

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR BENCILGLUCOSINOLATO EN TABLETAS DE 800 mg DE *Lepidium peruvianum* Chacón sp.”

**TESIS PRESENTADA POR EL BACHILLER:
CANCHERO REÁTEGUI DAN HILARIO**

**Para optar el título profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESOR:
Q. F. Luis Alberto Vilchez Alcalá Mgr.**

**CO-ASESOR:
Q. F. Víctor Raúl Lerma Huayhua.**

IQUITOS - PERÚ

2013

DEDICATORIA

*A mis padres Arquímedes Canchero Lume y Paquita Reátegui Cabrera, por su cariño
y dedicación, a mis hermanos por su afecto, ayuda y comprensión,
a mis tíos por su preocupación y todo el apoyo brindado y
a Dios, que es fuente de vida y luz que guía
e ilumina los pasos.*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana por la excelente formación profesional recibida.

A Laboratorios NATURGEN S.A.C en la persona de su jefe de control de calidad Dra: Erika Talavera Vásquez, por el apoyo y facilidades brindadas.

A mi familia, por su apoyo incondicional, permanente aliento que hizo posible la realización de este trabajo.

Al Sr: Eulogio Ching Soplin por su confianza y apoyo brindado.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Q. F. Alain Da Silva Rodríguez, Q. F. Janeth Pacheco Uyén, Q. F. Edgar Orosco Alanoca, Q. F. Jharly Aslla Quispe, Q. F. Shirley Coanqui Huamán, y Q. F. Giancarlo Gutiérrez Chávez por su constante apoyo incondicional.

Al Q. F. Luis Alberto Vílchez Alcalá Mgr. asesor de esta tesis, mi profundo agradecimiento por sus valiosos aportes y tiempo brindado.

Al Q. F. Víctor R. Lerma Huayhua, Co-asesor de esta tesis, mi profundo agradecimiento por sus valiosos aportes y tiempo brindado.

A los catedráticos de la Facultad, que con sus conocimientos brindados, forjaron y fortalecieron mi desarrollo profesional.

Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I

1.1	Introducción.....	15
1.2	Planteamiento del problema.....	17
1.3	Formulación del Problema.....	19
1.4	Objetivos.....	20
1.4.1	General.....	20
1.4.2	Específicos.....	20

CAPÍTULO II

2.1	Marco teórico.....	22
2.1.1	Antecedentes.....	22
2.1.2	Consideraciones teóricas.....	23
2.1.2.1	<i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca).....	23
2.1.2.1.1	Descripción general.....	23
2.1.2.1.2	Clasificación taxonómica.....	23
2.1.2.1.3	Ecotipos principales.....	24
2.1.2.1.4	Composición química.....	25
2.1.2.1.5	Ubicación geográfica y adaptabilidad.....	29
2.1.2.1.6	Descripción botánica.....	30
2.1.2.1.7	Metabolitos secundarios.....	31
2.1.2.2	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	35
2.1.2.2.1	Concepto.....	35
2.1.2.2.2	Partes.....	36
a.	Fase estacionaria y fase móvil.....	36
b.	Bomba.....	37
c.	Inyectores.....	38
d.	Detectores.....	38
e.	Sistema de toma y procesamiento de datos.....	39

2.1.2.2.3 Parámetros Cromatográficos.....	40
a. Tiempo de Retención (t_R).....	40
b. Tiempo muerto.....	40
c. Factor de Retención (K).....	40
d. Selectividad (α).....	41
e. Eficiencia (N).....	41
f. Resolución (R).....	42
2.1.2.3 Validación de técnicas analíticas.....	43
2.1.2.3.1 Parámetros de validación.....	45
a. Exactitud.....	45
b. Precisión.....	46
c. Selectividad.....	47
d. Linealidad.....	49
e. Intervalo.....	50
2.1.2.3.2 Datos requeridos para la validación.....	50
2.2 Definiciones operacionales.....	52
2.2.1 Variables independientes.....	52
2.2.2 Variables dependientes.....	52
2.3 Hipótesis.....	55

CAPITULO III

3.1 Metodología.....	57
3.1.1 Método de investigación.....	57
3.1.2 Muestra.....	58
3.1.3 Parte experimental.....	59
3.1.3.1 Desarrollo y validación de la técnica analítica.....	59
1. Objetivo.....	60
2. Alcance.....	60
3. Justificación.....	60
4. Calificación instrumental.....	60
5. Técnica analítica.....	63
5.1 Desarrollo de la técnica analítica.....	63

5.2 Materiales, reactivos y equipos.....	64
5.3 Condiciones de trabajo.....	65
5.4 Procedimiento analítico.....	66
6. Parámetros de validación.....	70
6.1 Desarrollo de los parámetros de validación.....	70
a. Selectividad.....	70
b. Linealidad.....	72
c. Precisión.....	75
d. Exactitud.....	77
e. Intervalo.....	78
6.2 Resultados.....	79
a. Selectividad.....	79
b. Linealidad.....	81
c. Precisión.....	115
d. Exactitud.....	123
e. Intervalo.....	129
7. Informe Técnico.....	130

CAPITULO IV

4.1 Discusiones.....	132
4.2 Conclusiones.....	134
4.3 Recomendaciones.....	135
4.4 Bibliografía.....	136
4.5 Anexos.....	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: División taxonómica del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca).....	24
Tabla N°2: Lista de ecotipos de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca).....	25
Tabla N°3: <i>Screening</i> fitoquímico del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	26
Tabla N°4: Vitaminas presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	26
Tabla N°5: Minerales presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	27
Tabla N°6: Composición química del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	28
Tabla N°7: Aminoácidos presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	28
Tabla N°8: Datos requeridos para la validación.....	51
Tabla N°9: Variables Independientes.....	53
Tabla N°10: Variables dependientes.....	54
Tabla N°11: Aptitud del sistema.....	68
Tabla N°12: Resumen del Análisis de la Selectividad.....	80
Tabla N°13: Linealidad del sistema al 80%.....	84
Tabla N°14: Linealidad del sistema al 90%.....	85
Tabla N°15: Linealidad del sistema al 100%.....	86
Tabla N°16: Linealidad del sistema al 110%.....	87
Tabla N°17: Linealidad del sistema al 120%.....	88
Tabla N°18: Resultado global de la Linealidad del sistema.....	89
Tabla N°19: Linealidad del método al 80%.....	101
Tabla N°20: Linealidad del método al 90%.....	102
Tabla N°21: Linealidad del método al 100%.....	103
Tabla N°22: Linealidad del método al 110%.....	104
Tabla N°23: Linealidad del método al 120%.....	105
Tabla N°24: Resultado global de la Linealidad del método.....	106
Tabla N°25: Repetibilidad del sistema.....	115
Tabla N°26: Repetibilidad del método.....	116
Tabla N°27: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (1).	117
Tabla N°28: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (1).	118
Tabla N°29: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (2).	119
Tabla N°30: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (2).....	120

Tabla N°31: Precisión intermedia de valoración global.....	121
Tabla N°32: Exactitud, placebo con analito al (80%).....	124
Tabla N°33: Exactitud, placebo con analito al (100%).....	125
Tabla N°34: Exactitud, placebo con analito al (120%).....	126
Tabla N°25: Intervalo.....	129
Tabla N°26: Resumen de resultados.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de un glucosinolato.....	32
Figura 2: Glucosinolatos presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.....	33
Figura 3: Estructura química del Bencilglucosinolato (glucotropaelina).....	34
Figura 4: Hidrolisis de glucosinolatos por acción de mirosinasas.....	34
Figura 5: Representación esquemática del detector cromatográfico, que simboliza una separación cromatográfica típica de dos sustancias.....	42

ÍNDICE DE GRAFICOS

Grafico 1: Linealidad del Sistema.....	91
Grafico 2: Linealidad de Método.....	107

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo 1:** Certificado del Estándar de Referencia de Maca
- Anexo 2:** Reporte de Análisis del Estándar de Referencia de Maca
- Anexo 3:** Equipos, Materiales y Reactivos
- Anexo 4:** Procedimiento Analítico
- Anexo 5:** Ensayos de la Selectividad
- Anexo 6:** Cromatograma Característico del Bencilglucosinato Observado con el Detector UV
- Anexo 7:** Espectros Observados por el Detector de Diodos (DAD)
- Anexo 8:** Cromatogramas de la Selectividad
- Anexo 9:** Cromatogramas de la Linealidad del Sistema
- Anexo 10:** Cromatogramas de la Linealidad del Método
- Anexo 11:** Cromatogramas de la Precisión
- Anexo 12:** Cromatogramas de la Exactitud

RESUMEN

Se desarrolló y validó una nueva técnica de análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que resultó ser selectiva, repetitiva y confiable para la cuantificación del principio activo Bencilglucosinolato de *Lepidium peruvianum* Chacón sp, Maca en tabletas de 800 mg. La técnica de análisis tomó en cuenta la preparación de muestra para que el principio activo pueda ser cuantificado en un sistema (fase móvil, columna cromatográfica y longitud de onda). Como paso previo a la validación de la técnica de análisis, se evaluó la adaptabilidad del sistema cromatográfico, asegurando de esta manera, el funcionamiento adecuado del sistema. Para el desarrollo de los parámetros de validación, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: Selectividad, Linealidad, Exactitud y Precisión; resultados que fueron sometidos a evaluación estadística corroborando que la técnica analítica propuesta para la cuantificación del principio activo es selectiva, lineal, exacta y precisa, cumpliendo así con los parámetros de validación establecidos en las obras oficiales; por lo cual la técnica validada es confiable y puede ser empleado en los análisis de rutina.

Palabras claves:

- *Lepidium peruvianum* Chacón sp.
- Bencilglucosinolato,
- Cromatografía.
- Validación.

ABSTRACT

It was developed and validated a new analysis technique for high performance liquid chromatography (HPLC), which proved to be selective, repetitive and reliable for the quantification of the active bencilglucosinolate of *Lepidium peruvianum* Chacon sp, Maca 800 mg tablets. The technique of analysis took into account the sample preparation for the active ingredient can be quantified in a system (mobile phase chromatographic column and wavelength). As a prelude to the validation of the analysis technique, we evaluated the suitability of the chromatographic system, thus ensuring the proper functioning of the system. For the development of the validation parameters were taken into account the following parameters: selectivity, linearity, accuracy and precision, results were subjected to statistical evaluation confirming that the proposed analytical technique for the quantification of the active ingredient is selective, linear, accurate and accurate, thus fulfilling the validation parameters established in the official works, for which validated the technique is reliable and can be used in routine analysis.

Keywords:

- *Lepidium peruvianum* Chacón sp.
- Bencilglucosinolate
- Chromatography
- Validation

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica se ha caracterizado desde sus inicios; por la necesidad de alcanzar altos niveles de calidad, para lo cual fue desarrollando procedimientos que han evolucionado con una reglamentación estricta: en este avance por conseguir un alto dominio de la calidad, es cuando surge el concepto de validación.

La validación de un método analítico nos asegura que la metodología es exacta, reproducible y resistente sobre el rango específico donde un analito es analizado.

La validación de un método nos garantiza su funcionalidad y por lo tanto cumple con normas y reglamentaciones establecidas. La validación es parte integral de las buenas prácticas de manufactura y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además contribuye a garantizar la calidad de un producto determinado.

El nuevo producto desarrollado en laboratorios Naturgen S.A.C. es un suplemento dietario que tiene como principal principio activo: Bencilglucosinolato. Dicho suplemento ya se expende en el mercado farmacéutico del país. La Maca es uno de los productos andinos más conocidos y reconocidos a nivel mundial por las propiedades curativas y revitalizantes que posee, se le ha atribuido el poder de mejorar el sistema inmunológico, reducir el riesgo de contraer SARS (Síndrome Respiratorio Agudo) y de dar poder, fuerza, energía, vigor, ser anti estrés y anti fatiga. También es considerada un poderoso reconstituyente físico, mental y sexual, fuente de Aminoácidos, Vitaminas B₁, B₂, B₁₂, C, E, Caroteno y otros minerales.

Sin embargo, la técnica de análisis para la determinación cuantitativa del principio activo (Bencilglucosinolato), que contiene el suplemento dietario no se encuentra descrita en obras oficiales: Farmacopea Americana, Farmacopea Británica, Farmacopea Japonesa, u otra; por lo cual se hace preciso desarrollar e implementar una técnica nueva de análisis para la cuantificación de dicho principio activo.

De acuerdo a la exigencia y normatividad vigente referida a buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos, se considera sumamente necesario que los procesos que participan en el ciclo productivo, incluyendo los métodos de análisis aplicados tanto para la evaluación de materias primas como para productos terminados, se encuentren validados; es por esto que en nuestro medio durante los últimos años, las empresas farmacéuticas, en cumplimiento de las exigencias de calidad, están orientando sus esfuerzos al desarrollo y ejecución de la validación de sus procesos.

Con este procedimiento se probará la confiabilidad de la técnica analítica para asegurar la calidad, eficacia e inocuidad del suplemento dietario. Por tanto, la validación de la técnica analítica constituye un instrumento importante a este respecto.

Este trabajo aportará conocimientos técnico-científicos que pueden ser aplicados en la actividad de las áreas de control de calidad e investigación de los laboratorios farmacéuticos del país garantizando la calidad y mejora de la productividad, así como la ventaja en la reducción de costos por análisis y su aplicación a productos que se comercializan en el mercado.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Industria Farmacéutica es una de las más importantes para el beneficio humano, ya que nuestros antepasados descubrieron varias plantas y sustancias de origen diverso que tenían beneficios curativos, tanto para el ser humano como para los animales, los cuales con diversas técnicas son perfeccionados con el fin de producir beneficios en la salud.¹

La investigación y el desarrollo son muy importantes en la Industria Farmacéutica ya que de ello depende que se puedan desarrollar nuevos productos. Sin duda los fabricantes de medicamentos han tratado por muchos años de asegurar que los productos que preparan tengan la calidad de una manera reproducible.¹

El departamento de desarrollo farmacéutico por lo general trabaja con fármacos, excipientes, tecnología y formas farmacéuticas, para poder así alcanzar la innovación mediante la selección, modificación, combinación de lo ya conocido, con el objetivo de obtener una mejor calidad, disponibilidad, aceptación, eficacia y estabilidad en el medicamento.

Dentro del área analítica, se realizan un sin número de pruebas que aseguran que los fármacos que se están desarrollando cumplen con lo antes descrito y nos permite conocer con más detalle las condiciones que pueden afectar las propiedades de un producto y cómo controlarlas por medio de límites y especificaciones.

Otra función principal de esta área es la de desarrollar métodos analíticos, aplicando diversas técnicas instrumentales ya sea para el control de la calidad de los medicamentos o para el estudio de estabilidad, esto en conjunto con otras actividades necesarias para efectuar de manera correcta los dos principales como el control de estándares de referencia, control de relaciones reactivo, documentación, verificación, calibración y mantenimiento de instrumentos.¹

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada². Ésta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.³

Para el desarrollo de un nuevo producto es necesaria la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto en forma de materia prima o como principio activo de la formulación con un alto grado de confiabilidad.⁴

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los medicamentos en el país están dados por la Dirección General de Insumos, Drogas y Medicamentos (DIGEMID) a través del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos⁵. Este organismo gubernamental a su vez se rige de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopeas Europeas y Americana.

En el mercado farmacéutico actual existen varios medicamentos de gran demanda por la población, cuyas técnicas de análisis no se encuentran publicadas en las obras oficiales que generalmente se consultan, a saber: Farmacopea americana, británica, europea y japonesa. Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio con el fin de separar y cuantificar los principios activos de dichos medicamentos.

Por lo tanto, el desarrollo y validación de técnicas analíticas para medicamentos es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad; basado en este criterio se plantea el siguiente problema de investigación:

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cumplirá con los parámetros de desempeño de la validación la nueva técnica analítica desarrollada para la cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Protocolo de validación).

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar una técnica de análisis capaz de cuantificar el principio activo del suplemento dietario.
- Demostrar mediante la validación la selectividad, linealidad, precisión (repetibilidad del sistema, repetibilidad del método y precisión intermedia), exactitud e intervalo del nuevo método de análisis.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 ANTECEDENTES

Se han elaborado diversos trabajos de investigación sobre el tema, los cuales nos sirven como antecedentes para el desarrollo del presente, los cuales son:

Br. Morales de la Cruz C. “Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.

Br. Silva Cajas G. “Validación del método de valoración de Glimepirida presentación comprimido 4 mg por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.

Br. Azaña Sulca J, Br. Cornelio Bello J. “Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Clonixinato de lisina 125 mg y Pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007.⁸

Br. Mayorga Bustinza G, Br. Del Castillo Herrera C. “Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar Norfloxacin y Fenazopiridina Clorhidrato en cápsulas orales”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010.

Los trabajos mencionados muestran la necesidad de la validación de las técnicas analíticas y la importancia de su inclusión dentro de los programas de validación en los laboratorios de Control de Calidad, así como la ventaja en la reducción de costos por análisis y su aplicación a productos que se comercializan en el mercado.

2.1.2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1.2.1 *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca)

2.1.2.1.1 Descripción general

La maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp.), es un producto que se cultiva en los andes desde el tiempo de los incas en altitudes comprendidas entre 3800 a 4500 msnm. Actualmente su cultivo se ha reducido a los alrededores del lago Chinchaycocha de la región Andrés Bello Cáceres sub. Región Alto Andina.⁹

Esta planta alto andina, es uno de los pocos recursos con que cuentan los habitantes en las grandes alturas de la sierra del Perú; es resistente a granizadas, heladas, sequías prolongadas y a las enfermedades. Esta planta va a la vanguardia entre todos los cultivos alimenticios, debido a su alto valor nutritivo por lo que se hace merecedora a su gran difusión mediante los sistemas de promoción y extensión por medio de los servicios oficiales, universidades, centros de investigación que deben investigar científicamente sobre su mejoramiento genético y agronómico, para su explotación industrial en las grandes alturas, donde otros cultivos no prosperan⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

2.1.2.1.2 Clasificación taxonómica

En 1843 Gerhard Walpers realiza la primera descripción científica de la especie *Lepidium Meyenii* Wallp en base a un espécimen recolectado por el Sr. Meyenii en el Perú en el Dpto. de Puno, quedando sorprendido con la facilidad de reproducción de la planta en hábitats tan extremos. Posteriormente en 1989, Gloria Chacón propone para esta especie el nombre de *Lepidium peruvianum* Chacón sp.⁹

Tabla N°1:

División taxonómica del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca)⁹	
Reino:	Vegetal
División:	Fanerógamas
Sub división:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledóneas
Orden.	Arquiclámideas
Familia:	Rhoedales
Género:	Brassicaceae
Especie:	Lepidium
Variedad:	<i>Lepidium peruvianum</i> chacón sp.
Nombre común:	Maca, Maca Maca, Ayak chichita, Maka, Maino, Huto-huto, Ginseng peruano, Viagra peruano, Ayak willku, pepper weed, power root and herbal viagra

2.1.2.1.3 Ecotipos principales

La mayor parte de autores describen diferentes ecotipos de Maca, teniendo en cuenta el color externo de la raíz, las que presentan principalmente colores; amarillo, negro, rojo y morado; existen sin embargo sub-categorías descritas y que también han sido observados en trabajos de campo realizados en diferentes localidades de los departamentos de Junín y Pasco durante los últimos años.⁽¹²⁻¹⁵⁾

Tabla N°2:

Lista de ecotipos de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. (Maca) ⁹	
Color externo de la raíz	Porcentaje
Amarillo	47.8
Rojo-blanco	16.5
Morado-blanco	9.0
Blanco-rojo	6.3
Plomo	5.4
Negro	4.2
Rojo-amarillo	3.7
Blanco	2.2
Blanco-morado	1.6
Amarillo-rojo	1.3
Plomo-claro	0.8
Morado-plomo	0.7
Amarillo-plomo claro	0.5

2.1.2.1.4 Composición química

El tubérculo del *Lepidium peruvianum* Chacón sp (maca) contiene el derivado benzilato de 1.2-Dihidro-N-hidroxi piridina, llamada macaridina junto con el alcaloide benzilado macamida: N-Benzil-5-oxo-6E, 8E-octadecadienamida y N-Benzilhexadecanamida.¹⁶

Además contiene: glucosinolatos p-metoxibencil, esteroides y/o cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas, amina alifática secundaria, aminas terciarias, almidon, fructosa, ácidos grasos y aceites naturales. (Tabla N° 3)^{9,11,13}

Tabla N°3:

Screening Fitoquímico del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.⁹	
Componentes secundarios	
	Saponinas
	Terpenoides
	Flavonoides
	Alcaloides
	Dextrinas
	Antocianinas

La maca contiene gran cantidad de vitaminas, es así que se encuentra presente la vitamina E y vitamina C en gran cantidad, también se encuentra vitaminas del complejo B (Tabla N°4).

