

219



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Z A R A G O Z A

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL PIRIDOXAL
5 FOSFATO Y CIPROHEPTADINA EN DIHEXA-
ZIN POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS A ALTA PRESION

T E S I S

Que Para Obtener el Titulo de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:
VERONICA C. GALLARDO ARELLANO.

México D. F.

Julio 1988.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO.

1. - Introducción.
2. - Objetivos.
 - 2.1 General.
 - 2.2 Específicos.
3. - Marco Teórico.
 - 3.1 Generalidades Sobre la Cromatografía.
 - 3.1.1 Definición.
 - 3.1.2 Desarrollo Histórico.
 - 3.1.3 Métodos Cromatográficos.
 - 3.1.4 Tipos de Cromatografía.
 - 3.1.4.1 Cromatografía Líquido - Sólido.
 - 3.2 Conceptos Básicos de la CLAP.
 - 3.2.1 Separación Cromatográfica.
 - 3.2.1.1 Migración Diferencial.
 - 3.2.1.2 Dispersión Molecular.
 - 3.2.2 Definiciones.
 - 3.2.2.1 Tiempo de Retención (t_R).
 - 3.2.2.2 Tiempo Muerto (t_0).
 - 3.2.2.3 Tiempo de Retención Ajustado (t'_R).
 - 3.2.2.4 Factor de Capacidad (K').
 - 3.2.2.5 Número de Platos Teóricos (ND).
 - 3.2.2.6 Resolución (R).
 - 3.2.2.7 Factor de Selectividad.
 - 3.3 Ventajas de la CLAP.



4. - Instrumental.

4.1 Componentes de un Aparato de CLAP.

5. - Análisis Cualitativo.

6. - Análisis Cuantitativo.

6.1 Fuentes de Error.

6.1.1 Separación y Detección.

6.1.2 Medicion de los Picos.

6.1.2.1 Altura de Pico.

6.1.2.2 Area del Pico.

6.2 Métodos de Calibración.

6.2.1 Estándar Externo.

6.2.2 Estándar Interno.

7. - Validación Estadística.

7.1 Generalidades.

8. - Monografía.

8.1 Generalidades.

8.2 Propiedades Físico-Químicas.

8.3 Propiedades Farmacológicas

9. - Desarrollo Experimental.

9.1 Equipo.

9.2 Material.

9.3 Reactivos.

9.4 Método.

9.4.1 Preparación de Solución de Referencia.

9.4.2 Preparación de Solución de Muestra.

9.4.3 Determinación de Piridoxal-5-Fosfato y Ciproheptadina

por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

9.5 Validación Estadística del Método para (PSF) y Ciproheptadina.

9.5.1 Especificidad.

9.5.2 Exactitud y Repetibilidad.

9.5.3 Linealidad.

9.5.4 Reproducibilidad.

10. - Resultados.

10.1 Especificidad.

10.2 Evaluación Estadística (PSF).

10.2.1 Exactitud.

10.2.2 Repetibilidad.

10.2.3 Linealidad.

10.2.3.1 Intercepto a la Ordenada (a).

10.2.3.2 Interferencias Acerca de la Pendiente (b).

10.2.4 Reproducibilidad.

10.3 Evaluación Estadística de la Ciproheptadina.

10.3.1 Exactitud.

10.3.2 Repetibilidad.

10.3.3 Linealidad.

10.3.3.1 Intercepto a la Ordenada (a).

10.3.3.2 Interferencias Acerca de la Pendiente (b)

11. - Conclusiones.

12. - Bibliografía.

13. - Anexos A Fórmulas Generales.

14. - Anexo B Fórmulas para el Cálculo de la Exactitud.

15. - Anexo C Fórmulas para el Cálculo de la Repetibilidad.

16. - Anexo D Fórmulas para el Cálculo de la Linearidad.

17. - Anexo E Fórmulas para el Cálculo de la Reproducibilidad.

1. INTRODUCCION

Diversos fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central pueden aumentar el apetito como efectos secundarios. La mayor parte de estos fármacos interactúan en una u otra forma con los mecanismos cerebrales monoaminas, pero la explicación de sus acciones estimulantes del apetito no es clara (1,2).

En el intento de buscar fármacos estimulantes del apetito se encontró el Dihexazin el cual está compuesto por el Piridoxal 5 Fosfato (PSF) y la Ciproheptadina. Este es un antianoréxico que tiene ventajas sobre otros, debido a que su mecanismo de acción se basa exclusivamente a una mayor ingestión de alimentos, inducida por el estímulo del apetito. Esto hace que el aumento de peso sea de tipo exógeno y que en la acción de este compuesto no intervenga en absoluto la existencia de una hiperfunción corticosuprarrenal con un aumento de retención acuosa ni de un hipotiroidismo (3,4).

Usualmente el método que se emplea para analizar el Dihexazin es el espectrofotométrico, en el cual se determina la absorbancia a 285 nm, siendo la longitud de onda máxima de 285 nm para la Ciproheptadina y de 295 nm

para el PSF , sin embargo este método tiene la desventaja de no detectar los posibles productos de degradación que pudiera contener como impurezas el Dihexazin por eso no se puede considerar específico.

Actualmente no se encuentra descrito en la literatura ningún método analítico por el cual se pueda lograr la separación, identificación y cuantificación de los componentes del Dihexazin (5).

Dicha problemática crea la necesidad de buscar un método que sea capaz de resolver este tipo de problema . una de las alternativas más viables es la Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), que fue descrita entre 1967 y 1969 por Kicklan, Hovath, Preiss y Lipsky (6) .El desarrollo de esta técnica ha tenido grandes avances dentro de la Industria Químico Farmacéutica, ya que por este proceso se pueden analizar compuestos altamente polares, no volátiles iónicos y térmicamente estables que con anterioridad presentaban dificultades en su separación y curntificación.

Por el uso de este método los compuestos pueden ser determinados con elevada sensibilidad, rapidéz, seguridad y resolución. Por tal motivo, el presente trabajo plantea la

posibilidad de establecer un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión que sea preciso exacto y reproducible, para la identificación, separación y cuantificación del P5F y Ciproheptaina en Dihexazin.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar y validar estadísticamente un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para la separación, identificación y cuantificación de Piridoxal 5 Fosfato (P5F) y Ciproheptadina en Dihexazin.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Diseñar un método para determinar cuantitativamente las características del P5F y Ciproheptadina por separado y como componentes del Dihexazin utilizando Cromatografía de Líquidos a Alta Presión .

2. Determinar los tiempos de retención adecuados para el análisis del P5F y Ciproheptadina mediante el método desarrollado.

3. Determinar las concentraciones del PSF Ciproheptadina en el Dihexazin con el método diseñado.

4. Estandarizar el método utilizando los procedimientos estadísticos existentes..

5. Aplicar el método estandarizado para detectar las posibles impurezas o productos de degradación que pudieran formarse en el Dihexazin al ser sometido a factores externos.

3. MARCO TEORICO.

3.1. GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA.

3.1.1. DEFINICION.

La Cromatografía es un método que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos mediante la distribución de una muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil (7).

3.1.2. DESARROLLO HISTORICO.

En 1850 Runge describió la formación de zonas

coloreadas cuando goteaban sustancias colorantes sobre papel secante. Fué en 1909 cuando se utilizaron por primera vez las técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores y al año siguiente fué empleada la Cromatografía de Elución por el Botánico Ruso Tswett en un experimento que tenía por objeto la separación de clorofila de extractos vegetales. De aquí el origen de la palabra Cromatografía que literalmente significa "Escritura de Color".

Harold (10) realizó una investigación bibliográfica completa con respecto a este tema. en ella menciona que la Cromatografía permaneció ignorada durante años hasta que en 1930 el investigador Sueco Tselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas, el "Análisis Frontal" y el "Análisis por Desplazamiento"; técnicas que han caído en desuso. En 1941 Martin y Synge introducen la Cromatografía de Reparto. Esta técnica evolucionó rápidamente, llegando a ser lo que ahora se conoce como Cromatografía en Papel y una versión limitada de Cromatografía Líquido - Líquido en Columna.

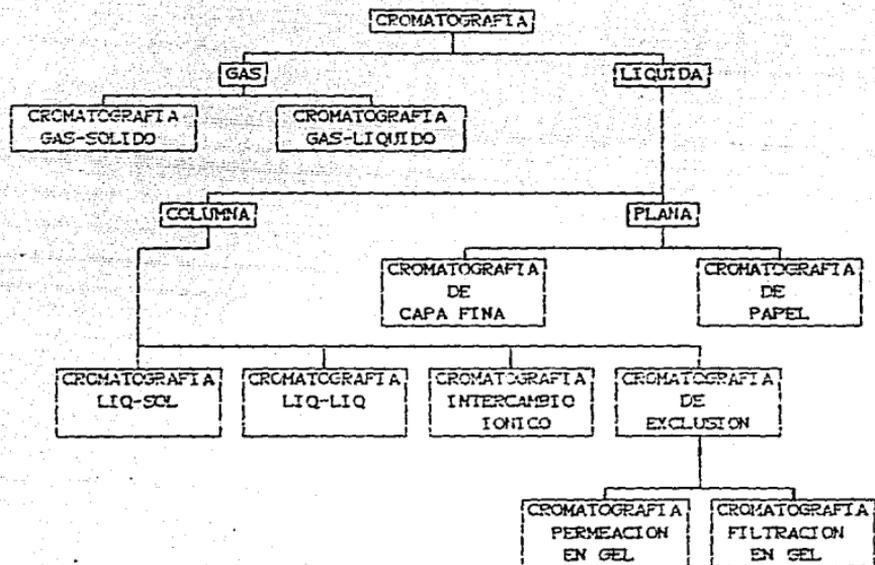
En 1952, Martin y James introdujeron la Cromatografía de Gases la cual se ha convertido en una de las técnicas analíticas más útiles para el análisis de gases y

compuestos orgánicos volátiles; y no fué hasta 1968 cuando se produjo un avance considerable en la Cromatografía Líquida. Este avance se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua. Actualmente, esta técnica se conoce como Cromatografía Líquida de Alta Presión la cual ha resultado una contribución significativa para los análisis farmacéuticos, bioquímicos y clínicos. (11)

3.1.3. METODOS CROMATOGRAFICOS.

Se pueden establecer dos principios de procesos cromatográficos "Cromatografía por Partición" y "Cromatografía por Adsorción". En ambos casos hay que considerar una fase móvil que puede ser un gas o un líquido y una fase estacionaria líquida o sólida. Si la fase estacionaria es sólida el proceso se produce por adsorción y cuando es líquida por partición, y de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil se puede clasificar en "Cromatografía de Gases" y "Cromatografía de Líquidos", las cuales se subdividen en diferentes tipos.

