizando el mismo método analítico.

Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD)

#### 4.7.5.6. RANGO

Se establece en base a la conformidad de los ensayos de Linealidad, Exactitud y Precisión.

#### 4.7.6 Criterios de aceptación

**Tabla N° 8.** Criterios de aceptación

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN
<b>Aptitud del Sistema</b>	a) Factor de Asimetría: No más de 2,0 b) $RSD \leq 2\%$ , áreas. c) $RSD \leq 2\%$ , tiempo de retención. d) Resolución: No menos de 7,0
<b>Especificidad</b>	a) Interferencia $\leq 2\%$ . valoración b) La degradación no es mayor que el 20%
<b>Linealidad</b>	a) Regresión Lineal: Ecuación de la recta $y = bx + a$ b) Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) Coeficiente de correlación (r) debe ser mayor 0,999 Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser mayor 0,998 c) Varianza Residual Constante (Homocedasticidad) d) Análisis de la Varianza: Anova <u>Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran):</u> $G_{exp} < G_{tablas}$ ; <u>ANOVA:</u> $F_{exp} > F_{tablas}$ e) Test de Linealidad: <u>El coeficiente de variación de los factores de Respuesta “f”</u> $RSD \leq 2.0 \%$ <u>Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente:</u>

	<p>Intervalo de confianza de la Pendiente “b”; No incluye el cero</p> <p style="text-align: right;"><math>t_{\text{experimental}} &gt; t_{\text{tablas}}</math></p> <p>f) Test de proporcionalidad:</p> <p>Intervalo de confianza del Intercepto “a”; Incluye el cero</p> <p style="text-align: right;"><math>t_{\text{experimental}} &lt; t_{\text{tablas}}</math></p>
<b>Exactitud</b>	<p>a) El porcentaje de recuperación debe estar entre 98% – 102% y su RSD no mayor de 2%</p> <p>b) Test de t de student <math>t_{\text{experimental}} &lt; t_{\text{tablas}}</math></p> <p>c) Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran): <math>G_{\text{exp}} &lt; G_{\text{tablas}}</math></p>
<b>Precisión</b>	<p>a) Aptitud del Sistema : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p> <p>b) Repetibilidad de Método : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p> <p>c) Precisión intermedia : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p>
<b>Robustez</b>	<p>a) Cambio de filtro : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p> <p>b) Cambio de flujo : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p> <p>c) Estabilidad 12 horas : <math>RSD \leq 2.0\%</math></p>
<b>Rango</b>	<p>a) Exactitud: comprendido entre el 50% - 150%</p> <p>b) Linealidad: Linealidad de Método: Comprendido entre el 50% - 150%</p> <p>c) Precisión: Comprendido entre el 90,0% - 105%</p>

#### 4.7.7 Criterios de verificación.

Se comprobará el enfoque analítico (se repetirá total o parcialmente la validación) en situaciones donde se realicen cambios en el procedimiento de análisis, los instrumentos y en la composición para asegurar la obtención de resultados confiables.

#### 4.7.8 Desviaciones

Si se presentan desviaciones durante la validación del método analítico, se deberán evaluar y detallar indicando las posibles causas, conclusiones y acciones a tomar en el Reporte de Validación respectivo.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Tratamiento Estadístico

#### ESPECIFICIDAD

Pureza pico (0,98 - 1,00):	1,00
Interferencia (<2%):	0,00
Degradaciones (<20%):	19,13%

**Conclusión:** Cumple con los parámetros de Especificidad en pureza e interferencia de la matriz menor del 2%.

#### LINEALIDAD DEL SISTEMA

**Tabla N° 9.** Estadístico de Linealidad del sistema

Conc.	Dato (n)	x (mg/mL)	y	x.y	f (y/x)	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	Varianza (s <sup>2</sup> )
<b>80 %</b>	1	0.079479	2542409.50	202068.27	31988427.38916	0.00632	6463846065690.25	63700392452.50
	2	0.079479	2580983.50	205134.09	32473762.89397	0.00632	6661475827272.25	
	3	0.079638	2557243.00	203653.10	32110935.81738	0.00634	6539491761049.00	
<b>90 %</b>	1	0.089320	2871545.00	256485.48	32149073.97787	0.00798	8245770687025.00	16773985964.53
	2	0.089399	2885683.00	257977.29	32278679.95003	0.00799	8327166376489.00	
	3	0.089637	2904969.00	260393.05	32408102.80384	0.00803	8438844890961.00	
<b>100 %</b>	1	0.099478	3219886.00	320307.05	32367898.11110	0.00990	10367665852996.00	10232051724.93
	2	0.099279	3199515.50	317645.85	32227398.52473	0.00986	10236899434740.20	
	3	0.099438	3199081.00	318110.47	32171588.59061	0.00989	10234119244561.00	
<b>110 %</b>	1	0.109398	3536806.00	386918.65	32329784.44897	0.01197	12508996681636.00	2863832661.86
	2	0.109437	3542253.00	387655.10	32367834.99322	0.01198	12547556316009.00	
	3	0.109239	3524289.00	384989.95	32262174.76829	0.01193	12420612955521.00	
<b>120 %</b>	1	0.119159	3858369.00	459759.55	32379993.99794	0.01420	14887011340161.00	739819235.02
	2	0.119238	3854555.50	459611.03	32326461.10649	0.01422	14857598102580.20	
	3	0.119556	3869018.50	462563.76	32361601.90920	0.01429	14969304153342.20	
<b>SUMA</b>	<b>15</b>	<b>1.49</b>	<b>48146606.50</b>	<b>4883272.69</b>	<b>484203719.28</b>	<b>0.15</b>	<b>157706359690033.00</b>	<b>94310082038.84</b>

Muestra : Estándar (Principio activo)				<u>Concentración de</u> <u>BISOPROLOL FUMARATO</u>			
<b>80 %</b>	20.03	mg	→ 50 mL			0.079479	mg/mL
	20.03	mg	↓			0.079479	mg/mL
	20.07	mg	5 mL →	25 mL		0.079638	mg/mL
<b>90 %</b>	22.51	mg	→ 50 mL			0.089320	mg/mL
	22.53	mg	↓			0.089399	mg/mL
	22.59	mg	5 mL →	25 mL		0.089637	mg/mL
<b>100 %</b>	25.07	mg	→ 50 mL			0.099478	mg/mL
	25.02	mg	↓			0.099279	mg/mL
	25.06	mg	5 mL →	25 mL		0.099438	mg/mL
<b>110 %</b>	27.57	mg	→ 50 mL			0.109398	mg/mL
	27.58	mg	↓			0.109437	mg/mL
	27.53	mg	5 mL →	25 mL		0.109239	mg/mL
<b>120 %</b>	30.03	mg	→ 50 mL			0.119159	mg/mL
	30.05	mg	↓			0.119238	mg/mL
	30.13	mg	5 mL →	25 mL		0.119556	mg/mL