Tabla N°4:

Vitaminas presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.⁹	
Vitamina	Miligramos %
Caroteno	0.07
Tiamina (B1)	0.15 – 1.17
Riboflavina (B2)	0.31 – 0.76
Ac. Ascórbico	0.80 – 3.52
Piridoxina (B6)	1.0
Cobalamina (B12)	125.0
Niacina	37.27 – 43.03

La presencia de minerales hace que la Maca sea un excelente revitalizante, contiene además de potasio y sodio; minerales que son cofactores enzimáticos importantes para el organismos, como son el cobre, magnesio y zinc (Tabla N°5)

Tabla N°5:

Minerales presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.⁹	
Mineral	Miligramos/100 g(%)
Calcio	220
Fosforo	180
Hierro	15.5
Manganeso	0.8
Cobre	5.9
Zinc	3.8
Sodio	18.7
Potasio	2050

También podemos tomar en cuenta otro estudio realizado acerca de la composición del aceite esencial del *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (Maca) el que fue obtenido de sus partes aéreas (hojas). Es así que se logró identificar 53 componentes dentro de los cuales encontramos 85.9% de fenil acetoneitrilo, 3,1% de benzaldehído y 2.1% de 3-metoxifenilacetoneitrilo entre otros, pero en menor cuantía.⁽¹⁷⁻²⁰⁾

Un estudio químico-proximal se muestra en la Tabla N° 6 y finalmente en la Tabla N° 7 se aprecia los aminoácidos encontrados en el *Lepidium peruvianum* Chacón.⁽²¹⁻²⁴⁾

Tabla N°6:

Composición Química del <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.⁹	
Componentes primarios	Porcentaje
Humedad	5.00 – 19.62
Proteínas	10.00 – 18.25
Cenizas	3.46 – 6.43
Grasa	0.20 – 2.20
Fibra	3.85 – 8.50
Carbohidratos	51.81 – 76.05

Tabla N°7:

Aminoácidos presentes en el <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.⁹	
Aminoácido	(mg/g.) de proteína
Alanina	63.1
Arginina	99.4
Ácido aspártico	91.7
Glicina	68.3
Ácido glutámico	156.5
Histidina	21.9
Hidroxilamina	26.0
Leucina	91.0
Lisina	54.5
Metionina	28.0
Fenilalanina	55.3
Prolina	0.5
Sarcosina	0.7
Serina	50.4
Treonina	33.1
Tirosina	30.6
Valina	79.3

2.1.2.1.5 Ubicación geográfica y adaptabilidad

Esta planta cuyo cultivo se halla en altitudes excepcionales, se distribuye principalmente en las regiones Suni y Puna de los departamentos de Junín y Pasco. En distritos y localidades de Junín como Carhuamayo a 4125 m.s.n.m (chacras de “Maca” de Huayre, La Victoria, Shalacancha, Quilcancha, etc), distrito de Ondores a 4033 m.s.n.m. (chacras de Ramancancha, Paccha, San Blas, Tacoran, Palamayo), distrito de Yanacancha a 3846 m.s.n.m.(Cachi - Cachi), Achiipampa a 3760 m.s.n.m.; San Pedro de Pari, Junin a 4107 m.s.n.m. (Chacras de Ochogla, Santa Catalina, Huatuncamino, Callahuay, Marcamarca, Pucumachay, Chaupi Calzada) , Huassicancha (3820 m.s.n.m.), Uco (4125 m.s.n.m.), distrito de San Juan de Jarpa (3726 m.s.n.m.). En Pasco en distritos como Ninacaca a 4140 m.s.n.m., Vilco (4114 m.s.n.m.), también en localidades de Huaraucaca (4300 m.s.n.m.), Shelby (4300 m.s.n.m.), Yanacachi (4297 m.s.n.m.), Villa de Pasco (4,338 m.s.n.m.), Sacra familia (al norte de Pasco), entre otros, tal como se observa en la zonas altas del valle del Mantaro y riberas del lago Chinchaycocha.

Hay referencias de su presencia en menores altitudes de Junín como: Ahuac, en su anexo Ninanya a 3400 m.s.n.m. (1993), Chacapampa a 3420 m.s.n.m.; así como estudios con cosechas óptimas en Muquiyauyo a 3350 m.s.n.m. (Jauja).

Ensayos aislados nos confirman su crecimiento a partir de semillas a 17 m.s.n.m. (California, campo Experimental Davis, 1994 - 1995) y de raíces en macetas, en Lima (Lida Obregón v. 1988, 1989, Instituto de Fitoterapia Americano. 1996, 1997) lo cual nos indica, su gran adaptabilidad.⁽²⁶⁻³⁰⁾

2.1.2.1.6 Descripción botánica

Planta herbácea anual. Raíz tuberosa de 3 a 5 cm de diámetro en la parte más ensanchada y de 10 a 14 cm de largo. Tallo principal reducido, del que nacen varias ramas secundarias, glabras, postradas, decumbentes. Hojas basales arrosetadas, pecioladas, peciolos aplanados de 2 – 3 cm de longitud, con margen escarioso; lámina de contorno oblongo, pinnatífido a bipinnatífido de 7 – 12 cm de longitud por 1.5 - 2.5 cm de ancho, segmentos con ápice agudo.

Hojas caulinares gradualmente más pequeñas hacia el ápice, sésiles.

Inflorescencia apical y axilar con espinas muy pequeñas en el pedúnculo.

Flores en grupo con pequeñísimas espinas. La flor es pequeña, completa, hipoginea, actinomorfa, cáliz de prefloración imbricada, con 4 sépalos libres en forma aovada elíptica cóncava de 1.2 a 1.4 mm de largo por 0.7 – 0.8 mm de ancho de color verde claro y blancuzco en los bordes. Corola con 4 pétalos libres altemisépalos lineal ligeramente encorvadas hacia el ápice de 1,4 a 1,6 mm de largo de color blanco, androceo, con 6 estambres tetradínamos, siendo dos de ellos fértiles de filamento alargado y engrosado, anteras ditésicas basifijas dehiscencia longitudinal, con granos de polen aovados de color amarillo y pequeñísimos, dispuestos a los lados de los fértiles. Gineceo, sincárpico, es decir ovario formado por dos carpelos unidos, bicarpelares, bilocular, súpero de 1.5 mm de largo con 2 óvulos anátropos de placentación axilar apical, estilo muy reducido, estigma globoso, papiloso. Fórmula floral: K4C4 A 2- 4 G2. Fruto seco, tipo silícula, ligeramente emarginado en el ápice de 2.8 - 3.3 mm y 2.5 de ancho, con una sola semilla en cada celda, dehiscencia longitudinal siguiendo la dirección del tabique, el cual es membranoso.

En la madurez, el pericarpio seco se separa en tres porciones y la porción central persistente tiene las semillas ligadas a ella. Semilla ovoide de hasta 2 mm de longitud.^{(26-28), (31)}

2.1.2.1.7 Metabolitos Secundarios

Son sintetizados por las plantas, como mecanismos de defensa contra el ataque de insectos, hongos, animales e incluso de otras plantas. Tiene un rol importante por la acción fitoterapéutica que posee.

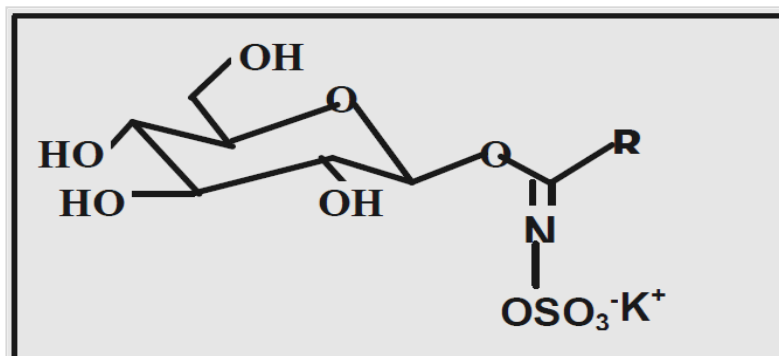
Para la Maca hasta el momento se han descrito como metabolitos secundarios a los Glucosinolatos principalmente, también contienen flavonoides, esteroides, bencil alcanoides, alcaloides y aceites esenciales.⁽²⁹⁻³³⁾

- **Glucosinolatos:**

Los Glucosinolatos (Fig.1) son una clase de tioglucósidos restringidos a las familias Brassicaceae, Capparidaceae y Resedaceae; en donde se almacenan en diferentes tejidos de la planta, siendo una fuente significativa del contenido de azufre y minerales de la planta. Se estima que por lo menos existen diecisiete tipos de glucosinolatos presentes en una brasicacea.

Se encuentran junto con la enzima que los degrada, la mirosinasa. Se hallan usualmente en toda la planta en las vacuolas celulares, abundantemente en las semillas maduras.

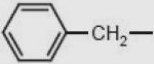

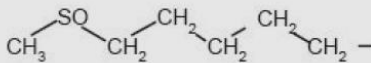
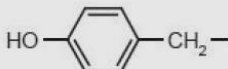
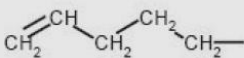
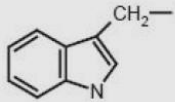
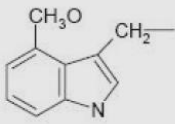
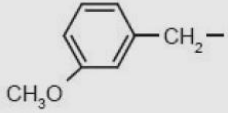
Fig N°1: Estructura general de un Glucosinolato ³⁵



Los Glucosinolatos provienen del metabolismo de los aminoácidos, valina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina y triptófano en una serie de reacciones en las que el grupo carboxílico se pierde y el carbono “a” se transforma en el carbono central del Glucosinolato, aunque solo siete corresponden a aminoácidos proteicos (antes mencionados) los restantes derivan de modificaciones de la cadena lateral, probablemente a nivel del Glucosinolato o de aminoácidos no proteicos. Químicamente los Glucosinolatos son compuestos hidrosolubles, tienen el mismo núcleo el cual consiste en un tioglucósido, unida al átomo de carbono de una oxima sulfonada y un grupo funcional R que deriva aminoácidos siendo éste el carácter variable y de cuya estructura depende la actividad biológica del glucosinolato, al determinar la naturaleza de los productos resultantes del daño de los tejidos de la planta. La naturaleza de este grupo R los divide en dos grupos los glucosinolatos aromáticos (alquil, alquenil, hidroalquenil) y los alifáticos (bencil, bencil sustituido), Fig. 2, el grupo sulfato le imparte fuertes propiedades ácidas por lo que los glucosinolatos se presentan como aniones contrabalanceados por un catión que es el potasio, la glucosa y sus formas aniónicas, los hacen compuestos no volátiles e hidrofílicos.

Por el gran número de glucosinolatos, se usan nombres semi-sistemáticos, terminados por el sufijo “Glucosinato”.

Fig N°2: Glucosinolatos presentes en el *Lepidium peruvianum* Chacón sp.³⁵

Glucosinolatos	R
Bencil glucosinato	
4 -metoxibencil glucosinato	
5 - metil -sulfinilpentil glucosinato	
4 - hidroxibencil glucosinato	
pent -4 -enil glucosinato	
indolil -3 - metil glucosinato	
4 - metoxiindolil -3 -metil glucosinato	
m - metoxibencil glucosinato	

Los Glucosinolatos son importantes debido a su actividad fertilizante, acción citostática, actividad anticarcinogénica y la prevención de enfermedades crónicas. Sus productos de hidrólisis como los isotiocianatos y los indoles han demostrado tener actividad antitumoral. ^{(29), (31), (33-42)}

El principal componente de la maca parece ser el bencilglucosinolato Fig. 3. Estos glucosinolatos pueden convertirse en isotiocianatos biológicamente activos por acción de su hidrólisis a bencil-isotiocianato y el p-metoxibencil isotiocianato siendo el contenido absoluto de glucosinolatos en los hipocótilos frescos de maca relativamente mayor a los reportados en otras crucíferas

Fig N°3: Estructura química del Bencilglucosinolato (glucotropaelina) ⁵⁸

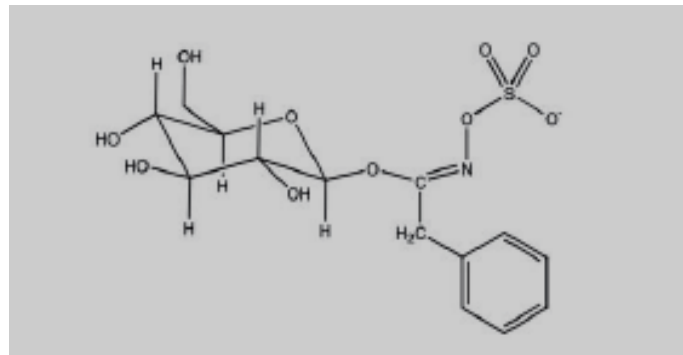
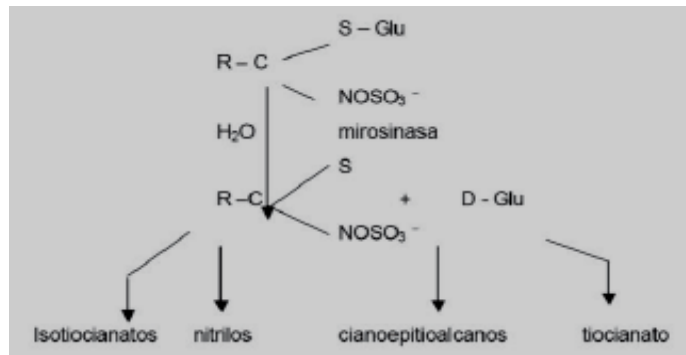


Fig N°4: Hidrolisis de glucosinolatos por acción de mirosinas ⁵⁸



2.1.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

2.1.2.2.1 Concepto

La cromatografía de líquidos de alta resolución - HPLC (por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para la separación, identificación cualitativa y determinación cuantitativa de componentes químicos en mezclas complejas.⁴³

Ampliamente utilizada en la industria farmacéutica por las ventajas que la técnica presenta, obteniendo un análisis cuantitativo rápido y preciso, es una operación automatizada, tiene una alta sensibilidad de detección pudiendo detectar nanogramos, picogramos, inclusive niveles de femtogramos; y una de las ventajas más importantes es la susceptibilidad a la detección de un 60% a 80% de todos los componentes existentes. Por otra parte, las limitaciones que presenta, son que el sistema no cuenta con un detector universal como en otros sistemas, por lo tanto la detección es problemática si el analito no absorbe haces de luz UV, otra desventaja se da cuando el analito no es fácilmente ionizado; y por último, la técnica por HPLC, tiene muchos parámetros operacionales que lo hace dificultoso para un principiante.⁴⁴ Existiendo cuatro tipos principales de técnicas de HPLC que responden a las fuerzas moleculares básicas: fuerzas iónicas, fuerzas polares y fuerzas de dispersión; cada técnica específica a cada una de ellas: las fuerzas polares son el tipo dominante de las interacciones moleculares empleadas en HPLC de fase normal; las fuerzas de dispersión son empleados en HPLC de fase reversa; las fuerzas iónicas son empleados en HPLC de intercambio iónico; y el cuarto tipo de técnica de HPLC de exclusión de tamaño, se basa en la separación dinámica de las moléculas de acuerdo al tamaño que presente, sin la interacción del analito con la fase estacionaria.⁴⁵

2.1.2.2.2 Partes

a. Fase estacionaria y fase móvil.

Siendo la cromatografía definida como un método físico de separación por la cual los componentes son separados y distribuidos en dos fases, una estacionaria y la otra móvil que se mueve en una determinada dirección. El sistema de HPLC presenta una gran versatilidad ya que abarca una serie de tipos de separación; teniendo cromatografía por adsorción donde el analito interactúa con una superficie sólida estacionaria y es desplazado por competencia con el eluyente por los sitios activos de la superficie. La separación por partición cromatográfica resulta de una distribución termodinámica entre dos fases líquidas; mientras que la cromatografía por cambio iónico, está gobernada por la interacción entre los analitos ionizados y la carga opuesta de la superficie de la fase estacionaria. En la cromatografía por exclusión de tamaño, la fuerza de resistencia para la separación es el tamaño físico de los analitos, lo que determina su accesibilidad a los diferentes tamaños de poros en la superficie de la fase estacionaria.

Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.⁴⁶

El diseño de las columnas para cromatografía de líquidos tiene un doble propósito, el primero separa los solutos individuales apartados por las diferentes fuerzas moleculares que se producen entre los solutos y las dos fases, en segundo lugar, limita la dispersión o difusión de cada banda de soluto a fin de ser separados uno de otro, que van eluyendo discretamente.

Siendo esta la capacidad de la columna de contener la dispersión de pico que determina el diseño y las dimensiones de muchas partes del cromatografía.

Las columnas pueden estar divididas de acuerdo a la fase estacionaria o los materiales de apoyo; normalmente es una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales que se unen químicamente a un compuesto con un grupo funcional determinado. La unión más frecuente es la de silicagel por medio de una unión covalente, una de las mayores limitaciones es que por encima de pH 8-9 se disuelve y por debajo de pH 3 muchos compuestos se hidrolizan.

El potencial de degradación incrementa también a elevadas temperaturas por encima de 60 – 70 °C; la silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (400 - 500 m²/g) siendo el diámetro de poro entre 80 a 300 Å.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾

b. Bomba

El sistema de bombas puede ser considerado como el corazón del HPLC; las características de funcionamiento y rendimiento de la bomba fundamentalmente definen y limitan el tipo de separaciones que pueden ser realizadas; las características más importantes son: a) la reproducibilidad de caudal, b) el rango de caudal, c) la estabilidad de la presión.⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾

Existen cuatro tipos de bombas: Las bombas de presión constante, las bombas de caudal constante, las bombas alternativas y las bombas de jeringa.⁴⁸

c. Inyectores

La muestra a analizar debe ser introducida en la fase móvil; una válvula de inyección adecuadamente diseñada y utilizada de manera correcta, asegura máxima eficiencia durante la cromatografía. Hoy en día la inyección manual es poco frecuente y sólo es justificado cuando la cantidad de muestra es limitada; la utilización de inyectores automáticos facilita la transferencia de muestras y el procesamiento automático de variables operativas como el control de volumen, número de inyecciones, el intervalo entre las inyecciones, ciclos de enjuague de las muestras; suprimiendo factor del error humano y mejorando la precisión del método.⁴⁷

d. Detectores

El propósito de un detector en un sistema de HPLC es identificar la presencia de componentes de interés del eluyente proveniente de la columna del HPLC.

El analito es reconocido por interacciones fisicoquímicas como por ejemplo la de absorbancia de radiación UV en una cierta longitud de onda.

Los detectores pueden ser clasificados dentro de dos categorías; los detectores basados en una propiedad de disolución que responden cualquier cambio de la alguna propiedad física de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos.

Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden únicamente a propiedades del analito, como la absorbancia UV, fluorescencia, o actividad electroquímica, que no son propias de la fase móvil.

Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas, existen siete especificaciones que son importantes: La linealidad, rango dinámico lineal, nivel de ruido, sensibilidad o concentración mínima detectable, sensibilidad a la presión, sensibilidad de flujo, sensibilidad de temperatura.^{44, (47-48)}

e. Sistemas de toma y procesamiento de datos

Para toma de datos, procesamiento de datos y el reporte, el uso de un sistema informático integrado es esencial. Este sistema integrado, recibe y almacena la señal de los detectores e imprime cromatogramas completos, e incluso controla la mayoría de variables operativas como selección de muestras, válvulas de muestreo, condiciones del detector, entre otros; simplificando el trabajo tedioso de una selección manual de las condiciones operativas cromatográficas; con el objetivo de obtener el cromatograma con fracciones separadas e identificadas de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas de mezclas complejas.⁴⁹

2.1.2.2.3 Parámetros Cromatográficos

a. Tiempo de Retención (t_R)

Cada analito específico está representado por un pico en el cromatograma; estos picos son simétricos y se asemejan a una curva de distribución normal tipo Gaussiana.

La distancia máxima del pico desde el punto de inyección, expresado en unidades de tiempo se llama tiempo de retención (t_R). El tiempo de retención de analito es dependiente del caudal de fase móvil; a mayor velocidad del caudal de flujo, más pequeño es el tiempo de retención de analito. El producto del tiempo de retención de analito y el caudal de fase móvil es el volumen de retención (V_R).⁴⁵

b. Tiempo muerto

Es el tiempo requerido por un compuesto inerte para migrar desde la inyección en la columna sin retraso por la fase estacionaria. Por consiguiente, el tiempo muerto es idéntico con el tiempo de residencia del compuesto en la fase móvil.^{45,47}

c. Factor de Retención (K)

La retención del analito se compone de dos partes: 1) El tiempo que el analito eluye en la fase móvil; 2) el tiempo que el analito es retenido en la fase estacionaria. La diferencia entre el tiempo total de retención (t_R) y el tiempo de demora, se denomina tiempo de retención reducido (t'_R), y la correspondiente diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen muerto se llama volumen de retención neta (V'_R).

La relación entre el volumen de retención reducido y del volumen muerto da un parámetro adimensional llamado factor de retención, (K) llamado también factor de capacidad.⁴⁵

$$K = V_R - V_0 / V_0 = V'_R / V_0 = t_R - t_0 / t_0$$

d. Selectividad (α)

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación de los factores de retención de dos analitos, o la relación de los tiempos de retención reducida.