3.1.4 TIPOS DE CROMATOGRAFIA



3.1.4.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDO - SOLIDO.

El mecanismo de separación de la Cromatografía Líquido - Sólido, o de Adsorción se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase

móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido.

Las técnicas de CLAP también se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de la fase móvil ; y teniendo en cuenta su polaridad en relación con la fase estacionaria encontramos dos tipos :

-La Cromatografía en fase normal. La fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es apolar.

-La Cromatografía en fase inversa. Aquí la fase estacionaria es de naturaleza apolar, mientras que la fase móvil es un líquido polar.

3.2 CONCEPTOS BASICOS DE LA CLAP.

3.2.1 SEPARACION CROMATOGRAFICA.

Para resolver un determinado problema por el uso de CLAP, es necesario lograr la correcta combinación de las siguientes condiciones de operación.

El tipo de empaque de la columna, la fase móvil, el

largo y diámetro de la columna, flujo de la fase móvil, la temperatura de separación y tamaño de la muestra.

Existen dos características muy importantes que intervienen en la separación cromatográfica: La Migración Diferencial y La Dispersión Molecular.

3.2.1.1 MIGRACION DIFERENCIAL.

La migración diferencial es la base de la separación en Cromatografía, se refiere a la variación en la velocidad y movimiento de los diferentes compuestos a través de la columna. Si no existiera una diferencia en la velocidad de migración para dos compuestos dados la separación no sería posible.

La migración diferencial o movimiento individual de los compuestos a través de la columna, depende del equilibrio en la distribución de cada uno de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Por lo tanto, la migración diferencial está determinada por aquellas variables experimentales que afectan esta distribución como: la composición de la fase móvil, la composición de la fase estacionaria y la temperatura de separación. Si se requiere alterar la migración diferencial para lograr una

mejor separación debemos cambiar algunas de las variables antes mencionadas.

3.2.1.2 DISPERSION MOLECULAR.

Se refiere a la distribución de las moléculas a lo largo de la columna para un compuesto dado; esta dispersión es causada por varios procesos físicos, como son:

a) Difusión de Eddy. Es causada por los diversos flujos microscópicos del disolvente, dando como resultado que las diferentes moléculas de una muestra determinada, puedan tener diferentes trayectorias de distintas longitudes a través del lecho de la columna.

b) Transferencia de masa en la fase móvil. Esto se refiere a las diferentes velocidades de flujo entre las partículas. El movimiento del flujo adyacente a las partículas será más lento, mientras que en el centro de las partículas el movimiento del flujo será más rápido.

c) Transferencia de masa en la fase móvil estancada. La fase móvil dentro de los poros de la partícula está estancada, es decir, entre más penetren las moléculas en el poro de una partícula más tardará en regresar al seno de la

corriente, por lo que su desplazamiento dentro del lecho sera menor.

d) Transferencia de masa en la fase estacionaria. Las moléculas de una muestra difunden dentro de los poros y después penetran a la fase estacionaria o permanecen enlazadas a esta.

e) Difusión longitudinal. Las moléculas de la muestra tienden a difundirse al azar, en todas direcciones y a lo largo de la columna, aunque la fase móvil se encuentre en movimiento o en reposo dentro de la columna. (14,15)

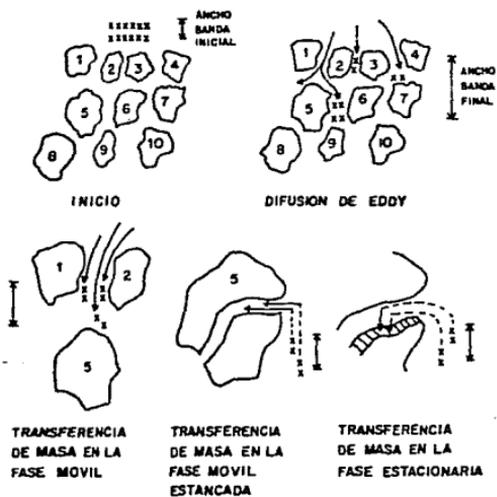
En la figura 1 se muestra una representación gráfica de los procesos mencionados en los incisos a,b,c y d

3.2.2 DEFINICIONES.

El lenguaje comunmente empleado en CLAP utiliza algunos términos y símbolos característicos, como son: tiempo de retención; tiempo muerto; tiempo de retención ajustado; factor de capacidad; resolución y factor de selectividad.

3.2.2.1 TIEMPO DE RETENCION (t_R). Es el tiempo que la

FIG. No. 1

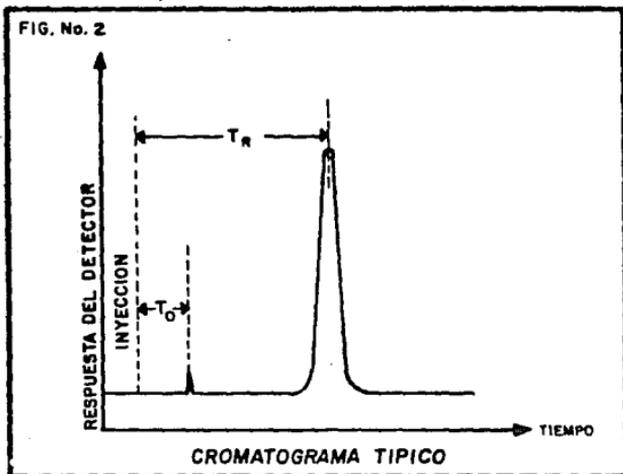


CONTRIBUCIONES A LA DISPERSION
MOLECULAR EN EL C.L.A.P.

muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta en el que aparece el ápice en el pico.

3.2.2.2 TIEMPO HUERTO (t_0). Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil.

(v. fig 2)



3.2.2.3 TIEMPO RETENCION AJUSTADO (t'_R). Es la diferencia entre t_R y t_0 es decir la medida del tiempo que

la muestra permanece retenida en el material de empaque de la columna y se calcula de la siguiente forma:

$$t'_R = t_R - t_0$$

Donde :

t_R = Tiempo total que la muestra permanece en la columna.

t'_R = Tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

t_0 = Tiempo que la muestra permanece en la fase móvil.

3.2.2.4 FACTOR DE CAPACIDAD (k'). Este término frecuentemente usado para identificar o localizar una banda cromatográfica y se determina como sigue: (v. fig. 3)

$$K' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Los valores de K' 'nos indican cuando las bandas eluyen relativamente en el tiempo muerto, estos valores no se ven afectados por factores como flujo y dimensiones de la

columna.

3.2.2.5 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (ND) Y ALTURA DEL PLATO (HD). Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. N se mide de acuerdo con la fórmula.

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W_b} \right]^2$$

Donde t_R y W_b (ancho de la banda), se expresan en unidades de tiempo, volumen, distancia, etc.

El número de platos teóricos, se utiliza para medir la eficiencia o deterioro de la columna, de acuerdo con la apertura de la banda; así que cuando N sea mayor, más eficiente será la columna.

La eficiencia de la columna deberá ser directamente proporcional al largo de la columna, lo cual se indica con la expresión siguiente.

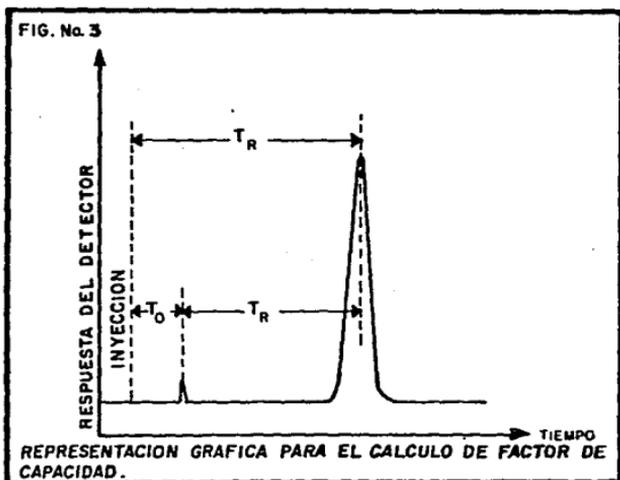
$$H = \frac{L}{N}$$

Donde:

H = Altura equivalente de un plato teórico.

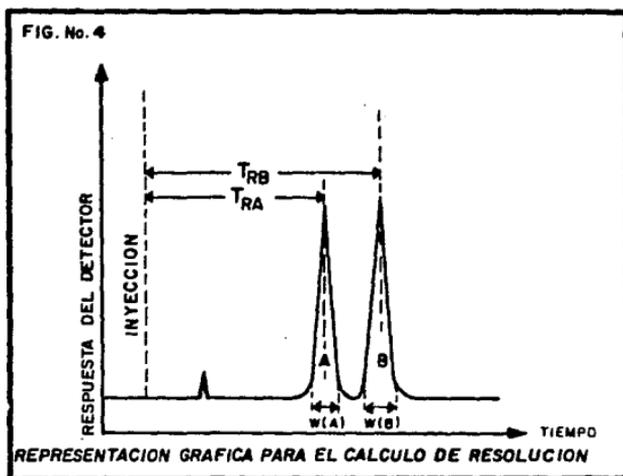
L = Longitud de la columna expresada en mm.

H se utiliza para evaluar la variación de la eficacia de la columna en diferentes condiciones.



3.3.2.6 RESOLUCION. (R). Este término describe el grado o la magnitud de separación entre dos compuestos.

La resolución es definida como el cociente entre la diferencia de dos tiempos de retención, de dos componentes y el promedio de los anchos de las bandas. La ecuación que presenta es la siguiente. (v. fig. 4)



$$R = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{1/2(W_A - W_B)}$$

Donde:

t_{RA} = Tiempo de retención de la banda A.

t_{RB} = Tiempo de retención de la banda B.

W_A = Ancho de la banda A.

W_B = Ancho de la banda B.

3.2.2.7 FACTOR DE SELECTIVIDAD O FACTOR DE SEPARACION

(α) .El valor de α nos dice cuando un pico eluye relativamente de otro.

