

**Treball de Fi de Grau**

*VALIDACIÓ DEL MÈTODE ANALÍTIC  
PER LA DETERMINACIÓ  
D'AMINOÀCIDS I CARBOHIDRATS  
D'UN PRODUCTE FARMACÈUTIC  
PER HPLC*

Aida Roy Boixader

**Grau en Biotecnologia**

Tutora UVic-UCC: Núria Barniol i Noguer

Tutor Empresa: Joan Garrote i Martínez

Vic, Juny de 2014

## ÍNDEX

RESUM.....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓ .....	3
2. CONCEPTES GENERALS .....	3
2.1. VALIDACIÓ DE MÈTODES ANALÍTICS .....	3
2.2. MATRIU .....	13
3. OBJECTIUS .....	15
4. MATERIALS I MÈTODES .....	16
4.1. AMINOÀCIDS .....	17
4.2. CARBOHIDRATS .....	17
5. RESULTATS .....	19
5.1 AMINOÀCIDS .....	19
5.2 CARBOHIDRATS .....	32
6. DISCUSSIÓ DE RESULTATS .....	40
6.1. AMINOÀCIDS .....	40
6.2. CARBOHIDRATS .....	42
7. CONCLUSIONS .....	43
8. BIBLIOGRAFIA .....	44
ANNEXOS.....	45

## RESUM TREBALL FINAL DE GRAU GRAU EN BIOTECNOLOGIA

**Títol:** Validació del mètode analític per la determinació d'aminoàcids i sucres d'un producte farmacèutic per HPLC

**Paraules clau:** fàrmac, HPLC, validació, aminoàcids i carbohidrats.

**Autora:** Aida Roy i Boixader

**Tutors:** Joan Garrote i Martínez i Maria Vivet i Prat (DFV) i Núria Barniol i Noguera (UVic -UCC)

**Data:** Juny de 2014

Per poder desenvolupar un producte farmacèutic és necessari establir un mètode d'anàlisi que permeti determinar i quantificar totes aquelles substàncies que conté, ja sigui referent als principis actius; a les impureses i productes de degradació, conservants, antioxidants,... Grans entitats com la ICH remarquen la importància de validar els mètodes analítics ja que és la via per demostrar que aquell producte compleix les garanties de qualitat prèviament establertes.

Així doncs, l'objectiu d'aquest *Treball Final de Grau* és poder desenvolupar i validar dos mètodes analítics per a la determinació d'aminoàcids i carbohidrats respectivament, d'un producte farmacèutic per cromatografia líquida (HPLC). Per tal de poder concloure que aquell mètode és adequat per la determinació per la qual ha estat desenvolupat, és necessari obtenir resultats que compleixin els criteris d'acceptació corresponents als paràmetres que han de ser avaluats en una validació analítica. Aquests paràmetres són: la precisió, la selectivitat, l'exactitud i la linealitat i el rang.

Els resultats d'aquest projecte han demostrat que els dos mètodes desenvolupats són adequats per a la determinació de tres dels principis actius (aminoàcid 1, aminoàcid 2 i carbohidrat 1) que conté el producte farmacèutic d'ús veterinari analitzat; i poden ser validats ja que compleixen els criteris d'acceptació dels paràmetres avaluats que proposa la ICH.

El mètode per la determinació de carbohidrats no és vàlid per el carbohidrat 2, ja que durant el desenvolupament es va detectar que una bona part d'aquest passava a carbohidrat 1 (desplaçament de l'equilibri cetò-enòlic que hi ha entre el carbohidrat 1 i el carbohidrat 2 a pHs alts). És per aquest motiu, que es pot concloure que aquest mètode no és vàlid i es recomana seguir investigant per a poder desenvolupar un mètode analític adient.

## ABSTRACT

**Title:** Validation of the analytical method for the determination of aminoacids and carbohydrates in a pharmaceutical product by HPLC.

**Key words:** drug, HPLC, validation, aminoacids and carbohydrates.

**Author:** Aida Roy Boixader

**Tutors:** Joan Garrote Martínez and Maria Vivet Prat (DFV) and Núria Barniol Noguera (UVic - UCC)

**Date:** June 2014

To develop a pharmaceutical product it is necessary to establish an analytical method capable of identifying and quantifying all the substances that it contains, such as active ingredients, impurities, degradation products, preservatives, antioxidants,... Reference organizations such as ICH emphasize the importance of method validation as the way to verify that the product satisfies the quality standards previously established.

Therefore, the main objective of this Final Degree Project is to develop and validate two analytical methods for the determination of aminoacids and carbohydrates in a pharmaceutical product by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). To ensure that a method is suitable for the determination for which it has been developed, it is necessary to obtain results which comply the acceptance criteria defined for each evaluated parameter of an analytical validation. These parameters are: precision, selectivity, accuracy and linearity and range.

The results obtained in this Project demonstrate that both methods are suitable for the determination of the three active ingredients (arginine, methionine and carbohydrate 1) of the veterinary pharmaceutical product analyzed, and both methods can be validated as they satisfy the acceptance criteria of the evaluated parameters recommended by ICH.

During method development, it was demonstrated that the method for the determination of carbohydrates is not valid for carbohydrate 2. At high pH, the equilibrium between carbohydrate 1 and carbohydrate 2 is moved to carbohydrate 1 and a great part of carbohydrate 2 converts to carbohydrate 1. Therefore, this method is not valid and it is recommended to keep on investigating to develop a suitable analytical method for carbohydrate 2.

## 1. INTRODUCCIÓ

Per desenvolupar un producte farmacèutic és necessari establir un mètode d'anàlisis que permeti determinar i quantificar totes aquelles substàncies que conté, ja sigui referent als principis actius; a les impureses i productes de degradació, conservants, antioxidants,... Gràcies a la validació del mètode d'anàlisis, s'assegura amb l'obtenció d'uns resultats fiables que aquell medicament compleix les especificacions exigides i alhora, assegura unes garanties de qualitat, que engloben les propietats del producte i el procés d'elaboració.

La fiabilitat dels resultats obtinguts, ve donada per la demostració de tots els requisits que ha de complir una validació i per la documentació dels processos utilitzats per l'obtenció de les mostres sotmeses a anàlisi i pels aparells i productes utilitzats en aquest.

El concepte de garantia de qualitat engloba les Bones Pràctiques al Laboratori (BPL), Normes de Correcta Fabricació (GMP) i factors com el disseny en l'elaboració del producte. És per aquest motiu que entitats com la *Farmacopea Europea* (EP), i en conseqüència, la *Real Farmacopea Española*, la *Organització Mundial de la Salut* (OMS) i la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), entre d'altres, remarquen la importància de validar els processos analítics, ja que d'aquesta manera es pot demostrar que aquell producte farmacèutic segueix unes garanties de qualitat.

Així doncs, una validació ens permet poder determinar a partir d'evidències documentals i dins d'uns paràmetres de qualitat ja establerts, que un procediment analític donarà uns resultats precisos i exactes amb un alt grau de seguretat.

## 2. CONCEPTES GENERALS

### 2.1. VALIDACIÓ DE MÈTODES ANALÍTICS

#### 2.1.1. CONCEPTE

El terme validació, segons les Normes de Correcta Fabricació es defineix com a "L'obtenció de proves que qualsevol procediment, procés, material, equip activat o sistema produeix en realitat el resultat previst".

### 2.1.2. PER QUÈ VALIDAR?

Existeixen diverses raons que justifiquen la validació de mètodes analítics com són:

- Assegurar que es treballa amb mètodes que ofereixen confiança i fiabilitat en els resultats, fet que com a conseqüència minimitza els errors i repeticions permetent un important estalvi de costos.
- Demostrar que els mètodes són adequats als anàlisis proposats en les condicions descrites, ja que la validació és la eina que permet obtenir les proves documentals al respecte.
- Treballar amb mètodes validats permet no només el coneixement del mètode analític, sinó també complir amb les exigències legals tant del registre d'especialitats farmacèutiques com de les Bones Pràctiques al Laboratori, amb la finalitat d'assegurar l'eficàcia i qualitat del producte.

### 2.1.3. MÈTODES SUSCEPTIBLES A SER VALIDATS

Són validables, els següents tipus de mètodes analítics:

- Assajos per la determinació de l'analit d'interès d'una matèria primera o d'una especialitat farmacèutica.
- Assajos del límit i quantificació d'impureses.
- Assajos microbiològics.
- Assajos per la determinació de característiques farmaco-tècniques inherents.
- Assajos d'identificació.

### 2.1.4. PROTOCOL DE VALIDACIÓ DE MÈTODES ANALÍTICS

Abans de començar una validació, s'ha d'elaborar un protocol de validació. El protocol, que és un document específic per cada producte i mètode, ha de recollir:

- Objectiu: en el qual es defineix l'estudi que es farà i el que es pretén demostrar de forma simple.
- Responsables: relació de les persones que porten a terme la validació i les que l'aprovaran.
- Detall del mètode analític a validar.

- Producte o matèria primera per a la qual es valida el mètode analític.
- Mostres: el mostreig es realitzarà d'acord amb els procediments escrits, en els quals s'indicaran els sistemes d'identificació i tractament previ de les mostres.
- Equips implicats en el procés de validació.
- Paràmetres de qualitat a avaluar.
- Criteris d'acceptació.

#### 2.1.4. PARÀMETRES D'UNA VALIDACIÓ ANALÍTICA

Els paràmetres de qualitat, definits segons la ICH que es poden avaluar són:

- Selectivitat: capacitat d'un mètode analític per mesurar i/o identificar l'analit, de forma inequívoca, en presència d'altres substàncies químiques que puguin estar presents en la mostra.
- Linealitat: capacitat d'un mètode analític per proporcionar resultats directament (o mitjançant transformacions matemàtiques) proporcionals a la concentració de l'analit en la mostra dins d'un rang establert.
- Rang: interval entre la concentració superior i inferior per a les quals s'ha demostrat la correcta precisió, exactitud i linealitat del mètode.
- Precisió: grau de concordança entre una sèrie de mesures obtingudes de preses múltiples d'una mateixa mostra homogènia en les condicions preescrites. La precisió es pot avaluar a 3 nivells:
  - o Repetibilitat (precisió del mètode o intra-assaig): estudia la variabilitat del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis sobre la mateixa mostra en les mateixes condicions operatives, en un mateix laboratori i en un període de temps curt.
  - o Precisió intermitja (precisió intralaboratori o interassaig): estudia la variabilitat del mètode efectuant una sèrie d'anàlisis sobre la mateixa mostra però en condicions operatives diferents (diferent analista, equip, dia,..) i en un mateix laboratori.
  - o Reproductibilitat (precisió interlaboratoris): estudia la variabilitat del mètode sota condicions operatives diferents i en diferents laboratoris. Aquest estudi és necessari si es pretén realitzar el mètode en diferents laboratoris o si es vol estandarditzar un procediment analític.

- Exactitud: expressa la proximitat entre el valor que s'accepta convencionalment com a verdader o valor de referència i el valor experimental trobat.
- Límit de detecció: mínima quantitat d'analít en una mostra que pot ser detectada, encara que no hagi estat necessàriament quantificada amb precisió i exactitud.
- Límit de quantificació: es defineix com la mínima quantitat d'analít que pot determinar-se quantitativament amb una adequada exactitud i precisió. Aquest paràmetre té sentit i especial interès en la determinació de concentracions baixes d'analít.

Segons el tipus d'estudi es necessari avaluar uns paràmetres o uns altres, aquests poden resumir-se en aquesta taula:

Parámetros	Identificación	Impurezas		Valoración: - Disolución - Contenido
		Cuantitativo	Test Límite	
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión				
- Repetibilidad	No	Si	No	Si
- Precisión intermedia	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
Límite detección	No	No	Si	No
Límite cuantificación	No	Si	No	No
Linealidad	No	Si	No	Si
Rango	No	Si	No	Si

Taula. 1.1. Resum paràmetres a avaluar. AGUIRRE ORTEGA, LETICIA et al. *Validación de métodos analíticos Monografías de AEFI*. Barcelona, (2001).

#### A) SELECTIVITAT

Per a estudiar la selectivitat s'han de comparar els resultats dels anàlisis de mostres amb i sense el principi actiu i amb presència o absència d'impureses, productes de degradació i/o excipients.

Existeixen dos procediments per determinar la selectivitat:

- Per adició d'interferències: Aquests tipus d'estudis són útils en aquells casos que es tenen identificades les possibles interferències i aquestes es troben disponibles de



forma aïllada. Segons la matèria prima o la forma farmacèutica utilitzades, s'han de preparar diferents mostres:

Forma farmacèutica	Matèria prima
Matriu* / Placebo	Blanc
Analit (100% concentració de treball)	Analit (100% concentració de treball)
Matriu / Placebo + Analit	Substàncies similars
Matriu / Placebo + Analit + Impureses + Productes de degradació	Analit + Impureses + Productes de degradació..

Nota (\*): totes aquelles substàncies i productes que acompanyen l'analit.

*Taula. 1.2. Mostres a preparar per avaluar la selectivitat. AGUIRRE ORTEGA, LETICIA et al. Validación de métodos analíticos Monografías de AEFI. Barcelona, (2001).*

La concentració de l'analit a escollir podria ser la teòrica de treball pel principi actiu i altres compostos d'interès; i la de les interferències el seu límit màxim de treball.

- Mostres sotmeses a estrès: Aquests tipus d'estudis són importants en aquells casos en els quals es vol determinar l'estabilitat d'un principi actiu o forma farmacèutica. S'analitza el producte sotmès a condicions d'estrès per tal d'aconseguir una degradació de l'ordre del 10-20% de la concentració de l'analit. En la majoria dels principis actius, les condicions d'estrès són:

Forma farmacèutica	Matèria prima
Calor (40-70°C)	Calor (40-100°C)
Llum	Llum
Humitat relativa	Àcid (HCl 0.1N) Base (NaOH 0.1N) Oxidant (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%)

*Taula. 1.3. Mostres a preparar per avaluar la selectivitat. AGUIRRE ORTEGA, LETICIA et al. Validación de métodos analíticos Monografías de AEFI. Barcelona, (2001).*

Els productes tractats d'aquesta forma, s'analitzen i se'n determina la seva puresa cromatogràfica i la resolució respecte els pics més pròxims. La degradació es pot avaluar comparant els perfils obtinguts del producte estressat i no estressat.

Criteris d'acceptació: La següent taula ens indica els criteris d'acceptació recomanables. No tots són d'aplicació en tots els casos.

Paràmetre	Criteri d'acceptació proposat
Capacitat de discriminació del mètode	El mètode ha de permetre distingir entre totes les possibles espècies químiques que puguin generar-se.

*Taula. 1.4. Criteris d'acceptació selectivitat. AGUIRRE ORTEGA, LETICIA et al. Validación de métodos analíticos Monografías de AEFI. Barcelona, (2001).*

## B) LINEALITAT I RANG

En la valoració del contingut del principi actiu del producte acabat i la matèria prima, la ICH recomana determinar la linealitat dels mètodes en un rang de 80-120% del principi actiu.

Per a la quantificació d'impureses, s'estableix un rang de treball des del 50% de la especificació límit de cada impuresa, fins un 120% d'aquesta especificació.

Per avaluar la linealitat s'estudiaran habitualment 5 nivells de concentració i tres rèpliques per cada un, fent un total de 15 determinacions. Aquestes s'analitzaran en sentit creixent de concentració, per exemple: 80,90,100,110 i 120% del contingut teòric de l'analit de la mostra.

Amb els resultats es determinarà:

- Representació gràfica de les dades experimentals.
- Representació gràfica de la recta de regressió.
- Càlcul de l'equació de la recta segons:

$$y = ax + b$$

On: a = coeficient de regressió, pendent de la recta  
b = ordenada a l'origen

*Equació (2.1.4.1): Equació de la recta.*

- Càlcul del coeficient de regressió de la recta ( $R^2$ ).

Seguidament es realitzarà el “Test de linealitat”, el qual consta de dos procediments:

- o Coeficient de variació dels factors de resposta:

$$CV (\%) = \frac{S_f}{\bar{f}} \cdot 100 \quad \text{On: } S_f = \text{desviació estàndard dels factors de resposta.}$$
$$\bar{f} = \text{mitjana dels factors de resposta.}$$

*Equació (2.1.4.2): Coeficient de variació.*

- o Significació estadística de la desviació estàndard de la pendent: que s’avalua mitjançant dos procediments:

- Càlcul de la “t de Student”:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad \text{On: } b = \text{pendent de la recta}$$
$$S_b = \text{desviació estàndard de la pendent}$$

*Equació (2.1.4.3): “Test t”.*

- També es solen calcular els intervals de confiança amb l’equació:

$$b \pm tS_b \quad \text{On: } t = \text{valor de la distribució t de Student per n-}$$
$$2 \text{ graus de llibertat i un grau de significació}$$
$$(\alpha=0,05).$$

*Equació (2.1.4.4): Intervals de confiança.*

Segons els resultats obtinguts, es defineixen uns criteris d'acceptació per a la quantificació del principi actiu i les impureses, que habitualment són:

Paràmetres	Criteri d'acceptació habitual
Coeficient de correlació (r)	$\geq 0,990$
Coeficient de variació dels factors de resposta (CV%):	$\leq 5\%$
Càlcul de la t de Student	$t_{exp} > t_{Student}$ (valor de la distribució t de Student per n-2 graus de llibertat i un grau de significació ( $\alpha=0,05$ )).
Intervals de confiança	No haurien d'incloure el 0.