**FIGURA N° 3.** Esquema de Linealidad del sistema

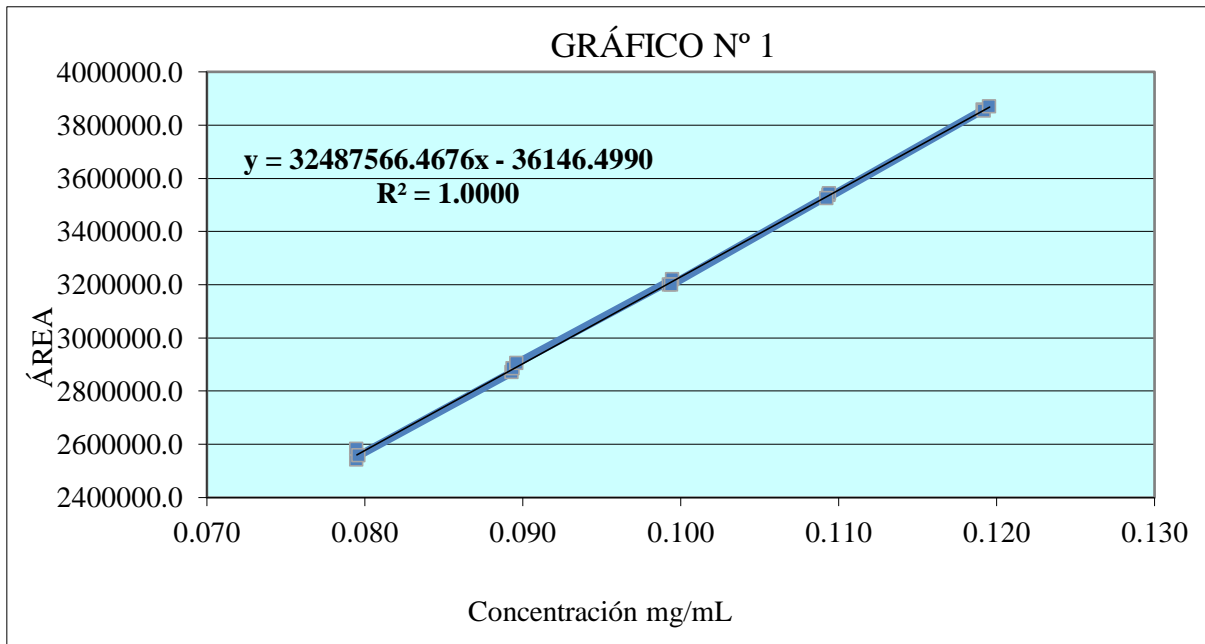
**Tabla N° 10.** Áreas de muestras de Linealidad del sistema

**Áreas de las Muestras**

	<b>80 %</b>	<b>90 %</b>	<b>100 %</b>	<b>110 %</b>	<b>120 %</b>
<b>M1</b>	2541588	2870880	3218466	3537807	3857356
	2543231	2872210	3221306	3535805	3859382
<b>M2</b>	2579920	2886854	3192869	3540062	3853400
	2582047	2884512	3206162	3544444	3855711
<b>M3</b>	2557542	2905871	3198083	3523768	3868804
	2556944	2904067	3200079	3524810	3869233

a) **Regresión Lineal**

**GRÁFICO N° 1.** Recta de Regresión de Linealidad del sistema



Ecuación de la recta:

$$y = 32651\ 314.2824 X - 36146.4990$$

b) **Coefficiente de correlación (r) y Coeficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)**

Criterio de aceptación:

r	≥	0.999
r <sup>2</sup>	≥	0.998

r =	1.000
r <sup>2</sup> =	1.000

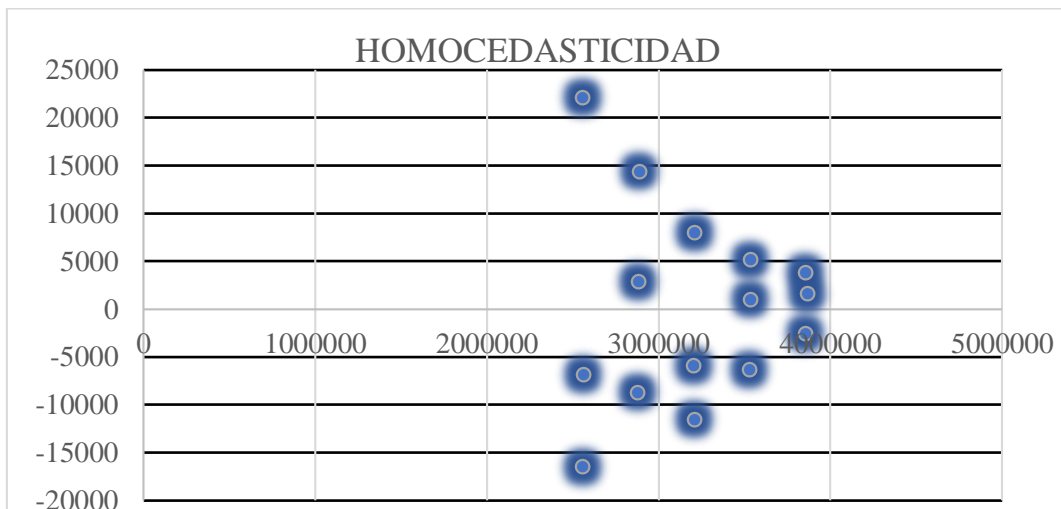
c) **Varianza Residual Constante (Homocedasticidad)**

La distribución de los puntos en la representación de los residuales debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia

**Tabla N° 11.** Homocedasticidad (Linealidad del sistema)

Obs.	Pronóstico Y	Residuos
1	2558 948.61495	-16539.1149512035
2	2558 948.61495	22034.8850487964
3	2564 131.03155	-6888.0315541131
4	2880 258.44433	-8713.4443316315
5	2882 849.65263	2833.3473669137
6	2890 623.27754	14345.7224625488
7	3211 933.10692	7952.8930821209
8	3205 455.08616	-5939.5861642407
9	3210 637.50277	-11556.5027671512
10	3535 834.14460	971.8554002373
11	3537 129.74875	5123.2512495113
12	3530 651.72800	-6362.7279968518
13	3854 552.76568	3816.2343212659
14	3857 143.97398	-2588.4739801888
15	3867 508.80719	1509.6928139897

**GRÁFICO N° 2.** Homocedasticidad Homocedasticidad (Linealidad del sistema)



**d) Análisis de la Varianza: ANOVA**

**d.1) Homogeneidad de Varianzas**

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

H0: Las varianzas son semejantes

H1: Las varianzas son diferentes

Criterio de Aceptación:

Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$  demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

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

$$G_{exp} = \mathbf{0.675}$$

$$G_{tablas} = \mathbf{0.680}$$

Resultado: Como  $G_{exp} < G_{tablas}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas.

#### d.2) ANOVA

Planteamiento de la Hipótesis

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

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

Criterio de Aceptación:

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

**Tabla N° 12.** ANOVA (Linealidad del sistema)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{exp}$	$F_{tablas}$
<b>Regresión</b>	1	3165225617650.25	3165225617650	<b>28986.10</b>	4.67
<b>Residuos</b>	13	1419574660.13	109198051		
<b>Total</b>	14	3166645192310.38			

Resultado: Como  $F_{exp} > F_{tab}$ , no se acepta la  $H_0$ ; se acepta hipótesis alterna ( $H_1$ ) por ende el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste de los datos.

#### e) Test de linealidad

##### e.1) Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta (f):

$$f = \frac{y}{x}$$

Criterio de Aceptación	:	RSD £ 2,0%	
De la Tabla N° 1	:	Media de f	= 32280 247.95219
( Linealidad del Sistema )		RSD	= 0.4 %

### e.2) Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Test de Hipótesis para la Pendiente b:

H0 = "b" es estadísticamente igual a cero

H1 = "b" es estadísticamente diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si  $t_{exp} > t_{tabla}$  para una probabilidad del 95% ( $p=0.05$ ) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.

El intervalo de confianza no incluye el cero.

			-Intervalo de confianza	
$s^2_{y,x} =$	109198050.8		32651 314.2824	+/- 414317.85
$s^2_b =$	36779985065		Limite superior=	33065632.1302046
$s_b =$	191781.0863	Max. Valor permitido	Limite inferior=	32236996.4346911
$s_{brel}\% =$	0.00587361	< 2%		

$$t_{exp} = 170.253$$

$$t_{tabla} = 2.160$$

Resultado:

$t_{exp} > t_{tabla}$  para  $p = 0.05$  y (n-2) grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H0) y "b" es significativamente diferente de cero.