El factor de selectividad, va a describir la posición relativa de dos picos adyacentes y se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}} = \frac{K'_B}{K'_A}$$

Donde:

t'_{RB} = Tiempo de retención para el pico B.

t'_{RA} = Tiempo de retención para el pico A.

Si dos compuestos eluyen con $\alpha = 1$ los dos picos tendrán tiempo de retención idénticos y por lo tanto solo se observará un pico en el cromatograma. (18)

3.3 VENTAJAS DE LA CLAP.

Este método ofrece las ventajas siguientes:

- Rapidez.
- Alta resolución.
- Exactitud.
- Alta sensibilidad.
- Amplio espectro de aplicaciones.
- Automatización.

En este método es usual obtener separaciones en términos de minutos, y en algunos casos de segundos. Para esto se requieren columnas de alta eficacia y sistemas de bombeo de alta presión. Otra ventaja es la alta resolución, que permite separar mezclas muy complejas; tal es el caso de algunos fluidos biológicos como la orina humana.

Los métodos de CLAP proporcionan una buena información de tipo cuantitativo, siendo posible efectuar con facilidad

análisis cuya precisión suele ser mayor del 1 % .

Los detectores empleados proporcionan buena sensibilidad y según el tipo de muestra es posible medir con una cierta facilidad hasta 10^{-9} g, algunos dispositivos muy especializados pueden detectar cantidades tan pequeñas como 10^{-12} g.

Entre las ventajas de este método, quizá la más importante es la diversidad de sus aplicaciones a compuestos no volátiles, iónicos y termolábiles, que anteriormente era casi imposible separar. Es aplicable a muestras de peso molecular tan bajo como 18 o tan alto como varios millones. Las únicas muestras no susceptibles de analizar con facilidad son las gaseosas.

Por último, cabe mencionar la automatización de los instrumentos de forma tal que realicen el análisis completo de la muestra desde su introducción en el cromatógrafo hasta el cálculo e impresión de los resultados. Mediante este procedimiento, la identificación de cada señal se realiza comparando los tiempos de retención con los valores previamente determinados y la cuantificación se obtiene midiendo las áreas integradas de las señales de acuerdo con el método analítico seleccionado. (17)

4. INSTRUMENTAL

Existe una diversidad de equipos utilizados en CLAP, en cuanto a costo versatilidad y complejidad.

Las características de índole general con que debe de cumplir el instrumento son:

a) Versatilidad. El instrumento debe de ser apto para trabajar con muestras de diferente tipo. Para ello, el instrumento debe de estar equipado con los siguientes aditamentos.

- Sistema de operación de alta presión.
- Diversos detectores.
- Sistema de recolectar fracciones a la salida de la columna.
- Programadores de fase móvil (generadores de gradiente).
- Control de temperatura.
- Control de flujo.

b) Rapidez. Para obtener rapidez en el análisis, es necesario contar con materiales de relleno, de columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de

bombeo de alta presión para la fase móvil.

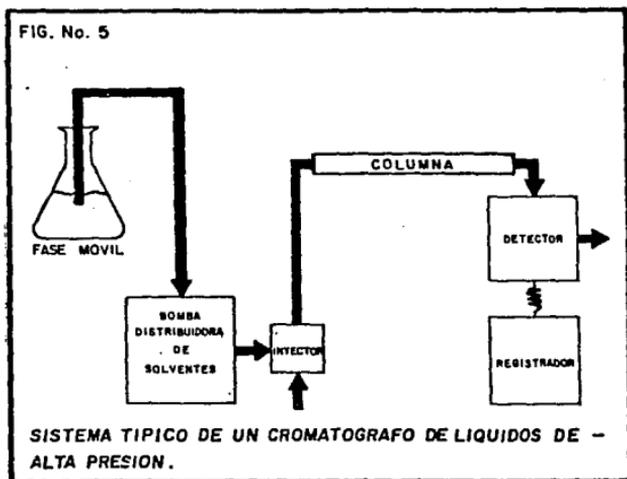
c) Reproducibilidad y Estabilidad. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como flujo de la fase móvil, presión y composición de la fase móvil.

d) Sensibilidad. El instrumento debe de generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos de alta presión depende sobre todo del sistema de detección que utiliza. (18).

4.1 COMPONENTES DE UN APARATO DE CLAP.

Como puede apreciarse (v. fig. 5), los componentes básicos de dicho equipo son: un sistema de bombeo para impulsar la fase móvil; un mecanismo para la introducción de la muestra; una columna que contenga la fase estacionaria; y un detector para determinar la separación que tiene lugar y proporcionar datos que permitan una evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados. Esto puede conseguirse por simple registro de la respuesta del detector en forma de cromatograma.

FIG. No. 5



SISTEMA TÍPICO DE UN CROMATOGRÁFO DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN.

5. ANALISIS CUALITATIVO.

El propósito de la mayoría de las investigaciones cromatográficas es analizar la muestra. El análisis cualitativo, se lleva a cabo fundamentalmente con ayuda de los tiempos de retención comparándolos con los resultados obtenidos al analizar patrones conocidos en idénticas condiciones.

6. ANALISIS CUANTITATIVO.

Uno de los aspectos importantes en CLAP es que se pueden analizar cuantitativamente una amplia variedad de compuestos.

La precisión de los resultados obtenidos por este método es comparable o superior a otros métodos de separación como Cromatografía de Gases, Cromatografía de Capa Fina, Electroforesis etc.

Cuando se cuantifica una muestra por CLAP, el pico de interés se asume como el compuesto puro que ha eluido de la columna y la cantidad del componente presente en la muestra será equivalente al área o altura del pico.

6.1 FUENTES DE ERROR.

6.1.1 SEPARACION Y DETECCION.

La separación en CLAP por si misma puede acarrear errores en la cuantificación, aunque la descomposición de la muestra casi nunca se produce en CLAP, se puede sospechar de este tipo de problemas .

Los errores de análisis también pueden provenir de las variaciones en la salida del detector. La sensibilidad, la estabilidad de la línea base y la linealidad son especificaciones importantes para el análisis cuantitativo y deben mantenerse estables para una mayor precisión analítica.

Es importante utilizar un detector con la suficiente sensibilidad, adecuado al tamaño de la muestra requerida para que la medición cuantitativa, no sobrepase la capacidad de la columna. Los cambios de flujo, temperatura y las fallas electrónicas pueden afectar las características de la respuesta del detector.

6.1.2 MEDICION DE LOS PICOS.

Los errores en el análisis cuantitativo pueden producirse durante el manejo de los datos, provenientes del detector.

El método de cuantificar la medida del pico también puede influenciar la exactitud y precisión del análisis. Se utilizan dos aproximaciones para medir el tamaño del pico.

1.- La medición de la altura del pico.

2.- Medición del área del pico por diversos métodos.

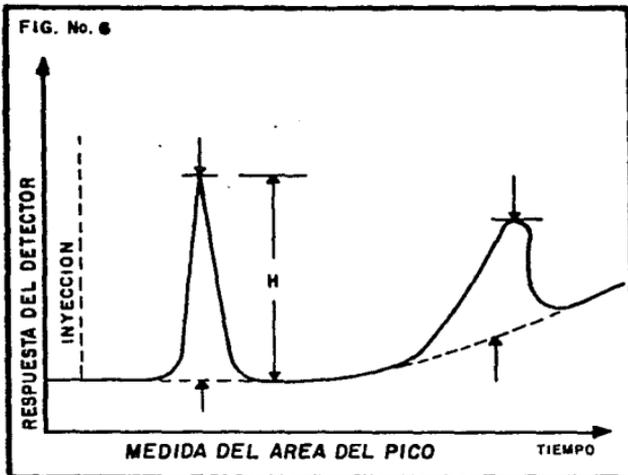
6.1.2.1 ALTURA DEL PICO.

Se representa por H , y es medida como la distancia desde la línea base hasta el máximo del pico. Es un método sencillo, ya que la H puede ser determinada fácilmente con una regla o mediante una carta de conteo con divisiones, aunque ya existen integradores electrónicos que reportan la altura de los picos.

Cuando hay una desviación de la línea base respecto a la línea horizontal (deriva), la altura del pico se obtiene interpolando la línea base entre el principio y el fin de cada pico (v. fig. 6)

La ventaja de este método es su simplicidad y la rapidez del cálculo. Pero tiene la desventaja de que es mucho más sensible a variaciones instrumentales. Si los picos están completamente distorcionados o asimétricos no debe utilizarse este método.

FIG. No. 6



6.1.2.2 AREA DEL PICO.

El uso de las áreas de los picos para las mediciones cuantitativas se basa en que el área medida es proporcional a la cantidad de la muestra; la precisión de este método es menos influenciado por las variaciones en el instrumental.

Algunas de las ventajas que presenta el método es que el área del pico se ve afectada por el área de los picos vecinos. Y la existencia de cola en ellos causa problemas en la medición del área.

Las técnicas existentes para la medición del área de los picos en CLAP, son las siguientes: (v. fig. 7)

AD Altura por el ancho a la mitad de la altura.

BD Triangulación.

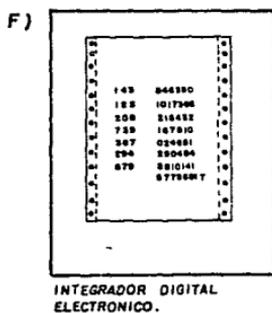
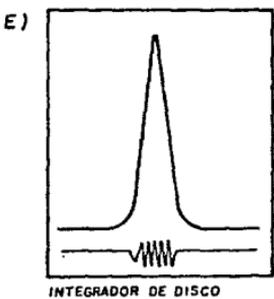
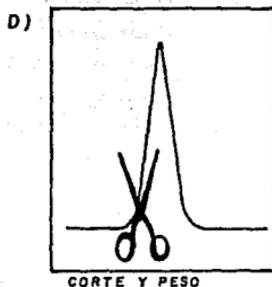
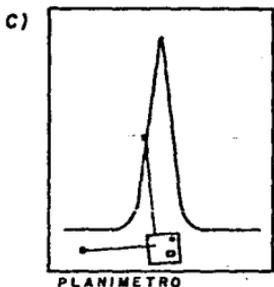
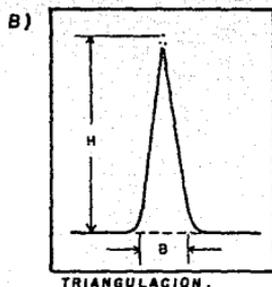
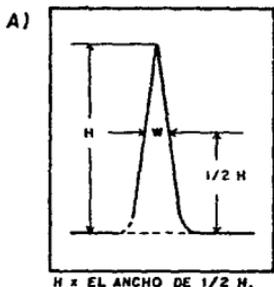
CD Planímetro.

