



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

DETERMINACION DEL CONTENIDO QUIMICO
DE CLORHIDRATO DE DIFENHIDRAMINA
EN JARABE UTILIZANDO EL METODO
DE MINIMOS CUADRADOS PARCIALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARICELA ESPINOSA GONZALEZ

ASESOR: Q.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Determinación del contenido químico de Clorhidrato de
Difenhidramina en jarabe utilizando el Método de Mínimos
Cuadrados Parciales

que presenta la pasante: Maricela Espinosa González
con número de cuenta: 40204371-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de junio de 2010

PRÉSIDENTE CFB. José Antonio Garduño Rosas

VOCAL Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

SECRETARIO Dra. Eva María Molina Trinidad

PRIMER SUPLENTE Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

SEGUNDO SUPLENTE Dra. Elizabeth Piñon Segundo

DEDICATORIA

A mis padres:

Martha González Gómar y Mario Espinosa Cedillo

*Gracias por su apoyo y amor,
porque sin ustedes no sería la persona que ahora soy.*

Mamá eres una mujer excepcional, llena de fuerza y sabiduría, no hay manera ni palabras para agradecerte todo lo que me has enseñado, el apoyo y el impulso que me has dado en la vida.

Papá, donde quieras que estés, esto es gracias a ti, gracias por haberme enseñado a siempre querer aprender más, a ser responsable y constante.

AGRADECIMIENTOS

⇒ A mis hermanas:

Adriana y Viris, porque siempre he contado con su apoyo y cariño a lo largo de mi vida. Siempre han sido un gran ejemplo para mí, gracias por sus consejos y críticas, pero sobre todo por su apoyo y cariño. Las quiero par de ñoñas.

⇒ A Miguel:

Gracias por haberte integrado a mi familia y por todo el apoyo que nos has brindado.

⇒ A Bruno:

Porque llegó a cambiar todo, su presencia me recuerda que la vida es para soñar, jugar, aprender, crecer y de vez en cuando hacer berrinches. Te amo Bruno.

⇒ A mi Asesor, QFB José Antonio Garduño Rosas

Por haber creído en mí en este proyecto y haberme apoyado, asesorado y regañado cuando lo necesitaba. Mil gracias profe.

⇒ A mis amigos:

A todos y cada uno que han compartido su tiempo conmigo, a los que solo me han acompañado un momento de mi vida porque el camino nos separo, pero sobre todo a los que siguen brindándome su amistad, gracias por todo su apoyo y por esos momentos de alegría que hemos vivido juntos. Los quiero mucho mugrosos.

⇒ A mis familiares:

Por su apoyo a mi y a mi familia, por estar pendiente del proceso de esta tesis y siempre haberme alentado.

⇒ A mis sinodales:

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Dra. Eva María Molina Trinidad

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Por su valiosas aportaciones a este trabajo.

⇒ A mis profesores, compañeros:

Por colaborar en mi formación profesional. Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

⇒ A todos y cada uno del LEM:

Por que siempre me alentaron y apoyaron en todo lo que necesitaba.

⇒ A la UNAM y a la FES Cuautitlán:

Porque orgullosamente soy PUMA.

INDICE

ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCIÓN	V
OBJETIVOS	VI
1. GENERALIDADES	1
1.1. Ley de Lambert-Beer	2
1.1.1. Espectro de absorción	2
1.2. Clasificación de los métodos de Calibración	3
1.2.1. Calibración Univariables	3
1.2.2. Calibración multivariante	3
1.2.2.1. Datos vectoriales. (Primer orden)	4
1.2.2.2. Matriz de datos (Segundo orden)	4
1.2.3. Calibración de orden superior.	5
1.3. Métodos Quimiométricos	6
1.3.1. Fundamento de los Métodos de Análisis de Multicomponentes	7
1.3.2. Mínimos Cuadrados Parciales	8
1.3.2.1. Algoritmo para MCP	9
1.3.2.1.1. Etapa de Calibración	9
1.3.2.1.2. Etapa de Predicción	11
1.4. Construcción de modelos de calibración multivariante	12
1.5. Validación del modelo de Calibración	13
1.5.1. Validación Cruzada	13
1.5.2. Selección del Número óptimo de Factores: Análisis de SCERP	14
1.5.3. Selección de región espectral	17
1.5.4. Calibración	20
1.5.5. Detección de muestras desechables	22

1.6. Simulación de una calibración.	23
1.6.1. Determinación de Coeficientes de Absortividad	23
1.6.2. Cálculo de las Absorbancias con error	24
1.6.3. Determinación de las Absorbancias Totales	24
1.7. Validación de Métodos Analíticos	25
1.7.1. Linealidad	25
1.7.1.1. Linealidad del Sistema	25
1.7.1.2. Linealidad del Método	25
1.7.2. Exactitud	26
1.7.3. Precisión	26
1.7.4. Repetibilidad entre días y Reproducibilidad	26
1.8. Características de la Difenhidramina	27
1.8.1. Propiedades	27
1.8.2. Indicaciones terapéuticas	28
1.8.3. Farmacocinética y Farmacodinamia	28
1.8.4. Reacciones adversas	29
1.9. Características de los parabenos	29
1.9.1. Metilparabeno	29
1.9.2. Propilparabeno	30
2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	31
2.1. Reactivos, Equipos y Software	32
2.2. Desarrollo y validación del modelo	33
2.2.1. Elaboración de Espectros de Absorción	34
2.2.2. Aditividad, Interacción e Interferencia	36
2.2.3. Selección de longitudes de onda	38
2.2.4. Selección del Número óptimo de Factores: Análisis de SCERP	41
2.2.5. Determinación de las Concentraciones para formar la Calibración	44

2.3. Condiciones finales del Análisis	45
2.3.1. Ensayo analítico	45
2.3.2. Calibración	45
2.3.2.1. Preparación de soluciones	45
2.3.2.1.1. Soluciones Stock	46
2.3.2.1.2. Preparación de sistemas	46
2.3.3. Condiciones de Lectura y estimación.	50
3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	51
3.1. Validación del sistema	52
3.1.1. Linealidad del sistema	52
3.1.2. Precisión y exactitud del sistema	54
3.2. Validación del método	56
3.2.1. Linealidad del método	56
3.2.2. Precisión y Exactitud del método	58
3.2.3. Repetibilidad	60
CONCLUSIONES	62
ANEXO	64
BIBLIOGRAFÍA	79

ABREVIATURAS

λ	<i>Longitud de onda</i>
%	<i>Porcentaje</i>
°C	<i>Grados Centígrados</i>
A	<i>Absorbancia</i>
b	<i>Ordenada al origen (intercepto)</i>
c, C	<i>Concentración</i>
Clor. DFH	<i>Clorhidrato de Difenhidramina</i>
CV	<i>Coefficiente de variación</i>
D.E.	<i>Desviación Estándar</i>
desvest	<i>Desviación Estándar</i>
DFH	<i>Difenhidrmina</i>
e, E	<i>Error</i>
FEUM	<i>Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos</i>
Fig.	<i>Figura</i>
g	<i>gramos</i>
k, K	<i>Coefficiente de regresión</i>
m	<i>pendiente</i>
µg, mcg	<i>microgramos</i>
MCP	<i>Mínimos Cuadrados Parciales</i>
mg	<i>Miligramos</i>
ml	<i>Mililitros</i>
MP	<i>Metilparabeno</i>
n	<i>Número de muestras</i>
nm	<i>Nanometros</i>
PP	<i>Propilparabeno</i>
r	<i>Coefficiente de correlación</i>
r ²	<i>Coefficiente de determinación</i>
s	<i>Desviación estándar</i>
SCERP	<i>Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso Central</i>
USP	<i>Farmacopea de los Estados Unidos de América</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>

INTRODUCCIÓN

Dentro de la Industria farmacéutica existe la necesidad de obtener resultados, en relación a la cuantificación de Fármacos, de forma eficaz, rápida y a bajo costo, por lo que hay ciertos procesos analíticos, que resultan ineficientes, debido a que para su uso se requiere de una instrumentación analítica sofisticada y la inversión de tiempo para optimizar las condiciones de separación.

Como alternativa se han desarrollado los métodos Quimiométricos, los cuales permiten cuantificar de forma simultánea y confiable, diversos analitos en la muestra analítica, a partir de señales o respuestas instrumentales con muy poca selectividad, sin necesidad de su separación previa o del conocimiento de todos los componentes presentes en la misma. Por tal motivo estos métodos se han convertido en una herramienta importante en el análisis de medicamentos.

El jarabe de Clorhidrato de Difenhidramina es un potente agente antihistamínico, ampliamente utilizado como anticolinérgico, antitusivo y antiemético, para el cual se han propuesto diversos métodos para la cuantificación de su principio activo, tales como Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) o Análisis electroquímico. Sin embargo siendo métodos tan confiables, estos presentan las desventajas, en cuanto costo y tiempo, antes mencionadas, debido a que se requiere de la separación previa del analito para su análisis.

Por lo anterior, la importancia de este trabajo radica en el desarrollo de un método para cuantificar Difenhidramina en Jarabe, el cual nos brinde todos los beneficios de la calibración multivariante, específicamente en uno de los métodos Quimiométricos más utilizados en la química analítica, Mínimos Cuadrados Parciales, apoyándose en técnicas instrumentales sencillas tales como la Espectrofotometría UV permitiendo así desarrollar un método eficaz, selectivo, rápido y de un menor costo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Establecer un Método Espectrofotométrico que sea confiable para la determinación del contenido químico de Clorhidrato de Difenhidramina presente en jarabe, aplicando el método de Mínimos Cuadrados Parciales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ⇒ Establecer las condiciones espectrofotométricas óptimas que permitan la cuantificación de Clorhidrato de Difenhidramina presente en una muestra analítica de una manera eficaz, reduciendo el tiempo y costo del análisis.
- ⇒ Establecer un ensayo analítico confiable y eficaz para cuantificar Clorhidrato de Difenhidramina en jarabe, sin necesidad de la separación previa del analito.
- ⇒ Evaluar la confiabilidad del sistema para la cuantificación de Clorhidrato de Difenhidramina presente en una mezcla, por medio de su validación.
- ⇒ Validar el Método Analítico propuesto, evaluando características tales como la linealidad, exactitud, precisión y repetibilidad.

1

Generalidades

1.1. Ley de Lambert-Beer ⁽⁸⁾

Establece que la absorbancia (A) de una muestra homogénea, es directamente proporcional a la concentración (C) de las moléculas en solución en una determinada longitud de onda.

$$A = a l C$$

donde (a) es una constante de proporcionalidad, llamada coeficiente de absorptividad y (l) es la longitud del paso óptico expresada en centímetros (cm). Cuando (C) es una concentración molar, la absorptividad recibe el nombre de absorptividad molar (ϵ)

$$A = \epsilon l C$$

La representación gráfica de la absorbancia en función de la concentración es lineal, sin embargo se presentan curvaturas causadas por desviaciones en la Ley de Lambert-Beer, entre las que se encuentran limitaciones reales (cambios en el índice de refracción del sistema analítico debido a concentraciones muy bajas o elevadas), desviaciones químicas (cambios en el equilibrio químico) o desviaciones instrumentales (falta de monocromaticidad en la radiación incidente).

1.1.1. Espectro de absorción

Se conoce como espectro de absorción a la representación gráfica de la absorción en función de la longitud de onda (λ).

Para la selección de una longitud de onda adecuada para la determinación de la absorptividad de un analito, se debe tomar en cuenta diversos aspectos:

- ⇒ La sensibilidad máxima se encuentra en la longitud de onda donde se obtiene el máximo del espectro de absorción.
- ⇒ En un espectro de absorción la variación de la absorbancia para pequeños cambios de longitud de onda es mínima en un pico máximo que no es agudo, por el contrario los cambios son apreciables cuando el pico máximo sí lo es.
- ⇒ La presencia de dos o más máximos de absorción en el espectro indica que hay más de una transición electrónica.

Además se debe tomar en cuenta la naturaleza química del analito y la del disolvente, pH de la solución, temperatura, concentraciones elevadas de electrolitos y si existe la presencia de una sustancia interferente.

1.2. Clasificación de los métodos de Calibración

En base a que los métodos de calibración pueden tener una base empírica o teórica que explica el fenómeno, físico o químico responsable de la señal analítica, se han propuesto diversas clasificaciones. Booksh y Kowalski, desde un punto de vista matemático, los clasifican en función de la dimensión de los datos disponibles por muestra.

1.2.1. Calibración Univariables

Este método supone que la respuesta analítica es consecuencia de un solo analito, es decir se obtiene un solo valor numérico, un escalar (pH o lecturas espectrométricas a una sola longitud de onda). El método analítico utilizado para el manejo de información analítica es la estadística univariable y la regresión lineal univariable.

Para la aplicación de estos métodos es necesaria la separación previa del analito, para la obtención de un espectro puro del mismo y la disminución del ruido espectral que puedan adicionar otros componentes de la muestra. Con ello la relación de la señal con la concentración del analito se reduce a una línea recta.

1.2.2. Calibración multivariante

El análisis multivariante ayuda a determinar la relación de varias variables independientes (variables X) con respecto a una o varias variables dependientes (respuesta, variable Y).

La calibración multivariante es una herramienta aplicable en la determinación de macro y micro componentes con diversas características, bajo distintos métodos de análisis (espectrometría, cromatografía, Infrarrojo, etc.).

Dentro de las ventajas que proporciona la calibración multivariante se pueden encontrar:

⇒ Mejora de precisión y exactitud en cualquiera de los métodos analíticos en comparación con la calibración univariable.

- ⇒ Cuantificación confiable y simultánea de uno o varios componentes presentes en la muestra analítica, aun cuando no se conozcan todos los componentes de la misma
- ⇒ Permite analizar sistemas con interferencias químicas, sin necesidad de una manipulación excesiva de la muestra.
- ⇒ Detección de muestras desechables presentes en la matriz de calibración para mejorar la capacidad predictiva de la misma.

Por lo anterior la calibración multivariante es una herramienta importante para estimular nuevos métodos analíticos, con la mejora de la capacidad predictiva y confiabilidad de los mismos.

Si existe alguna interferencia en el problema, este método permite la detección de la misma y con ayuda del centrado de datos y el uso de derivadas, se pueden corregir casi por completo los efectos en la base o la calibración puede modelarlos como un interferente más.

1.2.2.1. Datos vectoriales. (Primer orden)

En este caso los instrumentos de medición proporcionan un vector de datos (ej, espectro de absorción), por lo que los métodos analíticos utilizados se derivan del análisis multivariado de los datos y la estadística multivariable.

No es necesario el modelaje de las interferencias o del ruido antes de extraer la información química, sin embargo para obtener resultados satisfactorios es necesario que la matriz analítica sea de la misma naturaleza a las muestras.

1.2.2.2. Matriz de datos (Segundo orden)

En este método se obtienen matrices de datos, en las cuales se consideran dos direcciones: filas y columnas, que generalmente corresponden a dos tipos de medidas, tal es el caso de un seguimiento de respuesta de tipo multivariable con el tiempo, pH o concentración.

La calibración es posible en presencia de interferencias debido a que los instrumentos de segundo orden permiten el análisis en presencia de algún componente que no forme parte de la calibración.

En base a un desdoblamiento de datos (unfolding) se puede obtener tensores de primer orden para cada muestra, de esta manera se aprovechan las ventajas de la calibración de primer orden, manteniendo la estructura tridimensional de datos para obtener una calibración de segundo orden. Para este caso se utilizan los métodos de análisis de tres vías (three-way data analysis) ^(16,4)

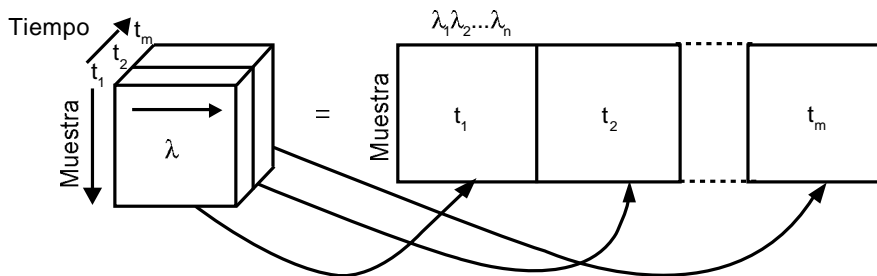


Figura 1.1. Desdoblamiento de una estructura tridimensional de datos (unfolding)

La calibración multivariable favorece el desarrollo de nuevos métodos analíticos y respalda la capacidad predictiva, así como la confiabilidad de los ya existentes. No obstante, su aplicación en algunas áreas es limitada debido a su complejidad para establecer las condiciones adecuadas y la poca comprensión de la misma.

1.2.3. Calibración de orden superior.

No hay límite en el orden máximo de datos que puede obtenerse por lo que la sensibilidad aumenta. Se requiere de instrumentos modernos que nos proporcionen una estructura tridimensional de datos por cada muestra.

Tabla 1.1 Descripción de análisis univariable y análisis multivariante (1)

ANÁLISIS	ORDEN DE LOS INSTRUMENTOS	EJEMPLOS DE INSTRUMENTOS	DATOS OBTENIDOS
Univariable	0	ph-metro, cromatografía, Absorbancia a una λ	Escalar
Multivariante	1	DAD-UV-Vis NIR, MIR	Vector
	2	DAD-UV-Vis NIR, midiendo cada tiempo t	Matriz
	Superior	Fluorímetro multidimensional midiendo a cada tiempo t	Cubo

1.3. Métodos Quimiométricos

Uno de los retos de la química analítica, es la cuantificación de un analito cuando se encuentra presente en una muestra con diversos componentes. La separación previa del analito de la mezcla es un paso muy frecuentemente utilizado, lo que lleva a un costo mayor e inversión de tiempo para lograr el objetivo y aún así, no siempre los resultados son satisfactorios.

Como alternativa se han desarrollado los métodos quimiométricos, los cuales permiten obtener la información requerida sobre el analito a partir del tratamiento de datos, sin necesidad de la separación previa de los componentes.

Una de las definiciones más acertadas, e incluso las más global, para la Quimiometría es la dada por el Prof. Massart [Massart 1997]: “La Quimiometría es la parte de la Química que se sirve de las matemáticas, estadística y lógica formal para: diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química relevante a partir del análisis de señales analíticas y, finalmente, adquirir conocimiento de los sistemas químicos”⁽¹⁾

Gracias a la quimiometría se ha pasado de hacer medidas puntuales a medidas espectrales, con lo que se obtiene una gran cantidad de información, desarrollando y aplicando nuevos métodos de calibración multivariante a partir de señales o respuestas instrumentales con muy poca selectividad.