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

La retención relativa describe la capacidad de un sistema cromatográfico de discriminar entre dos compuestos; es independiente de la longitud de columna y la velocidad de flujo; por el contrario es dependiente de la temperatura y las propiedades de la fase móvil y la fase estacionaria.^{45, 47}

e. Eficiencia (N)

La eficiencia es la medida del ensanchamiento de cinta cromatográfica y el número de los Platos Teóricos (N) en la columna y por lo general es calculada usando la ecuación siguiente:

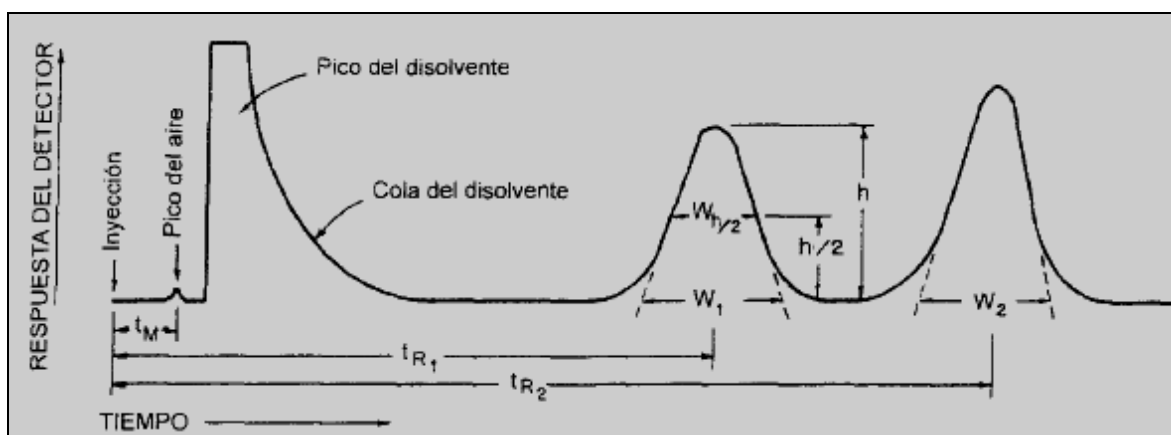
$$N = 16 (t_{RI}/w)^2$$

El número de los platos teóricos caracteriza la calidad de la columna y los fenómenos de transferencia de masas. Valores grandes para N califican la columna para separar mezclas complejas.⁴⁵

f. Resolución (R)

La resolución (R) está definida como la proporción de la distancia entre dos picos a la anchura media de los mismos y este descriptor abarca tanto eficacia como selectividad.⁴⁵

Fig N°5: Representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2. t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención respectivos: y h es la altura, $h/2$ la mitad de la altura y $W_{h/2}$ el ancho a la mitad de la altura, para el pico 1. W_1 y W_2 son los anchos de los picos 1 y 2, respectivamente, en la línea base. Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos. El tiempo de retención de estos picos de aire o componentes no retenidos se denomina t_M



Fuente: United States Pharmacopeial Conv. Inc., United States Pharmacopeia 35 NF 30, Monografías Oficiales, 2012.

2.1.2.3 Validación de Técnicas Analíticas

Para la producción y calidad en la industria farmacéutica, el objetivo principal es la fabricación de productos de alta calidad a un costo bajo; las exigencias de calidad son definidas por la necesidad del usuario, de la seguridad de producto, la eficacia y la facilidad de uso.

La FDA define el proceso de validación como "El establecimiento de pruebas documentadas que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso específico coherentemente producirá un producto que cumpla sus datos específicos predeterminados y atributos de calidad".⁵⁰

Aunque los estudios de validación de técnicas analíticas se han realizado en la industria farmacéutica durante mucho tiempo, hoy en día es de uso rutinario debido a un mayor énfasis de la industria en los últimos años de garantía de calidad y mejora de la productividad.

La validación de técnicas analíticas es una parte necesaria del programa de gestión de calidad y es fundamental para una operación de producción eficiente y es parte integral de las Buenas prácticas de manufactura; todo el conjunto de procesos de validación están descritos en un Plan Maestro de Validaciones, este plan considera el desarrollo de actividades como la Calificación del Sistema que viene a ser la ejecución de pruebas para determinar si un componente de un proceso posee los atributos requeridos para trabajar correctamente la técnica analítica elegida, esta primera etapa considera:

✓ **Calificación del diseño (DQ):**

Define los datos específicos funcionales y operacionales del instrumento y sistemas auxiliares, de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura. Es sumamente importante la selección cuidadosa de los procedimientos de prueba y límites de la aceptación definidos.

✓ **Calificación de la Instalación (IQ):**

Establece que el equipo y los sistemas auxiliares son entregados de acuerdo al diseño y especificación del fabricante, instalados en el ambiente seleccionado, y que este ambiente es conveniente para la operación y el empleo del instrumento.

✓ **Calificación operacional (OQ):**

Es el proceso de demostración que un instrumento funcionará según su especificación operacional en el ambiente seleccionado, el objetivo principal es de asegurar que el hardware y software del equipo se encuentran funcionales según los datos específicos requeridos en el documento DQ.

✓ **Calificación del performance (PQ):**

Establece por evidencia objetiva que el proceso, bajo condiciones delimitadas, produce constantemente un producto que cumple con las características de calidad deseadas y que las especificaciones del proceso no afectan al producto final.

Los métodos analíticos deben ser validados antes de su introducción en el uso de rutina; y revalidados al cambio de las condiciones del método validado (por ejemplo, un instrumento con características diferentes o muestras con una matriz diferentes); al cambio en el procedimiento analítico que se encuentra fuera del alcance de aplicación inicial del método; al cambio en la síntesis del principio activo, al cambio de la composición del producto terminado.⁽⁵⁰⁻⁵⁴⁾

2.1.2.3.1 Parámetros de Validación

a. Exactitud

La exactitud está definida como la concordancia entre el resultado obtenido mediante el método elegido y el valor verdadero. La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto; las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada obteniéndose valores superiores al valor verdadero; las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen en una disminución de la recuperación.

Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero (error o error porcentual).

Estadísticamente, suele efectuarse un test de “t” de student para determinar si el valor medio del error y valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que se evalúe realizando un mínimo de nueve determinaciones de tres niveles de concentración, cubriendo así, el intervalo especificado.^{52, (55-57)}

b. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o expresado de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.⁵⁶

Dentro del término precisión se pueden distinguir el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere a la medida de precisión de los resultados de un método analítico efectuado por laboratorios diferentes y en condiciones diferentes (diferentes analistas, equipos, días, etc.). Una precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

- ✓ **La repetibilidad** se refiere a la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo y en el curso de la misma serie de análisis efectuados durante un periodo de tiempo corto.

- ✓ **La precisión** de un método analítico matemáticamente se expresa por la desviación estándar de la desviación estándar relativa.

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad analizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento.^{52, (55 57)}

c. Selectividad

Se define como la capacidad para medir y/o identificar simultáneamente el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes relacionados o productos de degradación que puedan estar presentes en la matriz.

La selectividad de un método analítico, se determina comparando los resultados de análisis de muestras conteniendo impurezas, siendo un parámetro crucial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave.

Los estudios de selectividad varían según el método aplicado:

- ✓ **Métodos de identificación.** Debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y de aquéllas de composición similar.

- ✓ **Ensayos de pureza.** Debe garantizar que el método analítico permite la evaluación de impurezas cualitativa o cuantitativamente.

✓ **Determinación cuantitativa de un componente.**

Debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia analizada sin interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas cuando se determina el contenido en principio activo u otro componente (conservador, antioxidante) en un medicamento.

Para la determinación de la selectividad, se pueden plantear diferentes alternativas. Una de ellas es por la adición de interferencias, en estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con o sin analito en presencia o ausencia de dichas interferencias; para la determinación de una forma farmacéutica el grupo de muestras a preparar serían: matriz, analito, matriz más analito, matriz más analito más impurezas más productos de degradación.

La otra aplicación es utilizando pruebas confirmatorias con muestras sometidas a estrés para generar compuestos potencialmente interferentes, por lo cual, adquiere importancia para métodos que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica; estas condiciones, para lograr una degradación se somete a degradaciones de luz, humedad relativa, calor, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación.

La selectividad se confirma cuando un pico de la absorbancia es puro y no hay ninguna interferencia del placebo en el tiempo de retención correspondiente al analito.⁵⁵⁻⁵⁷

d. Linealidad

La linealidad de un método analítico incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y su capacidad de respuesta, así como el intervalo de concentraciones del analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona además, con la sensibilidad de calibrado (representación gráfica del cociente entre la señal del analito y la señal del patrón frente a la concentración de analito de los patrones).

La determinación de la linealidad se realiza calculando la curva de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con una concentración de analito determinado. Generalmente se pretende obtener una recta de calibración, determinándose los parámetros de la recta de regresión; para algunos casos, la obtención del parámetro de linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, se tienen que someter a una transformación matemática. Los datos obtenidos a través de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad.

Se debería presentar el coeficiente de correlación, la intersección del eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que para establecer la linealidad se utilice normalmente un mínimo de 5 concentraciones. También recomienda que para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) se realice dentro del intervalo de 80% a 120% de la concentración de prueba.^{52, (56-57)}

e. Intervalo

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.³

2.1.2.3.2 Datos Requeridos para la Validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Este capítulo cubre sólo las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación. Estas categorías se indican a continuación.³

- **Categoría I-** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II-** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III-** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.)

➤ **Categoría IV-** Pruebas de identificación.

Para cada categoría se requiere diferente información analítica. En la siguiente tabla se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Tabla N° 8: Datos Requeridos para la Validación ³

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

2.2 DEFINICIONES OPERACIONALES

2.2.1 Variables Independientes.

- Bencilglucosinato.

- *Lepidium peruvianum* Chacón sp.

2.2.2 Variables Dependientes.

- Concentración de Bencilglucosinato.

- Validación.

Tabla N° 9: Variables Independientes

Variables Independientes	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Escala
Bencilglucosinolato	Compuesto químico presente en <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Soluciones de tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Soluciones de diferentes concentraciones de tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Intervalo tipo cuantitativo.
<i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Es una Brassicacea, pertenece a una de las cuatro familias vegetales que acumulan glucosinolatos. Entre la multitud de propiedades que se le atribuye están sus efectos antianémico, antioxidante, energizante, promotor de fertilidad, estimulador de la libido y reductor de síntomas de la menopausia.	Presencia y/o cantidad de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Intervalo tipo cuantitativo.

Tabla N° 10: Variables Dependientes

Variables Dependientes	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Escala
Concentración de Bencilglucosinolato	Porcentaje de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Cuantificación de Bencilglucosinolato en fracción de tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp., utilizando la cromatografía líquida de alta resolución.(HPLC)	Uso de estándar de referencia.	Intervalo Tipo: Cuantitativo
Validación	La FDA define el proceso de validación como "El establecimiento de pruebas documentadas que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso específico coherentemente producirá un producto que cumpla sus datos específicos predeterminados y atributos de calidad.	Soluciones de diferentes concentraciones de tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.	Uso de estándar de referencia.	Parámetros de validación: Exactitud, Precisión, Selectividad, Linealidad e Intervalo.

2.3 HIPÓTESIS

La técnica analítica desarrollada para la cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp., por cromatografía líquida de alta resolución, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Método de Investigación

a) **De acuerdo al periodo en que se capta la información:**

- ✓ **Prospectiva:** porque se registrara la información según van ocurriendo los fenómenos.

b) **De acuerdo a la evolución del fenómeno estudiado:**

- ✓ **Transversal:** porque se estudiaran las variables simultáneamente en un determinado momento.

c) **De acuerdo con la comparación de las poblaciones:**

- ✓ **Descriptivo:** porque se estudiara solo a una población, la cual se pretenderá describir en función de un grupo de variables.

d) **De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza:**

- ✓ **De observación:** porque el investigador solo podrá describir o medir el fenómeno estudiado

3.1.2 Muestra

Las muestras a analizar serán:

a.- Producto terminado tabletas de 800 mg de Maca contenido en su envase definitivo.

b.- Placebo del producto.

Placebo, blanco o matriz de la muestra: Es un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto el analitos.

c.- Principio activo más el placebo en las concentraciones requeridas para el análisis de los parámetros a estudiar.

3.1.2.1 Identificación de muestras

Las muestras deberán estar identificadas y contener la siguiente información: nombre del producto, lote, fecha y nombre de la persona que muestreo el producto.

3.1.2.2 Procesamiento de muestras

Las muestras serán almacenadas en la sección del área de Desarrollo Analítico y Validaciones a una temperatura entre 13 a 26° C hasta su análisis.

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 1	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

3.1.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.3.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

Contenido:

1. Objetivo
2. Alcance
3. Justificación
4. Calificación del Instrumental
5. Técnica Analítica
 - 5.1 Desarrollo de la Técnica Analítica
 - 5.2 Materiales, Reactivos y Equipos
 - 5.3 Condiciones de Trabajo
 - 5.4 Procedimiento Analítico
6. Parámetros de Validación
 - 6.1 Desarrollo de los Parámetros de Validación
 - 6.2 Resultados
7. Informe Técnico

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 2
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i> FECHA
		01 Jun.20

1. Objetivo

Demostrar que la técnica de valoración cuantitativa de Bencilglucosinato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp por HPLC, cumple con los parámetros de selectividad, linealidad, precisión y exactitud en un intervalo de tiempo establecido y a lo largo de la prueba. De esta manera se establece que la técnica está totalmente bajo control y proporciona de forma constante y repetitiva resultados que cumplen con las especificaciones establecidas.

2. Alcance

Este protocolo describe la técnica de cuantificación de Bencilglucosinato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp. por HPLC.

3. Justificación

Dado que la técnica de cuantificación de Bencilglucosinato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp. por HPLC, no está considerado en obra oficial alguna (USP, BP), se hace necesario su validación para demostrar su fiabilidad.

4. Calificación Instrumental

a. Equipo: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)

- Marca : Merck Hitachi

Modelo: Lachrom Elite

Equipado con los siguientes módulos:

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 3
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i> FECHA
		01 Jun.20

Horno de Columnas: Modelo L-2300 Serie: 16E15-005

Bomba Cuaternaria: Modelo L-2130 Serie: 16N05-057

Detector UV: Modelo L-2400 Serie: 16E11-010

Inyector Automático: Modelo L-2200 Serie: 17E26-004

Estación de Trabajo Compatible marca HP

Software: EzChrom Elite

Versión 3.1.7

- Marca: Merck Hitachi

Modelo: Lachrom Elite

Equipado con los siguientes módulos:

Horno de Columnas: Modelo L-2300 Serie: 14E03-007

Bomba Cuaternaria: Modelo L-2130 Serie: 15E11-004

Detector DAD: Modelo L-2450 Serie: 1506-021

Inyector Automático: Modelo L-2200 Serie: 1402-002

Estación de Trabajo Compatible marca HP

Software: Chromatography Data Station

Software: EzChrom Elite

Versión 3.1.7

b. Balanza Analítica:

Marca: Mettler Toledo

Modelo: AL 204

Serie N°: 1225450027

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 4
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i> FECHA
		01 Jun.20

c. Ultrasonido:

Marca: Bransonic
 Modelo: 3510E – DTH
 Serie N°: EMC-060964373G

d. Centrífuga

Marca: Hettich Zentrifugen
 Modelo: EBA-20
 Serie N°: D-78532

e. Easy Pure (purificador de agua)

Marca: Barnstead Thermo
 Modelo: D7401
 Serie N°: 13020890494

f. Estufa

Marca: Media Center
 Modelo: Ecocell ss
 Serie N°: B073714

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 5
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		<i>01</i> <i>Jun.20</i>

5. Técnica analítica

La técnica analítica descrita se desarrollo y valido por cromatografía Liquida de Alta Resolución (HPLC).

5.1 Desarrollo de la técnica analítica

Se evaluó la solubilidad para evitar una fase móvil que pueda precipitar en el instrumento toda la muestra o parte de ella. Los disolventes cromatograficos utilizados a prueba fueron: agua, metanol y acetonitrilo. Seguidamente se selecciono la fase móvil y el diluyente.

El Bencilglucosinolato es soluble en agua, en base a ello se preparó una fase móvil en base a agua HPLC y para el diluyente una proporción entre acetonitrilo, metanol y agua.

Una vez hallada la fase móvil y el diluyente correcto se procedió a probar la columna cromatografica que diera una mejor resolución. Se probó una Lichrospher 100 RP-18 endcapped (5µm). La naturaleza de la fase móvil permite que el analito sea separado con facilidad por este tipo de columna y la determinación del pico dentro del cromatograma sea adecuada debido al carácter polar de la fase móvil, dando los resultados esperados.

Para determinar la longitud de onda con la cual se debe realizar la medición, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución DAD. El rango de prueba de las longitudes de onda es de 200 a 400 nm. Se determinó que la longitud de onda ideal para la lectura del principio activo en un cromatograma es de 229 nm.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 6	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Una vez determinados estos parámetros, se procedió al ensayo con la preparación de la muestra en base a tabletas de *Lepidium peruvianum* Chacón sp (Maca) de 800 mg, para seleccionar así el volumen de inyección y el flujo adecuado; y estimar el tiempo de retención para el pico respectivo del Bencilglucosinolato. Luego se procedió a realizar la validación de la técnica analítica.

5.2 Materiales, Reactivos y Equipos.

Materiales:

- Fiolas de 100 mL.
- Mortero y pilón
- Probetas de 500 y 1000 mL.
- Membranas filtrantes de 0.45µm de poro.
- Tubos para centrífuga.
- Porta filtros y jeringas descartables.
- Viales de HPLC de 2 mL y tapas para los mismos.
- Platos de aluminio.
- Columna cromatografica: Lichrospher 100 RP-18 endcapped (5µm) Merck.

Reactivos:

- Metanol, Acetonitrilo y Agua grado HPLC

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 7
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		<i>01</i> <i>Jun.20</i>

Equipos:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC).
- Balanza Analítica
- Ultrasonido
- Centrífuga
- Easy Pure (purificador de agua)
- Estufa

5.3 Condiciones de trabajo

Se realizó en condiciones normales de trabajo a temperatura ambiente.

- Estándar de Referencia

Nombre: Maca polvo

Potencia t/c: 0.83%

Vencimiento: 2015-02-08

- Muestra

Aspecto: Tabletas oblongas de color crema característico, no homogéneo, con olor Característico.

Peso promedio : 1000,00 mg/Tab (950,00 – 1050,00 mg/Tab)

Principio activo : Bencilglucosinolato

Excipientes : c.s.p

Método propuesto : Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 8
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i> FECHA
		01 Jun.20

5.4 Procedimiento Analítico

Se procedió de la siguiente manera:

Método : Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Sistema Cromatográfico:

Detector : UV, 229 nm
 Columna : Lichrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm) (5µm)
 Velocidad de flujo : 0,5 mL/minuto
 Volumen de inyección : 50 µl
 Temperatura : 35 °C
 Tiempo de retención : 2,5 minutos aproximadamente
 Tiempo de corrida : 4,0 minutos aproximadamente

Fase móvil:

Agua HPLC, filtrar y desgasificar con filtro de membrana de nylon de 0,45 µm

Solución diluyente: Acetonitrilo: Metanol: Agua (25:25:50)

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 9	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Preparación de las Soluciones de Trabajo:

Solución Estándar de Referencia

Concentración final 2 mg/mL

Pesar aproximadamente 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

Solución Muestra

Concentración final 2 mg/mL

Pesar no menos de 20 tabletas y moler a polvo fino. Pesar con exactitud 200 mg del polvo y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 10	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

ADECUACIÓN O APTITUD DEL SISTEMA ⁵⁶

Se inyectó el volumen indicado de solución de referencia por quintuplicado. Con lo cual se comprobó el funcionamiento del sistema: bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos. Coeficiente de Variación (CV), Factor de Asimetría (T), Factor de Capacidad (K'), Número de Platos Teóricos (N). Tabla N° 11.

Especificaciones de los parámetros cromatográficos:

Coeficiente de Variación (CV) = No más de 2,0%

Factor de Asimetría (T) = De 0,8 a 2,0

Factor de Capacidad (K') = No menor de 2

Número de Platos Teóricos (N) = No menos de 2000

Tabla N° 11: Aptitud del Sistema

PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Coeficiente de Variación (CV)	No más de 2,0%	1.6900
Factor de Asimetría (T)	De 0,8 a 2,0	1.3780
Factor de Capacidad (K')	No menor de 2	2.6580
Número de Platos Teóricos (N)	No menos de 2000	2971.2

Fuente: Elaboración propia

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 11	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Cálculo:

$$\text{Bencilglucosinolato \%} = \frac{A M}{A St} \times \frac{WSt}{100} \times \frac{Pot St}{100} \times \frac{100}{WM} \times pp \times 100$$

Donde:

A M : Área de muestra

A St : Área de estándar

W St : Peso del estándar expresado en mg

WM : Peso de la muestra expresada en mg

pp : Peso promedio expresado en mg

Pot St : Potencia del estándar expresado como tal cual.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 12	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

6. Parámetros de Validación

6.1 Desarrollo de los Parámetros de Validación

a. SELECTIVIDAD ⁵⁶

Mediante este parámetro se determina la capacidad del método analítico de medir el contenido sin interferencias de parte de los excipientes presentes o de posibles productos de degradación del principio activo.