DD Cortar y pesar.

ED Integradores de disco.

FD Integrador electrónicos digitales.

FIG. No. 7



TECNICAS PARA LA MEDICION DE LAS AREAS DEL PICO

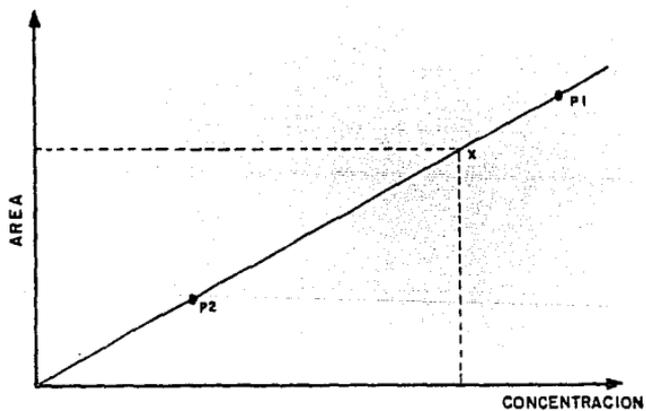
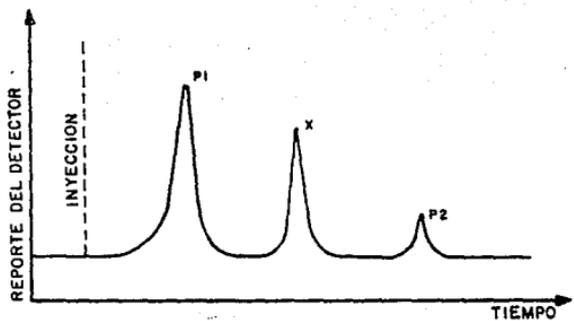
6.2 METODOS DE CALIBRACION.

A pesar de que la respuesta del detector es casi siempre proporcional a la concentración de la sustancia en la muestra, normalmente es imposible definir esta relación con precisión, siendo indispensable por lo tanto construir una prueba de calibrado del detector utilizando su respuesta frente a una serie de soluciones estándar.

6.2.1 ESTANDAR EXTERNO:

Este método consiste en comparar el área o altura del pico correspondiente a cantidades conocidas de sustancia pura (estándar), con el área o altura de la muestra. Se procede inyectando en el cromatógrafo muestras repetidas de cantidades exactas de la sustancia pura obteniéndose las áreas de los picos (P_1 y P_2), correspondientes a cada una de las cantidades inyectadas (v. fig. 8). A partir de estos datos se hace un gráfico de calibración , en el que se representa la concentración en función del área del pico; a continuación se inyecta la muestra , y se relaciona el área (X) obtenida para el compuesto objeto de análisis con el gráfico de calibración.

FIG. No. 8



METODOS DE CALIBRACION EXTERNA

6.2.2 ESTANDAR INTERNO.

Este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos errores producidos durante la preparación de la muestra. Utilizando un estándar interno se tendrá una mayor reproducibilidad y exactitud en el análisis. Consiste en comparar la relación entre áreas obtenidas de muestra y del estándar externo, tanto a la muestra como al estándar externo, se le agrega una cantidad conocida de una sustancia que sirve como estándar interno. La sustancia utilizada como estándar interno debe ser químicamente similar y de estructura parecida al compuesto que se está analizando, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto de interés pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra. (14,19)

7. VALIDACION ESTADISTICA

7.1 GENERALIDADES.

Cualquier método químico de análisis cuantitativo implica la toma de una muestra, su análisis y la deducción de algunas características respecto a la muestra, desde los resultados obtenidos en los análisis. Para poder evaluar la confiabilidad de los datos por métodos analíticos es necesaria la aplicación de procedimientos estadísticos porque estos constituyen un importante recurso para el analista, ya que actualmente el análisis estadístico es aplicado en control de calidad en pruebas de estabilidad, en procesos de producción y en análisis de fluidos biológicos. (20,21)

Para que una técnica se considere estadísticamente válida, hay que tomar en cuenta los siguientes criterios:

- 1) Exactitud.
- 2) Precisión
- 3) Repetibilidad.
- 4) Reproducibilidad.
- 5) Especificidad.
- 6) Sensibilidad.
- 7) Linealidad.

8. MONOGRAFIA

8.1 GENERALIDADES.

- Nombre Químico. 2 - metil - 3 hidroxil - 4 formil - 5 pirimidil fosfato de bis - 4 (5 h - dibenzo (a,d) - ciclohepten - 5 - ileno) 1 - metil piperidina.

- Nombre Genérico. Dihexazin.

- Fórmula Empírica. $C_{30} H_{52} N_3 O_3 P$

- Fórmula Estructural. (v. fig. 9).

8.2 PROPIEDADES FISICO -QUIMICAS.

- Peso Molecular. 821.97

-Aspecto. pequeños cristales de color amarillo canario, inodoro y de sabor ligeramente amargo.

- Punto de Fusión. 110 - 115 °C.

- Solubilidad. Prácticamente insoluble en agua y éter.

muy soluble en alcohol metílico (100g/100ml) y poco soluble en etílico (55g/100ml).

- Humedad. Perdida por desecación a 60 °C durante 8 horas, no más del 2 %.

- Ensayo. Por el método espectrofotométrico a 286 nm. contiene entre el 95 - 105 % de Piridoxal 5 Fosfato y Ciproheptadina. (23)

8.3 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

- Acción Farmacológica. Estimulante del apetito.

- Toxicidad aguda: la DL₅₀ se ha determinado en el ratón y la rata, tanto por vía oral como intraperitoneal.

Por vía oral, la DL₅₀ en el ratón es de 196 mg/kg y en la rata de 370 mg/ Kg.

Por vía intraperitoneal, la DL₅₀ es de 76 mg/kg en el ratón

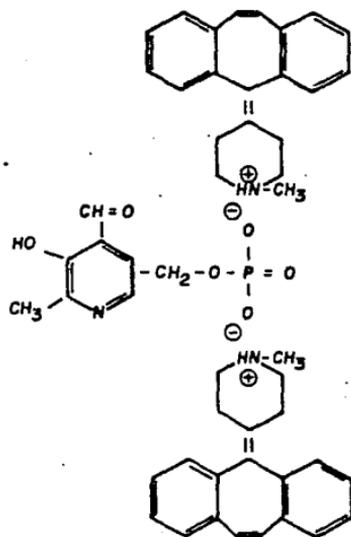
- Toxicidad Subaguda: La administración de una dosis

diaria de 6 mg/Kg en la rata durante 30 días ha puesto de manifiesto la buena tolerancia para este compuesto, no produciendo en ningún caso signo apreciable de toxicidad.

- Teratogénesis. No debe usarse durante el embarazo.

{24,25 }

FIG. No. 9



FORMULA ESTRUCTURAL (DIHEXAZIN)

9.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.

9.1 EQUIPO

NOMBRE	MARCA	MODELO
Cromatografo de líquidos de Alta Presión.	Waters Ass.	
Inyector.	Waters Ass.	US K
Bomba.	Waters Ass.	6000 A.
Columna. Modulo de Compresión radial Z Module radial Pack C ₁₈ C 10cm. X 8mm. J.	Waters Ass.	
Detector U.V. Lambda Max. de onda variable.	Waters Ass.	481
Registrador e Integrador.	Waters Ass.	730
Jeringa de 25 µl.	Waters Ass.	
Balanza Analítica.	Sartorio	2463
Espectrofotómetro.	Perkin-Elmer	552
Equipo para Filtración.	Millipore	
Bomba de Vacío.	Koblenz	GGP-134
Estufa.	Mapsa	HDP-3342

9.2 MATERIAL.

NOMBRE	CAPACIDAD	MARCA
- Matraz Volumetrico.	50.25 y 10ml.	Pyrex.
- Vasos de Precipitados.	250,100 y 50ml.	Pyrex.
- Matraz Erlenmeyer.	500 y 250ml.	Pyrex.
- Membrana de Filtración Acuosa.	0.45 μ m.	Millipore.
- Membrana de Filtración Orgánica.	0.50 μ m.	Millipore.

9.3 REACTIVOS.

- Metanol Lichrosolv Grado Cromatográfico... (Merck).
- Acetonitrilo Lichrosolv Grado Cromatográfico (Merck).
- Agua Bidestilada.
- Fosfato de Dibutilamina 0.05M. (D.).

9.4 METODO.

9.4.1 PREPARACION DE SOLUCION DE REFERENCIA EXTERNA (ESTANDAR)

Pesar 37.5mg. de Dihexazin de referencia y colocarlos en un matraz volumétrico de 25ml., disolver y aforar con el sistema de disolventes (Agua (60): Acetonitrilo (40): D₂O (1)), tomar una alícuota de 2ml. de esta solución y colocarlos en un matraz volumétrico de 25ml., aforar con el sistema de disolventes, la solución resultante tiene una concentración de 0.12mg/ml.

9.4.2 PREPARACION DE LA SOLUCION MUESTRA.

Pesar 37.5mg. de Dihexazin muestra y colocarlos en un matraz volumétrico de 25ml., disolver y aforar con el sistema de disolventes, tomar una alícuota de 2ml. de esta solución y colocarlos en un matraz volumétrico de 25ml., aforar con el sistema de disolventes, la solución resultante tiene una concentración de 0.12mg./ml.

9.4.3. DETERMINACION DE PIRIDOXAL 5 FOSFATO Y CIPROHEPTADINA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

Inyectar 20 μ l de la solución estandar y 20 μ l de la solución muestra en el cromatógrafo de líquidos bajo las siguientes condiciones analíticas:

Columna: Módulo de compresión radial. Pack Cis.

Fase móvil: Agua: Acetonitrilo: D. (60:40:1)

Velocidad de flujo: 2 ml/min.

Detector de U.V.: 290 nm.