### f) Test de proporcionalidad

Test de Hipótesis para el Intercepto a:

H0 = "a" es estadísticamente igual a cero

H1 = "a" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación:

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

El intervalo de confianza incluye el cero.

$s^2_{y,x} =$	109198051		-Intervalo de confianza		
$s^2_b =$	370764381		-36 146.4990	+/-	41598.42
$s_b =$	19255.2429	Max. Valor permitido	Limite superior=		5451.9243724
$s_{brel}\% =$	-0.5327001	< 2%	Limite inferior=		-77744.9222845
n	15				

$$t_{exp} = 1.877$$

$$t_{tabla} = 2.160$$

Resultado:

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

Este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

**Conclusión:** Cumple con los parámetros estadísticos de Linealidad de Sistema.

## REPETIBILIDAD

Tabla N° 13. Áreas de las Muestras de Repetibilidad

Muestra N°	Unidad (mg)	Factor	BISOPROLOL FUMARATO	Promedio de Áreas	% BISOPROLOL FUMARATO
M1	1030.25	2.615142	6474277	6462965	100.93%
			6451652		
M2	1030.07	2.615599	6402155	6407192	100.07%
			6412229		
M3	1030.22	2.615218	6473107	6450674	100.74%
			6428240		
M4	1030.26	2.615117	6451159	6457681	100.84%
			6464203		
M5	1030.59	2.614279	6373852	6364003	99.35%
			6354153		

<b>M6</b>	1030.64	2.614152	6379149	6392622	99.79%
			6406094		

Media: 100.3 %

Desvest (s): 0.65 %

CV % Máximo ( $\leq 2,0\%$ ): **0.65 %**

## PRECISIÓN INTERMEDIA

**Tabla N° 14.** Resultados de Precisión Intermedia

Muestra N°	Analista 1	Analista 2
<b>M1</b>	100.93 %	100.48 %
<b>M2</b>	100.07 %	100.09 %
<b>M3</b>	100.74 %	98.74 %
<b>M4</b>	100.84 %	99.67 %
<b>M5</b>	99.35 %	99.49 %
<b>M6</b>	99.79 %	97.77 %
<b>promedio</b>	100.29 %	99.37 %

Media: 99.8 %

Desvest PI(s): 0.92 %

CV PI (%) Máximo ( $\leq 2,0\%$ ): **0.93 %**

**Criterio de aceptación:** R.S D. de Precisión Intermedia  $\leq 2.0\%$

Límites de Confianza

$$\begin{aligned} \text{Intervalo de Confianza Individual} &= \text{Media} \pm t_{\text{tabla}} \cdot S \\ & \mathbf{99.83 \%} \pm \mathbf{2.37 \%} \\ & 97.45 \% \text{ a } 102.20 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Intervalo de Confianza Promedio} &= \text{Media} \pm t_{\text{tabla}} \cdot S / \sqrt{n} \\ & \mathbf{99.83 \%} \pm \mathbf{0.97 \%} \\ & 98.86 \% \text{ a } 100.80 \% \end{aligned}$$

$$t_{\text{tabla}} = 2.57 \quad (\alpha=0.05, n-1=5)$$

## LINEALIDAD DE MÉTODO

Muestra : Estándar (Principio activo) + placebo

		<u>Concentración de</u> <u>BISOPROLOL FUMARATO</u>	
<b>50 %</b>			
12.71	mg → 25 mL + Placebo	0.504333	mg/mL
12.62	mg	0.500762	mg/mL
12.70	mg	0.503936	mg/mL
<b>100 %</b>			
25.15	mg → 25 mL + Placebo	0.997952	mg/mL
25.01	mg	0.992397	mg/mL
25.21	mg	1.000333	mg/mL
<b>150 %</b>			
37.49	mg → 25 mL + Placebo	1.487603	mg/mL
37.47	mg	1.486810	mg/mL
36.74	mg	1.457843	mg/mL

**Tabla N° 15.** Áreas de las Muestras de Linealidad de Método

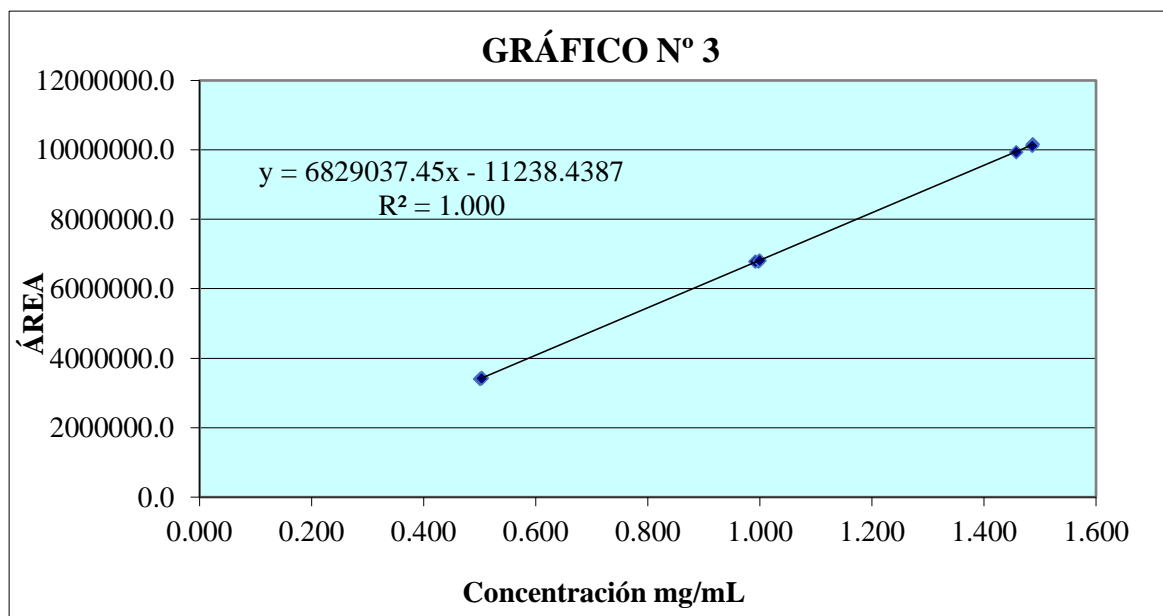
	<b>50 %</b>	<b>100 %</b>	<b>150 %</b>
<b>M1</b>	3441348	6772881	10151118
	3439818	6805102	10179377
<b>M2</b>	3407834	6778000	10136322
	3410698	6790419	10122377
<b>M3</b>	3420890	6811736	9935030
	3419895	6826850	9941501

**Tabla N° 16.** Estadístico de Linealidad de Método

Conc.	Dato (n)	X (mg/mL)	y	x.y	f (y/x)	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	Varianza (s <sup>2</sup> )
50 %	1	0.5043	3440583.0	1735198.85802	6822048.853	0.25435	11837611379889	304907201. 1310
	2	0.5008	3409266.0	1707229.49699	6808161.808	0.25076	11623094658756	
	3	0.5039	3420392.5	1723658.91488	6787354.942	0.25395	11699084854056	
100 %	1	0.9980	6788991.5	6775087.64541	6802923.888	0.99591	46090405587072	278733607. 7231
	2	0.9924	6784209.5	6732627.79833	6836186.392	0.98485	46025498539890	
	3	1.0003	6819293.0	6821562.46071	6817024.294	1.00067	46502757019849	
150 %	1	1.4876	10165247.5	15121854.70979	6833305.750	2.21296	103332256736256	116853955. 0625
	2	1.4868	10129349.5	15060414.07836	6812808.782	2.21060	102603721293150	
	3	1.4578	9938265.5	14488432.77897	6817101.798	2.12531	98769121148490	
<b>SUMA</b>	<b>9</b>	<b>8.932</b>	<b>60895598.0</b>	<b>70166066.741</b>	<b>61336916.508</b>	<b>10.289</b>	<b>478483551217409</b>	<b>700494763. 92</b>

a) **Regresión Lineal**

b) **GRÁFICO N° 3.** Recta de Regresión de Linealidad de Método



Ecuación de la recta:

$$y = 6829037.45 X - -11238.4387$$

c) **Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de Determinación (r<sup>2</sup>)**