Taula.1.5.- Criteris d'acceptació per la Linealitat i el Rang.

### C) PRECISIÓ

Segons la ICH, l'anàlisi quantitatiu del principi actiu i de les impureses són les úniques determinacions a realitzar en l'estudi de la precisió. Aquesta es divideix en:

- Repetibilitat (precisió del mètode o intraassaig): La repetibilitat es determina a partir de l'anàlisi de 6 pesades de la mateixa mostra de producte al 100% de la concentració a analitzar i un cop obtinguts els resultats, es determina:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{On: } S_t = \text{desviació estàndard del contingut de principi actiu.}$$

$\bar{x}$  = contingut mitjà.

Equació (2.1.4.5): Coeficient de variació.

- Precisió intermitja (precisió intralaboratori o interassaig): L'avaluació de la precisió intermitja es realitza a partir de l'anàlisi de dos grups de 6 pesades de la mateixa mostra de producte al 100% de la concentració a analitzar. Cada grup de 6 pesades s'analitza en el mateix laboratori però en condicions operatives diferents: això inclou diferents equips cromatogràfics, diferents dies d'anàlisis, diferents analistes... Amb els resultats obtinguts, es calcula:

- Coeficient de variació (CV%): (veure Equació (2.1.4.5): Coeficient de variació).

Segons els resultats obtinguts, es defineixen uns criteris d'acceptació tant pel que fa a la quantificació de les impureses i/o del principi actiu, que habitualment són:

Determinació	Criteri d'acceptació habitual
Coeficient de variació (CV%):	≤ 3% per la repetibilitat. ≤ 6% per la precisió intermitja.

Taula. 1.6. Criteris d'acceptació per la Repetibilitat i la Precisió intermitja.

- Reproductibilitat (precisió interlaboratoris): L'avaluació de la reproductibilitat es determina mitjançant l'anàlisi d'una sèrie d'alíquotes de lots homogenis del mateix producte en diferents condicions operatives i ambientals però seguint el mateix mètode.

#### D) EXACTITUD

En la determinació de l'exactitud s'utilitzen les mateixes mostres utilitzades en l'estudi de la linealitat i rang del mètode, és a dir, habitualment es treballa amb 5 nivells de concentració i tres repliques per cada un, fent un total de 15 determinacions en sentit creixent de concentració. Segons el tipus de mètode a validar, es treballa en un rang diferent:

- Un rang de 80-120% del principi actiu per anàlisi de producte acabat o matèria prima.
- Un rang de concentració del 50% de l'especificació límit fins a un 120% d'aquesta especificació per anàlisi d'impureses.

L'exactitud s'expressa com a percentatge, i fa referència al % de recuperació de la quantitat coneguda d'analít afegida sobre la mostra en la valoració. La fórmula matemàtica utilitzada per estudiar aquest paràmetre és la següent:

Percentatge de recuperació :  $R = \frac{x_m}{\mu} \cdot 100$       On:  $x_m$  = valor mitjà aïllat  
 $\mu$  = valor teòric

Equació (2.1.4.6): Percentatge de recuperació.

Per contrarestar que l'exactitud és vàlida, amb els resultats obtinguts es realitza el següent càlcul:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|r_m - 100| \cdot \sqrt{n}}{CV}$$

On:  $r_m$  = recuperació mitjana  
 $n$  = mida de la mostra  
 $CV$  (%) = coeficient de variació

*Equació (2.1.4.7): "Test t".*

Segons els resultats obtinguts, es defineixen uns criteris d'acceptació, que habitualment són:

Determinació	Criteri d'acceptació habitual
Percentatge de recuperació (R%):	99,0 – 101,0% per matèria prima 97,0 – 103,0% per principi actiu del producte acabat Mínim 90% per impureses
Càlcul de la t de Student	$t_{\text{exp}} > t_{\text{Student}}$ (valor de la distribució t de Student per n-1 graus de llibertat i un grau de significació ( $\alpha=0,05$ )).

*Taula.1.7. Criteris d'acceptació per l'Exactitud*

### E) LIMIT DE DETECCIÓ (LD) I LIMIT DE QUANTIFICACIÓ (LC)

L'estudi dels límits de detecció i quantificació es realitzen mitjançant una recta de calibració a nivells de concentració pròxims al límit de quantificació, normalment aquest comprèn un rang de 0,2 – 5% del contingut de l'analit a la solució problema. S'utilitza un mètode basat en l'extrapolació de l'equació de la recta ( $y = ax + b$ ) a concentració zero. Amb els resultats obtinguts es calcularà:

- coeficient de regressió (r)
- ordenada a l'origen (b)
- pendent de la recta (a)
- error típic ( $S_{xy}$ )

A partir d'aquests resultats es calcula la resposta del límit de detecció i del límit de quantificació:

- Resposta LD =  $a + 3 \cdot S_{xy}$
  
- Resposta LC =  $a + 10 \cdot S_{xy}$

Aquestes respostes corresponen a unes concentracions que equivalen al límit de detecció i al límit de quantificació respectivament.

Per comprovar els límits de detecció i quantificació obtinguts es preparen dues mostres de concentracions equivalents al límit de detecció i al límit de quantificació i s'analitzen amb el mètode a validar.

---

Críteri d'acceptació habitual

---

El límit de detecció i el límit de quantificació obtinguts han de permetre quantificar les substàncies relacionades o impureses, tant d'un principi actiu com d'una especialitat.

## **2.2. MATRIU**

### **2.2.1. PRODUCTE FARMACÈUTIC**

El producte en estudi és un medicament d'ús veterinari destinat a diferents espècies: bovina, equina, ovina, caprina, porcina i animals de companyia (gats i gossos). Es presenta en forma de solució injectable i s'administra per via endovenosa o subcutània. Per la seva composició, que consta de: Aminoàcid 1, Aminoàcid 2, Carbohidrat 1, Carbohidrat 2 i excipients; és un medicament que actua eficaçment com a protector hepàtic i restaurador de la glucèmia. Els seus components intervenen de forma decisiva en el metabolisme hepàtic, protegint i estimulant l'activitat d'aquest òrgan.

Al ser una solució injectable per via endovenosa és important determinar i caracteritzar adequadament els principis actius que conté.

### 2.2.1. PRINCIPIIS ACTIUS

Degut als desequilibris nutricionals i a les produccions elevades a les que estan sotmesos els animals d'alta producció, i especialment les vaques lleteres, es freqüent l'aparició de trastorns metabòlics i processos hepàtics. El producte en estudi ajuda eficaçment al metabolisme de l'animal gràcies a la seva composició en aminoàcids i carbohidrats. Les propietats farmacològiques d'aquests principis actius són:

#### A) AMINOÀCIDS

En la natura existeixen els aminoàcids essencials i els no essencials. El consum d'aquests aminoàcids essencials és fonamental per a que el cos funcioni correctament. Si la dieta és baixa en aquests aminoàcids o els aliments que consumeixen els animals són de mala qualitat, el cos tendeix a consumir les pròpies proteïnes i aquest fet provoca que la massa muscular disminueixi, i com a conseqüència disminueixi la resistència i la força de l'organisme.

El producte en estudi que porta en la seva composició dos d'aquests aminoàcids essencials (aminoàcid 1 i Aminoàcid 2) ajuda a l'animal a mantenir el seu pes i l'equilibri nitrogenat del cos mitjançant el seu subministrament per via endovenosa.

#### B) CARBOHIDRATS

La falta d'hidrats de carboni i un contingut baix de glucogen hepàtic fa que s'utilitzin les grasses com a font d'energia predominant i això, provoca cossos cetònics en excés que desenvolupen en una cetosis en els animals. L'administració del carbohidrat 1 suprimeix la cetosis i protegeix al fetge permetent la regeneració hepàtica gràcies a la formació de glucogen.



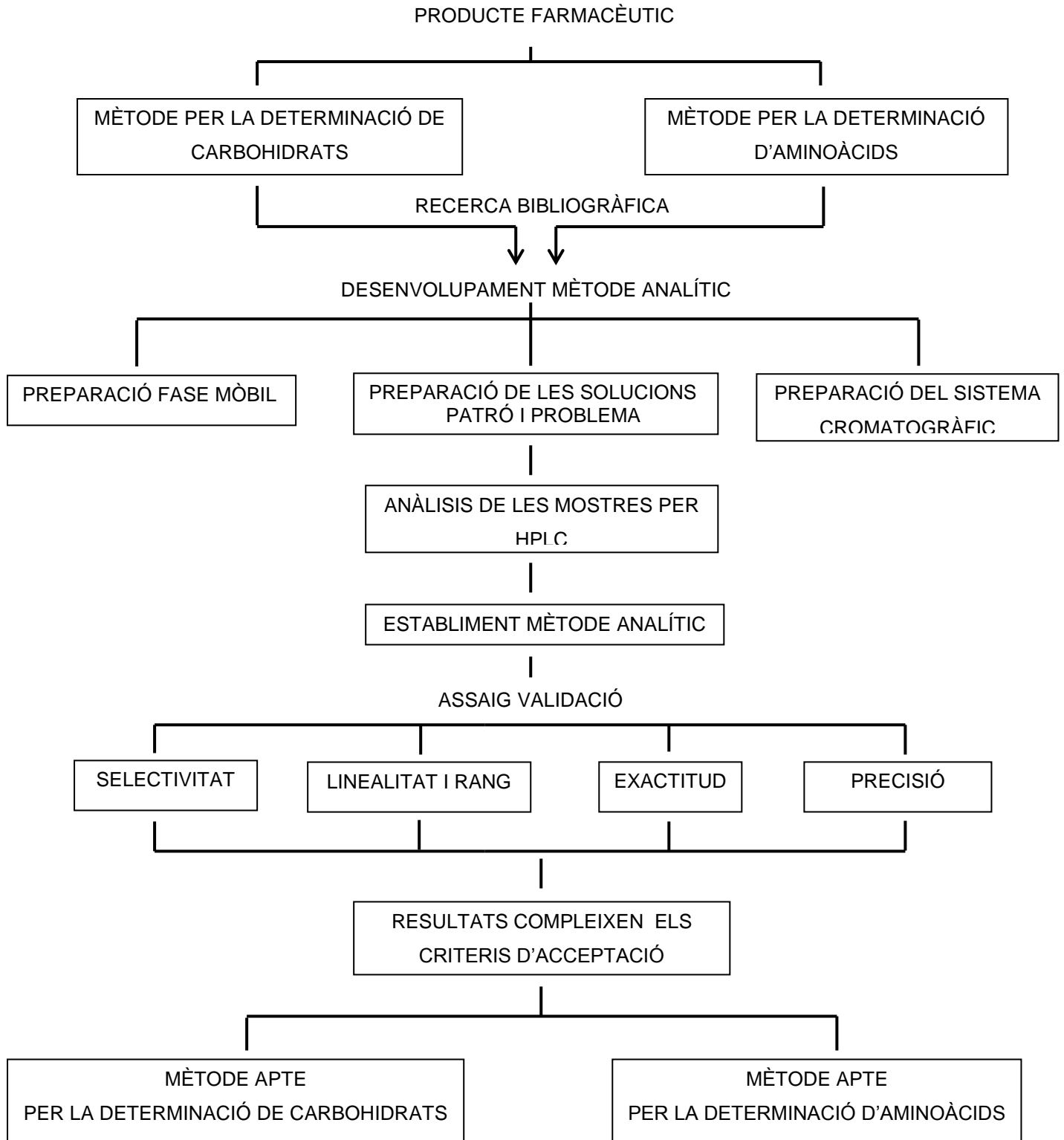
### 3. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest *Treball de Fi de Grau* és poder desenvolupar i validar dos mètodes analítics per a la determinació d'aminoàcids i carbohidrats respectivament, d'un producte farmacèutic per cromatografia líquida (HPLC).

Així cal:

- verificar i demostrar que es compleixen tots els paràmetres estadístics de la validació del mètode analític per HPLC en la quantificació de carbohidrats i aminoàcids, del producte farmacèutic analitzat.

#### 4. MATERIALS I MÈTODES



#### 4.1. AMINOÀCIDS

Els aminoàcids no tenen grups cromòfors i no poden ser detectats pel detector de UV-Vis de l'HPLC. Per aquest motiu s'han analitzat mitjançant el mètode AccQ·Tag de Waters que es basa en un reactiu que provoca una reacció de derivatització dels aminoàcids. El reactiu 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) forma derivats estables amb els aminoàcids primaris i secundaris. Els derivats són separats fàcilment per l'HPLC de fase reversa i poden ser detectats per fluorescència o per UV-Vis ( en aquest darrer cas, per límits de detecció més elevats).

L'excés de reactiu reacciona amb l'aigua, s'hidrolitza durant la reacció per formar 6-aminoquinoline (AMQ), les característiques espectrals de la qual són diferents a qualsevol del aminoàcids derivatitzats i permet reflectir una longitud d'ona que provoca un augment de la resposta emesa pels derivats, mentre redueix al mínim la resposta de l'AMQ.

El reactiu AccQ·Fluor reacciona ràpidament amb els aminoàcids primaris i secundaris formant compostos fortament estables i que poden ser detectats a una longitud d'ona de 395 nm (detector de fluorescència) o a 254 nm (detector UV-Vis).

En l'*Annex I* es mostra el protocol utilitzat per validar el mètode analític per la determinació de l'Aminoàcid 1 i de l'Aminoàcid 2 del producte farmacèutic analitzat.

Al desenvolupar el mètode analític pel producte farmacèutic a analitzar, es va detectar que no era possible derivatitzar l'Aminoàcid 2, ja que porta un grup acetil. Com a alternativa, els anàlisis es varen realitzar amb el patró de D,L-Aminoàcid 2 i mitjançant un factor de conversió del pes molecular es va poder obtenir el contingut en Aminoàcid 2 de la mostra.

#### 4.2. CARBOHIDRATS

Els carbohidrats poden ser separats per cromatografia d'intercanvi iònic en tots aquells processos que es trobin sota condicions alcalines ( $\text{pH} > 12$ ). Els carbohidrats són àcids dèbils amb valors de  $\text{pK}_a$  entre 12 i 14. A valors de  $\text{pH}$  alt poden ser ionitzats total o parcialment depenent del seu valor de  $\text{pK}_a$ .

Degut a les condicions d'alcalinitat extremes només les columnes d'intercanvi iònic són adequades per la separació de carbohidrats. El temps de retenció dels carbohidrats és inversament proporcional al seu valor de  $\text{pK}_a$ . En aquest tipus de columnes normalment

elueixen primer els grups alcohols dels sucres, seguit pels mono-, di- i tri- sacàrids i finalment els oligosacàrids.

La retenció dels carbohidrats es pot controlar mitjançant la concentració d'hidròxid sòdic i acetat de sodi en la fase mòbil.

Un increment de la concentració d'hidròxid sodi té un doble efecte en la retenció de carbohidrats. L'augment de la força iònica de l'eluent fa disminuir el temps de retenció de l'analit, mentre que nivells alts de pH fan augmentar el grau de dissociació i fan disminuir el temps de retenció de l'analit. Si el  $\text{pH} > \text{pKa}$ , augmenta el grau de dissociació i la força iònica provoca la separació del procés i el temps de retenció disminueix.

L'anàlisi dels carbohidrats es realitza amb un elèctrode d'or.  $E_1$  és el detector potencial. Durant un temps els carbohidrats són oxidats a la superfície de l'elèctrode d'or. El temps de retenció, ( $t_{\text{delay}}$ ), abans de començar a mesurar les mostres, assegura que la contribució de la càrrega utilitzada per l'elèctrode pel pas de potencial elèctric, tingui un petit efecte.

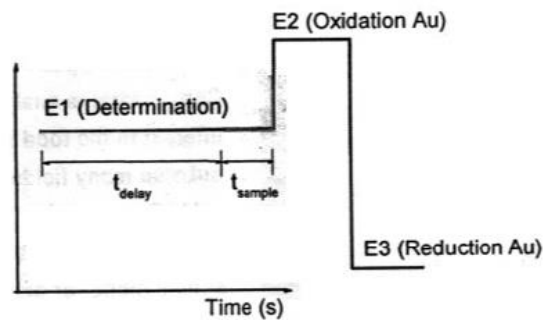
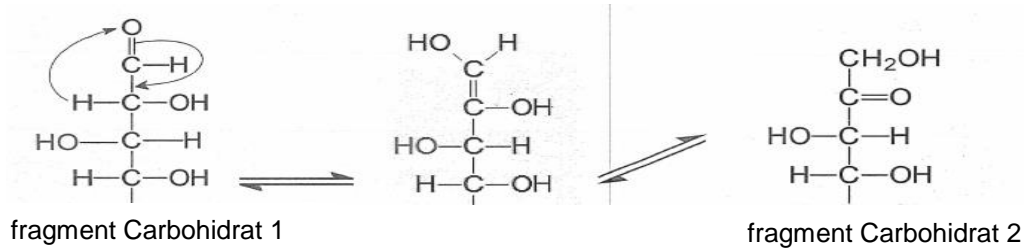


Fig.4.1. Anàlisi de carbohidrats

Tot seguit, s'aplica una càrrega potencial llarga ( $E_2$ ) per aconseguir la formació d'ànodes de superfície oxidada per netejar l'elèctrode. La superfície de l'elèctrode oxidada amb un potencial negatiu ( $E_3$ ), es redueix de nou a una superfície activada amb or, anomenada "pas de reactivació".