Velocidad de carta: 0.5 cm/min.

Sensibilidad: 0.1 AUFS.

Volumen de inyección: 20 μ l.

CALCULO:

$$\frac{APR}{ARST} \times C_{ST} = C_P$$

$$\frac{C_P}{C_{TP}} \times 100 = \% \text{ Recuperado}$$

Donde:

APR = Area relativa de la solución problema.

ARST = Area relativa de la solución estándar.

C_{ST} = Concentración de la solución estándar.

C_P = Concentración experimental de la solución problema.

C_{TP} = Concentración teórica de la solución problema.

0.5 VALIDACION ESTADISTICA DEL METODO.

0.5.1 ESPECIFICIDAD.

Para verificar la especificidad del método por CLAP, el Dihexazin se sometio a diferentes condiciones (V. Tabla 10): temperatura, luz solar y a hidrólisis usando medios alcalinos y medios ácidos, así como condiciones de oxidación con peróxido de hidrógeno.

CONDICIONES DE ALMACENAJE	TIEMPO (días)
70 C	20
Luz solar	20
Medio ácido	10
Medio alcalino	10
Peróxido de H	10

TABLA 1. Especificidad

9.5.2 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD PARA CIPROHEPTADINA Y PIRIDOXAL 5 FOSFATO.

Para valorar la exactitud y repetibilidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), se analizaron 10 muestras por separado a la misma concentración, para la cuantificación de Ciproheptadina y Piridoxal 5 Fosfato (PSF).

9.5.3 LINEARIDAD PARA CIPROHEPTADINA Y PIRIDOXAL 5 FOSFATO

Para evaluar la linealidad del método analítico por

CLAP, se realizó el análisis de 5 muestras independientes de diferentes concentraciones para la cuantificación de Ciproheptadina y Piridoxal 5 Fosfato (P5F)

9.5.4 REPRODUCIBILIDAD PARA LA CIPROHEPTADINA Y PIRIDOXAL 5 FOSFATO.

Para verificar la reproducibilidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para Ciproheptadina y Piridoxal 5 Fosfato, se llevó a cabo el análisis de tres muestras del mismo lote por dos analistas en dos días.

10 RESULTADOS.

10.1 ESPECIFICIDAD.

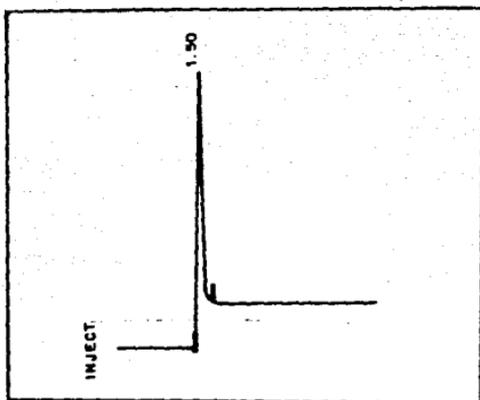
Los resultados obtenidos indican que no existe ningún compuesto adicional que presente el mismo tiempo de retención que el Piridoxal 5 Fosfato (PSF) y la Ciproheptadina, para todas las condiciones probadas. (v. fig. 10-18D).

10.2 EVALUACION ESTADISTICA PARA EL PIRIDOXAL 5 FOSFATO.

Los resultados obtenidos para la evaluación estadística de exactitud y repetibilidad del método por Cromatografía Líquida de Alta Presión, (CLAP), para la determinación del Piridoxal 5 Fosfato (PSF) se muestran en la tabla 2.

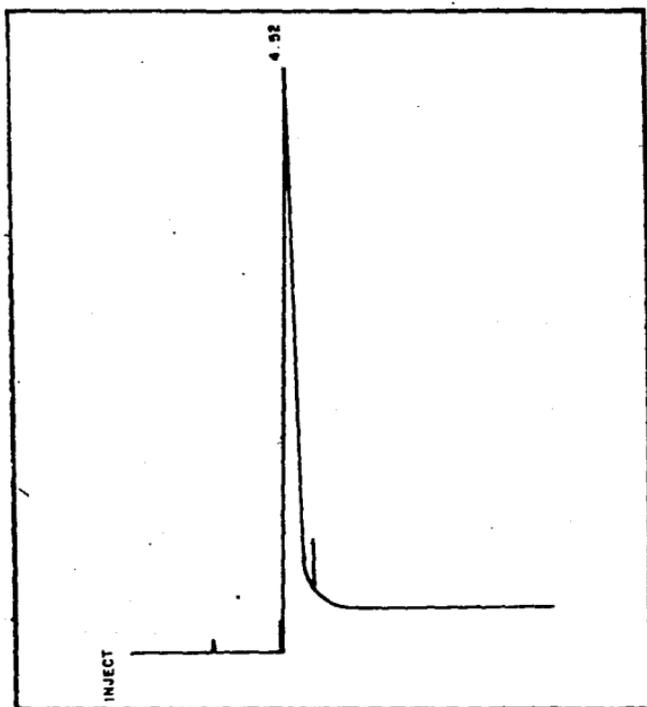
Las fórmulas para la realización del cálculo se encuentran en el Anexo A y B.

FIG. No. 10



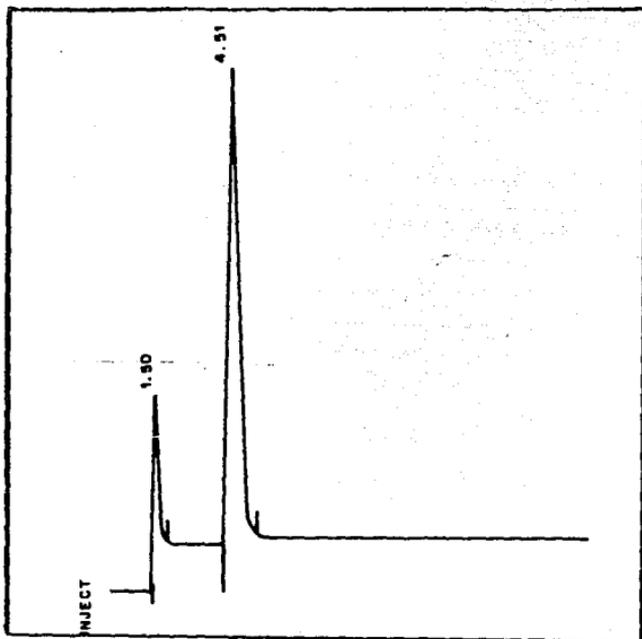
CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL D5F
ESTANDAR EN EL QUE SE OBSERVA UN
PICO CON UN ($t_R = 1.50$ min.)

FIG. No. 11



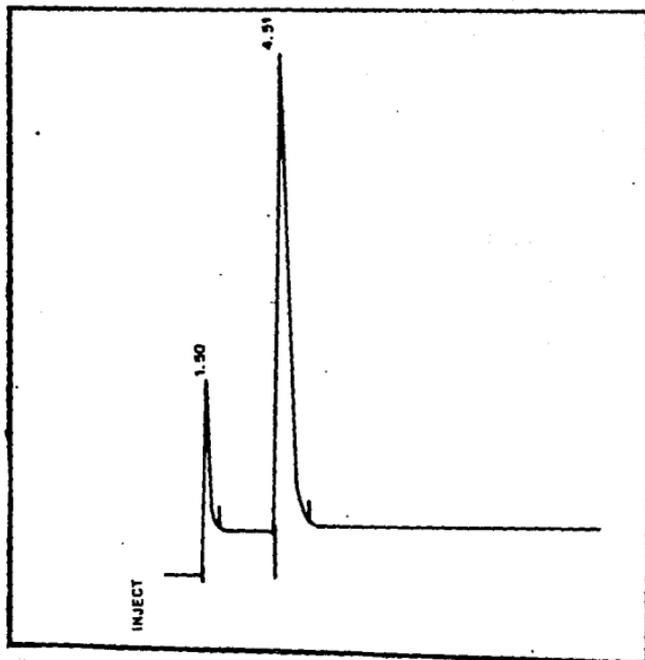
CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA LA
CIPROHEPTADINA ESTANDAR EN EL QUE SE OBSERVA
UN PICO CON UN ($t_R = 4.52$ min.)

FIG. No. 12



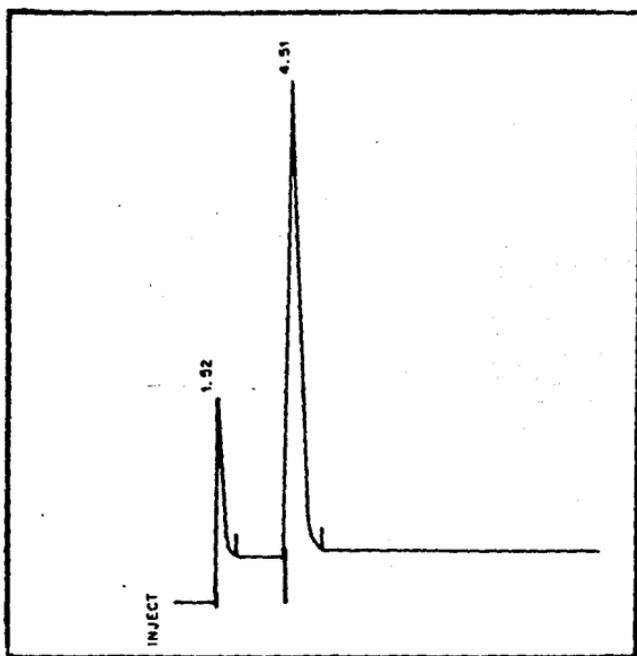
CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
ESTANDAR EN EL QUE SE OBSERVAN DOS PICOS
QUE CORRESPONDEN AL P5F ($t_R = 1.50$ min.) Y
LA CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.51$ min.)

