

28  
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN  
METODO PARA LA DETERMINACION  
DE VITAMINAS DEL COMPLEJO B  
EN UN POLIFARMACO POR CROMATOGRAFIA  
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A**

**GABRIEL GARCIA DEL VALLE BLANCO**



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.

## I.- INTRODUCCION

En la industria Farmacéutica actual se requiere de métodos analíticos que permitan realizar en forma confiable y rápida, la determinación cuantitativa de fármacos activos solos o asociados con otros fármacos en los diversos tipos de medicamentos existentes en el mercado.

Es frecuente encontrar dificultades para el análisis de cada una de las sustancias debido a la complejidad y variabilidad de la composición de los medicamentos existentes. Por lo mismo se hace difícil encontrar en la literatura un camino claro y recto a seguir, por lo que se modifican y adaptan procedimientos ya existentes para lograr la cuantificación confiable de las sustancias por analizar, o bien, se desarrolla un nuevo método.

Por lo anterior, uno de los objetivos que persigue el Desarrollo Analítico es implementar nuevos métodos de cuantificación de fármacos activos o la adaptación y/o mejoramiento de técnicas ya existentes para la detección y cuantificación de las sustancias farmacológicamente activas de interés, de una manera rápida, confiable y, en la medida de lo posible, al menor costo.

El propósito de este trabajo fué el de desarrollar un método analítico que permita determinar simultáneamente las vitaminas del complejo B contenidas en un polifármaco (Clorhidrato de Tiamina, Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Riboflavina 5-Fosfato de Sodio). El método propuesto para lograr esta finalidad es mediante la utilización de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección de las vitaminas en la región de Ultravioleta. La técnica cromatográfica empleada en este trabajo está basada en la formación de un par iónico entre la sustancia de interés y un contraión adecuado según se explicará más adelante.

Se realizaron estudios de especificidad para cada una de las vitaminas y posteriormente se llevó a cabo la validación estadística del método.

Por último se discuten las ventajas y desventajas del método desarrollado.

## II.- GENERALIDADES

## 1.- CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA.

### 1.1. Introducción (10. 17, 22).

La cromatografía es un proceso que básicamente involucra la separación de sustancias debido a diferencias en su equilibrio de distribución entre dos fases inmiscibles. Una de estas fases, es una fase "móvil" y la otra, es una fase "estacionaria". Los componentes de la mezcla migran a través del sistema cromatográfico a diferentes velocidades, los componentes de la mezcla que tienen ya equilibrio de distribución favorables hacia la fase estacionaria migran más lentamente que aquellos que tienen un equilibrio de distribución favorable hacia la fase móvil. La separación es pues, el resultado de las diferentes velocidades de migración de los componentes de la mezcla como consecuencia de las diferencias en los equilibrios de distribución. El proceso cromatográfico se inicia al colocar los componentes de la mezcla al principio del sistema cromatográfico ocurriendo el desarrollo a través del sistema. Si el sistema está compuesto de una columna, los componentes eluyen a través de ésta de acuerdo con sus equilibrios de distribución entre la fase estacionaria y la fase móvil, la distribución de la concentración va tomando una forma simétrica y gaussiana conforme se va verificando el proceso cromatográfico.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de fase móvil y fase estacionaria seleccionadas. La Cromatografía de gases involucra aquellos en los cuales la fase móvil es un gas; la Cromatografía líquida moderna involucra aquellos en los cuales la fase móvil es un líquido. Las diferentes fases estacionarias dan origen a las llamadas cromatografías líquido-líquido, gas-sólido y líquido-sólido.

Dentro de la cromatografía de líquidos existe una técnica cromatográfica conocida como cromatografía de reparto ó partición. El proceso responsable de la retención es una -- distribución líquido-líquido, ésto es que el proceso de equilibrio es prácticamente idéntico al de la extracción líquido-líquido.

En el caso de que la Cromatografía de Partición se --- efectúe en "fase normal", la fase estacionaria será la más - polar de los dos líquidos. Esta fase se adsorbe formando -- una película muy delgada sobre la superficie de un sólido finamente dividido, el cual es el soporte de la fase estacionaria. En teoría, el único papel del soporte en este tipo de cromatografía es contener a la fase estacionaria. La fase - móvil es un disolvente menos polar inmiscible en la fase estacionaria. Muy a menudo la fase estacionaria es agua o una solución acuosa y la fase móvil es un disolvente orgánico.

Cuando la fase estacionaria es un disolvente no polar (disolventes orgánicos) y la fase móvil es polar (agua, ó solución acuosa de disolventes orgánicos más o menos polares como metanol, acetonitrilo, etc.), esta técnica se conoce como cromatografía en fase reversa ó fase invertida.

Como las fases estacionarias químicamente enlazadas -- son más estables que las físicamente adsorbidas, su uso es - más simple y se obtienen eficiencias mayores, por eso han -- desplazado casi por completo a la cromatografía de reparto - sobre fases impregnadas. Las fases químicamente enlazadas - se unen al soporte mediante enlaces covalentes. Debido a -- que no se conocía en principio su mecanismo de retención se les clasificó originalmente dentro de la cromatografía de reparto. Sin embargo, Horvath et al han realizado estudios en

años recientes para tratar de dilucidar el comportamiento de estas fases, el cual lo han explicado mediante la teoría del efecto solvofóbico, siendo esta teoría la más aceptada actualmente.

Otros avances recientes en la cromatografía líquida -- son la obtención de fases estacionarias de granulometría pequeña (3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ ) con lo cual se obtienen mayores eficiencias y mayor resolución, y, el desarrollo de equipo altamente automatizado que permite efectuar mayor número de análisis -- en menor tiempo.

En general, la cromatografía en fase normal se usa para separar compuestos polares y medianamente polares. Los compuestos menos polares se separan por cromatografía en fase reversa, ésta última es la que tiene mayor utilidad actualmente debido a su sencillez y a que permite separar una gran variedad de compuestos.

## 1.2. Cromatografía de Pares de Iones (9, 22, 23).

### 1.2.1. Introducción.

Esta técnica cromatográfica surge a mediados -- de la década de los setentas como una alternativa en la separación de compuestos iónicos, dadas las limitaciones prácticas que presentaban las columnas de intercambio iónico.

El desarrollo de la cromatografía de pares de iones se atribuye generalmente a G. Schill et al. Ellos fueron los primeros en aplicar las técnicas de extracción con pares de iones a la cromatografía líquida moderna. Encontraron que -- las columnas de sílica gel y celulosa podían ser cubiertas con una disolución acuosa de un reactivo capaz de formar pares de iones y empleando fases móviles poco polares, se po--

dian obtener excelentes separaciones de especies iónicas.

Las primeras publicaciones sobre cromatografía de pares de iones consideran un sistema constituido por una fase líquida impregnada sobre un soporte, la fase estacionaria, y otro líquido miscible con la fase estacionaria denominado fase móvil. Una de estas fases es acuosa y contiene sales, amortiguadores de pH y el agente formador del par de iones al cual se le llama contra-ión; la otra fase está formada por un disolvente o mezcla de disolventes orgánicos con capacidad para extraer el par de iones soluto/contra-ión de la fase acuosa. El contra-ión es un ión de carga opuesta a la de los solutos que se desean separar y puede ser orgánico ó inorgánico. Dependiendo de que la fase acuosa sea móvil o estacionaria se tratará de cromatografía en fase reversa ó en fase móvil respectivamente.

Como es de esperarse, este sistema tiene los problemas inherentes a las fases impregnadas por lo que se ha desarrollado la cromatografía de pares de iones en fase reversa sobre fases estacionarias químicamente enlazadas que han venido a desplazar totalmente a las fases impregnadas. Es a esta última técnica a la que nos referiremos exclusivamente a continuación.

#### 1.2.2. Fases Estacionarias en la Cromatografía de Pares de Iones en Fase Reversa.

Se utilizan las mismas fases estacionarias usadas en cromatografía en fase reversa (cadenas de 8-18 carbonos enlazadas químicamente a la sílice mediante una reacción de silinización).

#### 1.2.3. Fases Móviles en la Cromatografía de Pares de Iones en Fase Reversa.

Se utilizan como tales una mezcla de agua/disolvente orgánico. Las mezclas más utilizadas son agua/metanol y agua/acetonitrilo. La fase móvil además contiene algún amortiguador de pH que permite fijar el pH del medio con lo cual se garantiza que los solutos por separar estén ionizados; también contiene algunas otras sales inorgánicas y una sal del contra-ión.

La retención de los solutos se ve modificada por diversos parámetros que se pueden manejar, tales como: variación de la naturaleza del contra-ión ó de las sales, variación de la proporción del disolvente orgánico, cambios en el pH (que eventualmente provoca cambios en la selectividad), cambios en la concentración de sales en la fase móvil particularmente de iones del mismo signo que el soluto y cambios en la concentración del contra-ión.

El contra-ión es generalmente un ión orgánico cuya molécula poseé una parte hidrocarbonada importante. A mayor área hidrocarbonada en la molécula del contra-ión mayor será la retención de los solutos. Como contra-iones son muy utilizados los iones alquilsulfato y alquilsulfonato (para separar solutos catiónicos) y, los iones tetraalquilamonió ó aminas terciarias ionizadas (para separar solutos aniónicos).

#### 1.2.4. Mecanismos de Retención.

El mecanismo de retención en esta técnica -- cromatográfica aún no está completamente elucidado. Sin embargo, pese a las fuertes polémicas existentes, se aceptan los siguientes mecanismos de retención como los más probables.

- a) Adsorción del soluto iónico en la fase estacionaria.
- b) Adsorción del contra-ión en la fase estacionaria según su isoterna de adsorción.
- c) Formación de pares de iones soluto-contraión en el eluente.
- d) Intercambio Iónico dinámico que según muchos investigadores es el que permite explicar en mayor medida el comportamiento observado en los solutos.
- e) Formación de Pares de Iones soluto-contraión en la fase estacionaria.

#### 1.2.5. Aplicaciones.

En general, la cromatografía por formación de pares de iones ha sido aplicada a muestras de naturaleza polar tales como bases, ácidos, iones y compuestos con varios grupos ionizables. También se ha utilizado para el análisis de fluidos fisiológicos. Algunos ejemplos de aplicación son: separación y análisis de alcaloides, analgésicos, antipiréticos, antibióticos, antihistamínicos, antitusivos, vitaminas hidrosolubles, aminosulfonatos e hidroxisulfonatos de colorantes, surfactantes, descongestionantes, etc.

### 1.3. Conceptos Básicos en Cromatografía (11, 14, 17)

#### 1.3.1. Tiempo de Retención ( $t_r$ ).

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto de la señal o pico. El tiempo de retención es característica de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura. Por lo general se emplea como medida de tipo cualitativo.

### 1.3.2. Tiempo Muerto ( $t_0$ ó $t_m$ ).

Es el tiempo requerido par eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma, o bien de una muestra similar.

### 1.3.3. Tiempo de Retención 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 relleno de la columna. Dicho de otra manera,  $t_r$  es el tiempo total de permanencia en la columna,  $t_0$  el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil, y por lo tanto  $t'_r$  es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

### 1.3.4. Anchura de la Base de las Señales (W).

Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazados a ambos lados de una señal cromatográfica asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de una desviación standard ( $\sigma$ ); este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

### 1.3.5. Número de Platos Teóricos (N).

Una de las más importantes características de un sistema cromatográfico es su eficiencia o número de Platos Teóricos N. El número de platos N puede ser definido a partir de un cromatograma de una banda sencilla como sigue:

$$N = (t_r / \sigma)^2$$



### 1.3.7. Coeficiente de Distribución ó de Reparto ( $K_D$ ).

Se define por:

$$K_D = \frac{\text{Masa de Muestra en F.E./Volumen de F.E.}}{\text{Masa de Muestra en F.M./Volumen de F.M.}}$$

El coeficiente de distribución es una propiedad fisico química fundamental de cada sustancia. Es característico de cada soluto, del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración y también es función de la temperatura.

### 1.3.8. Factor de Capacidad ( $k'$ ).

Se define por:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{t_r'}{t_0} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

### 1.3.9. Resolución (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos (A y B):

$$R = \frac{2 \Delta t}{(W_a + W_b)} = \frac{2(t_{rb} - t_{ra})}{(W_a + W_b)}$$

T,  $W_a$  y  $W_b$  debenser expresados en las mismas unidades. Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa.

### 1.3.10. Selectividad ( $\alpha$ ).

Valores elevados de  $\alpha$  significan mejores separaciones.

$$\alpha = t_{rb}'/t_{ra}'$$

En forma práctica se puede decir que  $\alpha$  es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

## 2.- DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

### 2.1. Introducción.

El desarrollo analítico es, actualmente, una actividad que ha venido ganando mayor importancia debido entre otras cosas a los requerimientos cada vez más estrictos para los productos farmacéuticos, a la necesidad de llevar a cabo estudios de estabilidad tanto para nuevos productos como para productos ya existentes, a la realización de estudios de bio disponibilidad y/o bioequivalencia y para el diseño de métodos rutinarios para el análisis de principios activos en control de calidad.

Por lo mismo estos métodos deben ser cuidadosamente diseñados y validados para que puedan ser utilizados con confianza y rapidez y en lo posible, a un bajo costo.

Desarrollar un método analítico es desarrollar una técnica que permita realizar en forma confiable, rápida y a un costo razonable, la determinación cuantitativa de sustancias farmacológicamente activas y de otro tipo de sustancias relacionadas como los metabolitos o subproductos de síntesis. Para esto, se puede seleccionar un método adecuado para un problema particular, ó, se puede adaptar un método ya existente.

Un buen método analítico es aquel que cumple con las características de confiabilidad, rapidez y costo para el fin para el que se pretende diseñarlo. Sin embargo, esto mismo está limitado a la disponibilidad de recursos técnicos y económicos con los que se cuentan, que en última instancia son los que permitirán desarrollar el método más conveniente para nuestras necesidades.

Cuando se desarrolla un método analítico, generalmente se atraviesa por las siguientes etapas: revisión bibliográfica, adaptación ó desarrollo del método analítico, estudio de la especificidad del método (que incluye someter a condiciones extremas de degradación varias muestras de materia prima y/o formulación completa así como también placebos, - con la finalidad de obtener productos de degradación que pudieran interferir en la detección de las sustancias de interés y de esta forma definir si los resultados obtenidos son debidos a las sustancias en estudio ó a interferencias como se explica en (2.2)) y validación del método.

En la revisión bibliográfica se investigarán las propiedades fisicoquímicas de las sustancias en estudio y se buscan métodos reportados en la literatura que puedan servir de guía en el desarrollo del método. Durante el desarrollo del método propiamente dicho, se establecen los recursos, técnicas y las condiciones experimentales del método. Finalmente, para conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos, se hacen estudios de especificidad y la validación estadística del método mediante la evaluación de los parámetros tales como: exactitud, precisión y linealidad.

Debido a que una parte importante del desarrollo de un método es la determinación de la especificidad y la validación estadística del método, a continuación se dará una breve descripción de lo que abarca cada aspecto de la validación de un método.

## 2.2. Especificidad (18).

Por especificidad se puede entender el que la detección de las sustancias de interés por el método se haga sa

tisfactoriamente en presencia de muchas otras sustancias -- que puedan interferir como pueden ser: impurezas, componentes de la formulación y de esta forma, se puede determinar si los resultados obtenidos son debidos a la sustancia en estudio ó a interferencias.

En la práctica se puede demostrar la especificidad de la siguiente manera:

- A) Cuando se trata de una materia prima, analizar las sustancias de acuerdo con el método para determinar si las impurezas y/o productos de degradación presentes interfieren. Si se trata de una formulación, se analizan placebos para determinar si los excipientes interfieren. Habiendo determinado ésto, se podrán hacer las modificaciones pertinentes al método.
- B. Examen de la estructura química de cada componente de la formulación para poder deducir cambios estructurales --- (productos de degradación).
- C. Obtener posibles productos de degradación tanto de la materia prima como de muestras de placebos y formulaciones según el caso del que se trate mediante el sometimiento de éstos a condiciones extremas de degradación como por ejemplo: temperatura (80°C-100°C), luz solar, luz ultravioleta, temperatura ambiente (como referencia), durante un período de tiempo razonable, para obtener posibles -- productos de degradación y analizarlos según el método -- desarrollado.
- D. En la medida de lo posible, obtener precursores y analizarlos.

## 2.3. Validación Estadística (6,8).

### 2.3.1. Finalidad.

El propósito de llevar a cabo una determinación es el de obtener un valor estimado del valor verdadero, ya que nunca se podrá conocer el valor real. Esto se debe a -- que ninguna medición se encuentra libre de error y lo que se está determinando es un valor que difiere del valor real con una diferencia llamada error absoluto.

Además, cada medición estará sujeta a cierta incertidumbre en el valor final obtenido, sin tomar en cuenta su relación con el valor verdadero. Así, cualquier medición ó valor medido puede expresarse con un número limitado de cifras, y la cifra final o significativa, reflejará la - confiabilidad del método de medición.

Existen dos tipos de errores: Los sistemáticos ó determinados y los indeterminados ó aleatorios. Un error sistemático es aquel cuya fuente puede localizarse o definirse y de esta manera tratar de eliminarlos lo más posible. Algunas de estas fuentes de errores sistemáticos -- pueden ser: errores instrumentales, errores del método, -- errores de operación, errores personales. Un error aleatorio es aquel que no puede atribuirse a una causa conocida, ni puede predecirse su magnitud o dirección para una medición de una serie de datos ó para una sola medición, no son posibles de identificar fácilmente, ocurren de una manera - aislada, fortuita y accidentalmente.

En vista de que los errores aleatorios no pueden predecirse con exactitud una manera de estimarlos es mediante técnicas estadísticas las cuales proporcionan un panorama de su magnitud, frecuencia de ocurrencia y efecto en

la expresión final del resultado. A partir de dicho análisis puede obtenerse un indicio de las probabilidades de ocurrencia de errores indeterminados.