Criterio de aceptación:

r	≥	0.999
r <sup>2</sup>	≥	0.998

r =	1.000
r <sup>2</sup> =	1.000

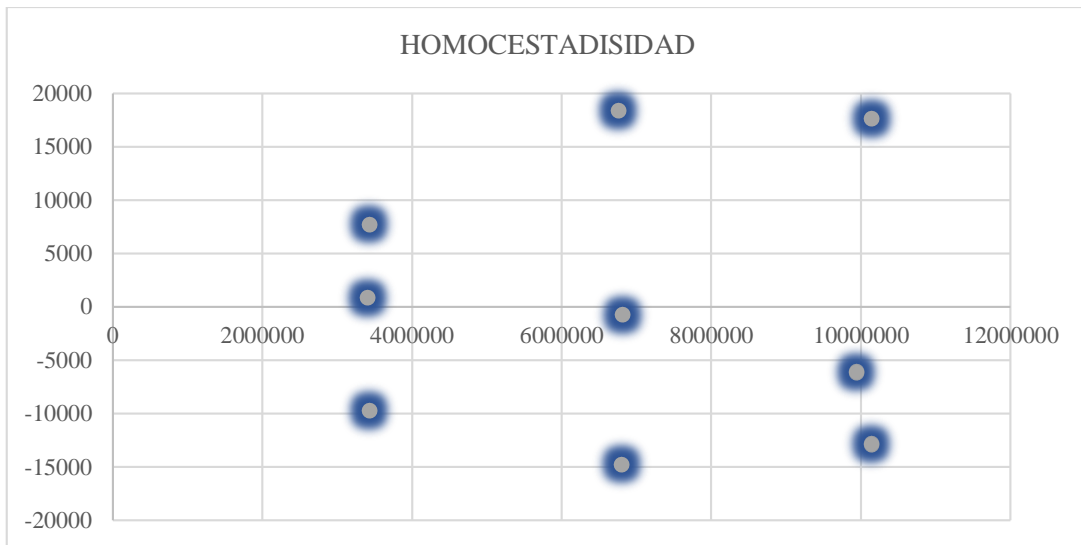
d) **Varianza Residual Constante (Homocedasticidad)**

La distribución de los puntos en la representación de los residuales debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

**Tabla N° 17.** Homocedasticidad (Linealidad de Método)

Obs.	Pronóstico Y	Residuos
1	3432869.13828	7713.8617161
2	3408481.27975	784.7202473
3	3430159.37622	-9766.8762248
4	6803813.13971	-14821.6397087
5	6765876.47088	18333.0291177
6	6820071.71206	-778.7120628
7	10147659.52054	17587.9794568
8	10142239.99643	-12890.4964252
9	9944427.36612	-6161.8661165

**GRÁFICO N° 4. Homocedasticidad (Linealidad de Método)**



**e) Análisis de la Varianza: ANOVA**

**d.1) Homogeneidad de Varianzas**

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

H0: Las varianzas son semejantes

H1: Las varianzas son diferentes

Criterio de Aceptación:

Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la H<sub>0</sub> demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

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

$$G_{\text{exp}} = \mathbf{0.44}$$

$$G_{\text{tablas}} = \mathbf{0.87}$$

Resultado: Como  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas.

#### d.2) ANOVA

Planteamiento de la Hipótesis

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

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

Criterio de Aceptación:

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

**Tabla N° 18.** ANOVA (Linealidad de Método)

	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>F<sub>tablas</sub></b>
<b>Regresión</b>	1	66451897428489.90	66451897428489.90	<b>379610.72</b>	5.591
<b>Residuos</b>	7	1225369185.8898	175052740.84		
<b>Total</b>	8	66453122797675.8000			

Resultado: Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ , no se acepta la  $H_0$ ; se acepta hipótesis alterna ( $H_1$ ) por ende el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste de los datos.

#### f) Test de linealidad

##### e.1) Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta (f):

$$f = \frac{y}{x}$$

Criterio de Aceptación	:	RSD £ 2,0%		
De la Tabla Nº 2 ( Linealidad del Método )	:	Media de f RSD	= =	6815 212.95 <b>0.2 %</b>

### e.2) Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente

Test de Hipótesis para la Pendiente b:

H0 = "b" es estadísticamente igual a cero

H1 = "b" es estadísticamente diferente de cero.

Criterio de aceptación:

Si  $t_{exp} > t_{tabla}$  para una probabilidad del 95% ( $p=0.05$ ) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.

El intervalo de confianza no incluye el cero.

$s^2_{y,x} =$	175052740.8		-Intervalo de Confianza	
$s^2_b =$	122851515.2		6829037.4471	+/- 26209.118
$s_b =$	11083.84027	Max. Valor permitido	Límite superior =	6855246.5646
$s_{prel\%} =$	0.001623046	< 2%	Límite inferior =	6802828.3296

$$t_{exp} = 616.126$$

$$t_{tabla} = 2.365$$

Resultado:

$t_{exp} > t_{tabla}$  para  $p = 0.05$  y (n-2) grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H0) y "b" es significativamente diferente de cero

### g) Test de proporcionalidad

Test de Hipótesis para el Intercepto a:

H0 = "a" es estadísticamente igual a cero

H1 = "a" es estadísticamente diferente de cero

Criterio de aceptación:

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

El intervalo de confianza incluye el cero.

$s_{2y,x}^2 =$	175052740.8			-Intervalo de Confianza		
$s_a^2 =$	140451543.00			-11238.4387	+/-	28023.695
$s_a =$	11851.22538	Max. Valor permitido		Límite superior =	16785.2562	
$s_{a,rel}\% =$	-1.054525959	< 2%		Límite inferior =	-39262.1337	
n	9					

$$t_{exp} = 0.948$$

$$t_{tabla} = 2.365$$

Resultado:

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

Este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

**Conclusión:** Cumple con los parámetros estadísticos de Linealidad de Método.

## EXACTITUD

**Tabla N° 19.** Área de muestras de Exactitud

	50 %	100 %	150 %
M1	3441348	6772881	10151118
	3439818	6805102	10179377
M2	3407834	6778000	10136322
	3410698	6790419	10122377
M3	3420890	6811736	9935030
	3419895	6826850	9941501

Tabla N° 20. Resultados de Exactitud

Conc.	Ensayo	** Pesado (mg)	** Añadido (mg)	** Hallado (mg)	Recuperación %
50 %	1	12.71	12.61	12.71	100.81 %
	2	12.62	12.52	12.60	100.61 %
	3	12.70	12.60	12.64	100.30 %
100 %	1	25.15	24.95	25.08	100.53 %
	2	25.01	24.81	25.06	101.02 %
	3	25.21	25.01	25.19	100.74 %
150 %	1	37.49	37.19	37.55	100.98 %
	2	37.47	37.17	37.42	100.68 %
	3	36.74	36.45	36.72	100.74 %

**\*\* BISOPROLOL FUMARATO**

**Potencia (99.2% T/C)**

Porcentaje de Recuperación (98,0 - 102,0%)	:	100.71 %
Coefficiente de Variación	:	0.22%
T. Exp. (Valor porcentual)	:	-9.69%

**a) t de Student:**

**Hallando del t-experimental:**

$$t_{exp} = \frac{(100 - \bar{x}) * \sqrt{n}}{CV} = \frac{(100 - 100.71\%) * \sqrt{9}}{0.22\%} = \frac{-2.14}{0.22\%} = -9.69\%/100 = -0.097$$

**Hallando el t tablas:**

t tablas (  $\alpha=0.05$  ; g.l = 9-1 = 8 )

$t_{exp} =$	<b>-0.097</b>	$t_{tablas} =$	2.306	( $\alpha=0.05, n-1=8$ gl)
-------------	---------------	----------------	-------	----------------------------

Cumple con el test de Student ya que  $t_{exp} < t_{tablas}$  significa que no hay diferencia entre las dos medias.