FIG. No. 13



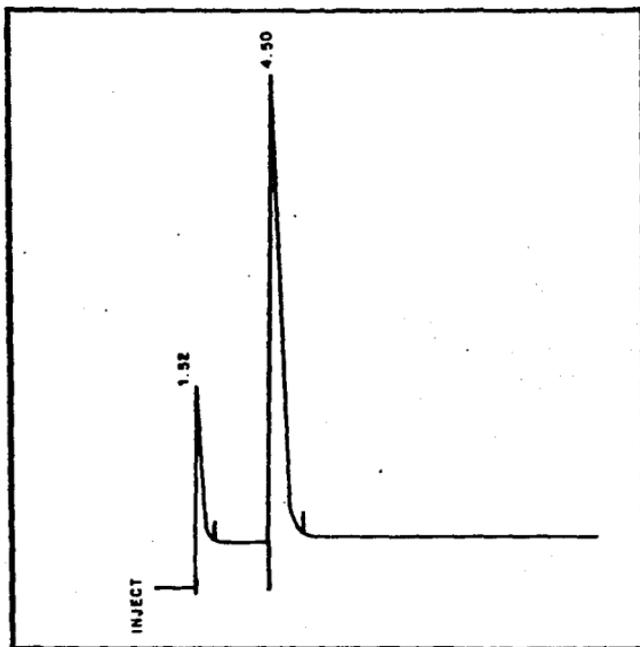
CROMATOGRAMA DE DIHEXAZIN MUESTRA EN EL QUE SE OBSERVAN DOS PICOS QUE CORRESPONDEN AL P5F CON UN ($t_R = 1.50 \text{ min.}$) Y A LA CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.51 \text{ min.}$)

FIG. No. 14

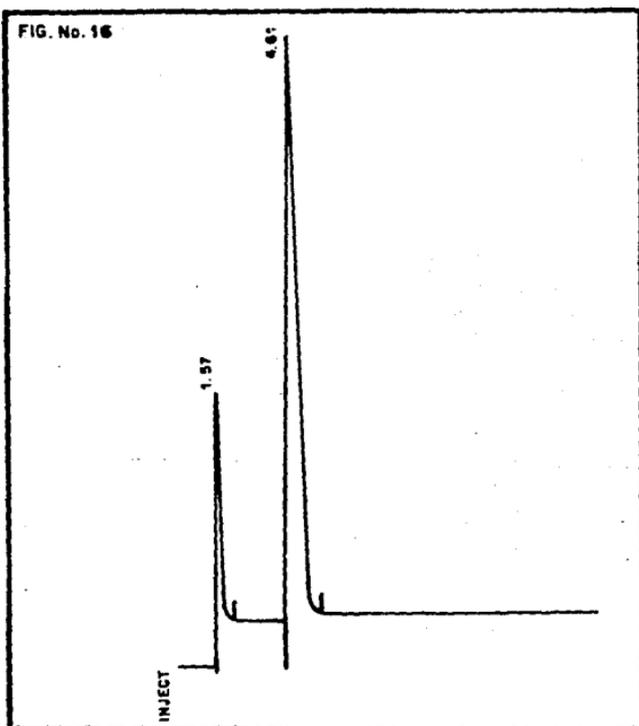


CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
SOMETIDO A LA TEMPERATURA DE 70°C POR
20 DIAS EN EL QUE SE OBSERVAN DOS PICOS
QUE CORRESPONDEN AL PSF ($t_R = 1.52$ min.) Y
A LA CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.51$ min.)

FIG. No. 15

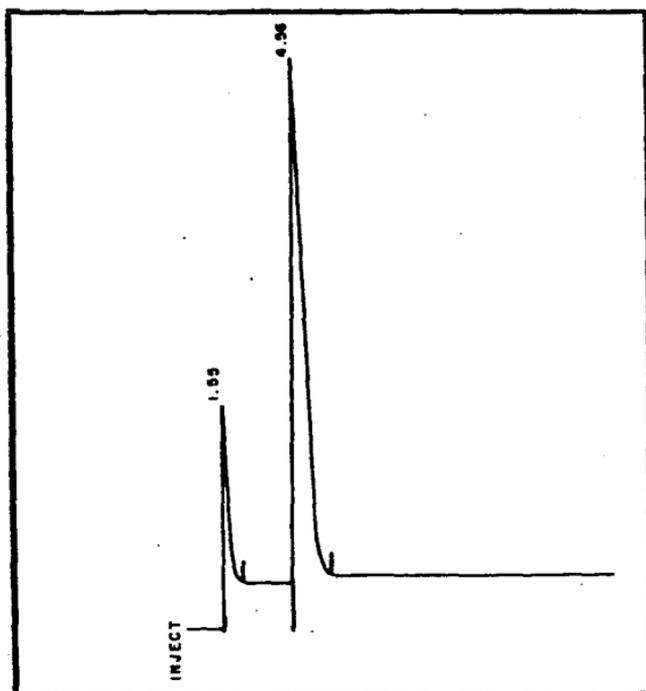


GROMATOGAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
SOMETIDO A LA ACCION DE LA LUZ SOLAR POR
20 DIAS EN EL QUE SE OBSERVAN DOS PICOS
QUE CORRESPONDEN AL P5F ($t_R = 1.52$ min.) Y
A LA CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.50$ min.)

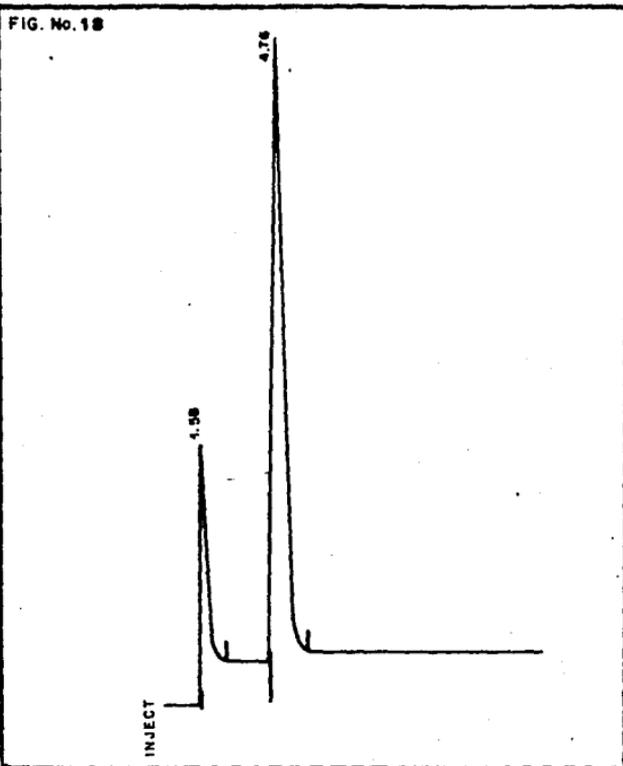


CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
SOMETIDO A UN MEDIO ACIDO POR 10 DIAS
OBTENIENDOSE DOS PICOS. P5F ($t_R = 1.57$ min.)
Y CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.61$ min.)

FIG. No. 17



CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
SOMETIDO A UN MEDIO ALCALINO POR 10 DIAS
OBTENIENDO DOS PICOS. P5F ($t_R = 1.55 \text{ min}$)
CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.56 \text{ min.}$)



CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA EL DIHEXAZIN
SOMETIDO A LA ACCION DE H_2O_2 DURANTE 10
DIAS OBTENIENDOSE DOS PICOS P5F ($t = 1.58$ min)
Y CIPROHEPTADINA ($t_R = 4.76$ min)

Miligramos Adicionados (x)	Miligramos Recuperados (y)	Porcentaje de Recuperación (y/x)
0.12	0.12128	101.05
0.12	0.12268	102.23
0.12	0.12008	100.05
0.12	0.12306	102.65
0.12	0.12010	100.08
0.12	0.12000	100.00
0.12	0.11747	97.89
0.12	0.12011	100.09

Tabla 2. Datos para la evaluación estadística de la Exactitud y de la Repetibilidad para Piridoxal 5 Fosfato.

Media.	$\bar{y} = 99.919$
Desviación Estándar.	$S = 1.77622$
Número de Datos.	$n = 10$

10.2.1 EXACTITUD

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : \mu = 100\%$$

$$H_1 : \mu \neq 100\%$$

2) Resultados:

$$t_{\text{calc}} = -0.14420$$

$$t_{(10, 975, 9)} = 2.26$$

$t_{(10, 975, 9)} > t_{\text{calc}}$. \therefore No se rechaza H_0 y podemos concluir que el método es exacto.

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$98.64959 < \mu < 101.19841$$

10.2.2 REPETIBILIDAD.

Las fórmulas para calcular la repetibilidad se encuentra en el Anexo C.

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 : \sigma > 2\%$$

2) Resultados:

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 7.09849$$

$$\chi^2_{(10, 975, 9)} = 16.919$$

$\chi^2_{(10, 975, 9)} > \chi^2_{\text{calc.}}$. \therefore No se rechaza H_0 y podemos decir que la técnica es repetible.

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$1.22245 < \sigma < 3.24293$$

10.2.3 LINEARIDAD.

En la tabla 3 y en la gráfica No. 1 se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP) para la determinación de Piridoxal 5 Fosfato (P5F).

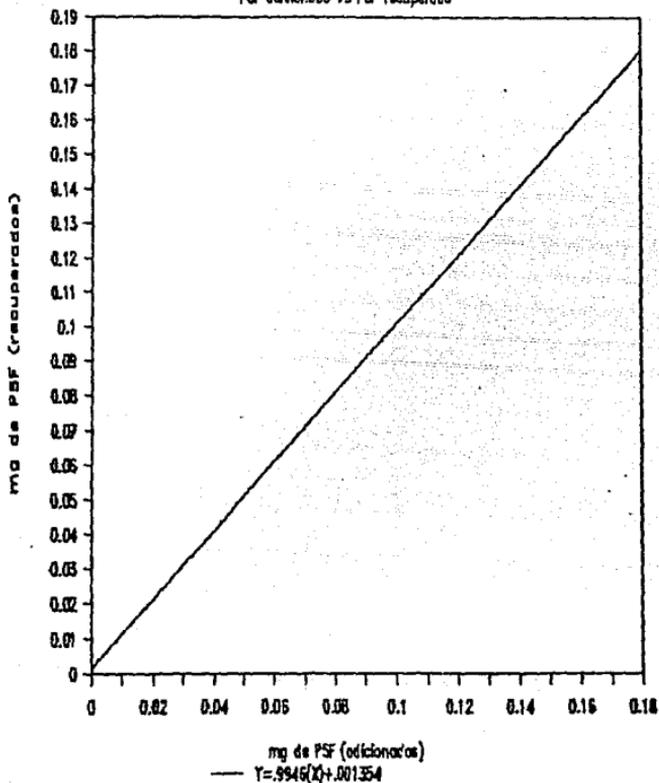
Las fórmulas para los cálculos de linealidad se encuentran en el Anexo D.