- Por adición de las interferencias

➤ **Placebo**

Pesar aproximadamente 50 mg de placebo (excipientes), y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

➤ **Analito**

Pesar aproximadamente 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 13	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

➤ **Placebo con Analito**

Pesar no menos de 20 tabletas y moler a polvo fino. Pesar con exactitud 200 mg del polvo y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

- Determinación de Productos de Degradación

Se somete al principio activo, a degradación forzada.

➤ **Termolisis**

Pesar con exactitud 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, que haya sido sometido a la temperatura de 70° C durante 2 horas, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 14	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

➤ **Fotolisis**

Pesar con exactitud 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, que haya sido sometido a la luz ultravioleta (254 nm) durante 2 horas, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

➤ **Humedad Relativa (85%)**

Pesar con exactitud 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, que haya sido sometido a 85% de humedad durante 2 horas, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

b. LINEALIDAD⁵⁶

- Linealidad del Sistema

Se determina empleando estándares de referencia en las concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%; siendo el 100% una concentración de 2 mg/mL que corresponde a la concentración final del estándar en el ensayo

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 15	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Solución Estándar al 80%

Pesar 160 mg de estándar de referencia de Maca, luego seguir como la preparación de la solución estándar de referencia del procedimiento analítico (5.4).

Solución Estándar al 90%

Pesar 180 mg de estándar de referencia de Maca, luego seguir como la preparación de la solución estándar de referencia del procedimiento analítico (5.4).

Solución Estándar al 100%

Pesar 200 mg de estándar de referencia de Maca, luego seguir como la preparación de la solución estándar de referencia del procedimiento analítico (5.4).

Solución Estándar al 110%

Pesar 220 mg de estándar de referencia de Maca, luego seguir como la preparación de la solución estándar de referencia del procedimiento analítico (5.4).

Solución Estándar al 120%

Pesar 240 mg de estándar de referencia de Maca, luego seguir como la preparación de la solución estándar de referencia del procedimiento analítico (5.4).

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 16	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

- Linealidad del Método

Se determina empleando muestras en las concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%; siendo el 100% una concentración de 2 mg/mL que corresponde a la concentración final de la muestra en el ensayo.⁵⁶

Solución Muestra al 80%

Pesar 160 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

Solución Muestra al 90%

Pesar 180 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

Solución Muestra al 100%

Pesar 200 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

Solución Muestra al 110%

Pesar 220 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

Solución Muestra al 120%

Pesar 240 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 17	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

c. PRECISIÓN

- **Repetibilidad**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.⁵⁶

- **Repetibilidad del Sistema**

Se determina analizando una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. En el caso de una forma farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal.⁵⁶

Procedimiento Analítico

Pesar aproximadamente 200 mg de estándar de referencia de Maca y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 18/	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

- Repetibilidad del Método

Se determina analizando un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal o un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).⁵⁶

Procedimiento analítico

Pesar no menos de 20 tabletas y moler a polvo fino. Pesar con exactitud 200 mg del polvo y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

• Precisión Intermedia

Se determinó de la siguiente forma: dos analistas, dos instrumentos y realizando el análisis tres días diferentes. Se preparó la muestra a la concentración nominal.⁵⁶

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 19	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Procedimiento analítico

Pesar no menos de 20 tabletas y moler a polvo fino. Pesar con exactitud 200 mg del polvo y llevar a fiola de 100 mL, agregar 70 mL de solución diluyente, sonicar y agitar hasta completa disolución y diluir a volumen con solución diluyente. Centrifugar a 50 r.p.m. por 5 minutos. Homogenizar, filtrar a través de filtro de jeringa de talla de poro de 0,45µm y de 25 mm de diámetro y colocar en viales e inyectar en el sistema HPLC.

d. EXACTITUD

Se preparó tres muestras en las concentraciones de 80%, 100% y 120%, y se analizó cada solución por triplicado de la cual se obtiene la desviación estándar de cada concentración.⁵⁶

Procedimiento Analítico:

Solución al 80%

Pesar 160 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

Solución al 100%

Pesar 200 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 20	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Solución al 120%

Pesar 240 mg del pulverizado de Maca tabletas, luego seguir como la preparación de la muestra del procedimiento analítico (5.4).

e. INTERVALO

Se valida verificando que el procedimiento analítico proporcionado por la precisión, exactitud y linealidad son aceptables.³

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 21	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

6.2 RESULTADOS

a. SELECTIVIDAD

➤ **Determinación de picos cromatográficos de excipientes en el placebo:**

No se detectan picos cromatográficos de excipientes en el placebo.

➤ **Determinación de productos de degradación:**

No se detectan picos cromatográficos de los posibles productos de degradación, por efecto de los diferentes métodos de degradación forzada al que han sido sometidos.

Por lo tanto la selectividad se confirma porque el pico de la absorbancia es puro y no hay ninguna interferencia del placebo y de los productos de degradación en el tiempo de retención correspondiente al analito ver Anexo N° 8.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 22
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		01 Jun.20

Tabla N° 12: Resumen del Análisis de la Selectividad

Sustancia tratada		Evaluación en el método	Reactivo usado en el tratamiento	Condiciones	Observaciones
Placebo	Excipientes	sí	*	**	Ninguna
F. móvil	NA				
Termólisis	Estándar	sí	*	70 °C x 2 horas	Ninguna
Fotolisis	Estándar	sí	*	UV (254 nm) x 2 horas	Ninguna
Humedad relativa	Estándar	sí	*	85% de Humedad x 2 horas	Ninguna
<p>* Reactivos empleados en la técnica de análisis en evaluación.</p> <p>** Las que se señalan en la técnica</p> <p>CONFORME X</p> <p>NO CONFORME</p>					

Fuente: Elaboración propia

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 23
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		<i>01</i> <i>Jun.20</i>

b. LINEALIDAD

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados, para nuestro caso las áreas que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra, se realiza con el objetivo de obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta.

Este parámetro se evaluó en un rango de 80-120 %, preparando 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales.

La evaluación estadística de la linealidad del sistema se realizó por medio:

o CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN

Determinar la recta de regresión. Sobre los puntos individuales y sin promediar. Para el caso de una recta la función toma la forma

$$y = b x + a$$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		Pág 24
		De 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		Nº
		FECHA
		01 Jun.20

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos de las Tablas N° (13-17).

En la Tabla N° 18, Se muestran los resultados de la linealidad del sistema en el que se trabajó con el estándar secundario de Maca, se prepararon 5 concentraciones diferentes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120% se trabajó por triplicado para cada nivel de concentración obteniéndose las áreas correspondientes.

Después de haberse establecido la recta de regresión , los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes fórmulas:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \qquad a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

n: Número de muestras para nuestro caso n:15

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes:

a: -544098.07

b: 56286.4

ECUACIÓN DE LA RECTA: $y = 56286.4 \ x + (- 544098.067)$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 25	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Estándar de referencia
Nombre: Maca Lote : MACPW029080212 Fecha de Expira: 2015-02-08 Potencia (%) : 0.83

Diluciones

ESTANDAR

<u>200</u>	x	<u>0.83</u>
100		100

FACTOR St:	0.0166
-------------------	--------

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 26	
		<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°13: Linealidad del Sistema al 80%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
80%	160.06	80.55	3836676	3909390.00	6488.303	15283330172100	314901364.50	48533.71	1.76040
			3951754						
			3939740						
80%	160.08	83.99	4048673	4076557.00	7054.320	16618316974249	342390022.43	48536.22	
			4055944						
			4125054						
80%	160.07	79.13	3895989	3840630.00	6261.557	14750438796900	303909051.90	48535.70	
			3824586						
			3801315						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 27	
		<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°14: Linealidad del Sistema al 90%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
90%	180.00	87.50	4333976	4430629.00	7656.250	19630473335641	387680037.50	50635.76	1.80862
			4485774						
			4472137						
90%	180.00	91.64	4595791	4640319.33	8397.890	21532563515307	425238863.71	50636.40	
			4604044						
			4721123						
90%	180.00	85.86	4385829	4347419.33	7371.940	18900054859840	373269423.96	50633.81	
			4341422						
			4315007						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 28	
		<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°15: Linealidad del Sistema al 100%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
100%	200.04	99.33	4977310	5071641.00	9866.449	25721542432881	503766100.53	51058.50	3.34922
			5126599						
			5111014						
100%	200.05	103.57	5252333	5288506.67	10726.745	27968302763378	547730635.47	51062.15	
			5261765						
			5351422						
100%	200.05	97.58	5054256	4982439.33	9521.856	24824701710347	486186430.15	51060.05	
			4961626						
			4931436						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 29</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°16: Linealidad del Sistema al 110%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
110%	220.01	106.84	5392085	5494277.33	11414.786	30187083415580	587008590.29	51425.28	0.31097
			5553816						
			5536931						
110%	220.01	111.41	5690027	5729215.00	12412.188	32823904516225	638291843.15	51424.60	
			5700245						
			5797373						
110%	220.00	104.96	5475444	5397642.33	11016.602	29134542758592	566536539.31	51425.71	
			5375094						
			5342389						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 30</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°17: Linealidad del Sistema al 120%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
120%	240.05	118.94	6014249	6128232.67	14146.724	37555235616800	728891993.37	51523.73	0.71534
			6194641						
			6175808						
120%	240.06	124.03	6346569	6390278.67	15383.441	40835661437655	792586263.03	51522.04	
			6357966						
			6466301						
120%	240.05	116.85	6107226	6020447.67	13653.923	36245790107072	703489309.85	51522.87	
			5995298						
			5958819						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 31</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N° 18: Resultado global de la Linealidad del Sistema

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	% xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
S		1411.63		71838235.33	144884.669	376728612240469	7386975104.64	711002.8	6.18415
							Promedio	538118100	50995
							Varianza	17880059784950100	483244
							D.S.	133716341	695
							r² =	1.002394	

r =	1.0011954
------------	-----------

Pendiente (b) = 56286.4

Intercepto (a) = -544098.07

Ecuación de la recta y =	56286.4	x	+	(-544098.067)
--------------------------	---------	---	---	---	--------------

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 32	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

**TEST DE LINEALIDAD DEL
SISTEMA**

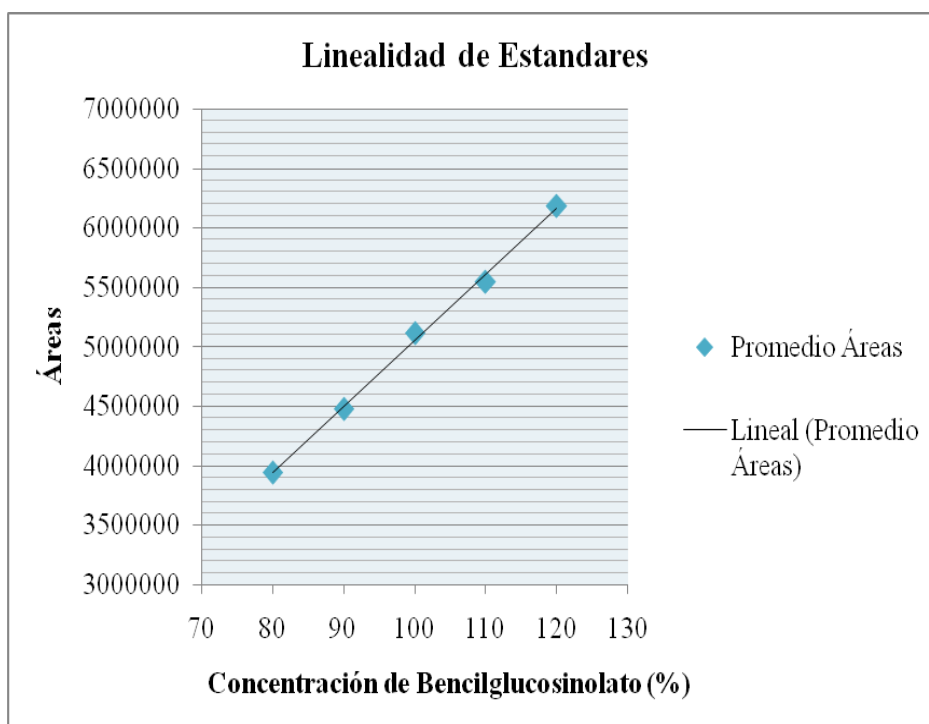
Coefficiente variación, factores respuesta (%)	1.363
Varianza de la pendiente (b)	72290736
D.S de la pendiente (b)	8502.396
RSD (%) pendiente	257.886
t exp	6.620
t tabla	2.160

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 33	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

La recta de regresión lineal, pudo graficarse a su vez, en el Grafico N° 1 a partir de las TABLAS N° (13-17), en la que se evidencia la linealidad del sistema, que fue construida con la concentración “x” del Estándar de Maca en mg/mL versus “y” que son las áreas del Bencilglucosinolato correspondientes a cada concentración “x”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

GRAFICO N° 1: Linealidad del Sistema



Al observar el Grafico N° 1 nos percatamos que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 34	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

○ **INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL**

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- a. Cálculo del coeficiente de correlación (r)
- b. Cálculo del coeficiente de determinación (r^2)
- c. Test de linealidad:
 - c.1 Límite de confianza de la pendiente “b”:
 - c.2 Test estadístico de la pendiente “b”
 - c.3 Coeficiente de variación de los factores de respuesta

a. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y” , se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, el que puede adoptar distintos valores por consiguiente distintos indicadores como:

$r = 1$ indica una recta perfectamente lineal

$r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa

$r = 0$ indica que no hay relación entre “x” e “y”

El coeficiente de correlación lineal se determinó con los valores hallados en las **TABLAS N° (13-17)** y con las siguientes fórmulas:

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 35	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

RESULTADO:

El coeficiente de correlación fue de 1.001. Dicho valor indica que la recta de regresión es casi perfectamente lineal y que existe una correlación lineal positiva.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Mayor o igual que 0.999

b. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r^2)

Indica el grado de ajuste de la ecuación

Se halló el coeficiente de determinación " r^2 " con la siguiente fórmula:

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

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 36	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

RESULTADO:

El coeficiente de determinación fue de 1.002. El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 100.20% de las variaciones se debe a influencia de la variable “x”.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: ≥ 0.998

Sin embargo el mejor indicativo de un modelo lineal no es “r” sino un test estadístico.

c. TEST DE LINEALIDAD

c.1 Límite de Confianza de la Pendiente “b”:

Este valor se calcula en función de la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” (Sb) se debe hallar primero la **VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL** (determinación de la varianza de X sobre Y) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y^2_i - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i}{n - 2} \qquad S_{XY}^2 = 72290736$$

A partir de ello se determina la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” (Sb) cuya fórmula es la siguiente:

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 37
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		<i>01</i> <i>Jun.20</i>

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X^2_i - \frac{(\sum X\bar{i})^2}{n}}} \quad S_b = 8502.396$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** de la pendiente “b”

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \times sb$$

t_{tabla} = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad, n: número de muestras
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%

RESULTADO:

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

t_{tabla} : 2.16 Para 15-2 = 13 grados de libertad y (p= 0.05)

$$b = 56286.4 \pm 2.16 \times 8502.396 =$$

$$b = 37921.2 \text{ hasta } 74651.6$$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	Pág 38	
	De 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	Nº	FECHA
	01	Jun.20

c.2 TEST ESTADÍSTICO DE LA PENDIENTE “b”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “t_{exp}” y “t_{tabla}”

HIPÓTESIS NULA (H₀)= "b" es estadísticamente igual a cero (b=0)

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H₁)= "b" es estadísticamente diferente de cero (b diferente de cero)

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL** “ t_{exp}

$$t_{exp} = \frac{|b|}{Sb} \qquad T_{exp} = 6.620$$

RESULTADO:

t_{tabla} : 2.16 Para 15-2=13 grados de libertad y (p = 0.05)

t_{exp}: 6.620

t_{exp} > t_{tabla}, entonces se rechaza la hipótesis nula (H₀) y "b" es significativamente diferente de cero.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 39	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Si $t_{exp} > t_{tabla}$ para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95% y $(n-2)$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula (H_0), entonces “ b ” es estadísticamente diferente de cero es decir el intervalo de confianza no incluye el cero.

c.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (F):

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. El coeficiente de variación de los factores de respuesta se calcula a partir de la siguiente fórmula pero antes de calcular ello primero se debe calcular la desviación estándar de f (sf):

$$CVf\% = \frac{sf}{\bar{x}f} \times 100$$

RESULTADO: Coeficiente de variación inferior al 5%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.363 % de dispersión

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: $CV < 5.0\%$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 40	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

2. LINEALIDAD DEL METODO

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados, para nuestro caso las áreas que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra, se realiza con el objetivo de obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta.

Este parámetro se evaluó en un rango de 80-120 %, preparando 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales.

La evaluación estadística de la linealidad del sistema se realizó por medio:

○ CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN

Determinar la recta de regresión. Sobre los puntos individuales y sin promediar.
Para el caso de una recta la función toma la forma

$$y = b x + a$$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		Pág 41
		De 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		Nº
		FECHA
		01 Jun.20

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos de las Tablas N° (19-23).

En la Tabla N° 24, Se muestran los resultados de la linealidad del Método en el que se trabajó con la muestra de Maca, se prepararon 5 concentraciones diferentes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120% se trabajó por triplicado para cada nivel de concentración obteniéndose las áreas correspondientes.

Después de haberse establecido la recta de regresión, los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes fórmulas:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \qquad a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

n: Número de muestras para nuestro caso n:15

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes:

a: -555054.91

b: 56418.3

ECUACIÓN DE LA RECTA: $y = 56418.3 \ x + (- 555054.91)$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 42	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Estándar de referencia	
Nombre	: Maca
Lote	: MACPW029080212
Fecha de Expira:	2015-02-08
Potencia (%):	0.83

Diluciones

ESTANDAR

<u>200</u>	x	<u>0.83</u>
100		100

FACTOR St	0.0166
FACTOR M	62.14446388

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 43</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°19: Linealidad del Método al 80%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
80%	160.06	80.95	3951748	3929161	6552.903	15438306163921	318065582.95	48538.12	0.16865
			3939734						
			3896001						
80%	160.08	78.72	3824582	3820859	6196.838	14598966045120	300778046.72	48537.34	
			3801319						
			3836677						
80%	160.07	80.16	3939740	3890802	6425.626	15138337609336	311886661.60	48537.94	
			3836676						
			3895989						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 44</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°20: Linealidad del Método al 90%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
90%	180.01	89.22	4472129	4517901	7960.208	20411426433867	403087097.48	50637.76	1.68987
			4485768						
			4595805						
90%	180.01	90.05	4472149	4559696	8109.003	20790827612416	410600624.80	50635.16	
			4485789						
			4721150						
90%	180.02	87.84	4485758	4447913	7715.866	19783927090294	390704648.64	50636.53	
			4385836						
			4472144						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 45</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°21: Linealidad del Método al 100%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
100%	200.05	99.83	5111022	5097304	9966.029	25982504670213	508863825.04	51059.84	0.71600
			5126612						
			5054277						
100%	200.05	97.88	4961643	4997727	9580.494	24977278498347	489177551.39	51059.74	
			5054234						
			4977305						
100%	200.06	102.11	5261659	5213566	10426.452	27181266960645	532357190.22	51058.33	
			5252218						
			5126820						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 46</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°22: Linealidad del Método al 110%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
110%	220.00	109.83	5700171	5648029	12062.629	31900235350194	620323061.68	51425.20	0.69319
			5689984						
			5553933						
110%	220.01	107.38	5475680	5522064	11530.464	30493187138720	592959196.53	51425.44	
			5536797						
			5553714						
110%	220.01	105.28	5375200	5414208	11083.878	29313644657792	570007783.15	51426.74	
			5392208						
			5475215						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 47</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°23: Linealidad del Método al 120%

CONCENT. TEORICA	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi^2	yi^2	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
120%	240.01	119.54	6107278	6159225	14289.812	37936052600625	736273756.50	51524.39	0.63335
			6175849						
			6194548						
120%	240.02	117.29	6175704	6043308	13756.944	36521575611736	708819634.42	51524.50	
			5995262						
			5958959						
120%	240.02	122.27	6194868	6299725	14949.953	39686539275442	770267416.51	51523.07	
			6357825						
			6346483						

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág 48</i>	
		<i>De 73</i>	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

Tabla N°24: Resultado Global de la Linealidad del Método

Concent. Teórica	Peso (mg)	Resultado mg xi	AREAS yi	AREAS PROMEDIO yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta yi/xi	VARIANCIA
S		1407.40		71632326	144054.196	374715769554748	7346106494.67	711012.0	3.73242
Promedio							537052862	50995	
Varianza							17205861444163600	482877	
D.S.							131171115	695	
r² =							0.998451		

r =	0.999725
------------	-----------------

Pendiente:

(b) = 56418.3

Intercepto (a) = -555054.91

Ecuación de la recta y =	56418.3	x	+	(-555054.914)
--------------------------	---------	---	---	---------------

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 49	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