**b) Test de Cochran (Homogeneidad de varianzas):**

$G_{exp} =$	<b>0.435</b>	$G_{tablas} =$	0.871	( $\alpha=0.05, k=3, n=3$ )
-------------	--------------	----------------	-------	-----------------------------

$G_{exp} < G_{tablas}$  significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. En otras palabras, las diferentes concentraciones tienen la misma variabilidad.

**c) Intervalos de Confianza (IC( $\mu$ ))**

$$IC(\mu) = y \pm t(0.01, n-1) \times S/\sqrt{n}$$

$$IC \text{ Inferior} = 100.54 \%$$

$$IC \text{ Superior} = 100.88 \%$$

Al ser el  $t_{exp} < t_{tablas}$ , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 %, por lo que la exactitud es correcta.

**Conclusión:** Cumple con los parámetros estadísticos de Exactitud

## ROBUSTEZ (CAMBIO DE FILTRO)

**Tabla N° 21.** Determinación de los Factores a estudiar:

Factor	Descripción
<b>a</b>	Cambio de filtro PVDF 0,45 $\mu\text{m}$ a PVDF 0,22 $\mu\text{m}$

**Tabla N° 22.** Definición de valores nominales y alternativos de los factores:

Factor	Valor D (Nominal)	Factor	Valor d (Alternativo)
<b>A</b>	Filtro PVDF 0,45 $\mu\text{m}$	<b>a</b>	Filtro PVDF 0,22 $\mu\text{m}$

**Tabla N° 23.** Cálculo de la diferencia entre promedios:

Exp.	conc. calc. %	Diferencia %
0	100.29 %	
<b>a</b>	97.92 %	<b>2.36 %</b>
		$\leq 2.0\%$

**Conclusión:** No cumple con los parámetros estadísticos de Robustez de filtros de 0,22 $\mu\text{m}$

## ROBUSTEZ (CAMBIO DE FLUJO)

**Tabla N° 24.** Determinación de los Factores a estudiar:

Factor	Descripción
<b>a</b>	Robustez de Flujo 0,5 mL/min

**Tabla N° 25.** Definición de valores nominales y alternativos de los factores

Factor	Valor D (Nominal)	Factor	Valor d (Alternativo)
<b>A</b>	Tiempo = 0 Hrs.	<b>a</b>	Robustez de Flujo 0,5 mL/min

**Tabla N° 26.** Cálculo de la diferencia entre promedios:

Exp.	conc. calc. %	Diferencia %	
0	100.29 %		
<b>a</b>	98.56 %	<b>1.72 %</b>	≤ 2.0%

**Conclusión:** Si cumple con los parámetros estadísticos.

### ESTABILIDAD (12 HORAS)

**Tabla N° 27.** Determinación de los Factores a estudiar:

Factor	Descripción
<b>a</b>	Robustez de Muestra 12 H

**Tabla N° 28.** Definición de valores nominales y alternativos de los factores

Factor	Valor D (Nominal)	Factor	Valor d (Alternativo)
<b>A</b>	Tiempo = 0 Hrs.	<b>a</b>	Rob. de Muestra 12 H

### **A) TIEMPO CERO DE ANÁLISIS**

**Tabla N° 29.** Áreas del estándar (TIEMPO CERO DE ANÁLISIS)

Estándar N°	St-1	St-2
Áreas	13702575	13656742
	13709786	13680526
	13700283	-
	13701506	-
	13721626	-
<b>Media</b>	13707155.20	13668634.00
<b>Chk ST Media ≤ 2.0%</b>	0.1 %	

**Tabla N° 30.** Áreas de Muestras (TIEMPO CERO DE ANÁLISIS)

Muestra N°	Unidad (mg)	Factor	BISOPROLOL FUMARATO	Promedio de Áreas	% BISOPROLOL FUMARATO
M1	1030.5900	2.614279	12801236	12801007.50	97.57 %
			12800779		
M2	1030.7400	2.613899	13122231	13117278.50	99.97 %
			13112326		
M3	1030.3000	2.615015	13020220	13011445.50	99.21 %
			13002671		
M4	1030.3300	2.614939	13003504	12998807.00	99.11 %
			12994110		
M5	1030.0700	2.615599	12896653	12889150.50	98.30 %
			12881648		
M6	1030.4300	2.614685	12756389	12751265.50	97.21 %
			12746142		

**a) ESTABILIDAD 12 H**

**Tabla N° 31.** Áreas del estándar (TIEMPO 12 HORAS)

Estándar N°	St-1	St-2
Áreas	6935452	6923761
	6933160	6929611
	6940064	-
	6942572	-
	6941093	-
Media	6938468	6926686
Chk ST Media ≤ 2.0%	0.2 %	

**Tabla N° 32.** Áreas de Muestras (TIEMPO 12 HORAS)

Muestra N°	Unidad (mg)	Factor	BISOPROLOL FUMARATO	Promedio de Áreas	% BISOPROLOL FUMARATO
M1	1030.59	2.614279	6381239	6374117.50	96.48 %
			6366996		
M2	1030.74	2.613899	6549080	6547145.00	99.08 %

			6545210		
M3	1030.30	2.615015	6483029	6480582.50	98.12 %
			6478136		
M4	1030.33	2.614939	6453180	6452390.50	97.69 %
			6451601		
M5	1030.07	2.615599	6392534	6393314.00	96.82 %
			6394094		
M6	1030.43	2.614685	6321384	6321574.50	95.70 %
			6321765		

Media : **97.31 %**

Desvest (s) : 1.2 %

CV % Máximo ( $\leq 2,0\%$ ) : **1.3 %**

**Tabla N° 33.** Cálculo de la diferencia entre promedios:

Exp.	conc. calc. %	Diferencia %	
0	98.56 %		
<b>a</b>	97.31 %	<b>1.26 %</b>	$\leq 2.0\%$

**Conclusión:** Si cumple con los parámetros estadísticos.

**5.2. Informe Técnico**

**PRODUCTO** : **BISOPROLOL FUMARATO 2,5 mg TABLETA**  
**RECUBIERTA**

**VALORACIÓN DE BISOPROLOL FUMARATO**

**MÉTODO** : **Cromatografía Líquida HPLC**

**Tabla N° 34.** Informe Técnico (Parte 1)

<b>PARAMETRO</b>	<b>LÍMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<u>Precisión Instrumental:</u>		
De las Áreas	RSD $\leq$ 2,0%	0.1 %
Del tiempo de retención	RSD $\leq$ 2,0%	0.1 %
Asimetría	$\leq$ 2,0%	1.23
Resolución	$>$ 7,0	11.80
<u>Especificidad:</u>		
Pureza	0,98 - 1,00	1,00
Interferencia debido a excipientes (matriz)	Ausencia de interferencia: $\leq$ 2%	0,00
Degradaciones	$\leq$ 20,0%	0.12
Fotólisis	$\leq$ 20,0%	11.30%
Calor húmedo	$\leq$ 20,0%	0.79%
Calor seco	$\leq$ 20,0%	11.21%

Hidrólisis ácida	$\leq 20,0\%$	1.80%
Hidrólisis alcalina	$\leq 20,0\%$	0.89%
Hidrólisis oxidativa	$\leq 20,0\%$	19.13%