Aún cuando los errores sistemáticos pueden ser detectados, también es posible evaluarlos mediante técnicas estadísticas apropiadas con el cual evaluaremos de una manera más acertada la concordancia de los valores estimados con el calor real.

Para evaluar la influencia de los errores aleatorios, se evalúa la precisión del método y para los errores determinados, la exactitud del método.

### 2.3.2. Exactitud.

Es la concordancia existente entre un valor de terminado experimentalmente y su valor real. La evaluación de la exactitud se puede llevar a cabo efectuando inferencias estadísticas en base al valor real mediante:

- A) Pruebas de Hipótesis: Verificación de que los datos experimentales pertenezcan a una distribución especial cuyo parámetro es el valor real. Esta distribución especial es la de "t" de Student" (para pequeñas muestras) y que está definida por la expresión:

$$t = (\bar{x} - \mu) / S / \sqrt{n}$$

donde:  $\bar{x}$  = media de las determinaciones.

$\mu$  = media teórica = 100% (poblacional).

S = desviación standard de las determinaciones.

n = número de determinaciones.

Se establece un contraste Ho:  $\bar{x} = \mu$  Hipótesis nula.

de Hipótesis: H<sub>1</sub>:  $\bar{x} \neq \mu$  Hipótesis alternativa.

con lo que se determina si el método es exacto para una región de aceptación ó de rechazo del 95% con una significancia de 0.05.

- B) Intervalo de Confianza: Permite evaluar dentro de que intervalo se localiza el valor verdadero del parámetro, esto se hace mediante:

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} S / \sqrt{n}$$

### 2.3.3. Precisión.

Se refiere a la dispersión que hay de las mediciones alrededor de su valor central o valor medio, ó lo que es lo mismo, medida de la concordancia de los valores experimentales alrededor de un valor central.

La precisión evalúa dos aspectos: la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

#### 2.3.3.1. Repetibilidad.

Esta es la concordancia entre valores sucesivos determinados bajo condiciones iguales de trabajo y un valor central. Una manera de evaluarla es mediante el cálculo de la desviación standard de los resultados obtenidos. La inferencia de la variabilidad de los resultados - obtenidos se hace mediante la prueba de  $\chi^2$  que está definida por:

$$\chi^2 = \frac{(n - 1) (S^2)}{\sigma^2}$$

donde: n = número de determinaciones.

$S^2$  = varianza muestral.

$\sigma^2$  = varianza teórica (poblacional). Representa la variabilidad del método. (Este valor se selecciona)

ciona basándose en la variabilidad que por experiencia generalmente presentan los métodos. En el caso de la Cromatografía de líquidos moderna el valor seleccionado es  $\sigma^2 = 5$ .

Para poder decidir acerca de la repetibilidad del método, se establece un contraste de Hipótesis:

$H_0: S^2 = \sigma^2$  Hipótesis nula.

$H_1: S^2 \neq \sigma^2$  Hipótesis alternativa.

Para una región de aceptación ó de rechazo del 95% con una significancia de 0.05.

La evaluación del intervalo de confianza para determinar entre que valores se encuentra el valor verdadero del parámetro se hace mediante:

$$IC_{95\%} = \sqrt{\frac{(n-1) (S^2)}{\chi_{1-\alpha/2}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) (S^2)}{\chi_{\alpha/2}^2}}$$

### 2.3.3.2. Reproducibilidad.

Esta es la concordancia entre valores sucesivos y un valor central pero determinado bajo diferentes condiciones de trabajo (analistas, días, equipos, laboratorios, etc). Una manera de evaluarla es mediante la de terminación del cuadrado medio del error de varianza. Para la determinación de este parámetro estadístico se utiliza un diseño experimental denominado análisis de varianza en el cu al se analizan todas las interacciones existentes al traba jar el método desarrollado. Existe un análisis de varianza más simplificado que solo involucra las interacciones anal is tas, días, y analistas-días de donde se puede inferir el cu adrado medio del error de varianza como un estimador de la re

producibilidad. El análisis de varianza sigue el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

donde:

$y_{ijk}$  = porcentaje cuantificado con el  $i$ -ésimo analista dado el  $j$ -ésimo día de la  $k$ -ésima repetición.

$A_i$  = efecto del analista  $i$  en el porcentaje cuantificado.

$D_j$  = efecto del  $j$ -ésimo día en el porcentaje cuantificado.

$AD_{ij}$  = interacción analista-día.

$E_{(ij)k}$  = error experimental, el cual es una medida de la reproducibilidad.

$\mu$  = el parámetro que representa el valor real del porcentaje de recobro donde no hay efecto por analista ó día.

La tabla de análisis de varianza que representa el modelo - seleccionado queda como sigue:

Factor de Variación.	Grados de Libertad.	Producto Simplificado.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado Medio	$F_{calc.}$
$A_i$	$a-1$	$j-1$	$\frac{y_{1..}^2}{bc} - \frac{y_{..}^2}{abc}$	$SC_A/a-1$	$CM_A/CM_e$
$D_j$	$b-1$	$j-1$	$\frac{y_{.1.}^2}{ac} - \frac{y_{..}^2}{abc}$	$SC_D/b-1$	$CM_D/CM_e$
$AD_{ij}$	$(a-1)(b-1)$	$ij-i-j+1$	$\frac{y_{ij.}^2}{c} - \frac{y_{i.}^2}{bc} - \frac{y_{.j.}^2}{ac} + \frac{y_{..}^2}{abc}$	$SC_{AD}/(a-1)(b-1)$	$CM_{AD}/C_e$
$E_{(ij)k}$	$(a-b)(c-1)$	$ijk-ij$	$y_{ijk}^2 - \frac{y_{ij.}^2}{c}$	$SC_E/ab(c-1)$	.....

#### 2.3.4. Linealidad.

La linealidad es la relación existente entre una variable independiente dentro de un intervalo considerado. En el caso particular de la cromatografía será el intervalo donde la señal obtenida es directamente proporcional a la cantidad de muestra. Esta relación queda establecida por la ecuación de una recta:

$$y = mx + b$$

donde:  $y$  = variable dependiente (señal o respuesta).

$x$  = variable independiente (cantidad de muestra).

$b$  = ordenada al origen.

$m$  = pendiente.

La ecuación de esta recta puede servir para fines predictivos de la variable dependiente cuando se conocen o suponen los valores de la variable independiente.

La linealidad se evalúa mediante una regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. La recta así obtenida será la que mejor se ajuste a el conjunto de valores obtenidos experimentalmente siendo la ecuación de esta recta de regresión:

$$y = \gamma x + \beta$$

Donde:  $y$  = cantidad recobrada.

$x$  = cantidad adicionada.

$\beta$  = ordenada al origen poblacional = cero

$\gamma$  = pendiente poblacional = 1.

El ajuste de los valores experimentales al modelo lineal propuesto se puede conocer mediante dos valores: el coeficiente de determinación  $r^2$  y el coeficiente de correlación  $r$ . Mientras más se acerquen éstos al valor de 1, el modelo lineal propuesto será el más aproximado a una recta.

Para inferir que tanto la recta de ajuste de los valores experimentales se acerca al modelo de regresión lineal propuesto, se recurre nuevamente a establecer Pruebas de Hipótesis tanto para la pendiente como para la ordenada al origen estableciendo para ellos sus respectivos intervalos de confianza a un nivel de significancia dado. Las Hipótesis que se establezcan quedarán como se indica a continuación.

A) Ordenada al Origen:  $H_0: b = \beta$  donde  $\beta = \text{cero}$ , Hipótesis nula.

$H_1: b \neq \beta$  Hipótesis alternativa.

B) Pendiente:  $H_0: m = \delta$  donde  $\delta = 1$ , Hipótesis nula.

$H_1: m \neq \delta$  Hipótesis alternativa.

El estadístico de prueba utilizado para comprobar estas Hipótesis de la "t de Student" considerando como valores poblacionales cero y uno para la ordenada al origen y la pendiente respectivamente. Las expresiones de la t de student para éstas serán.

A) Ordenada al Origen:

$$t = \frac{b - \beta}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

B) Pendiente:

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

- donde:  $m$  = valor de la pendiente experimental.  
 $\delta$  = pendiente teórica = 1 (poblacional).  
 $b$  = valor de la ordenada al origen poblacional.  
 $\beta$  = ordenada al origen teórico = cero (poblacional).  
 $x_i$  = Cantidad adicionada.  
 $\bar{x}$  = media de las cantidades adicionadas.  
 $S_x$  = desviación estándar de las cantidades adicionadas.  
 $\hat{S}_{y/x}$  = error standard de estimación modificado.  
 $n$  = número de determinaciones.

La evaluación de los intervalos de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente a un nivel de significancia dado (siendo éste igual a 0.05) para determinar entre que valores se encuentra el valor verdadero de la pendiente y de la ordenada al origen se hace utilizando las expresiones siguientes:

A) Ordenada al Origen:

$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{S}_{y/x}) \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n(\sum x_i - \bar{x})^2}}$$

B) Pendiente:

$$IC = m \pm t_{0.95} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n - 1}}$$

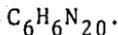
### 3. - MONOGRAFÍAS DE LAS VITAMINAS

#### 3.1. Nicotinamida.

##### 3.1.1. Nombres Químicos y Sinónimos (19).

Nicotinamida; amida del ácido nicotínico; niacinamida; amida del ácido 3-piridinocarboxílico; vitamina PP; piridina 3-carboxamida.

##### 3.1.2. Fórmula Condensada (19).



##### 3.1.3. Fórmula Desarrollada (19).



##### 3.1.4. Peso Molecular (19).

122.12

##### 3.1.5. Descripción (19,20,21).

Pólvo cristalino blanco, ó cristales incoloros con ligero olor característico y sabor salado. Absorbe insignificantes cantidades de humedad cuando se somete a condiciones de humedad relativa por arriba del 90% a 25°C.

##### 3.1.6. Fuentes Naturales. Síntesis y/o Biosíntesis(15,16)

Se presenta en plantas y animales, generalmente en forma conjugada (sistemas enzimáticos).

Se prepara haciendo reaccionar cloruro de tio-nilo con ácido nicotínico y tratado a continuación al cloruro de ácido formado con amoniaco. Alternativamente se prepara haciendo pasar gas de amoniaco sobre ácido nicotínico fundido.

### 3.1.7. Ensayos de Identidad (2,20,21).

- A) Solubilidad: \*1 parte de Nicotinamida en  
\*1 parte de agua.  
\*1 parte de Nicotinamida en  
1.5 partes de Etanol,  
\*1 parte de Nicotinamida en  
10 partes de Glicerina.
- B) Punto de Fusión: 128°C-131°C.
- C) Características de Absorción al Ultravioleta: en etanol presenta un máximo a 262 nm ( $E_{1\%}^{-1cm} = 218$ ), y dos inflexiones a 257 nm y 269 nm. En HCl 0.1M presenta un máximo a 261 nm ( $E_{1\%}^{-1cm} = 454$ ).
- D) Características de Absorción al Infrarrojo: los principales máximos determinados en pastilla de KBr son:  $1300\text{ cm}^{-1}$ ,  $1324\text{ cm}^{-1}$ ,  $744\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.1.8. Ensayos de Pureza (20,21).

- A) Pérdida al secado: no más de 0.5%.
- B) Residuo a la ignición: 0.1%.
- C) Metales pesados: no más de 0.003%.
- D) Substancias carbonizables: una solución de prueba no debe tener más color que una solución de referencia USP.
- E) pH de una solución: Una solución al 5% en agua es neutra al tornasol.

### 3.1.9. Estudios de Estabilidad (5).

Generalmente es muy estable. Puede sufrir hidrólisis en condiciones drásticas de acidez o basicidad y formar ácido nicotínico (niacina).

### 3.1.10. Funciones Fisiológicas (4,13).

Es precursora de la coenzima NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) la cual toma parte en el metabolismo de todas las células vivientes. Su deficiencia provoca serios trastornos metabólicos.

### 3.1.11. Farmacodinamia (13).

Se absorbe fácilmente de todas las porciones del tracto gastrointestinal, y la vitamina se distribuye por todos los tejidos. La vía más importante del metabolismo de ácido nicotínico es la formación de N-metilnicotinamida, que a su vez sigue metabolizándose a N-metil-4-piridona-3-carboxamida; estos metabolitos son excretados en la orina.

### 3.1.12. Toxicología (2,13,19).

Esencialmente libre de efectos colaterales y no causa vasodilatación como el ácido nicotínico, por lo que se prefiere a ésta para el tratamiento de las deficiencias de la niacina.

LD<sub>50</sub> en ratas (vía subcutánea): 1.68 g/Kg.

### 3.1.13. Dosis (2).

A) Profiláctica: 15-30 mg diarios (vía oral).

B) Terapéutica: 50 mg/3 veces al día (vía oral).

25-50 mg/2 veces al día  
(vía parenteral).

## 3.1.14. Usos (13,19).

En la profilaxis y tratamiento de la pelagra.

## 3.1.15. Conservación (20,21).

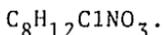
En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

## 3.2. Piridoxina, Clorhidrato.

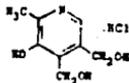
## 3.2.1. Nombres Químicos y Sinónimos (19).

Clorhidrato de piridoxina; Clorhidrato de piridoxol; vitamina B<sub>6</sub>; cloruro de piridoxonio; clorhidrato de adermina; 5-hidroxi-6-metil-3-4-piridinodimetanol clorhidrato; 2-metil-3-hidroxi-4-5-bis(hidroximetil)piridina clorhidrato; 5-hidroxi-6-metil-3-4-piridineocarbinol clorhidrato; 3-hidroxi-4-5-dimetil-ol-picolina clorhidrato.

## 3.2.2. Fórmula Condensada (19).



## 3.2.3. Fórmula Desarrollada (19).



## 3.2.4. Peso Molecular (19).

205.64

## 3.2.5. Descripción (19,20,21).

Polvo blanco, o cristales blancos, o polvo cristalino blanco. Es estable cuando se pone en contacto con el aire, y es afectada lentamente por la luz.

### 3.2.6. Fuentes Naturales. Síntesis y/o Biosíntesis(15,19)

Se presenta en carnes, hígado, riñón, cereales de grano entero, germen de trigo y soya.

Sintetizada mediante la condensación de la cianoacetamida y la etoxiacetilacetona. También a partir de la 2-butanona-1-4-diol-metil-iminio propionitrilo. Otra ruta de síntesis es a partir del etil piruvato, etil glicinato, y 1-4-dietoxi-2-butanona. También se puede sintetizar a partir -- del oxazol el dietil malonato.

### 3.2.7. Ensayos de Identidad (2,20,21).

- A) Solubilidad: \*1 parte de Piridoxina HCl en 5 partes de agua.  
\*1 parte de Piridoxina HCl en 100 partes de etanol.  
\*Soluble en Propilenglicol.  
\*Poco soluble en Acetona.  
\*Insoluble en Eter y Cloroformo.
- B) Punto de Fusión: 202°C-206°C con descomposición.
- C) Características de Absorción al Ultravioleta: Una solución de clorhidrato de piridoxina ajustada a pH = 7 con solución de fosfatos presenta un máximo a 255 nm (E1%-1cm = 345) y otro máximo a 326 nm (E1%-1cm = 422).
- D) Características de Absorción al Infrarrojo: los principales máximos determinados en pastilla de KBr son: 1536  $\text{cm}^{-1}$ . 1273  $\text{cm}^{-1}$ , 1207  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.8. Ensayos de Pureza (20,21).

- A) Pérdida al secado: no más de 0.5%.
- B) Residuo a la ignición: no más de 0.1%.
- C) Metales pesados: no más de 0.003%.
- D) Contenido de cloruros: no menos del 16.9% y no más del 17.6% de cloruros (base anhidra).
- E) pH de una solución: una solución acuosa al 5% tiene un pH de 2.3-3.5.

### 3.2.9. Estudios de Estabilidad (5).

Normalmente es muy estable; la presencia de iones metálicos en solución pueden catalizar la descomposición. Las soluciones diluídas para análisis son sensibles a la luz. Sensible a la luz. Sensible a la oxidación.

### 3.2.10. Funciones Fisiológicas (4,13).

Una vez dentro del organismo, la piridoxina se transforma en fosfato de piridoxal, el cual tiene un papel importante en el metabolismo como coenzima en gran variedad de transformaciones metabólicas de aminoácidos, entre ellas: descarboxilación, transaminación y racemización, así como en pasos enzimáticos del metabolismo del triptofano, los aminoácidos que contienen azufre y los de hidroxiaminoácidos.

### 3.2.11. Farmacodinamia (13).

La piridoxina se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal. El principal producto excretorio es el ácido 4-piridóxico, formado por acción de una aldehíoxidasa hepática sobre el piridoxal libre, el cual se excreta por la orina.

### 3.2.12. Toxicología (2,13,19).

Ninguna conocida en el hombre.

LD<sub>50</sub> en ratas (vía oral); 5.5 g/Kg.

3.2.13. Dosis (2).

A) Profiláctica: 2 mg/día (vías oral, intramuscular, intravenosa).

B) Terapéutica: 10-50 mg/día.

3.2.14. Usos (13,19).

Se usa en el tratamiento de deficiencia de vitaminas del complejo B.

3.2.15. Conservación (20,21).

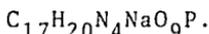
En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

3.3. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

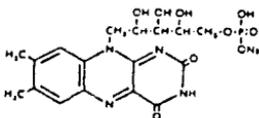
3.3.1. Nombres Químicos y Sinónimos (19).

Riboflavina 5-fosfato de sodio; riboflavina 5-fosfato disódica; vitamina B<sub>2</sub> fosfato (sal sódica); flavina mononucleótido; sal monosódica del éster 5'-fosfato de riboflavina.

3.3.2. Fórmula Condensada (19).



3.3.3. Fórmula Desarrollada (19).



3.3.4. Peso Molecular (19).

478.34

3.3.5. Descripción (19,20,21).

Polvo higroscópico cristalino de un color que varía del amarillo al anaranjado-amarillo. Inodoro, o casi inodoro, con un ligero sabor amargo.