TEST DE LINEALIDAD DEL METODO

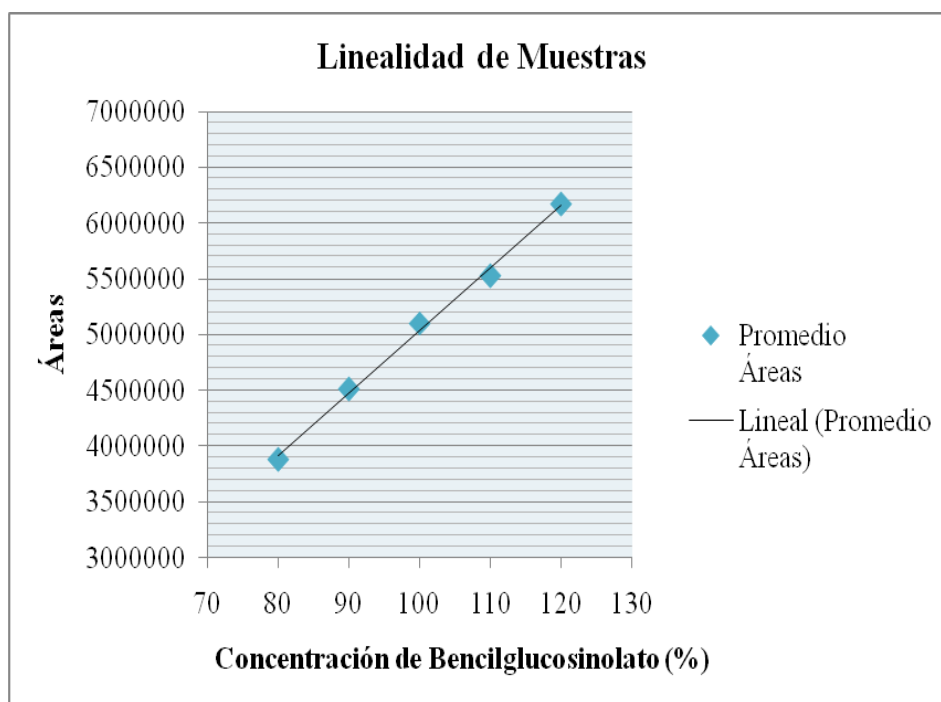
Coefficiente variación, factores respuesta (%)	1.363
Varianza de la pendiente (b)	72504587
D.S de la pendiente (b)	8514.963
RSD (%) pendiente	257.886
t exp	6.626
t tabla	2.160

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 50	
		<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
		<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

La recta de regresión lineal, pudo graficarse a su vez, en el Grafico N° 2 a partir de las TABLAS N° (19-23) en la que se evidencia la linealidad del método, que fue construida con la concentración “x” de la Muestra de Maca en mg/mL versus “y” que son las áreas del Bencilglucosinolato correspondientes a cada concentración “x”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

GRAFICO N° 2: Linealidad del Método



Al observar el Grafico N° 2 nos percatamos que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 51	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

○ **INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL**

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- a. Cálculo del coeficiente de correlación (r)
- b. Cálculo del coeficiente de determinación (r²)
- c. Test de linealidad:
 - c.1 Límite de confianza de la pendiente “b”:
 - c.2 Test estadístico de la pendiente “b”
 - c.3 Coeficiente de variación de los factores de respuesta

d. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y” , se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, el que puede adoptar distintos valores por consiguiente distintos indicadores como:

r = 1 indica una recta perfectamente lineal

r = -1 indica una recta perfectamente lineal negativa

r = 0 indica que no hay relación entre “x” e “y”

El coeficiente de correlación lineal se determinó con los valores hallados en las **TABLAS N° (19-23)** y con las siguientes fórmulas:

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		Pág 52
		De 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		Nº
		FECHA
		01 Jun.20

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

RESULTADO:

El coeficiente de correlación fue de 0.9997. Dicho valor indica que la recta de regresión es casi perfectamente lineal y que existe una correlación lineal positiva.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Mayor o igual que 0.999

e. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r²)

Indica el grado de ajuste de la ecuación

Se halló el coeficiente de determinación “r²” con la siguiente fórmula:

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

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 53	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

RESULTADO:

El coeficiente de determinación fue de 0.9985. El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 99.85% de las variaciones se debe a influencia de la variable “x”.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: ≥ 0.998

Sin embargo el mejor indicativo de un modelo lineal no es “r” sino un test estadístico.

f. TEST DE LINEALIDAD

c.1 Límite de Confianza de la Pendiente “b”:

Este valor se calcula en función de la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” (*S_b*) se debe hallar primero la **VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL** (determinación de la varianza de X sobre Y) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y^2 i - a \sum Yi - b \sum Xi Yi}{n - 2} \qquad S_{XY}^2 = 72504587$$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 54	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

A partir de ello se determina la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” (*S_b*) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X^2 i - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}} \quad S_b = 8514.963$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** de la pendiente “b”

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \times sb$$

t_{tabla} = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad, n: número de muestras
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

RESULTADO:

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

t_{tabla}: 2.16 Para 15-2 = 13 grados de libertad y (p= 0.05)

$$b = 56418.3 \pm 2.16 \times 8514.963 =$$

$$b = 38026 \text{ hasta } 74810.6$$

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 55	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

c.2 TEST ESTADÍSTICO DE LA PENDIENTE “b”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ t_{exp} ” y “ t_{tabla} ”

HIPÓTESIS NULA (H_0)= "b" es estadísticamente igual a cero (b=0)

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1)= "b" es estadísticamente diferente de cero (b diferente de cero)

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL** “ t_{exp} ”

$$t_{exp} = \frac{|b|}{Sb} \qquad T_{exp} = 6.626$$

RESULTADO:

t_{tabla} : 2.16 Para 15-2=13 grados de libertad y (p = 0.05)

t_{exp} : 6.626

$t_{exp} > t_{tabla}$, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 56	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Si $t_{exp} > t_{tabla}$ para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95% y (n-2) grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula (H_0), entonces “b” es estadísticamente diferente de cero es decir el intervalo de confianza no incluye el cero.

c.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (F):

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. El coeficiente de variación de los factores de respuesta se calcula a partir de la siguiente fórmula pero antes de calcular ello primero se debe calcular la desviación estándar de f (sf):

$$CVf\% = \frac{sf}{\bar{x}f} \times 100$$

RESULTADO: Coeficiente de variación inferior al 5%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.363 % de dispersión

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: CV < 5.0%

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 57	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

c. PRECISIÓN

REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

Tabla N°25: Repetibilidad del Sistema

Nº INYECCION	Área	TIEMPOS
1	5095539	2.61
2	5054851	2.61
3	5090203	2.61
4	5075336	2.61
5	5063426	2.61
6	5111014	2.58
PROMEDIO	5081728	2.61
%RSD	0.41	0.47

Fuente: Elaboración propia

En la **TABLA N° 25**, se muestra el parámetro de la repetibilidad del sistema, se debe determinar antes de iniciar el estudio de otros parámetros de validación, dado que así se conoce en que grado de respuesta del método es únicamente es proporcionada por el analito, obteniéndose un promedio de área 5081728 y un CV 0.41 %, promedio de Tiempos de Retención de 2.61 y un CV 0.47% el cual para los dos casos es inferior al $CV \leq 2\%$ teórica máxima por lo tanto la repetibilidad del sistema es adecuada.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 58	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Tabla N°26: Repetibilidad del Método

N° INYECCION	Área	TIEMPOS
1	5111022	2.58
2	5126612	2.59
3	5054277	2.58
4	5261659	2.58
5	5252218	2.59
6	5126820	2.59
PROMEDIO	5155435	2.59
%RSD	1.61	0.21

Fuente: Elaboración propia

En la **TABLA N° 26**, Se muestra el parámetro de la repetibilidad del método, se debe determinar antes de iniciar el estudio de otros parámetros de validación, dado que así se conoce en que grado de respuesta del método es únicamente es proporcionada por el analito, obteniéndose un promedio de área 5155435 y un CV 1.61 %, promedio de Tiempos de Retención de 2.59 y un CV 0.21% el cual para los dos casos es inferior al $CV \leq 2\%$ teórica máxima por lo tanto la repetibilidad del método es adecuada.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 59	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Tabla N°27: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (1)

ANALISTA (1)		Equipo(1):				
		Nombre: HPLC 3				
Equipo	RESULTADOS					
		M1	M2	M3		
Día " 1 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5111022	5054234	5261659	
		Inyección "2"	5126612	4977305	5252218	
		PROMEDIO	5118817	5015770	5256939	5130508
		% RSD	0.22	1.08	0.13	2.357
		PORCENTAJE	100.25	98.24	102.96	100.48
Día " 2 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5262327	5252796	5254493	
		Inyección "2"	5350860	5261302	5350342	
		PROMEDIO	5306594	5257049	5302418	5288687
		% RSD	1.18	0.11	1.28	0.517
		PORCENTAJE	103.93	102.96	103.84	103.58
Día " 3 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5254895	5338964	5158161	
		Inyección "2"	5339827	5265190	5220771	
		PROMEDIO	5297361	5302077	5189466	5262968
		% RSD	1.13	0.98	0.85	1.009
		PORCENTAJE	103.38	103.47	101.63	102.83
				PROMEDIO	5227388	
				PORCENTAJE	102.30	
				%RSD	1.29	
ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR				

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 60	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Tabla N°28: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (1)

ANALISTA (1)		Equipo(2):				
		Nombre: HPLC 7				
Equipo		RESULTADOS				
		M1	M2	M3		
Día " 1 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "1"	5111550	5127135	5072477	
		Inyección "2"	5110478	5126063	5070805	
		PROMEDIO	5111014	5126599	5071641	5103085
		% RSD	0.01	0.01	0.02	0.522
		PORCENTAJE	100.12	100.36	99.36	99.95
		Inyección "1"	5055292	5054499	5055079	
Día " 2 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "2"	5053220	5054013	5054668	
		PROMEDIO	5054256	5054256	5054874	5054462
		% RSD	0.03	0.01	0.01	0.097
		PORCENTAJE	99.08	98.96	99.15	99.06
		Inyección "1"	5110623	5111656	5111879	
		Día " 3 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "2"	5110232	5111233
PROMEDIO	5110428			5111445	5111064	5110979
% RSD	0.01			0.01	0.02	0.050
PORCENTAJE	100.03			100.13	100.09	100.08
PROMEDIO				5089508		
PORCENTAJE				99.70		
%RSD				0.22		

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 61
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i> FECHA
		01 Jun.20

Tabla N°29: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (2)

ANALISTA (2) :		Equipo(1):				
		Nombre: HPLC 3				
Equipo		RESULTADOS				
		M1	M2	M3		
Día " 1 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5127534	5110271	5117981	
		Inyección "2"	5126901	5110794	5118806	
		PROMEDIO	5127218	5110533	5118394	5118715
		% RSD	0.01	0.01	0.01	0.206
		PORCENTAJE	100.45	100.04	100.21	100.23
Día " 2 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5083378	5114078	5140686	
		Inyección "2"	5081892	5115564	5142160	
		PROMEDIO	5082635	5114821	5141423	5112960
		% RSD	0.02	0.02	0.02	0.565
		PORCENTAJE	99.56	100.18	100.69	100.14
Día " 3 "	EQUIPO " 1 "	Inyección "1"	5111013	5180991	5119006	
		Inyección "2"	5112374	5182353	5120070	
		PROMEDIO	5111694	5181672	5119538	5137635
		% RSD	0.02	0.02	0.01	0.744
		PORCENTAJE	100.11	101.48	100.27	100.62
				PROMEDIO	5123103	
				PORCENTAJE	100.33	
				%RSD	0.51	
ELABORADO POR		APROBADO POR		AUTORIZADO POR		

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 62	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Tabla N°30: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (2)

ANALISTA (2) :		Equipo(2):				
		Nombre: HPLC 7				
Equipo		RESULTADOS				
		M1	M2	M3		
Día " 1 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "1"	5090960	5091169	5095600	
		Inyección "2"	5089896	5092601	5097602	
		PROMEDIO	5090428	5091885	5096601	5092971
		% RSD	0.01	0.02	0.03	0.063
		PORCENTAJE	99.70	99.73	99.82	99.75
		%RSD	0.01	0.03	0.02	0.269
Día " 2 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "1"	5106033	5099687	5110315	
		Inyección "2"	5107927	5098553	5111713	
		PROMEDIO	5106980	5099120	5111014	5105705
		% RSD	0.03	0.02	0.02	0.117
		PORCENTAJE	100.02	99.87	100.10	100.00
		%RSD	0.01	0.03	0.02	0.269
Día " 3 "	EQUIPO " 2 "	Inyección "1"	5133369	5118411	5163640	
		Inyección "2"	5132447	5116361	5165438	
		PROMEDIO	5132908	5117386	5164539	5138278
		% RSD	0.01	0.03	0.02	0.269
		PORCENTAJE	100.53	100.23	100.77	100.51
		%RSD	0.01	0.03	0.02	0.269
				PROMEDIO	5112318	
				PORCENTAJE	100.09	
				%RSD	0.15	
ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR				

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 63	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

Tabla N°31: Precisión intermedia de valoración global

		RESULTADOS (%)			
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	
EQUIPO 1	ANALISTA 1	M1	100.25	103.93	103.38
		M2	98.24	102.96	103.47
		M3	102.96	103.84	101.63
		PROMEDIO	100.48	103.58	102.83
		%RSD	2.36	0.52	1.01
	ANALISTA 2	M1	100.45	99.56	100.11
		M2	100.04	100.18	101.48
		M3	100.21	100.69	100.27
		PROMEDIO	100.23	100.14	100.62
		%RSD	0.21	0.57	0.74
EQUIPO 2	ANALISTA 1	M1	100.12	99.08	100.03
		M2	100.36	98.96	100.13
		M3	99.36	99.15	100.09
		PROMEDIO	99.95	99.06	100.08
		%RSD	0.52	0.10	0.05
	ANALISTA 2	M1	99.70	100.02	100.53
		M2	99.73	99.87	100.23
		M3	99.82	100.10	100.77
		PROMEDIO	99.75	100.00	100.51
		%RSD	0.06	0.12	0.27
		PROMEDIO TOTAL	100.60		
		%RSD GLOBAL	1.42		

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 64	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

En las **TABLAS N° (27-30)**, Se observan las áreas, dosaje y desviaciones estándar de las Muestras del analista **1** y del analista **2**, a partir de esto datos podemos determinar los promedios de las áreas, dosaje y desviación estándar; siendo la especificación de este último un máximo de 6.0% cuyo resultado global se evidencia en la **TABLA N° 31**.

En la **TABLA N° 31**, Se observa el promedio del dosaje siendo este 100.60% y una desviación estándar de 1.42% por lo tanto cumple con la especificación y lo cual demuestra la precisión de la técnica analítica

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 65	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

d. EXACTITUD

Estándar de referencia	
Nombre:	Maca
Lote:	MACPW029080212
Fecha de Expira:	2015-02-08
Peso St (mg)	: 200,00 mg
Potencia	: 0.83%
Peso Promedio	: 994.56 mg/Tab

DILUCIÓN AL 100%

**Estándar
De Referencia**

$\frac{200.00}{100} \times \frac{0.83}{100}$
--

Factor St = 0.0166

Muestra $\frac{100}{200} \times \frac{994.56}{800} \times 100$

Factor M = 62.16000000

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 66
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		<i>01</i> <i>Jun.20</i>

Tabla N°32: EXACTITUD, PLACEBO CON ANALITO AL 80%

Porcentaje Teórico	Peso (mg)	Área	Analito Hallado (mg)	% de Recuperación	Promedio (%)	Variancia
80%	160.00	3882163	79.99	99.99	99.90	0.011
		3881131	79.83	99.79		
		3881781	79.95	99.94		
80%	160.00	3875010	79.84	99.80	99.80	0.019
		3873924	79.73	99.66		
		3876096	79.95	99.94		
80%	160.00	3866333	79.66	99.58	99.51	0.024
		3868310	79.70	99.63		
		3865401	79.47	99.34		
PROMEDIO				99.74		
RSD (%)				0.21		

Para la prueba de Homogeneidad de Variancias

G exp	0.442	G _{exp} es menor que G _{tabla} por tanto cumple test de igualdad de variancias.
G tabla	0.871	

Prueba de t de Student

T exp	2.146	T _{exp} es menor que T _{tabla} por tanto no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación y 100%.
T tabla	2.306	

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 67
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		01 Jun.20

Tabla N°33: EXACTITUD, PLACEBO CON ANALITO AL 100%

Porcentaje Teórico	Peso (mg)	Área	Analito Hallado (mg)	% de Recuperación	Promedio (%)	Variancia
100%	200.00	5098086	99.81	99.81	99.87	0.004
		5099120	99.87	99.87		
		5100154	99.94	99.94		
100%	200.00	5090428	99.70	99.70	99.65	0.014
		5088156	99.51	99.51		
		5091500	99.73	99.73		
100%	200.00	5109961	100.01	100.01	100.12	0.015
		5111074	100.11	100.11		
		5113067	100.25	100.25		
PROMEDIO				99.88		
RSD (%)				0.23		

Para la prueba de Homogeneidad de Variancias

G exp	0.440	G _{exp} es menor que G _{tabla} por tanto cumple test de igualdad de variancias.
G tabla	0.871	

Prueba de t de Student

T exp	0.912	T _{exp} es menor que T _{tabla} por tanto no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación y 100%.
T tabla	2.306	

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		Pág 68
		De 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		Nº
		FECHA
		01 Jun.20

Tabla N°34: EXACTITUD, PLACEBO + ANALITO AL 120%

Porcentaje Teórico	Peso (mg)	Área	Analito Hallado (mg)	% de Recuperación	Promedio (%)	Variancia
120%	240.00	6173766	119.63	99.69	99.84	0.018
		6175917	119.88	99.90		
		6177850	119.93	99.94		
120%	240.00	6186262	120.11	100.09	100.03	0.005
		6185225	120.05	100.04		
		6184108	119.95	99.96		
120%	240.00	6170934	119.77	99.81	100.10	0.096
		6186108	120.07	100.06		
		6062160	120.51	100.43		
PROMEDIO				99.99		
RSD (%)				0.21		

Para la prueba de Homogeneidad de Variancias

G exp	0.811	G _{exp} es menor que G _{tabla} por tanto cumple test de igualdad de variancias.
G tabla	0.871	

Prueba de t de Student

T exp	0.078	T _{exp} es menor que T _{tabla} por tanto no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación y 100%.
T tabla	2.306	

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 69	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

En las **TABLAS N° (32-34)**, Se observan los promedios de los porcentajes de recuperación, desviación estándar y las pruebas de Homogeneidad de variancias y t de student de las Muestras: placebo con analito al 80%, 100% y 120% respectivamente.

Para este parámetro se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio satisfactoria de 99.87% para el rango de 80% a 120%.

Se determinó la igualdad de variancias de varios grupos muestrales del mismo tamaño con la (test de Cochran) para G_{tablas} ($\alpha= 0.05$; $k= 3$; $n = 3$), donde k es el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo por lo tanto $G_{exp} 0.469 < G_{tablas} 0.871$ significa que las variancias de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Para el t de Student, se tiene se tiene un t_{tabla} de 2.306 para $\alpha = 0.05$ y un t_{exp} de 1.926 menor al t_{tabla} por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad del analito, es decir que el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 70	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	<i>01</i>	<i>Jun.20</i>

La Recuperación Media (R) para n = 9 medidas es:

% DE RECUPERACION	99.87 %
RSD	0.202 %

Para la prueba de Homogeneidad de Variancias

G exp	0.469	G _{exp} es menor que G _{tabla} por tanto cumple test de igualdad de variancias.
G tabla	0.871	

Prueba de t de Student

T exp	1.926	T _{exp} es menor que T _{tabla} por tanto no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación y 100%.
T tabla	2.306	

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	<i>Pág</i> 71	
	<i>De</i> 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	<i>Nº</i>	<i>FECHA</i>
	01	Jun.20

e. INTERVALO

Tabla N°35: Intervalo

ELEMENTOS	RANGO	RESULTADO
Exactitud	80-120%	99.87%
Precisión	80-120%	100.60%
Linealidad	80-120%	99.85%

Resultado:	80-120%	100.11%
-------------------	---------	---------

Fuente: Elaboracion propia

En la **Tabla N° 35**: Se observa los resultados de la Exactitud, Precisión y Linealidad satisfactorios por lo tanto el procedimiento se valida ya que se verifica que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables.