**Tabla N° 35.** Informe Técnico (Parte 2)

<b>PARÁMETRO</b>	<b>LÍMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<u>Linealidad de Método</u>		
Regresión Lineal:		
Ecuación de la Recta:	$y = bx + a$	$y = 6829037.447 x + -11238.43873$
Coefficiente de Correlación (r)	Mayor o igual a 0.999	1.000
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	Mayor o igual a 0.998	1.000
Homogeneidad de varianza (Test Cochran)	$G_{exp} < G_{tabla}$	0.44 < 0.87
Test de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	379610.72 > 5.591
Test de Linealidad: Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0.22 %
Intervalo de confianza de la pendiente "b":	$b \pm t_{tabla} \cdot S_b$	6829037.45 +/- 26209.12
	$t_{exp} > t_{tabla}$	616.126 > 2.365
Intervalo de confianza del Intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \cdot S_a$	-11238.44 +/- 28023.69

	$t_{exp} < t_{tabla}$	0.948 < 2.365
<u>Exactitud:</u>		
Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	100.71 %

**Tabla N° 36.** Informe Técnico (Parte 3)

<b>PARÁMETRO</b>	<b>LÍMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<u>Linealidad de Sistema</u>		
Regresión Lineal:		
Ecuación de la Recta:	$y = bx + a$	$y = 3E+07 x + -36146$
Coefficiente de Correlación	Mayor o igual a 0.999	1.000
Coefficiente de Determinación	Mayor o igual a 0.998	1.000
Homogeneidad de varianza (Test Cochran)	$G_{exp} < G_{tabla}$	0.675 < 0.680
Test de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	28986.10 > 4.667
Test de Linealidad: Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0.4 %

Intervalo de confianza de la pendiente "b":	$b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$	32651314.28	+/-	414317.85
	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	170.253	>	2.160
Test de Proporcionalidad: Intervalo de confianza del Intercepto "a"	$a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$	-36146.50	+/-	41598.42
	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$	1.877	<	2.160

**Tabla N° 37.** Informe Técnico (Parte 4)

<b>PARÁMETRO</b>	<b>LÍMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<u>Repetibilidad:</u>	RSD ≤ 2,0%	0.65 %
Intervalo de Confianza del - 95% Individual	$X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$	100.29% ± 1.66%
Intervalo de Confianza del - 95% de la Media	$X \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$	100.29% ± 0.68%
<u>Precisión Intermedia:</u>	RSD ≤ 2,0%	0.93 %
<u>Robustez</u>		
Cambio de Filtro	RSD ≤ 2,0%	2.36 %
Cambio de Flujo	RSD ≤ 2,0%	1.72 %
<u>Estabilidad</u>		
Estabilidad 12 horas	RSD ≤ 2,0%	1.26 %

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### - **ESPECIFICIDAD:**

Al efectuar el análisis del placebo se observa ausencia de respuesta, es decir, no interfiere en la determinación de Bisoprolol Fumarato. Las muestras mantienen una pureza de 1,00.

Se realizaron las diferentes degradaciones del placebo y del producto terminado (Hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, luz, oxidación, calor húmedo y calor seco). Obteniendo que el Bisoprolol Fumarato se degrada 11,30% en la degradación por Luz, 0,79% en la degradación por Calor Húmedo, 11,21% en degradación por calor seco, 1,80% en degradación con hidrolisis acida, 0,89% en degradación en hidrólisis alcalina y 19,13% en degradación en hidrólisis oxidativa, siendo este último un valor elevado debido al aumento de la polaridad del Principio Activo del betabloqueador (1), permitiendo así una rápida disolución y por consiguiente, una mayor degradación (2).

### - **LINEALIDAD:**

El gráfico de respuesta vs concentración para Bisoprolol Fumarato demuestra que el método Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC), produce una respuesta lineal para el principio activo y para las muestras (principio activo + placebo). La ecuación de la recta obtenida en la linealidad de método demuestra que la metodología analítica responde lineal y proporcionalmente en el rango de trabajo empleado, con un  $r^2 = 1,000$ .

### - **EXACTITUD:**

Los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación, siendo el porcentaje de recuperación obtenido de: 100,71 %, encontrándose dentro de los límites establecidos (98-102%)

### - **PRECISIÓN:**

En el análisis de repetibilidad del método; la desviación estándar relativa es menor del criterio de aceptación ( $\leq 2,0\%$ ), obteniendo un resultado de 0,65%, lo que demuestra la precisión del método analítico.

En el análisis de precisión intermedia hay similitud en cuanto a los resultados obtenidos ( $RSD \leq 2,0\%$ ), resultando 0,93% de desviación estándar relativa entre los resultados de los analistas, en diferentes días y equipos HPLC, lo que demuestra la fiabilidad del método analítico.

- **ROBUSTEZ POR CAMBIO DE FILTRO:**

En este estudio se evaluó la Robustez por Cambio de filtro (filtro 0,22um), donde se demuestra con los resultados de Bisoprolol Fumarato obtenidos que no cumplen con el criterio de aceptación siendo la RSD y la diferencia absoluta entre las muestras iniciales y la nueva condición  $\geq 2,0\%$ .

- **ROBUSTEZ POR CAMBIO DE FLUJO:**

En este estudio se evaluó la Robustez por Cambio de flujo (flujo 0,5mL/min), donde se demuestra con los resultados de Bisoprolol Fumarato obtenidos que cumplen con el criterio de aceptación siendo la RSD y la diferencia absoluta entre las muestras iniciales y la nueva condición  $\leq 2,0\%$ .

- **ESTABILIDAD 12 HORAS:**

En este estudio se evaluó la Estabilidad de 12 horas, donde se observó que los resultados de Bisoprolol Fumarato SI cumplen con el criterio de aceptación siendo la RSD y la diferencia absoluta entre las muestras iniciales y la nueva condición  $\leq 2,0\%$ .

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ Este estudio permite concluir que el método por HPLC para la Valoración de Bisoprolol Fumarato 2,5 mg Tableta Recubierta, resultó ser específico, pues permite cuantificar el principio activo después de la degradación de éste sin interferencia de excipientes o posibles productos de degradación.
- ✓ Este estudio permite concluir que el método por HPLC es lineal y proporcionalmente en el rango de trabajo empleado. Si es un método exacto porque permite la recuperación del activo dentro de los límites establecidos (98-102%). Asimismo, la repetibilidad y precisión intermedia del método cumple con los parámetros establecidos y demuestra la fiabilidad del método analítico.
- ✓ Este estudio permite concluir que el método por HPLC No es robusto con membrana de PVDF de porosidad 0,22  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Este estudio permite concluir que el método por HPLC Sí es robusto a flujo 0,5mL/min.
- ✓ Este estudio permite concluir que el método por HPLC Sí es estable hasta las 12 horas.
- ✓ De acuerdo con los resultados obtenidos confrontados con los criterios de aceptación establecidos en el reporte de Verificación RVM-2303 (I), se dictamina que la Verificación de la Metodología Analítica para Valoración de Bisoprolol Fumarato 2,5 mg Tableta Recubierta, por el método por HPLC es CONFORME para su empleo en el análisis del producto por satisfacer los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda el uso de la presente validación del método analítico como material validado aplicable para análisis fisicoquímicos en laboratorios farmacéuticos para la obtención de resultados confiables y reproducibles.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Guideline, I.H.T. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R2). in International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. [Internet]. 2022 [citado 25 de julio de 2023]; Recuperado a partir de [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2-R2\\_Document\\_Step2\\_Guideline\\_2022\\_0324.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf)
- (2) PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5281064, Bisoprolol Fumarate; [cited 2024 July 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisoprolol-Fumarate>
- (3) Zaki MM, Abdelwahab NS, Ali AA, Sharkawi SMZ. Determinación simultánea de fumarato de bisoprolol y calcio de rosuvastatina en una nueva formulación combinada mediante RP-HPLC validada. Eur. J. Chem. [Internet]. 31 de marzo de 2019 [citado el 19 de julio de 2023];10(1):52-6. Disponible en: <https://www.eurjchem.com/index.php/eurjchem/article/view/1815>
- (4) USP. Stage 4 Harmonization. (621) Chromatography. 2022. Recuperado a partir de: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf>
- (5) Braz. J. Validation of an analytical method by high-performance liquid chromatography and microbiological assay, biological safety and in silico toxicity for danofloxacin. [Internet]. Pharm. Sci. 56. 2020. [citado el 19 de julio de 2023]; Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000418355>
- (6) British Pharmacopoeia, Bisoprolol fumarate. [Internet]. United Kingdom; 2020. [citado el 19 de julio de 2023]; Recuperado a partir de: <https://www.pharmacopoeia.com/shop/products/1000015254?journey-type=CRS>
- (7) FDA, Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, USA, 2015.
- (8) Priyanka S. Gawarkar, et al. Development and validation of UV spectrophotometric methods for simultaneous estimation of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate in pure and tablet dosage form, International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences, 2015; 4(3).
- (9) Hernandis V. Validación de métodos analíticos por cromatografía líquida alta resolución (HPLC) para la cuantificación de cefuroxima, delafloxacino y tilvalosina en muestras biológicas [Internet]. Universidad de Murcia, España; 2022. Recuperado a partir de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=315845>