Ahora de desenvolupar el mètode que conté els dos carbohidrats del producte farmacèutic es va detectar que una bona part de el Carbohidrat 2 passava a carbohidrat 1, això es degut a que es treballa a un pH molt elevat i això provoca que l'equilibri ceto-enòlic que hi ha entre el Carbohidrat 1 i el Carbohidrat 2 es desplaci cap a el Carbohidrat 1 fent una isomerització entre un grup alcohol de les dues molècules. El mètode desenvolupat no és vàlid per la determinació de el Carbohidrat 2, per aquest motiu en aquest treball només s'exposen els resultats obtinguts en el mètode per la determinació del Carbohidrat 1.



Imatge.4.1.Isomerització entre el Carbohidrat 1 i el Carbohidrat 2

El protocol utilitzat per validar el mètode analític per la determinació del Carbohidrat 1 es troba detallat en els Annexos (vegeu Annex II).

## 5. RESULTATS

### 5.1 AMINOÀCIDS

#### A) SELECTIVITAT

La selectivitat del mètode respecte els components coneguts, es comprova injectant les solucions següents:

- *Placebo sense Aminoàcid 1* : Es prepara un placebo de la especialitat, constituït per tots els components de la mateixa, excepte pel principi actiu, Aminoàcid 1. Es considera de la mateixa manera que una *solució problema*, es pesen 8,3 g d'aquest placebo i es dilueixen en 50 ml HCl 0,01N.
- *Placebo sense D,L-Aminoàcid 2*: Es prepara un placebo de la mateixa especialitat, constituït per tots els components de la mateixa excepte pel principi actiu d'aquest, D,L-Aminoàcid 2: Es pesen exactament, 8,3 g d'aquest placebo i es dilueixen en 50 ml HCl 0,01N.
- *Placebo sense Aminoàcid 1 i sense D,L-Aminoàcid 2*: Es prepara un placebo de la especialitat, constituït per tots els components de la mateixa, excepte pels seus principis actius, Aminoàcid 1 i D,L-Aminoàcid 2. Es pesen 8,3 g d'aquest placebo i es dilueixen en 50 ml d'HCl 0,01N.
- *Solució patró Aminoàcid 1*: Es pesen exactament 20 mg d'Aminoàcid 1 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 ml de HCl 0,01 N.

- *Solució patró D,L-Aminoàcid 2*: Es pesen exactament 20 mg de D,L-Aminoàcid 2 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 ml de HCl 0,01 N.

La selectivitat del mètode respecte els components desconeguts potencialment interferents, es comprova injectant mostres del producte farmacèutic sotmeses a condicions d'estrès:

- *Condicions àcides*: En un matràs aforat de 50 ml, afegir 8,3 g de mostra i 10 ml d'HCl 0,01N. Afegir la quantitat suficient de HCl 0,1N per obtenir pH = 2. Deixar 1 hora. Enrasar amb HCl 0,01N.
- *Condicions bàsiques*: En un matràs aforat de 50 ml, afegir 8,3 g de mostra i 10 ml de HCl 0,01N. Afegir la quantitat suficient de NaOH 0,1 N per obtenir pH = 10. Deixar 1 hora. Enrasar amb HCl 0,01N.
- *Condicions oxidants*: En un matràs aforat de 50 ml, afegir 8,3 g de mostra i 10 ml de HCl 0,01N. Afegir 4 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Deixar 1 hora. Enrasar amb HCl 0,01N.
- *Condicions de calor*: En un matràs aforat de 50 ml, afegir 8,3 g de mostra i 10 ml de HCl 0,01N. Tapar i deixar-ho 1 hora en un bany a 80 °C. Enrasar amb HCl 0,01N.

Segons els resultats obtinguts a partir dels cromatogrames (*veure Annex IV*) es pot concloure que no s'observa cap interferència en els temps de retenció dels pics corresponents als principis actius, Aminoàcid 1 i D,L-Aminoàcid 2. Tampoc s'observa cap interferència en els cromatogrames obtinguts de la fase mòbil i els placebos.

No s'observa cap interferència en els temps de retenció dels pics de les impureses i productes de degradació obtinguts alhora de sotmetre les mostres a condicions d'estrès.

## B) LINEALITAT I RANG

Es preparen 2 mostres de cada principi actiu a cinc nivells de concentració: 80%, 90%, 100%, 110% i 120% aproximadament, de la següent forma: en un matràs aforat de 100 ml, es pesa exactament la quantitat de mostra patró corresponent al rang de concentració a estudiar i es dilueix en 100 ml d'HCl 0,01 N.

Després de la injecció de les mostres, es realitzen els següents càlculs:

- 1) Càlculs de la regressió lineal.
- 2) Verificació de la linealitat mitjançant el "Test de Linealitat".

A continuació, es mostren les àrees obtingudes de la injecció de cada una de les mostres.

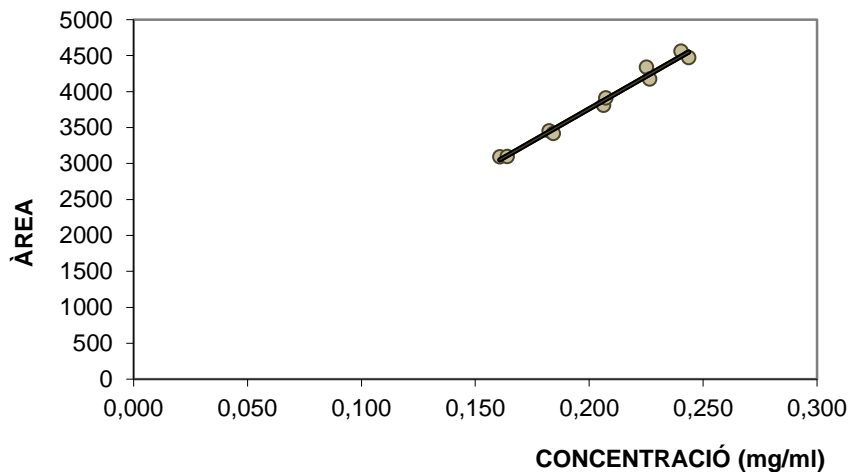
○ DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 1

mostra	concentració (mg/ml) (x)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana (y)	factor de resposta (y/x)
1 1	0,1608	3075,095	3112,540	3093,82	19240,2
1 2	0,1640	3119,643	3075,575	3097,61	18887,9
2 1	0,1825	3441,681	3460,352	3451,02	18909,7
2 2	0,1843	3429,029	3405,136	3417,08	18540,9
3 1	0,2064	3824,624	3795,493	3810,06	18459,6
3 2	0,2074	3923,352	3901,807	3912,58	18864,9
4 1	0,2252	4314,270	4362,175	4338,22	19263,9
4 2	0,2266	4168,432	4178,890	4173,66	18418,6
5 1	0,2404	4571,969	4545,768	4558,87	18963,7
4 2	0,2437	4476,997	4465,388	4471,19	18347,1

Taula (5.1.1): Àrees de les injeccions de l'Aminoàcid 1.

REGRESSIÓ LINEAL

La representació gràfica de la recta obtinguda és la següent:



Gràfica (5.1.1): Representació de la linealitat de l'Aminoàcid 1.

Els resultats de la regressió lineal s'obtenen agafant els valors de les àrees i de les concentracions i substituint-los a l'equació de la recta:

$$y = ax + b \quad \rightarrow \quad y = 10877x + 142,41$$

Equació (5.1.1): Equació de la recta.

$$R^2 = 0.985$$

$$R = 0.993$$

## TEST DE LINEALITAT

S'utilitzen dos proves per verificar la linealitat:

- 1) Coeficient de variació dels factors de resposta: En un calibrat lineal, els factors de resposta han de ser semblants entre sí i similars al valor de la pendent. Els factors de resposta obtinguts en cada mostra, s'especifiquen en la taula anterior:

$$CV (\%) = \frac{S_f}{\bar{f}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{332,02}{18789,63} \cdot 100 = 1,77$$

Equació (5.1.2): Coeficient de variació.

- 2) Significació estadística de la desviació estàndard de la pendent: S'ha de comprovar que la pendent és significativament diferent a 0. Aquesta s'avalua mitjançant dos procediments:

- Càlcul de la "t de Student":

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad \rightarrow \quad t_{exp} = \frac{|18076,71|}{786,6} = 22,98$$

Equació (5.1.3): "Test t".

- Càlcul dels intervals de confiança:

$$b \pm tSb \quad \rightarrow \quad 18076,71 \pm 2,306 \cdot 786,6$$

Equació (5.1.4): "Intervals de confiança".



Els intervals de confiança obtinguts són: [ 199775,79 ± 16377,64 ]

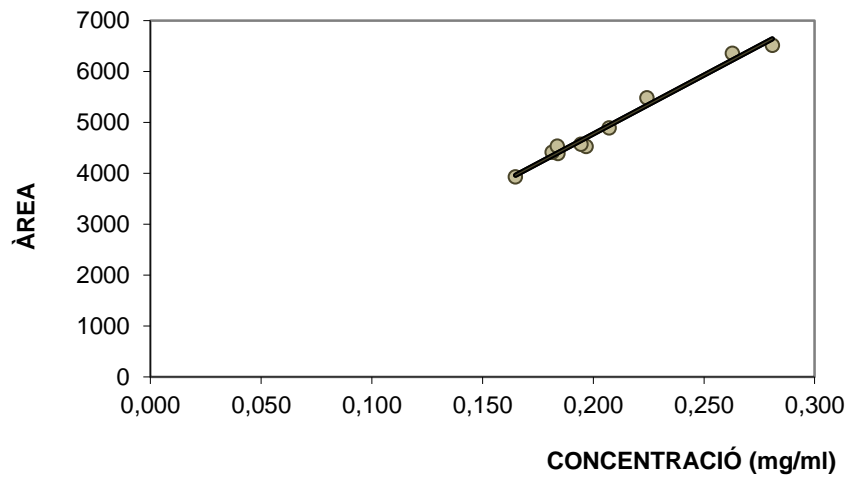
○ DETERMINACIÓ DEL D,L-AMINOÀCID 2

mostra	concentració (mg/ml) (x)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana (y)	factor de resposta (y/x)
1 1	0,1649	3971,752	3883,170	3927,46	23817,2
1 2	0,1841	4372,981	4400,852	4386,92	23829,0
2 1	0,1815	4407,380	4412,618	4410,00	24297,5
2 2	0,1838	4782,432	4276,058	4529,25	24642,2
3 1	0,2072	4868,967	4909,967	4889,47	23597,8
3 2	0,1968	4528,508	4525,894	4527,20	23004,1
4 1	0,1945	4563,181	4577,910	4570,55	23498,9
4 2	0,2243	5319,664	5636,629	5478,15	24423,3
5 1	0,2809	6501,735	6527,816	6514,78	23192,5
4 2	0,2628	6346,561	6368,893	6357,73	24192,3

Taula (5.1.2): Àrees de les injeccions del D,L-Aminoàcid 2.

REGRESSIÓ LINEAL

A continuació es mostra la representació gràfica de la recta obtinguda:



Gràfica (5.1.2): Representació de la linealitat del D,L-Aminoàcid 2.

Els resultats obtinguts es substitueixen a l'equació de la recta:

$$y = ax + b \quad \rightarrow \quad y = 213139,45x + 144,29$$

*Equació (5.1.5): Equació de la recta.*

$$R^2 = 0.983$$

$$R = 0.992$$

## TEST DE LINEALITAT

Dos proves per verificar la linealitat:

- 1) Coeficient de variació dels factors de resposta:

$$CV (\%) = \frac{S_f}{\bar{f}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{538,51}{23849,49} \cdot 100 = 2,26$$

*Equació (5.1.6): Coeficient de variació.*

- 2) Significació estadística de la desviació estàndard de la pendent:

- Càlcul de la "t de Student":

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad \rightarrow \quad t_{exp} = \frac{|23139,45|}{1068,7} = 21,65$$

*Equació (5.1.7): "Test t".*

- Càlcul dels intervals de confiança:

$$b \pm tSb \quad \rightarrow \quad 23139,45 \pm 2,306 \cdot 1068,7$$

*Equació (5.1.8): Intervals de confiança.*

Els intervals de confiança obtinguts són: [ 25447,82 ± 20831,09 ]

C) EXACTITUD

S'utilitzen les mateixes mostres que s'han preparat per determinar la linealitat. També, es prepara una solució patró d'Aminoàcid 1 i D,L-Aminoàcid 2. A continuació, es mostren els resultats:

○ DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 1

mostra	concentració (mg/ml) (x)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana (y)	contingut (mg/ml)	recuperació (%)
1 1	0,1608	3075,095	3112,540	3093,82	0,1640	102,0
1 2	0,1640	3119,643	3075,575	3097,61	0,1642	100,1
2 1	0,1825	3441,681	3460,352	3451,02	0,1829	100,2
2 2	0,1843	3429,029	3405,136	3417,08	0,1811	98,3
3 1	0,2064	3824,624	3795,493	3810,06	0,2020	97,9
3 2	0,2074	3923,352	3901,807	3912,58	0,2074	100,0
4 1	0,2252	4314,270	4362,175	4338,22	0,2300	102,1
4 2	0,2266	4168,432	4178,890	4173,66	0,2212	97,6
5 1	0,2404	4571,969	4545,768	4558,87	0,2417	100,5
5 2	0,2437	4476,997	4465,388	4471,19	0,2370	97,3

Taula (5.1.3): Àrees de les injeccions de l'Aminoàcid 1.

Solució patró Aminoàcid 1:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana
0,2074	3923,352	3901,807	3912,58

Es realitzen dos proves per verificar l'exactitud:

1) Recuperació mitjana i coeficient de variació:

$$CV (\%) = \frac{S_{r_m}}{\bar{r}_m} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{1,76}{99,6} \cdot 100 = 1,77$$

Equació (5.1.9): Coeficient de variació.

2) Test t:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{r}_m - 100| \cdot \sqrt{n}}{CV} \rightarrow t_{exp} = \frac{|99,6 - 100| \cdot \sqrt{10}}{1,77} = 0,714$$

Equació (5.1.10): "Test t".

○ DETERMINACIÓ DEL D,L-AMINOÀCID 2

mostra	concentració (mg/ml) (x)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana (y)	contingut (mg/ml)	recuperació (%)
1 1	0,1649	3971,752	3883,170	3927,46	0,1627	98,6
1 2	0,1841	4372,981	4400,852	4386,92	0,1817	98,7
2 1	0,1815	4407,380	4412,618	4410,00	0,1826	100,6
2 2	0,1838	4782,432	4276,058	4529,25	0,1876	102,1
3 1	0,2072	4868,967	4909,967	4889,47	0,2025	97,7
3 2	0,1968	4528,508	4525,894	4527,20	0,1875	95,3
4 1	0,1945	4563,181	4577,910	4570,55	0,1893	97,3
4 2	0,2243	5319,664	5636,629	5478,15	0,2269	101,2
5 1	0,2809	6501,735	6527,816	6514,78	0,2698	96,1
5 2	0,2628	6346,561	6368,893	6357,73	0,2633	100,2

Taula (5.1.4): Àrees de les injeccions del D,L-Aminoàcid 2.

Solució patró D,L-Aminoàcid 2:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana
0,1875	4528,508	4525,849	4527,20

Dos proves per verificar l'exactitud:

1) Recuperació mitjana i coeficient de variació:

$$CV (\%) = \frac{S_{r_m}}{\bar{r}_m} \cdot 100 \rightarrow CV (\%) = \frac{2,23}{98,8} \cdot 100 = 2,26$$

Equació (5.1.11): Coeficient de variació.

2) Test t:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{r}_m - 100| \cdot \sqrt{n}}{CV} \quad \rightarrow \quad t_{exp} = \frac{|98,8 - 100| \cdot \sqrt{10}}{2,26} = 1,714$$

Equació (5.1.12): "Test t".

D) PRECISIÓ

La precisió s'avalua a dos nivells:

REPETIBILITAT

La repetibilitat d'un mètode es determina mitjançant sis determinacions de la mateixa mostra de producte a la concentració nominal. Es comprova injectant les solucions següents:

- *Solució patró Aminoàcid 1:* Es pesen exactament 20 mg d'Aminoàcid 1 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 ml de HCl 0,01 N.
- *Solució patró D,L-Aminoàcid 2:* Es pesen exactament 20 mg de D,L-Aminoàcid 2 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 ml de HCl 0,01 N.
- *6 solucions problema.* Es pesen exactament 8,3 g del producte farmacèutic a analitzar i es dilueixen en 50 ml de HCl 0,01 N.

En els resultats obtinguts en les dues determinacions (Aminoàcid 1 i Aminoàcid 2), es descarta la mostra 4 ja que està molt desviada.

○ DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 1

mostra	concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 1 (mg/ml)
1	0,0332	3349,565	3394,635	3372,10	1,22
2	0,0332	3252,085	3256,531	3254,31	1,18
3	0,0332	3241,166	3218,864	3230,02	1,17
5	0,0332	3470,211	3486,390	3478,30	1,26
6	0,0333	3319,340	3339,881	3329,61	1,20

Taula (5.1.5): Àrees de les injeccions de l'Aminoàcid 1.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Aminoàcid 1:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)
0,0208	1945,347	1936,473	1940,91	99,6

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{0,04}{1,20} \cdot 100 = 2,98$$

Equació (5.1.13): Coeficient de variació.

○ DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 2

mostra	concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 2 (mg/ml)
1	0,0332	2969,171	3009,631	2989,40	38,2
2	0,0332	2881,166	2884,819	2882,99	36,9
3	0,0332	2860,433	2895,479	2877,96	36,8
5	0,0332	3075,974	3109,613	3092,79	39,6
6	0,0333	2939,421	2958,928	2949,17	37,6

Taula (5.1.6): Àrees de les injeccions del D,L-Aminoàcid 2.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró D,L-Aminoàcid 2:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)	factor
0,7960	2668,810	2686,092	2677,45	99,0	1,28

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{1,13}{37,8} \cdot 100 = 2,99$$

Equació (5.1.14): Coeficient de variació.

## PRECISIÓ INTERMITJA

L'avaluació de la precisió intermitja es realitza mitjançant dos grups de 6 determinacions de la mateixa mostra. Cada grup de sis determinacions es realitza en el mateix laboratori, però en condicions operatives diferents: diferent equip, columna i data d'anàlisi.

En els resultats obtinguts en les dues determinacions del grup 2, es descarta la mostra 2 ja que està molt desviada.

Els resultats del grup 1 són aquells obtinguts en la determinació de la repetibilitat.

Condicions d'anàlisi:

- GRUP 1: S'injecten 10 µl de les solucions patró i les solucions problema per duplicat amb el mètode cromatogràfic i les condicions descrites anteriorment (*veure Annex I*).
- GRUP 2: S'injecten 10 µl de les solucions patró i les solucions problema per duplicat amb el mateix mètode cromatogràfic però amb diferent sistema cromatogràfic (*veure Annex V*):

### o DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 1

GRUP1:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 1 (mg/ml)
1	0,0332	3349,565	3394,635	3372,10	1,22
2	0,0332	3252,085	3256,531	3254,31	1,18
3	0,0332	3241,166	3218,864	3230,02	1,17
5	0,0332	3470,211	3486,390	3478,30	1,26
6	0,0333	3319,340	3339,881	3329,61	1,20

Taula (5.1.7): Àrees de les injeccions de l'Aminoàcid 1.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Aminoàcid 1:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)
0,0208	1945,347	1936,473	1940,91	99,6

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{0,04}{1,20} \cdot 100 = 2,98$$

*Equació (5.1.15): Coeficient de variació.*

GRUP 2:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 1 (mg/ml)
1	0,0332	3432,169	3498,893	3465,53	1,22
3	0,0333	3566,869	3624,547	3595,71	1,27
4	0,0329	3352,541	3349,343	3350,94	1,19
5	0,0341	3625,978	3690,927	3658,45	1,26
6	0,0321	3226,224	3301,106	3263,67	1,19

*Taula (5.1.8): Àrees de les injeccions de l'Aminoàcid 1.*

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Aminoàcid 1:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)
0,0201	1888,232	1958,206	1923,22	99,6

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{0,03}{1,23} \cdot 100 = 2,81$$

*Equació (5.1.16): Coeficient de variació.*

L'estimació de la precisió intermitja es realitza amb el càlcul del coeficient de variació dels dotze resultats obtinguts, considerant cada resultat independentment:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{0,04}{1,21} \cdot 100 = 2,89$$

*Equació (5.1.17): Coeficient de variació.*



○ DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 2

GRUP 1:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 2 (mg/ml)
1	0,0332	2969,171	3009,631	2989,40	38,2
2	0,0332	2881,166	2884,819	2882,99	36,9
3	0,0332	2860,433	2895,479	2877,96	36,8
5	0,0332	3075,974	3109,613	3092,79	39,6
6	0,0333	2939,421	2958,928	2949,17	37,6

Taula (5.1.9): Àrees de les injeccions del D,L-Aminoàcid 2.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró D,L-Aminoàcid 2:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)	factor
0,7960	2668,810	2686,092	2677,45	99,0	1,28

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{1,13}{37,8} \cdot 100 = 2,99$$

Equació (5.1.18): Coeficient de variació.

GRUP 2:

mostra	concentració (g/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	contingut Aminoàcid 2 (mg/ml)
1	0,0332	3416,248	3484,596	3450,42	41,6
3	0,0333	3553,648	3609,626	3581,64	43,1
4	0,0329	3329,282	3314,535	3321,91	40,5
5	0,0341	3624,352	3690,296	3657,32	43,0
6	0,0321	3241,025	3264,451	3252,74	40,6

Taula (5.1.10): Àrees de les injeccions del D,L-Aminoàcid 2.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró D,L-Aminoàcid 2:

concentració (mg/ml)	àrea 1	àrea 2	àrea mitjana	riquesa patró (%)	factor
0,7898	2813,916	2824,268	2819,09	99,0	1,28

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{1,25}{41,8} \cdot 100 = 3,00$$

Equació (5.1.19): Coeficient de variació.

Estimació de la precisió intermitja:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{2,35}{39,8} \cdot 100 = 5,91$$

Equació (5.1.20): Coeficient de variació.

## 5.2 CARBOHIDRATS

### A) SELECTIVITAT

La selectivitat del mètode respecte els components coneguts, es comprova injectant les solucions següents:

- *Placebo sense Carbohidrat 1 150 μM*: Es prepara un placebo de la especialitat, constituït per tots els components de la mateixa, excepte pel principi actiu, Carbohidrat 1. Es considera de la mateixa manera que una *solució problema*, es dissolen 100,0 mg d'aquest en 100 ml de fase mòbil. Es dilueix 1 ml d'aquesta solució en 10 ml de fase mòbil.
- *Solució patró Carbohidrat 1 150 μM*: Es dissolen 150,0 mg de carbohidrat 1 patró (de riquesa coneguda) en 100,0 ml de fase mòbil. Es dilueix 1 ml d'aquesta solució amb 50 ml de fase mòbil.

En la selectivitat s'injecten les mostres del producte farmacèutic i es sotmeten a condicions d'estrès:

- *Condicions àcides:* En un matràs aforat de 100 ml, afegir 100,0 mg de mostra i 20 ml de fase mòbil. Afegir la quantitat suficient d'HCl 0,1N per obtenir pH = 2. Deixar 1 hora. Enrasar amb fase mòbil. Diluir 1 ml de la solució en 10 ml de fase mòbil.
- *Condicions bàsiques:* En un matràs aforat de 100 ml, afegir 100,0 mg de mostra i 20 ml de fase mòbil. Afegir la quantitat suficient de NaOH 0,1 N per obtenir pH = 10. Deixar 1 hora. Enrasar amb fase mòbil. Diluir 1 ml de la solució en 10 ml de fase mòbil.
- *Condicions oxidants:* En un matràs aforat de 100 ml, afegir 100,0 mg de mostra i 20 ml de fase mòbil. Afegir 4 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Deixar 1 hora. Enrasar amb fase mòbil. Diluir 1 ml de la solució en 10 ml de fase mòbil.
- *Condicions de calor:* En un matràs aforat de 100 ml, afegir 100,0 mg de mostra i 20 ml de fase mòbil. Tapar i deixar-ho 1 hora en un bany a 80 °C. Enrasar amb fase mòbil. Diluir 1 ml de la solució en 10 ml de fase mòbil.

Segons els resultats obtinguts a partir dels cromatogrames (*veure Annex IV*) es pot concloure que no s'observa cap interferència en els temps de retenció dels pics corresponents al Carbohidrat 1. Tampoc s'observa cap interferència en els cromatogrames obtinguts de la fase mòbil i el placebo.

No s'observa cap interferència en els temps de retenció dels pics de les impureses i productes de degradació obtinguts alhora de sotmetre les mostres a condicions d'estrès.

## B) LINEALITAT I RANG

Es preparen 3 mostres del principi actiu a cinc nivells de concentració: 80%, 90%, 100%, 110% i 120% aproximadament, de la següent forma: en un matràs aforat de 100 ml, es pesa exactament la quantitat de mostra patró corresponent al rang de concentració a estudiar i es dilueix en 100 ml de fase mòbil. Finalment, es dilueix 1 ml de la solució en 50 ml de fase mòbil.

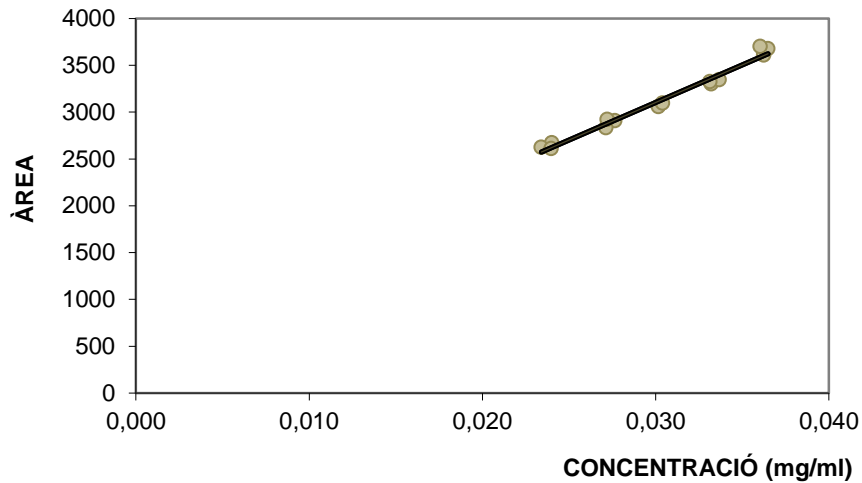
Després de la injecció de les mostres, es realitzen els següents càlculs:

- 1) Càlculs de la regressió lineal.
- 2) Verificació de la linealitat mitjançant el "Test de Linealitat".

Les àrees obtingudes de la injecció de les mostres són les següents:

REGRESSIÓ LINEAL

A continuació es mostra la representació gràfica de la recta obtinguda:



Gràfica (5.2.1): Representació de la linealitat del Carbohidrat 1.

Es substitueixen els resultats obtinguts a l'equació de la recta:

$$y = ax + b \quad \rightarrow \quad y = 80244,60 + 696,21$$

$$R^2 = 0.981$$

$$R = 0.991$$

Equació (5.2.1): Equació de la recta.

TEST DE LINEALITAT

Dos proves per verificar la linealitat:

1) Coefficient de variació dels factors de resposta:

$$CV (\%) = \frac{s_f}{\bar{f}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{4405,63}{103868,85} \cdot 100 = 4,24$$

Equació (5.2.2): Coeficient de variació.

2) Significació estadística de la desviació estàndard de la pendent:

- Càlcul de la “t de Student”:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b} \quad \rightarrow \quad t_{exp} = \frac{|80244,60|}{3200,7} = 25,07$$

Equació (5.1.7): “Test t”.

- Càlcul dels intervals de confiança:

$$b \pm tSb \quad \rightarrow \quad 80244,60 \pm 2,160 \cdot 3200,7$$

Equació (5.2.3): Intervals de confiança.

Els intervals de confiança obtinguts són: [87158,20 ± 73331,00 ]

C) EXACTITUD

S'utilitzen les mateixes mostres que s'han preparat per determinar la linealitat i una mostra de solució patró de Carbohidrat 1. Els resultats obtinguts són els següents:

mostra	concentració (mg/ml) (x)	àrea mitjana (y)	contingut (mg/ml)	recuperació (%)
1 1	0,0240	2670,348	0,0262	109,2
1 2	0,0234	2621,547	0,0258	110,0
1 3	0,0240	2609,626	0,0256	106,9
2 1	0,0276	2907,772	0,0286	103,3
2 2	0,0271	2832,932	0,0278	102,6
2 3	0,0272	2921,809	0,0287	105,5
3 2	0,0302	3058,215	0,0300	99,6
3 3	0,0304	3094,368	0,0304	100,0
4 1	0,0332	3300,905	0,0324	97,7
4 2	0,0337	3344,874	0,0329	97,6
4 3	0,0331	3324,074	0,0327	98,6
5 1	0,0362	3607,875	0,0354	97,8
5 2	0,0365	3676,215	0,0361	99,0
5 3	0,0360	3698,832	0,0363	100,8

Taula (5.2.1): Àrees de les injeccions del Carbohidrat 1.

Solució patró Carbohidrat 1:

<b>concentració (mg/ml)</b>	<b>àrea mitjana</b>
0,0304	3094,368

Es realitzen dos proves per verificar l'exactitud:

1) Recuperació mitjana i coeficient de variació:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{r}_m}}{\bar{r}_m} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{4,33}{102,1} \cdot 100 = 4,24$$

*Equació (5.2.4): Coeficient de variació.*

2) Test t:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{r}_m - 100| \cdot \sqrt{n}}{CV} \quad \rightarrow \quad t_{exp} = \frac{|102,1 - 100| \cdot \sqrt{15}}{4,24} = 1,872$$

*Equació (5.2.5): "Test t".*

## D) PRECISIÓ

La precisió s'avalua a dos nivells:

### REPETIBILITAT

La repetibilitat d'un mètode es determina mitjançant sis determinacions de la mateixa mostra de producte a la concentració nominal. Es comprova injectant les solucions següents:

- *Solució patró Carbohidrat 1:* Es dissolen 150,0 mg de carbohidrat 1 patró (de riquesa coneguda) en 100,0 ml de fase mòbil. Es dilueix 1 ml d'aquesta solució amb 50 ml de fase mòbil.
- *6 solucions problema.* Es dissolen 100,0 mg del producte farmacèutic en 100 ml de fase mòbil. Es dilueix 1 ml d'aquesta solució en 10 ml de fase mòbil.

Els resultats obtinguts són:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea	contingut Carbohidrat 1 (mg/ml)
1	0,1086	3204,868	320,1
2	0,1309	3624,158	300,2
3	0,1212	3503,299	313,3
4	0,1023	2802,256	297,1
5	0,1081	3027,745	303,7
6	0,1235	3543,128	311,2

Taula (5.2.2): Àrees de les injeccions del Carbohidrat 1.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Carbohidrat 1:

concentració (mg/ml)	àrea	riquesa patró (%)
0,0302	2851,576	90,9

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{8,76}{307,6} \cdot 100 = 2,85$$

Equació (5.2.6): Coeficient de variació.

## PRECISIÓ INTERMITJA

L'avaluació de la precisió intermitja es realitza mitjançant dos grups de 6 determinacions de la mateixa mostra. Cada grup de sis determinacions es realitza en el mateix laboratori, però en condicions operatives diferents: diferent equip, columna i data d'anàlisi.

Els resultats del grup 1 són aquells obtinguts en la determinació de la repetibilitat.

Condicions d'anàlisi:

- GRUP 1: S'injecten 20 µl de la solució patró i les solucions problema amb el mètode cromatogràfic i les condicions descrites anteriorment (*veure Annex II*).
- GRUP 2: S'injecten 20 µl de les solucions patró i les solucions problema amb el mateix mètode i sistema cromatogràfic però amb diferent columna, analista i data d'anàlisi.

GRUP1:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea	contingut Carbohidrat 1 (mg/ml)
1	0,1086	3204,868	320,1
2	0,1309	3624,158	300,2
3	0,1212	3503,299	313,3
4	0,1023	2802,256	297,1
5	0,1081	3027,745	303,7
6	0,1235	3543,128	311,2

Taula (5.2.3): Àrees de les injeccions del Carbohidrat 1.

Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Carbohidrat 1:

concentració (mg/ml)	àrea	riquesa patró (%)
0,0302	2851,576	90,9

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{8,76}{307,6} \cdot 100 = 2,85$$

Equació (5.2.7): Coeficient de variació.

GRUP 2:

mostra	concentració (mg/ml)	àrea	contingut Carbohidrat 1 (mg/ml)
1	0,1255	4868,663	293,7
2	0,1227	4737,701	292,3
3	0,1223	4640,301	287,0
4	0,1076	4088,591	287,5
5	0,1021	3714,368	275,3
6	0,1181	4268,253	273,6

Taula (5.2.4): Àrees de les injeccions del Carbohidrat 1.



Densitat producte farmacèutic (g/mL) = 1,127

Solució patró Carbohidrat 1:

<b>concentració (mg/ml)</b>	<b>àrea</b>	<b>riquesa patró (%)</b>
0,0300	4067,983	90,9

Resultats obtinguts:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{8,51}{284,9} \cdot 100 = 2,99$$

*Equació (5.2.8):* Coeficient de variació.

L'estimació de la precisió intermitja es realitza amb el càlcul del coeficient de variació dels dotze resultats obtinguts, considerant cada resultat independentment:

$$CV (\%) = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \rightarrow \quad CV (\%) = \frac{14,4}{296,2} \cdot 100 = 4,87$$

*Equació (5.2.9):* Coeficient de variació.

## 6. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

A continuació es mostra una taula resum de cada principi actiu. En aquestes, es determina si els resultats obtinguts dels paràmetres avaluats compleixen o no els criteris d'acceptació habituals per tal de poder concloure que els dos mètodes són vàlids en la determinació d'aquell principi actiu en concret.