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD		<i>Pág</i> 71
		<i>De</i> 73
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		VERSIÓN
TÍTULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.		<i>Nº</i>
		<i>FECHA</i>
		01 Jun.20

7. Informe Técnico:

Tabla N°36: Resumen de Resultados

Producto: Maca 800 mg Tab	Tipo de Validación: Prospectiva	
PA: Bencilglucosinolato		
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
1. Selectividad		
Por adición de interferencias	El T _R del pico principal en el cromatograma de la muestra debe ser similar al T _R del estándar	Conforme
Lectura del placebo	No debe interferir	Conforme
2. Linealidad del Sistema		
Coeficiente de Correlación	Mayor o igual que 0.999	1.001
Coeficiente de Determinación	Mayor o igual que 0.998	1.002
Coeficiente de Variación	Menor a 5.0 %	1.363
Valor t experimental para un valor p de 0.05; n : 15	T _{exp.} > T _{tabla} (2.160)	6.620
3. Linealidad del Método		
Coeficiente de Correlación	Mayor o igual que 0.999	1.000
Coeficiente de Determinación	Mayor o igual que 0.998	0.999
Coeficiente de Variación	Menor a 5.0 %	1.363
Valor t experimental para un valor p de 0.05; n : 15	T _{exp.} > T _{tabla} (2.160)	6.626

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CONTROL DE CALIDAD	Pág 73	
	De 73	
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	VERSIÓN	
TITULO: Validación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp por HPLC.	Nº	FECHA
	01	Jun.20

4. Precisión		
Repetibilidad del método	CV o RSD \leq 2.0	0.21
Repetibilidad del sistema	CV o RSD \leq 2.0	0.47
5. Precisión Intermedia		
Coeficiente de Variación o desviación estándar	Maximo 6.0%	1.42%
6. Exactitud		
El % de recuperación promedio	98 – 102 %	99.87
Test de recuperación promedio y el 100% y n-1 Grados de Libertad	$T_{exp} < T_{tabla}$ (2.306)	1.926
Test de igualdad de variancias de varios grupos muestrales del mismo tamaño	$G_{exp} < G_{tab}$ (0.871)	0.469
7. Intervalo		
Precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo,al igual que dentro del intervalo	80% - 120%	100.11%

Fuente de las especificaciones: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Validación de Métodos Analíticos, Madrid: Gráficas Gispert S.A., 2001y States Pharmacopeial Conv. Inc., United States Pharmacopeia 35 NF 30, Monografías Oficiales, 2012. Tabla:

Elaboración propia

ELABORADO POR	APROBADO POR	AUTORIZADO POR

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIONES:

➤ **SELECTIVIDAD**

La técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp por HPLC, permite obtener picos cromatográficos con buena resolución tanto para el estándar de referencia, como para la muestra. El análisis cromatográfico del placebo de las tabletas nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, como tampoco se ha detectado presencia de productos de degradación al realizar los análisis al principio activo sometido a diferentes procedimientos de degradación forzada.

Por lo tanto la técnica analítica propuesta es selectiva para el fin propuesto.

➤ **LINEALIDAD**

Se tiene para la linealidad del sistema un coeficiente de correlación lineal de 1.001 para el rango de 80% a 120% siendo el valor mínimo 0.999 y coeficiente de determinación de 1.002 siendo el valor mínimo de 0.998 por lo tanto se tiene una relación lineal entre la concentración del analito y el área obtenida.

Además se obtiene como coeficiente de variación de los factores de respuesta 1.363% este debe ser menor al 5% por lo tanto se tiene una sensibilidad de calibrado de las concentraciones analizadas y el valor t_{exp} 6.620 para un valor de $\alpha = 0,05$ debe ser mayor que el t_{tabla} 2.160 para (n-2) grados de libertad para un nivel de significación del 95%.

Para la linealidad del método se tiene un coeficiente de correlación lineal de 1.000 para el rango de 80% a 120% siendo el valor mínimo 0.999 y coeficiente de determinación de 0.999 siendo el valor mínimo de 0.998 por lo tanto se tiene una relación lineal entre la concentración del analito y el área obtenida.

Además se obtiene como coeficiente de variación de los factores de respuesta 1.363% este debe ser menor al 5% por lo tanto se tiene una sensibilidad de calibrado de las concentraciones analizadas y el valor t_{exp} 6.626. para un valor de $\alpha=0,05$; debe ser mayor que el t_{tabla} 2.160 para (n-2) grados de libertad para un nivel de significación del 95%.

➤ **PRECISIÓN**

Los valores de Desviación Estándar Relativa (RSD) obtenidos tanto para la repetibilidad y la precisión intermedia se encuentran por debajo del valor máximo permitido para la repetibilidad del sistema 0.47%, y repetibilidad del método 0.21% el valor máximo de 2.0% y la precisión intermedia 1.42% el valor máximo de 6.0%; lo cual demuestra la precisión de la técnica analítica.

➤ **EXACTITUD**

Para este parámetro se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio satisfactoria 99.87% para el rango de 80% a 120%.

Se determino la igualdad de variancias de varios grupos muestrales del mismo tamaño con la (test de Cochran) para G_{tablas} ($\alpha= 0.05$; $k= 3$; $n = 3$), donde k es el número de grupos y n el numero de determinaciones por grupo por lo tanto G_{exp} $0.469 < G_{tablas}$ 0.871 significa que las variancias de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Para el t de Student, se tiene se tiene un t_{tabla} de 2.306 para $\alpha = 0.05$ y un t_{exp} de 1.926 menor al t_{tabla} por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad del analito, es decir que el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%.

➤ **INTERVALO**

El intervalo del procedimiento se valida ya que se verifica que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables.

4.2 CONCLUSIONES:

- La técnica analítica desarrollada y validada de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp por HPLC, produce resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro del intervalo de 80% a 120%, de esta manera se concluye que la técnica analítica es optima para este análisis cuantitativo.
- El método es selectivo, porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes presentes en la tableta.
- El método es lineal, porque los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.
- El método es preciso, porque nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles, cuando este es aplicado en análisis repetitivos de la misma muestra.
- El método es exacto, ya que permite la recuperación de la totalidad de analito presente en la muestra.
- El método de análisis propuesto cumple con los parámetros establecidos para una validación demostrando que es posible la cuantificación del Bencilglucosinolato por HPLC.
- El método analítico validado es rápido y sencillo, y el costo de realización del mismo no es elevado, con lo que se reconoce que la validación es una herramienta de mejoramiento continuo en la industria farmacéutica.

4.3 RECOMENDACIONES:

- El desarrollo de productos nuevos en nuestros laboratorios obligan al desarrollo de sus técnicas analíticas. Estas deben de ser validadas dentro de su programa de validación ya que serán utilizadas posteriormente para el análisis dentro del ensayo de estabilidad acelerada para estos productos por lo cual se requiere de una técnica confiable.
- El área de control de calidad de los diferentes laboratorios deben de considerar un programa de validación para sus métodos analíticos tanto para los nuevos como los que se vienen usando rutinariamente aplicando el tipo de validación que corresponda.
- Con respecto a la documentación, se recomienda el uso de un formato único, el cual contemple de forma detallada el desarrollo de la validación, como lo establecen las normas de buenas prácticas de laboratorio, desde el establecimiento de objetivos, hasta la elaboración del informe técnico, el mismo que presente en forma concisa los resultados.
- Los laboratorios farmacéuticos deberán contar con personal calificado y los recursos necesarios (columnas adecuadas, reactivos, material de vidrio, equipos, etc) para realizar la validación de técnicas analíticas, con lo cual se garantiza la fiabilidad de los resultados.
- Se recomienda la aplicación de la técnica analítica de cuantificación de Bencilglucosinolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp, por HPLC, por ser este rápido, sencillo y de bajo costo.

4.4 BIBLIOGRAFÍA:

1. Orosco Ch. Anteproyecto Residencia Profesional. “Validación de dos métodos analíticos para la cuantificación de Metformina en tabletas”. Instituto Tecnológico de Durango. Durango 2011.
2. Aguilar G, Alcántara A, Chárvel A, García JL, Garzón A, Guerrero ME, et al. Validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. México AC, 1992.
3. United States Pharmacopeial Conv. Inc., United States Pharmacopeia 35 NF 30, Monografías Oficiales, 2012.
4. Rampazoo P. Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry. II *Farmaco* 1990; 45:807-15.
5. Ministerio de Salud - DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Editorial Servigraf América S.R.L. Lima; 1999.
6. Valdez AN, Cuadros QE. Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 1999.
7. Skoog D, Leary LJ. Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid, Mc Graw- Hill Interamericana España S.A, 1994.
8. Azaña y Cornelio. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargoverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2007.
9. Obregón Vilchez, Lida. “Maca” Planta Medicinal y Nutritiva del Perú. Edit. Instituto de Fitoterapia Americana. 1997
10. Yllescas Gutierrez, Maria. Estudio Fotoquímico y comparativo de tres ecotipos de *lepidium meyenii* walp “Maca”, procedente de carhuamayo (Junín). Catedra de bromatología. Facultad de farmacia y bioquímica. Universidad nacional mayor de san marcos. Lima 1994. (pag.103)
11. Ciega de León, Pedro. La crónica del Perú. Ediciones PEISA. Lima-Perú. 1973.

12. Rutsworoski de Diez Canseco, María. Historia del Tahuantinsuyo. 1992. (pag.332)
13. Beltrán S. Hamilton; Baldón M. Severo; Carrillo F. Elida; Fuertes R. Cesar; Arroyo A. Jorge; Sndoval M. Soledad; Obregón V. Lida, Estudio Botánico y Químico de los ecotipos amarillo y morado de *Lepidium peruvianum* Maca. Evaluación de su toxicidad aguda. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1997.
14. Weddell, H. A. Plantas Ineditas de los Andes *Lepidium gelidium* wedd. Ann. Sci. Nat. 1984.
15. Ganzera M, Zhao J; Mamad I, Khan IA. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyeii* (maca) by resersed phase high performance liquid chromatography. Chem. Pharm. 50(7) 988 -911 (2002).
16. Muhammad I, Zhao J, Chuck D, Khan I. Constituents of *Lepidium meyenii* (maca). Phytochemistry 59 (2002) 105-110.
17. Muhammad I., Zhao J., Chuck D., Khan I. (2001). Constituents of *Lepidium meyenii* “maca”, National center for natural products research, research institute of pharmaceutical sciences, school of pharmacy, University of Mississippi.).
18. Brako, Lois; Zaruchi, James: Catálogo de Angiospermas y gimnospermas del Perú. Editorial Missouri Botanical Garden. 1994. Vol.45 (pag.1286)
19. Chacon de Popovic, Gloria. Analisis Cualitativo de los 33 elementos de la Maca (*Lepidium peruvianum*) y otros alimentos andinos del Perú. Segundo curso Nacional de Maca. Huancayo del 3-5 de diciembre de 1988
20. Chacon Roldan, Gloria. Estudio Fitoquimico del *Lepidium peruvianum meyenii* walp. Tesis de bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de ciencias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 1971 (pag 46).
21. Instituto Nacional de Nutrición 1993. Composición Química de los Alimentos Consumidos en el Perú. Ministerio de Salud.
22. Tellez M.R., Khan I., Kobaisy M., Schrader K., Dayan F., Osbrink W. (2001). Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (maca).
23. Aliaga C. Rolando. La Maca (*Lepidium* sp) recurso genético del Perú, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos “Oscar Blanco Galdós” del 22-25 de Abril de 1997.

24. Hickey E. Cordova Herrera. Ecología, Uso y Conservación de la Maca en los Andes Centrales (Junin y Pasco). Escuela de Post-Grado. Universidad Agraria La Molina. 1993. (pag.111).
25. Salas C. A. Vigor Inducing Effect of Maca (*Lepidium meyenii* Walp), and Andean Hipocotil in Mice. Universidad Peruana Cayetano Heredia (U.P.C.H). Perú. 1988.
26. Chacón G. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 1961.
27. Chacón, G. La Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov) y su habitat. Rev. Per. Biol., 1990. 3(2) 169 – 272.
28. Aliaga, R. Biología Floral de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp). Tesis Departamento de Horticultura. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria, Lima, 1995.
29. Lock, O y Rojas, R. Química y Farmacología de *Lepidium meyenii* Walp (“Maca”). Rev. de Química, Dep. de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2002; 17(1): 25 – 32.
30. King, S. R. Economic Botany of the Andean tuber Crop complex : *Lepidium meyenii*, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum tuberosum*, and *Ullucus Tuberosus*. Thesis for Doctor of Philosophy. NY. 1988.
31. Obregón, L. Maca, planta medicinal y nutritiva. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, 1998.
32. Yllesca, M. Estudio químico y fotoquímico comparativo de 3 ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp “Maca” procedente de Carhuamayo (Junín). Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 1994.
33. Sigrid, A; Finley, J. Cruciferous Vegetables: Cancer Protective Mechanisms of Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium. Integrative Cancer Therapies, 2004; 3(1) : 5-12
34. Genyi, L., Ammermam, U. y Quiroz, C. Glucosinolate contents in Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, nature plants and several derived products. Economic Botany, 2001; 55(2) : 225 – 262.

35. Valentová, K y Ulrichova, J., *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* Walp, prospective andean crops for the prevention of chronic diseases, 2003; 147 (2): 119 – 130.
36. Johns, T. Ethnobotany and phytochemistry of *Tropaeolum tuberosum* and *Lepidium meyenii* Walp from Andean South America. Faculty of graduate Studies University of British Columbia, dpt. of Botany, 1980.
37. Kjaer, A. Glucosinolates in *Lepidium bonaeriense* L. *Phytochemistry*, 1974, 7: 1663 – 1668.
38. Kjaer, A. The Natural Distribution of Glucosinolates : A Uniform group of Sulphur - Containing Glucosides Nobel 25, 1973. *Chemistry in Botanical Classification*, 1973: 229 – 234.
39. Frydoonfar, H; McGrat, D; Spigelman, A. Sulforaphane inhibits growth of a colon cancer cell line, *Colorectal Disease*, 2004; 6 : 28.
40. Xenophon, H., Macleod, J., y Moreau, M. Glucosinolates of Nine Cruciferae and two Capparaceae Species. *Phytochemistry*, 1981; 20 (10) : 2355 – 2358.
41. Lockwood, G. y Belkhiri, A. Glucosinolate Spectrum of some Algerian Cruciferae. *Pl. Syst. Evol.*,1991; 176 : 11 – 20.
42. Ashok, Ch.; Liu, B.; Mittelman, T. Abrogation of estrogen-mediated cellular and biochemical effects by indole-3-carbinol. *Nutr. Cancer*, 2001; 41: 180-7.
43. Grushka E, Grinberg N. *Advances in Chromatography*, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
44. Dong MW. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, New Jersey: Jhon Wiley & Sons Inc, 2006.
45. Kazakevich Y, LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientist*, New jersey: Jhon Wiley & Sons Inc, 2007.
46. Heftmann E. (ed.) *Chromatography 6th edition*, Vol 69A, San Diego: Elsevier, 2004.
47. Katz E. (ed.) et al. *Handbook of HPLC – Cromatographic Science Series*, v. 78, New York: Marcel Dekker Inc, 1998.
48. Lough WJ, Wainer IW. *High Performance Liquid Chromatography – Fundamental principles and practice*, New York: Chapman & Hall, 1996.
49. Cazes J. (ed.), *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook 3th edition*, New York: Marcel Dekker Inc., 2005.

50. FDA U.S. Food and Drug Administration [en línea]. Guideline on General Principles of Process Validation.
<<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124720.htm>> [Consulta: 24 Noviembre 2012].
51. Carleton F, Agalloco J. (ed.); Validation of pharmaceutical processes: Sterile products 2nd edition, New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.
52. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [en línea]. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1).
<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>> [Consulta: 14 noviembre 2012].
53. Huber L. Validation and Qualification in Analytical laboratories 2nd edition, New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.
54. Arias Ortiz A. Validación. Ponencia presentada en la Universidad de Valparaíso con auspicio de Laboratorio Bagó de Chile. Valparaíso, 2008.
55. Swadesh JK. HPLC Practical and Industrial Applications 2nd edition, Florida: CRC Press, 2001.
56. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Validación de Métodos Analíticos, Madrid: Gráficas Gispert S.A., 2001.
57. Calpena A. et al. Validación de métodos analíticos, Farmacia Clínica Vol.7 n° 9, Barcelona, 1990.
58. Gonzales Carla. Monografía: MACA *Lepidium meyenii Walp.* Perúbiodiverso. Lima Perúbiodiverso 2010.

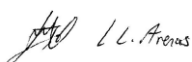

ANEXOS

ANEXO 1: CERTIFICADO DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA DE MACA


	CONTROL DE MATERIAS PRIMAS Y MATERIAL DE EMPAQUE F/CMP-ME-011	Página: 1 de 1 Revisión: 03 Edición: 03 Vigente desde: 2012-06-01 Vigente hasta: 2014-06-01
CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE ESTÁNDARES SECUNDARIOS		
Elaborado por: Ornella Díaz Cargo: Analista CMP-ME Fecha: 2012-05-30 Firma: 	Revisado por: Erika Talavera Cargo: Jefe de CC Fecha: 2012-05-31 Firma: 	Aprobado por: Lilian Sánchez Cargo: DT Fecha: 2012-06-01 Firma: 

NOMBRE: Maca Nº ANALISIS: 13060801 Nº LOTE: MACPW029080212	FECHA DE EXPIRACIÓN: 2015-02-08 FECHA DE ANALISIS: 2013-06-08
---	--

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Polvo de color beige uniforme	Conforme
IDENTIFICACIÓN	HPLC: Espectro de la M es similar a la del St	Conforme
SOLUBILIDAD	Insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol y cloroformo	Conforme
AGUA/ HUMEDAD/ PÉRDIDA POR SECADO	Humedad: Máximo 5%	3.81%
pH	Entre 5 - 7	5.977
METALES PESADOS	-----	-----
RESIDUO DE INCINERACIÓN	-----	-----
DOSAJE	0.64% - 0.96% Bencilglucosinolato	0.83% Bencilglucosinolato
OTROS	-----	-----
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	Conservar en envases impermeables	
NORMA TECNICA: Propia		
PATRON DE REFERENCIA: Glucotropaeolin		

VºBª RESPONSABLE DE MATERIA PRIMA	VºBª JEFE DE CONTROL DE CALIDAD
	

**ANEXO 2: REPORTE DE ANÁLISIS DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA
DE MACA**

 <p>Naturgen Laboratorios Naturales y Genéricos S.A.C.</p>	CONTROL DE MATERIAS PRIMAS Y MATERIAL DE EMPAQUE F/CMP-ME-011	Página: 1 de 1 Revisión: 03 Edición: 03 Vigente desde: 2012-06-01 Vigente hasta: 2014-06-01
	REPORTE DE ANÁLISIS DE ESTÁNDARES SECUNDARIOS	
Elaborado por: Ornella Díaz Cargo: Analista CMP-ME Fecha: 2012-05-30 Firma: <i>[Firma]</i>	Revisado por: Erika Talavera Cargo: Jefe de CC Fecha: 2012-05-31 Firma: <i>[Firma]</i>	Aprobado por: Lilian Sánchez Cargo: DT Fecha: 2012-06-01 Firma: <i>[Firma]</i>
Condiciones de Almacenamiento: Conservar en envases impermeables Analista: B. Aparicio Fecha de Análisis : 2013-06-08 Producto: Maca Fecha de Reanálisis: 2014-06-08 Lote: MACPW029080212 Fecha de Expiración: 2015-02-08 Nº de Análisis: 12022310 Metodología: Propia		
1. Descripción: Polvo de color Beige uniforme 2. Identificación: HPLC (X) UV/VIS () RX QUIMICA () CCF () IR () 3. Solubilidad: Insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol y cloroformo 4. Agua () / Humedad (X) / Pérdida por Secado () Especificación: Máximo 5% Resultado: 3.81% Datos de Equipos:		
Nombre	Código	
Balanza Analítica	BAL-002	
5. pH: Especificación: Entre 5 - 7 Resultado: 5.977 6. Metales Pesados: Especificación: ---- Resultado: ---- 7. Residuo de Incineración: Especificación: ---- Resultado: ---- 8. Contenido: Especificación: T/C : 0.645 - 0.96 % HPLC N°: (3) Bencilglucosinolato N° de Columna: (75) B/S: ---- N° de Serie: (229705) Estándar: Maca (Glucotropaeolin) Código: PSTD-18 Lote: 5843 Potencia: 100.00% Peso de Muestra 1: 200.02 mg Peso del Estándar 1: 20.05 mg Peso de Muestra 2: 200.02 mg Peso del Estándar 2: 20.05 mg Peso de Muestra 3: 200.02 mg Fórmula: $\frac{AM}{Ast} \times \frac{WSt}{100} \times \frac{2}{50} \times \frac{Pot\ St}{100} \times \frac{100}{WM} \times 100$ FSTD 1: 0.01620324 FSTD 2: 0.01620324 FMP 1: 49.9950005 FMP 2: 49.9950005 FMP 3: 49.9950005 % RSD: 1.007% Resultado T/C % = 0.83% Bencilglucosinolato B/S % = ----		
9. Compuestos Relacionados: ----- 10. Otros: -----		
Analizado por: B. Aparicio	Revisado por:	<i>[Firma]</i> L. Arenas

ANEXO 3: EQUIPOS, MATERIALES y REACTIVOS

Fig N° 1: Centrifuga



Fig N° 2: Balanza Analítica



Fig N° 3: Ultrasonido



Fig N° 4: Estufa



Fig N° 5: HPLC Acoplado con Detector de Diodos (DAD)



Fig N° 6: HPLC con Detector (UV)



Fig N° 7: Estándar de Referencia
Maca

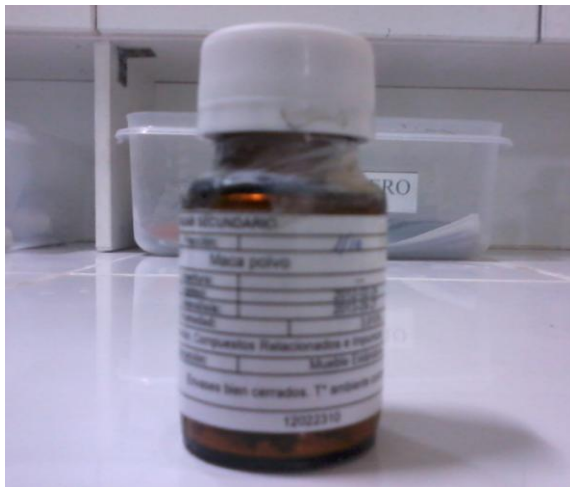


Fig N° 8: Reactivos: Metanol
y Acetonitrilo



Fig N° 9: Columna
Cromatográfica



Fig N° 10: Jeringa, Filtrador y Membranas
Filtrantes para HPLC



Fig N° 11: Mortero, Pilón y Muestra



ANEXO 4: PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Fig N° 1: Pesando las Muestras