- (10) Alla, S. R., Seemaladinne, R., Cheemalapati, S., & Doshi, O. P. A quick and standard pharmaceutical industrial approach to develop a robust analytical method by HPLC. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 2024, vol. 11, no 2, p. 168-173.
- (11) Kowalska, M., Woźniak, M., Kijek, M., Mitrosz, P., Szakiel, J., & Turek, P. Gestión de la validación del método HPLC para la determinación de impurezas de ácido acetilsalicílico en un nuevo producto farmacéutico. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, no 1, p. 1. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99269-x>

## X. ANEXOS

### Anexo N° 1. Matriz de consistencia

**Título de la investigación:** Validación de método analítico de valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) - 2023

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	Hipótesis nula	VARIABLES	DISEÑO METODOLÓGICO
¿El método analítico para la valoración del Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) cumplirá con los parámetros de desempeño de validación?	Validar el método analítico para la valoración del Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), 2023.	El método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución cumple con todos los parámetros de validación y criterios de aceptación exigidos por la USP vigente fijados para la valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.	<p><b>Variable independiente:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación del estándar para evaluación de aptitud del sistema</li> <li>• Degradaciones de placebo, analito, analito + placebo y producto terminado</li> <li>• Rango de concentraciones</li> <li>• Cambio de Analista</li> <li>• Rango de concentraciones</li> <li>• Cambio de filtro</li> <li>• Cambio de flujo</li> <li>• Estabilidad de muestras</li> </ul> <p><b>Variable dependiente:</b></p>	<p><b>Tipo de investigación:</b> Experimental Correlacional</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> investigativo correlacional</p> <p><b>Diseño de la investigación:</b> Diseño cuantitativo experimental sincrónico (2023)</p> <p><b>Población:</b> Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.</p>
<p><b>Problemas específicos:</b></p> <p><b>PE1:</b> ¿Es posible identificar la Aptitud del Sistema conforme a parámetros establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)?</p> <p><b>PE2:</b> ¿El método utilizado cumple con el parámetro de Especificidad para la Cuantificación de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta?</p> <p><b>PE3:</b> ¿El método utilizado cumple con los parámetros de</p>	<p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p><b>OE1:</b> Identificar la Aptitud del Sistema conforme a parámetros establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).</p> <p><b>OE2:</b> Evaluar la Especificidad del método utilizado para la cuantificación de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.</p> <p><b>OE3:</b> Evaluar Linealidad del sistema, Precisión Intermedia y del método cromatográfico</p>	<p><b>Hipótesis Alternativa</b></p> <p>El método analítico mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución no cumple con todos los parámetros de validación y criterios de aceptación exigidos por la USP vigente fijados para la valoración de Bisoprolol fumarato 2.5 mg tableta recubierta.</p>		

<p>Linealidad del sistema, Precisión Intermedia para determinar Coeficiente de Determinación, Factor de Respuesta?  <b>PE4:</b> ¿El método utilizado cumple con los parámetros de Exactitud, Repetibilidad del método cromatográfico para determinar porcentaje de recuperación de Bisoprolol fumarato?  <b>PE5:</b> ¿El método utilizado cumple con los parámetros de Estabilidad y Robustez de método cromatográfico para determinar el comportamiento del activo de bisoprolol fumarato ante parámetros determinados?</p>	<p>para determinar Coeficiente de Determinación, Factor de Respuesta.  <b>OE4:</b> Evaluar la Exactitud, Repetibilidad del método cromatográfico para determinar porcentaje de recuperación de Bisoprolol fumarato.  <b>OE5:</b> Evaluar la Estabilidad y Robustez del método cromatográfico para determinar el comportamiento del activo de Bisoprolol fumarato ante parámetros determinados.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asimetría de pico</li> <li>• Porcentaje promedio de RSD de Áreas del Estándar</li> <li>• Porcentaje promedio de RSD de Tiempo de retención del Estándar</li> <li>• Valor de resolución</li> <li>• Área del pico</li> <li>• Porcentaje de degradación</li> <li>• Desviación Estándar Relativa (RSD) entre analistas</li> <li>• Desviación Estándar Relativa (RSD) entre ambos cambios analíticos (cambio de filtro y flujo)</li> <li>• Desviación Estándar Relativa (RSD) entre tiempo 0 y tiempo 12 horas</li> </ul>	
--	--	--	---	--

## Anexo N° 2. Consentimiento informado

Ica, 13 de Agosto del 2024



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Q.F. Mirella Edith Chumbes Cornejo, autorizo a Alonso José Purilla De la Cruz, Bachiller de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", quien solicita el permiso correspondiente para realizar el trabajo de investigación en este Laboratorio Farmacéutico Gabblan.

El estudio de investigación cuyo título tentativo es "Validación del Método Analítico para la Valoración de Bisoprolol Fumarato 2.5 mg tableta recubierta por método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) - 2023", se desarrollará a partir del mes de Agosto y por un periodo aproximado de 8 meses consecutivos.

DNI: 45032441

Q.F. Mirella Edith Chumbes Cornejo

### Anexo N° 3. Validez de Instrumento

#### CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

**TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN:** VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE BISOPROLOL FUMARATO 2.5 MG TABLETA RECUBIERTA POR MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) – 2023

N°	Parámetros de Validación	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		SI	NO	SI	NO	SI	NO	
1	ESPECIFICIDAD	X		X		X		
2	LINEALIDAD	X		X		X		
3	EXACTITUD	X		X		X		
4	PRECISIÓN	X		X		X		
5	ROBUSTEZ	X		X		X		
6	RANGO	X		X		X		

**Observaciones (precisar si hay suficiencia):** NINGUNO

**Opinión de aplicabilidad:**

Aplicable (X)

Aplicable después de corregir ( )

No Aplicable ( )