3.3.6. Fuentes Naturales. Síntesis y/o Biosíntesis (15,19).

Se encuentra en leche, vísceras, huevos, verduras de hoja, levadura seca, pan y harina enriquecida.

Preparada por fosforilación de la riboflavina con ácido clorofosfórico ó con ácido pirofosfórico.

3.3.7. Ensayos de identidad (2,20,21).

- A) Solubilidad: \*1 parte de Riboflavina 5-fosfato de sodio en 20 partes de agua.  
 \*Muy ligeramente soluble en -- Etanol.  
 \*Insoluble en Cloroformo.  
 \*Insoluble en Eter.
- B) Rotación Específica:  $+37^{\circ}$  a  $+42^{\circ}$  (determinado en una solución al 1.5% en HCl 5M en base seca).
- C) Características de Absorción al Ultravioleta: en agua presenta máximos a 222 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 942$ ), 267 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 873$ ), 371.5 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 277$ ), 445 nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 324$ ).
- D) Características de Absorción al Infrarrojo: Los principales máximos determinados en pastilla de KBr son:  $1554\text{ cm}^{-1}$ ,  $1575\text{ cm}^{-1}$ , ---  $1641\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.3.8. Ensayos de Pureza (20,21).

- A) Pérdida al secado: no más de 7.5%.
- B) Residuo a la ignición: no más de 25%.
- C) Fosfato libre: no más de 1%.
- D) Riboflavina libre y riboflavina difosfato: no más de 6%.
- E) Lumiflavina: sin límites establecidos.
- F) pH de una solución: una solución acuosa al 2% presenta un pH de 4-6.3.

### 3.3.9. Estudios de Estabilidad (5).

Es inestable en solución ácida puesto que, el enlace éster fosfato se hidroliza; inestable en soluciones alcalinas; sensible a la luz, especialmente en soluciones alcalinas o en soluciones ácidas muy diluidas para análisis; se descompone por acción de agentes reductores. La irradiación de la molécula en soluciones ácidas o neutras da luminocromo, y, en solución alcalina, lumiflavina. La velocidad de descomposición depende de la temperatura, pH, intensidad luminosa y de la longitud de onda de la luz incidente. En presencia de tiamina, la riboflavina se reduce por acción de la tiamina pudiendo precipitar el producto de reducción de la riboflavina: cloroflavina.

### 3.3.10. Funciones Fisiológicas (4,13).

Las formas activas de la riboflavina son las coenzimas FAD (flavina adenina dinucleótido) y FMN (flavina mononucleótido ó 5'-fosfato de riboflavina), y tienen una función vital en el metabolismo como coenzimas de gran variedad de flavoproteínas respiratorias, algunas de las cuales contie

nen metales (xantino oxidasas).

### 3.3.11. Farmacodinamia (13).

La riboflavina 5-fosfato se absorbe del tracto gastrointestinal, y ya en la circulación se une a todas las proteínas del plasma. Una pequeña parte de ella se almacena en órganos tales como hígado y los riñones, y las cantidades que se encuentran en exceso dentro del organismo se excretan por la orina.

### 3.3.12. Toxicología (2,13,19).

Ninguna conocida.

### 3.3.13. Dosis (2).

A) Profiláctica: 1-4 mg/día.

B) Terapéutica: 5-10 mg/día.

### 3.3.14. Usos (13,19).

En el tratamiento o prevención de la enfermedad causada por su deficiencia. También para tratar otras enfermedades debidas a deficiencias de otras vitaminas del complejo B.

### 3.3.15. Conservación (20,21).

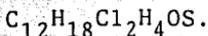
En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

## 3.4. Tiamina, Clorhidrato.

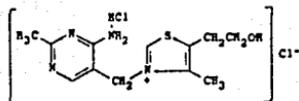
### 3.4.1. Nombres Químicos y Sinónimos (19).

Clorhidrato de tiamina; vitamina B<sub>1</sub> clorhidrato; tiamina cloruro clorhidrato; 3-[4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2hidroxietil)-4-metiltiazolio cloruro monoclóridrato.

## 3.4.2. Fórmula Condensada (19).



## 3.4.3. Fórmula Desarrollada (19).



## 3.4.4. Peso Molecular (19).

337.28

## 3.4.5. Descripción (19,20,21).

Cristales blancos ó polvo cristalino, generalmente con un ligero y característico olor. Cuando se expone al aire, el producto anhidro rápidamente absorbe cerca del 4% de agua.

## 3.4.6. Fuentes Naturales. Síntesis y/o Biosíntesis (15,19).

Se encuentra en carne porcina, vísceras, germen de trigo, grano entero, cereales y pan enriquecido.

Esta vitamina consta de dos porciones ó sistemas de anillos, una porción de pirimidina y una porción tiazólica unidos por un puente metilénico. La porción pirimidínica se prepara como sigue: el etil acrilato es calentado con alcohol etílico formando el éster  $\beta$ -etoxipropionato, el cual se condensa en presencia de sodio metálico con ácido fórmico para formar etil sodioformil- $\beta$ -etoxipropionato; éste entonces se condensa con acetamida obteniéndose 2-metil-5-etoximetil-5-hidroxipirimidina. Este compuesto se trata con oxícloro fosforoso y luego con amoniaco. Finalmente, el último producto obtenido se trata con HBr obteniéndose 2-metil-5-bro

moetil-6-aminopirimidina bromhidrato. La porción tiazólica de la molécula de la tiamina se sintetiza a partir del etilacetato, el cual se trata con óxido de etileno, y, la lactona acetilbutírica resultante se hace reaccionar con cloruro de sulfurilo, dando cloroacetilbutirolactona. Este compuesto se descarboxila con calentamiento con HCl, liberándose CO<sub>2</sub> y formando cloroacetopropanol. Posteriormente, éste último se condensa con la tioformamida obteniéndose el tiazol, 4-metil-5-hidroxietil tiazol.

El paso final de este proceso es la combinación de la pirimidina y el tiazol para formar un haluro de tiazolio. La vitamina bromhidrobromurada obtenida se transforma en el correspondiente compuesto clorinado con cloruro de plata.

#### 3.4.7. Ensayos de Identidad (2,20,21).

- A) Solubilidad: \*1 parte de Tiamina HCl en 1 parte de agua.  
 \*1 parte de Tiamina HCl en 1 parte de Glicerina.  
 \*1 parte de Tiamina HCl en 100 partes de Etanol (95%).  
 \*Una parte de Tiamina HCl en 315 partes de Etanol absoluto.  
 \*Más soluble en Metanol que en Etanol.  
 \*Prácticamente insoluble en Eter, Acetona, Benceno, Hexano, Cloroformo.

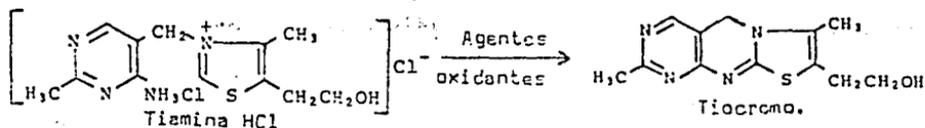
- B) Punto de Fusión: 248°C con algo de descomposición.
- C) Características de Absorción al Ultravioleta: en etanol presenta máximo a 233 nm ( $E_{1\%}^{-1\text{cm}} = 380$ ) y a 267 nm ( $E_{1\%}^{-1\text{cm}} = 240$ ). En  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1N presenta un máximo a 247 nm ( $E_{1\%}^{-1\text{cm}} = 253$ ) y una inflexión a 260 nm.
- D) Características de Absorción al Infrarrojo: No reportadas.

### 3.4.8. Ensayos de Pureza (20,21).

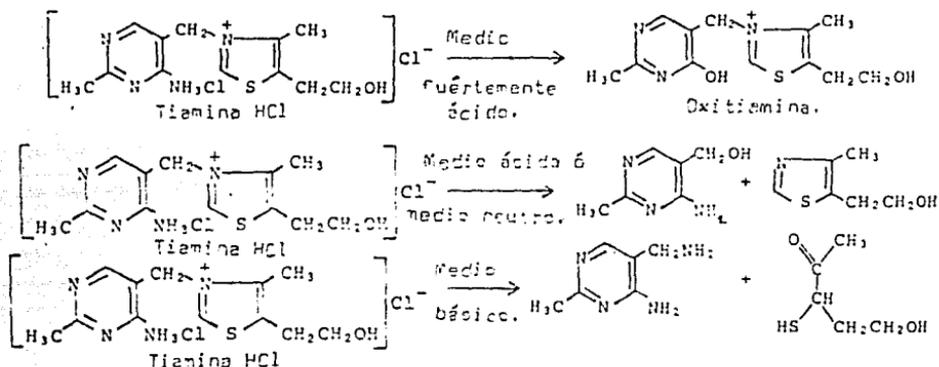
- A) Contenido de agua: no más de 0.2%.
- B) Residuo a la ignición: no más de 0.2%.
- C) Nitratos: no debe contenerlos.
- D) pH de una solución: una solución acuosa al 2.5% presenta un pH de 2.7-3.3.

### 3.4.9. Estudios de Estabilidad (3,5).

Es muy estable cerca de  $\text{pH} = 2$  y se vuelve sumamente inestable conforme el pH aumenta, siendo muy inestable en pH alcalino. Sumamente sensible a la acción de agentes reductores y oxidantes. Un producto de oxidación de ésta es el compuesto áltamente fluorescente llamado tiocromo (base del análisis fluorométrico de la tiamina). Cuando se encuentra en presencia de riboflavina, la acción oxidativa de ésta última provoca la formación y precipitación de tiocromo.



En ausencia de oxígeno, las reacciones importantes de degradación de la tiamina son de tipo hidrolítico, la naturaleza de las reacciones dependen del pH del medio. Las reacciones probables de descomposición se muestran a continuación:



### 3.4.10. Funciones Fisiológicas (4,13).

La forma activa de la tiamina, el pirofosfato de tiamina, funciona como coenzima en el metabolismo de los carbohidratos.

### 3.4.11. Farmacodinamia (13).

La tiamina se absorbe del tracto gastrointestinal y se distribuye ampliamente en casi todos los tejidos del organismo. No se almacena en cantidades apreciables en el cuerpo, y la cantidad que se encuentra en exceso en el organismo se excreta en la orina como tiamina ó como su metabolito, la pirimidina. Cerca de 1 mg de tiamina se metaboliza diariamente en el cuerpo.

### 3.4.12. Toxicología (2,13,19).

Generalmente no es tóxica aún cuando se administra en dosis muy por arriba de la dosis terapéutica. Se han encontrado algunos casos de sensibilidad a la tiamina después de la aplicación de tiamina por vía intravenosa.

LD<sub>50</sub> en ratones (vía oral): 3 g/Kg.

### 3.4.13. Dosis (2).

A) Profiláctica: 2-5 mg/día.

B) Terapéutica: 25-100 mg/día (vía oral).  
75-100 mg (vía subcutanea ó  
intramuscular).

### 3.4.14. Usos (13,19).

En el tratamiento o profilaxia de la deficiencia de la misma, manifestada por la enfermedad llamada beriberi.

### 3.4.15. Conservación (20,21).

En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

### III.- PARTE EXPERIMENTAL

## 1. - INTRODUCCION.

El objetivo de este trabajo experimental fue el de proponer un método de separación y cuantificación simultánea de las vitaminas de una formulación polivitamínica que contiene: Nicotinamida (105.00 mg/ml), Clorhidrato de Piridoxina (5.25 mg/ml), Riboblavina 5-fosfato de sodio (2.87 mg/ml) y Clorhidrato de tiamina (86.25 mg/ml).

En la literatura se reportan diversos métodos de cuantificación de vitaminas hidrosolubles. Sin embargo, en el presente trabajo se requirió de un método que fuera capaz de separar todas las vitaminas de la formulación y cuantificación simultáneamente a pesar de las diferencias en concentraciones y características fisicoquímicas que existen entre ellas. La problemática de la separación llevó a seleccionar un método - por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (7,12,16,24, 26) en los cuales se proponen métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la separación y cuantificación simultánea de diversas vitaminas hidrosolubles. Estas técnicas incluyen el intercambio iónico y la cromatografía por par iónico.

La técnica elegida para este trabajo fue la de cromatografía por par iónico ya que se ha reportado ser la más conveniente para este tipo de sustancias, y además, por los recursos disponibles en el laboratorio.

Por otro lado, para evaluar si la detección de cada una de las vitaminas era satisfactoria en presencia de muchas otras sustancias como impurezas y productos de degradación, se hizo el estudio de especificidad del método. Por último, se evaluó la exactitud, precisión y linealidad del método para determinar si la cuantificación de cada vitamina resultaba

ser confiable.

## 2. EQUIPO UTILIZADO.

- A) Cromatógrafo de líquidos con detector de longitud de onda fija U.V.-Visible modelo 440 (WATERS).
- B) Programador de disolventes modelo 660 (WATERS).
- C) Integrador HEWLETT-PACKARD Modelo 5390-A.
- D) Columna de acero inoxidable Partisil ODS III de 10  $\mu\text{m}$ , 25 cm de longitud y 0.46 cm de diámetro (ALLTECH).
- E) Jeringa Hamilton de 25  $\mu\text{l}$ .
- F) Agitador Vortex Maxi-Mix, THERMOLYNE.

## 3. REACTIVOS UTILIZADOS.

- A) Nicotinamida; Solución de referencia.
- B) Piridoxina, Clorhidrato; Solución de referencia.
- C) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio; Solución de referencia.
- D) Tiamina, Clorhidrato; Solución de referencia.
- E) Heptansulfonato de sodio 0.005M (Reactivo PIC-B7; WATERS).
- F) Metanol Lichrosolv; MERCK.
- G) Tetrahidrofurano Uvasol; MERCK.
- H) Acido Acético, R.A.

## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

### 4.1. Soluciones Patrón de cada Vitamina.

- A) Solución patrón de Nicotinamida de concentración 10.500 mg/ml en fase móvil.

- B) Solución patrón de Clorhidrato de Piridoxina de concentración 0.525 mg/ml en fase móvil.
- C) Solución patrón de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio - de concentración 0.287 mg/ml en fase móvil.
- D) Solución patrón de Clorhidrato de Tiamina de concentración 8.625 mg/ml en fase móvil.

#### 4.2. Preparación de la Solución de Referencia.

Tomar un mililitro de cada solución patrón (4.1) y llevarlos a 10 ml con fase móvil (en el mismo matraz volumétrico). Concentraciones finales de cada vitamina: a) Nicotinamida 1.0500 mg/ml; b) Clorhidrato de Piridoxina: 0.0525 mg/ml; c) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio: 0.0287 mg/ml; d) -- Clorhidrato de Tiamina: 0.8625 mg/ml.

#### 4.3. Preparación de la Solución Problema.

Tomar un mililitro de la solución problema y llevarlo a 100 ml con fase móvil(en el mismo matraz volumétrico). Las concentraciones finales de cada vitamina son las que se enuncian en (4.2).

#### 4.4. Condiciones de la Cromatografía.

- A) Condiciones del Cromatógrafo: +  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .  
 + Volumen de la inyección = 15  $\mu\text{l}$ .  
 + Columna = Partisil ODS III (ALLTECH).
- B) Sistema Cromatográfico + Fase Móvil A: Solución de Heptán Sulfo-nato de Sodio 0.005M en Acido Acético al 1%

- \* Fase Móvil B: Metanol/Tetrahidrofurano  
97:03.
- \* Gradiente: 30 minutos.
- \* Condiciones Iniciales A: 80.
- \* Condiciones Iniciales B: 20.
- \* Condiciones Finales A: 55.
- \* Condiciones Finales B: 45.
- \* Flujo 1 ml/min.

- C) Condiciones del Integrador: + Atenuación =  $2^5$ .  
+ Velocidad de la carta  
= 0.2 cm/min.  
+ Cuando el tiempo de -  
corrida sea de 25 mi-  
nutos, cambiar la ate  
nuación a  $2^9$ .

#### 4.5. Especificidad.

Se sometieron a diferentes condiciones de degradación, la formulación completa, placebos de cada vitamina, placebo de todas las vitaminas, y muestras de vitaminas como materia prima. Las condiciones de degradación y los resultados obtenidos se presentan en la sección de resultados.

#### 4.6. Evaluación Estadística.

Se determinó la exactitud, precisión y linealidad del método para poder determinar la confiabilidad del método. Los diferentes parámetros estadísticos evaluados y la metodología seguida en la evaluación; así como los resultados obtenidos, se presentan en la sección de resultados.

#### IV.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

## 1.- SEPARACION OBTENIDA.

Siguiendo las condiciones del gradiente establecidas en la sección III-4-4., se logró obtener la separación siguiente, según se ilustra en las figuras 2 y 3, tanto como para el --- standard de referencia, como para el problema.

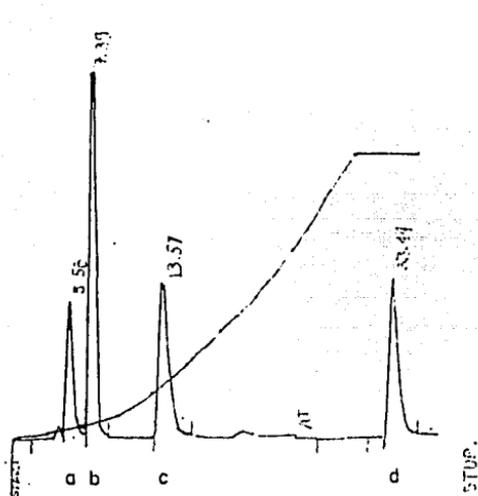


Fig. 2

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de sodio.  
 $t_R = 5.58$  min.
- b) Nicotinamida.  
 $t_R = 7.39$  min.
- c) Piridoxina HCl.  
 $t_R = 13.57$  min.
- d) Tiamina HCl.  
 $t_R = 33.44$  min.