1.3.1. Fundamento de los Métodos de Análisis de Multicomponentes.

La relación entre la absorbancia y la concentración a cierta longitud de onda se explica por la Ley de Beer:

$$A_1 = k_1 c_1$$

En la cual (A_1) es la absorbancia a una longitud de onda (λ_1), (k_1) la absorptividad del analito y (c_1) la concentración.

Dicha ecuación se resuelve con tan solo una muestra, no obstante debido al ruido, error instrumental o error en la manipulación de soluciones, se analizan diversas muestras a distintas concentraciones, lo cual arroja un gráfico con los resultados obtenidos (variable x, variable y) que mediante un ajuste por mínimos cuadrados, se convierte en una línea recta que comprende los puntos en donde el error total es mínimo.

En el análisis de multicomponentes es posible establecer dos ecuaciones, cuando se encuentra la mezcla de dos analitos:

$$\begin{aligned} A_1 &= k_1 c_1 + e_1 \\ A_2 &= k_2 c_2 + e_2 \end{aligned}$$

A_1 y A_2 son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes, k_1 y k_2 , las absorptividades de los analitos a las respectivas longitudes de onda, e_1 y e_2 los errores residuales del ajuste por mínimos cuadrados de las absorbancias reales.

Estas ecuaciones pueden resolverse de manera independiente, siempre y cuando las bandas estén bien resueltas (no interfiera una con la otra). En el caso de interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro (bandas solapadas) es posible resolver las ecuaciones simultáneamente partiendo del hecho que la Ley de Beer es aditiva:

$$\begin{aligned} A_1 &= k_{11} c_1 + k_{21} c_2 + e_1 \\ A_2 &= k_{12} c_1 + k_{22} c_2 + e_2 \end{aligned}$$

Sin embargo cuando se tratan más de dos componentes, el solucionar ecuaciones simultáneas es algo laborioso, además se recomienda medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda por cada componente y resolver sus ecuaciones respectivas.

Por lo anterior los métodos matriciales son eficientes para resolver este tipo de ecuaciones simultáneas, las cuales en términos matriciales se expresan de la siguiente manera:

$$A_{(n,j)} = K_{(m,j)} C_{(n,m)} + E_{(n,j)}$$

En donde n es el número de soluciones patrón o muestras, j el número de valores de longitud de onda y m el número de componentes.

Por medio del algebra matricial, se pueden resolver de manera eficaz y confiable ecuaciones simultáneas y para ello se cuenta con diversos métodos:⁽³⁾

Aplicables a sistemas lineales:

- ⇒ Regresión Lineal Múltiple (Multiple Linear Regression) o RLM
- ⇒ Mínimos Cuadrados Clásicos (Classical Least Squares) o MCC
- ⇒ Mínimos Cuadrados Inversos (Inverse Least Squares) o MCI
- ⇒ Análisis Lineal Híbrido (HLA)

Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales:

- ⇒ Análisis del Componente Principal (principal Component Analysis) o ACP
- ⇒ Regresión del Componente Principal (Principal Component Regression) o RCP
- ⇒ Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares) o MPC
- ⇒ Otros de más reciente incorporación son: ACE (Alternating Conditional Expectations), LWR (Locally Weighted Regression), MARS (Multivariante Adaptive Regression Splines), PPR (Projection Pursuit Regression), NN (Neural Networks), de aplicación a sistemas no lineales.

1.3.2. Mínimos Cuadrados Parciales.

Denominado comúnmente como “la mayor técnica de regresión para datos multivariantes”. Fue utilizado originalmente en la econometría por H. World y posteriormente en aplicaciones químicas por S. Wold y H. Martens. Este método permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos por separado y es ideal para muestras en donde los analitos presentan intensidades espectrales muy diferentes.

1.3.2.1. Algoritmo para MCP ⁽²⁾

En el algoritmo establecido por Haaland, el cual es una modificación del algoritmo NIPALS (non linear iterative partial least-squares), se realiza el análisis de calibración y la predicción para solo un componente a la vez, es decir, solo utiliza la concentración del componente de interés en los datos de la calibración, mientras que la concentración de los demás componentes no se incluye.

No obstante si se desea conocer la concentración de uno de los otros componentes de la mezcla, solo se debe realizar el análisis en donde se incluya los datos del componente de interés en la calibración.

El algoritmo de MCP comprende de dos etapas:

1.3.2.1.1. Etapa de calibración

En base a un conjunto de soluciones de referencia, las cuales contienen las posibles combinaciones de los componentes de la muestra problema, se establece una relación entre la absorbancia obtenida a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés.

Con ello se obtiene dos matrices compuestas por los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda (matriz A) y el número de soluciones (vector c). En base al siguiente algoritmo se resuelven los datos de las matrices para elaborar el modelo para MCP (ver Anexo 1):

1) Centrar los datos de la matriz A (valores de absorbancia) y la matriz c (valores de concentración). Se obtiene la media de los valores de absorción de la matriz (A) y la media de matriz (c). Se sustrae a cada valor de absorción la matriz (A) la media de la misma, así como a cada valor de concentración la media de la matriz (c).

2) Formación del vector cargador de peso o “weight loading vector” “ w_h ”

$$A = c w_h' + E_A$$

$$w_h' = A'c / c'c$$

Una vez que se obtiene el vector de carga, dichos valores deben ser normalizados, con la finalidad de que la información de la concentración sea introducida directamente en el cálculo de los siguientes vectores de carga.

3) Vector indicador o “score” (variable latente) t_h :

$$A = t_h w_h' + E_A$$

$$t_h = A w_h$$

Este vector representa la intensidad del primer vector de carga (loading), está relacionado con la variabilidad en las muestras.

4) Relación del vector indicador con las concentraciones:

$$c = v_h t_h + e_c$$

$$v_h = t_h' c / t_h' t_h$$

5) Formación del vector de carga o “loading vector”, b_h para A:

$$A = t_h b_h' + E_A$$

$$b_h = A' t_h / t_h' t_h$$

6) Cálculo de los residuales en A y C.

Espectros Residuales:

$$E_A = A - t_h b_h'$$

Concentraciones residuales:

$$e_c = c - v_h t_h$$

El producto de la multiplicación de v_h por t_h es una estimación de la concentración del analito de interés basado en el espectro, así como el producto del vector t_h por b_h es una aproximación del espectro de calibración.

7) Se incrementa h , sustituyendo A por E_A y c por e_c en el paso 2 y se continua desde este punto, se repiten estos paso como sea necesario con el fin de obtener los factores para optimizar el modelo.

1.3.2.1.2. Etapa de predicción

A partir del espectro obtenido para una muestra problema, se estima la concentración del analito de interés, por medio de uno de los dos métodos de predicción establecidos para MCP:

Método 1:

El principio básico de este método es la generación de “residuales espectrales”, involucra el cálculo de las intensidades espectrales (t_h) del espectro de la muestra problema en el nuevo sistema de coordenadas obtenido durante la etapa de calibración por MCP.

Basándose en el algoritmo de calibración por MCP, se emplean los valores de w_h , v_h y b_h así como el valor de concentración promedio del analito presente en la calibración.

Paso 1: Centrar la matriz de datos correspondiente a las lecturas de absorbancia de la muestra problema. (“a”).

Paso 2: Cálculo de la variable latente:

$$t_h = a w_h$$

Paso 3: Cálculo de la concentración:

$$c_h = c_{h-1} + v_h t_h$$

Paso 4: Cálculo de residuales:

$$e_h = e_{h-1} - t_h b_h'$$

Paso 5: incrementar h, sustituyendo “a” por e_h y repetir desde el paso 2, hasta calcular el número óptimo de factores empleados en la calibración.

Método 2

Este método involucra el cálculo y uso del vector de coeficiente de regresión lineal, k , el cual tiene las mismas dimensiones que un espectro normal.

Paso 1: Después de la calibración para MCP, calcular k :

$$K = W (B'W)^{-1} v'$$

Paso 2: Cálculo del residual e_c :

$$e_c = c_0 - a_0 k$$

Paso 3: Cálculo de la concentración:

$$c = a k + e_c$$

Se debe tomar en cuenta que en este algoritmo, los valores de “ a ” no se encuentran centrados, mientras que W y B son las matrices obtenidas en la etapa de calibración que contienen todos los vectores w_h y b_h obtenidos hasta el número de factores óptimo establecido para el modelo. V es el vector obtenido utilizando los v_h óptimos calculados para el modelo y a_0 es el vector de la media del espectro obtenida en la etapa de calibración.

1.4. Construcción de modelos de calibración multivariante ⁽¹⁶⁾

El objetivo de los métodos de calibración multivariante es proporcionar modelos de calibración confiables y robustos, capaces de predecir el valor de la propiedad estudiada para nuevas muestras, para ello se propone seguir las siguientes etapas:

- a) Definición de un conjunto de calibración o un conjunto de entrenamiento (training set): establece la propiedad a determinar, es representativo del sistema en estudio y debe permitir realizar predicciones futuras para nuevas muestras. El conjunto de calibración debe ser representativo de todo intervalo de concentración, de las posibles interferencias y otros componentes presentes en las muestras.
- b) Registro de la información analítica: Registro de la señal o respuesta analítica obtenida del instrumento elegido para el estudio.

c) Pretratamiento de los datos: se minimiza la contribución no deseada presentes en la señal analítica, que disminuye la reproducibilidad y puede provocar que el sistema presente comportamientos que disminuirían la capacidad predictiva del modelo.

d) Selección del modelo: el objetivo es establecer la relación más simple entre la propiedad a determinar y la señal analítica,. La mayoría de las veces requiere de un estudio complejo de la matriz de datos obtenidos.

e) Validación del modelo: de esta manera se verifica que el modelo propuesto es el correcto para la obtención de resultados confiables.

f) Predicción de nuevas muestras: Con el modelo construido y validado se calcula la propiedad estudiada en nuevas muestras.

1.5 Validación del modelo de Calibración

Existe una gran diferencia entre “validar el modelo o sistema” y “validar el método analítico”, cuando se habla del modelo se refiere a validar las condiciones establecidas para realizar el método de calibración multivariante, en este caso MCP y con ello evaluar su capacidad predictiva, mientras que al validar al método analítico, se demuestra que éste es confiable para su aplicación.

El modelo de validación en la calibración multivariante se conforma por una serie de parámetros, que una vez que se cumplan, se puede validar el método analítico:

- ⇒ Número óptimo de factores que deben ser incluidos en el modelo
- ⇒ Capacidad predictiva para muestras de concentración desconocida
- ⇒ Cantidad de soluciones de la calibración representativas para el modelo.
- ⇒ Detección de muestras desechables
- ⇒ Selección de variables (longitud de onda)
- ⇒ Pretratamiento de datos.

1.5.1. Validación Cruzada

La validación cruzada es una herramienta quimiométrica muy útil en los métodos de calibración multivalente, su propósito es conocer la capacidad predictiva del modelo, por medio de un conjunto de datos, usando $n-1$ muestras, dejando una muestra (i) fuera. ⁽¹¹⁾

Para realizar la validación cruzada debemos seguir los siguientes pasos:

- ⇒ Seleccionar las soluciones que conformaran la “nueva calibración”, para ello es necesario dividir en dos partes los datos espectrales de los sistemas que conforman la calibración.
- ⇒ Debemos seleccionar los sistemas basándonos en la concentración del analito, ya que deben estar presentes la mayor parte de las concentraciones propuestas con anterioridad, así como también tomar en cuenta qué sistemas son más prácticos de preparar debido a las alícuotas que deben tomarse de la solución Stock.
- ⇒ A los sistemas que no fueron seleccionados, los tomaremos como “muestras para predicción”, para así evaluar la capacidad predictiva de la “nueva calibración” elegida.

El procedimiento anterior debe repetirse con el mayor número de combinaciones posibles, si aplicamos la suma de cuadrados para compararlos entre sí podemos evaluar la calibración óptima para el modelo.

Hay que tomar en cuenta que si los sistemas de la calibración son preparados por duplicado o triplicado, al momento de dividir los datos espectrales, deben descartarse los de las replicas también, ya que esto nos podría dar errores al sobrestimar la capacidad predictiva del modelo.

1.5.2. Selección del Número óptimo de Factores: Análisis de SCERP

Escoger el número apropiado de vectores de carga h (número de factores) es una tarea en la cual se debe tener especial cuidado, ya que si se selecciona un número inferior al óptimo se corre el riesgo de obtener un empobrecimiento de las predicciones y al contrario, si se incluyen demasiados, los vectores comenzaran a modelar el ruido del sistema lo que lleva a un sobreajuste y con esto a la pérdida de exactitud en los resultados.

Por lo anterior, el parámetro llamado PRESS (Prediction Residual Error Sum of Squares) o SCERP (Suma de Cuadrados de los Errores Residuales de Predicción) es un criterio estadístico que nos ayuda a evitar los inconvenientes mencionados.

Para cada modelo generado que contenga un determinado número de loadings:

$$(\text{PRESS}) \text{ SCERP} = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C}_i - C_i)^2$$

en donde n = número total de muestras empleadas en la calibración; m = número total de componentes en la mezcla, \hat{C}_i = concentración calculada y C_i = concentración de referencia.

El valor de PRESS es un indicador de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) determina la concentración de una solución. El gráfico de valor de SCERP contra el número de factores nos ayuda a determinar si el modelo que se plantea es el adecuado, es decir, si el algoritmo empleado es el adecuado para modelar la variación presente en los datos para la estimación de las concentraciones de las muestras.

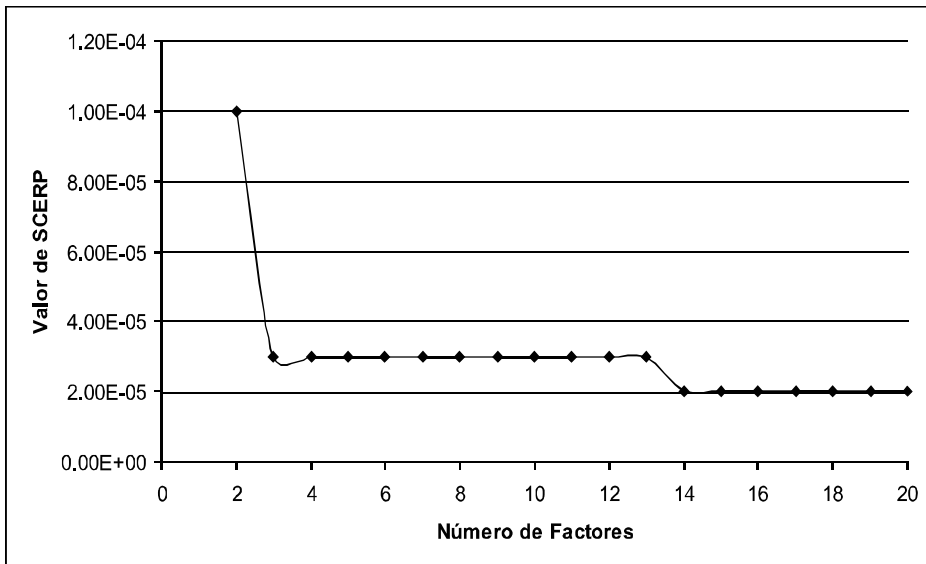


Figura.1.2. Gráfico de valores SCERP contra número de Factores (gráfico de sedimentación o de los autovalores)

Como se puede apreciar en el gráfico de valores SCERP contra el número de factores, o también conocido como gráfico de los autovalores o de sedimentación, usualmente se presenta una zona inicial de caída brusca, seguida de una caída gradual o una constante, se toma como valor óptimo de h el orden del autovalor o del componente donde se produce el cambio de caída brusca a gradual. ⁽¹¹⁾

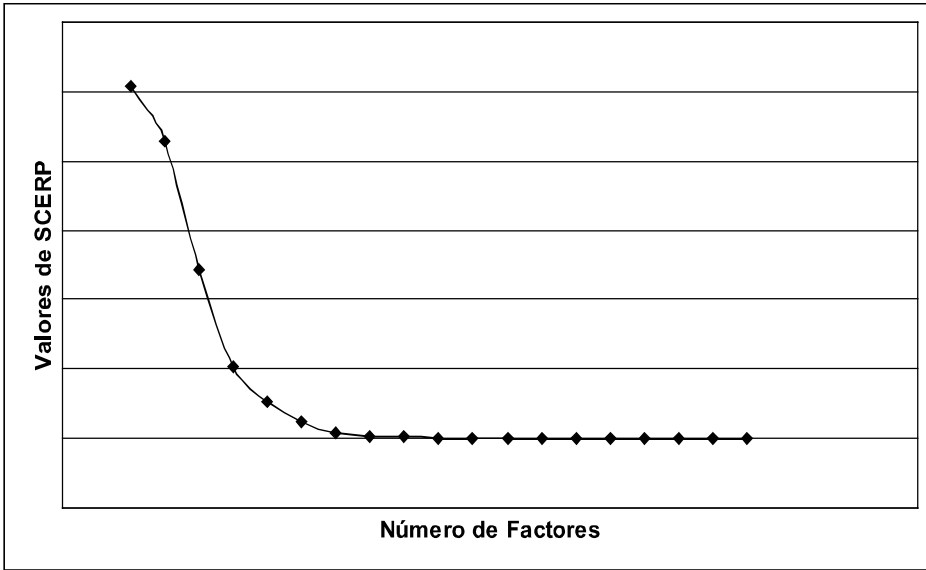


Figura 1.3. Gráfico de sedimentación donde se muestra que el algoritmo de MCP puede modelar los datos.