Fig N° 2: Muestras Sometidas al Ultrasonido Conteniendo 70 mL de Solución Diluyente



Fig N° 3: Luego de la Sonicación se Procede al Enrasado con Solución Diluyente

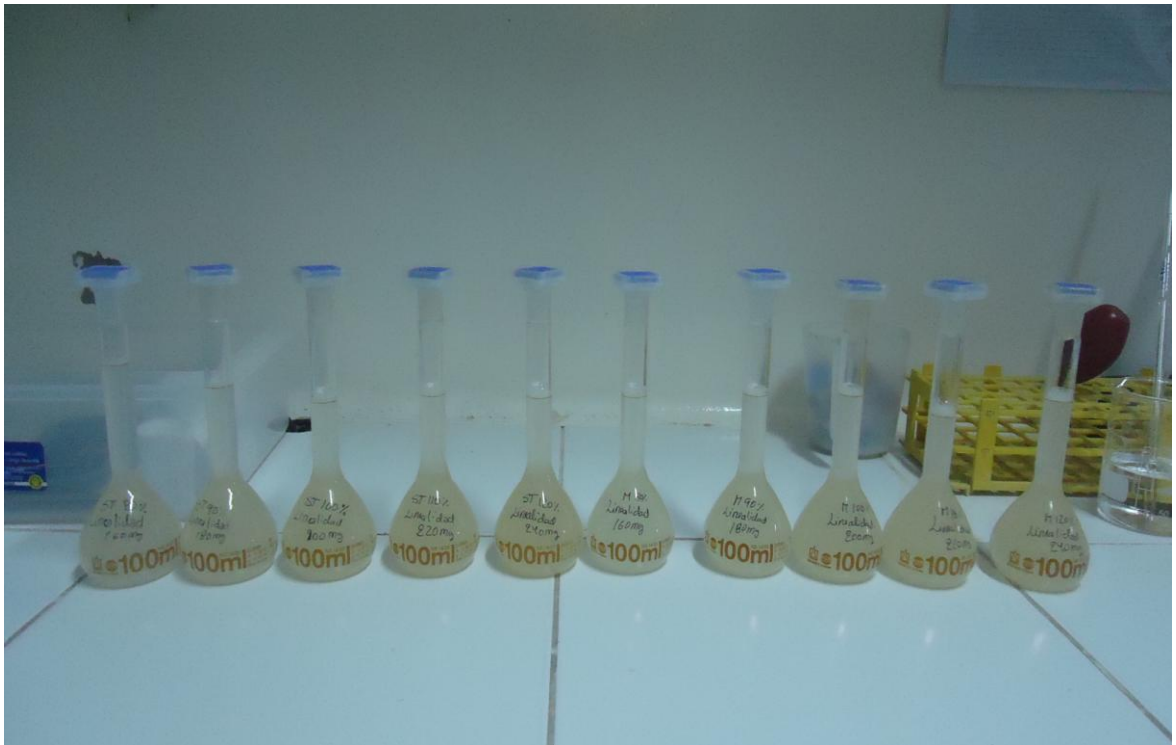


Fig N° 4: Luego del Enrasado se Depositan a Tubos de Centrifuga y se les Realiza la Centrifugación a 50 r.p.m. por 5 minutos



Fig N° 5: Terminada la Centrifugación, se Procede a Filtrarlas a través de Filtro Jeringa y se Colocan en Viales para sus Respectivas Inyecciones en el Sistema HPLC.



Fig N° 6: Muestras Filtradas en Viales para HPLC



ANEXO 5: ENSAYOS DE LA SELECTIVIDAD

**Fig N° 1: Placebo, Analito
y Placebo con Analito**



**Fig N° 2: Muestras Sometidas a la
Radiación Ultravioleta**



**Fig N° 3: Muestras Sometidas a Humedad
Relativa en la Cabina de Estabilidad
a Tiempo Acelerado**



**Fig N° 4: Muestras Sometidas
a Temperatura de 70°C**



**ANEXO 6: CROMATOGRAMA CARACTERÍSTICO DEL BENCILGLUCOSINOLATO
OBSERVADO CON EL DETECTOR UV**



ANEXO 7: ESPECTROS OBSERVADOS POR EL DETECTOR DE DIODOS
(DAD)

Gráfico N°1: Espectro Tridimensional del Estándar de Referencia de Maca Observado por el Detector de Arreglo de Diodos (DAD)

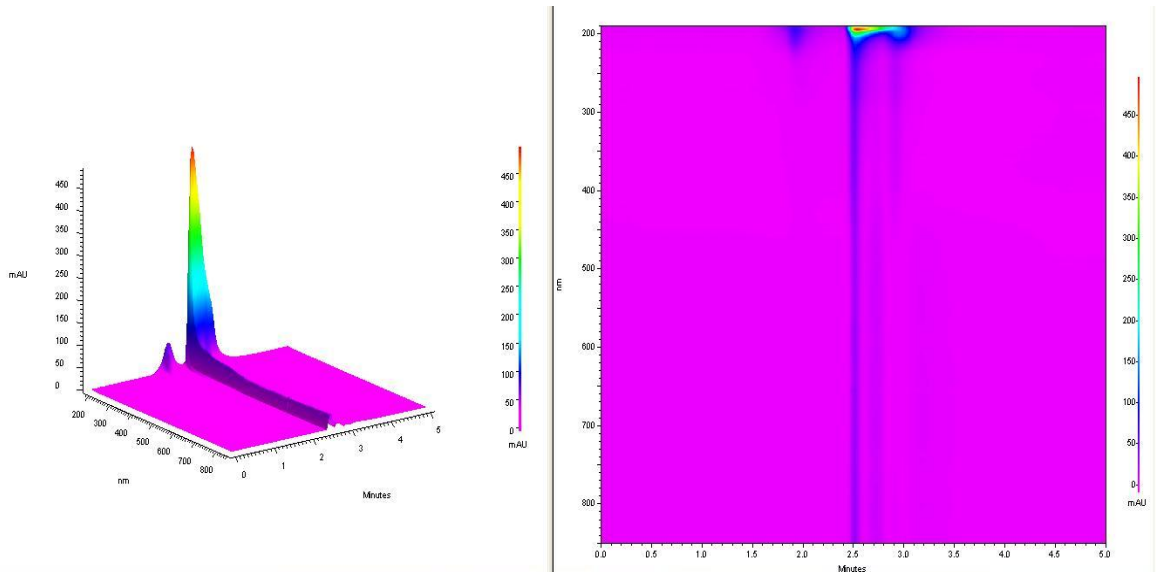
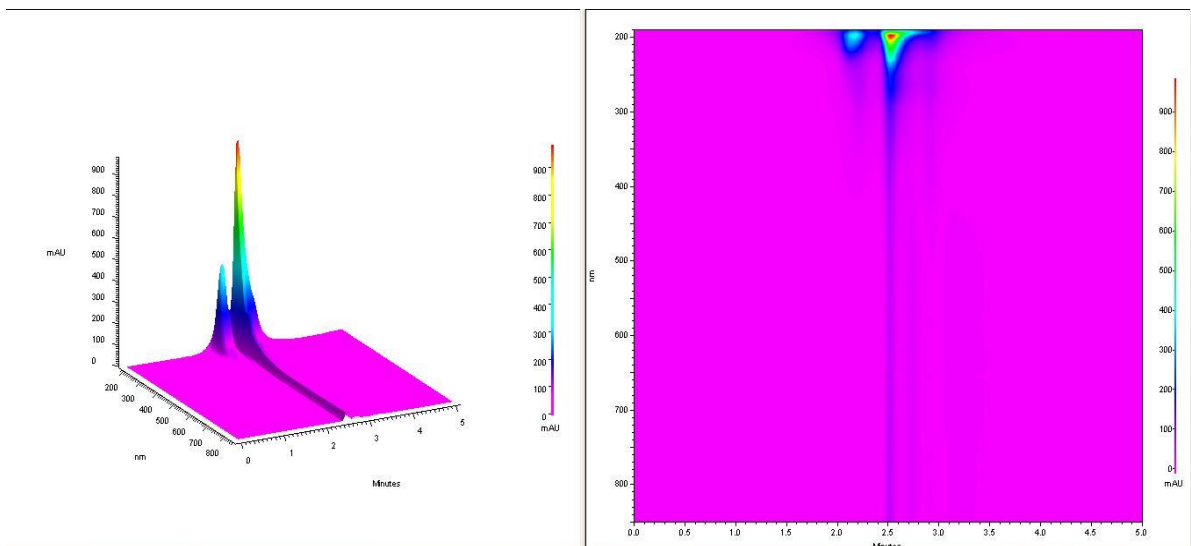


Gráfico N°2: Espectro Tridimensional de la Muestra de Maca Observado por el Detector de Arreglo de Diodos (DAD)



ANEXO 8: CROMATOGRAMAS DE LA SELECTIVIDAD

Por adición de las interferencias

Gráfico N° 1: Cromatograma del Estándar de Maca

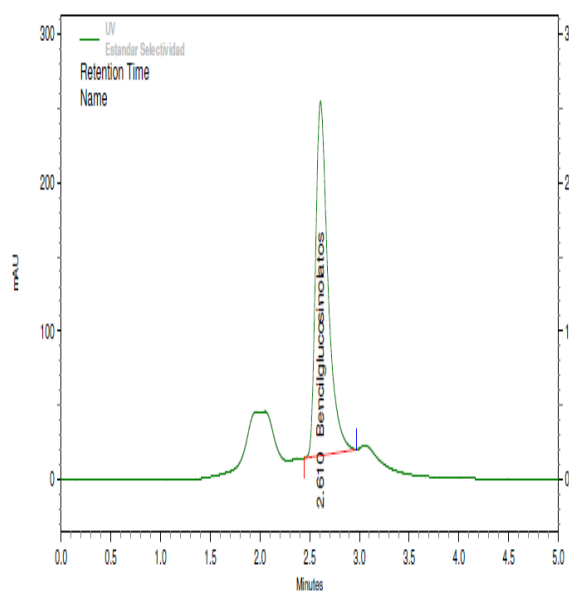


Gráfico N° 2: Cromatograma del Placebo

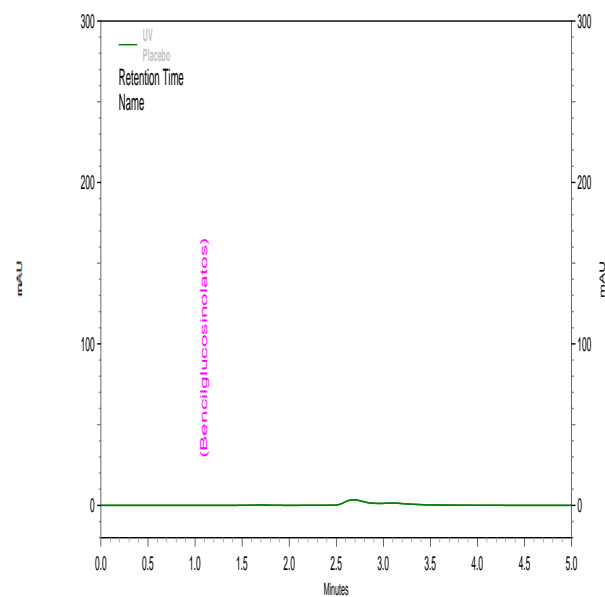


Gráfico N° 3: Cromatograma del Analito

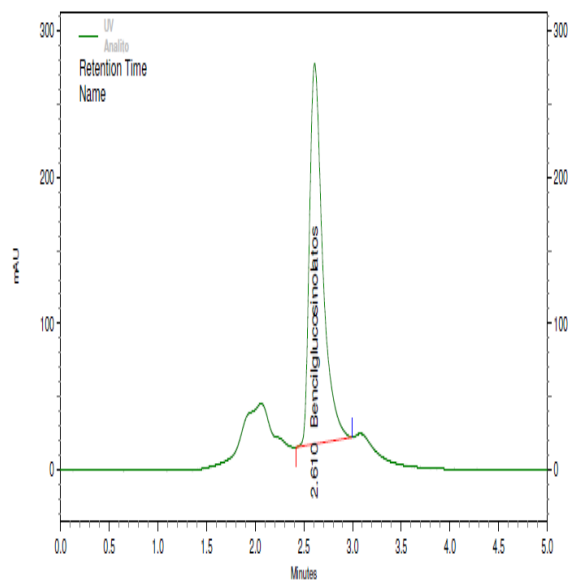
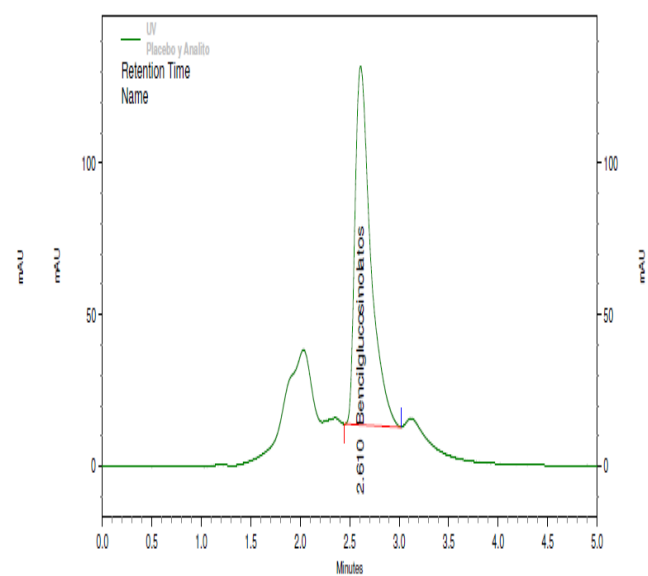


Gráfico N° 4: Cromatograma del Placebo con Analito



Selectividad: Productos de Degradación

Gráfico N° 5: Cromatograma del Estándar De Referencia de Maca Sometida a Condiciones Normales

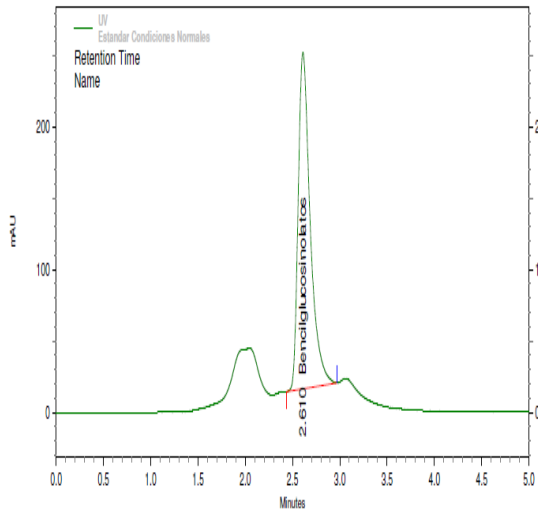


Gráfico N° 6: Cromatograma del Estándar de Referencia de Maca a Temperatura de 70 °C x 2 Hrs

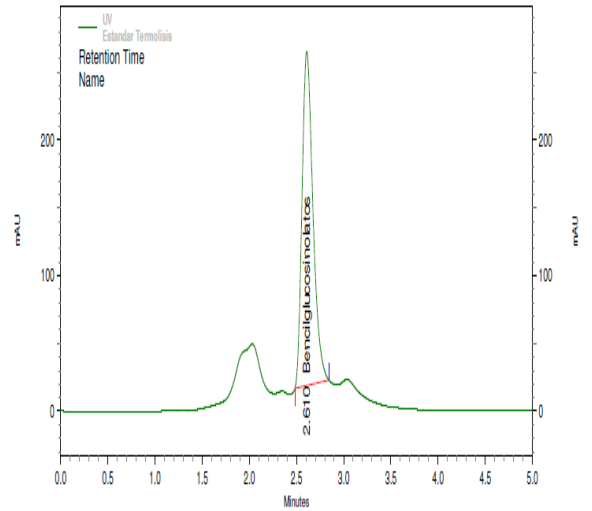


Gráfico N° 7: Cromatograma del Estándar de Referencia de Maca Sometida a la Exposición de la luz UV

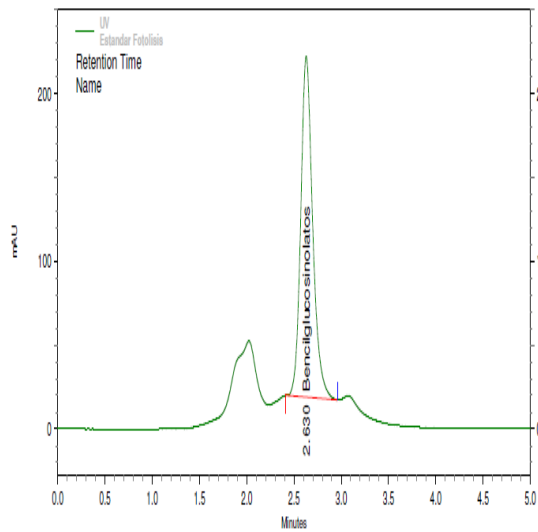
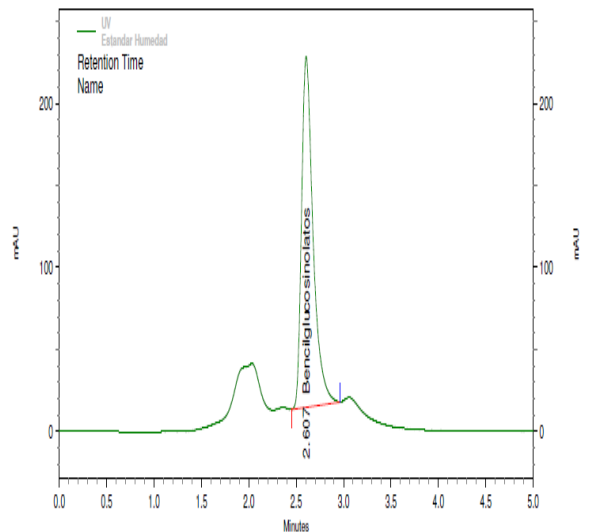
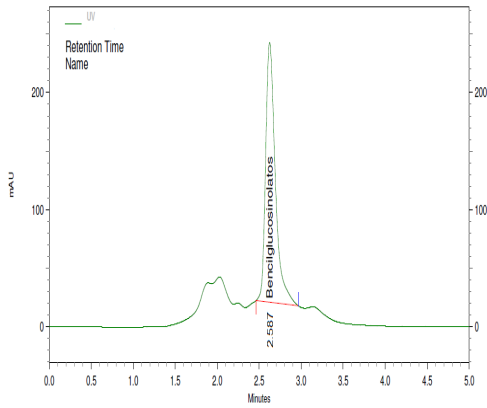


Gráfico N° 8: Cromatograma del Estándar de Referencia de Maca Sometida a 85% de Humedad por 2 Hrs

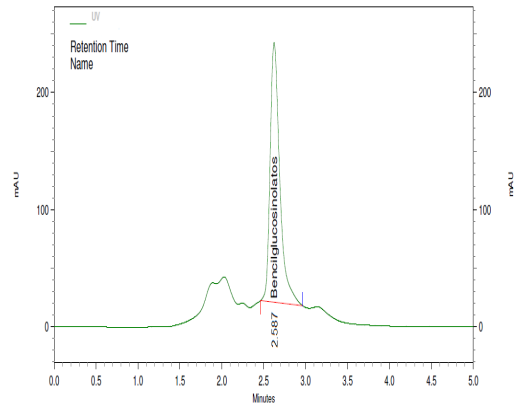


ANEXO 9: CROMATOGRAMAS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

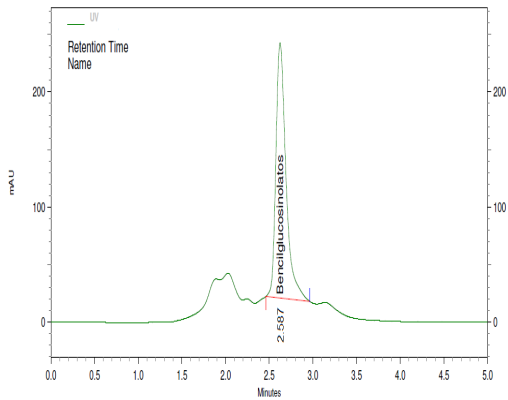
**Gráfico N° 1: Cromatograma
del Estándar al 80%**



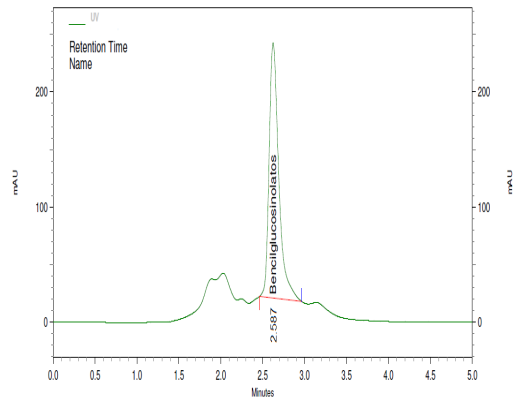
**Gráfico N° 2: Cromatograma
del Estándar al 90%**