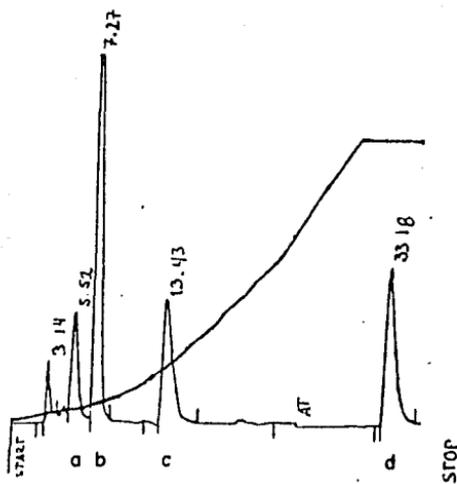


Fig. 3

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.  
 $t_R = 5.52$  min.
- b) Nicotinamida.  
 $t_R = 7.27$  min.
- c) Piridoxina HCl.  
 $t_R = 13.43$  min.
- d) Tiamina HCl.  
 $t_R = 33.18$  min.

## 2. ESPECIFICIDAD.

### 2.1. Finalidad

La determinación de la especificidad del método tuvo como finalidad establecer que la detección de cada una de las vitaminas fuera satisfactoria en presencia de muchas otras -- sustancias como impurezas y productos de degradación de las vitaminas.

Para lograr este fin, se sometió la formulación completa, placebos de cada vitamina, placebo de todas las vitaminas y las vitaminas como materia prima a diferentes condiciones de degradación para obtener productos de degradación y establecer si estos interfieren o no en la detección de cada vitamina.

### 2.2. Condiciones de Degradación.

#### 2.2.1. Formulación Completa y Placebos.

Se sometieron durante 15 días: formulación completa, placebo de nicotinamida, placebo de piridoxina HCl, -- placebo de riboflavina 5-fosfato de sodio, placebo de tiamina HCl y placebo de todas las vitaminas bajo las siguientes condiciones de degradación: Luz Solar, Luz Ultravioleta, Temperatura de 80°C, Temperatura Ambiente.

#### 2.2.2. Materia Prima.

Se sometieron durante 15 días la nicotinamida, piridoxina HCl, riboflavina 5-fosfato de sodio y tiamina HCl como materia prima bajo las siguientes condiciones de degradación: Temperatura Ambiente, Temperatura de 80°C, Luz Solar y Luz Ultravioleta.

### 2.3. Resultados Obtenidos.

Se ilustran de las figuras 4 a la 49, los resultados obtenidos.

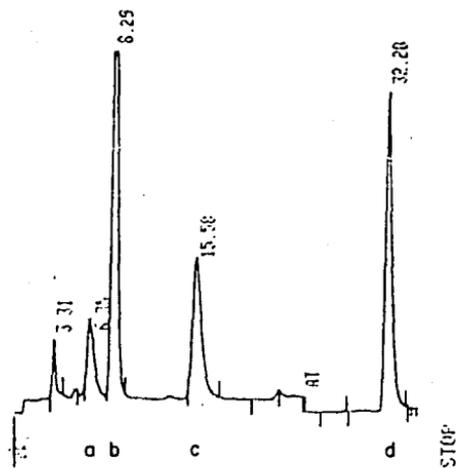


Fig. 4. Formulación Completa,

Referencia.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 6.35$  min.
- b) Nicotinamida,  $t_R = 8.29$  min.
- c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.58$  min.
- d) Tiamina HCl,  $t_R = 32.28$  min.

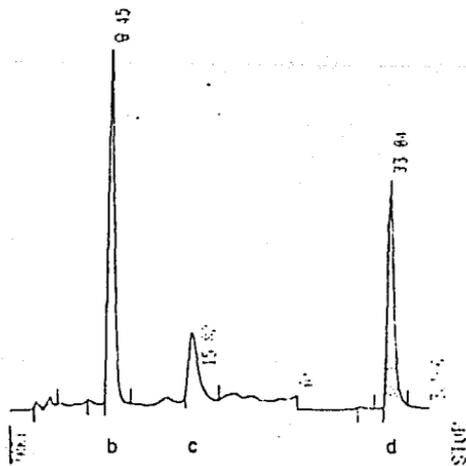


Fig. 5. Formulación Completa.

Luz Solar.

Identificación:

- b) Nicotinamida,  $t_R = 8.45$  min.
- c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.82$  min.
- d) Tiamina HCl,  $t_R = 33.04$  min.

Fig. 6. Formulación Completa.

Luz Ultravioleta.

Identificación:

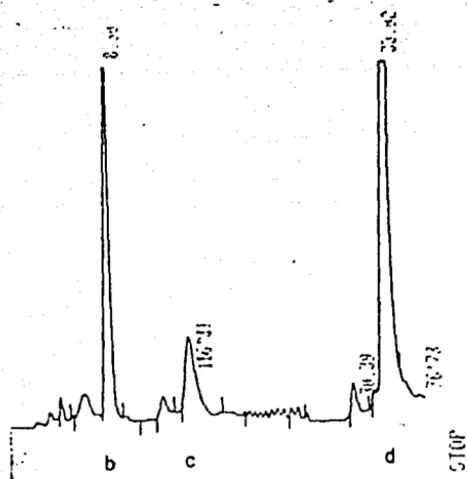
b) Nicotinamida,  $t_R = 8.30$  min.c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.71$  min.d) Tiamina HCl,  $t_R = 33.02$  min.

Fig. 7. Formulación Completa.

Temperatura = 80 °C .

Identificación:

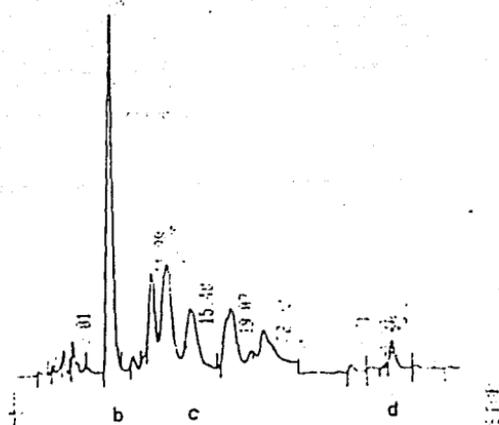
b) Nicotinamida,  $t_R = 8.18$  min.c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.48$  min.d) Tiamina HCl,  $t_R = 33.38$  min.

Fig. 8. Formación Completa.

Temperatura Ambiente.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 6.24$  min.  
 b) Nicotinamida,  $t_R = 8.20$  min.  
 c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.35$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 32.14$  min.

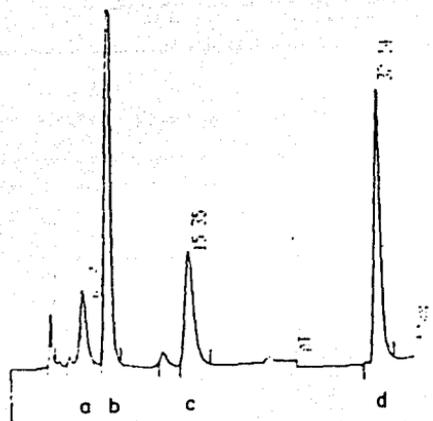
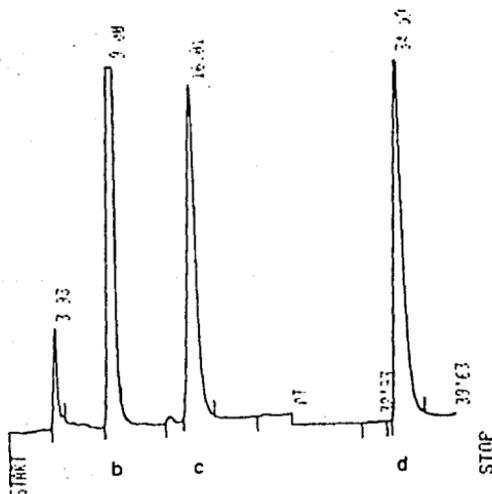


Fig. 9. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

Referencia.

Identificación:

- b) Nicotinamida,  $t_R = 9.00$  min.  
 c) Piridoxina HCl,  $t_R = 16.01$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 34.59$  min.



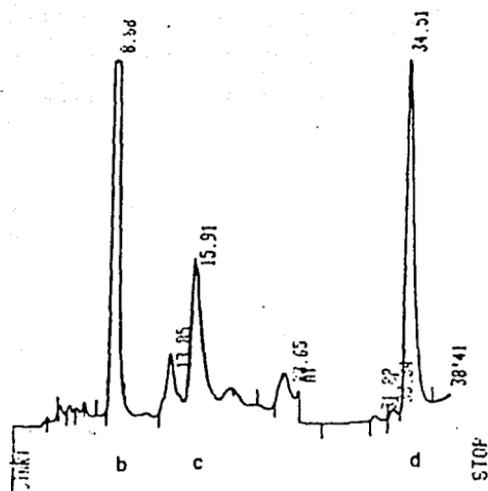


Fig. 10. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

Luz Solar.

Identificación:

- b) Nicotinamida,  $t_R = 8.88$  min.  
 c) Piridoxino HCl,  $t_R = 15.91$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 34.51$  min.

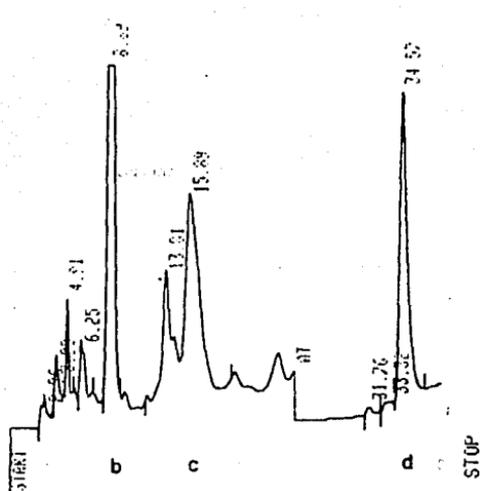


Fig. 11. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

Luz Ultravioleta.

Identificación:

- b) Nicotinamida,  $t_R = 8.89$  min.  
 c) Piridoxino HCl,  $t_R = 15.89$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 34.57$  min.

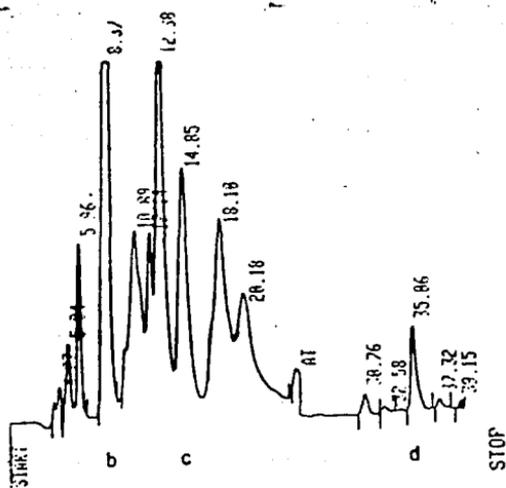


Fig. 12. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

Temperatura = 80°C.

Identificación:

b) Nicotinamida,  $t_R = 8.37$  min.

c) Piridoxina HCl,  $t_R = 14.85$  min.

d) Tiamina HCl,  $t_R = 35.06$  min.

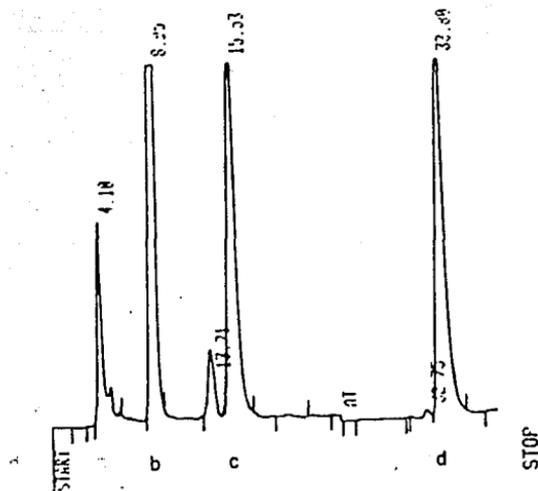


Fig. 13. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

Temperatura Ambiente.

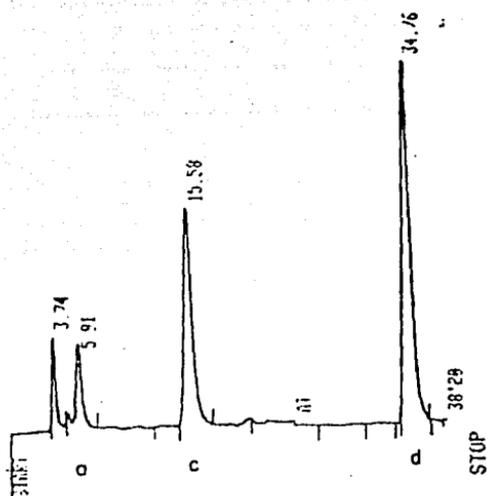
Identificación:

b) Nicotinamida,  $t_R = 8.95$  min.

c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.53$  min.

d) Tiamina HCl,  $t_R = 33.80$  min.

Fig.14. Placebo de Nicotinamida.

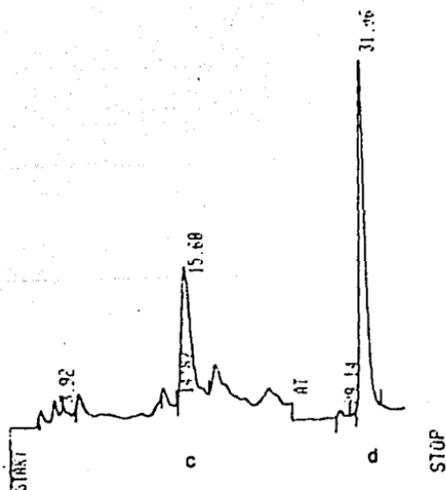


Referencia.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R=5.91$  min.
- c) Piridoxina HCl,  $t_R=15.58$  min.
- d) Tiamina HCl,  $t_R=34.76$  min.

Fig.15. Placebo de Nicotinomida.



Luz Solar.

Identificación:

- c) Piridoxina HCl,  $t_R=15.60$  min.
- d) Tiamina HCl,  $t_R=31.06$  min.

Fig.16. Placebo de Nicotinamida.

Luz Ultravioleta.

Identificación:

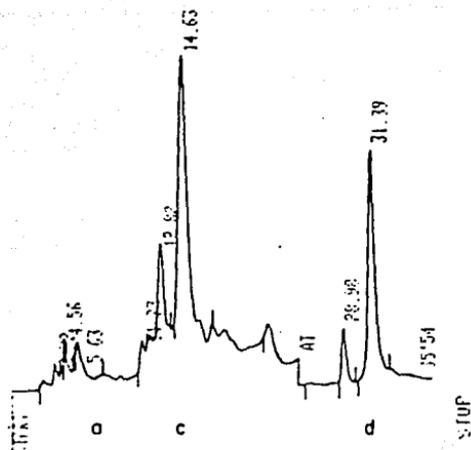
a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 5.63$  min.c) Piridoxina HCl,  $t_R = 14.63$  min.d) Tiamina HCl,  $t_R = 31.39$  min.

Fig.17. Placebo de Nicotinamida.

Temperatura = 80°C.

Identificación:

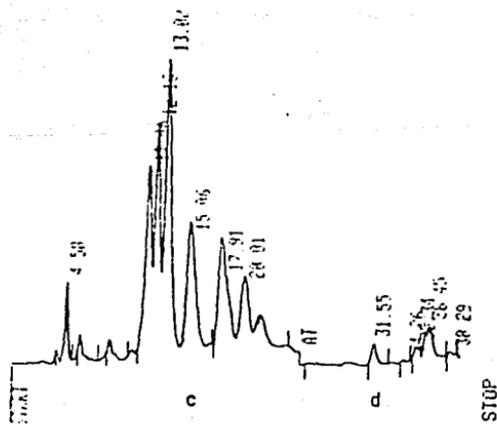
c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.06$  min.d) Tiamina HCl,  $t_R = 31.55$  min.

Fig. 18. Placebo de Nicotinamida.

Temperatura Ambiente.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 5.88$  min.  
 c) Piridoxina HCl,  $t_R = 15.14$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 34.51$  min.

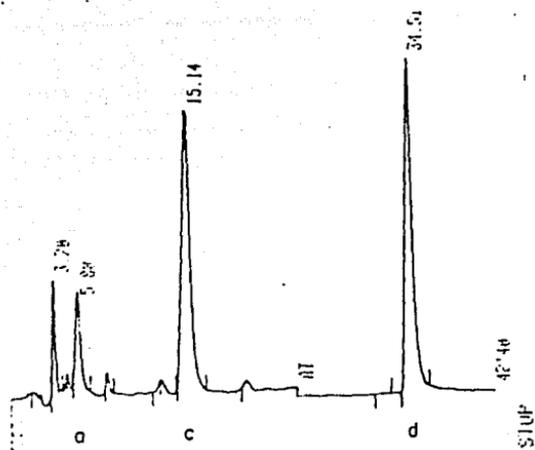


Fig. 19. Placebo de Piridoxina HCl.

Referencia.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 5.85$  min.  
 b) Nicotinamida,  $t_R = 8.45$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R = 29.75$  min.

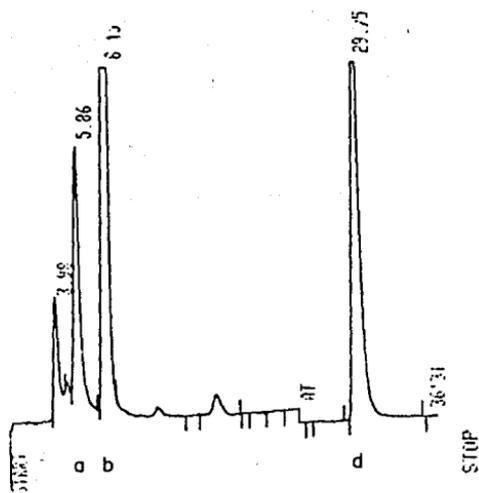


Fig. 20. Placebo de Piridoxina HCl.