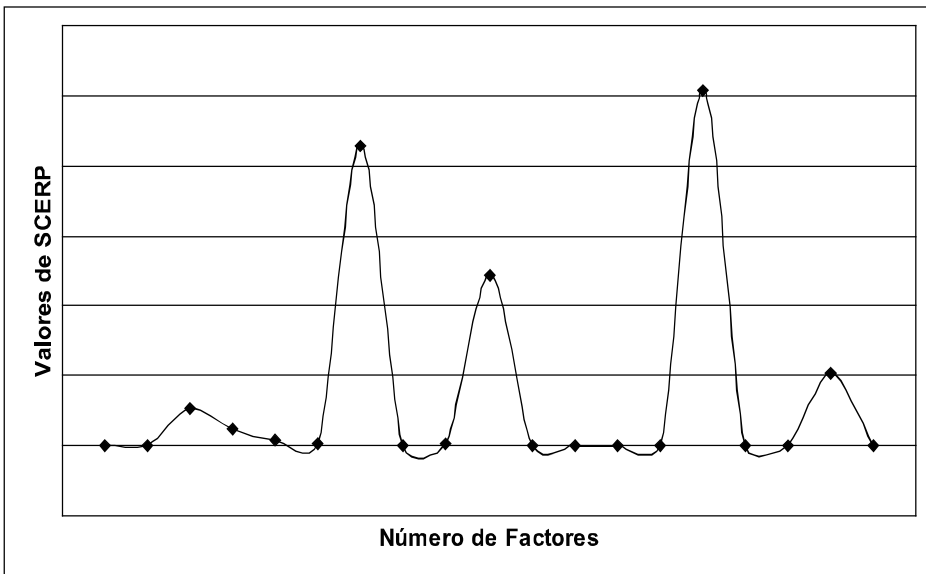


Figura 1.4. Gráfico de sedimentación donde se muestra que el algoritmo de MCP no puede modelar los datos.

Sin embargo este procedimiento tiene como inconveniente que la división del gráfico de sedimentación en dos zonas suele ser subjetiva y difícil de establecer debido a que la caída puede estar muy poco marcada.

Por lo anterior otra forma de evaluar el número de factores óptimo es por medio de un gráfico de cocientes de autovalores sucesivos. Su objetivo es resaltar la diferencia entre la caída brusca y gradual, por medio de dividir cada valor de SCERP por el que le sigue. Los cambios bruscos se convierten en picos en este gráfico y se toma como valor óptimo el denominador del primer pico.

Un criterio que se puede tomar en cuenta para la elección del número óptimo de factores es por medio del número de fuentes significativas de varianza, en donde el número de factores que se emplea en el modelo no es mayor que el número de fuentes significativas de varianza presentes en los datos.

Si el algoritmo es el adecuado se observara un comportamiento similar al descrito en la Figura 1.3., mientras que si el algoritmo no puede modelar los datos, se podrá observar un comportamiento similar al descrito en la Figura 1.4.

El número de factores óptimo deberá ser aquel que proporciona el mínimo valor de PRESS. Cuantos más factores se tienen en cuenta, el error de predicción disminuye, sin embargo hay que evitar elegir un número de factores mayor ya que podrían contener vectores ruido en la matriz de calibración.

El parámetro SCERP es el más comúnmente usado, sin embargo existen otras herramientas estadísticas para determinar el número de factores, tal es el caso de la Raíz del Cuadrado Medio del Error de Predicción (RCMEP)

$$RCMEP = \left(\sum_{i=1}^n (C_i \text{ real} - c_i \text{ est})^2 / n \right)^{1/2}$$

1.5.3. Selección de región espectral. ^(2,14)

El método de Mínimos Cuadrados Parciales presenta la ventaja de ocupar el espectro completo para la realización de un modelo. Sin embargo la utilización de una gran cantidad de longitudes de onda puede ocasionar problemas de ruido espectral o longitudes de onda que contienen información irrelevante para el modelo.

Por lo anterior es importante elegir correctamente las longitudes de onda que conformaran al modelo con el fin de asegurar una buena capacidad predictiva, así como la construcción de un modelo fácil de interpretar.

Un modelo empírico utilizado para este fin, es el basado en la obtención del coeficiente de regresión lineal k_w descrito a continuación, el cual se detalla en el Anexo 2 ⁽²⁾;

A) Estandarizar los datos de la calibración por medio de la siguiente ecuación:

$$(a_i - \bar{a}) / s^2$$

Donde (a_i) es cada uno de los valores espectrales, (\bar{a}) es la media del espectro de calibración y s la desviación estándar.

B) Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos de la calibración “estandarizados” y determinar el número óptimo de factores a incluir en el modelo.

C) Determinar los valores del coeficiente de regresión lineal:

1. Con los datos ya estandarizados obtener el vector cargado de peso w_n del algoritmo de calibración de MCP y normalizar sus valores.
2. Obtener los valores del coeficiente de regresión lineal k_w por medio de la siguiente ecuación:

$$K_w = W_n((B*W_n)^{-1} v_n$$

El valor de v_n proviene de la etapa de calibración por MCP.

3. Graficar el coeficiente de regresión final (k_w) contra la longitud de onda (nm)

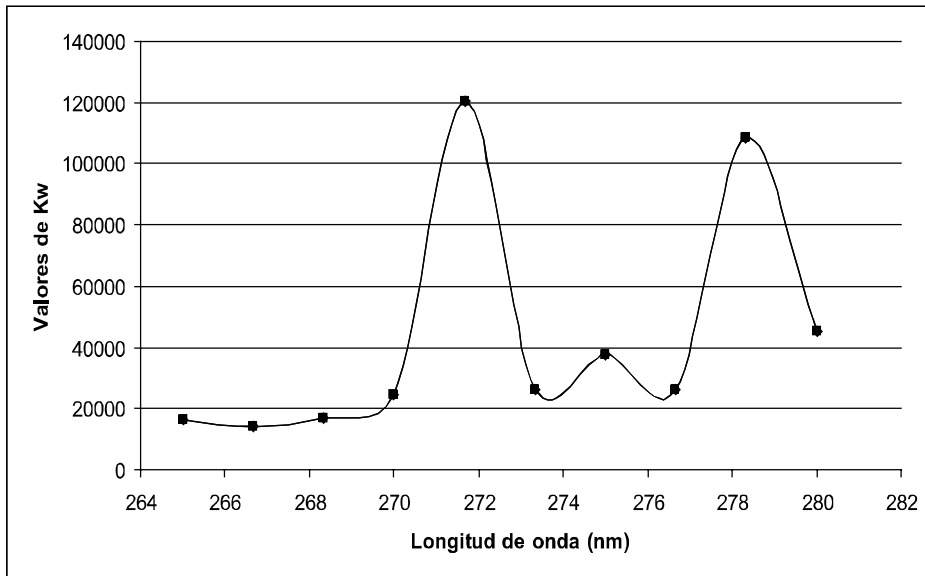


Figura 1.5. Grafico de Coeficiente de regresión final (kW) contra la longitud de onda (nm)

D) Seleccionar la región de longitudes de onda que tenga valores de kw equidistantes entre si, o eliminar la región de longitudes de onda que presenten valores negativos grandes de k_w .

E) Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos centrados y con las longitudes de onda seleccionadas.

F) Determinar el número óptimo de factores utilizando la validación cruzada y el análisis de SCERP.

G) Comparar el número óptimo de factores obtenido en el paso B con el del paso F. Para determinar el número óptimo de longitudes de onda se selecciona el valor más pequeño de SCERP con el número de factores calculados.

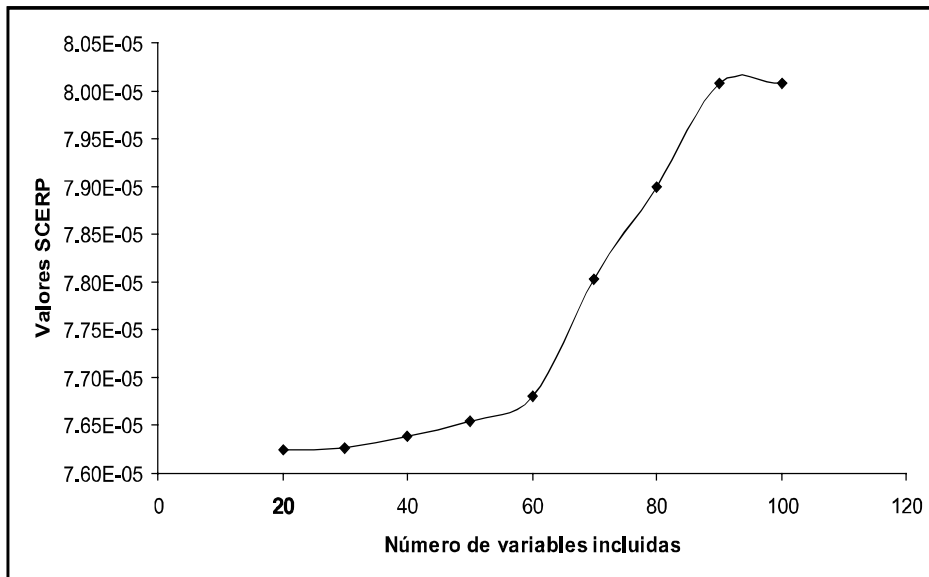


Figura 1.6. Gráfico del valor de SCERP contra el número de variables incluidas en la calibración. El valor del SCERP se debe estimar con el número de factores óptimo.

1.5.4. Calibración

Para la construcción de un buen modelo de predicción se debe realizar un diseño de las muestras o conjuntos de soluciones que conformaran la calibración. Por ello hay que tomar en cuenta los siguientes puntos:

- ⇒ Deberá haber por lo menos tantas muestras como componentes de interés. Preferentemente mucho más muestras que la cantidad de componentes de interés.
- ⇒ Las disoluciones o sistemas deberán cubrir todo el intervalo de concentraciones del analito de interés esperadas para la muestra problema y deben estar poco correlacionadas entre sí.
- ⇒ Las concentraciones de los componentes de la mezcla deben corresponder a la proporción en la que se encuentran en la muestra problema.

Una ayuda para determinar el número correcto de muestras incluidas en la calibración, es elaborar un gráfico de los valores de SCERP contra el número de muestras incluidas en la calibración. ⁽²⁾

Previamente con los datos “estandarizados” de cada calibración propuesta, realizar el algoritmo de calibración de MCP y obtener el número de factor óptimo, así obtener el valor de SCERP para cada una y graficarlo.

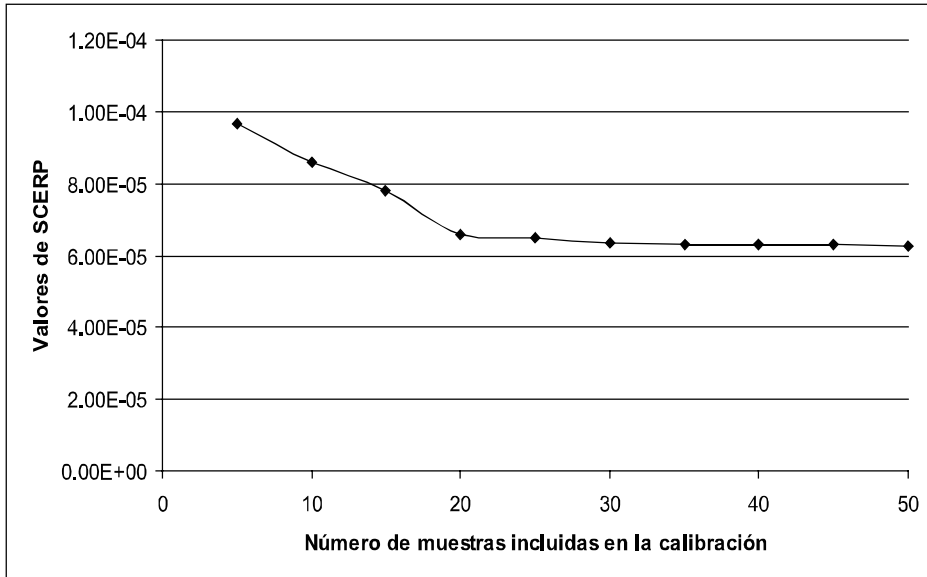


Figura 1.7. Gráfico del valor de SCERP contra el número de muestras incluidas en la calibración. El valor del SCERP se debe estimar cuando el número de factores es el óptimo.

Como se muestra en la Figura 1.7. Cuando aumenta el número de muestras incluidas en la calibración, el valor de SCERP disminuye a un punto donde la diferencia entre los valores es muy pequeña. Para elegir el número de muestras a incluir en la calibración deberá buscarse un equilibrio entre el valor de SCERP mas pequeño y la mínima cantidad de muestras para proporcionar una buena capacidad predictiva al modelo.

Una vez que se determina la cantidad de muestras en la calibración podemos demostrar la capacidad predictiva del modelo realizando un gráfico de la concentración estimada contra la concentración real, en el cual debe existir una relación lineal entre las variables, lo cual indica que no existe problema con el modelo.

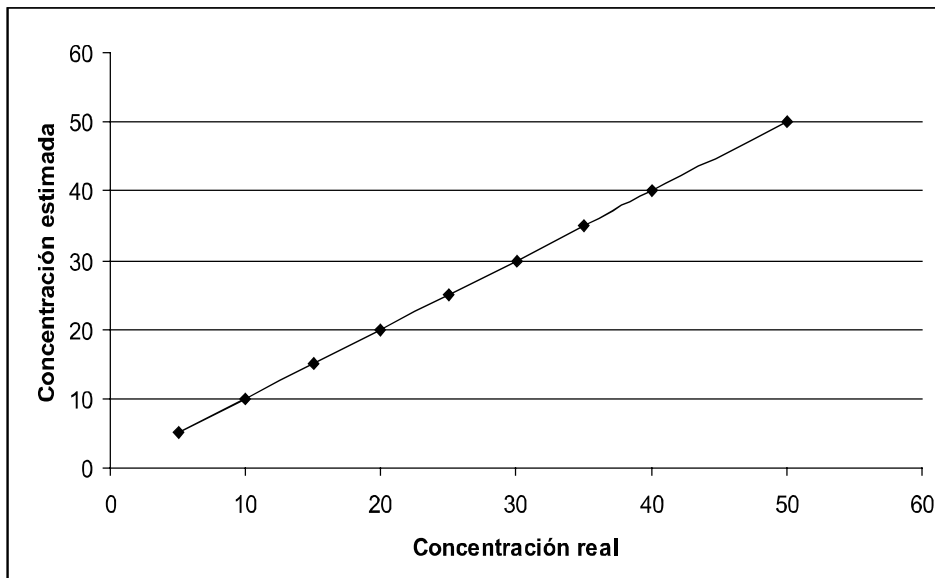


Figura 1.8. Gráfico de concentración estimada contra Concentración real, donde el intercepto = 0 y la pendiente = 1.

1.5.5. Detección de muestras desechables

Debido a que una o varias muestras de la calibración pueden tener un error relacionado a una concentración incorrecta, una mala preparación o manipulación, la detección de muestras desechables juega un papel importante, ya que se si se cuenta con muestras erróneas en la calibración, la predicción lleva a falsos resultados.

La validación cruzada es una herramienta de gran ayuda para la detección de muestras desechables. Se puede determinar el porcentaje de desviación de la concentración estimada con respecto a su concentración real:

$$\frac{(C_{\text{calculada}} - C_{\text{real}})}{C_{\text{real}}} * 100$$

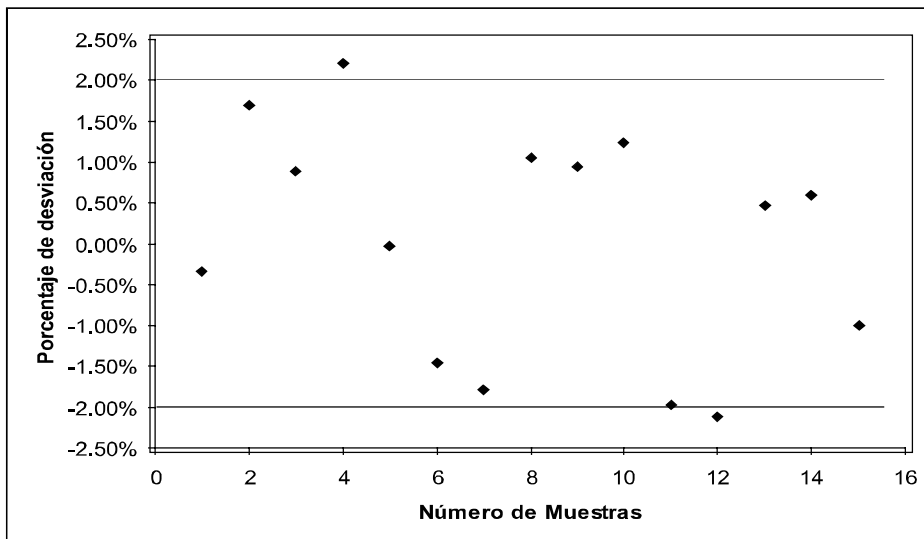


Figura 1.9. Gráfico de porcentaje de desviación de cada muestra de calibración, en donde se estableció un intervalo de error de $\pm 2\%$, por lo que la muestras 4 y 12 serían desechables.

1.6. Simulación de una calibración.

Una herramienta útil para el desarrollo de un modelo de predicción es la simulación de una calibración. Tiene como objetivo obtener información sobre las posibles combinaciones de los niveles de concentración del analito y otros componentes a partir de la información de sus coeficientes de absorptividad y sus concentraciones. Sin embargo como su nombre lo dice, es solo una simulación, por lo que los resultados obtenidos no pueden ser utilizados para la validación de un modelo o un método analítico.

1.6.1. Determinación de Coeficientes de Absortividad

Por medio de los espectros de absorción del componente y la concentración del mismo se obtiene el coeficiente de absorptividad. Despejando la absorptividad de la ley de Beer, queda la siguiente ecuación:

$$a = \frac{A}{bc}$$

En donde (a) es la absorptividad del analito, (A) es la absorbancia obtenida en el espectro de absorción, (b) es la longitud del camino óptico y (c) la concentración del analito en la solución.

1.6.2. Cálculo de las Absorbancias con error

Dentro la etapa de experimentación se pueden presentar variaciones que nos dan cierto grado de error por lo cual es necesario, a todas las absorbancias obtenidas anteriormente, sumarle un porcentaje de error que puede ir del 2 al 5% y con ello determinar si aun sigue siendo eficaz la calibración.

- a) A partir de la siguiente fórmula, calcular un número aleatorio, el cual deberá estar alrededor de 1 (valores positivos o negativos):

$$\# \text{ ALEATORIO} = (\text{ALEATORIO} () - 0.5) * 2$$

- b) Una vez calculado, multiplicar por el porcentaje de error que se desea determinar.

$$(\# \text{ Aleatorio} * \% \text{ Error})$$

- c) El resultado de la operación anterior se multiplica por el valor de absorbancia a las diferentes longitudes de onda.

$$\text{Abs} * (\# \text{ Aleatorio} * \% \text{ Error})$$

- d) Y finalmente se tiene que sumar el error calculado en el paso anterior a los valores de absorbancias totales que integran la calibración

$$\text{Abs} + \text{Error} = \text{Abs} + \text{Abs} (\# \text{ Aleatorio} * \% \text{ Error})$$

1.6.3. Determinación de las Absorbancias Totales

Se calcula la absorbancia de cada principio activo en todas las longitudes de onda propuestas, multiplicando el coeficiente de absorptividad del analito obtenido anteriormente por la concentración del analito propuesta para cada nivel de concentración.