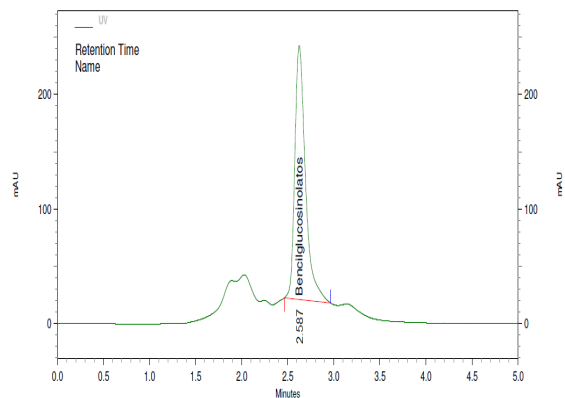
**Gráfico N° 3: Cromatograma
del Estándar al 100%**



**Gráfico N° 4: Cromatograma
del Estándar al 110%**

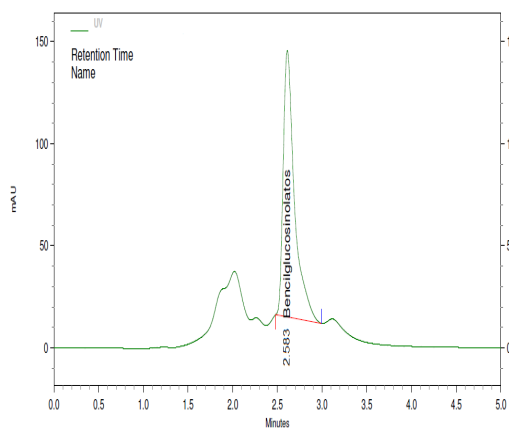


**Gráfico N° 5: Cromatograma
del Estándar al 120%**

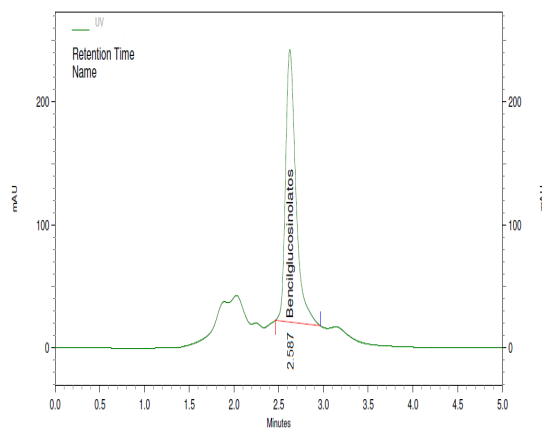


ANEXO 10: CROMATOGRAMAS DE LA LINEALIDAD DEL METODO

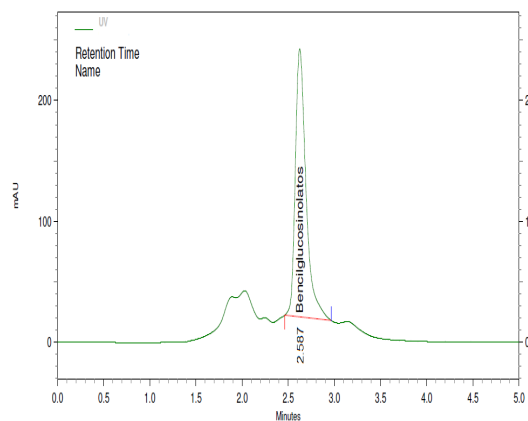
**Gráfico N° 1: Cromatograma
de la Muestra al 80%**



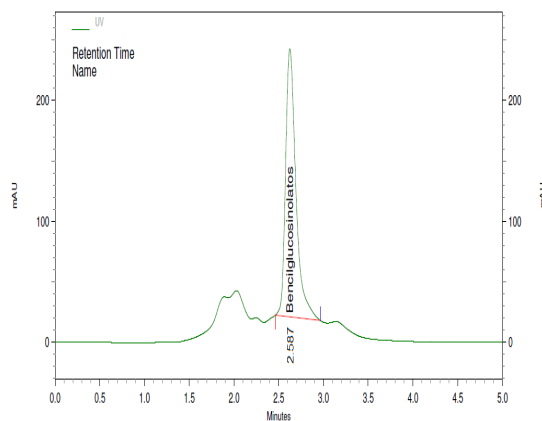
**Gráfico N° 2: Cromatograma
de la Muestra al 90%**



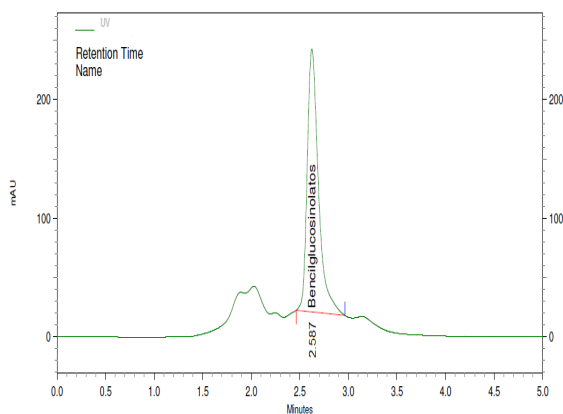
**Gráfico N° 3: Cromatograma
de la Muestra al 100%**



**Gráfico N° 4: Cromatograma
de la Muestra al 110%**



**Gráfico N° 5: Cromatograma
de la Muestra al 120%**



ANEXO 11: CROMATOGRAMAS DE LA PRECISIÓN

Gráfico N° 1: Cromatograma de la Repetibilidad del Sistema

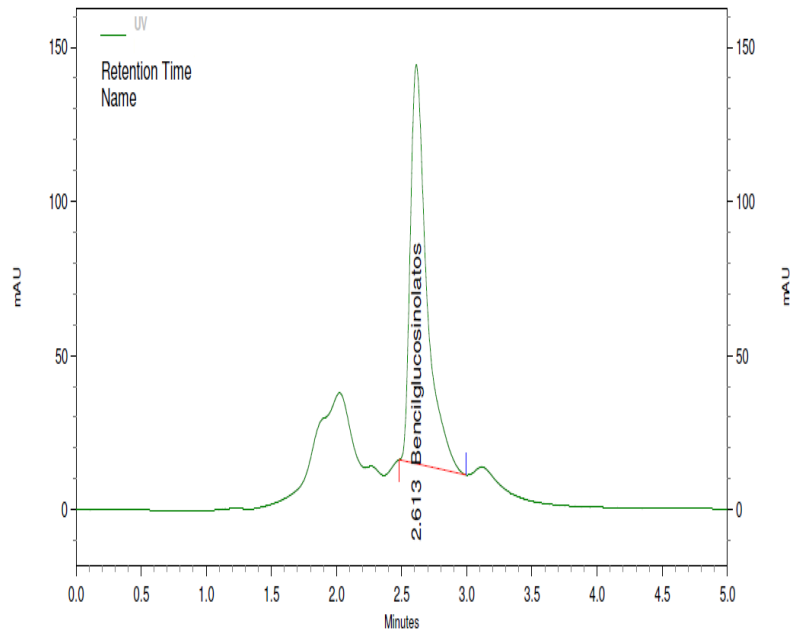


Gráfico N° 2: Cromatograma de la Repetibilidad del Método

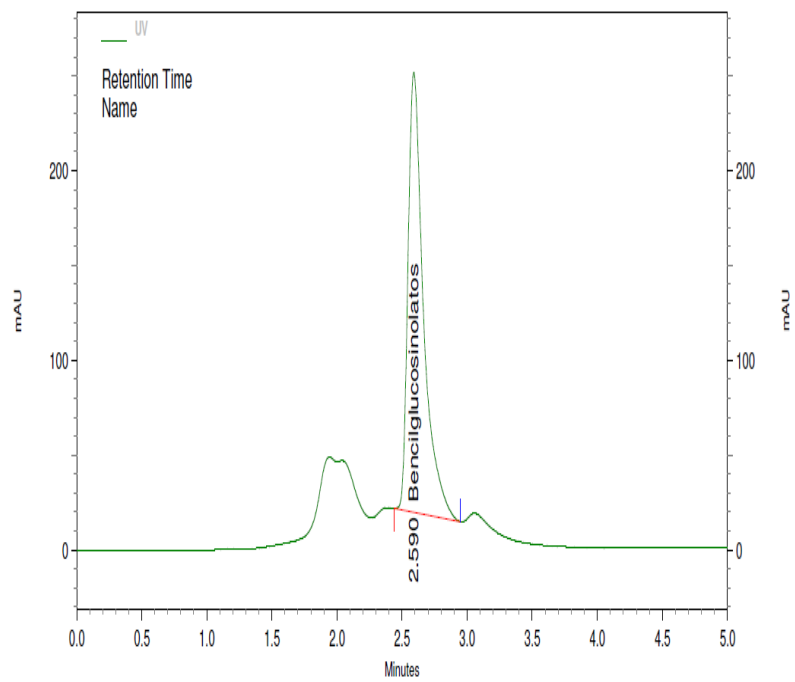


Gráfico N° 3: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (1) Dia 1

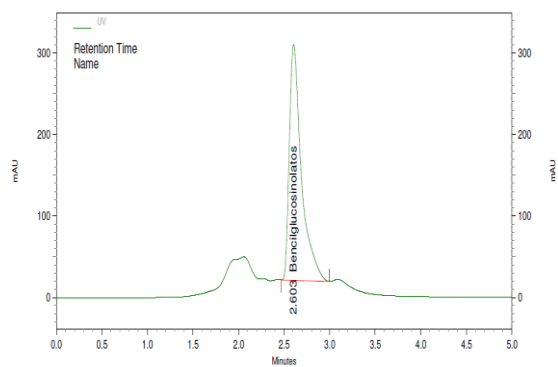


Gráfico N° 4: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (1) Dia 2

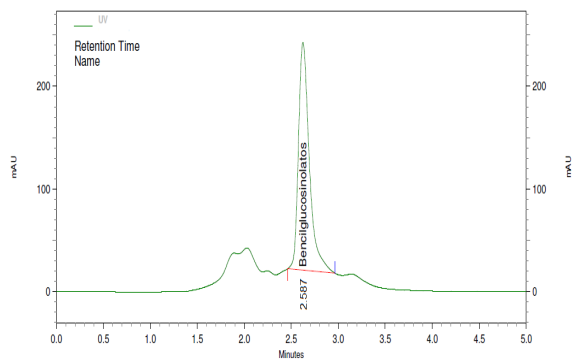


Gráfico N° 5: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (1) Dia 3

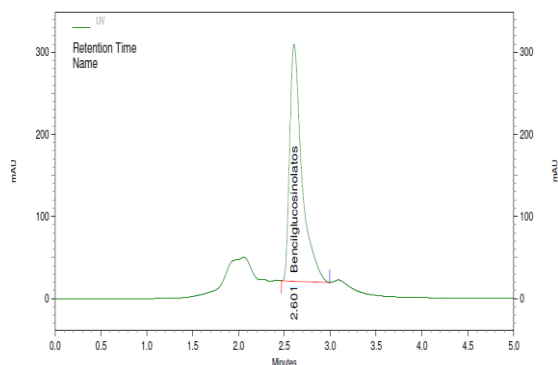


Gráfico N° 6: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (1) Dia 1

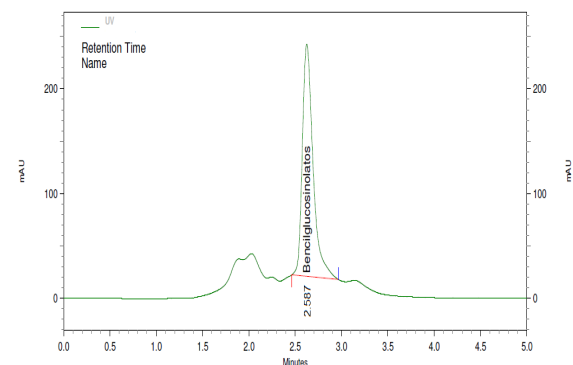


Gráfico N° 7: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (1) Dia 2

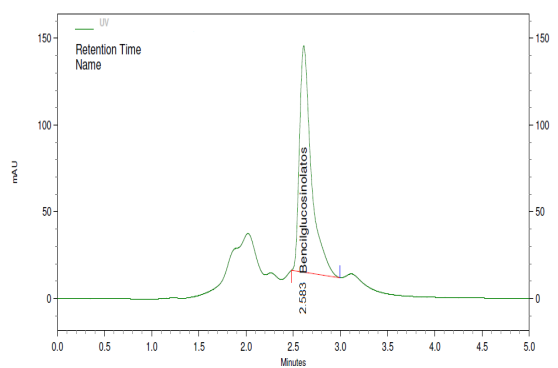


Gráfico N° 8: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (1) Dia 2

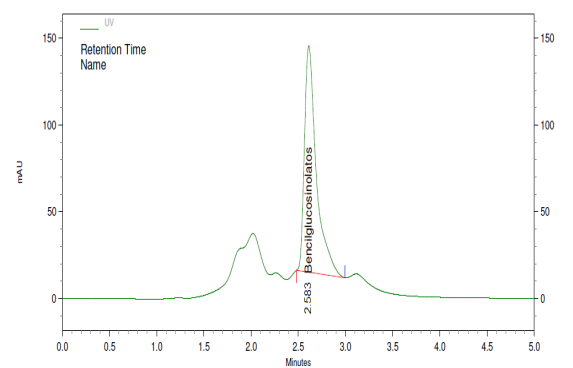


Gráfico N° 9: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (2) Dia 1

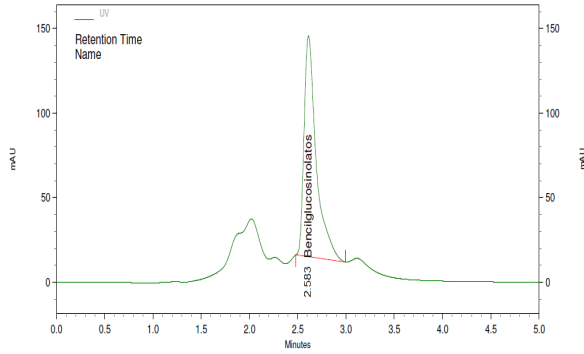


Gráfico N° 10: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (2) Dia 2

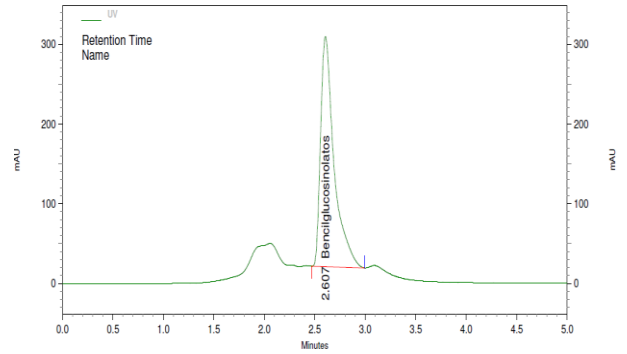


Gráfico N° 11: Precisión intermedia de valoración instrumento (1), tiempo y analista (2) Dia 3

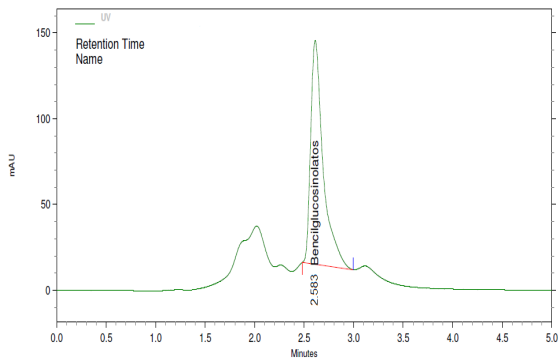


Gráfico N° 12: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (2) Dia 1

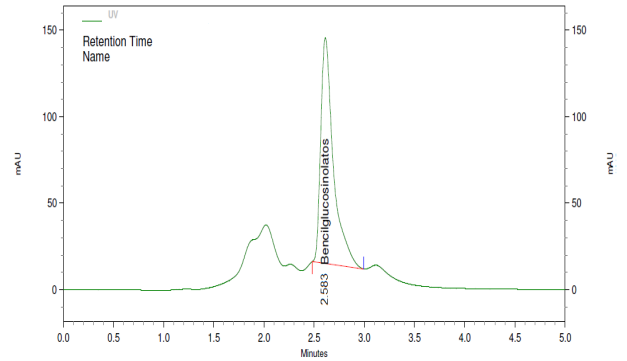


Gráfico N° 13: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (2) Dia 2

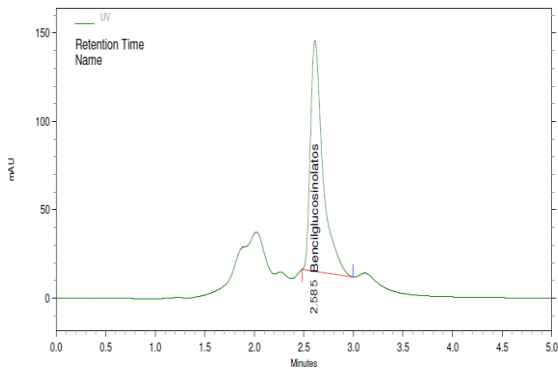
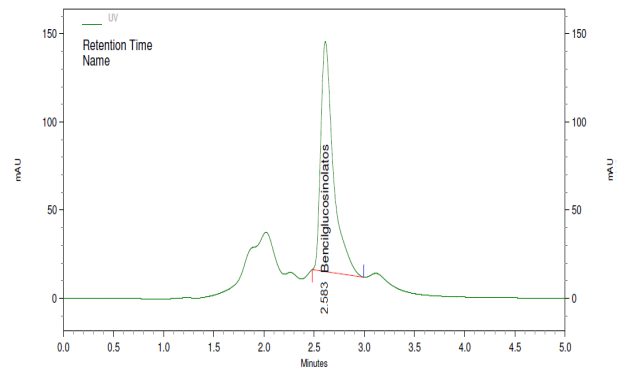


Gráfico N° 14: Precisión intermedia de valoración instrumento (2), tiempo y analista (2) Dia 3



ANEXO 12: CROMATOGRAMAS DE LA EXACTITUD

Gráfico N° 1: Placebo con Analito al 80%

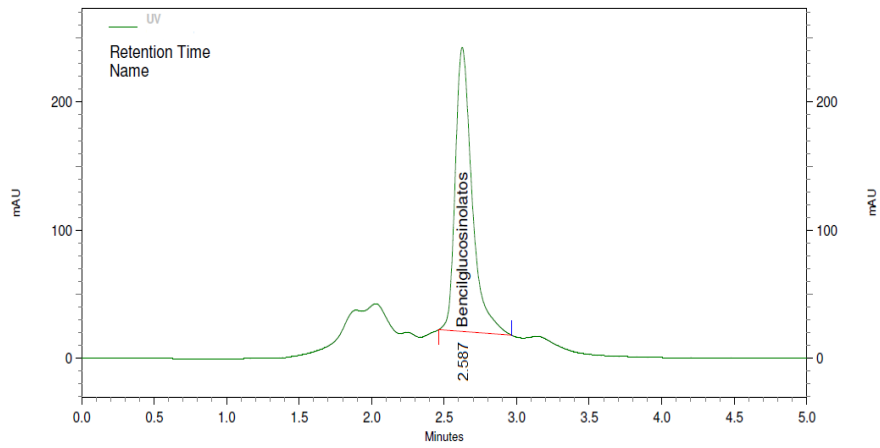


Gráfico N° 2: Placebo con Analito al 100%

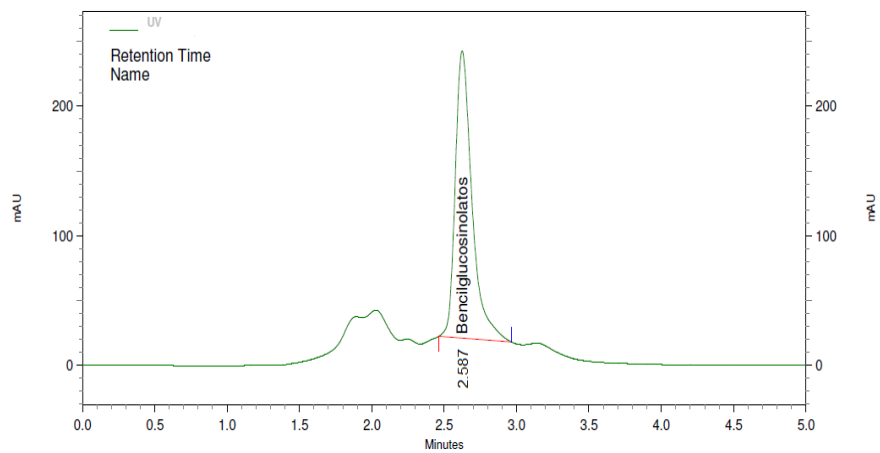


Gráfico N° 3 Placebo con Analito al 120%