Luz Solar.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R=5.98$  min.  
 b) Nicotinamido,  $t_R=8.48$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R=32.68$  min.

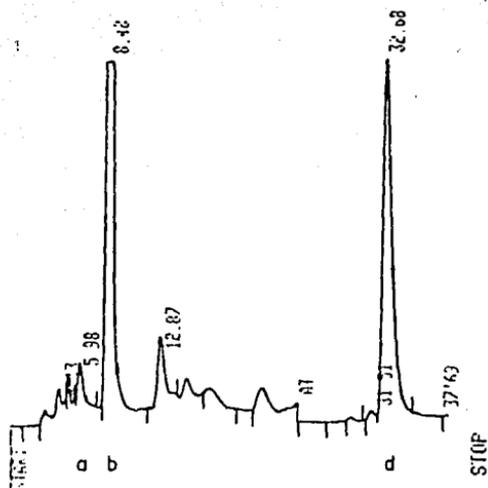


Fig. 21. Placebo de Piridoxina HCl.

Luz Ultravioleta.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R=6.08$  min.  
 b) Nicotinamido,  $t_R=8.61$  min.  
 d) Tiamina HCl,  $t_R=32.99$  min.

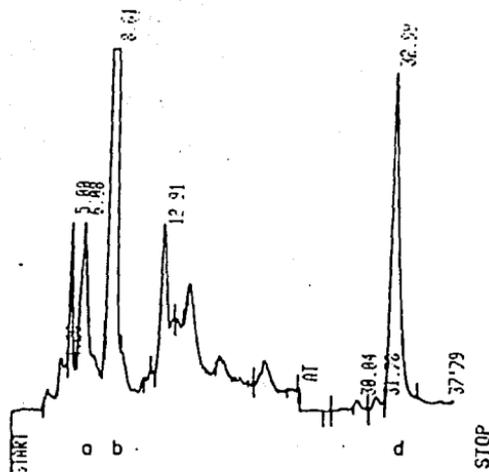


Fig.22. Placebo de Piridoxina HCl.

Temperatura = 80°C.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-fosfato de Sodio,  $t_R = 6.44$  min.  
 b) Nicotinamida,  $t_R = 9.22$  min.  
 d) Tiamino HCl,  $t_R = 33.13$  min.

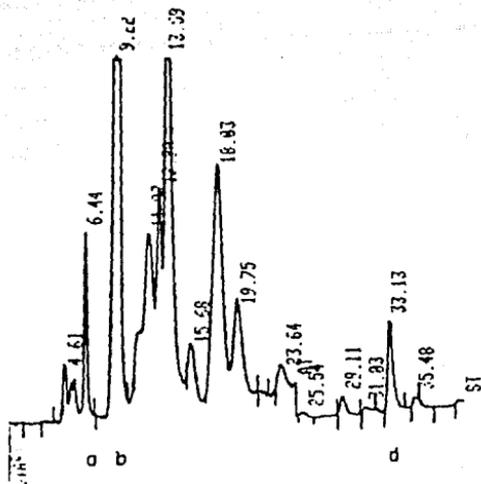


Fig.23, Placebo de Piridoxina HCl.

Temperatura Ambiente.

Identificación:

- a) Riboflavina 5-fosfato de Sodio,  $t_R = 5.85$  min.  
 b) Nicotinamida,  $t_R = 8.52$  min.  
 d) Tiamino HCl,  $t_R = 29.24$  min.

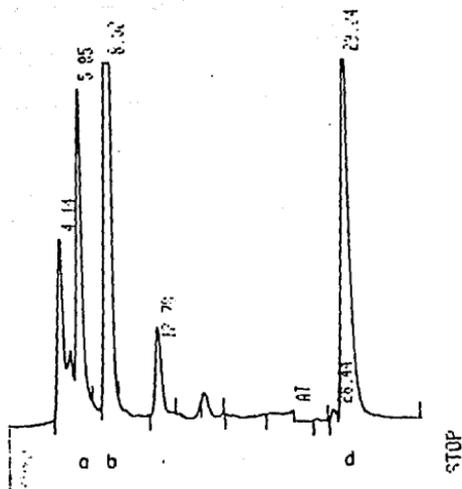


Fig. 24. Placebo de Tiamina HCl.

Referencia.

Identificación:

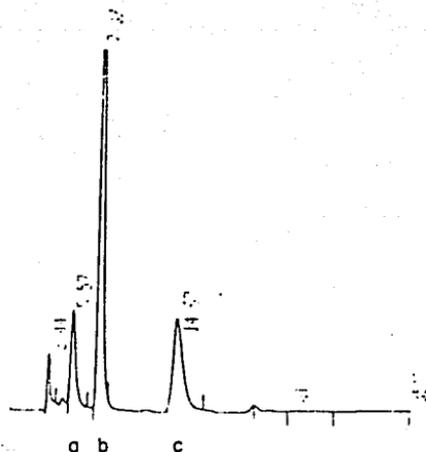
a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 5.57$  min.b) Nicotinamida,  $t_R = 7.87$  min.c) Piridoxina HCl,  $t_R = 14.67$  min.

Fig. 25. Placebo de Tiamina HCl.

Luz Solar.

Identificación:

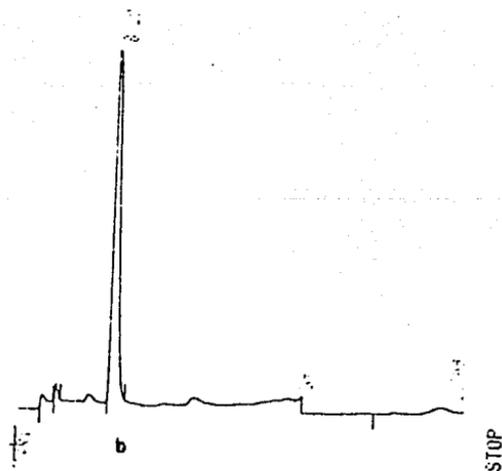
b) Nicotinamida,  $t_R = 8.29$  min.

Fig. 26. Placebo de Tiamina HCl.

Luz Ultravioleta.

Identificación:

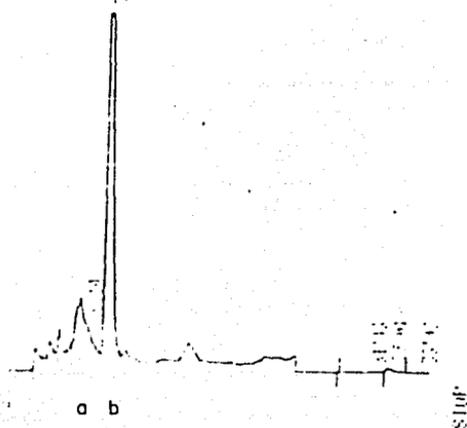
a) Riboflavina 5-Fosfato de Sodio,  $t_R = 6.14$  min.b) Nicotinamida,  $t_R = 8.27$  min.

Fig. 27. Placebo de Tiamina HCl.

Temperatura = 80°C.

Identificación:

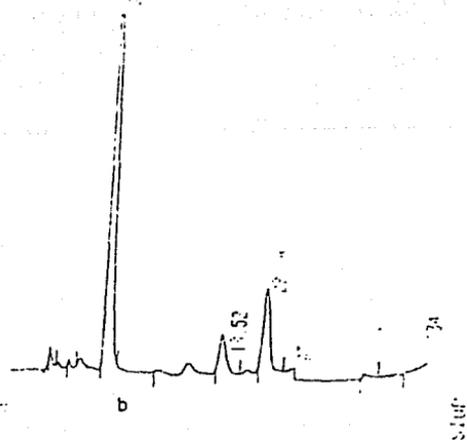
b) Nicotinamida,  $t_R = 8.32$  min.

Fig. 28. Placebo de Tiamina HCl.

Temperatura Ambiente.

Identificación:

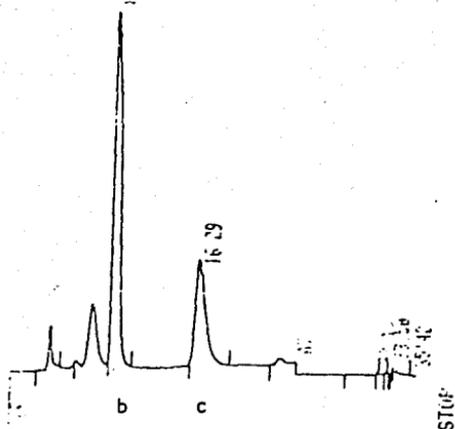
b) Nicotinamida,  $t_R = 8.70$  min.c) Piridoxina HCl,  $t_R = 16.29$  min.

Fig. 29. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio, Nicotinamida, Piridoxina HCl y Tiamina HCl.

Referencia.

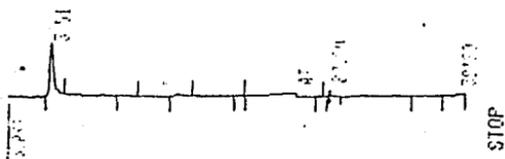


Fig.30. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio, Nicotinamida, Piridoxina HCl y Tiamina HCl.

Luz Solar.

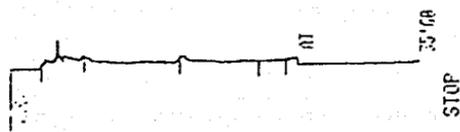


Fig.31. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio, Nicotinamida, Piridoxina HCl y Tiamina HCl.

Luz Ultravioleta.

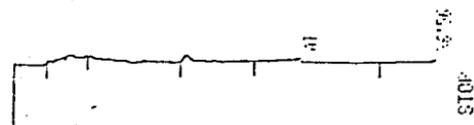


Fig.32. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio, Nicotinamida, Piridoxina HCl y Tiamina HCl.

Temperatura = 80°C.

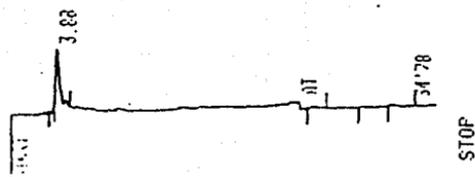


Fig.33. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio, Nicotinamida, Piridoxina HCl y Tiamina HCl.

Temperatura Ambiente.

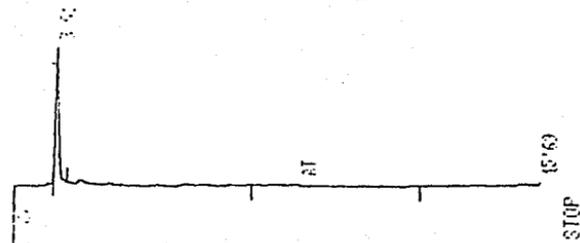


Fig. 34. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.  
Materia Prima.

Temperatura Ambiente.

$t_R = 5.89$  min.

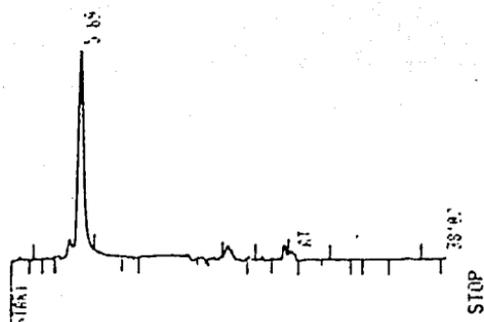


Fig. 35. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.  
Materia Prima.

Temperatura = 80°C.

$t_R = 6.30$  min.

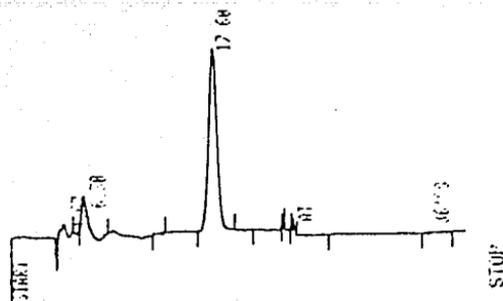


Fig. 36. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.  
Materia Prima.

Luz Solar.  
 $t_R = 5.98$  min.

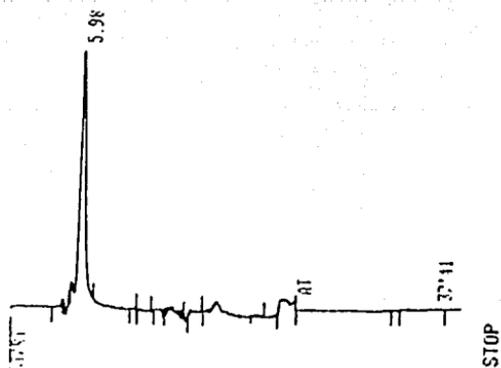
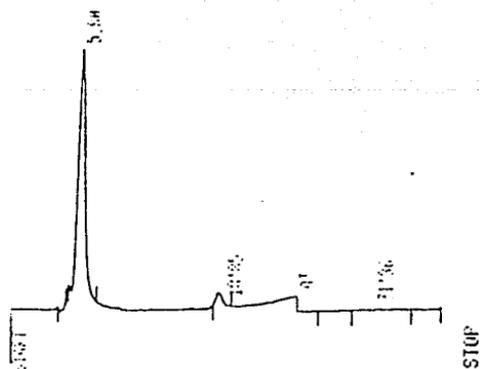


Fig. 37. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.  
Materia Prima.

Luz Ultravioleta.  
 $t_R = 5.80$  min.



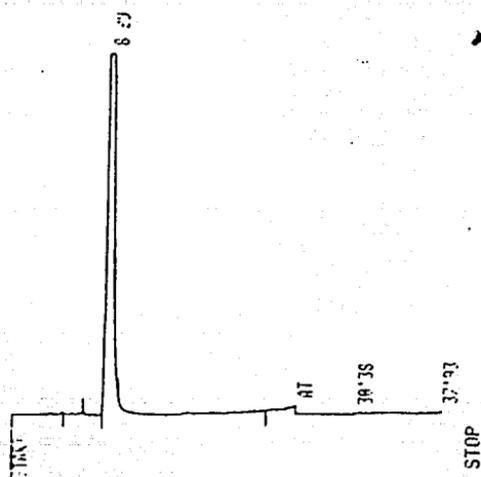


Fig. 38. Nicotinamida.  
Materia Prima.

Temperatura Ambiente  
 $t_R = 8.29$  min.

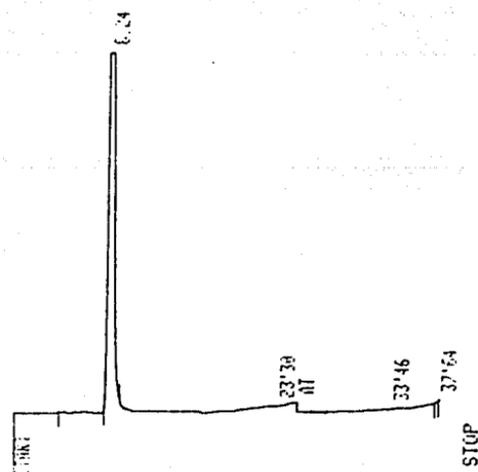


Fig. 39. Nicotinamida.  
Materia Prima.

Temperatura = 80°C.  
 $t_R = 8.24$  min.

Fig. 40. Nicotinamida.  
Materia Prima.

Luz Solar.

$t_R = 8.75$  min.

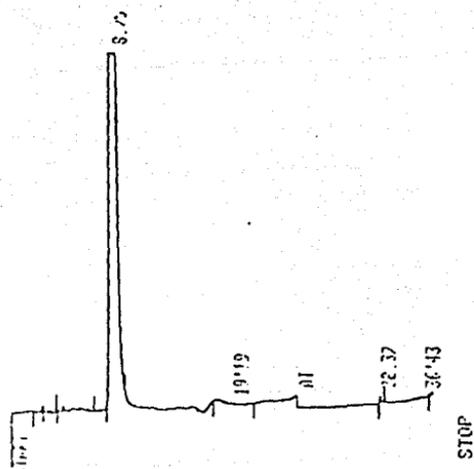


Fig. 41. Nicotinamida.  
Materia Prima.

Luz Ultravioleta.

$t_R = 8.65$  min.

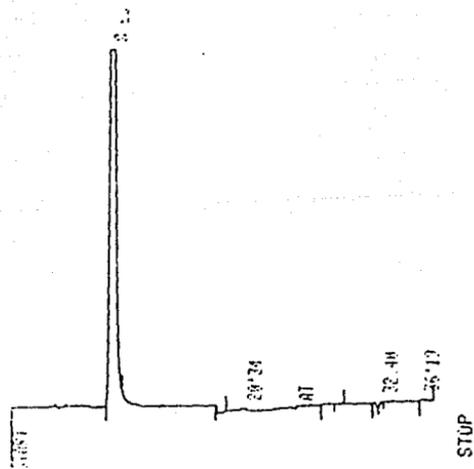


Fig. 42. Piridoxina HCl.  
Materia Prima.

Temperatura Ambiente.  
 $t_R = 14.95$  min.

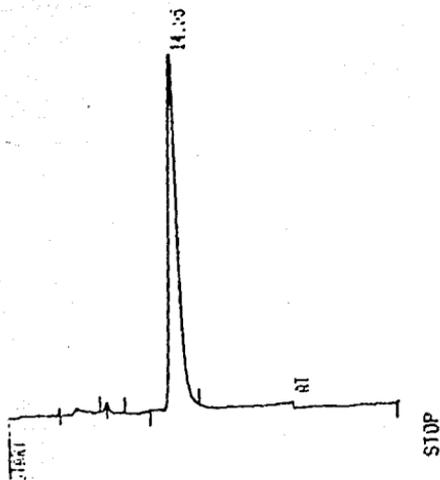


Fig. 43 Piridoxina HCl.  
Materia Prima.

Temperatura = 80°C.  
 $t_R = 15.40$  min.