Se realiza el mayor número de combinaciones posibles para llevar a cabo la simulación de la calibración. Cada combinación recibió el nombre de sistema.

Una vez obtenidas las absorbancias para cada analito en cada uno de sus niveles y la composición de todos los sistemas, se lleva a cabo la determinación de absorbancias totales, la cual consiste en sumar la absorbancia de cada analito que conforman el sistema. Teniendo todas las absorbancias totales de cada sistema, se puede aplicar el algoritmo de MCP en sus dos etapas: Calibración y Predicción.

1.7. Validación de Métodos Analíticos ^(2,8)

1.7.1. Linealidad

1.7.1.1. Linealidad del Sistema

La finalidad de determinar la linealidad del sistema, es demostrar que el mismo es capaz de asegurar que las respuestas analíticas, son directamente proporcionales a la concentración del analito de interés, bajo un intervalo comprendido entre los niveles superior e inferior de la concentración del analito.

Para poder determinar la linealidad del sistema se realiza una de calibración con 5 niveles de concentración diferentes, por triplicado, todo ellos a partir de una misma solución patrón, con el mismo número de diluciones y procurando el mismo grado de error en su preparación.

Se evalúa basándose en un grafico, en donde la respuesta analítica esté en función de la concentración del analito, considerando el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de variación (c.v.)

1.7.1.2. Linealidad del Método

Un método se considera lineal cuando asegura que la relación entre la concentración real (ó cantidad adicionada del analito) y la concentración estimada (ó la cantidad recuperada) es directamente proporcional y lineal en un intervalo de diferentes concentraciones que la muestra pueda contenga con una amplia probabilidad.

Se evalúa por medio de la preparación de 5 muestras de placebo cargado, cada una de diferente concentración del analito de interés y con ensayos por triplicado.

El efecto de proporción se evalúa bajo los parámetros del coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la ordenada al origen (b), el coeficiente de variación (c.v.) y la pendiente (m).

1.7.2. Exactitud

Definida generalmente como el porcentaje de recobro, la exactitud es el grado de concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Aquí se mide el error sistemático o la tendencia hacia él a diferencia de la precisión que se encarga del error aleatorio.

Este parámetro se evalúa determinando la concentración de tres muestras de diferentes concentraciones del analito de interés, las cuales son sometidas al ensayo por sextuplicado.

1.7.3. Precisión

Se encarga de medir el error aleatorio de un análisis, el cual se puede expresar como coeficiente de variación.

Este parámetro debe ser estimado tanto para el sistema, así como para el método, aunque la forma de determinarlo es diferente para cada uno, ya que para el sistema se evalúa realizando la determinación de la concentración del analito de interés presente en una mezcla, en tres diferentes soluciones, mientras que para el método se debe determinar la concertación del analito de interés presente en tres diferentes muestras de placebos cargados, en ambos casos con seis ensayos cada una.

1.7.4. Repetibilidad entre días y Reproducibilidad.

Estos dos parámetros nos permiten evaluar la precisión de un método bajo ciertas condiciones.

La repetibilidad entre días, nos permite evaluar la precisión del método bajo las mismas condiciones de análisis (analista, instrumentos, laboratorio, etc.) pero en días diferentes. Mientras que la reproducibilidad, evalúa la precisión del método modificando las condiciones del análisis (diferentes analistas, instrumentos, laboratorios, etc.).

Para determinarlas debe analizarse una muestra homogénea del producto, mínimo por triplicado, dos analistas y dos días, para probar cada condición, evaluando el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método.

1.8. Características de la Difenhidramina ^(5,9,17,13,18,19)

1.8.1. Propiedades

Nombre:

2-Diphenylmethoxy-N,N-dimethylethanamine

2-(benzhydryloxy)-N,N-dimethylethylamine;

β -dimethylaminoethyl benzhydryl ether;

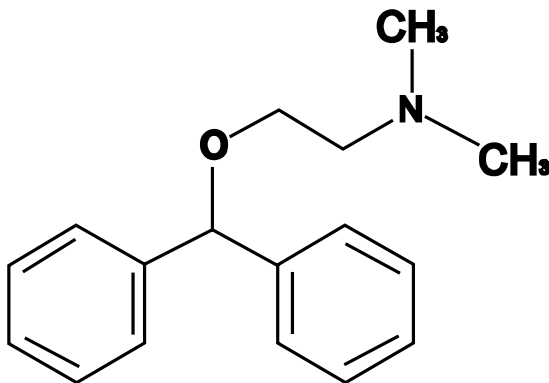
O- benzhydryldimethylaminoethanol;

β -dimethylaminoethanol diphenylmethyl ether;

α -(2-dimethylaminoethoxy)diphenylmethane;

benzhydramine.

Estructura química:



⇒ (C₁₇H₂₁NO)

⇒ Peso molecular = 254.4

⇒ Consta de dos anillos arilo fijos al extremo de una cadena de tres átomos, con un grupo de dimetilamina en el otro extremo.

⇒ Difenhidramina es un isómero de la Feniltoloxamina

En preparaciones farmacéuticas se encuentra como Clorhidrato de Difenhidramina, el cual tiene las siguientes propiedades:

- ⇒ (C₁₇H₂₁NO•HCl)
- ⇒ Peso molecular = 291.8
- ⇒ Polvo cristalino blanco, se obscurece con la exposición de la luz,
- ⇒ Estable bajo condiciones ordinarias
- ⇒ Solubilidad: es alta en agua, poco soluble en etanol y cloroformo; prácticamente insoluble en éter.
- ⇒ Rango de fusión = 167-172°C
- ⇒ pKa es de 9.0 (25°C)

1.8.2. Indicaciones terapéuticas

La Difenhidramina es un potente agente antihistamínico de primera generación, de la clase de las etanolaminas, el cual tiene una alta afinidad por los receptores de histamina H1, sin embargo se ha demostrado que la Difenhidramina tiene efectos anticolinérgicos debido a su afinidad con los receptores muscarínicos así como un marcado efecto sedativo, probablemente debido a la afinación del receptor central de histamina H1, proporcionando otras acciones farmacológicas con utilización terapéutica o con consecuencias adversas.

Puede ser utilizado por vía intramuscular o intravenosa en alergias severas Usualmente es administrado de forma oral en preparaciones de tabletas, cápsulas o jarabe.

La Difenhidramina ejerce una actividad antitusiva importante, por lo que el jarabe de Difenhidramina es utilizado para el control de la tos provocada por resfríos o alergias. La solución oral de clorhidrato de Difenhidramina contiene no menos de 90% y no más de 110 % de la cantidad declarada en la etiqueta.

1.8.3. Farmacocinética y Farmacodinamia

La Difenhidramina se absorbe adecuadamente en las vías gastrointestinales, alcanza su concentración plasmática máxima en dos horas. El fármaco se distribuye ampliamente en todo el organismo incluyendo el SNC. De 80 a 85 % se encuentra unido a proteínas del plasma y su vida media de eliminación es de 2.4 y 9.3 horas.

Su estructura básica contiene una porción semejante a la estructura esencial de la propia histamina (una etilamina), por lo que compite por los sitios de histamina en las células blanco, es decir, es un bloqueador competitivo de histamina.

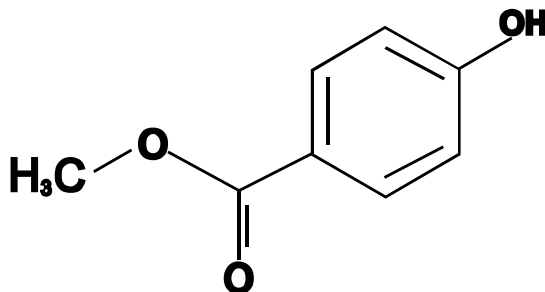
1.8.4. Reacciones adversas ⁽⁶⁾

La principal reacción adversa que se observa es la acción que presenta en el SNC y al bloqueo colinérgico, sin embargo con un uso continuado se presenta cierto grado de tolerancia a la acción sedante. A continuación se mencionan otras probables reacciones adversas cuando se administra Difenhidramina:

- ⇒ En el Sistema nervioso puede provocar: Somnolencia, vértigo, debilidad, visión borrosa.
- ⇒ En el aparato cardiovascular: taquicardia, hipertensión o hipotensión.
- ⇒ En el aparato digestivo: náuseas, vómito, pérdida de apetito.
- ⇒ La acción anticolinérgica produce sequedad en la boca, nariz y garganta.

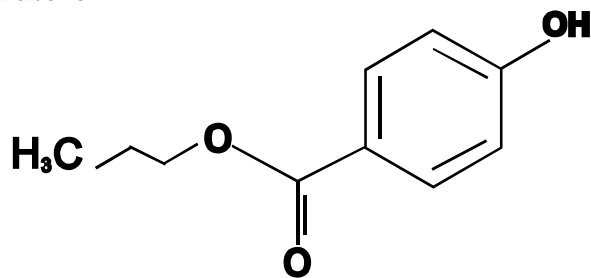
1.9. Características de los parabenos ⁽⁵⁾

1.9.1. Metilparabeno



4-Hidroxibenzoato de metilo

- ⇒ $C_8H_8O_3$
- ⇒ Cristales incoloros o polvo blando cristalino.
- ⇒ Solubilidad; Fácilmente soluble en etanol y metanol, soluble en agua en ebullición, ligeramente soluble en agua.

1.9.2. Propilparabeno

4-Hidroxibenzoato de propilo

⇒ $C_{10}H_{12}O_3$

⇒ Cristales incoloros o polvo blanco cristalino.

⇒ Solubilidad: Muy soluble en metanol, alcohol, alcohol anhidro, acetona y éter dietílico; ligeramente soluble en agua en ebullición; muy ligeramente soluble en agua.

2

Desarrollo del método análítico

2.1. Reactivos, Equipos y Software

Materiales:

- ⇒ Matracas Volumétricos de 25 ml
- ⇒ Matracas Volumétricos de 50 ml
- ⇒ Matracas Volumétricos de 100 ml
- ⇒ Matracas Volumétricos de 1000 ml
- ⇒ Vasos de precipitado de 50 ml
- ⇒ Vasos de precipitado de 100 ml
- ⇒ Vasos de precipitado de 250 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 1 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 2 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 3 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 5 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 6 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 7 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 8 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 9 ml
- ⇒ Pipetas Volumétricas de 10 ml
- ⇒ Agitadores de Vidrio
- ⇒ Perillas
- ⇒ Celdas Espectrofométricas

Equipo:

- ⇒ Espectrofotómetro UV-VIS Cary 100
- ⇒ Balanza Analítica Mettlet Toledo Modelo PB 303-S

Reactivos:

- ⇒ Estándar de Clorhidrato de Difenhidramina
- ⇒ Estándar de Metilparabeno
- ⇒ Estándar de Propilparabeno
- ⇒ Solución placebo de Jarabe de Clorhidrato de Difenhidramina.

Software:

Se utilizaron los programas "Cary Simple Reads" y "Cary Scan" para la recolección de datos, mientras que el tratamiento de los datos por el algoritmo de MCP, se llevó a cabo por medio del programa ISHEJA INC, versión 1.0.0 soportado en ambiente Windows XP, (el cual usa el algoritmo NIPALS para MCP establecido por Haaland) y en programa de Excel de la paquetería de Microsoft Excel.

2.2. Desarrollo y validación del modelo.

2.2.1. Elaboración de Espectros de Absorción.

Con información previa se realizaron pruebas de solubilidad a nuestro analito, Clorhidrato de Difenhidramina en agua, ácido clorhídrico (0.1N), hidróxido de sodio (0.1N) y el Solución amortiguadora de fosfatos (0.1M) a diferentes pH.^(15,12,7)

Se elaboró el espectro de absorción, en los medios antes mencionados, recolectado en el Programa "Cary Scan" con un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm, obteniendo una mejor respuesta en un intervalo de 200 a 280 nm. (Figura 2.1)

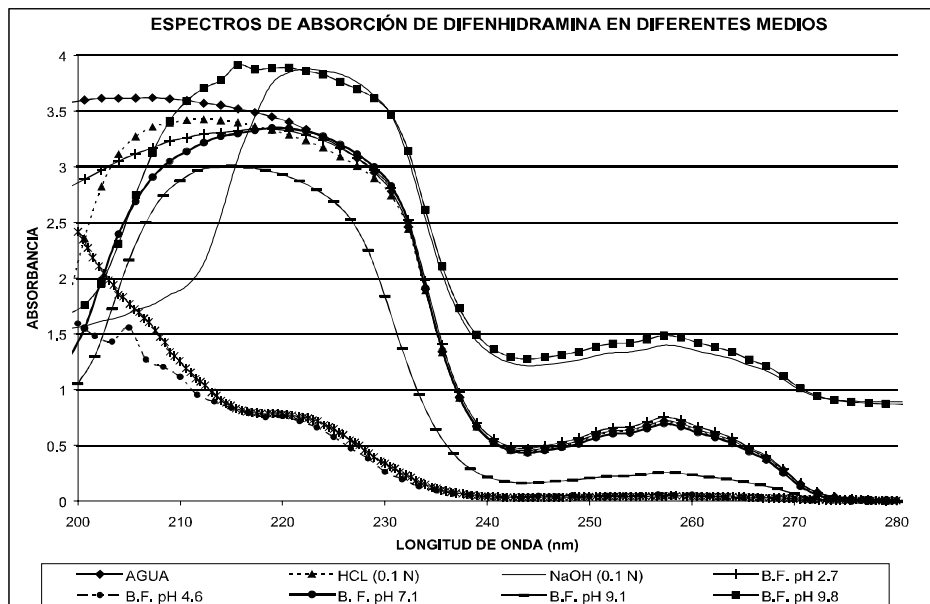


Figura 2.1. Espectro UV de DFH en diferentes medios (Agua, HCl (0.1N), NaOH (0.1 N), Solución amortiguadora de fosfatos pH 2.7, 4.6, 7.1, 9.1 y 9.8)

En algunas ocasiones, la interacción del analito con los demás componentes de la muestra en la que se encuentra (matriz analítica) produce una exaltación o una inhibición de la sensibilidad de detección, a lo anterior se le conoce como efecto matriz. ⁽¹¹⁾

Por lo anterior se llevó a cabo la evaluación del efecto matriz de la muestra analítica por medio de la obtención de los coeficientes de absorptividad del Clorhidrato de Difenhidramina en cuatro distintas muestras.

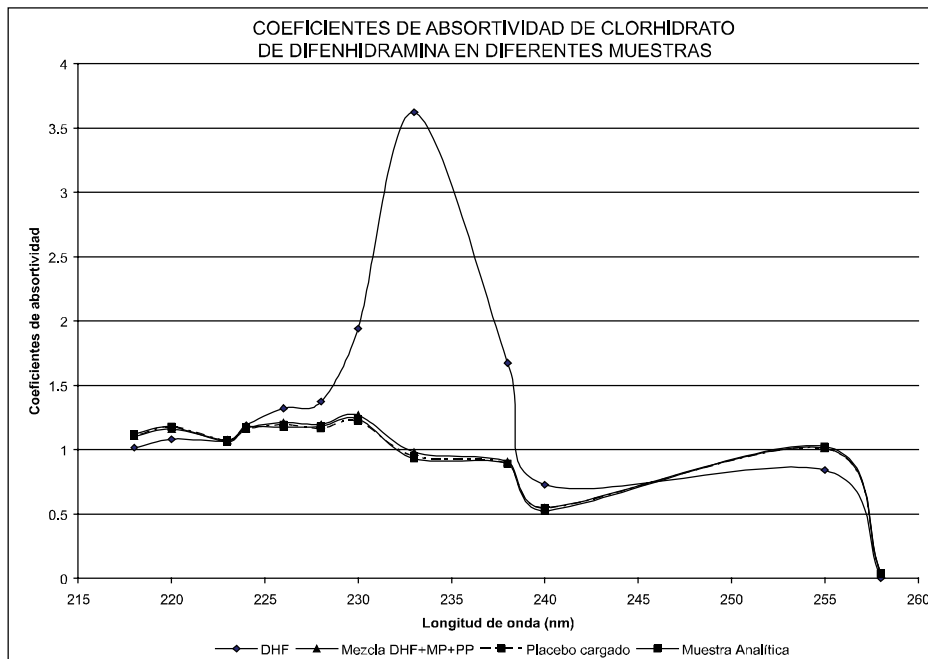


Figura 2.2. Gráfico de Coeficientes de Absortividad de Clorhidrato de Difenhidramina contra Longitud de onda (nm).

Como se puede apreciar en la Figura 2.2, los Coeficientes de Absortividad del Clorhidrato de Difenhidramina son iguales cuando se encuentran presentes dos de los excipientes del Jarabe, Metilparabeno y Propilparabeno, tanto en la mezcla, el placebo cargado y la muestra analítica, mientras que se observa un cambio de los coeficientes de absorptividad cuando solo se encuentra el Clorhidrato de Difenhidramina presente en la ensayo, esto demuestra que existe una interacción del analito con el entorno.