**Apellidos y nombres del juez validador:** QF. Mirella Edith Cahuana Cornejo

**DNI:** 45032411

<sup>1</sup>**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado

<sup>2</sup>**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

<sup>3</sup>**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

**Nota:** Suficiencia, se dice cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

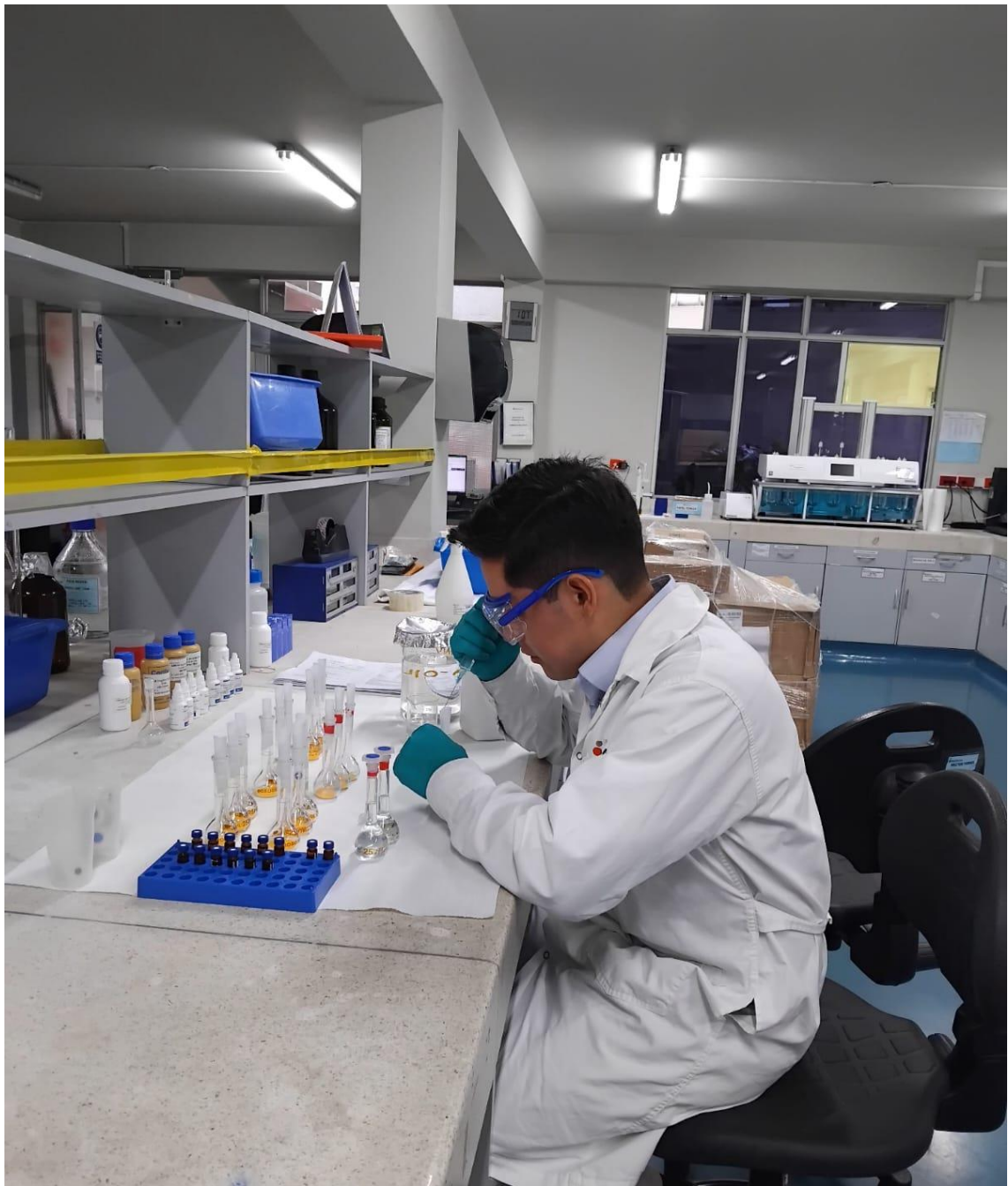
**15 de agosto del 2024**



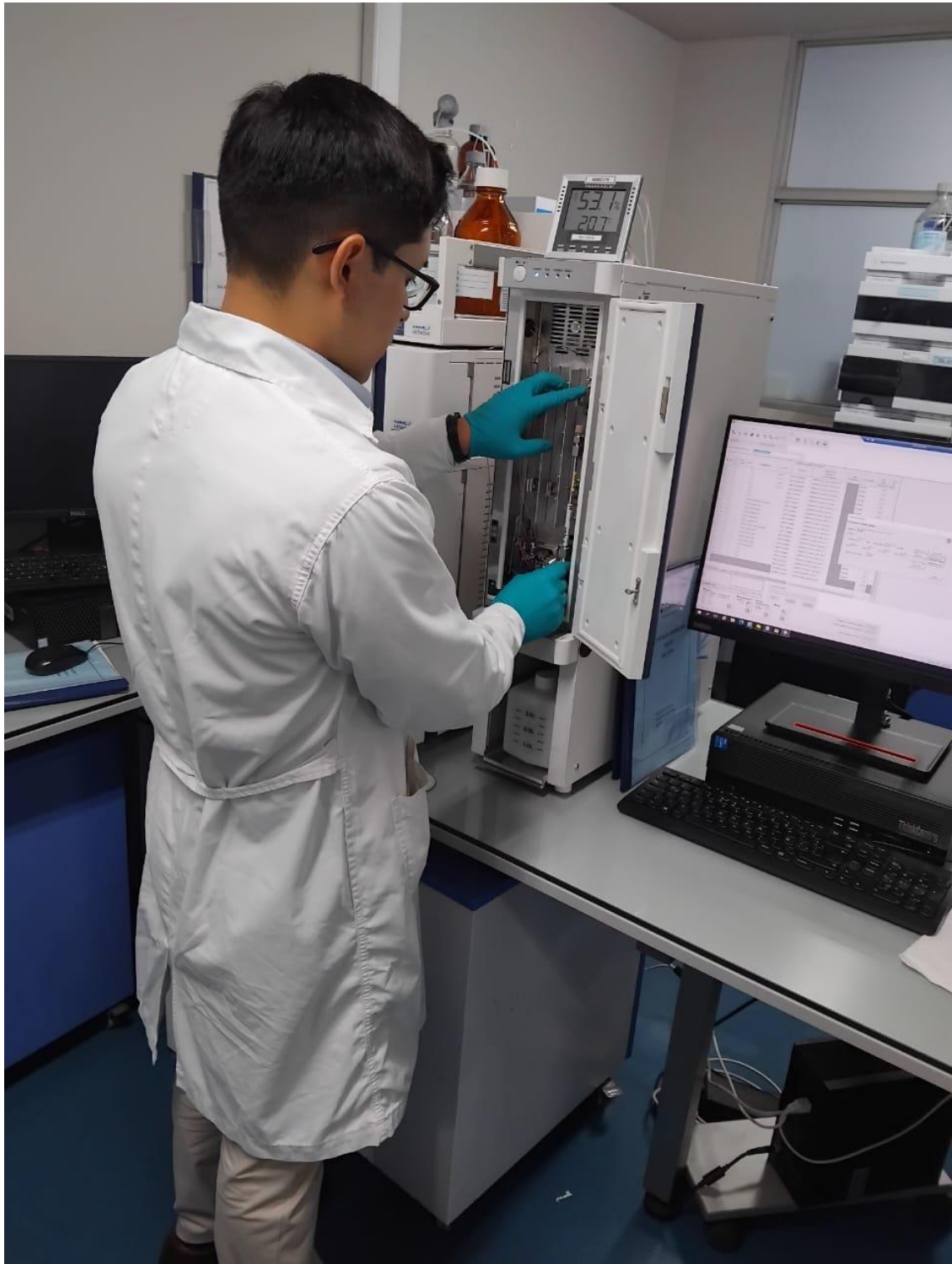
QF. MIRELLA EDITH CAHUANA CORNEJO  
C.Q.F.P. 17927

Firma del Experto Informante

**Anexo N° 4. Fotos**



**FIGURA N° 4. Preparación de muestras**



**FIGURA N° 5.** Colocación de columna cromatográfica



**FIGURA N° 6.** Uso del equipo HPLC