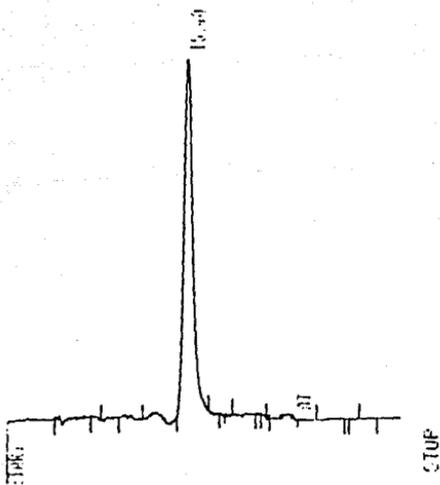


Fig. 44. Piridoxina HCl.  
Materia Prima.

Luz Solar.  
 $t_R = 14.92$  min.

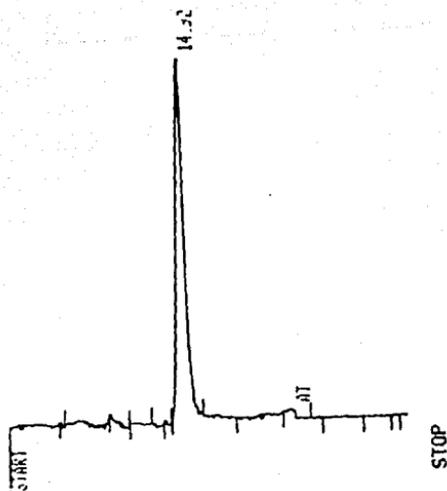


Fig. 45. Piridoxina HCl.  
Materia Prima.

Luz Ultravioleta.  
 $t_R = 16.09$  min.

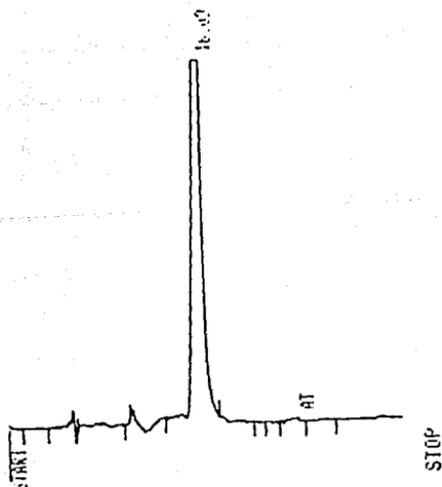


Fig. 46. Tiamina HCl.  
Materia Prima.

Temperatura Ambiente.  
 $t_R = 33.44$  min.

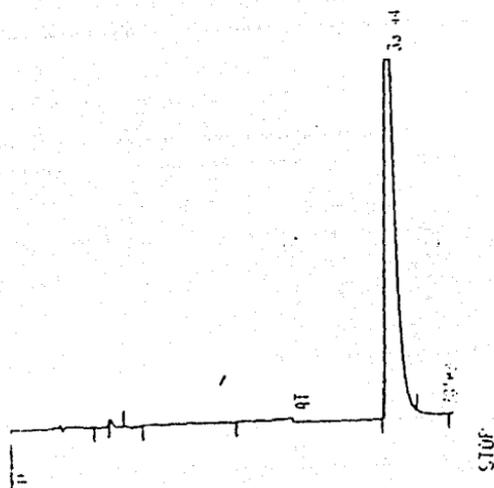


Fig. 47. Tiamina HCl.  
Materia Prima.

Temperatura = 80°C.  
 $t_R = 33.78$  min.

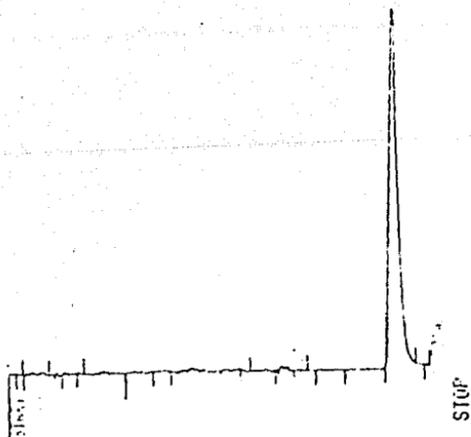


Fig. 48. Tiamina HCl.  
Materia Prima.

Luz Solar.  
 $t_R = 33.81$  min.

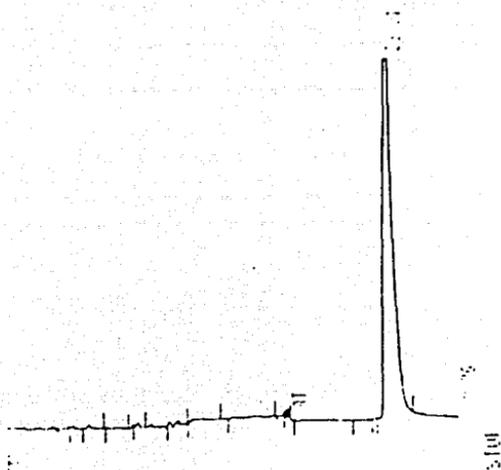
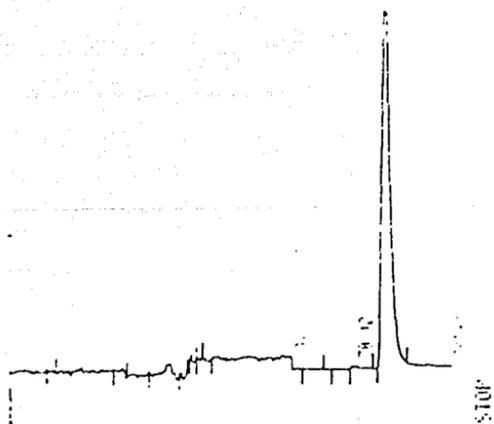


Fig. 49. Tiamina HCl.  
Materia Prima.

Luz Ultravioleta.  
 $t_R = 33.01$  min.



## 2.4. Discusión de Resultados.

### 2.4.1. Formulación Completa (Figs. 4 a 8).

En condiciones extremas de degradación se observa degradación notable de la riboflavina 5-fosfato de sodio y de la tiamina HCl. A temperatura ambiente, la formulación -- presenta una buena estabilidad y aparentemente no parecen --- existir interferencias en la detección de las vitaminas.

### 2.4.2. Placebo de Riboflavina 5-Fosfato de Sodio (Figs. 9 a 13).

A temperatura ambiente en las muestras analizadas: no existe ninguna interferencia en la detección de esta vitamina, sin embargo, en condiciones severas de degradación, aparecen picos que dificultan su detección. Muy posiblemente, - te éstos correspondan a degradación de la tiamina HCl.

### 2.4.3. Placebo de Nicotinamida (Figs. 14 a 18).

Aparentemente no hay interferencias en la de-- tección de esta vitamina a pesar de la notable degradación - de la riboflavina 5-fosfato de sodio y de la tiamina HCl.

### 2.4.4. Placebo de Piridoxina HCl (Figs. 19 a 23).

En condiciones severas de degradación se observa que la detección de ésta es muy difícil debido a interferencias originadas por productos de degradación de la riboflavina 5-fosfato de sodio y de la tiamina HCl, ésto mismo se - observa en los placebos de riboflavina 5-fosfato de sodio y de la nicotinamida. A temperatura ambiente, aparentemente - no existe esta dificultad.

### 2.4.5. Placebo de Tiamina HCl (Figs. 24 a 28).

No se observan interferencias provocadas por -

productos de degradación de otras vitaminas. Se observa notable degradación de la piridoxina HCl.

#### 2.4.6. Placebo de todas las vitaminas (Figs. 29 a 33).

De la observación de estos cromatogramas se desprende que los productos de degradación detectados en el estudio muy probablemente sean debidos a interacciones entre vitaminas, entre vitaminas y excipientes y vitaminas-contenedor, y no a interferencias entre excipientes y excipientes-contenedor.

#### 2.4.7. Vitaminas como Materia Prima (Figs. 34 a 49).

Sometidas aisladamente a condiciones de degradación, éstas no presentaron degradación notable; excepto la riboflavina 5-fosfato de sodio sometida a 80°C que presentó una degradación notable.

#### 2.4.8. Discusión.

Bajo las severas condiciones de degradación (luz Solar, luz U.V., 80°C de Temperatura) a las que fueron sometidas tanto la formulación completa como los placebos, se observa que hay interferencias en la detección de las vitaminas siendo, en algunos casos, de manera notable. El someter la formulación completa y los placebos bajo las condiciones de degradación utilizadas en este estudio fue para obtener -- productos de degradación que pudieran dar información acerca de la especificidad del método bajo condiciones menos severas de degradación (Almacenamiento y Estabilidad Acelerada para formulaciones polivitamínicas).

Por lo tanto, se puede estimar que este método es aplicable al análisis de una formulación polivitamínica de este tipo, ya sea tanto para un análisis rutinario de control

de calidad, como para determinar si un lote de esta formulación que lleve almacenado un cierto tiempo puede ser consumido. Aún podría ser utilizado como un método indicador de estabilidad ya que un programa de estabilidad para una formulación polivitamínica no incluye someter la formulación a condiciones de estudio severas como se ha hecho en este trabajo, sino que se somete a condiciones más moderadas de estabilidad acelerada y durante periodos relativamente cortos de tiempo, de modo que los productos de degradación que se vayan detectando serán menores y, por lo tanto, las vitaminas podrán ser detectadas con mayor facilidad y confiabilidad.

### 3. VALIDACION ESTADISTICA.

#### 3.1. Finalidad.

Con la finalidad de evaluar la confiabilidad de la cuantificación de cada vitamina, se evaluó la exactitud, la precisión (como repetibilidad y reproducibilidad), y linealidad para cada una de las vitaminas. Los resultados se presentan a continuación.

#### 3.2. Riboflavina 5-Fosfato de Sodio.

##### 3.2.1. Exactitud.

Con la finalidad de determinar la exactitud del método, se hicieron recobros entre el 50% y el 120% aproximadamente de la cantidad de Riboflavina 5-fosfato de sodio etiquetada en el marbete. Los resultados se muestran en la Tabla # 1.

Tabla # 1.

mg. Adicionados.	mg. Recuperados.	% Recuperado.
1.72	1.77	102.91
1.72	1.72	100.00
1.72	1.73	100.58
2.12	2.14	100.94
2.12	2.05	96.50
2.12	2.08	98.11
2.72	2.71	99.63
2.72	2.71	99.63
2.72	2.68	98.52
2.95	3.01	100.03
2.95	2.90	98.31
2.95	3.00	101.70
3.47	3.51	101.15
3.47	3.34	96.25
3.47	3.44	99.14

3.2.1.1. Cálculos para conocer la exactitud, considerando los datos de porcentaje recuperados.

$$\bar{x} = 99.71\%$$

$$S = 1.92$$

$$S/\sqrt{n} = 0.50$$

$$n = 15$$

$$n-1 = 14 \text{ g.l.}$$

$$t_{0.975} = +2.15 \text{ (1)}$$

$$t_{0.025} = -2.15 \text{ (1)}$$

$$t_{0.95} = +1.76 \text{ (1)}$$

### 3.2.1.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: \bar{x} = \mu \text{ donde } \mu = 100\%$$

$$H_1: \bar{x} \neq \mu$$

### 3.2.1.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ ).

$$\alpha = 0.05$$

### 3.2.1.4. Estadístico de Prueba.

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

### 3.2.1.5. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia $\alpha = 5$ .

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \text{ (14 g.l.):}$$

$$\text{entonces: } t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975}$$

### 3.2.1.6. Resultado.

$$t_{\text{calc}} = -0.59$$

### 3.2.1.7. Conclusión.

Siendo  $-2.15 < -0.59 < +2.15$ , se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Exacto.

3.2.1.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $\bar{x}$ .

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} (S/\sqrt{n})$$

$$\text{Entonces: } IC = 99.71\% \pm 0.88.$$

$$\text{Límite Superior: } 100.59\%$$

$$\text{Límite Inferior: } 98.83\%$$

3.2.2. Linealidad(Fig. 50).

Para evaluar la relación entre la variable independiente (mg. adicionados) y la variable dependiente (mg. recuperado) se recurrió al análisis de la linealidad utilizando para ello los valores de la Tabla # 1.

3.2.2.1. Ordenada al Origen de la Recta estimada.

$$b = 0.04$$

3.2.2.2. Pendiente de la Recta Estimada.

$$m = 0.98$$

3.2.2.3. Ecuación de la Recta Estimada.

$$y = 0.98x + 0.04$$

3.2.2.4. Coeficiente de Determinación.

$$r^2 = 0.9934$$

3.2.2.5. Coeficiente de Regresión.

$$r = 0.9967$$

3.2.2.6. Pruebas de Hipótesis para la Ordenada al Origen.

$$H_0: b = \beta \text{ donde } \beta = \text{cero}$$

$$H_1: b \neq \beta$$

3.2.2.7. Estadístico de Prueba para la Ordenada al Origen.

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

3.2.2.8. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Ordenada al Origen.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1).$$

3.2.2.9. Resultados para la Ordenada al Origen.

$$t_{\text{calc}} = +0.60$$

3.2.2.10. Pruebas de Hipótesis para la Pendiente.  
te.

$$H_0: m = \lambda \quad \text{donde } \lambda = 1$$

$$H_1: m \neq \lambda$$

3.2.2.11. Estadístico de Prueba de la Pendiente.

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

3.2.2.12. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Pendiente.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

### 3.2.2.13. Resultado para la Pendiente.

$$t_{\text{calc}} = -0.83$$

### 3.2.2.14. Conclusión.

Siendo: a) ordenada al Origen,  $-2.16 < +0.60 < +2.16$ ; b) pendiente,  $-2.16 < -0.83 < +2.16$  se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Lineal.

### 3.2.2.15. Intervalo de Confianza del 95% para Ordenada al Origen.

$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{S}_{y/x}) \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 0.04 \pm 0.13$$

$$\text{Límite Superior: } +0.17$$

$$\text{Límite Inferior: } -0.09$$

### 3.2.2.16. Intervalo de Confianza del 95% para la Pendiente.

$$IC = \pm t_{0.95} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n - 1}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 0.98 \pm 0.05$$

$$\text{Límite Superior: } +1.03$$

$$\text{Límite Inferior: } +0.93$$

### 3.2.3. Precisión (Repetibilidad).

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello, los valores de % recuperado de la Tabla # 1.

3.2.3.1. Cálculos para conocer la repetibilidad, considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$\begin{array}{ll}
 S = 1.92 & \chi^2_{0.95} = 23.69 \quad (1) \\
 S^2 = 3.69 & \chi^2_{0.975} = 26.12 \quad (1) \\
 n = 15 & \chi^2_{0.025} = 5.63 \quad (1) \\
 n-1 = 14 \text{ g.l.} &
 \end{array}$$

3.2.3.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: S^2 = \sigma^2 \text{ donde } \sigma^2 = 5.$$

$$H_1: S^2 \neq \sigma^2$$

3.2.3.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.2.3.4. Estadístico de Prueba.

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

3.2.3.5. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{1-\alpha} \quad (14 \text{ g.l.}); \text{ entonces:}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.95}$$

## 3.2.3.6. Resultado.

$$\chi_{\text{calc}}^2 = 10.33$$

## 3.2.3.7. Conclusión.

Siendo  $10.33 < 23.69$ , se acepta  $H_0$ .  
Se concluye que el método es Preciso  
(Repetible).

3.2.3.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $S^2$ .

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi_{0.975}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi_{0.025}^2}}$$

Entonces:  $IC = 1.41 < 2.23 < 3.03$

## 3.2.4. Precisión (Reproducibilidad).

Con la finalidad de determinar el efecto de analistas y días en las determinaciones hechas por el método se hizo la evaluación de la reproducibilidad, haciendo para esto recobros de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos analistas diferentes. Los resultados se presentan en la Tabla # 2.

Tabla # 2.

	Analista 1.	Analista 2.
Día 1.	120.12%	122.38%
	122.87%	122.72%
	119.80%	121.75%
Día 2.	118.36%	120.94%
	120.70%	120.72%
	119.57%	122.38%

Los resultados del análisis de varianza se presentan en la Tabla # 3.

Tabla # 3. ANOVA (2 Factores Aleatorios).

Fuente.	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$F_{\text{calc.}}$	$F_{0.95}$
Analista	1	7.48	7.48	53.18	161.45
Día	1	4.07	4.07	28.92	161.45
Analista-Día	1	0.14	0.14	0.11	5.32
Error	8	10.53	1.32	-----	-----

3.2.4.1. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha} \quad (1/1 \text{ g.l.A; } 1/1 \text{ g.l.D; } 1/8 \text{ g.l.AD});$$

entonces:

$$F_{\text{calc}}^A < F_{0.95} \quad (\text{Analista})$$

$$F_{\text{calc}}^D < F_{0.95} \quad (\text{Día})$$

$$F_{\text{calc}}^{AD} < F_{0.95} \quad (\text{Interacción Analista-Día}).$$

3.2.4.2. Conclusión.

Siendo: a) efecto por analista,  $53.18 < 161.45$ ; b) efecto por día,  $28.92 < 161.45$ ; c) efecto por interacción analista-día,  $0.11 < 5.32$ ; se concluye que no existen efectos por analista, día e interacción analista-día y, por lo tanto, se deduce que el método es Preciso (Reproducibile).