Por lo anterior se decidió incluir a los parabenos en la estructuración de la calibración, preparando una serie de estándares imitando la composición de la muestra (calibración externa), para ello se realizaron pruebas de solubilidad de los parabenos en diferentes medios, así como la realización de los espectros de cada uno

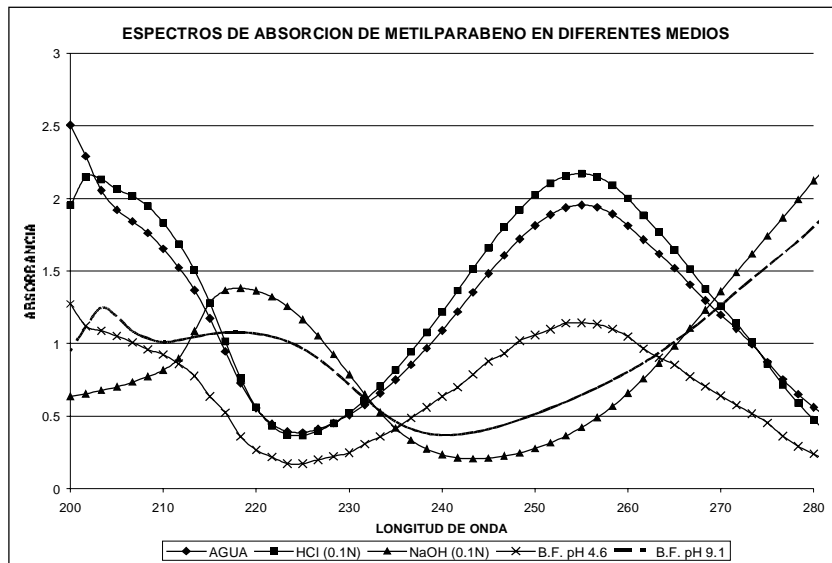


Figura 2.3. Espectro UV de MP en diferentes medios (Agua, HCl (0.1N), NaOH (0.1 N), Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.6 y pH 9.1)

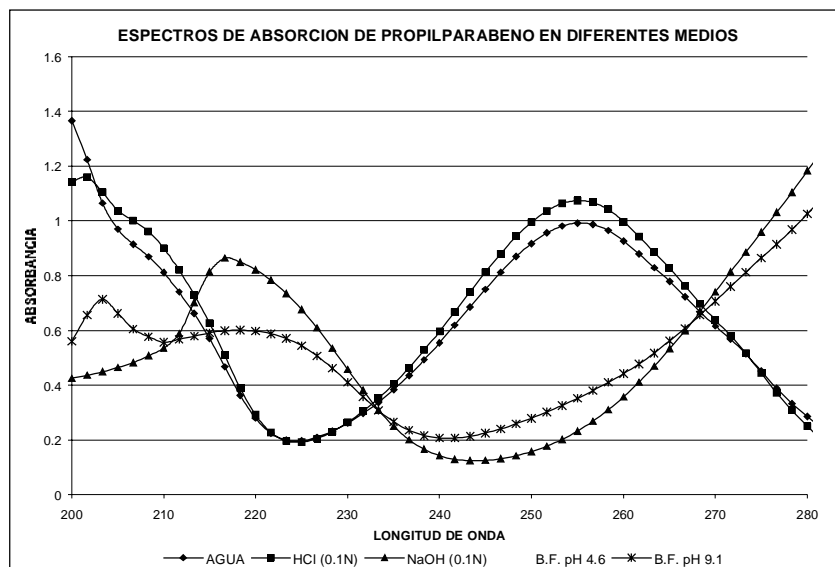


Figura 2.4. Espectro UV de PP en diferentes medios (Agua, HCl (0.1N), NaOH (0.1 N), Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.6 y pH 9.1)

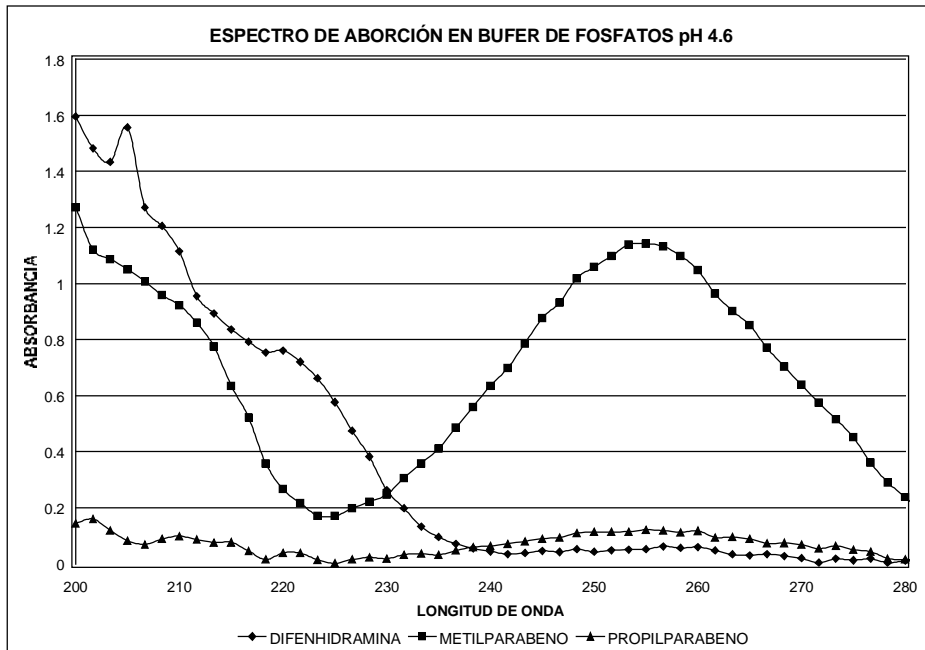


Figura 2.5. Espectro UV de DFH, MP Y PP en Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.6.

Se estableció como medio de trabajo adecuado para la cuatificación de Clorhidrato de Difenhidramina a la solución amortiguadora de fosfatos pH 4.6.

2.2.2. Aditividad, Interacción e Interferencia

Dentro de las ventajas que ofrece el Método de Mínimos Cuadrados es que puede corregir las interferencias químicas o físicas matemáticamente, siempre y cuando exista una relación lineal entre el analito y la propiedad a medir y exista aditividad entre los analitos de interés.

Para determinar si existe aditividad entre el espectro obtenido por la mezcla de DFH-MP-PP, se comparó este espectro con el de la suma algebraica de los espectros individuales de cada uno.

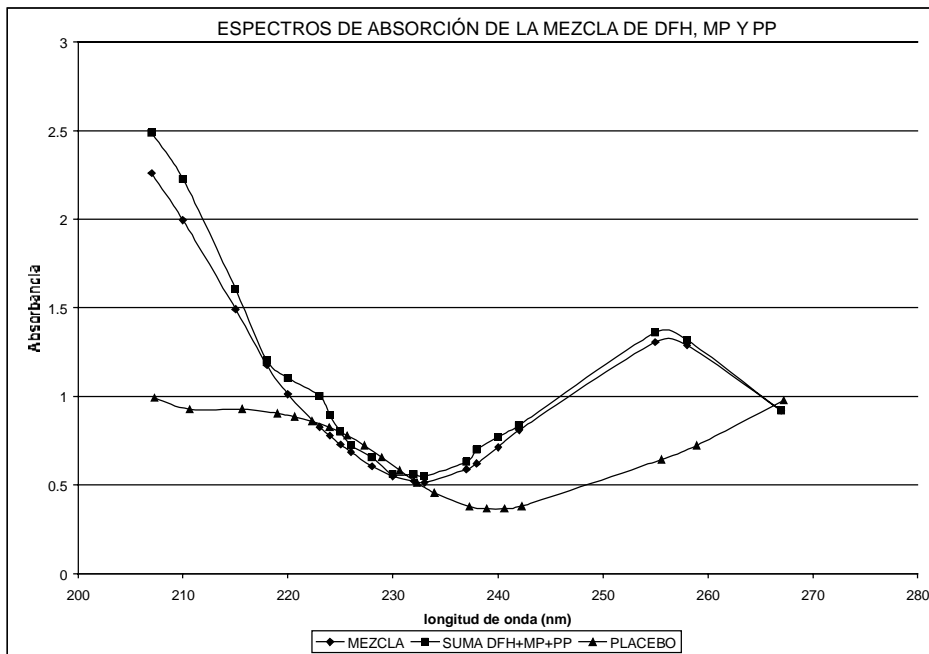


Figura 2.6. Espectros obtenidos de la mezcla de DFH, MP y PP (18.75-12.0 y 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente), la suma de los espectros individuales de cada componente y una solución placebo en intervalo de 200-270 nm en Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Se puede apreciar en la Figura 2.6 que la suma de los espectros de DFH –MP y PP es similar al espectro de la mezcla de componentes a lo largo de la región espectral de 200 a 270 nm, con lo que se comprueba la aditividad entre los espectros.

También se puede observar que los espectros de absorción de la mezcla y la suma de Difenhidramina y parabenos no se superponen, por lo que se puede afirmar un fenómeno de interacción. En el caso del placebo, se muestra que registra valores de absorbancia mayores a cero, incluso interactúa con las bandas de los componentes, sin embargo al evaluar el efecto matriz, por medio de la cuantificación de Clorhidrato de Difenhidramina, en muestras de concentración conocida en presencia del placebo, se determinó que ningún otro excipiente interfiere en la cuantificación del analito.

2.2.3. Selección de longitudes de onda

En el método de MPC, se puede utilizar toda la región espectral para la cuantificación de Difenhidramina, aún estando presentes los parabenos en la mezcla. Sin embargo al contar con tres componentes en nuestra solución, las probabilidades de obtener ruido espectral o información no relevante aumentan, disminuyendo la capacidad predictiva de nuestro modelo.

Con el fin de determinar las longitudes de onda adecuadas, se preparó una calibración de 15 mezclas de concentraciones conocidas de Difenhidramina, Metilparabeno y Propilparabeno, las cuales se leyeron a 49 longitudes de onda en un intervalo de 200 a 280 nm.

Con los datos estandarizados se determinó el número de óptimo de factores y se realizó el gráfico de los valores de SCERP contra el número de factores. (Figura 2.7)

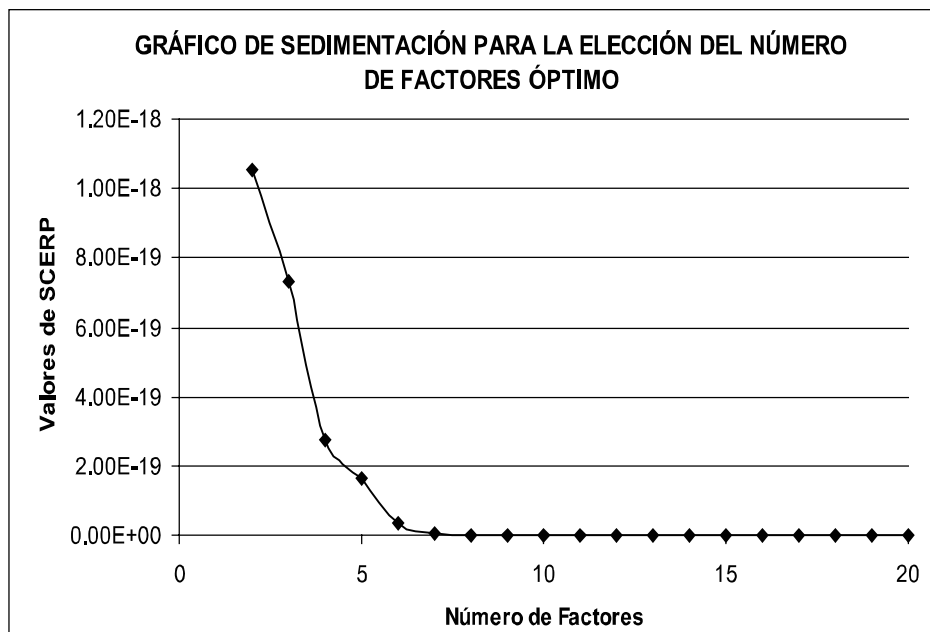


Figura 2.7. Gráfico de sedimentación en donde se muestra como número de factor óptimo el 6.

El número óptimo de factores para determinar las longitudes de onda del modelo de calibración fue de 6, con un valor de SCERP de $3.29E-20$. A continuación se realizó el gráfico de Coeficiente de Regresión lineal (k_w) contra longitudes de onda, con el fin de determinar que longitudes de onda podían ser eliminadas del modelo.

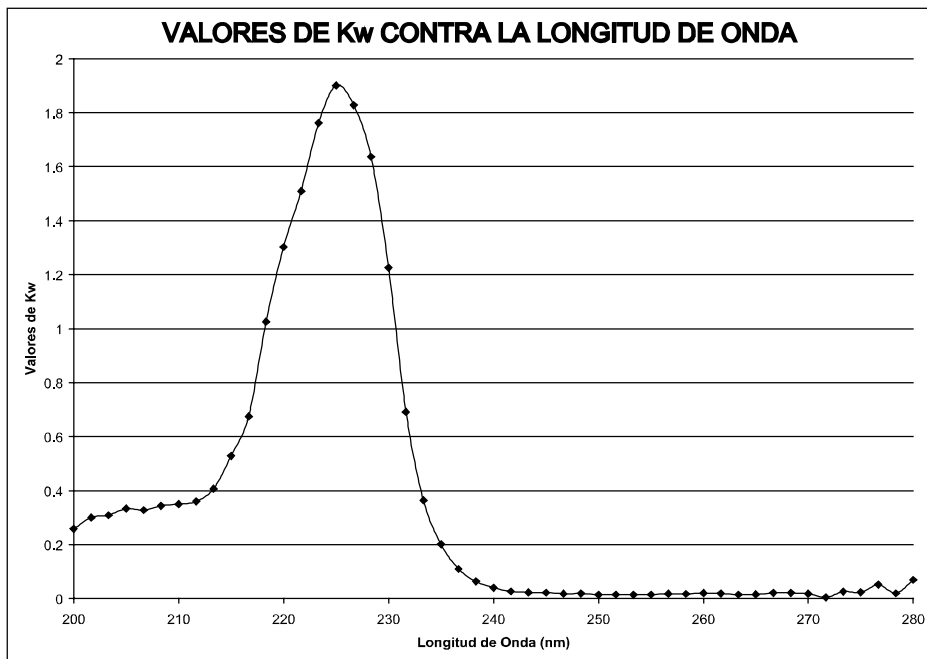


Figura 2.8. Gráfico del valor k_w contra la longitud de onda

Como se observa en la Figura 2.8. no se presentan valores negativos en los valores de k_w , sin embargo en el intervalo de 240-280 nm presenta valores muy pequeños. Esto es lógico debido a que como se observó en el espectro de absorción de la Difenhidramina, la absorbancia es muy pequeña en este intervalo del espectro.

Por lo anterior se decidió eliminar la mayor parte de longitudes de onda comprendidas en este intervalo, sin embargo se consideraron algunas longitudes de onda debido a que se presenta un pico de absorción de Metilparabeno, así como puntos de intersección en la bandas de los componentes, los cuales proporcionan información al modelo.

Se realizó una elección de 20 y 25 longitudes de onda y se volvió a realizar el gráfico de los valores de SCERP contra el número de factores, los cuales se compararon entre sí para determinar si la elección de variables propuesta proporciona una mejor capacidad predictiva al modelo.

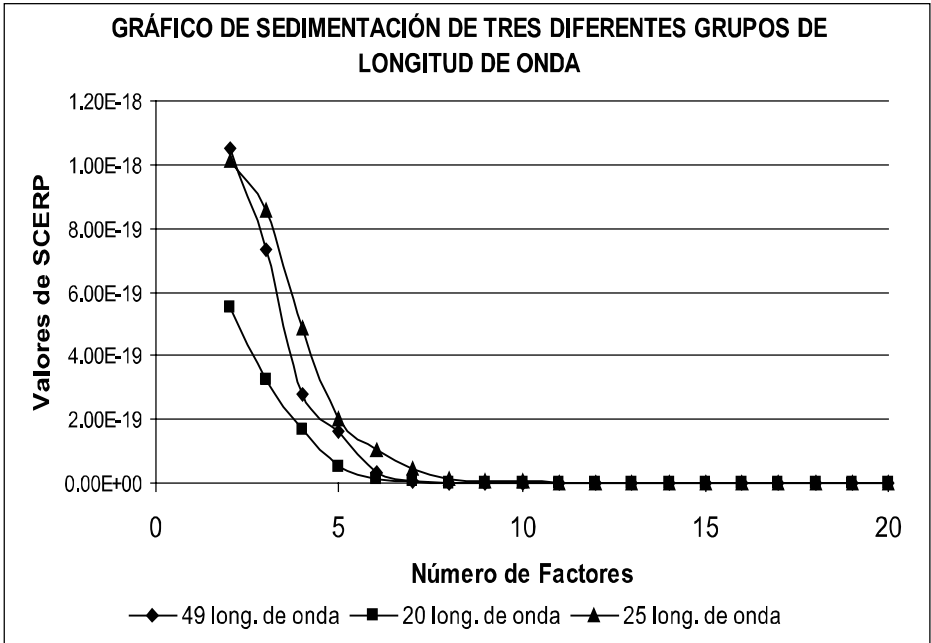


Figura 2.9. Gráfico del valor SCERP contra el número de factores, eligiendo 49, 20 o 25 longitudes de onda.

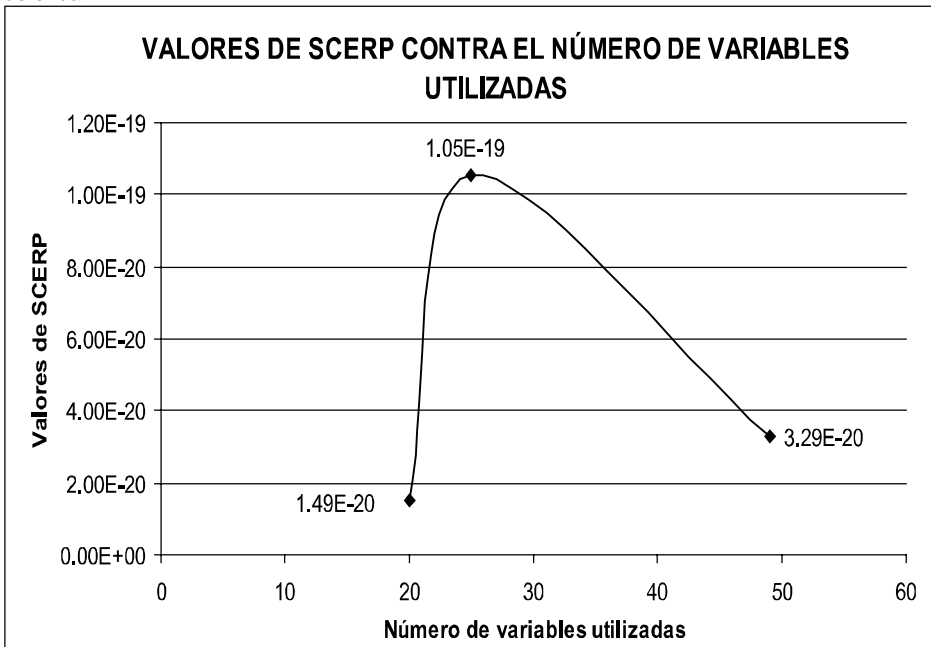


Figura 2.10. Gráfico del valor de SCERP contra el número de variables incluidas en el modelo. El número de factores calculado fue de 6.