### 6.1. AMINOÀCIDS

#### A) DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 1

PARÀMETRE AVALUAT	RESULTAT	CRITERIS D'ACCEPTACIÓ	CONCLUSIÓ
Selectivitat	No hi ha interferències.	No hi ha interferències del placebo ni de la fase mòbil en el temps de retenció de l'Aminoàcid 1.	Compleix
Linealitat	$r = 0,993$ $CV = 1,77\%$ $22,98 > 2,306$ $199775,79 \pm 116377,64$	$r \geq 0,990$ $CV \leq 5\%$ $t_{exp} > t_{Student}$ Els intervals de confiança no haurien d'incloure el 0.	Compleix
Repetibilitat	$CV = 2,98\%$	$CV \leq 3 \%$	Compleix
Precisió intermitja	$CV = 2,89\%$	$CV \leq 6 \%$	Compleix
Exactitud	$CV = 1,77$ $\bar{r}_m \% = 99,6$ $0,874 > 2,228$	$CV \leq 5\%$ $\bar{r}_m \% = 97,0 - 103,0 \%$ $t_{exp} \leq t_{Student}$	Compleix

6.2. DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID 2

PARÀMETRE AVALUAT	RESULTAT	CRITERIS D'ACCEPTACIÓ	CONCLUSIÓ
Selectivitat	No hi ha interferències.	No hi ha interferències del placebo ni de la fase mòbil en el temps de retenció de l'Aminoàcid 2.	Compleix
Linealitat i Rang	$r = 0,992$ $CV = 2,26\%$ $21,65 > 2,306$ $25447,82 \pm 20831,09$	$r \geq 0,990$ $CV \leq 5\%$ $t_{exp} > t_{tabulada}$ Els intervals de confiança no haurien d'incloure el 0.	Compleix
Repetibilitat	$CV = 2,99\%$	$CV \leq 3 \%$	Compleix
Precisió intermitja	$CV = 5,91\%$	$CV \leq 6 \%$	Compleix
Exactitud	$CV = 1,77$ $\bar{r}_m \% = 99,6$ $0,874 > 2,228$	$CV \leq 5\%$ $\bar{r}_m \% = 97,0 - 103,0 \%$ $t_{exp} \leq t_{teòrica}$	Compleix

## 6.2. CARBOHIDRATS

### DETERMINACIÓ DEL CARBOHIDRAT 1

PARÀMETRE AVALUAT	RESULTAT	CRITERIS D'ACCEPTACIÓ	CONCLUSIÓ
Selectivitat	No hi ha interferències.	No hi ha interferències del placebo ni de la fase mòbil en el temps de retenció del Carbohidrat 1.	Compleix
Linealitat i Rang	$r = 0,991$ $CV = 4,24$ $25,07 > 2,160$ $87158,20 \pm 73331,00$	$r \geq 0,990$ $CV \leq 5\%$ $t_{exp} > t_{tabulada}$ Els intervals de confiança no inclouen el 0.	Compleix
Repetibilitat	$CV = 2,85$	$CV \leq 3\%$	Compleix
Precisió intermitja	$CV = 4,87$	$CV \leq 6\%$	Compleix
Exactitud	$CV = 4,24$ $\bar{r}_m \% = 102,1$ $1,872 > 2,145$	$CV \leq 5\%$ $\bar{r}_m \% = 97,0 - 103,0 \%$ $t_{exp} \leq t_{teòrica}$	Compleix

## 7. CONCLUSIONS

Segons els resultats obtinguts en aquest treball i, d'acord amb els objectius plantejats, podem concloure que:

- 1) Els dos mètodes validats són aptes per la determinació dels aminoàcids (Aminoàcid 1 i Aminoàcid 2) i per la determinació del Carbohidrat 1 ja que compleixen tots els paràmetres estadístics per a poder ser validats segons com ho contempla la ICH. Aquestes mètodes, són: precisos ja que ens permeten obtenir resultats repetitius i reproduïbles; exactes perquè ens permeten la recuperació total de l'analit present en la mostra i selectius ja que ens permeten l'anàlisi dels principis actius sense interferències, ja sigui d'impureses, productes de degradació, ...
- 2) El mètode per la determinació de carbohidrats no és vàlid per el Carbohidrat 2, ja que durant el desenvolupament es va detectar que una bona part del Carbohidrat 2 passava a Carbohidrat 1 (desplaçament de l'equilibri ceto-enòlic que hi ha entre el Carbohidrat 1 i el Carbohidrat 2). És per aquest motiu, que es pot concloure que aquest mètode no és vàlid i es recomana seguir investigant per a poder desenvolupar un mètode analític adient.

## 8. BIBLIOGRAFIA

AGUIRRE ORTEGA, Leticia et al. *Validación de métodos analíticos. Monografías de AEFI*. Barcelona: Asociación española de farmacéuticos de la industria , 2001.

VIVET, MARIA. “Validación de métodos analíticos (PNT VMA 10000/14-2)”, DIVASA-FARMAVIC, S.A, (2014): 1-13.

WATERS. “The science of what’s possible”. © Waters Corporation, (2009).

GUIDEDANCE FOR INDUSTRY. *Q2B Validation for analytical procedures: Methodology*. (EMA/CVMP/VICH/591/98), 1996.

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf> (Consulta: maig de 2014).

ICH Topic Q2A. *Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology*. (EMA/CVMP/590/98), 1995.

<http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf> (Consulta: maig de 2014).

Inspección de Normas de Correcta Fabricación:

<http://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/home.htm> (Consulta: maig de 2014).

FARMACOPEA EUROPEA. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. <http://www.edqm.eu/en/edqm-homepage-628.html> (Consulta: maig de 2014).

ANTEC. “Carbohydrates in Food”. © Antec Proven Performance: [www.myantec.com](http://www.myantec.com) (Consulta: maig de 2014).

## ANNEXOS

### ANNEX I:

Protocol utilitzat per validar el mètode analític per la determinació de l'Aminoàcid 1 i de l'Aminoàcid 2 del producte farmacèutic analitzat:

#### MATERIALS I REACTIUS

- Balança analítica amb la precisió de dècima de mil·ligram.
- Placa calefactora
- Micropipeta per volums de 10 – 70 µL i 1,0 mL.
- Vòrtex
- Tubs Eppendorf
- Matraus aforats de 10, 50 i 10 mL.
- Pipetes aforades de 1,0 i 5,0 mL.
- Concentrat AccQ-Tag Eluent A
- Kit derivatitzant AccQ-Fluor (consta de 3 reactius: vial 1, vial 2A i vial 2B)
- Aigua grau HPLC (H<sub>2</sub>O)
- Acetonitril grau HPLC (ACN)

#### SISTEMA CROMATOGRÀFIC

Cromatògraf: AGILENT SERIES 1100  
Desgasificador (G1322A)  
Bomba Quaternària (G1311A)  
Injector Automàtic (G1313A)  
Compartimento de columna termostatitzat G1316A

Detector: Diode Array (G1315A)

Columna: NOVA-PACK C18 150 x 3,9 mm 4 µm (o sistema cromatogràfic equivalent).

#### CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

Eluents: - Eluent A: Diluir 100 mL del concentrat AccQ-Tag amb 1000 L d' Aigua grau HPLC. Aquesta solució és estable 1 mes a 4 °C.

- Eluent B: Acetonitril grau HPLC.

- Eluent C: Aigua grau HPLC.

NOTA: Abans de començar l'anàlisi, acondicionar la columna durant 5 minuts amb 60% Eluent B: 40% Eluent C a 1 ml/min. Equilibrar la columna al 100% amb Eluent A durant 10 minuts a 1 ml/min.

Elució: en gradient

Temps (min)	%A	%B	%C
0.0	100	0	0
0.5	99	1	0
18.0	95	5	0
19.0	91	9	0
29.5	83	17	0
33.0	0	60	40
36.0	100	0	0
45.0	100	0	0

Flux: 1,0 mL/min

Detector UV: 254 nm

Volum d'injecció: 10 µL

Temps d'anàlisi: 30 + 15 min

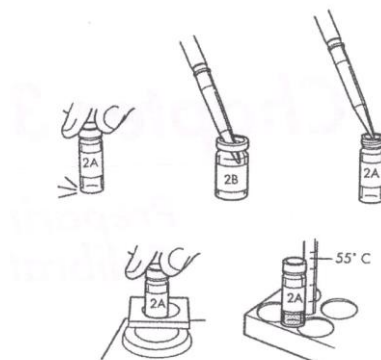
Temperatura de la columna: 37 °C

#### RECONSTITUENT DEL REACTIU DERIVATITZANT ACCQ·FLUOR

1. Escalfar la placa calefactora a 55 °C.
2. Colpejar lleugerament el vial 2A per assegurar que tota la pols del reactiu AccQ·Fluor es troba a la base del vial.



3. Netejar la punta de la micropipeta aspirant i descartant 1,0 mL del diluent pel reactiu AccQ·Fluor (vial 2B).
4. Transferir 1,0 mL del diluent pel reactiu AccQ·Fluor (vial 2B) al vial 2A. Capsular el vial.
5. Agitar amb el vòrtex durant 10 segons.
6. Escalfar el vial 2A a la placa calefactors fins que la pols del reactiu AccQ·Fluor s'hagi dissolt.
7. No escalfar més de 10 minuts.



El reactiu AccQ·Fluor reconstituït ha de conservar-se en un dessecador a temperatura ambient. Llançar a la setmana de la seva reconstitució.

### SOLUCIONS NECESSÀRIES

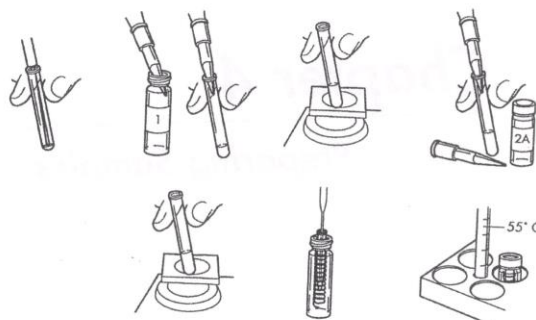
*Solució problema.* Es pesen exactament 8,3 g de PRODUCTE EN ESTUDI (sol. inj.) a analitzar i es dilueixen en 50 mL de HCl 0,01 N.

*Solució patró Aminoàcid 1:* Es pesen exactament 20 mg d'Aminoàcid 1 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 mL de HCl 0,01 N.

*Solució patró D,L-Aminoàcid 2:* Es pesen exactament 20 mg de D,L-Aminoàcid 2 patró (de riquesa coneguda) i es dilueixen en 100 mL de HCl 0,01 N.

### DERIVATITZACIÓ DE LA SOLUCIÓ PATRÓ

1. Introduir 10 µL de la solució patró a derivatitzar en un tub Eppendorf.
2. Netejar la punta de la micropipeta (aspirant i descartant) 70 µL del tampó borat AccQ·Fluor (vial 1).
3. Afegir 70 µL del tampó borat AccQ·Fluor (vial 1). Agitar amb el vòrtex durant 10 segons.
4. Netejar la punta de la micropipeta (aspirant i descartant) 20 µL del reactiu AccQ·Fluor reconstituït.



5. Afegir 20  $\mu\text{L}$  del reactiu AccQ-Fluor reconstituït. Agitar amb el vòrtex immediatament durant 10 segons.
6. Deixar reposar a temperatura ambient durant 1 minut.
7. Prendre el contingut del tub Eppendorf amb una pipeta Pasteur e introduir-lo en un vial de HPLC amb un insert per a volums petits. Capsular.

Les solucions derivatitzades poden conservar-se a temperatura ambient durant una setmana.

#### DERIVATITZACIÓ DE LA SOLUCIÓ PROBI FMA

1. Introduir 20  $\mu\text{L}$  de la solució problema a derivatitzar en un tub Eppendorf.
2. Netejar la punta de la micropipeta aspirant i descartant 60  $\mu\text{L}$  del tampó borat AccQ-Fluor (vial 1).
3. Afegir 60  $\mu\text{L}$  del tampó borat AccQ-Fluor (vial 1). Agitar amb el vòrtex durant 10 segons.
4. Netejar la punta de la micropipeta (aspirant i descartant) 20  $\mu\text{L}$  del reactiu AccQ-Fluor reconstituït.
5. Afegir 20  $\mu\text{L}$  del reactiu AccQ-Fluor reconstituït. Agitar amb el vòrtex immediatament durant 10 segons.
6. Deixar reposar a temperatura ambient durant 1 minut.
7. Prendre el contingut del tub Eppendorf amb una pipeta Pasteur e introduir-lo en un vial de HPLC amb un insert per a volums petits. Capsular.

#### DERIVATITZACIÓ DEL BLANC

1. Netejar la punta de la micropipeta aspirant i descartant 80  $\mu\text{L}$  del tampó borat AccQ-Fluor (vial 1).
2. Afegir 80  $\mu\text{L}$  del tampó borat AccQ-Fluor (vial 1) en un tub Eppendorf.
3. Netejar la punta de la micropipeta (aspirant i descartant) 20  $\mu\text{L}$  del reactiu AccQ-Fluor reconstituït.
4. Afegir 20  $\mu\text{L}$  del reactiu AccQ-Fluor reconstituït. Agitar amb el vòrtex immediatament durant 10 segons.
5. Deixar reposar a temperatura ambient durant 1 minut.
6. Prendre el contingut del tub Eppendorf amb una pipeta Pasteur e introduir-lo en un vial de HPLC amb un insert per a volums petits. Capsular.

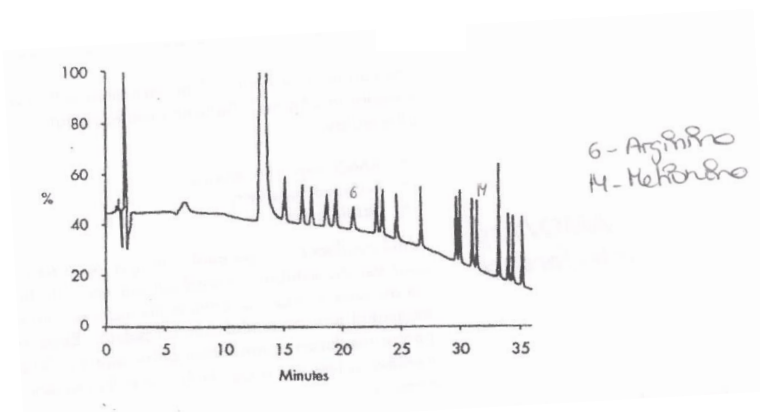
## INJECCIÓ DE LES MOSTRES DERIVATITZADES

Realitzar un gradient blanc abans de començar a injectar les mostres. S'injecten 10 µL del *blanc* i de la *solució problema* i la *solució patró* per duplicat amb el mètode cromatogràfic descrit.

## IDENTIFICACIÓ

L'identificació dels pics d'Aminoàcid 1 i Aminoàcid 2 es realitzen per comparació del temps de retenció dels pics obtingut amb la *solució problema* i la *solució patró*.

El pic d'Aminoàcid 1 elueix primer, al voltant dels 20 minuts. El pic de Aminoàcid 2 elueix als 32 minuts aproximadament. Veure cromatograma adjunt.



## CÁLCULS

El contingut d'Aminoàcid 1 i Aminoàcid 2 s'obtenen per comparació de les àrees dels pics obtinguts amb la *solució problema* i la *solució patró*.

$$\text{Contingut aminoàcid (mg/ml)} = \frac{A_p \times C_s \times F \times D}{A_s \times C_p}$$

- As - Àrea mitjana del pic corresponent a l'aminoàcid a quantificar de les 2 injeccions de la solució patró.
- Ap - Àrea mitjana del pic corresponent a l'aminoàcid a quantificar de les 2 injeccions de la solució problema.
- Cs - Concentració de la solució patró en mg/ml.

- Cp - Concentració de la *solució problema* en g/ml.
- F - Factor degut a la riquesa del patró.
- D - Densitat PRODUCTE EN ESTUDI (sol. inj.) en g/ml.

## **ANNEX II:**

Protocol utilitzat per validar el mètode analític per la determinació del Carbohidrat 1 i del Carbohidrat 2 del producte farmacèutic.

### MATERIALS I REACTIUS

- Balança analítica amb la precisió de dècima de mil·ligram.
- Balança analítica amb la precisió de la dècima de mil·ligram.
- Matraus aforats de 10, 50 i 100 mL.
- Pipetes aforades de 1 ml
- Acetat de sodi
- Solució d'Hidròxid de Sodi al 50%
- Solució d'Hidròxid de Sodi 0,2M
- Aigua grau HPLC (ELGA PURELAB)

### SISTEMA CROMATOGRÀFIC

Cromatògraf: AGILENT SERIES 1100  
Desgasificador (G1322A)  
Bomba Quaternària (G1311A)  
Injector Automàtic (G1313A)  
Detector: DECADE II ANTEC LEYDEN  
Columna: HAMILTON RCX-10 250 x 4,6 mm 7 µm

### CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

Fase mòbil: Sonica 1L d'Aigua per HPLC durant 15 minuts per tal d'eliminar el CO<sub>2</sub> dissolt que pugui contenir.  
En una ampolla de plàstic, dissoldre 0.08g d'Acetat de Sodi Anhidric en 1L d'Aigua. Afegir 1,5mL de solució d'Hidròxid de Sodi al 50%. Sonicar durant 15 minuts. Desgasificar contínuament amb Heli.  
(PREPARAR LA FASE MÒBIL DIARIAMENT)

Flux: 2,0 mL/min.

Detector UV: 230 nm

Volum d'injecció: 20 µL

Temps d'anàlisi: 10 min.

Temperatura columna: 30 °C

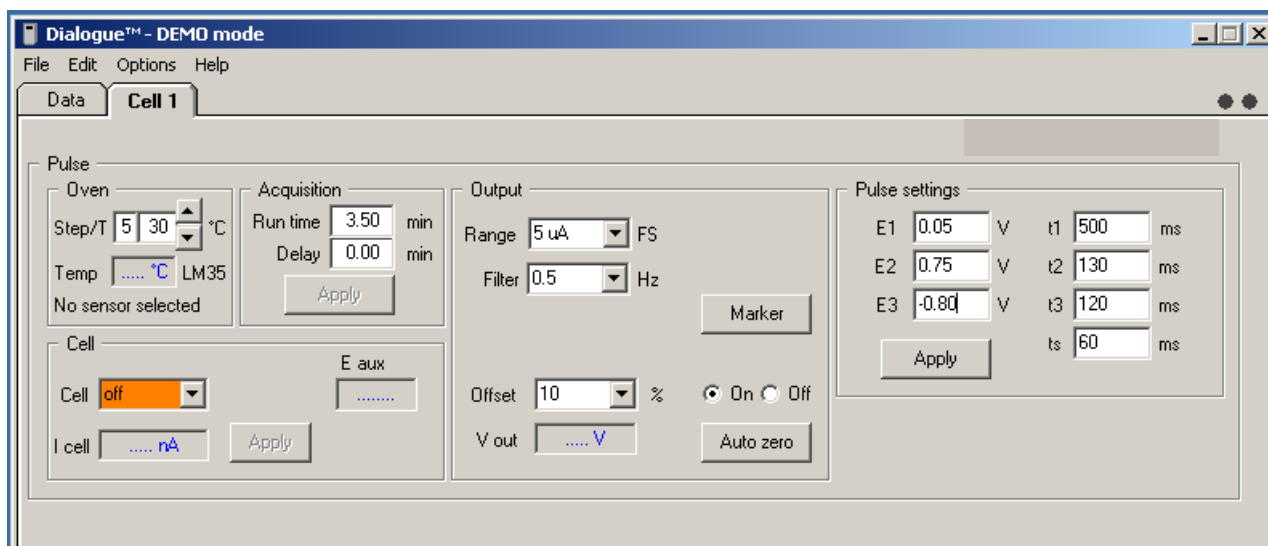
CONDICIONS DE DETECCIÓ

Detecció amperomètrica en mode “pulso” amb un elèctrode indicador d'or i un elèctrode de referència Ag/AgCl. Els potencials aplicats són els següents:

Temps (ms)	Potencial (V)
ts: 60 t1: 500	+ 0,05
130	+ 0,75
120	- 0,80

S'apliquen tres potencials: + 0,05 V detecció, + 0,75 V oxidació, -0,80 V reducció.

A continuació s'adjunten les condicions introduïdes amb el programa DECADE II:



### SOLUCIONS NECESSÀRIES

*Solució problema.* Es pesen exactament 100,0 mg de PRODUCTE EN ESTUDI (sol. inj.) a analitzar en 100 ml de fase mòbil. Diluir 1 ml d'aquesta solució amb 10 ml de fase mòbil.

*Solució patró Carbohidrat 1 150 µM y carbohidrat 2 50 µM:* Es dissolent 150,0 mg de Carbohidrat 1 patró (de riquesa coneguda) i 45,0 mg de Carbohidrat 2 patró (de riquesa coneguda) en 100,0 ml de fase mòbil. Diluir 1 ml d'aquesta solució en 50 ml de fase mòbil.

Injectar la dissolució patró i la dissolució problema amb el mètode cromatogràfic descrit.

### REGENERACIÓ DE LA COLUMNA

Si durant l'anàlisi s'observa una pèrdua en la retenció dels carbohidrats, la columna ha de regenerar-se. Regenerar la columna passant 30-60 ml d'Hidròxid de Sodi 0,2M lliure de carbonats. Després de la regeneració, reequilibrar la columna amb fase mòbil durant 5 hores a 2 ml/min.

### CÁLCULS

El contingut del Carbohidrat 1 s'obté per comparació de les àrees dels pics obtinguts amb la *solució problema* i la *solució patró*.

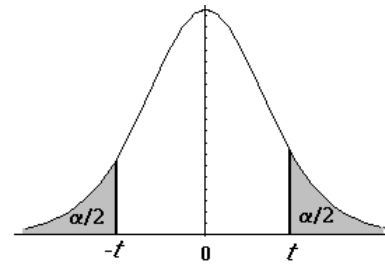
$$\text{Contingut carbohidrat (mg/ml)} = \frac{A_p \times C_s \times F \times D}{A_s \times C_p}$$

- As - Àrea mitjana del pic corresponent al carbohidrat a quantificar de les 2 injeccions de la solució patró.
- Ap - Àrea mitjana del pic corresponent al carbohidrat a quantificar de les 2 injeccions de la solució problema.
- Cs - Concentració de la solució patró en mg/ml.
- Cp - Concentració de la solució problema en g/ml.
- F - Factor degut a la riquesa del patró.
- D - Densitat PRODUCTE EN ESTUDI (sol. inj.) en g/ml.

**ANNEX III:**

TAULA DE LA T DE STUDENT

Conté els valors  $t$ , tals que:  $p[T > t] = \alpha$ ,  
 on  $n$  són els graus de llibertat



$n \setminus \alpha$	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,1584	0,3249	0,5095	1,0000	1,9626	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6550	638,5778
2	0,1421	0,2887	0,4447	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	31,5998
3	0,1366	0,2767	0,4242	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	12,9244
4	0,1338	0,2707	0,4142	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,8041	8,6101
5	0,1322	0,2672	0,4082	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8685
6	0,1311	0,2648	0,4043	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9587
7	0,1303	0,2632	0,4015	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	5,4081
8	0,1297	0,2619	0,3995	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0414
9	0,1293	0,2610	0,3979	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,2602	0,3966	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5888
11	0,1286	0,2596	0,3956	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4369
12	0,1283	0,2590	0,3947	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,2586	0,3940	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2209
14	0,1280	0,2582	0,3933	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1403
15	0,1278	0,2579	0,3928	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,2576	0,3923	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0149
17	0,1276	0,2573	0,3919	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,2571	0,3915	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9217
19	0,1274	0,2569	0,3912	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8833
20	0,1273	0,2567	0,3909	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8496
21	0,1272	0,2566	0,3906	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,2564	0,3904	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7922
23	0,1271	0,2563	0,3902	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,2562	0,3900	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,7454
25	0,1269	0,2561	0,3898	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251
26	0,1269	0,2560	0,3896	0,6840	1,0575	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,7067
27	0,1268	0,2559	0,3894	0,6837	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,6895
28	0,1268	0,2558	0,3893	0,6834	1,0560	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,6739
29	0,1268	0,2557	0,3892	0,6830	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,6595
30	0,1267	0,2556	0,3890	0,6828	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,6460
40	0,1265	0,2550	0,3881	0,6807	1,0500	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,5510
80	0,1261	0,2542	0,3867	0,6776	1,0432	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	3,4164
120	0,1259	0,2539	0,3862	0,6765	1,0409	1,2886	1,6576	1,9799	2,3578	2,6174	3,3734
$\infty$	0,126	0,253	0,385	0,674	1,036	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576	3,291



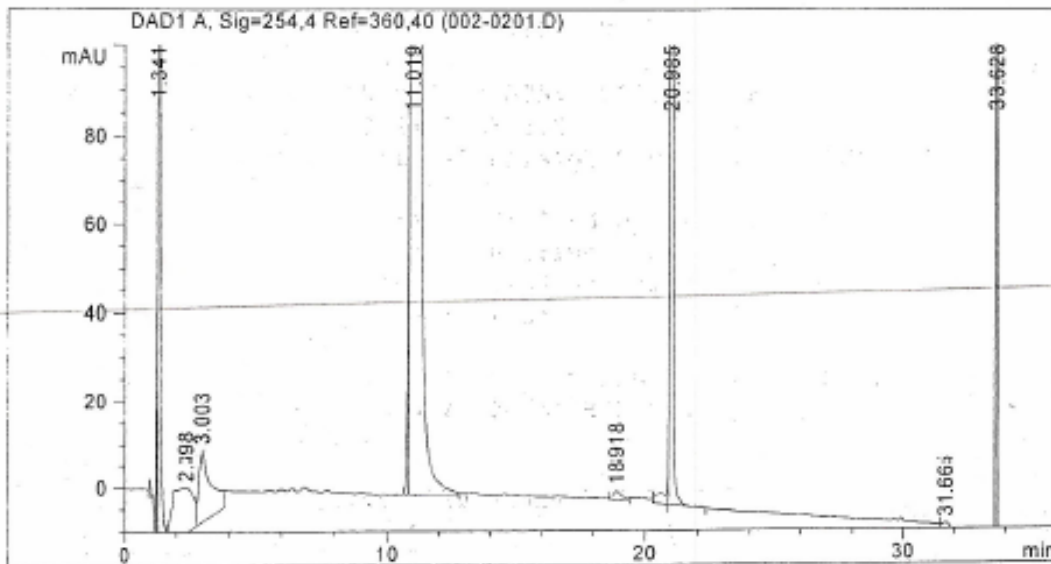
**ANNEX IV:**

**A) AMINOÀCIDS**

Cromatogrames obtinguts amb el mètode utilitzat per la determinació d'aminoàcids:

**LINEALITAT 1.1 → LINEALITAT I EXACTITUD AMINOÀCID 1**

Sample Info : LINEALITAT 1.1 --> LINEALITAT I EXACTITUD AMINOÀCID 1  
 16.08 mg / 100 ml, HCL 0.01N



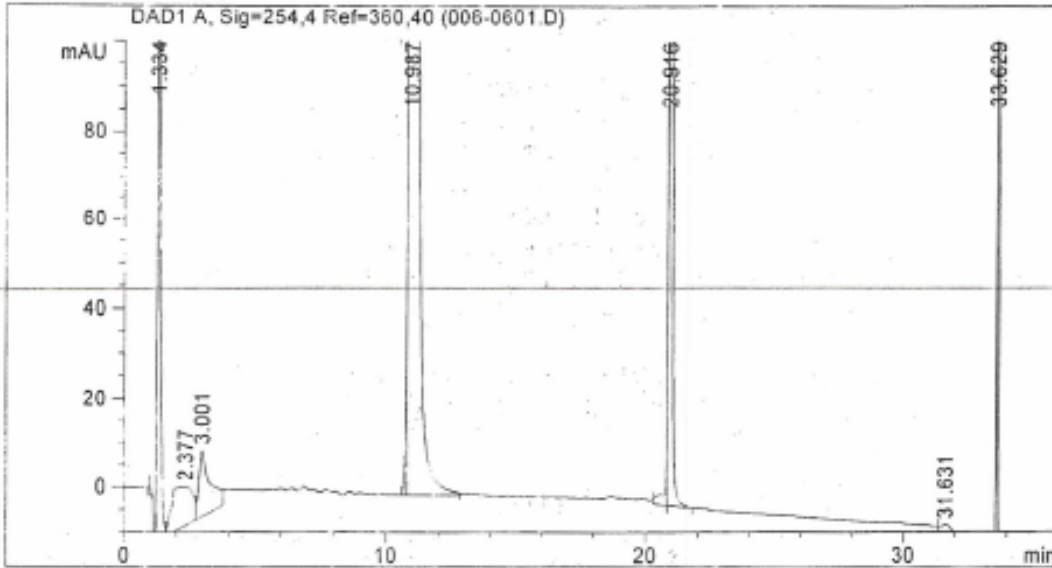
Area Percent Report

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.341	BV	0.0888	2241.20728	535.87952	6.1795
2	2.398	VV	0.7848	613.74902	10.39608	1.6922
3	3.003	VB	0.4348	536.93890	16.89213	1.4804
4	11.019	BB	0.2115	2.61965e4	1965.87195	72.2291
5	18.918	BB	0.3793	59.58378	2.26212	0.1643
6	20.985	BB	0.1119	3075.09399	499.25177	8.4787
7	31.665	BV	1.4822	1317.28223	11.83854	3.6320
8	33.628	VV	0.0938	2228.29346	483.23135	6.1439

Sample Info : LINEALITAT 3.1 --> LINEALITAT I EXACTITUD AMINOÀCID 1  
 20.64 mg / 100 ml HCL 0.01N



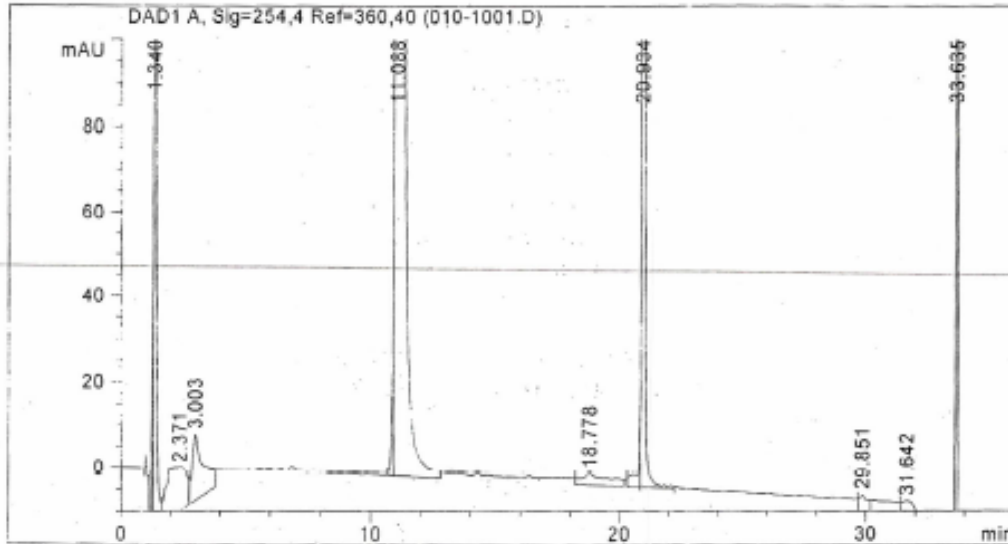
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.334	BV	0.0902	2153.50928	500.54773	6.0568
2	2.377	VV	0.8477	492.91235	8.56168	1.3863
3	3.001	VB	0.4084	440.97339	14.93730	1.2403
4	10.987	BB	0.2124	2.52032e4	1880.48376	70.8848
5	20.916	BB	0.1116	3824.62402	623.10559	10.7569
6	31.631	BV	1.5557	1306.26306	11.24100	3.6739
7	33.629	VV	0.0917	2133.66138	481.46362	6.0010

Sample Info : LINEALITAT 5.1 --> LINEALITAT I EXACTITUD AMINOÀCID 1  
 24.04 mg / 100 ml HCL 0.01N



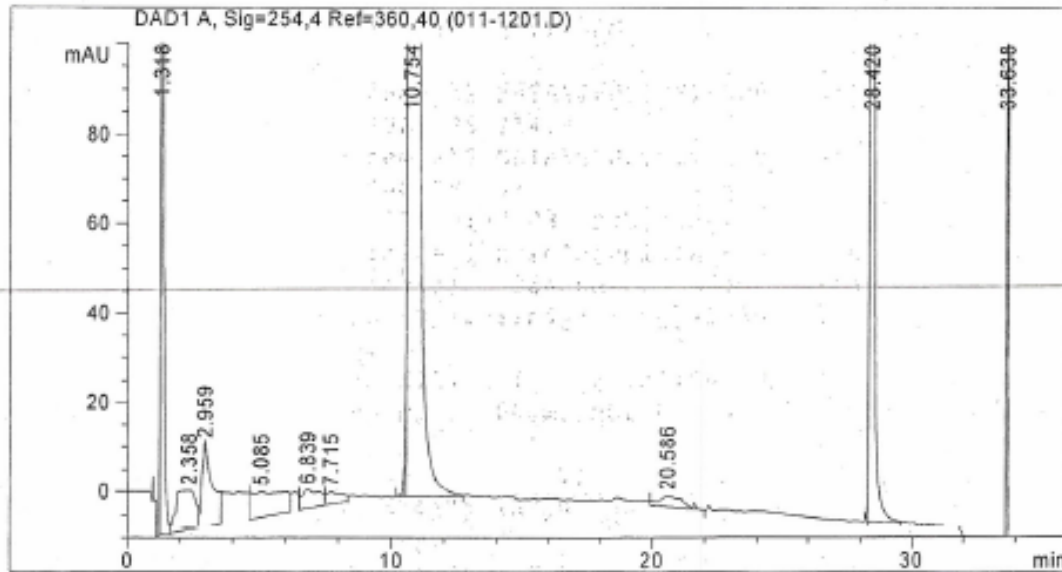
Area Percent Report

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.340	BV	0.0872	2315.53467	572.66502	5.8415
2	2.371	VV	0.8827	609.48584	10.06176	1.5376
3	3.003	VB	0.4352	488.08005	15.33930	1.2313
4	11.088	BB	0.2155	2.66383e4	1949.01929	67.2015
5	18.778	BB	0.9780	200.44717	2.58109	0.5057
6	20.934	BB	0.1119	4571.96924	741.44482	11.5339
7	29.851	BB	0.4032	247.52251	8.12933	0.6244
8	31.642	BV	1.4354	2056.28906	19.41919	5.1875
9	33.635	VV	0.0836	2511.82056	567.80096	6.3367

Sample Info : LINEALITAT 1.1 --> VALIDACIÓ MÈTODE D,L-AMINOÀCID 2  
 16.49 mg / 100 ml HCL 0.01N



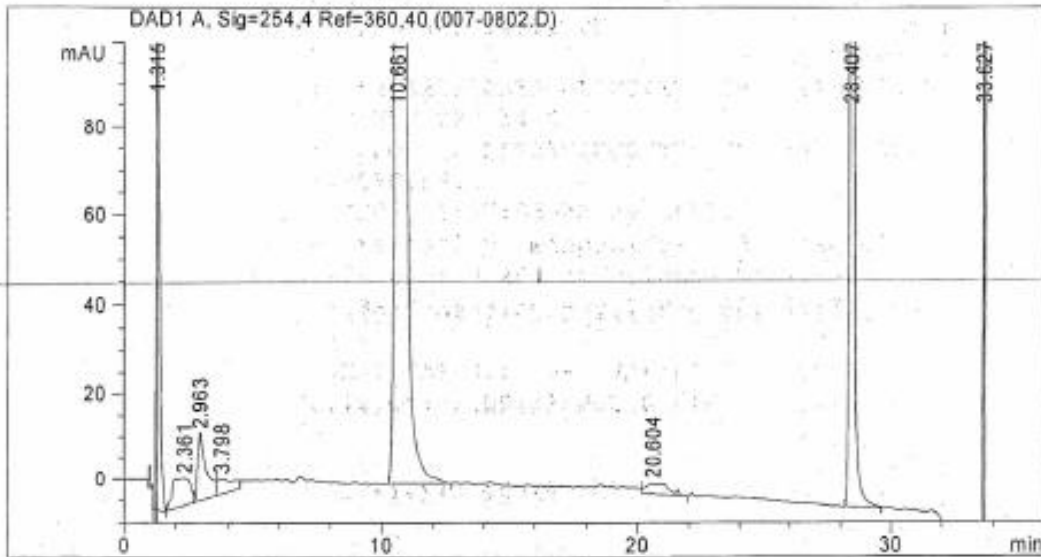
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.318	BV	0.0841	2259.91309	601.02197	6.1372
2	2.358	VV	0.7130	445.43051	8.53261	1.2043
3	2.959	VB	0.3812	515.11176	18.48135	1.3927
4	5.085	BB	1.0802	462.06106	5.38999	1.2493
5	6.839	BB	0.6011	185.09708	4.02046	0.5004
6	7.715	BB	0.5361	105.76729	2.61386	0.2860
7	10.754	BB	0.2281	2.79738e4	1896.58936	75.6331
8	20.586	BV	0.9455	157.41904	2.29141	0.4256
9	28.420	BB	0.1459	3971.75293	473.45398	10.7385
10	33.638	BV	0.0739	899.81232	250.60078	2.4328

Sample Info : LINEALITAT 3.1 --> VALIDACIÓ MÈTODE D,L-AMINOÀCID 2  
 20.72.mg / 100.ml HCL 0.01N



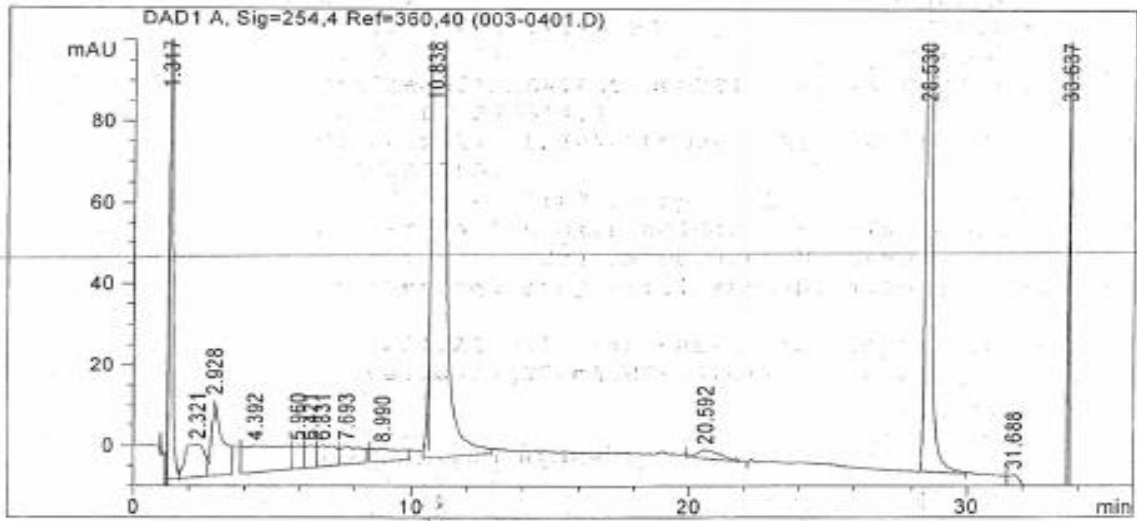
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.315	BV	0.0837	2215.21582	591.90698	6.1367
2	2.361	VV	0.6964	316.00766	6.30878	0.8754
3	2.963	VV	0.3280	363.60898	15.59420	1.0073
4	3.798	VB	0.5981	155.00735	3.43740	0.4294
5	10.661	BB	0.2404	2.71644e4	1796.28650	75.2522
6	20.604	VV	0.8630	154.96799	2.43318	0.4293
7	28.407	BB	0.1334	4909.96777	613.49493	13.6018
8	33.627	BV	0.0841	818.65900	216.39078	2.2679

Sample Info : LINEALITAT 5.1 --> VALIDACIÓ MÈTODE D,L-AMINOÀCID 2  
 24.09.mg / -100 ml HCL 0.01N



-----  
 Area Percent Report  
 -----

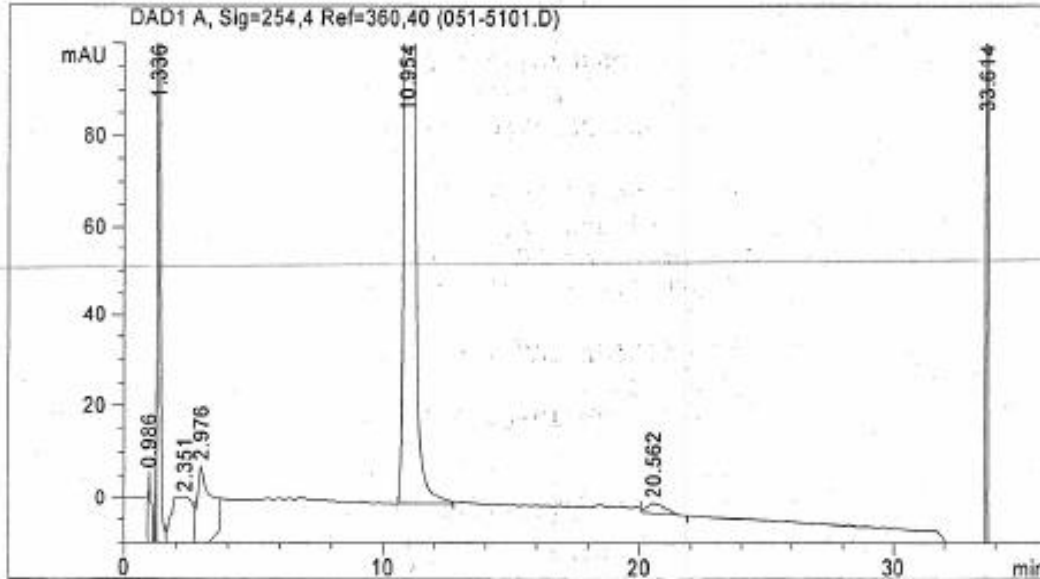
Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.317	BV	0.0837	2210.42798	589.62695	5.5072
2	2.321	VV	0.6627	395.01801	8.13212	0.9842
3	2.928	VB	0.3923	526.47034	18.70793	1.3117
4	4.392	BV	1.3167	695.74695	6.60628	1.7334
5	5.960	VV	0.3457	141.42862	5.69472	0.3524
6	6.421	VV	0.3592	139.82040	5.52665	0.3484
7	6.831	VV	0.5916	239.57896	5.21814	0.5969
8	7.693	VB	0.6482	228.87515	4.63407	0.5702
9	8.990	BB	0.9374	250.47218	3.37686	0.6240
10	10.838	BB	0.2330	2.61439e4	1723.02356	65.1366
11	20.592	BV	0.9581	154.77963	2.26254	0.3856
12	28.530	BB	0.1451	6501.73584	781.52051	16.1989
13	31.688	BV	1.4853	1384.15686	12.18466	3.4486
14	33.637	VV	0.0920	1124.63342	218.72310	2.8020

Sample Info : ST. BLANC

80 microL AccQ-Fluor (1) + 20 microL AccQ-Fluor (2A)



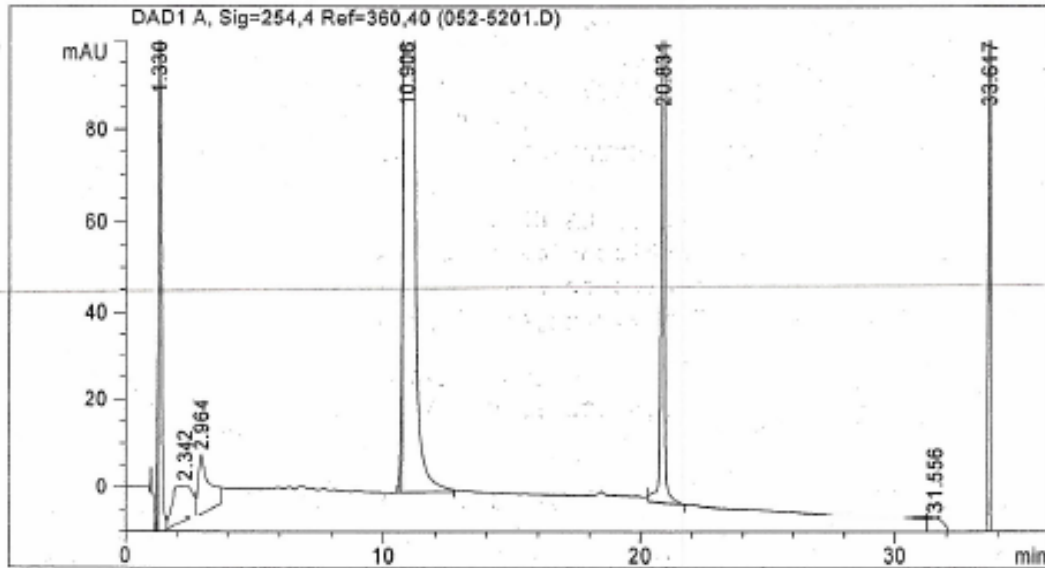
-----  
 Area Percent Report  
 -----

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.986	BV	0.1678	264.60223	24.15211	0.8283
2	1.336	VV	0.1001	2338.38013	454.27707	7.3201
3	2.351	VV	0.8579	1066.15491	16.49886	3.3375
4	2.976	VB	0.4848	683.80060	18.95761	2.1406
5	10.954	BB	0.1992	2.49133e4	1922.09973	77.9890
6	20.562	BB	0.7030	114.09783	2.19304	0.3572
7	33.614	BV	0.0749	2564.30933	697.72894	8.0274

Sample Info : ST. AMINOÀCID 1  
 20.76 g / 100 ml HCL 0,01N



=====  
 Area Percent Report  
 =====

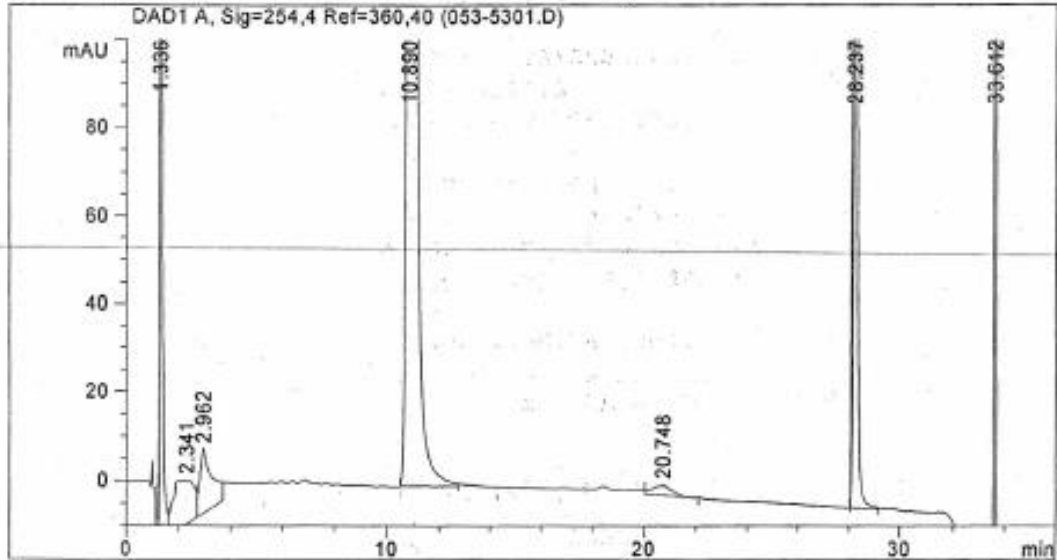
Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.330	BV	0.0913	2308.01611	525.04163	6.0449
2	2.342	VV	0.7528	425.89108	7.65828	1.1154
3	2.964	VB	0.4248	392.57071	12.69417	1.0282
4	10.906	BB	0.2159	2.86157e4	2088.31421	74.9471
5	20.831	BB	0.1196	1945.34778	285.26816	5.0950
6	31.556	BV	1.7404	1208.54919	9.34725	3.1653
7	33.617	VV	0.0803	3285.12646	794.02087	8.6040



Sample Info : PATRÓ D,L-AMINOÀCID 2  
 20.41 g / 100 ml HCL 0.01N



=====  
 Area Percent Report  
 =====

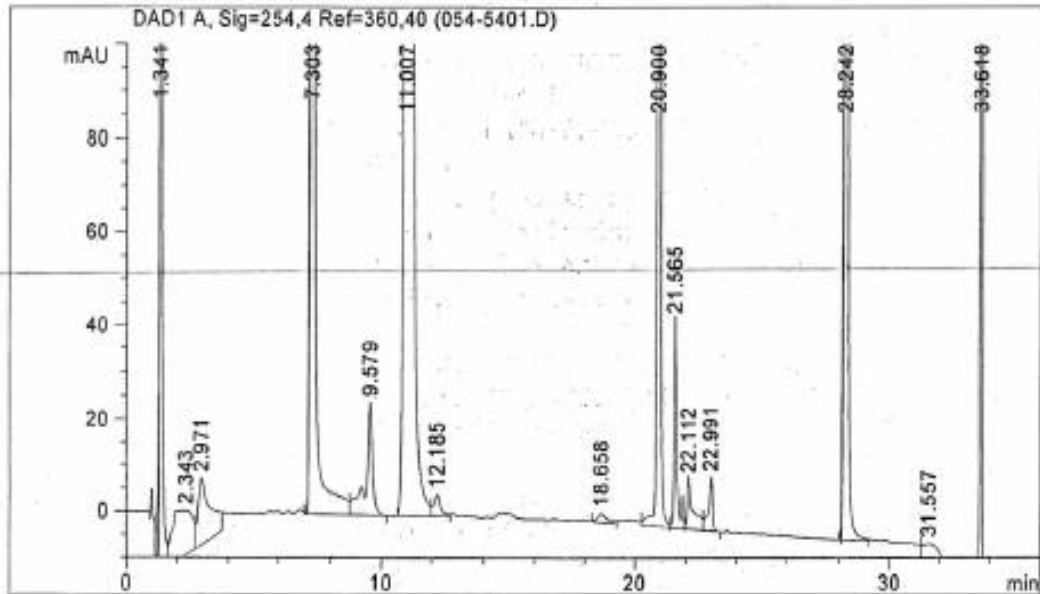
Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.336	BV	0.0873	2576.62988	634.95355	6.3456
2	2.341	VV	0.8019	574.05078	9.82162	1.4137
3	2.962	VB	0.4363	467.33124	14.33499	1.1509
4	10.890	BB	0.2164	3.09779e4	2253.77954	76.2912
5	20.748	BB	0.6824	124.91494	2.41909	0.3076
6	28.237	BB	0.1356	2668.81055	325.62619	6.5726
7	33.612	BV	0.0757	3215.17456	858.19611	7.9182