3.3. Nicotinamida.

3.3.1. Exactitud.

Con la finalidad de determinar la exactitud del método, se hicieron recobros aproximadamente entre el 50% y 120% de la cantidad de Nicotinamida etiquetada en el marbete. Los resultados se muestran en la Tabla # 4,

Tabla # 4

mg. Adicionados.	mg. Recuperados.	% Recuperado
53.90	53.75	99.68
53.90	52.35	97.12
53.90	53.02	98.37
81.50	79.28	97.28
81.50	82.03	100.65
81.50	80.23	98.44
96.90	97.17	100.28
96.90	97.12	100.23
96.90	98.46	101.61
106.15	105.32	99.22
106.15	107.45	101.22
106.15	104.95	98.87
122.45	127.11	103.80
122.45	123.86	101.15
122.45	121.64	99.34

3.3.1.1. Cálculos para conocer la exactitud, -- considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$\bar{x} = 99.82\% \quad n = 15 \quad t_{0.025} = -2.15 \quad (1)$$

$$S = 1.75 \quad n-1 = 14 \text{ g.l.} \quad t_{0.95} = +1.76 \quad (1)$$

$$S/\sqrt{n} = 0.45 \quad t_{0.975} = +2.15(1)$$

3.3.1.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: \bar{x} = \mu \text{ donde } \mu = 100\%$$

$$H_1: \bar{x} \neq \mu$$

3.3.1.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.3.1.4. Estadístico de Prueba

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

3.3.1.5. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (14 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975}$$

3.3.1.6. Resultado.

$$t_{\text{calc}} = -0.40$$

3.3.1.7. Conclusión.

Siendo  $-2.15 < -0.40 < +2.15$ , se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es --- Exacto.

3.3.1.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $\bar{x}$ .

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} (S/\sqrt{n})$$

$$\text{Entonces: } IC = 99.82\% \pm 0.79$$

$$\text{Límite Superior: } 100.61\%$$

$$\text{Límite Inferior: } 99.03\%$$

3.3.2. Linealidad (Fig. 51).

Para evaluar la relación entre la variable independiente (mg. adicionados) y la variable dependiente (mg. recuperados) se recurrió al análisis de la linealidad utilizando para ello los valores de la Tabla # 4.

3.3.2.1. Ordenada al Origen de la Recta Estimada.

$$b = -3.21$$

3.3.2.2. Pendiente de la Recta Estimada.

$$m = 1.04$$

3.3.2.3. Ecuación de la Recta Estimada.

$$y = 1.04x - 3.21$$

3.3.2.4. Coeficiente de Determinación.

$$r^2 = 0.9966$$

3.3.2.5. Coeficiente de Regresión.

$$r = 0.9983$$

3.3.2.6. Pruebas de Hipótesis para la Ordenada al Origen.

$$H_0: b = \beta \quad \text{donde } \beta = \text{cero}$$

$$H_1: b \neq \beta$$

3.3.2.7. Estadístico de Prueba para la Ordenada al Origen.

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

3.3.2.8. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Ordenada al Origen.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

3.3.2.9. Resultado para la Ordenada al Origen.

$$t_{\text{calc}} = -1.95$$

3.3.2.10. Pruebas de Hipótesis para la Pendiente.

$$H_0: m = \beta \text{ donde } \beta = 1$$

$$H_1: m \neq \beta$$

3.3.2.11. Estadístico de Prueba para la Pendiente.

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

3.3.2.12. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Pendiente.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.}):$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

3.3.2.13. Resultado para la Pendiente.

$$t_{\text{calc}} = +2.13$$

3.3.2.14. Conclusión.

Siendo: a) ordenada al origen,  $-2.16 < -1.95 < +2.16$ ; b) pendiente,  $-2.16 < +2.13 < +2.16$ ; se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Lineal.

3.3.2.15. Intervalo de Confianza del 95% para la Ordenada al Origen.

$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{S}_{y/x}) \sqrt{\frac{2}{n} \frac{\sum x_i^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 0.04 \pm 0.13$$

$$\text{Límite Superior: } +0.17$$

$$\text{Límite Inferior: } -0.09$$

3.3.2.16. Intervalo de Confianza del 95% para la Pendiente.

$$IC = m \pm t_{0.95} \frac{\widehat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 1.04 \pm 0.04$$

$$\text{Límite Superior: } + 1.08$$

$$\text{Límite Inferior: } +1.00$$

3.3.3. Precisión (Repetibilidad).

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello, los valores de % recuperado de la Tabla # 4.

3.3.3.1. Cálculos para conocer la repetibilidad, considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$S = 1.75$$

$$\chi_{0.95}^2 = 23.69 \quad (1)$$

$$S^2 = 3.06$$

$$\chi_{0.975}^2 = 26.12 \quad (1)$$

$$n = 15$$

$$\chi_{0.025}^2 = 5.63 \quad (1)$$

$$n-1 = 14 \text{ g.l.}$$

3.3.3.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: S^2 = \sigma^2 \quad \text{donde } \sigma^2 = 5$$

$$H_1: S^2 \neq \sigma^2$$

3.3.3.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.3.3.4. Estadístico de Prueba

$$\chi_{\text{calc}}^2 = \frac{(n-1)(S^2)}{\sigma^2}$$

3.3.3.5. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{1-\alpha} \quad (14 \text{ g.l.}); \text{ entonces:}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.95}$$

3.3.3.6. Resultado.

$$\chi^2_{\text{calc}} = 8.57$$

3.3.3.7. Conclusión.

Siendo  $8.57 < 23.69$ , se acepta  $H_0$ .  
Se concluye que el método es Preciso (Repetible).

3.3.3.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $S^2$ .

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.975}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.025}}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 1.28 < 2.23 < 2.76$$

3.3.4. Precisión (Reproducibilidad).

Con la finalidad de determinar el efecto de analistas y días en las determinaciones hechas por el método se hizo la evaluación de la reproducibilidad, haciendo para esto, recobros de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos analistas diferentes. Los resultados se presentan en la Tabla # 5.

Tabla # 5.

	Analista 1.	Analista 2.
Día 1.	97.02%	96.38%
	98.01%	98.77%

	98.50%	98.41%
	97.77%	97.30%
Día 2.	96.13%	96.00%
	96.52%	97.91%

Los resultados del análisis de varian-  
za se presentan en la Tabla # 6.

Tabla # 6. (2 Factores Aleatorios).

Fuente.	Grados de Libertad.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado medio.	$F_{\text{calc}}$	$F_{0.95}$ (1)
Analista	1	0.07	0.07	1.20	161.45
Día	1	2.40	2.40	40.99	161.45
Analista-Día	1	0.06	0.06	0.06	5.32
Error	8	7.68	0.98	-----	-----

3.3.4.1. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha} \quad (1/1 \text{ g.l.A}; 1/1 \text{ g.l.D}; 1/8 \text{ g.l.AD}); \text{ entonces:}$$

$$F_{\text{calc}}^A < F_{0.95} \quad (\text{Analista}).$$

$$F_{\text{calc}}^D < F_{0.95} \quad (\text{Día})$$

$$F_{\text{calc}}^{AD} < F_{0.95} \quad (\text{Interacción Analista-Día}).$$

3.3.4.2. Conclusión.

Siendo: a) efecto por analista,  $1.20 < 161.45$ ; b) efecto por día,  $40.99 < 161.45$ ; c) efecto por - interacción analista-día,  $0.06 < 5.32$ ; se concluye que no existen efectos por analista, día e interacción analista-día, y, por lo tanto, se deduce que el método es Preciso (Reproducible).

## 3.4. Piridoxina HCl.

## 3.4.1. Exactitud

Con la finalidad de determinar la exactitud del método, se hicieron recobros aproximadamente entre el 50% y 120% de la cantidad de Piridoxina HCl etiquetada en el marbete. Los resultados se muestran en la Tabla # 7.

Tabla # 7.

mg. Adicionados.	mg. Recuperados	% Recuperado.
2.98	2.96	99.33
2.98	2.86	95.97
2.98	2.97	99.66
4.10	3.99	97.32
4.10	4.00	97.56
4.10	4.15	101.22
4.80	4.84	100.83
4.80	4.82	100.42
4.80	4.88	101.67
5.32	5.31	99.81
5.32	5.35	100.56
5.32	5.38	101.13
6.45	6.33	98.14
6.45	6.42	99.54
6.45	6.52	101.09

3.4.1.1. Cálculos para conocer la exactitud, considerando los datos de porcentaje recuperados.

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 99.62\% & n &= 15 & t_{0.025} &= -2.15(1) \\ S &= 1.68 & n-1 &= 14 \text{ g.l.} & t_{0.95} &= +1.76(1) \\ S/\sqrt{n} &= 0.43 & & & t_{0.975} &= +2.15(1) \end{aligned}$$

3.4.1.2. Prueba de Hipótesis.

$$H_0: \bar{x} = \mu \text{ donde } \mu = 100\%$$

$$H_1: \bar{x} \neq \mu$$

3.4.1.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.4.1.4. Estadístico de Prueba.

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

3.4.1.5. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (14 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975}$$

3.4.1.6. Resultado.

$$t_{\text{calc}} = -0.88$$

3.4.1.7. Conclusión.

Siendo  $-2.15 < -0.88 < +2.15$ , se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Exacto.

3.4.1.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $\bar{x}$ .

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} (S/\sqrt{n})$$

$$\text{Entonces: } IC = 99.62\% \pm 0.76$$

$$\text{Límite Superior: } 100.38\%$$

$$\text{Límite Inferior: } 98.86\%$$

3.4.2. Linealidad (Fig. 52).

Para evaluar la relación entre la variable independiente (mg. adicionados) y la variable dependiente (mg. recuperados) se recurrió al análisis de la linealidad utilizando para ello los valores de la Tabla # 7.

3.4.2.1. Ordenada al Origen de la Recta Estimada.

$$b = -0.08$$

3.4.2.2. Pendiente de la Recta Estimada.

$$m = 1.01$$

3.4.2.3. Ecuación de la Recta Estimada.

$$y = 1.01x - 0.08$$

3.4.2.4. Coeficiente de Determinación.

$$r^2 = 0.9968$$

3.4.2.5. Coeficiente de Regresión.

$$r = 0.9984$$

3.4.2.6. Pruebas de Hipótesis para la Ordenada al Origen.

$$H_0: b = \beta \quad \text{donde } \beta = \text{cero}$$

$$H_1: b \neq \beta$$

3.4.2.7. Estadístico de Prueba para la Ordenada al Origen.

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

3.4.2.8. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Ordenada al Origen.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

3.4.2.9. Resultados para la Ordenada al Origen.

$$t_{\text{calc}} = -0.92$$

3.4.2.10. Pruebas de Hipótesis para la Pendiente.

$$H_0: m = \gamma \quad \text{donde } \gamma = 1$$

$$H_1: m \neq \gamma$$

3.4.2.11. Estadístico de Prueba para la Pendiente.

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m - \gamma) S_x \sqrt{n - 1}}{S_{y/x}}$$

3.4.2.12. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Pendiente.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

3.4.2.13. Resultado para la Pendiente.

$$t_{\text{calc}} = +0.88$$

3.4.2.14. Conclusión.

Siendo a) ordenada al origen,  $-2.16 < -0.92 < +2.16$ ; b) pendiente,  $-2.16 < +0.88 < +2.16$ ; se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Lineal.

3.4.2.15. Intervalo de Confianza del 95% para la Ordenada al Origen.

$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{S}_y/x) \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Entonces:  $IC = -0.08 \pm 0.18$

Límite Superior:  $+0.10$

Límite Inferior:  $-0.26$

3.4.2.16. Intervalo de Confianza del 95% para la Pendiente.

$$IC = m \pm t_{0.95} \frac{\hat{S}_y/x}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Entonces:  $IC = 1.01 \pm 0.03$

Límite Superior:  $+1.04$

Límite Inferior:  $+0.98$

### 3.4.3. Precisión (Repetibilidad).

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello, los valores de % recuperado de la Tabla # 7.

3.4.3.1. Cálculos para conocer la repetibilidad, considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$S = 1.68 \quad \chi_{0.95}^2 = 23.69 (1)$$

$$S^2 = 2.82 \quad \chi_{0.975}^2 = 26.12 (1)$$

$$n - 15 \quad \chi_{0.025}^2 = 5.63 (1)$$

$$n-1 = 14 \text{ g.l.}$$

## 3.4.3.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: S^2 = \sigma^2 \quad \text{donde } \sigma^2 = 5$$

$$H_1: S^2 \neq \sigma^2$$

3.4.3.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ ).

$$\alpha = 0.05$$

## 3.4.3.4. Estadístico de Prueba.

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

## 3.4.3.5. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia = 0.05.

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{1-\alpha} \quad (14 \text{ g.l.}); \text{ entonces:}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.95}$$

## 3.4.3.6. Resultado.

$$\chi^2_{\text{calc}} = 7.90$$

## 3.4.3.7. Conclusión.

Siendo  $7.90 < 23.69$ , se acepta  $H_0$ .

Se concluye que el método es preciso (Repetible).

3.4.3.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $S^2$ .

$$IC = \sqrt{\frac{(n - 1) (S^2)}{\chi^2_{0.975}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n - 1) (S^2)}{\chi^2_{0.025}}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 1.23 < 2.23 < 2.65$$

## 3.3.4. Precisión (Reproducibilidad).

Con la finalidad de determinar el efecto de

analistas y días en las determinaciones hechas por el método se hizo la evaluación de la reproducibilidad, haciendo para - ésto, recobros de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos analistas diferentes. Los resultados se presentan en la Tabla # 8.

Tabla # 8.

	Analista 1.	Analista 2.
Día 1.	98.58%	94.46%
	96.45%	96.59%
	97.47%	94.94%
Día 2.	97.13%	95.77%
	96.89%	96.92%
	96.85%	97.83%

Los resultados del análisis de varianza se --  
presentan en la Tabla # 9.

Tabla # 9. ANOVA (2 Factores Aleatorios).

Fuente.	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados.	Cuadrado Medio.	$F_{\text{calc.}}$	$F_{0.95}$ (1)
Analista	1	3.93	3.93	1.23	161.45
Día	1	0.69	0.69	0.22	161.45
Analista Día	1	3.18	3.18	3.66	5.32
Error	8	6.95	0.87	----	-----

3.4.4.1. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha} (1/1 \text{ g.l.A; } 1/1 \text{ g.l.D; } 1/8 \text{ g.l.AD}); \text{ Entonces:}$$

$$F_{\text{calc}}^A < F_{0.95} \quad (\text{Analista})$$

$$F_{\text{calc}}^D < F_{0.95} \quad (\text{Día})$$

$$F_{\text{calc}}^{\text{AD}} < F_{0.95} \text{ (Interacción Analista -Día).}$$

#### 3.4.4.2. Conclusión.

Siendo: a) efecto por analista, --  
 1.23 < 161.45; b) efecto por día, 0.22 < 161.45; c) efecto por  
 interacción analista-día, 3.66 < 5.32; se concluye que no exis  
 ten efectos por analista, día e interacción analista-día, y,  
 por lo tanto, se deduce que el método es Preciso. (Reproduci-  
 ble).

### 3.5. Tiamina HCl.

#### 3.5.1. Exactitud.

Con la finalidad de determinar la exactitud del  
 método, se hicieron recobros aproximadamente entre el 50% y  
 120% de la cantidad de Tiamina HCl etiquetada en el marbete.  
 Los resultados se muestran en la Tabla # 10.

Tabla # 10.

mg. Adicionados.	mg. Recuperados.	% Recuperado.
<sup>3</sup> 45.45	42.76	98.41
43.45	42.16	97.05
43.45	42.76	98.42
67.25	63.99	95.15
67.25	64.28	95.59
67.25	66.65	99.10
79.50	79.99	100.62
79.50	81.57	102.61
79.50	83.81	105.42
86.43	88.29	102.15
86.43	85.84	99.32
86.43	87.42	101.15
103.62	101.70	98.15
103.62	102.92	99.63
103.62	99.94	96.45

3.5.1.1. Cálculos para conocer la exactitud, considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$\bar{x} = 99.62\% \quad n = 15 \quad t_{0.025} = -2.15 \quad (1)$$

$$S = 2.79 \quad n-1 = 14 \text{ g.l.} \quad t_{0.95} = +1.76 \quad (1)$$

$$S/\sqrt{n} = 0.72 \quad t_{0.975} = +2.15$$

3.5.1.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: \bar{x} = \mu \quad \text{donde } \mu = 100\%$$

$$H_1: \bar{x} \neq \mu$$

3.5.2.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.5.1.4. Estadístico de Prueba.

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

3.5.1.5. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (14 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975}$$

3.5.1.6. Resultado.

$$t_{\text{calc}} = -1.03$$

3.5.1.7. Conclusión.

Siendo  $-2.15 < -1.03 < +2.15$ , se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Exacto.

3.5.1.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $\bar{x}$ .

$$IC = \bar{x} \pm t_{0.95} (S/\sqrt{n})$$

$$\text{Entonces: } IC = 99.26\% \pm 1.27$$

$$\text{Límite Superior: } 100.53\%$$

$$\text{Límite Inferior: } 97.99\%$$

3.5.2. Linealidad (Fig. 53).

Para evaluar la relación entre la variable independiente (mg. adicionados) y la variable dependiente (mg. recuperados) se recurrió al análisis de la linealidad utilizando para ello los valores de la Tabla # 10.

3.5.2.1. Ordenada al Origen de la Recta Estimada.

$$b = -0.70$$

3.5.2.2. Pendiente de la Recta Estimada.

$$m = 1.003$$

3.5.2.3. Ecuación de la Recta Estimada.

$$y = 1.003x - 0.70$$

3.5.2.4. Coeficiente de Determinación.

$$r^2 = 0.9894$$

3.5.2.5. Coeficiente de Regresión.

$$r = 0.9947$$

3.5.2.6. Pruebas de Hipótesis para la Ordenada al Origen.

$$H_0: b = \beta \quad \text{donde } \beta = \text{cero}$$

$$H_1: b \neq \beta$$

3.5.2.7. Estadístico de Prueba para la Ordenada al Origen.

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

3.5.2.8. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Ordenada al Origen.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975} \quad \text{donde:}$$

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.975} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

3.5.2.9. Resultado para la Ordenada al Origen.

$$t_{\text{calc}} = -0.31$$

3.5.2.10. Pruebas de Hipótesis para la Pendiente.

$$H_0: m = \beta \quad \text{donde } \beta = 1$$

$$H_1: m \neq \beta$$

3.5.2.11. Estadístico de Prueba para la Pendiente.

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

3.5.2.12. Región Crítica Bilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$  para la Pendiente.

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \quad (13 \text{ g.l.});$$

entonces:

$t_{0.025} < t_{\text{calc}} < t_{0.975}$  donde:

$$t_{0.025} = -2.16 \quad (1) \quad t_{0.95} = +1.77 \quad (1)$$

$$t_{0.975} = +2.16 \quad (1)$$

### 3.5.2.13. Resultado para la Pendiente.

$$t_{\text{calc}} = +0.10$$

### 3.5.2.14. Conclusión.

Siendo: a) ordenada al origen,  $-2.16 < -0.31 < +2.16$ ; b) pendiente,  $-2.16 < +0.10 < +2.16$ , se acepta  $H_0$ . Se concluye que el método es Lineal.