Se observa en la Figura 2.9. que el número óptimo de factores para la cantidad de variables 20 y 49 son muy similares, sin embargo como lo muestra el gráfico de la Figura 2.10 el valor de SCERP es menor para la variable de 20 longitudes de onda. Debido a que la variable de 49 longitudes de onda contiene información de ruido espectral o información que no contribuye a la capacidad predictiva del modelo.

Por lo anterior las longitudes de onda que se seleccionaron son: 267, 258, 255, 242, 240, 238, 237, 233, 232, 230, 228, 226, 225, 224, 223, 220, 218, 215, 210, 207 las cuales presentaron una buena capacidad predictiva para el modelo MCP.

2.2.4. Selección del Número óptimo de Factores: Análisis de SCERP

Para poder determinar el número de factores óptimo que debe incluirse en el modelo de calibración se construyó una calibración con 15 diferentes mezclas, en las cuales se presentaban en diferentes concentraciones los tres componentes de la mezcla.

Se aplicó el algoritmo de MCP a la matriz de la calibración y se realizó el gráfico del valor de SCERP contra el número de factores.

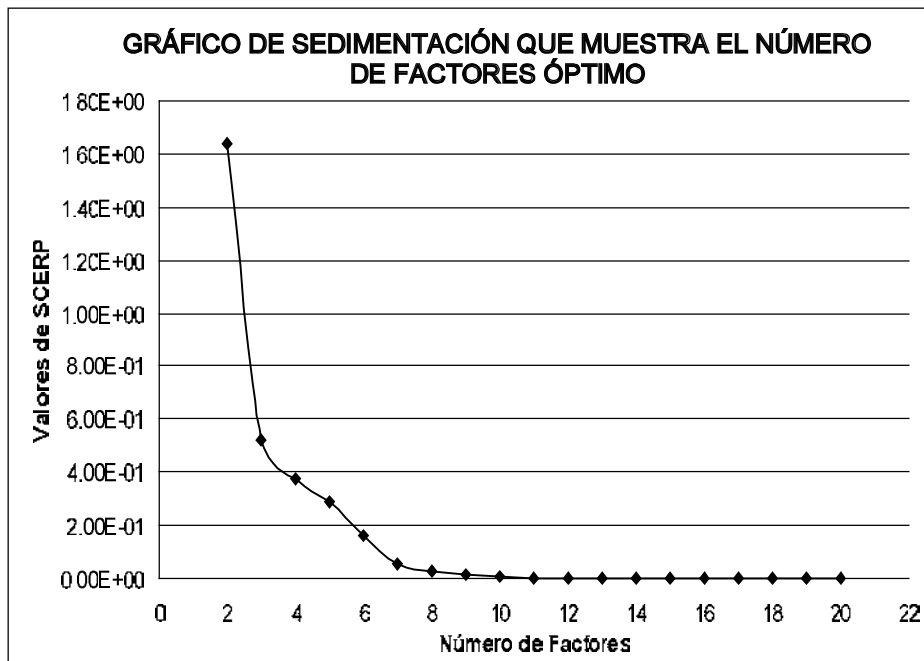


Figura 2.11. Gráfico de sedimentación en donde se muestra que el número de factor óptimo es 7, debido a la caída brusca que presenta. En este gráfico se eliminó el factor 1 para poder observar las caídas.

Como se puede observar Figura 2.11 el número de Factor óptimo es el 7, debido a que se presenta una caída brusca. Para confirmar el factor elegido se realizó el grafico de cocientes de autovalores sucesivos. El cual nos indica que el factor óptimo es 13.

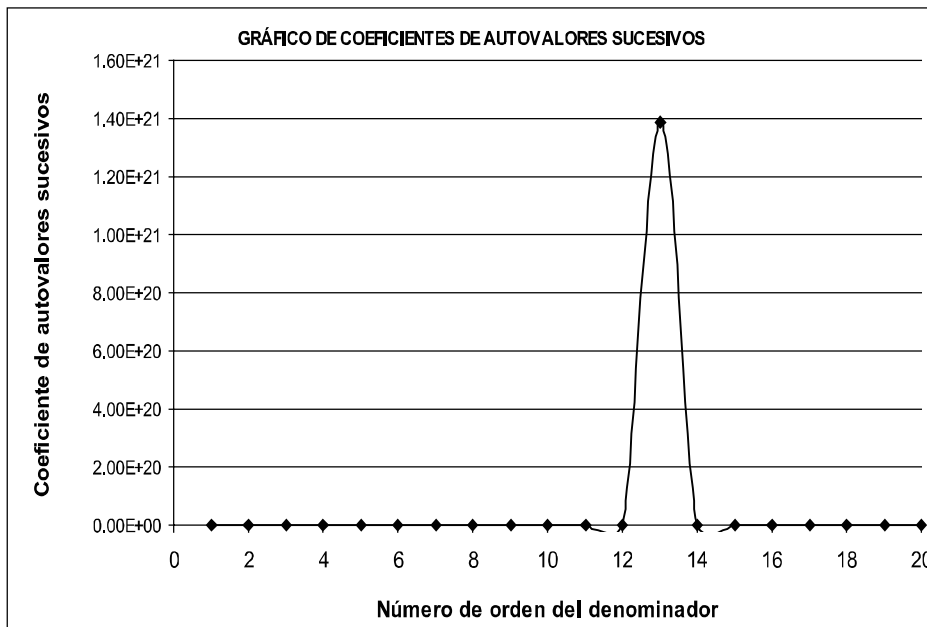


Figura 2.12. Gráfico de cocientes de autovalores sucesivos contra el número de orden del denominador, en donde muestra que el número de factor óptimo es 13 debido a que es el único pico presente.

Debido a que se contaba con dos números de factores propuestos, se compararon los valores de regresión obtenidos empleando un valor 7 y un factor 13.

Tabla 2.1. Comparación de valores de regresión de los factores 7 y 13

	Número de Factores	
	7	13
Valor SCERP	5.54E-02	2.37E-06
Promedio	1.0000	1.0000
Desvest	0.0027	0.00001
C.V.	0.2728	0.00126
Intercepto	0.0038	0.00000
Pendiente	0.9999	1.00000
r	0.9999	1.00000

Como se puede ver en la tabla 2.1 los valores de regresión son óptimos con el factor 13. Aun así, se realizó la prueba F para poder elegir el número de factores que serán incluidos en el modelo sin perder confiabilidad en ensayos posteriores.

Tabla 2.2. Resultados de la F calculada para los factores 7 y 13.

F calculada	F crítica
9.7260E-11	4.08

La tabla 2.2. muestra que el valor de F calculada es menor al valor de F crítica, lo que indica que no existe diferencia estadística entre los datos obtenidos cuando se utiliza un factor de 7 que cuando se utiliza un factor de 13.

Sin embargo se eligió como número de factores óptimo al factor 13 debido a que como se muestra en el gráfico de cocientes de autovalores, presenta el único pico que indica un cambio brusco en la pendiente del gráfico de sedimentación y por el hecho de que su valores de regresión son mejores que los del factor 7.

Una vez que se eligió el número de factor óptimo, se revisó que no existieran muestras que tuvieran un porcentaje de desviación mayor a 2%, lo cual pudiera ocasionar resultados erróneos. Se llevó a acabo por medio del programa ISHEJA (outliers), para determinar si eran retiradas del modelo por una posible mala preparación.

Tabla 2.3. Outliers para determinar el porcentaje de desviación en las muestras.

OUTLIERS	DFH
CONC. 1	1.35%
CONC. 2	1.99%
CONC. 3	-2.00%
CONC. 4	-0.26%
CONC. 5	0.65%
CONC. 6	-0.86%
CONC. 7	-0.53%
CONC. 8	-0.77%
CONC. 9	0.75%
CONC. 10	-0.85%
CONC. 11	1.82%
CONC. 12	-1.66%
CONC. 13	0.73%
CONC. 14	1.08%
CONC. 15	-1.61%

Como se puede observar en la tabla anterior, los porcentajes de desviación son menores al 2.0 % por lo que no fue necesario retirar ninguna muestra del modelo de calibración.

2.2.5. Determinación de las Concentraciones para formar la Calibración

Se tomó en cuenta el contenido químico del activo presente en la muestra, para llevar a cabo las diluciones necesarias de la misma, con el fin de obtener lecturas confiables de absorbancia por parte del espectrofotómetro.

Al preparar las soluciones stock se debe considerar los siguientes puntos:

- ⇒ Escoger una concentración, con la cual se puedan elaborar distintos sistemas por medio de alícuotas de diferente volumen.
- ⇒ Utilizar el menor número de diluciones posibles ya que así evitamos una mayor variación.
- ⇒ Tomar en cuenta la pureza de las soluciones estándar al realizar los cálculos de concentración
- ⇒ Pesarse la cantidad del estándar lo más exacto posible.

En base a la FEUM, la cual indica que el contenido químico del clorhidrato de Difenhidramina es de 90-110 % de lo que indica el marbete, se eligieron cinco niveles de concentración de Difenhidramina y tres de cada uno de los parabenos, tomando en cuenta la concentración de cada analito en la muestra como el 100%. Abarcando de 75 a 125 % del contenido químico de clorhidrato de Difenhidramina en el jarabe. (Anexo 3, Tabla 3.1)

Con ello se realizaron el mayor número de combinaciones posibles arrojando un número de 45 sistemas, con los cuales se realizó una calibración para determinar cuáles eran los sistemas que proporcionarían la mayor capacidad predictiva al modelo, así como eficiencia al mismo. (Anexo 3 Tabla 3.2)

Utilizando la validación cruzada, se realizó el gráfico de concentración estimada contra concentración real (Figura 2.13) En donde se presenta que los 15 sistemas seleccionados presentan una buena capacidad predictiva, por lo que conformarán la matriz de calibración. (Anexo 3 Tabla 3.3.)

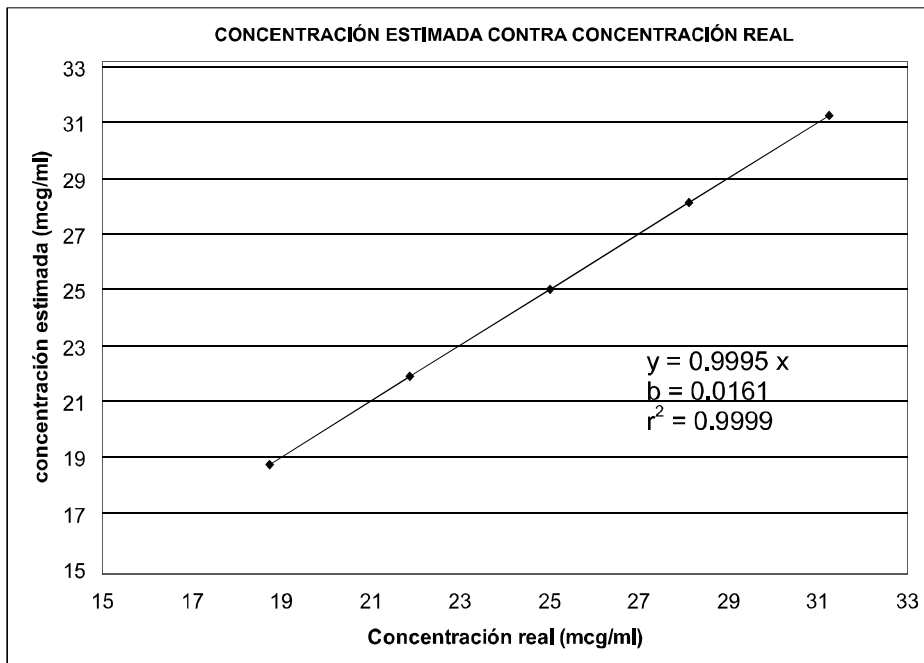


Figura 2.13. Gráfico de concentración estimada contra concentración real de DFH.

2.3. Condiciones finales del Análisis

2.3.1. Ensayo analítico

- Tomar una alícuota de 1 ml de la sol de jarabe de Clorhidrato de Difenhidramina y colocarla en un matraz de 100 ml
- Llevar a volumen de aforo Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6

2.3.2. Calibración

2.3.2.1. Preparación de soluciones

- ⇒ Etiquetar cada uno de los matraces necesarios para la calibración
- ⇒ Tomar la alícuota de solución stock correspondiente a cada sistema y colocarla en el respectivo matraz volumétrico.
- ⇒ Llevar a volumen de aforo todos los sistemas con el medio de disolución establecido
- ⇒ Agitar cada uno de los sistemas

2.3.2.1.1. Soluciones Stock

Preparación de NaOH (0.1 N)

1. Pesar 200 mg de NaOH (perlas) en un vaso de precipitado de 50 ml
2. Agregar 25 ml de Agua destilada y disolver
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar al volumen de aforo con Agua destilada

A) Clorhidrato de Difenhidramina STOCK (78 mg /ml)

1. Pesar 15.6 mg de Clorhidrato de difenhidramina en un vaso de precipitado de 50 ml.
2. Agregar 20 ml de Agua destilada y disolver.
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 200 ml y llevar al volumen de aforo con Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6

B) Metilparabeno STOCK (75 mg /ml)

1. Pesar 18.75 mg en un vaso de precipitado de 50 ml
2. Agregar 5 ml de la solución de NaOH (0.1) y disolver
3. Transferir a un matraz volumétrico de 25 ml
4. Llevar al volumen de aforo con agua destilada
5. Tomar una alícuota de 5 ml y transferir a un matraz de 50 ml
6. Llevar a volumen de aforo con Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6

C) Propilparabeno STOCK (5 mg /ml)

1. Pesar 12.5 mg en un vaso de precipitado de 50 ml
2. Agregar 5 ml de la solución de NaOH (0.1) y disolver
3. Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml
4. Llevar al volumen de aforo con agua destilada
5. Tomar una alícuota de 2 ml y transferir a un matraz de 100 ml
6. Llevar a volumen de aforo con Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6

2.3.2.1.2. Preparación de sistemas

Sistema 1.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 2.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 3 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 3.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 4.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 7 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 5.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 7 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 3 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 6.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 7 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 7.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 8 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 8.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 8 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 3 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a al marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 9.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 8 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a al marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 10.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 9 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 11.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 9 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 3 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 12.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 9 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 13.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 10 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 14.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 10 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml,.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 3 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Sistema 15.

- a) Tomar con una pipeta volumétrica, 10 ml de la solución STOCK de Difenhidramina (A) y verter su contenido a un matraz volumétrico de 25 ml.
- b) Tomar con una pipeta volumétrica, 5 ml de la solución STOCK de Metilparabeno (B) verter su contenido en el mismo matraz de 25 ml.
- c) Tomar con una pipeta volumétrica, 6 ml de la solución STOCK de Propilparabeno (C) y verter al mismo matraz de 25 ml.
- d) Llevar a la marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

2.3.3. Condiciones de Lectura y estimación.

Llevar a cabo la lectura de cada sistema y muestra, en el Espectrofotómetro Cary 100, en el programa “Cary simple reads”, de cada uno de los Sistemas.

⇒ Longitudes de ondas : 267, 258, 255, 242, 240, 238, 237, 233, 232, 230, 228, 226, 225, 224, 223, 220, 218, 215, 210, 207

⇒ Línea base: Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6

Estimar la concentración de Clorhidrato de Difenhidramina presente en la muestra utilizando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales.

3

Validación del método analítico

3.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

3.1.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad del sistema se realizó la estimación de 15 diferentes soluciones de mezclas de DFH, MP y PP, las cuales fueron preparadas por duplicado, con cinco concentraciones diferentes de DFH, incluyendo el 100% y tres concentraciones diferentes de cada uno de los parabenos.

En la tabla 3.1 se muestra las respuestas analíticas obtenidas al evaluar la linealidad del sistema

Tabla 3.1. Concentración real de Difenhidramina y respuestas analíticas
(Evaluación de la linealidad del sistema)

Solución	Concentración real de DFH	Respuesta analítica
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
1	18.84	18.7622
2	18.84	18.9468
3	18.84	18.7340
4	18.84	19.0950
5	18.84	18.8896
6	18.84	18.9356
7	21.98	21.9106
8	21.98	22.0129
9	21.98	22.0305
10	21.98	21.7800
11	21.98	22.0006
12	21.98	21.8327
13	25.12	24.8405
14	25.12	25.2038
15	25.12	25.1932
16	25.12	24.9094
17	25.12	24.9716
18	25.12	25.3496
19	28.26	28.4372
20	28.26	28.4870

Solución	Concentración real de DFH	Respuesta analítica
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
21	28.6	28.2831
22	28.6	28.3423
23	28.6	28.0791
24	28.6	28.2638
25	31.4	31.3798
26	31.4	31.2056
27	31.4	31.5334
28	31.4	31.3304
29	31.4	31.3786
30	31.4	31.4811

Posteriormente se realizó el gráfico de concentración real contra la respuesta analítica obtenida para la Difenhidramina (Figura 3.1) y se llevó a cabo el cálculo de regresión lineal (Tabla 3.2.) así como el análisis de varianza (Tabla 3.3) para determinar si existe o no una relación lineal entre la concentración real y la respuesta analítica.

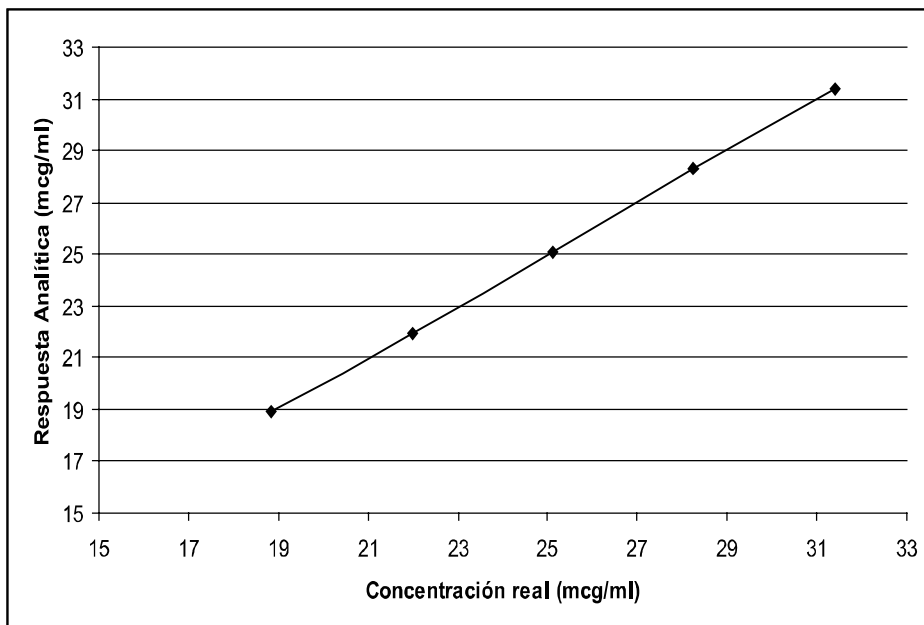


Figura 3.1 Evaluación de la linealidad del sistema

Tabla 3.2. Parámetros de la regresión lineal.