Miligramos Adicionados (x)	Miligramos Recuperados (y)	Porcentaje de Recuperación (y/x)
0.05	0.06090	101.50
0.09	0.09105	101.06
0.12	0.11919	99.32
0.15	0.15355	102.36
0.18	0.17894	99.35

Tabla 3 Datos para la evaluación estadística de la linealidad para Piridoxal 5 Fosfato.

LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO / CLAP

PSF adicionado VS PSF recuperado



GRAFICA NO. 1. Linearidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para PSF adicionado contra PSF recuperado.

$$\bar{y} = 0.12071$$

$$S_y = 0.04722$$

$$\bar{x} = 0.12$$

$$S_x = 0.04743$$

Intercepto a la ordenada:

$$a = 0.00135$$

Pendiente:

$$b = 0.99460$$

Coefficiente de Correlación:

$$r = 0.99923$$

$$\Sigma y = 0.06035$$

$$\Sigma_{xy} = 0.08138$$

$$\Sigma y^2 = 0.09177$$

$$\Sigma x^2 = 0.81000$$

$$S_{y/x} = 0.00167$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.00216$$

10.2.3.1 INTERCEPTO A LA ORDENADA AL ORIGEN (a)

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : a = 0$$

$$H_1 : a \neq 0$$

2) Resultados:

$$t_{\text{calc.}} = 0.45722$$

$$t_{(0.95, 3)} = 2.35$$

$t_{(0.95, 3)} > t_{\text{calc.}} \therefore$ No se rechaza H_0 y podemos concluir que

$$a = 0$$

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$- 0.01648 < a < 0.01919$$

10.2.3.2 INTERFERENCIAS ACERCA DE LA PENDIENTE (b).

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : b = 1$$

$$H_1 : b \neq 1$$

2) Resultados:

$$t_{\text{calc.}} = -0.23717$$

$$t_{(0.95,3)} = 2.35$$

$t_{(0.95,3)} > t_{\text{calc.}}$ ∴ No se rechaza H_0 y podemos concluir que
 $b = 1$

3) Intervalo de confianza (95%):

$$0.94109 < b < 1.04810$$

10.2.4 REPRODUCIBILIDAD.

Los resultados obtenidos para el estudio del efecto de

analista y día para la reproducibilidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), para la determinación de Piridoxal 5 Fosfato (PSF) se muestran en la tabla 4.

Las fórmulas para el cálculo se encuentran en el Anexo E.

DIA	ANALISTA	
	J = 1	J = 2
i=1	100.54	100.32
	98.45	100.65
	101.01	99.01
i=2	100.40	100.95
	99.80	97.18
	98.38	97.78

Tabla 4 Datos para la Evaluación Estadística de la Reproducibilidad para el Piridoxal 5 Fosfato.

$$\frac{\sum y_i}{6} = 119879.2454$$

$$\frac{\Sigma \Sigma y_{ij}^2}{3} = 118880.6243$$

$$\frac{y_i^2}{12} = 118876.6414$$

$$\frac{\Sigma \Sigma y_{ij}^2}{6} = 118877.2901$$

$$\Sigma \Sigma \Sigma y_{ijk}^2 = 118895.6469$$

$F_{teórica} > F_{calc.}$ ∴ No existe ningún efecto de alguna de las fuentes de variación en la determinación de Piridoxal. 5 Fosfato (PSF), por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP). (v. tabla 5).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados	Media Cuadratica	F _{calc.}	F _{teor}
D _i	1	2.6040	2.6040	4.1320	161.4
A _j	1	0.8487	0.8487	1.0293	1.641
DA _{ij}	1	0.6302	0.6302	0.3324	5.32
E _{(i,j)k}	.8	15.1226	1.8903		

Tabla 5 Análisis de Varianza para el Piridoxal 5 Fosfato.

10.3 EVALUACION ESTADISTICA PARA LA CIPROHEPTADINA.

Los resultados obtenidos para la evaluación estadística de la exactitud y repetibilidad del método por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), para la determinación de Ciproheptadina se muestran en la tabla 6.

Las fórmulas de cálculo para cada uno de los siguientes subíndices se encuentran en los Anexos A, B, C.

D y E.

Miligramos Adicionados (x)	Miligramos Recuperados (y)	Porcentaje de Recuperados (y%)
0.12	0.12129	100.24
0.12	0.12409	103.40
0.12	0.11939	99.49
0.12	0.11771	98.09
0.12	0.12000	100.00
0.12	0.11993	99.94
0.12	0.12000	100.00
0.12	0.11803	98.35
0.12	0.11999	99.99
0.12	0.11918	99.31

Tabla 6 Datos para la evaluación estadística de la Exactitud y Repetibilidad para la Ciproheptadina.

Media:

$$\bar{y} = 99.891$$

Desviación Estándar:

$$S = 1.43707$$

Número de Datos:

$$n = 10$$

10.3.1 EXACTITUD

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : \mu = 100\%$$

$$H_1 : \mu \neq 100\%$$

2) Resultados :

$$t_{\text{calc.}} = -0.23196$$

$$t_{(0.975,9)} = 2.26$$

$t_{(0.975,9)} > t_{\text{calc.}}$ \therefore No se rechaza H_0 y podemos concluir que el método es exacto.

3) Intervalo de Confianza (95%) :

$$98.85396 < \mu < 100.90804$$

10.3.2 REPETIBILIDAD.

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : \sigma \leq 2\%$$

$$H_1 : \sigma > 2\%$$

2) Resultados:

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 4.84862$$

$$\chi^2_{(0.95,9)} = 16.91$$

$\chi^2_{(10, 95,0)} > \chi^2_{calc.}$ ∴ No se rechaza H_0 y podemos concluir que el método es repetible.

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$0.98906 < \sigma < 2.62372$$

10.3.3 LINEARIDAD.

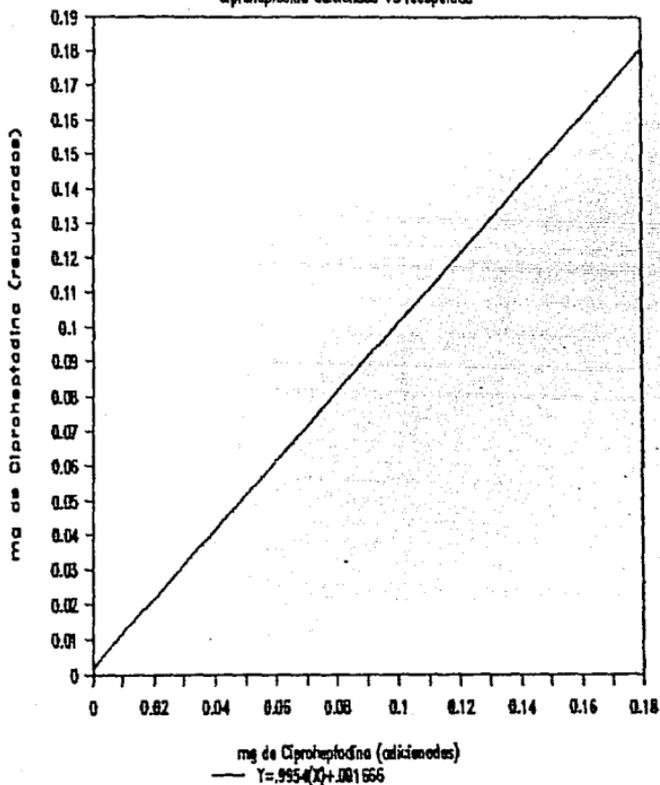
En la tabla 7 y en la gráfica No. 2 se muestran los resultados, obtenidos, para la linealidad del método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), para la determinación de Ciproheptadina.

Miligramos Adicionados (x)	Miligramos Recuperados (y)	Porcentaje de Recuperación (y%)
0.06	0.06176	102.93
0.09	0.09100	101.11
0.12	0.12146	101.22
0.15	0.14953	99.68
0.18	0.18180	101.00

Tabla 7 Datos para la evaluación estadística de la Linealidad para la Ciproheptadina.

LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO / CLAP

Ciproheptadina adicionada VS recuperada



GRAFICA NO. 2. Linearidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión para Ciproheptadina adicionada contra Ciproheptadina recuperada.

$$\bar{y} = 0.12111$$

$$S_y = 0.47223$$

$$\bar{x} = 0.12000$$

$$S_x = 0.04743$$

Intercepto a la Ordenada:

$$a = 0.00168$$

Pendiente:

$$b = 0.99536$$

Coefficiente de Correlación:

$$r = 0.99981$$

$$\Sigma y = 0.6055$$

$$\Sigma xy = 0.08162$$

$$\Sigma y^2 = 0.82258$$

$$\Sigma x^2 = 0.08100$$

$$S_{y/x} = 0.00082$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.00108$$

10.3.3.1 INTERCEPTO DE LA ORDENADA AL ORIGEN (a)

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : a = 0$$

$$H_1 : a \neq 0$$

2) Resultados:

$$t_{\text{calc.}} = 1.88038$$

$$t_{(0.95,3)} = 2.35$$

$t_{(0.95,3)} > t_{\text{calc.}}$ ∴ No se rechaza H_0 y podemos concluir que

$$a = 0$$

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$-0.00711 < a < 0.01044$$

10.3.3.2 INTERFERENCIAS ACERCA DE LA PENDIENTE (b).

1) Prueba de Hipótesis:

$$H_0 : b = 1$$

$$H_1 : b \neq 1$$

2) Resultados:

$$t_{\text{calc.}} = -0.41346$$

$$t_{(0.95,3)} = 2.35$$

$t_{(0.95,3)} > t_{\text{calc.}}$ \therefore No se rechaza H_0 y podemos concluir que

$$b = 1$$

3) Intervalo de Confianza (95%):

$$0.96902 < b < 1.02170$$

10.3.4. REPRODUCIBILIDAD.

Los resultados obtenidos para el estudio del efecto de analista y día para la reproducibilidad del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), para la determinación de Ciproheptadina se muestran en la tabla 9.