Sample Info : MOSTRA 1

8.31053 g / 50 ml HCL 0.01N



=====  
 Area Percent Report  
 =====

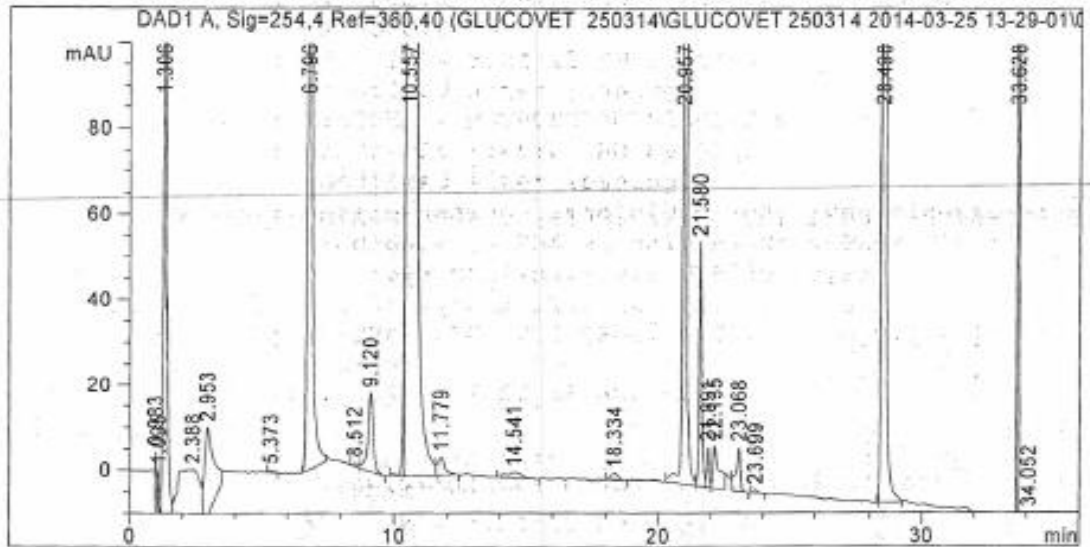
Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DADI A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.341	BV	0.0890	2463.93286	586.63983	6.0789
2	2.343	VV	0.7942	575.94940	9.73561	1.4210
3	2.971	VB	0.4557	479.74750	14.29044	1.1836
4	7.303	VV	0.1649	3558.28516	354.98306	8.7789
5	9.579	VB	0.2641	449.04153	24.23956	1.1079
6	11.007	BV	0.1973	2.01424e4	1574.26782	49.6947
7	12.185	VB	0.2601	79.92507	4.56765	0.1972
8	18.658	BB	0.4053	52.93388	1.85283	0.1306
9	20.900	BV	0.1060	3349.56543	528.10297	8.2639
10	21.565	VV	0.1351	366.50165	44.97780	0.9042
11	22.112	VV	0.2456	188.61462	10.70065	0.4653
12	22.991	VB	0.1709	128.26306	11.43142	0.3164
13	28.242	BB	0.1350	2969.17163	364.69598	7.3254
14	31.557	BV	1.7058	1174.71851	9.19910	2.8982
15	33.618	VV	0.0788	4553.24854	1135.76599	11.2336

Sample Info : MOSTRAL

8.31026 g / 50 ml HCL 0.01N



-----  
 Area Percent Report  
 -----

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

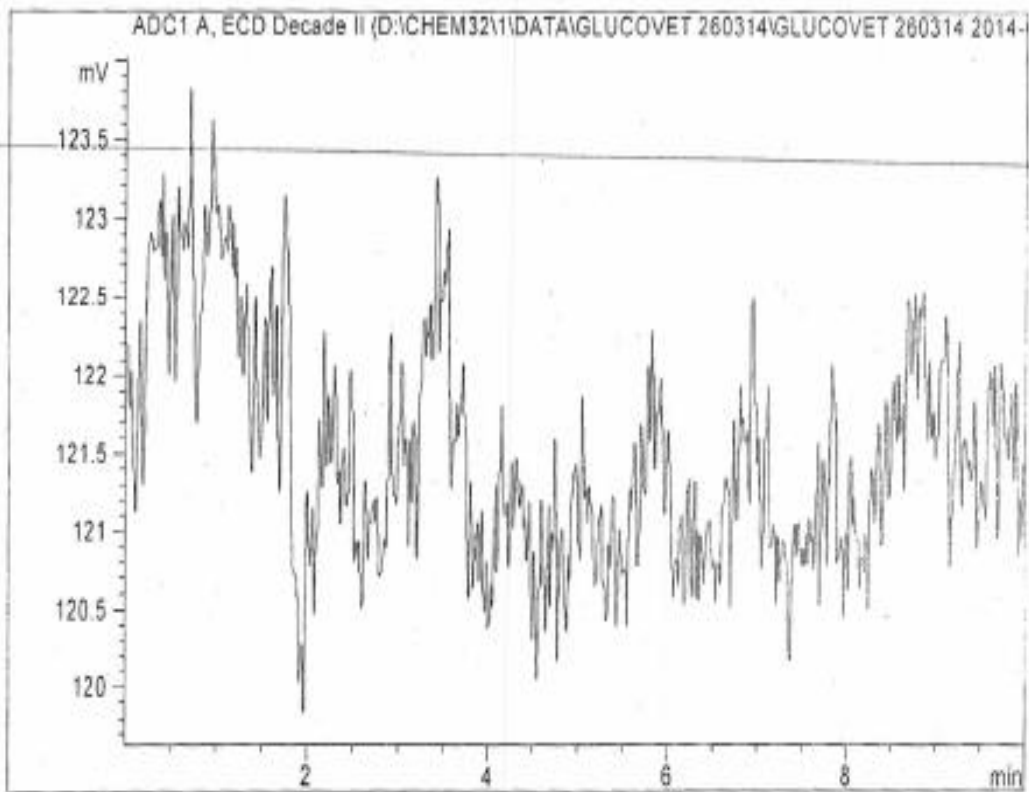
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,40

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.983	BV	0.0721	144.13467	27.09356	0.3699
2	1.095	VV	0.0704	154.43138	31.93841	0.3963
3	1.306	VV	0.0662	2890.95093	622.59949	7.4186
4	2.388	VV	0.8450	1365.20789	19.07432	3.5033
5	2.953	VB	0.3014	495.91977	20.86059	1.2726
6	5.373	VB	0.1773	8.04840	5.54567e-1	0.0207
7	6.796	BB	0.1486	2192.26294	223.10645	5.6257
8	8.512	BV	0.1952	12.39769	7.81043e-1	0.0318
9	9.120	VB	0.1946	247.28876	18.42149	0.6346
10	10.557	BV	0.2095	2.06513e4	1510.12427	52.9945
11	11.779	VB	0.2522	75.47807	4.27122	0.1937
12	14.541	BB	0.4934	51.54909	1.34414	0.1323
13	18.334	BB	0.2609	26.81636	1.45602	0.0688
14	20.957	BV	0.0906	3432.16943	584.10132	8.8075
15	21.580	VV	0.0998	383.36130	57.46295	0.9838
16	21.891	VV	0.0936	55.79758	9.34852	0.1432
17	22.135	VB	0.2039	152.96700	9.92256	0.3925
18	23.068	BB	0.1629	120.75906	10.28812	0.3099
19	23.699	BB	0.1270	5.75008	6.64283e-1	0.0148
20	28.490	BB	0.1209	3416.24829	429.15891	8.7666
21	33.628	BV	0.0522	3080.43896	942.01300	7.9049
22	34.052	VV	0.0576	5.51987	2.03637	0.0142

B) CARBOHIDRATS

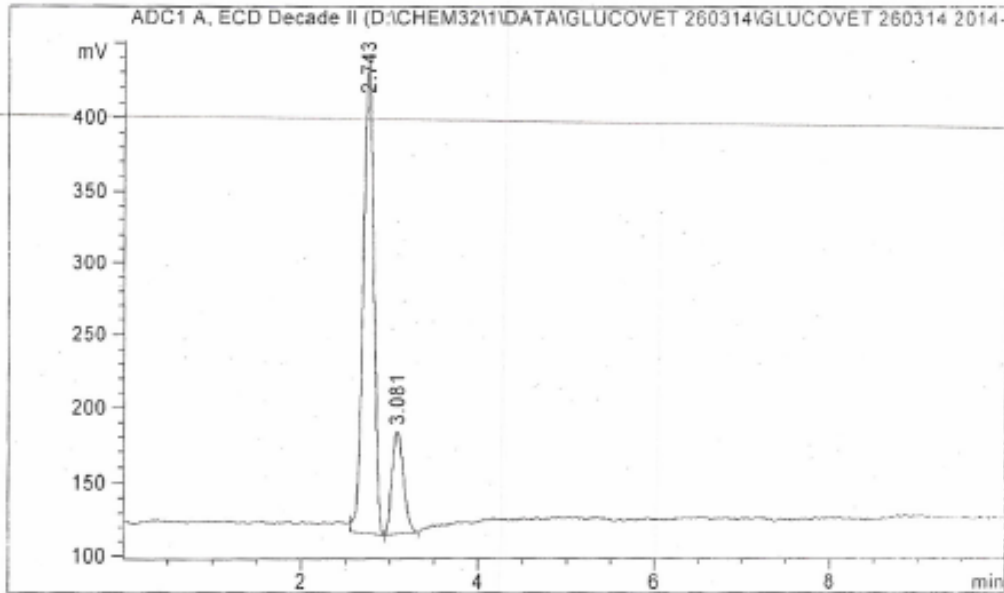
Cromatogrames obtinguts amb el mètode utilitzat per la determinació de carbohidrats:

Sample Info : PLACEBO CARBOHIDRAT 1  
133.94 mg / 100 mL FM  
--> 1 mL SOL. / 10 mL FM



Sample Info : LINEALITAT 1.1 --> CARBOHIDRAT 1

120.08 mg CARBOHIDRAT 1 / 100 mL FM  
 --> 1 mL SOL. / 50 mL FM



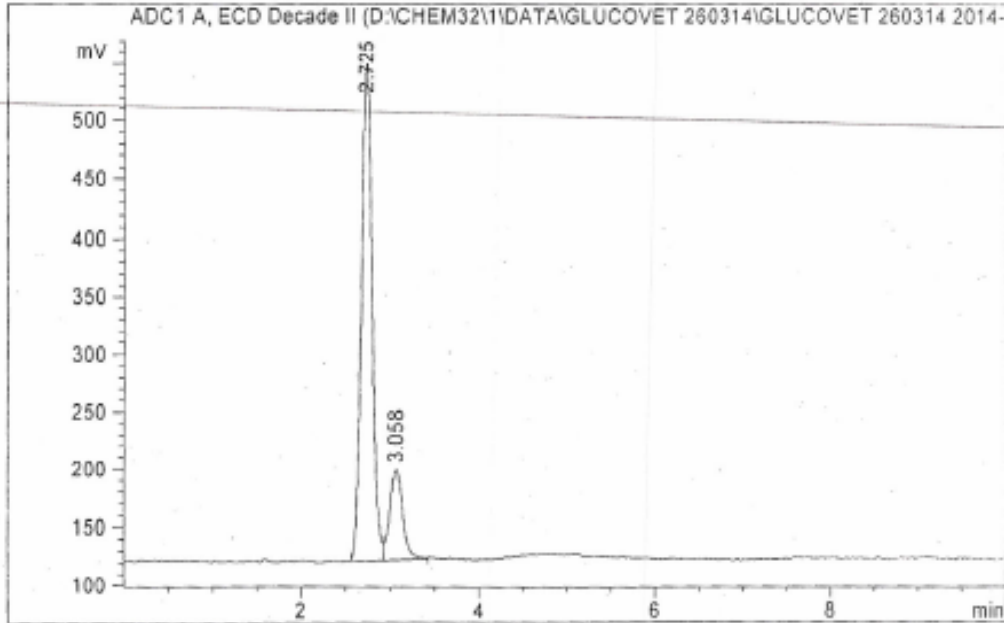
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ECD Decade II

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.743	BV	0.1273	2670.34839	320.16266	81.4537
2	3.081	VV	0.1268	608.01642	68.97530	18.5463

Sample Info : LINEALITAT 5.1 --> 180 mg CARBOHIDRAT 1  
 181.23 mg CARBOHIDRAT 1 / 100 mL FM  
 --> 1 mL SOL. / 50 mL FM



=====  
 Area Percent Report  
 =====

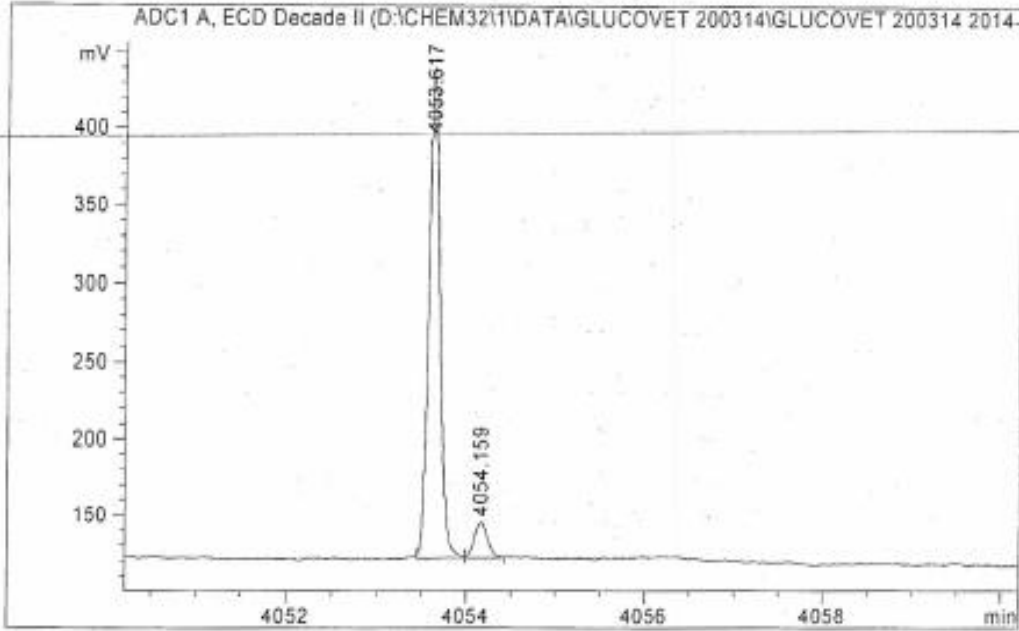
Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ECD Decade II

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	2.725	BV	0.1183	3607.87524	428.07980	82.6858
2	3.058	VR	0.1405	755.48090	76.99671	17.3142

Sample Info : ST. PATRÓ CARBOHIDRAT 1

150.87 mg CARBOHIDRAT 1 / 100 mL FM  
 --> 1 mL SOL. / 50 mL FM



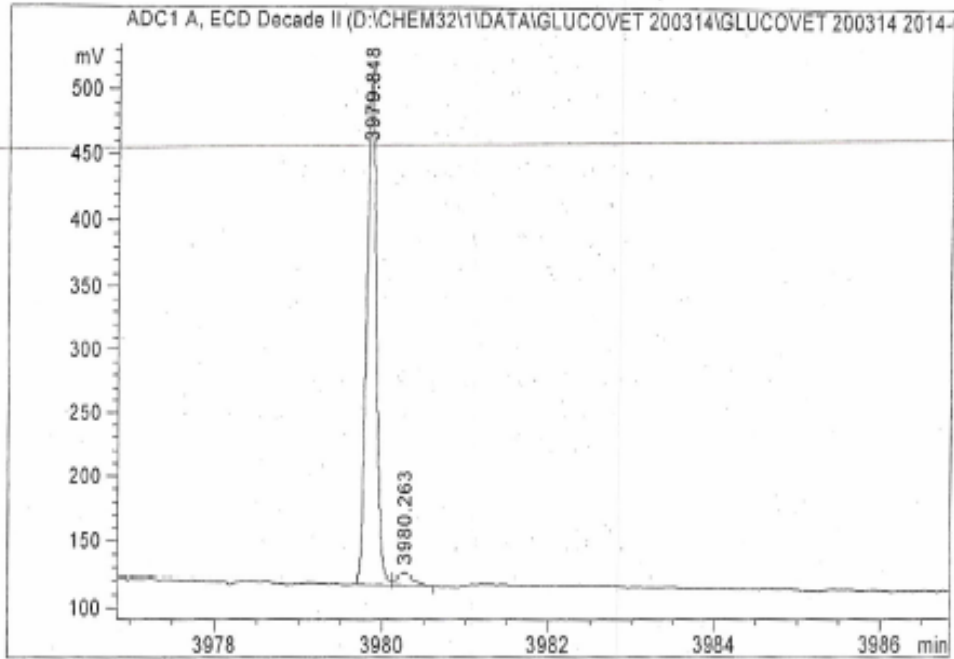
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ECD Decade II

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	4.05e3	BV	0.1333	2851.57642	316.07968	92.1041
2	4.05e3	VB	0.1593	244.45827	23.12757	7.8959

Sample Info : DETERMINACIÓ CARBOHIDRATS  
 108.55 mg MOSTRA / 100 mL FM  
 1 mL SOL. / 10 mL FM



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: ADC1 A, ECD Decade II

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mV*s]	Height [mV]	Area %
1	3.98e3	BV	0.1191	3204.86816	393.20596	96.3309
2	3.98e3	VB	0.1873	122.06802	9.67082	3.6691



**ANNEX V:**

A) AMINOÀCIDS

Sistema cromatogràfic utilitzat com a “GRUP 1” per avaluar la precisió intermitja:

Cromatògraf: AGILENT SERIES 1100  
Desgasificador (G1322A)  
Bomba Quaternària (G1311A)  
Injector Automàtic (G1313A)  
Compartimento de columna termostatitzat (G1316A)

Detector: Diode Array (G1315A)  
Columna: NOVA-PACK C18 150 x 3,9 mm 4 µm (12574)  
Data: 03/03/2014  
Analista: 1

Sistema cromatogràfic utilitzat com a “GRUP 2” per avaluar la precisió intermitja:

Cromatògraf: AGILENT SERIES 1100  
Desgasificador (G1324A)  
Bomba Quaternària (G1312A)  
Injector Automàtic (G1314A)  
Compartimento de columna termostatitzat (G1317A)

Detector: Diode Array (G1318A)  
Columna: NOVA-PACK C18 150 x 3,9 mm 4 µm (13682)  
Data: 07/03/2014  
Analista: 1