### 3.5.2.15. Intervalo de Confianza del 95% para la Ordenada al Origen.

$$IC = b \pm t_{0.95} (\hat{S}_y/x) \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{Entonces: } IC = -0.70 \pm 4.88$$

$$\text{Límite Superior: } + 4.18$$

$$\text{Límite Inferior: } -5.58$$

### 3.5.2.16. Intervalo de Confianza del 95% para la Pendiente.

$$IC = m \pm t_{0.95} \frac{\hat{S}_y/x}{S_x \sqrt{n-1}}$$

$$\text{Entonces: } IC = 1.003 \pm 0.06$$

$$\text{Límite Superior: } +1.063$$

$$\text{Límite Inferior: } +0.943$$

### 3.5.3. Precisión (Repetibilidad).

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello, los valores de % recuperado de la Tabla # 10.

3.5.3.1. Cálculos para conocer la repetibilidad, considerando los datos de porcentaje recuperado.

$$S = 2.79 \quad \chi^2_{0.95} = 23.69 \quad (1)$$

$$S^2 = 7.77 \quad \chi^2_{0.975} = 26.12 \quad (1)$$

$$n = 15 \quad \chi^2_{0.025} = 5.63 \quad (1)$$

$$n-1 = 14 \text{ g.l.}$$

3.5.3.2. Pruebas de Hipótesis.

$$H_0: S^2 = \sigma^2 \quad \text{donde } \sigma^2 = 5$$

$$H_1: S^2 \neq \sigma^2$$

3.5.3.3. Nivel de Significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

3.5.3.4. Estadístico de Prueba.

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

3.5.3.5. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia = 0.05

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{1-\alpha} \quad (14 \text{ g.l.});$$

entonces:

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{0.95}$$

3.5.3.6. Resultado.

$$\chi^2_{\text{calc}} = 21.76$$

3.5.3.7. Conclusión.

Siendo  $21.76 < 23.69$ , se acepta  $H_0$ .  
Se concluye que el método es Preciso (Repetible).

3.5.3.8. Intervalo de Confianza del 95% para  $S^2$

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.975}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.025}}}$$

Entonces:  $IC = 2.04 < 2.23 < 4.40$

3.5.4. Precisión (Reproducibilidad).

Con la finalidad de determinar el efecto de - analistas y días en las determinaciones hechas por el método se hizo la evaluación de la reproducibilidad, haciendo para ésto, recobros de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos analistas diferentes. Los resultados se pre--sentan en la Tabla # 11.

Tabla # 11.

	Analista 1.	Analista 2.
Día 1.	102.81%	100.34%
	104.69%	104.22%
	104.60%	104.94%
Día 2.	103.87%	107.02%
	102.78%	103.07%
	106.70%	105.71%

Los resultados del análisis de varianza se presentan en la Tabla # 12.

Tabla # 12 ANOVA (2 Factores Aleatorios)

Fuente	Grados de Libertad.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado Medio	$F_{\text{calc}}$	$F_{0.95}$ (1)
Analista	1	1.25	1.25	12.59	161.45
Día	1	1.06	1.06	12.86	161.45
Analista-Día	1	1.08	0.08	0.04	5.32
Error	8	18.83	2.35	-----	-----

3.5.4.1. Región Crítica Unilateral a Nivel de Significancia  $\alpha = 0.05$ .

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha}(1/1 \text{ g.l.A; } 1/1 \text{ g.l.D; } 1/8 \text{ g.l.AD}); \text{ entonces:}$$

$$F_{\text{calc}}^A < F_{0.95} \quad (\text{Analista})$$

$$F_{\text{calc}}^D < F_{0.95} \quad (\text{Día})$$

$$F_{\text{calc}}^{AD} < F_{0.95} \quad (\text{Interacción Analista-Día})$$

3.5.4.2. Conclusión.

Siendo: a) efecto por analista,  $15.29 < 161.45$ ; b) efecto por día,  $12.86 < 161.45$ ; c) efecto por interacción analista-día,  $0.04 < 5.32$ ; se concluye que no existen efectos por analista, día e interacción analista-día, y, por lo tanto, se deduce que el método es Preciso (Reproducible).

# RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO

LINEARIDAD

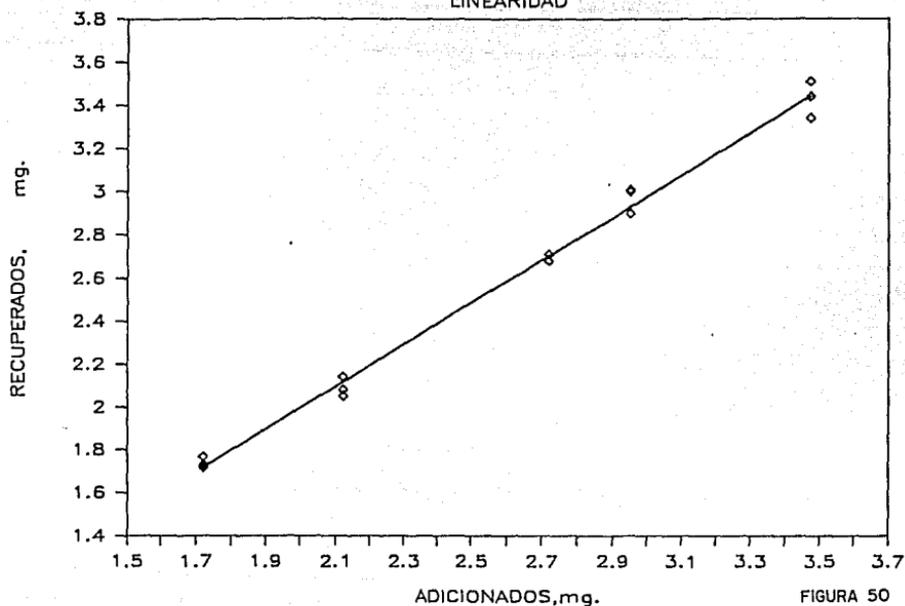


FIGURA 50

# NICOTINAMIDA

LINEARIDAD

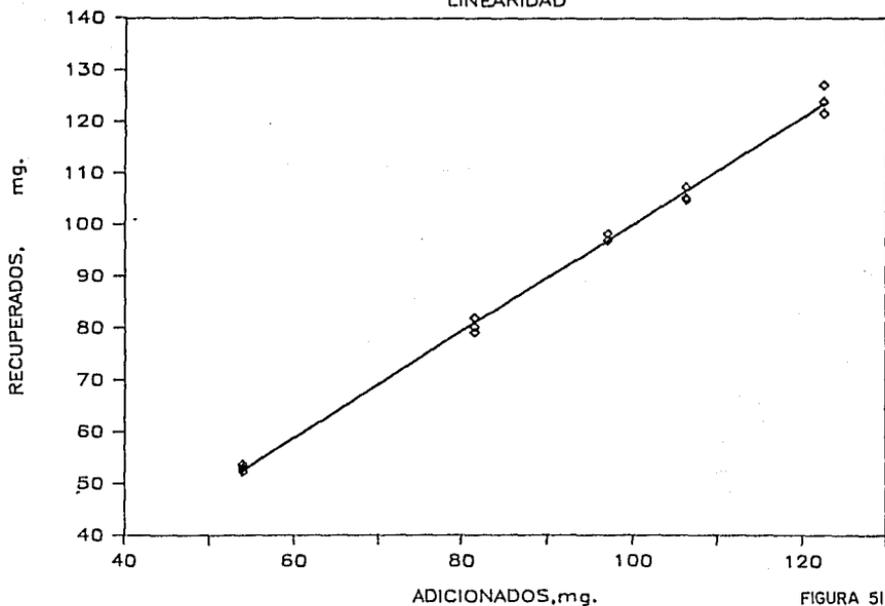


FIGURA 51

# PIRIDOXINA HCl

LINEARIDAD

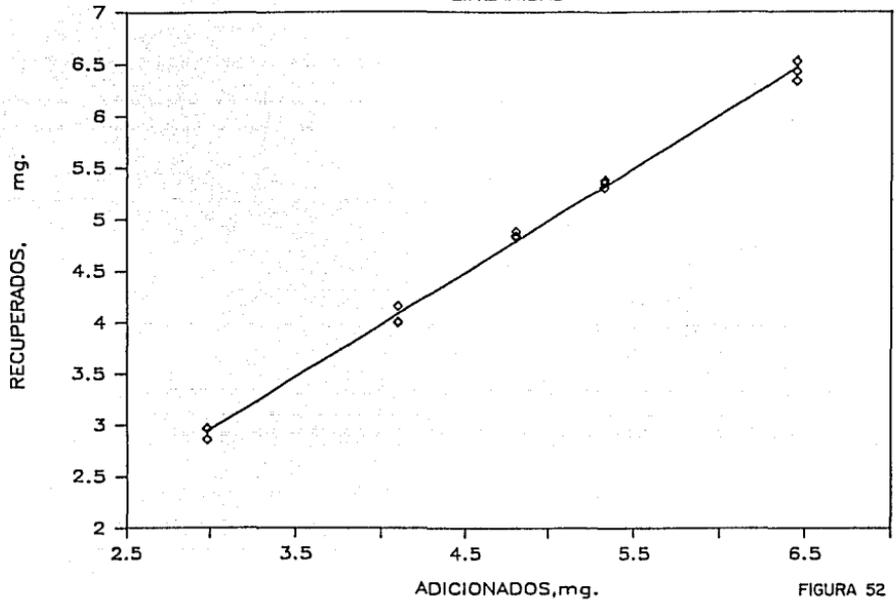


FIGURA 52

# TIAMINA HCl

LINEARIDAD

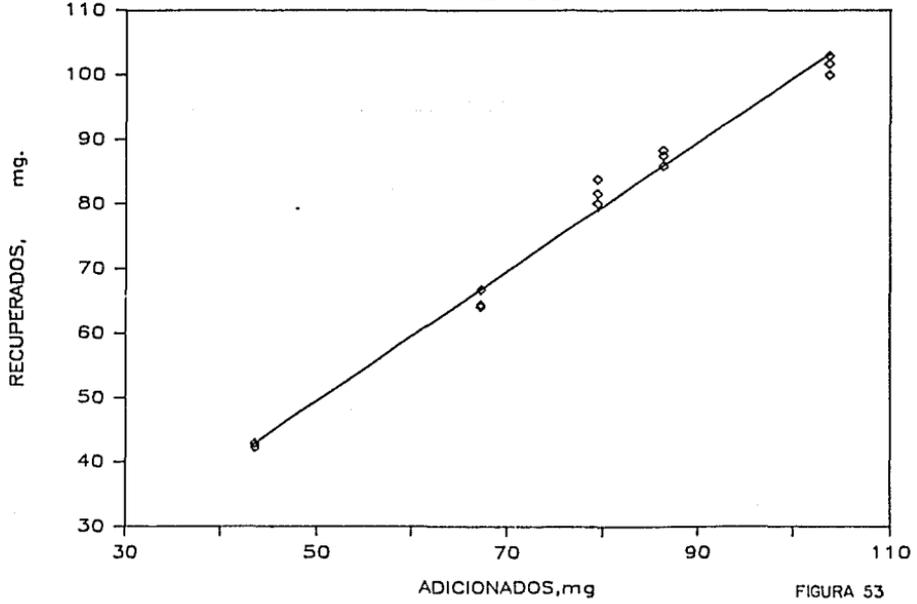


FIGURA 53

## V.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante el desarrollo y validación de este método, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1º) El método demostró ser exacto, preciso y lineal para cada una de las vitaminas en estudio.
- 2º) El método demostró no ser específico para las condiciones de degradación utilizadas en este estudio. Las interferencias obtenidas en condiciones severas de degradación no son completamente representativas de condiciones de almacenamiento normales de una formulación polivitamínica ó de un programa de Estabilidad Acelerada de una formulación de este tipo sino que dan una idea de lo que pudiese ocurrir bajo condiciones normales de almacenamiento y en un programa de Estabilidad Acelerada adecuadamente diseñado para una formulación polivitamínica. Los probables productos de degradación de las condiciones de degradación mencionadas al último tendrían que ser evaluadas para poder determinar si el método es específico bajo esas condiciones de degradación.
- 3º) En análisis rutinarios de Control de Calidad, su uso será del todo confiable según se demostró en el desarrollo y validación del método.
- 4º) El método es aplicable para el análisis de lotes de esta formulación polivitamínica que lleven un tiempo razonable de almacenamiento y que se quiere determinar si es posible consumirlos todavía.
- 5º) El método puede emplearse en análisis de materia prima con resultados plenamente confiables.

6º) El método desarrollado reduce tiempos y costos de análisis ya que se emplea un máximo de 40 minutos para determinar todas las vitaminas.

## VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arkin, Herbert; Calton, Raymond D.  
TABLES FOR STATISCIANS.  
2nd Edition.  
Barnes and Noble Inc.  
New York, USA.  
1972.  
Págs: 121, 122, 126.
- 2.- Clarke, E.G.C.  
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS.  
Vol. I.  
1st Edition.  
The Pharmaceutical Press.  
London, U.K.  
1969.  
Págs: 440, 528, 570.
- 3.- Connors, Kenneth A.; Amidon, Gordon.; Kannon, Lloyd.  
CHEMICAL STABILITY OF PHARMACEUTICALS.  
1st Edition.  
John Wiley and Sons, Inc.  
New York, USA.  
1979.  
Págs: 318-326.
- 4.- Danfor, Darla E.; Munro, Hamish N.  
"Vitaminas Hidrosolubles: Complejo B y Acido Ascórbico".  
Goodman Gilman, Alfred; Goodman, Louis S.; Gilman, Alfred.  
LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA.  
6º Edición.  
Editorial Médica Panamericana.  
Buenos Aires, Argentina.  
1982.  
Págs: 1520-1540.
- 5.- De Ritter, Elmer J.  
J. Pharm. Sci. 71, 1073 (1982).
- 6.- Dick, John G.  
QUIMICA ANALITICA.  
1º Edición.  
Editorial El Manual Moderno, S.A.  
México, D.F.  
1973.  
Págs: 36-81.

- 7.- "Quantitative Analysis of The Fat and Water Soluble Vitamins by High Speed Liquid Chromatography".  
Dupont Liquid Chromatography Methods Bulletin.  
March 23rd, 1972.
- 8.- García Pérez , Ma. Araceli.  
Tesis Profesional.  
1983  
Págs: 42-55.
- 9.- Gloor, R.; Johnson, E.L.  
J. Chromatog. Sci. 15, 413 (1977).
- 10.- Horvath, C.; Melander, W.; Molner I.  
J. Chromatogr. 125 (1976) 126.
- 11.- Karger, Barry L.; Snyder Lloyd R.; Horvath, Csaba.  
AN INTRODUCTION TO SEPARATION SCIENCE.  
1st Edition.  
John Wiley and Sons, Inc.  
New York, USA.  
1973.  
Págs: 265-302.
- 12.- Kirchmeir, R.L.; Upton, R.P.  
J. Pharm. Sci. 67, 1444 (1978).
- 13.- Martindale The Extra Pharmacopoeia.  
27th Edition.  
1977.  
Págs: 1690, 1691, 1694, 1697-1700.
- 14.- Mc.Nair, Harold M.; Esquivel, Benjamin.  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION.  
2º Edición.  
Secretaría General de la OEA. Programa Regional  
de Desarrollo Científico y Tecnológico.  
1980.  
p. 1-63.
- 15.- Remington's Pharmaceutical Science.  
17th Edition.  
1977.  
Págs: 1002-1026.

- 16.- Roderick, P.K.; Rose, W.P.; Tabor, R.; Pattison, T.S.  
J. Pharm. Sci. 70, 1014 (1981).
- 17.- Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.  
INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY.  
2nd Edition.  
John  
New York, USA.  
1979.  
Págs: 453-482.
- 18.- "Validation of Analytical Methods".  
Syntex Laboratories, Inc.  
Quality Assurance Division.
- 19.- The Merck Index.  
10th Edition.  
1985.  
Págs: 6325, 7882, 7883, 8100, 9134.
- 20.- The United States Pharmacopoeia XIX.  
1975.  
Págs: 110, 111, 340.
- 21.- The United States Pharmacopoeia XXI.  
1985.  
Págs: 255, 256, 732.
- 22.- Vera Avila, Luz Elena  
APUNTES DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA  
Maestría en Química Analítica.  
Facultad de Química, UNAM.
- 23.- Vera Avila L.E; Caude, M; Russet, R.  
Analisis 10 (1982) 36.
- 24.- Walker, M.C.; Carpenter, B.E.; Cooper, E.L.  
J. Pharm. Sci., 70, 99 (1981).
- 25.- Williams, R.G.; Baker, D.R.; Schmit, J.A.  
J. Chromatog. Sci. 11, 519 (1973).
- 26.- Wittmer, D.P.; Haney, W.G. Jr.  
"Water Soluble Vitamins".  
Tsuiji, Kyoshi.  
GLC AND HPLC DETERMINATION OF THERAPEUTIC AGENTS.

Part 3. (Chromatographic Sciences Series, Volume IX).  
Marcel Dekker, Inc.  
New York, USA.  
1979.  
Pågs: 1235-1255.