Pendiente (m)	0.9990
Ordenada (b)	0.0244
Coefficiente de Correlación (r)	0.9995
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9990
Intervalo de confianza para (b) al 95%	-0.2836 / 0.3325

Tabla 3.3. Análisis de varianza para determinar la relación lineal entre la concentración real de DFH y su respuesta analítica.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Pormedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	590.425	590.425	28712.623	4.200
Residuos	28	0.576	0.021		
Total	29	591.001			

De acuerdo con el gráfico de concentración real contra la respuesta analítica obtenida y los parámetros de regresión lineal, en donde se obtiene un Coeficiente de determinación de 0.9990 y un valor de ordenada en el origen dentro del intervalo de confianza, así como el análisis de varianza en donde la f calculada es mayor a la f crítica, se determina que existe una relación lineal entre la concentración real y su respuesta analítica obtenida, por lo tanto se puede afirmar que el sistema es lineal.

3.1.2. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA

Mediante la estimación de la concentración de tres diferentes soluciones de DFH, preparadas por sextuplicado, se llevó a cabo la evaluación de la precisión y exactitud del sistema.

En la tabla 3.4. se muestran las concentraciones de cada una de las tres soluciones empleadas, así como los porcentajes determinados por el método de MCP.

Tabla 3.4. Porcentajes determinados obtenidos para la evaluación de la precisión y exactitud del sistema.

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje determinado (%)
21.7	102.360
	98.669
	100.143
	100.003
	100.000
	100.001
24.8	97.988
	100.965
	100.477
	99.998
	100.000
	100.000
27.9	101.225
	100.581
	99.847
	99.998
	100.000
	100.000

Tabla 3.5. Parámetros determinados para evaluar la Precisión del Sistema.

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio (%)	D.E.	C.V.
21.7	100.196	1.194	1.192%
24.8	99.905	1.015	1.016%
27.9	100.275	0.285	0.284%

Tabla 3.6. Resultados Obtenidos para evaluar la exactitud del sistema.

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
21.7	0.4020	2.57
24.8	-0.2300	2.57
27.9	1.2705	2.57

Como se muestra en la tabla 3.5 los valores calculados del C.V. en las tres diferentes concentraciones utilizadas son menores al 2%, lo cual demuestra que el sistema es preciso.

Así mismo, en la Tabla 3.6. se observa que los valores de la t calculada son menores que el valor de t crítica correspondiente, por lo cual se establece que el sistema es exacto en las tres diferentes concentraciones utilizadas para Clorhidrato de Difenhidramina.

3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.2.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para llevar a cabo la evaluación de la linealidad del método, se realizó la estimación de 5 muestras de placebo cargado, las cuales fueron preparadas por triplicado. La preparación de los placebos se describe en el Anexo 4.

La Tabla 3.7. muestra la concentración real de Clorhidrato de Difenhidramina y la concentración estimada de la misma.

Tabla 3.7. Concentraciones estimadas de Clorhidrato de Difenhidramina

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración estimada ($\mu\text{g/ml}$)
18.5	17.027
18.5	17.664
18.5	17.42
21.92	21.093
21.92	21.446
21.92	20.804

Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración estimada ($\mu\text{g/ml}$)
25.12	24.231
25.12	24.846
25.12	24.958
28.24	27.105
28.24	27.980
28.24	28.055
31.52	30.411
31.52	31.569
31.52	31.974

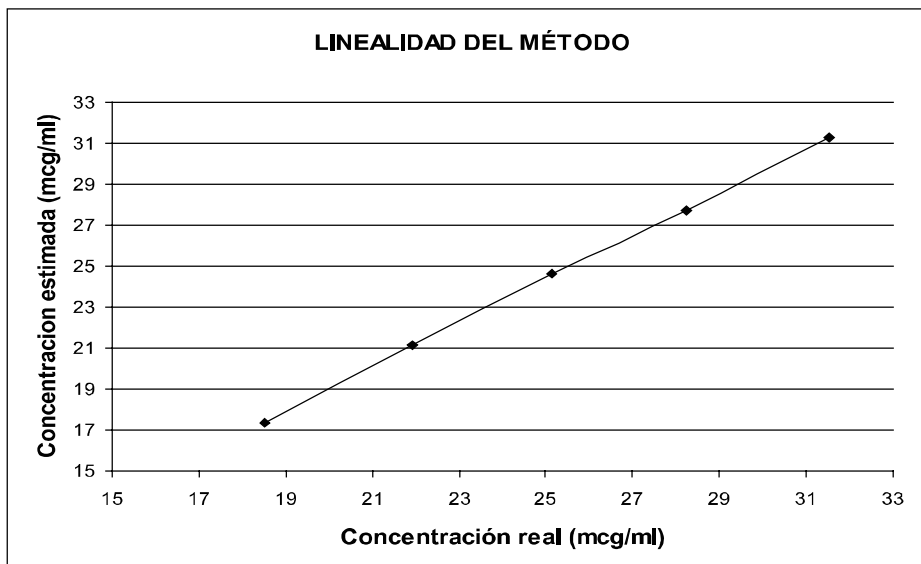


Figura 3.2 Evaluación de la linealidad del método. Gráfico de la concentración real contra la concentración estimada.

Tabla 3.8. Análisis de varianza para determinar la relación lineal entre la concentración real de DFH y su respuesta analítica.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Pormedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	357.205	357.205	1691.755	4.600
Residuos	13	2.745	0.211		
Total	14	359.950			

Tabla 3.9. Parámetros de evaluación y criterios de aceptación para determinar la linealidad del método.

Parámetros evaluados	Criterios de Aceptación	
Pendiente (m)	1.066	= 1
Ordenada (b)	-2.276	= 0
Coefficiente de Correlación (r)	0.996	≥ 0.99
Coefficiente de determinación (r ²)	0.993	≥ 0.98
Intervalo de confianza para m al 95 %	1.010 - 1.122	
Intervalo de confianza para b al 95 %	-3.702 - -0.850	

Como se puede observar en la tabla 3.9 los parámetros de evaluación de la linealidad del sistema, se encuentran dentro de las especificaciones. Por lo que se puede determinar que el método es lineal.

3.2.3. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

La evaluación de la precisión y exactitud del método se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración de tres diferentes muestras de placebos cargados con seis ensayos cada una.

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes determinados en las tres diferentes soluciones de Clorhidrato de Difenhidramina empleadas, así como la concentración de las mismas.

Tabla 3.10. Porcentajes determinados obtenidos para evaluar la precisión del método.

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje determinado (%)
18.68	98.686
	101.488
	98.641
	100.159
	99.396
	100.665
24.92	98.717
	95.988
	98.648
	98.151
	102.005
	98.938
31.28	98.784
	99.716
	97.161
	98.263
	97.704
	99.288

Tabla 3.11. Características determinadas para evaluar la Precisión del Método

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio (%)	D.E.	C.V.
18.68	99.839	1.137	1.14%
24.92	98.741	1.930	1.95%
31.28	98.889	1.780	1.80%

Tabla 3.12 Resultados obtenidos para evaluar la Exactitud del Método

Concentración real de DFH ($\mu\text{g/ml}$)	t calculada	t crítica ($\alpha=0.05$)
18.68	-0.346	2.57
99.84	-1.597	2.57
98.74	-1.529	2.57

Los resultados mostrados en Tabla 3.11. indican que los valores calculados de CV en las tres diferentes soluciones empleadas son menores al 2%, por lo que se puede determinar que el método analítico tiene precisión.

En relación a la evaluación de la exactitud del método, los porcentajes determinados obtenidos para las tres diferentes concentraciones de Clorhidrato de Difenhidramina, cumplen los valores del criterio de aceptación (97-103 %), por lo que se demuestra que el método es exacto.

3.2.4. REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó mediante la determinación de la concentración de tres diferentes muestras de placebo cargado, con tres ensayos cada uno. Las muestras fueron preparadas por un analista, en dos diferentes días bajo las mismas condiciones de análisis establecidas.

Tabla 3.13. Porcentajes determinados de Clorhidrato de Difenhidramina

Concentración real de DFH	Porcentaje determinado (%)	
	Día 1	Día 2
Concentración 1	99.854	98.686
	102.404	101.488
	107.221	98.641
Concentración 2	96.460	98.717
	98.908	95.988
	99.355	98.648
Concentración 3	96.483	97.858
	100.155	100.609
	101.439	102.620

Tabla 3.14. Análisis de varianza para determinar a repetibilidad entre días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Pormedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	4.5246673	4.5246673	0.75066666	5.59
Residuos	7	42.192724	6.0275320		
Total	8	122.61836			

Con lo anterior, se puede asegurar que el método es repetible entre días bajo las mismas condiciones.

Conclusiones

- ⇒ Se desarrolló un método analítico para cuantificar confiablemente Clorhidrato de Difenhidramina presente en una matriz analítica, por medio de espectrofotometría UV.
- ⇒ Se establecieron las condiciones espectrofotométricas óptimas para el modelo de calibración
- a) Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.6, como medio de dilución.
 - b) 15 soluciones estándar (sección 2.3.2.1.2)
 - c) Longitudes de onda: 267, 258, 255, 242, 240, 238, 237, 233, 232, 230, 228, 226, 225, 224, 223, 220, 218, 215, 210, 207
 - d) El número de factores óptimo es 13.
- ⇒ El sistema al ser validado demostró ser lineal, preciso y exacto.
- ⇒ Se estableció un ensayo analítico, fácil de llevar a cabo, en el cual se elimina la necesidad de la separación previa del analito, la reducción de tiempo de análisis y la variabilidad entre los resultados analíticos.
- ⇒ El método desarrollado para la cuantificación de Clorhidrato de Difenhidramina al ser validado, muestra que presenta linealidad, es exacto, preciso y repetible entre días.

Anexos

ANEXO 1

Algoritmo de MCP desarrollado por Wold, empleado para estimar la concentración del componente de interés para descomposición de los datos de la matriz A.

Paso 1: Se obtiene la media de los valores de absorción de la matriz (A) y la media de las concentraciones (c).

c	A									
18.75	0.0113	0.0047	0.0194	0.0135	0.0196	0.0042	0.0209	0.0299	0.0365	0.0314
21.87	0.0132	0.0054	0.0227	0.0157	0.0229	0.0049	0.0244	0.0349	0.0425	0.0366
25	0.0151	0.0062	0.0259	0.0180	0.0262	0.0056	0.0279	0.0399	0.0486	0.0419
28.125	0.0169	0.0070	0.0292	0.0202	0.0295	0.0063	0.0314	0.0449	0.0547	0.0471
31.25	0.0188	0.0078	0.0324	0.0225	0.0328	0.0070	0.0349	0.0499	0.0608	0.0524
MEDIA										
24.999	0.0151	0.0062	0.0259	0.0180	0.0262	0.0056	0.0279	0.0399	0.0486	0.0419

Paso 2: Se sustrae a cada valor de la matriz (A) la media de la misma, así como a cada valor de concentración la media de las concentraciones (c)

c	A									
-6.249	-0.0038	-0.0016	-0.0065	-0.0045	-0.0066	-0.0014	-0.007	-0.01	-0.0122	-0.0105
-3.129	-0.0019	-0.0008	-0.0033	-0.0023	-0.0033	-0.0007	-0.0035	-0.005	-0.0061	-0.0052
0.001	6E-07	2.5E-07	1E-06	7.2E-07	1E-06	2.3E-07	1.1E-06	1.6E-06	1.9E-06	1.7E-06
3.126	0.00189	0.00078	0.00325	0.00225	0.00328	0.00071	0.00349	0.005	0.00609	0.00524
6.251	0.00378	0.00157	0.0065	0.0045	0.00656	0.00141	0.00698	0.01	0.01217	0.01049

Paso 3: Formación del vector cargador de peso o "weight loading vector" " w_h "

$$w_h' = A'c / c'c$$

A'					X	c	=	A'c
-0.00378	-0.00189	0.00000	0.00189	0.00378				0.059
-0.00157	-0.00079	0.00000	0.00078	0.00157	-6.249	0.025		
-0.00650	-0.00325	0.00000	0.00325	0.00650	-3.129	0.102		
-0.00450	-0.00225	0.00000	0.00225	0.00450	0.001	0.070		
-0.00656	-0.00329	0.00000	0.00328	0.00656	3.126	0.103		
-0.00141	-0.00071	0.00000	0.00071	0.00141	6.251	0.022		
-0.00698	-0.00350	0.00000	0.00349	0.00698		0.109		
-0.01000	-0.00500	0.00000	0.00500	0.01000		0.156		
-0.01217	-0.00609	0.00000	0.00609	0.01217		0.190		
-0.01048	-0.00525	0.00000	0.00524	0.01049		0.164		

<u>c'</u>					X	<u>c</u>	=	<u>c'c</u>
-6.249	-3.129	0.001	3.126	6.251		-6.249		-3.129
					0.001			
					3.126			
					6.251			

<u>A'c</u>	/	<u>c'c</u>	=	<u>w_h</u>
0.059				97.688
0.025				0.000251
0.102				0.001039
0.070				0.000720
0.103				0.001050
0.022				0.000226
0.109				0.001117
0.156				0.001599
0.190				0.001947
0.164				0.001678

Normalizar los valores de w_h :

<u>A'c</u>	/	<u>c'c</u>	=	<u>w_h</u>	<u>w_h²</u>	Suma de w _h ² norma	1.36E-05 0.003687	<u>w_h nom</u>
0.059								
0.025				0.000251	6.3E-08			0.000251
0.102				0.001039	1.08E-06			0.001039
0.070				0.000720	5.19E-07			0.000720
0.103				0.001050	1.1E-06			0.001050
0.022				0.000226	5.1E-08			0.000226
0.109				0.001117	1.25E-06			0.001117
0.156				0.001599	2.56E-06			0.001599
0.190				0.001947	3.79E-06			0.001947
0.164				0.001678	2.81E-06			0.001678

Norma = raíz cuadrada de suma de w_h^2
 $w_h \text{ nom} = w_h / \text{norma}$

Paso 4: vector indicador o “score” (variable latente) t_h :

$$t_h = A w_h$$

A									
-0.0038	-0.0016	-0.0065	-0.0045	-0.0066	-0.0014	-0.007	-0.01	-0.0122	-0.0105
-0.0019	-0.0008	-0.0033	-0.0023	-0.0033	-0.0007	-0.0035	-0.005	-0.0061	-0.0052
6E-07	2.5E-07	1E-06	7.2E-07	1E-06	2.3E-07	1.1E-06	1.6E-06	1.9E-06	1.7E-06
0.00189	0.00078	0.00325	0.00225	0.00328	0.00071	0.00349	0.005	0.00609	0.00524
0.00378	0.00157	0.0065	0.0045	0.00656	0.00141	0.00698	0.01	0.01217	0.01049

X		
<u>w_h</u> nom		
0.000604		
0.000251		
0.001039		<u>t_h</u>
0.000720		-3.47E-05
0.001050	=	-1.74E-05
0.000226		5.559E-09
0.001117		1.738E-05
0.001599		3.475E-05
0.001947		
0.001678		

Paso 5: relación del vector indicador con las concentraciones:

$$v_h = t_h'c / t_h't_h$$

<u>t_h'</u>						<u>c</u>		<u>$t_h'c$</u>
-3.47E-05	-1.74E-05	5.56E-09	1.74E-05	3.47E-05	X	-6.249	=	0.000543
						-3.129		
						0.001		
						3.126		
						6.251		

$$\begin{array}{cccccc}
 & & \underline{t_h'} & & & \\
 \underline{-3.47E-05} & \underline{-1.74E-05} & \underline{5.56E-09} & \underline{1.74E-05} & \underline{3.47E-05} & \\
 \times & & & & & \underline{t_h} \\
 & & & & & -3.5E-05 \\
 & & & & & -1.7E-05 \\
 & & & & & 5.56E-09 \\
 & & & & & 1.74E-05 \\
 & & & & & 3.47E-05 \\
 & & & & & = \\
 & & & & & \underline{t_h' t_h} \\
 & & & & & 3.0187E-0.9
 \end{array}$$

$$\frac{\underline{t_h' c}}{0.000543} \quad / \quad \frac{\underline{t_h' t_h}}{3.0187E-0.9} = \frac{\underline{v_h}}{179892.36}$$

Paso 6: Formación del vector de carga o "loading vector", bh para A:

$$b_h = A' t_h / t_h' t_h$$

$$\begin{array}{cccccc}
 & & \underline{A'} & & & \\
 \underline{-0.00378} & \underline{-0.00189} & \underline{0.00000} & \underline{0.00189} & \underline{0.00378} & \\
 \underline{-0.00157} & \underline{-0.00079} & \underline{0.00000} & \underline{0.00078} & \underline{0.00157} & \\
 \underline{-0.00650} & \underline{-0.00325} & \underline{0.00000} & \underline{0.00325} & \underline{0.00650} & \\
 \underline{-0.00450} & \underline{-0.00225} & \underline{0.00000} & \underline{0.00225} & \underline{0.00450} & \\
 \underline{-0.00656} & \underline{-0.00329} & \underline{0.00000} & \underline{0.00328} & \underline{0.00656} & \\
 \underline{-0.00141} & \underline{-0.00071} & \underline{0.00000} & \underline{0.00071} & \underline{0.00141} & \\
 \underline{-0.00698} & \underline{-0.00350} & \underline{0.00000} & \underline{0.00349} & \underline{0.00698} & \\
 \underline{-0.01000} & \underline{-0.00500} & \underline{0.00000} & \underline{0.00500} & \underline{0.01000} & \\
 \underline{-0.01217} & \underline{-0.00609} & \underline{0.00000} & \underline{0.00609} & \underline{0.01217} & \\
 \underline{-0.01048} & \underline{-0.00525} & \underline{0.00000} & \underline{0.00524} & \underline{0.01049} & \\
 & & & & & \times \\
 & & & & & \underline{t_h} \\
 & & & & & -3.5E-05 \\
 & & & & & -1.7E-05 \\
 & & & & & 5.56E-09 \\
 & & & & & 1.74E-05 \\
 & & & & & 3.47E-051 \\
 & & & & & = \\
 & & & & & \underline{A' t_h} \\
 & & & & & 3.2809E-07 \\
 & & & & & 1.3632E-07 \\
 & & & & & 5.6446E-07 \\
 & & & & & 3.9109E-07 \\
 & & & & & 5.7012E-07 \\
 & & & & & 1.2265E-07 \\
 & & & & & 6.0676E-07 \\
 & & & & & 8.6858E-07 \\
 & & & & & 1.0575E-06 \\
 & & & & & 9.1107E-07
 \end{array}$$

$A \cdot t_h$		b_h
3.2809E-07		9.904E-16
1.3632E-07		4.115E-16
5.6446E-07		1.704E-15
3.9109E-07		1.181E-15
5.7012E-07	/	1.721E-15
1.2265E-07		3.702E-16
6.0676E-07		1.832E-15
8.6858E-07		2.622E-15
1.0575E-06		3.192E-15
9.1107E-07		2.750E-15

$$\frac{t_h \cdot t_h}{3.0187E-0.9} =$$

Paso 7: Cálculo de los residuales en A y C.
Espectros Residuales:

$$E_A = A - t_h b_h'$$

t_h
-3.5E-05
-1.7E-05
5.56E-09
1.74E-05
3.47E-051
X

b_h'
9.904E-16 4.115E-16 1.704E-15 1.181E-15 1.721E-15 3.702E-16 1.832E-15 2.622E-15 3.192E-15 2.750E-15

$$t_h b_h'$$

-3.440E-20	-1.429E-20	-5.919E-20	-4.101E-20	-5.978E-20	-1.286E-20	-6.363E-20	-9.108E-20	-1.109E-19	-9.553E-20
-1.723E-20	-7.158E-21	-2.964E-20	-2.053E-20	-2.993E-20	-6.440E-21	-3.186E-20	-4.561E-20	-5.552E-20	-4.784E-20
5.506E-24	2.288E-24	9.472E-24	6.563E-24	9.567E-24	2.058E-24	1.018E-23	1.458E-23	1.774E-23	1.529E-23
1.721E-20	7.151E-21	2.961E-20	2.051E-20	2.991E-20	6.434E-21	3.183E-20	4.556E-20	5.547E-20	4.779E-20
3.441E-20	1.430E-20	5.921E-20	4.102E-20	5.980E-20	1.287E-20	6.365E-20	9.111E-20	1.109E-19	9.557E-20

$$A$$

-0.0038	-0.0016	-0.0065	-0.0045	-0.0066	-0.0014	-0.007	-0.01	-0.0122	-0.0105	
-0.0019	-0.0008	-0.0033	-0.0023	-0.0033	-0.0007	-0.0035	-0.005	-0.0061	-0.0052	
6E-07	2.5E-07	1E-06	7.2E-07	1E-06	2.3E-07	1.1E-06	1.6E-06	1.9E-06	1.7E-06	$-t_h b_h'$
0.00189	0.00078	0.00325	0.00225	0.00328	0.00071	0.00349	0.005	0.00609	0.00524	
0.00378	0.00157	0.0065	0.0045	0.00656	0.00141	0.00698	0.01	0.01217	0.01049	

$$=$$

$$E_A$$

-3.77E-03	-1.56E-03	-6.49E-03	-4.50E-03	-6.56E-03	-1.41E-03	-6.98E-03	-9.99E-03	-1.21E-02	-1.04E-02
-1.89E-03	-7.85E-04	-3.25E-03	-2.25E-03	-3.28E-03	-7.06E-04	-3.49E-03	-5.00E-03	-6.09E-03	-5.25E-03
6.04E-07	2.51E-07	1.03E-06	7.20E-07	1.05E-06	2.25E-07	1.11E-06	1.59E-06	1.94E-06	1.67E-06
1.88E-03	7.84E-04	3.24E-03	2.25E-03	3.28E-03	7.06E-04	3.49E-03	5.00E-03	6.08E-03	5.24E-03
3.77E-03	1.56E-03	6.49E-03	4.50E-03	6.56E-03	1.41E-03	6.98E-03	9.99E-03	1.21E-02	1.04E-02

Concentraciones residuales:

$$e^c = c - v_h t_h$$

$\frac{v_h}{179892.36}$	$\frac{t_h}{-3.5E-05}$	$\frac{v_h t_h}{-6.249}$
X	-1.7E-05	= -3.129
	5.56E-09	0.001
	1.74E-05	3.126
	3.47E-051	6.251

<u>c</u>		<u>v_h t_h</u>		<u>e_c</u>
-6.249		-6.249		0.E+00
-3.129	-	-3.129	=	0.E+00
0.001		0.001		-3.E-15
3.126		3.126		0.E+00
6.251		6.251		0.E+00

Anexo 2

Obtención de k_w . Algoritmo empleado en la selección de longitudes de onda que aportaran información relevante en el análisis MCP.

Datos originales de concentración (vector c) y absorbancia (matriz A) a diferentes longitudes de onda.

<u>c</u>	<u>A</u>									
18.75	0.0113	0.0047	0.0194	0.0135	0.0196	0.0042	0.0209	0.0299	0.0365	0.0314
21.87	0.0132	0.0054	0.0227	0.0157	0.0229	0.0049	0.0244	0.0349	0.0425	0.0366
25	0.0151	0.0062	0.0259	0.0180	0.0262	0.0056	0.0279	0.0399	0.0486	0.0419
28.125	0.0169	0.0070	0.0292	0.0202	0.0295	0.0063	0.0314	0.0449	0.0547	0.0471
31.25	0.0188	0.0078	0.0324	0.0225	0.0328	0.0070	0.0349	0.0499	0.0608	0.0524

Paso 1: Estandarizar los datos de la calibración: por medio de la siguiente ecuación

$$(a_i - \bar{a}) / s^2$$

	<u>c</u>	<u>A</u>									
Media	24.999	0.015104	0.006276	0.02599	0.018004	0.026246	0.005646	0.027933	0.039986	0.048681	0.041942
D.E.	4.9418	0.002986	0.001241	0.00514	0.003559	0.005188	0.001116	0.005522	0.007904	0.009623	0.008291
(D.E)²	24.422	8.91E-06	1.54E-06	2.6E-05	1.27E-05	2.69E-05	1.25E-06	3.05E-05	6.25E-05	9.26E-05	6.87E-05

c	A									
-0.256	-423.508	-1019.277	-246.165	-355.286	-243.718	-1132.905	-229.003	-159.973	-131.400	-152.513
-0.128	-212.059	-510.372	-123.260	-177.899	-122.035	-567.268	-114.666	-80.102	-65.794	-76.367
4E-05	0.068	0.163	0.039	0.057	0.039	0.181	0.037	0.026	0.021	0.024
0.128	211.856	509.883	123.142	177.728	121.918	566.724	114.556	80.025	65.731	76.293
0.256	423.643	1019.603	246.244	355.399	243.796	1133.267	229.076	160.025	131.442	152.562

Paso 2: Formación del vector cargador de peso

$$w_h' = A'c / c'c$$

c'	X	c	=	c'c
-0.255877107 -0.128122814 4.095E-05 0.127999974 0.255959001		-0.255877107 -0.128122814 4.09469E-05 0.127999974 0.255959001		0.1637876

A'	X	c	=	A'c
-423.508 -212.059 0.068 211.856 423.643 -1019.277 -510.372 0.163 509.883 1019.603 -246.165 -123.260 0.039 123.142 246.244 -355.286 -177.899 0.057 177.728 355.399 -243.718 -122.035 0.039 121.918 243.796 -1132.905 -567.268 0.181 566.724 1133.267 -229.003 -114.666 0.037 114.556 229.076 -159.973 -80.102 0.026 80.025 160.025 -131.400 -65.794 0.021 65.731 131.442 -152.513 -76.367 0.024 76.293 152.562		-0.2558771 -0.1281228 4.0947E-05 0.12799997 0.255959	271.0882955 652.4414208 157.5708904 227.4192605 156.0047292 725.1749211 146.5850759 102.3993642 84.10915221 97.62424665	

<u>A'c</u>		<u>w_h</u>
271.0882955		1655.121456
652.4414208		3983.461521
157.5708904		962.0443442
227.4192605		1388.501472
156.0047292	X	952.4821941
725.1749211		4427.533725
146.5850759		894.9707836
102.3993642		625.196246
84.10915221		513.5259055
97.62424665		596.0419092

$$X \frac{c'c}{0.163787554} =$$

Normalizar los valores de w_h :

<u>w_h</u>	<u>w_h²</u>		<u>w_h nom</u>
1655.121456	2739427.033		0.250139514
3983.461521	15867965.69		0.602022966
962.0443442	925529.3203		0.145394348
1388.501472	1927936.338	Suma de w _h ²	0.209845073
952.4821941	907222.3301	norma	0.143949214
4427.533725	19603054.89		0.669135868
894.9707836	800972.7035	Norma = raíz cuadrada de	0.13525748
625.196246	390870.3461	suma de w _h ²	0.094486289
513.5259055	263708.8557	w _h norm = w _h /norma	0.077609483
596.0419092	355265.9575		0.090080177

Paso 3 $K_w = W_h ((B^*W_h)^{-1} v_h$

B	w_h nom		B*w_h
1655.12	0.250139514		1.0000
3983.46	0.602022966	X	1.0000
962.04	0.145394348		
1388.50	0.209845073		
952.48	0.143949214		
4427.53	0.669135868		
894.97	0.13525748		
625.19	0.094486289		
513.52	0.077609483		
596.04	0.090080177		

$$\frac{(B^*w_h)^{-1}}{1.0000} \times \frac{v_h}{179892.3616} = \frac{((B^*w_h)^{-1}) v_h}{179892.3616}$$

w_h nom		k_w
0.250139514		44998.18783
0.602022966		108299.333
0.145394348	X	26155.33256
0.209845073		37749.52577
0.143949214		25895.36407
0.669135868		120372.4316
0.13525748		24331.78742
0.094486289		16997.36174
0.077609483		13961.35315
0.090080177		16204.73573

Paso 4 Graficar el coeficiente de regresión final contra la longitud de onda

ANEXO 3

Concentración de Clorhidrato de Difenhidramina, Metilparabeno y Propilparabeno presentes en el Jarabe de Clorhidrato de Difenhidramina elaborado por el Laboratorio de Medicamentos y Productos Biológicos "Importadora y Manufacturera Bruluart, S.A."

Tabla 3.1. Relación de porcentaje activo y concentración para Clorhidrato de Difenhidramina, Metilparabeno y Propilparabeno.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	
Clorhidrato de Difenhidramina	150 mg / 60 ml	2.5 mg / ml
Metilparabeno	54 mg / 60 ml	0.9 mg / ml
Propilparabeno	6 mg / 60 ml	0.1 mg / ml

Clorhidrato de Difenhidramina					
%	75	87.48	100	112.5	125
[µg/ml]	18.75	21.87	25	28.125	31.25

Metilparabeno			
%	0	100	133
[µg/ml]	0	9	12

Propilparabeno			
%	0	100	120
[µg/ml]	0	1	1.2

Tabla 3.2. Combinación de las cinco concentraciones de Clorhidrato de Difenhidramina y tres concentraciones de los parabenos.

Sistema	µg / ml			Sistema	µg / ml		
	Clor. DFH	MP	PP		Clor. DFH	MP	PP
1	18.75	0	0	24	25	9	1.2
2	18.75	0	1	25	25	12	0
3	18.75	0	1.2	26	25	12	1
4	18.75	9	0	27	25	12	1.2
5	18.75	9	1	28	28.125	0	0
6	18.75	9	1.2	29	28.125	0	1
7	18.75	12	0	30	28.125	0	1.2
8	18.75	12	1	31	28.125	9	0
9	18.75	12	1.2	32	28.125	9	1
10	21.87	0	0	33	28.125	9	1.2
11	21.87	0	1	34	28.125	12	0
12	21.87	0	1.2	35	28.125	12	1
13	21.87	9	0	36	28.125	12	1.2
14	21.87	9	1	37	31.25	0	0
15	21.87	9	1.2	38	31.25	0	1
16	21.87	12	0	39	31.25	0	1.2
17	21.87	12	1	40	31.25	9	0
18	21.87	12	1.2	41	31.25	9	1
19	25	0	0	42	31.25	9	1.2
20	25	0	1	43	31.25	12	0
21	25	0	1.2	44	31.25	12	1
22	25	9	0	45	31.25	12	1.2
23	25	9	1				

Tabla 3.3. Sistemas elegidos para conformar la calibración del modelo.

Sistema	$\mu\text{g} / \text{ml}$		
	Clor. DFH	MP	PP
1	18.75	0	0
2	18.75	9	1
3	18.75	12	1.2
4	21.87	0	0
5	21.87	9	1
6	21.87	12	1.2
7	25	0	0
8	25	9	1
9	25	12	1.2
10	28.125	0	0
11	28.125	9	1
12	28.125	12	1.2
13	31.25	0	0
14	31.25	9	1
15	31.25	12	1.2

ANEXO 4

Placebos cargados

Solución A

1. Pesar 44.8 mg de Clorhidrato de Difenhidramina en un vaso de precipitado de 50 ml.
2. Agregar 10 ml de Agua destilada y disolver.
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 ml y llevar al volumen de aforo con. Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.

Solución B

1. Pesar 62.5 mg de Clorhidrato de Difenhidramina en un vaso de precipitado de 50 ml.
2. Agregar 10 ml de Agua destilada y disolver.
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 ml y llevar al volumen de aforo con Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6..

Solución C

1. Pesar 78.0 mg de Clorhidrato de Difenhidramina en un vaso de precipitado de 50 ml.
2. Agregar 10 ml de Agua destilada y disolver.
3. Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 ml y llevar al volumen de aforo con Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6..

Para preparar los ensayos:

1. Tomar con una pipeta volumétrica, 1 ml de la solución correspondiente y verter su contenido a un matraz volumétrico de 100 ml
2. Tomar con una pipeta volumétrica, 1 ml del vehiculo de jarabe de Clorhidrato de Difenhidramina. y verter su contenido en el matraz volumétrico de 100 ml
3. Llevar a al marca de aforo con el Solución amortiguadora de Fosfatos pH 4.6.



Bibliografía



1. Amigo Rubio, José Manuel. Tesis Doctoral: "Desarrollo y aplicación de Métodos Quimiométricos Multidimensionales al estudio de sistemas enzimáticos." Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. 2007. pág. 41-43.
2. Barrera Galicia, Mauricio. Tesis de Licenciatura: "Aplicación de métodos de calibración multivariante en la cuantificación simultanea por espectrofotometría U.V. de Acetaminofen (APAP) y Naproxeno (NAP) presentes en un medio de disolución". UNAM. Cuautitlan Izcalli. 2004. pág 14-21, 28-31, 33-35, 43-52.
3. Bohoyo Gil, Diego. Tesis Doctoral: "Nuevos Métodos de determinación de Antibióticos y otros principios activos en alimentos, formulaciones zoonosanitarias y fluidos biológicos. Universidad de Extremadura. Badajoz, 2005. pág. 162-179.
4. Crouch S.R., Coello J., Maspoch S., Porcel M.. "Evaluation of classical and three-way multivariate calibration produres in kinetic-spectrophotometric analysis." *Analytica Chimica Acta*. 2000, Vol. 424, pág. 115-126.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 9a edición. México 2008. pág. 669-670, 695, 955, 1625-1629.
6. Flórez, Jesús. "Farmacología Humana". 3a edición. Barcelona, 1998. pág. 310-312.
7. Gomez María R., Olsina Roberto A., Martínez Luis D., Silva María F.. "Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectoran and decongestant syrups by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002. Vol. 30 pág. 791-799.
8. González González, Adriana Lucero. Tesis de Licenciatura: "Desarrollo de un método para cuantificar Ketoconazol en tabletas". UNAM. Cuautitlan Izcalli. 2006 pág 15- 19, 23-25.
9. Goodman & Gilman. "bases farmacológicas de la Terapéutica", 9a edición. Interamericana. México 1996. pág. 627-633.
10. Hou Ruihua H., Scaife Jessica, Freeman Clare, Langley Rob W., Szabadi Elemer & Bradshaw Chris M.. "Relationship between sedation and pupillary function: Comparison of diazepam and diphenhydramine". *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, Vol. 61, pág. 752-760.

11. Irigoyen Osorno, Olga Lidia. Tesis de licenciatura: "Determinacion de la capacidad predictiva del modelo de minimos cuadrados parciales en la cuantificacion simultanea de naproxeno y acetaminofen provenientes de una suspensión". UNAM. Cuautitlan Izcalli. 2006 pág 17-21, 23-27.
12. Jifeng Liu, Weidong Cao, Xiurong Yang, Erkang Wang. "Determination of diphenhydramine by capillary electrophoresis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrochemiluminescence detection". Talanta. 2003, Vol. 59. pág. 453-459.
13. Kalant H y Roschlau WH. Principios de Farmacología Medica. Oxford university press. 6o edición. 2002. pág. 406-409.
14. Luis M. Luz, Fraga José M. G., Jiménez Francisco, Jiménez Ana I., Hernández Oscar M. y Arias Juan J.. "Selection of Wavelength Range and Number of Factors to be Used in the PLS Treatment of Spectrophotometric Data". Analytical Letters. 2007. Vol. 40, pág. 257-280.
15. Marchesini A.F., Williner M.R., Mantovani V.E., Robles J.C., Goicoechea H.C., " Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003. Vol. 31. pág. 39-46.
16. Porcel García, Martha. Memoria para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas. "Aplicación de Técnicas Quimiométricas para el desarrollo de nuevos Métodos Cinético-Espectrofotométricos de análisis". Univesitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, 2001. pág. 5-27.
17. Rang H.P., "Pharmacology H.P. Rang" Edinburgh : Churchill Livingstone, 2003 pág. 252-255.
18. Remington. Farmacia; Vol. 2. 20ª edición, Panamericana, Argentina 2003, pág. 1742-1743.
19. United States Pharmacopoeial. Ed. 29. Rockville: Mack Printing, 2006.