DIA	ANALISTA	
	J = 1	J = 2
1=1	100.32	99.99
	100.10	99.87
	99.56	101.39
1=2	100.90	100.74
	100.09	101.19
	100.06	102.95

Tabla 8 Datos para la Evaluación Estadística de la Reproducibilidad para la Ciproheptadina.

$$\frac{\sum y_i^2}{6} = 121355.6849$$

$$\frac{\sum \sum y_{i,j}^2}{3} = 121359.3505$$

$$\frac{y^2}{12} = 121351.7956$$

$$\frac{\sum \sum y_j^2}{6} = 121353.6109$$

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = 121365.1942$$

$F_{teórica} > F_{calc}$. No existe ningún efecto de alguna de las fuentes de variación en la determinación de Ciproheptadina por Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP). (v. tabla 9).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados	Media Cuadrática	F_{calc}	F_{teor}
D _i	1	3.8988	3.8988	2.1179	161.4
A _j	1	1.8252	1.8252	0.9915	161.4
DA _{ij}	1	1.8409	1.8409	2.5200	5.32
E _{(i,j)k}	8	5.8437	0.7305		

Tabla 9 Análisis de Varianza para la Ciproheptadina.

11. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), para Dihexazin es específico ya que logra separar, identificar y cuantificar al Piridoxal 5 Fosfato (PSF) y la Ciproheptadina, así como a sus productos de degradación.

- La Evaluación Estadística demostró que se cumplieron los objetivos planteados, ya que el método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), para Dihexazin es Exacto, Repetible, Reproducible y Lineal a un 95 % de probabilidad por cada uno de los componentes (Piridoxal 5 Fosfato y Ciproheptadina).

BIBLIOGRAFIA

1. Drills., Pharmacology in Medicine., 4 A. Ed. Mc.Graw-Hill., New York (1971). 35-47.
2. - Bowman. W.C. Farmacologia. 2A. Ed. Interamerica., México, D.F. (1978). 12-18.
3. - Bergen. S.S. Am. J. Dis. Child., 108-270 (1964).
4. - Charraharty, A.S. y Col. Brain Res., 6. 561 (1967).
5. - Das. G.V., Journal of Pharmaceutical Sciences. 9, (10), 1145-48 Octubre (1980).
6. - Fryde. A. and Gilbert, M.T. Applications of High Performance Liquid Chromatography. First by Chapman and Haall., New York (1979).
7. - Giddings, J. et al Advances in Chromatography. Marcel Dekker., 12, 137-42 (New York 1975).
8. - Abbott. D. and Andrews. Introduction to Chromatography. 2A. Ed., London (1975). 22-35.
9. - Edwards. L. An Introduction to Chromatography. 5A. Ed. Mill Hill. New York (1981).
10. - Harol, M. y Esquivel, B. Cromatografía Líquida de Alta Presión. 2A. Ed., Programa Regional de Desarrollo

Científico y Tecnológico.. Washington, D.C. (1980). 2-38.

11. - Ettre, L.S. y Horvath, C. The Foundation of Modern Liquid Chromatography., Analytical Chemistry., U.S.A. (1978).

12. - Johnson, E.L. and Stevenson, H. Basic Liquid Chromatography. Varian., California (1978).

13. - Cassidy, H.G. Fundamentals of Chromatography., 2A Ed., Interscienc., New York (1978), 289-398.

14. - Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución., Ed. Escuela de Cromatografía Líquida., Millipore Div. Waters Ass. Inc Mexico. D.F. (1994), 49-63

15. - Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introducción Modern Liquid Chromatography., 2A Ed., John Wiley -Sons, Inc., New York (1979). 542-50.

16. - Simpson, C.F. Practical High Performance Liquid Chromatography. Inglaterra (1978).

17. - Thin, L. Chromatography., 2A Ed., Egon Stahl., Berlin (1969), 496- 578.

18. - Yost, R. W. et al., Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica., Perkin Elmer., U.S.A. (1981). 148-211.

19. - Hefman. E. Chromatography., 2A. Ed., Reinhold Publishing Corporation., New York (1972).

20. - Massart, L.D. and Dijkstra, A. Evaluation an Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures. Elsevier Scientific Publishing Company., Amsterdam- Oxford-New York (1978), 7-22.

21. - Williams, G.C. Diseños Experimentales., 9 A. Trillas., México D.F. (1985), 34-55.

22. - Lartinen, H.A. and Walter, E.H. Chemical Analysis. 2A. Ed. Mc Graw- Hill Kogakusha., U.S.A. (1975), 534-557.

23. - Técnica de Laboratorios Senosiain. S.A. de C.V.

24. - Windholz, M. et al. The Merck Index., 9A. Ed., Merck I.Co., U.S.A. (1976), 4798-6542.

25. - Genaro, A. R. et al. Remingtons Pharmaceutical Science., 17 A. Ed., Board., Philadelphia (1985), 1152-60.

ANEXO A FORMULAS GENERALES.

FORMULAS:

- Media Aritmética (\bar{x}).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Desviación Estándar Muestral (S).

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- Varianza (S^2).

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

- Error Estándar Aproximado (E.S.).

$$E.S. = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

- Error Máximo de Estimación para el 95% de Probabilidad (E).

$$E = E.S. \cdot t_{(0.075, n-1)}$$

- Ecuación de la Recta.

$$y = a + bx$$

Ordenada al Origen (a).

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

- Pendiente de la Recta (b)

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

- Coeficiente de Correlación Muestral (r).

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

- Error Estándar de Regresión ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y^2) - a \sum y - b \sum (xy)}{n}}$$

- Error Estándar ($\hat{S}_{y/x}$)

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} S_{y/x}$$

ANEXO B FORMULAS PARA LA EXACTITUD.

- Modelo Probabilístico.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{\bar{y} - \mu}{S \sqrt{\frac{1}{n}}}$$

- Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: \mu = 100\%$$

$$H_1: \mu \neq 100\%$$

- Decisión Estadística.

Si $t_{(0,975,n-1)} > t_{\text{calc.}}$, no se rechaza H_0 se puede concluir que $\mu = 100\%$ el método es exacto.

- Intervalo de Confianza para el 95% de Probabilidad,
con $n-1$ grados de libertad.

$$IC_{(95\%)} = \bar{x} \pm t_{(0,975,n-1)} \text{ E.S.}$$

ANEXO C FORMULAS PARA LA REPETIBILIDAD.

- Modelo Probabilístico.

$$\chi^2_{\text{calc.}} = \frac{(n-1) \cdot S^2}{\sigma^2}$$

- Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: \sigma \leq 2\%$$

$$H_1: \sigma > 2\%$$

- Decisión Estadística.

Si $\chi^2_{(0.95, n-1)} > \chi^2_{\text{calc.}}$, no se rechaza H_0 y se puede concluir que $\sigma \leq 2\%$ ∴ el método es repetible.

- Intervalo de Confianza para el 95% de Probabilidad con $n - 1$ grados de libertad.

$$\frac{(n-1) S^2}{\chi^2_{(0.95, n-1)}} < \sigma^2 < \frac{(n-1) S^2}{\chi^2_{(0.025, n-1)}}$$

ANEXO D FORMULAS PARA LA LINEARIDAD.

Intercepto de la Ordenada al Origen.

- Modelo Probabilístico.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{a - A_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n(\sum x_i - \bar{x})^2}}}$$

- Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: a = A_0$$

$$H_1: a \neq A_0$$

Donde $A_0 = 0$

- Decisión Estadística.

Si $t_{\text{calc.}} > t_{\alpha, ps, n-2}$ no se rechaza la H_0 y se puede concluir que $a = 0$

- Intervalo de Confianza para el 95% de Probabilidad,
con $n - 2$ grados de libertad.

$$a \pm t_{(0.975, n-2)} \frac{\hat{S}_{y/x}}{\sqrt{\sum x^2}}$$

Pendiente.

- Modelo Probabilístico.

$$t_{\text{calc.}} = \frac{(b - b_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

- Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: b = b_0$$

$$H_1: b \neq b_0$$

- Decisión Estadística.

Si $t_{(0.975, n-2)} > t_{\text{calc.}}$ no se rechaza. Hoy podemos concluir que $b = 1$

- Intervalo de Confianza para el 95% de Probabilidad.

n - 2 grados de libertad.

$$b \pm t_{(0.99, n-2)} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

ANEXO E FORMULAS PARA LA REPRODUCIBILIDAD

Modelo Matemático (2 factores aleatorios).

$$y_{ij} = \mu + D_i + A_j + AD_{ij} + E_{(i)jk}$$

Donde:

y_{ij} = Porcentaje cuantificado con el i -ésimo analista en el j -ésimo día en la k -ésima repetición.

D_i = Efecto del i -ésimo día en el porcentaje cuantificado.

A_j = Efecto del j -ésimo analista en el porcentaje cuantificado.

AD_{ij} = Efecto debido a la interacción día-analista.

$E_{(i)jk}$ = Error experimental.

Inferencia.

1. - Efecto por Día.

$$\text{Si } F_{\text{cal-Día}} < F_{(i, 95)} \text{ con } \frac{\text{G. L. Día}}{\text{G. L. An-Día}} = \frac{i - 1}{(i-1)(j-1)}$$

No existe efecto por día.

2. - Efecto por Analista.

$$\text{Si } F_{\text{cal-An.}} < F_{(j, 95)} \text{ con } \frac{\text{G. L. An.}}{\text{G. L. An. Día}} = \frac{j - 1}{(j-1)(i-1)}$$

No existe efecto por analista.

3. - Efecto por Interacción Analista- Día.

$$\text{Si } F_{\text{calc. An-Día}} < F_{(i, 95)} \text{ con } \frac{\text{G. L. An-Día}}{\text{G. L. error}} = \frac{(j-1)(i-1)}{ij(k-1)}$$

No existe efecto por analista-día.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Sumatoria de Cuadrados(S. C.)	Media Cuadrática (C. M.)	F _{calc.}	
D _i	i-1	$\frac{\sum y_i^2}{jk}$	$\frac{y^2}{ijk}$	S. C. Df _a	C. M. Df _a
				i-1	C. M. An-D
A _j	j-1	$\frac{\sum y_j^2}{ik}$	$\frac{y^2}{ijk}$	S. C. An	C. M. An
				j-1	C. M. An-D
AD _{ij}	(i-1)(j-1)	$\frac{\sum y_{ij}^2}{k}$	$\frac{\sum y_i^2}{ik}$	S. M. An-D	C. M. An-D
				(i-1)(j-1)	C. M. error
		$\frac{\sum y_i^2}{jk}$	$\frac{y^2}{ijk}$		

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA