



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

38
20/12/95

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

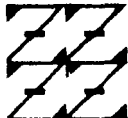
FALLA DE ORIGEN

IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR CLAR PARA CUANTIFICAR
GRISEOFULVINA, COMO MATERIA PRIMA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A,
LETICIA CECILIA JUAREZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO MURADO ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.,

DIC. 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES

VOCAL: Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

SECRETARIO: Q.F.B. MA. CIRENIA SANDOVAL LOPEZ

SUPLENTE: Q.F.B. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

SUPLENTE: Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ

A MIS PADRES: VICTORIA AGUILAR Y VENANCIO JUAREZ POR EL GRAN ESFUERZO
Y ENTREGA EN MI VIDA.

A MIS ABUELOS: POR FORJAR MIS PASOS EN MI VIDA.

A MIS HERMANOS POR EL APOYO RECIBIDO.

A MI FAMILIA:

OSCAR EDUARDO POR SER UN ESTIMULO DE SUPERACION EN MI
EXISTENCIA.

OSCAR POR SUS CONSEJOS, FELICIDAD BRINDADA Y APOYO
RECIBIDO.

AL AMOR DE MI VIDA:

OSCAR GRACIAS POR COMPARTIR CONMIGO TUS
CONOCIMIENTOS, Y ENSEÑARME A VER LA VIDA CON OTRA
MENTALIDAD.

A PATY PARRA POR SU TIEMPO, SUS CONOCIMIENTOS COMPARTIDOS Y POR SER
UNA ESTUPENDA PERSONA.

CON CARÍÑO PARA UNA AMIGA QUE FORMA Y FORMO PARTE DE UNA ETAPA
IMPORTANTE EN MI VIDA: SANDRA.

PARA MIS AMIGOS:

MARGARITA

MARINA

MANUEL

LUIS

INDICE GENERAL.

I. INTRODUCCION.....	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	2
2.1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.....	2
2.1.1. ANTECEDENTES.....	2
2.1.2. TIPOS DE CLAR.....	3
CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.....	3
CROMATOGRAFIA DE PARTICION.....	4
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.....	5
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION.....	6
2.1.3. TERMINOLOGIA.....	6
TIEMPO DE RETENCION.....	6
TIEMPO MUERTO.....	7
TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO.....	7
NUMERO DE PLATOS TEORICOS.....	7
FACTOR DE CAPACIDAD.....	8
RESOLUCION.....	9
FACTOR DE SIMETRIA.....	9
2.1.4. EQUIPO.....	10
DEPOSITO DE LA FASE MOVIL.....	10
SISTEMA DE BOMBEO.....	11

INVECTOR.....	12
DETECTOR.....	13
COLUMNA.....	17
2.2. FARMACOLOGIA.....	20
2.3. GENERALIDADES.....	21
a) NOMBRE QUIMICO.....	21
b) FORMULA CONDENSADA.....	21
c) FORMULA DESARROLLADA.....	21
d) PESO MOLECULAR.....	21
e) DESCRIPCION.....	22
f) ESPECTRO ULTRAVIOLETA.....	22
g) SOLUBILIDAD.....	23
h) METODOS ANALITICOS.....	23
2.4. CRITERIOS DE VALIDACION.....	27
2.4.1. EVALUACION DEL SISTEMA.....	27
PRECISION DEL SISTEMA.....	27
LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	28
2.4.2. EVALUACION DEL METODO.....	29
ESPECIFICIDAD.....	29
EXACTITUD.....	30
LINEALIDAD.....	30
PRECISION.....	31
ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA.....	33

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
IV. OBJETIVO GENERAL.....	36
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
V. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	37
VI. PARTE EXPERIMENTAL.....	38
6.1. EQUIPO MATERIAL Y METODO.....	38
EQUIPO.....	38
MATERIAL.....	38
METODO.....	38
VII. RESULTADOS.....	44
7.1. IMPLEMENTACION DEL METODO.....	44
7.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	46
TABLA DE RESULTADOS.....	46
CALCULOS.....	46
PORCIENTO DE RECOBRO.....	47
GRAFICA.....	48
7.3. PRECISION DEL SISTEMA.....	49
TABLA DE RESULTADOS.....	49
CALCULOS.....	49
7.4. ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	50
7.5. LINEALIDAD DEL METODO.....	51

TABLA DE RESULTADOS.....	51
CALCULOS.....	51
PORCIENTO DE RECOBRO.....	52
GRAFICA.....	54
7.6. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.....	55
TABLA DE RESULTADOS.....	55
CALCULOS.....	55
7.7. PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).....	57
TABLA DE RESULTADOS.....	57
CALCULOS.....	57
7.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	59
TABLA DE RESULTADOS.....	59
CALCULOS.....	59
VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.....	61
8.1. METODO ANALITICO IMPLEMENTADO.....	61
8.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	63
LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	63
PRECISION DEL SISTEMA.....	63
LINEALIDAD DEL METODO.....	64
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.....	64
PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).....	64
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	65
ESPECIFICIDAD DEL METODO.....	65
IX. CONCLUSIONES.....	66
X. ANEXOS.....	67
XI. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	75

INDICE DE TABLAS.

TABLA 1. Solubilidad a 25°C de Griseofulvina.....	23
TABLA 2. Método de identificación de griseofulvina por cromatografía en papel.....	24
TABLA 3. Sistema de cromatografía en capa fina.....	25
TABLA 4. Método de análisis por cromatografía de gases para griseofulvina.....	25
TABLA 5. Método de análisis por CLAR para cuantificar griseofulvina.....	26
TABLA 6. Cálculos en el análisis de varianza.....	33
TABLA 7. Resultados analíticos de concentración vs respuesta para la linealidad del sistema.....	46
TABLA 8. Porcientos recuperados para linealidad del sistema.....	47
TABLA 9. Resultados analíticos para la precisión del sistema.....	49
TABLA 10. Resultados analíticos de cantidad adicionada contra cantidad recuperada para la linealidad del método.....	51
TABLA 11. Porcientos recuperados para la linealidad del método....	52
TABLA 12. Resultados analíticos del por ciento recuperado para la exactitud y repetibilidad al 100%.....	55
TABLA 13. Por ciento de recobro por día y por analista, para la reproducibilidad del método.....	57
TABLA 14. Análisis de varianza para cada una de las fuentes de variación en la reproducibilidad del método.....	58
TABLA 16. Porcentajes recuperados del análisis inicial y 24 horas después a temperatura ambiente y refrigeración para la muestra de análisis.....	59

muestra de análisis.....	59
TABLA 17. Valores de la distribución de t de Student.....	74
TABLA 18. Valores de la distribución F de Fischer con u n a probabilidad acumuladade 0.975.....	75

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Representación de un cromatograma.....	6
FIGURA 2. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.....	10
FIGURA 3. Válvula inyectora.....	13
FIGURA 4. Estructura química de griseofulvina.....	21
FIGURA 5. Espectro Ultravioleta de la griseofulvina.....	22
FIGURA 6. Cromatogramas que muestran la especificidad del método.....	50

INDICE DE GRAFICAS.

GRAFICA 1. Gráfica de concentración vs respuesta en la linealidad del sistema.....	48
GRAFICA 2. Gráfica de cantidad adicionada vs cantidad recuperada en la linealidad del método.....	54

I. INTRODUCCION.

La griseofulvina es un antibiótico antimicótico utilizado para el tratamiento de dermatofitosis que es una enfermedad contagiosa producida por los hongos del género *Trichophyton* y *Microsporum*, debido a la gran importancia de esta enfermedad en los países en vías de desarrollo , es necesario contar con un medicamento que nos ayude terapéuticamente en la micosis de la piel , pelo y uñas. Y por consiguiente con un método analítico confiable que nos asegure la cuantificación de esta como materia prima.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad.(19)

Este trabajo presenta la implementación y validación de un método analítico para cuantificar griseofulvina como materia prima mediante el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Los resultados muestran que el método es específico, lineal, preciso, exacto y la muestra analítica es estable dentro de las 24 horas posteriores a su preparación en refrigeración.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA.

2.1. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

2.1.1. ANTECEDENTES. (12)

Los métodos de separación han constituido siempre una de las herramientas más importantes en la Química Analítica. En una época, el método esencial de separación y análisis fue la precipitación pero poco a poco, los progresos técnicos y científicos permitieron el desarrollo de métodos de análisis que requieren un mínimo de separación.

Entre los métodos recientes de separación se distinguen especialmente la extracción y la cromatografía. En ambos casos la separación está basada en las diferencias de distribución de los compuestos de la muestra entre dos fases no miscibles.

El termino Cromatografía abarca las técnicas capaces de hacer que mezclas de compuestos puedan ser separadas tomando en cuenta sus diferentes propiedades físicas y químicas. Estas diferencias están gobernadas por el grado de migración de los componentes de una mezcla que pasan a través de una fase estacionaria por influencia de la fase móvil.

La importancia actual de la cromatografía como método de separación proviene de su velocidad, su gran poder de resolución y de

la posibilidad que ofrece para trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra. Se ha presentado una serie de investigaciones tanto en el aspecto teórico como en el desarrollo de nuevas y más perfeccionadas generaciones de equipos instrumentales, lo que ha conducido a la cromatografía líquida a su acepción actual de "moderna cromatografía líquida" ó "cromatografía líquida de alta resolución", cuyas siglas, CLAR designan universalmente a esta técnica.

2.1.2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.

El mecanismo de retención en está, obedece a una adsorción por parte del relleno hacia el soluto, para posteriormente llegar la fase móvil atraer hacia sí el soluto, vencer las fuerzas de adsorción dadas y arrastrar el soluto a lo largo de la columna.(11)

La fase estacionaria es un material sólido altamente polar, alguno de estos sólidos que se utilizan con más frecuencia son albúmina y gel de sílice.(12)

Este tipo de cromatografía es muy útil y se aplica a moléculas de baja o media polaridad, de peso molecular no mayor de 1000 mol.(12)

La actividad de la superficie de muchos sólidos (incluyendo la sílice) se ve con frecuencia afectada por la retención de ciertas moléculas de alta polaridad como alcoholes, fenoles, agua, etc., y debido a ello en ocasiones es difícil reproducir los resultados

obtenidos en los análisis porque las propiedades de la superficie han sufrido cambios. En consecuencia la superficie de sílice empleada en CLAR es habitualmente sometida a procesos de desactivación con el propósito de disminuir la retención de moléculas muy polares y de este modo se mantiene la superficie en condiciones uniformes, lo que contribuye a mejorar en forma notable la reproducibilidad de los análisis.(12)

CROMATOGRAFIA DE PARTICION.

En este tipo de cromatografía la separación obedece a fuerzas de partición. Se trata de dos líquidos inmiscibles: uno es la fase móvil y el otro se fija antes a los poros del relleno para ser la fase estacionaria, en donde las moléculas del soluto son distribuidas en función de su coeficiente de partición.(11)

En cromatografía de partición se dan dos formas de operación: fase normal, en donde la fase móvil es un líquido de baja polaridad y el líquido de la fase estacionaria es de naturaleza polar; y la fase reversa en la que la fase móvil es un líquido polar y la fase estacionaria es de naturaleza contraria, esto es, apolar.(11)

Los líquidos en la fase estacionaria comúnmente empleados son: nitrogenato, etilenglicol, dimetilsulfóxido, agua etc. Los soportes sólidos más empleados es el gel de sílice con grandes poros y la tierra de diatomea. En este tipo de cromatografía, el líquido queda simplemente embebido al soporte, por lo que la fase estacionaria no se encuentra en condiciones estables, es por esto que se ideó ligar

(unir químicamente) el líquido de la fase estacionaria a las partículas de sílice o de alumina denominándose cromatografía de fase Químicamente Unida.(12)

La cromatografía de partición a polaridad de fase invertida sobre fase químicamente unida es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad, aproximadamente entre 60 y 80 % de las separaciones analíticas se realizan por este medio.(11)

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.(11)

Se repite una vez más que la atracción de la fase estacionaria por las moléculas del soluto es, en comparación con las fuerzas tendientes a disolver ese soluto en la fase móvil, el fundamento de la cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria esta constituida por resina de granulometría fina, contando comúnmente con una matriz de poliestireno-divinilbenceno y una estructura macroporosa.

La carga iónica va ha ser de signo contrario a la de la muestra problema. Así, se habla de cromatografía de intercambio catiónico, si el relleno tiene naturaleza aniónica y la muestra problema es catiónica y de cromatografía de intercambio aniónico si el relleno tiene naturaleza catiónica y la muestra problema es aniónica.

Por lo general la fase móvil va ha ser acuosa, casi siempre es tamponada muchas veces con pequeñas cantidades de otro solvente orgánico miscibles con el agua. Por otra parte el detector utilizado para determinar aniones y cationes inorgánicos es la cubeta conductimétrica.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION.

Se basa en diversas penetrabilidades en poros de las moléculas. En este tipo de cromatografía no se presentan fuerzas como en las anteriores, sino una mayor o menor probabilidad de entrar en mayor o menor grado en los poros que presentan las partículas del relleno. Por lo que se dispone de un relleno poroso de un tamaño determinado, en donde las moléculas de gran magnitud molecular no entran en el poro, y permanecen menos tiempo en la columna, en cambio las de menor tamaño entran en los poros que encuentran a su paso.(12)

2.1.3. TERMINOLOGIA. (11,12)

El lenguaje empleado en cromatografía utiliza algunos términos y ecuaciones característicos de esta técnica de separación.

TIEMPO DE RETENCION (t).

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce al sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo del pico (FIG.1).

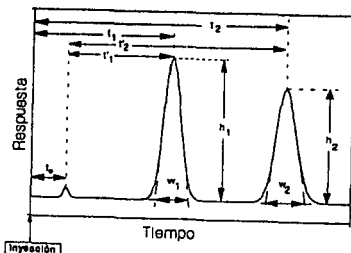


FIG.1. Representación de un Cromatograma.

TIEMPO MUERTO (t_0).

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna; físicamente este volumen representa el espacio intersticial entre las partículas del empaque de la columna y cualquier poro del empaque mismo que pueda ser ocupado por la fase móvil.

TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO (t^*R).

Es el tiempo que pasa la muestra efectivamente en la fase estacionaria:

$$t^*R = t_r - t_0 \dots \dots \dots (\text{ec. 1})$$

De esta manera, el tiempo de retención es un parámetro indicativo de la elución. Pero la elución está condicionada por la cantidad de fase móvil que llega a la columna, es decir, el flujo de la fase móvil F , expresado en volumen frente al tiempo, en ml/min. Pues bien se puede representar el volumen de retención como:

$$V_R = t_r \times F \dots \dots \dots (\text{ec. 2})$$

NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).

Es una medida de eficiencia de la separación cromatográfica pues bien cuando mayor sea N esta indicando que la columna tiene más capacidad separativa:

$$N = a (t_r/W)^2 \dots \dots \dots (\text{ec. 3})$$

donde:

- a: factor de corrección.
- w: ancho de la base del pico a determinada altura.
- t_r: tiempo de retención.

El método para el cálculo de N debe elegirse de acuerdo a las necesidades del analista, teniendo en cuenta, las limitaciones de cada modalidad. Los métodos a elegir son los siguientes:

<u>W</u>	<u>a</u>	<u>Método</u>
W _i	4	inflexión
W _h	5.54	altura media del pico
W _{3σ}	9	3.
W _{4σ}	16	4.
W _{5σ}	25	5.
W _{tan}	16	tangente

FACTOR DE CAPACIDAD (k').

Es el tiempo que se retiene cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo t, mientras t_m representa el tiempo que permanece el soluto en la fase móvil, por lo tanto el cociente entre ambos nos dará el valor de K'. Expresado por la siguiente ecuación:

$$K' = t - t_m / t_m = (t / t_m) - 1 \dots \dots \dots (\text{ec. 4})$$

en donde:

t= tiempo de retención del compuesto

t_m= tiempo muerto

K'= factor de capacidad.

RESOLUCION (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos.

$$R = 2 (t_2 - t_1) / W_2 - W_1 \dots \dots \dots (\text{ec. 5})$$

donde:

t₁ y t₂ = tiempo de retención del soluto 1 y 2 (min).

W₁ y W₂ = ancho de los picos.

FACTOR DE SIMETRIA (F).

Se refiere a la simetría del pico, para un pico simétrico, el factor de simetría tiene un valor igual a 1, por lo que a medida que aumenta el valor, la asimetría comienza a ser más pronunciada.

$$T = W_{0.05} / 2f \dots \dots \dots (\text{ec. 6})$$

donde:

W_{0.05} = ancho del pico al 5% de la altura del pico en cm.

f = Trazando una línea perpendicular a la línea base desde el vértice del pico, f es el ancho desde esa línea hasta el lado izquierdo del pico, al 5% de la altura de éste, en cm.

2.1.4. EQUIPO.

Los componentes básicos de un aparato para cromatografía de líquidos son: un sistema de bombeo para impulsar la fase móvil, un mecanismo para la introducción de la muestra, una columna, un detector y un integrador, como puede apreciarse en la FIG 2.

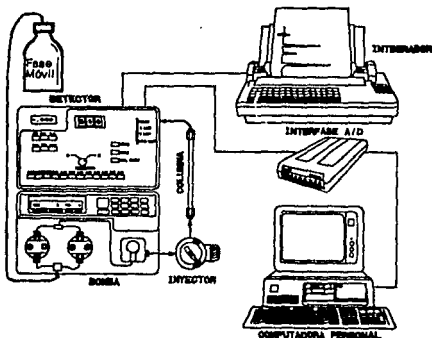


FIG. 2. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

El equipo debe de tener una gran sensibilidad y resolución, así como un alto grado de reproducibilidad.

DEPOSITO DE LA FASE MOVIL.

Su misión será contener los disolventes, que se empleen como fase móvil. Por tanto la forma de este puede ser el propio frasco en que comercialmente viene contenido el solvente hasta un complejo sistema capaz de filtrar, descavitar, desoxigenar, etc. el solvente.(11)

La toma de la fase móvil se hace a través de un filtro, con el objeto de remover pequeñas partículas que puedan obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna. Por lo que es necesario filtrar la fase móvil así como degasificarla, debido a que algunos gases como el oxígeno tienden a disolverse en el líquido produciendo burbujas que pueden afectar el funcionamiento del equipo.(11)

SISTEMA DE BOMBEO.

Las columnas utilizadas en la moderna cromatografía líquida están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo que hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere de un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable.(12)

Los aspectos más importantes en todo sistema de bombeo son:

- Flujo entre 0.5 - 10 ml/min.
- Presión máxima de flujo hasta 400 atm (5600psi), usualmente.
- Reproducibilidad y constancia de flujo < 1%.
- Independiente de presión y viscosidad.
- Sin pulsaciones.
- Resistentes a líquidos corrosivos.

En general los sistemas de bombeo se pueden dividir en dos grupos: de presión constante y de flujo constante.(13)

Bombas de flujo constante. La forma más simple de una bomba de

flujo constante, consiste en un pistón accionado por un tornillo, si el tornillo se mueve a una velocidad constante el desplazamiento del pistón será constante y una vez que el sistema ha alcanzado la presión de operación, la velocidad de flujo será también constante.

Bombas de presión constante. La forma más sencilla de una bomba de presión constante consiste en un tubo de acero inoxidable en forma de espiral con fase móvil en su interior, al cual en un extremo se le coloca una columna y en el otro extremo se conecta a una fuente de gas. Cuando el suministro de gas se acciona, el gas desplaza a la fase móvil, forzándola por el sistema. Se debe mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes, la ventaja es que si estos parámetros se controlan, las pulsaciones también.

INYECTOR.

Al situar el inyector antepuesto como es natural a la columna, la introducción de la muestra problema debe hacerse mediante sistemas que, con válvulas generalmente, pueden incorporar esta muestra a la fase móvil y con ello a la columna sin pérdida de presión que altere el flujo supuestamente constante.

Inyector manual. La muestra se introduce con una jeringa y emplea generalmente válvulas inyectoras como la que se ilustra en la FIG. 3. En donde el inyector tipo "Rhedyne" es una válvula de alta presión con 6 (o 4) puertas y dos posiciones. Una de las posiciones comunica directamente la bomba con la columna, mientras que se puede

introducir la muestra en el "loop" a baja presión. El "loop" es en general un capilar externo con un volumen conocido.(12)

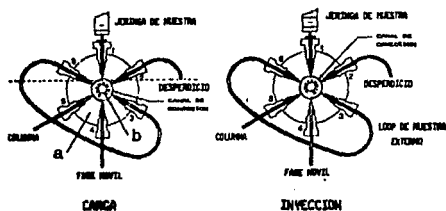


FIG. 3 - Válvula inyectora.

Inyector automático. Inyecta por sí solo las muestras disminuyendo el error en la medición del volumen a inyectar y aumenta la reproducibilidad de las inyecciones.(11)

DETECTOR.

La detección del soluto fue durante mucho tiempo una de las principales dificultades del CLAR. Una de las formas de clasificar el tipo de detector es:(11)

- Detector universal. El cual detecta el eluente y funciona por diferencia entre la respuesta del soluto y la del solvente. Este tipo de detector tiene forzosamente una sensibilidad limitada.
- Detector específico. Tiene una respuesta variable según el tipo de

molécula detectada. Por lo que se buscan detectores que tengan una respuesta mínima con respecto al eluyente y máxima con respecto al soluto.

Un detector ideal sería el que cumpla con los siguientes requisitos:(11)

- altamente sensible
- estable
- de lectura continua y respuesta universal.

Hoy en día no existe un detector ideal y los que se encuentran disponibles sólo son aplicados para casos particulares. Por tanto en un detector, se pretende que la respuesta sea lineal a la concentración para así poder cuantificar la respuesta. Para ello hay que considerar dos aspectos fundamentales previos: la molécula problema debe producir señal en el detector, esto es, modificar la propiedad física medida por este y la intensidad de la señal ha de ser proporcional al número de moléculas que pasan por la cubeta de flujo continuo. En este sentido, se consideran 3 parámetros fundamentales para el detector:(11)

Límite de detección. Es la cantidad mínima detectable de un soluto dado.

Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra; esta proporción se conoce como

linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como una relación entre las concentraciones máximas y mínima respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

Sensibilidad. Se refiere a la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

Se han propuesto una variedad de detectores para Cromatografía Líquida de Alta Resolución basándose en diversos principios de operación, sin embargo sólo algunos son lo suficientemente versátiles para usarse y producirse comercialmente. A continuación se mencionan aquellos que son más usados:(15)

- Detector Ultravioleta
- Detector de Fluorescencia
- Detector de Índice de Refracción
- Detector Electroquímico
- Detector Infra Rojo
- Detector de Conductividad
- Detector de Radioactividad
- Detector de Espectrofotometría de Masas.

- Detector de índice de refracción.(11)

Se basa en el hecho de que la mayoría de líquidos tienen diferente índice de refracción, y por tanto este equipo mide la diferencia entre el índice de refracción del disolvente puro y la solución de la muestra que sale de la columna, de esta manera se

detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. Su sensibilidad es moderada del orden de μg o partes por millón (menor que los detectores de fluorescencia o U.V), por lo cual es poco popular en Cromatografía Líquida.

- Detector Ultravioleta.(11,12)

Estos detectores son los de más uso en CLAR y responden a aquellas sustancias que absorben la luz U.V. El principio de la detección se basa en la absorción de luz provocada por el soluto al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Utilizan generalmente como fuente de luz una lámpara de mercurio de baja presión. El haz de luz, proveniente de la lámpara es primero colimado y después se hace pasar a través de dos celdas, una de ellas de referencia o compensación; los rayos de luz emergentes se hacen pasar por filtros específicos con el objeto de obtener la longitud de onda requerida. La intensidad es medida por una fotocelda doble que genera una señal, que posteriormente es amplificada y representada gráficamente en el registrador. Hay dos tipos de detectores, el de longitud de onda variable que utiliza como fuente luminosa comúnmente una lámpara de deuterio (permite trabajar a una longitud de onda de 190 a 600 nm.), y el de longitud de onda fija en donde la fuente luminosa es una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una longitud de onda de 254 nm.

- Detector de Arreglo de Fotodiodo.(11,14)

Es el principio de detección más moderno que existe para

cromatografía de líquidos, cubre un intervalo de longitud de onda desde UV hasta cerca de IR. Obtiene absorción UV/visible simultáneamente por lo que se pueden construir cromatogramas en tercera dimensión (absorbancia vs. tiempo vs. longitud de onda). Utiliza una lámpara de deuterio, la cual emite una luz que pasa a través de un lente y de una abertura, limitando la cantidad de luz que penetra al sistema proveniente de la lámpara para después entrar en la celda. Toda la luz proveniente de la lámpara pasa a través de la celda y viaja hasta el monocromador de óptica inversa donde es dispersada en todas sus longitudes de onda y es así como llega hasta el arreglo de fotodiodos. Cuando la luz incide sobre los fotodiodos, la energía luminosa para cada longitud de onda no llega a un fotodiodo en particular, sino que éstos están dispuestos en tal forma que sólo reciben la energía luminosa correspondiente a un intervalo pequeño de longitud de onda del total del espectro. Los fotodiodos al recibir la señal luminosa se descargan en una cierta medida, la descarga de los fotodiodos es directamente proporcional a la cantidad de muestra y por consiguiente a la absorbancia. Cada fotodiodo produce una señal análoga, la cual es directamente proporcional a la cantidad de luz que recibe. La longitud de onda de la luz que recibe un fotodiodo en particular es determinada, por la posición relativa del diodo respecto a la posición del monocromador de diafragma.

COLUMNA.

Es la parte central del sistema cromatográfico, es en ella en donde se lleva a cabo la separación. La columna está constituida por un tubo de acero inoxidable (de vidrio o titanio en ciertos casos)

la cual contiene la fase estacionaria que esta constituida de partículas de diámetro muy pequeño (5 a 15 μ); las más comunes tienen un diámetro interno entre 2-5 mm y una longitud de 3 a 30 cm. En general las columnas para cromatografía líquida tienen una gran duración y una gran vida de servicio útil, a menos que se utilicen eluentes extremadamente ácidos o básicos, o se fraccione por el mal cuidado. El relleno, idealmente, debe producir la máxima resolución en el menor tiempo, tener la máxima capacidad de muestra, ser fácilmente empacable, producir pequeñas caídas de presión y ser barato. Las partículas del relleno sirven como fase estacionaria o bien de soporte para la misma, la naturaleza de la fase estacionaria esta en función de la separación a la que se pretende aplicar.(11)

En CLAR el material de empaque consiste de gel de sílice en forma de partículas completamente porosas o de bolas de vidrio esféricas que están recubiertas de una delgada capa de gel de sílice distribuida irregularmente. La sílice está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano (Si-O-Si) con grupos silanol (Si-OH) de superficie, que pueden interaccionar con las moléculas de la muestra. Los grupos hidroxilo son los más importantes, existen 2 tipos: los libres y los reactivos, estos últimos constituyen agentes enlazantes muy fuertes que pueden absorber permanentemente los compuestos polares de la muestra y que absorben el agua en la gel.(16)

Fase Estacionaria. La selección de la fase estacionaria define en gran medida el éxito de la separación de solutos con diferentes características y propiedades. El comportamiento de la fase estacionaria se comprende al conocer sus propiedades físicas; dentro

de estas propiedades físicas se destacan el tamaño de partícula, diámetro y volumen de los poros, la cantidad de carbón y el proceso de recubrimiento final o end-capping. Cada una de ellas afecta importantemente el desempeño del material de empaque y en forma definitiva a la separación cromatográfica.(15)

Los grupos silanol se hacen reaccionar con agentes silanizantes para producir la fase C-18 (ODS) debido a un impedimento estérico (del radical C-18 sobre los grupos silanol) solo el 30-40% de todos los silanoles se recubren. La reacción, posterior con una molécula más pequeña (TMS) recubre una cantidad adicional de radicales -O-OH (tal procedimiento se conoce como End-Capping).(15)

Los grupos -Si-OH no recubiertos exhiben su carácter reactivo cuando se hallan en presencia de moléculas de muestras básicas lo cual se traduce en pobres separaciones.(15)

2.2. FARMACOLOGIA. (10)

La griseofulvina es un antibiótico antimicótico de espectro reducido. Es producido por diversas cepas de Penicillium, principalmente la Penicillium griseofulvum. Inhibe el crecimiento in vitro de diversas especies de Microsporum, Epydermophyton y Trichophyton; tienen efectos fungostáticos y fungicidas. Su efecto fungicida se observa en los organismos en rápido crecimiento, ya que uno de sus efectos importantes es la inhibición de la mitosis en los hongos. Posee una acción epiceas en la dermatofitosis producida por hongos del género Trichophyton y género Microsporum. La griseofulvina se absorbe bien cuando se administra por vía bucal y parenteral, la absorción en el tubo digestivo depende del tamaño de partículas, de tal forma que si son pequeñas (2.7 fm de diámetro) se absorben más por su mayor superficie. En la sangre la griseofulvina se encuentra combinada con las proteínas en un 80%, pasa a los tejidos y se deposita especialmente en la piel, en las células basales de la epidermis, de tal manera que cuando se vuelven queratinizadas retienen suficiente cantidad de la droga para inhibir el crecimiento del dermatofito. La inhibición se produce cuando la griseofulvina interrumpe la etapa del huso mitótico al interactuar con los microtubulos polimerizados. El antibiótico presente en estas células persiste por un tiempo, de tal forma que la queratina se hace resistente a la invasión micótica impidiendo la enfermedad en el crecimiento de pelo y uñas nuevas. La mayor parte del fármaco se elimina sin cambio através de las héces y un 0.6% se elimina por la orina.

2.3. GENERALIDADES.

a) NOMBRE QUIMICO. (2):

1. -7-cloro-2',4,6-trimetoxi-6'β-metilespiro(benzofuran-2(3H),1'-(2) -ciclohexanol) 3,4'diona.
2. -7-cloro-4,6-dimetoxicumaran-3-ona-2-spiro-1'-(2'-metoxi-6-metilciclohexano-2'-en-4'-ona.

b) FORMULA CONDENSADA. (2):



c) FORMULA DESARROLLADA. (1):

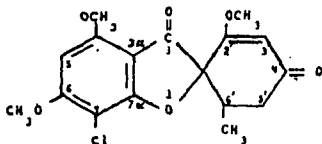


FIG.4 Estructura Química de Griseofulvina.

d) PESO MOLECULAR. (1):

352.77

e) DESCRIPCION. (1):

Polvo cristalino blanco o amarillo pálido,
inodoro.

f) ESPECTRO ULTRAVIOLETA. (1):

El espectro UV de una sustancia patrón de griseofulvina en metanol anhidro a 25°C se muestra en la figura 5, con los siguientes valores de absorción:

Pico máximo a 324; a:15.5

Pico máximo a 291; a:68.3

Pico máximo a 235; a:64.0

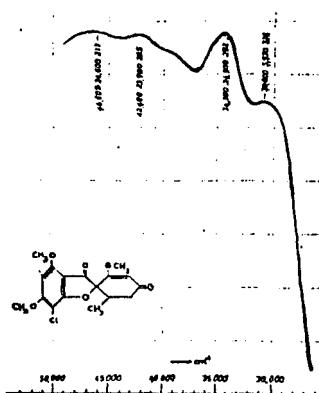


FIG. 5. Espectro UV de griseofulvina.

g) SOLUBILIDAD A 25°C. (1):

SOLUBILIDAD A 25°C. (1)	
Disolventes	Solubilidad (g/l)
Acetona	30
Dicloroetano	80
Dimetilacetamida	40
Dioxano	30
Eter etílico	0.7
Heptano	0.3
Metanol	0.4
Agua	0.2

TABLA 1. SOLUBILIDAD A 25° DE GRISEOFULVINA.

h) METODOS DE ANALISIS.

1. Identificación (2). Se detecta en el momento en que una coloración roja es producida con 5 mg de griseofulvina disuelta en 1 ml de ácido sulfúrico y agregando 5 mg de dicromato de potasio en polvo.

2. Análisis Espectrofluorométrico (1). Se realiza en etanol acuoso al 1%, con activación máxima de 295 y 335 nm, fluorescencia máxima a 450 nm ó metanol anhidro con activación máxima a 295 y 335 nm, fluorescencia máxima 420 nm.

3. Análisis colorimétrico (1). Se lleva a cabo calentando la griseofulvina con hidrazona-ácido isonicotínico en medio alcalino. El color amarillo-naranja absorbe a 420 nm.

4. Análisis Cromatográficos.

4.1 Cromatografía de Partición en Columna (1). Este método es utilizado principalmente para separar impurezas de griseofulvina en medios de cultivo, tales como: tetrahidrogriseofulvina, dihidrogriseofulvina, isogriseofulvina y diclorogriseofulvina. Se lleva a cabo en una columna empacada con celita y un sistema de solventes metanol : agua : hexano : cloroformo (8:2:9:1) respectivamente.

Cromatografía en Papel (1). Es un método de identificación para griseofulvina y se lleva a cabo de la siguiente forma:

Sistema de Solventes	Papel	Detector
Benceno:Ciclohexano:Metanol:Agua(5:5:6:4)siendo adherido ácido acético glacial al 5% a la fase orgánica después del equilibrio.	Whatman No.1	UV

TABLA 2. METODO DE IDENTIFICACION DE GRISEOFULVINA POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

4.3. Cromatografía en Capa Fina (1). Algunos sistemas en cromatografía de Capa Fina utilizados para detectar griseofulvina son los siguientes:

Sistemas de Solventes	Adsorbente	Tiempo de Retención.
Cloroformo:Isopropanol (3:1)	Silica Gel	0.80
Metanol:Benceno (2:98)	Silica Gel	0.50
Cloroformo:Acetona (93:7)	Silica Gel	0.65

TABLA 3. SISTEMA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

4.4. Cromatografía de gases (1). Un método analítico desarrollado para griseofulvina en donde se determina exactitud y precisión por cromatografía de gases se realiza bajo las siguientes condiciones:

Columna	Gas Acarreador	Temperatura de Columna	Estandar Interno
5ft x 4mm ID. Columna de vidrio. 3 % OV-17 en Cromosorb W.	10% Metano 90% Argon ó Nitrogeno.	270°C	Diazepam

TABLA 4. METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA DE GASES PARA GRISEOFULVINA.

4.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La investigación de métodos analíticos para griseofulvina por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución se ha desarrollado. Mediante las siguientes condiciones:

Columna	Fase Movil	Tipo de Cromatografía.	Detector (nm)	Velocidad ml/min	tr (min)
μ Bondapak C (Ref.8)	45% Acetonitrilo en ácido acético pH=3.	Fase Reversa	UV 290nm F. 290nm	1.0	9.0
μ Bondapak C (Ref.9)	Acetonitrilo en 45mM de KH_2PO_4 pH=3.	Fase Reversa	UV 295nm	2.5	4.8
μ Bondapak C (Ref.13)	Solvente 1°:Heptano 100%, 2°:Metanol Isopropanol (1:1)	Fase Reversa	UV 254nm	1.5 a 2.0	3.6
μ Bondapak C (Ref.10)	Agua:Acetonitrilo (1:1)	Fase Reversa	F. 260nm	2.0	3.8
μ Bondapak C (Ref.11)	45% Acetonitrilo-Agua. pH=3.4	Fase Reversa	UV 290nm F. 280nm	1.0	---
Zorbax CN (Ref.14)	Metanol: Agua (3:2)	Fase Reversa	UV 254nm	1.0 a 2.0	6.3
Permafase ETH 5%. (Ref.1)	Cloroformo en Hexano	Fase Normal	-----	---	---

TABLA 5. METODOS ANALICOS POR CLAR PARA CUANTIFICAR GRISEOFULVINA.

2.4. CRITERIOS DE VALIDACION. (19,20)

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido mediante estudios de laboratorio la confiabilidad de una metodología.

La validación incluye dos partes:

1) Sistema

- Precisión
- Linealidad

2) Método

- Especificidad.
- Exactitud.
- Linealidad.
- Precisión.
- Estabilidad de la Muestra.

2.4.1. EVALUACION DEL SISTEMA.

PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Es el grado de concordancia de medidas individuales de un proceso. Se determina evaluando por lo menos 6 replicaciones de la solución del principio activo a la concentración del 100 % de lo que indica el método, preparadas a partir de una misma solución concentrada y analizándola bajo las condiciones cromatográficas preestablecidas.

a) Criterios:

1. Coeficiente de Variación $< 2.0 \%$

b) Cálculos:

$$CV = (S / \bar{X}) 100$$

LINEALIDAD.

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de las sustancias dentro de un intervalo determinado. Se establece realizando una gráfica de concentración (utilizando diferentes niveles de concentración del principio activo preparados a partir de una misma solución patrón), contra la respuesta del equipo (absorbancia, area, etc.) y comprobando un comportamiento de $y = mx + b$, en donde la pendiente relativa (PR) y el intercepto (b) no sean estadísticamente diferentes de 1 y 0 respectivamente.

a) Criterios:

1. Intercepto (b)

$$t_{cal.} < t_{97.5\% n-2 gl.}$$

$$H_0: \text{intercepto} = 0$$

$$H_a: \text{intercepto} \neq 0$$

$$LIIC < 0 > LSIC$$

LIIS= Límite Inferior del Intervalo de Confianza.

LSIC= Límite Superior del Intervalo de Confianza.

2. Pendiente (m)

$$t_{\text{cal.}} < t_{\text{cr.}} \text{ a } \alpha = 1 \text{ gl.}$$

$$H_0: \text{Pendiente} = 1$$

$$H_a: \text{Pendiente} \neq 1$$

$$LIIC < 1 > LSIC$$

3. Coeficiente de Determinación (r^2)

$$r^2 \geq 0.98$$

4. Coeficiente de variación (CV)

$$CV < 1.5\%$$

2.4.2. EVALUACION DEL METODO.

ESPECIFICIDAD.

Es la habilidad de un método analítico para determinar solamente el componente que se va a analizar. Se demuestra estableciendo experimentalmente que el método sea capaz de separar y cuantificar sólo lo que se desea, sin que intervengan productos de degradación o de formación, precursores de síntesis, etc.

La especificidad de un método analítico se demuestra al comparar los resultados de análisis de muestras que contienen impurezas, placebo, o producto de degradación o formación, con muestras que carecen de lo anterior. Cuando las impurezas o productos de degradación no son conocidas, la especificidad se demuestra obteniendo los primeros y más importantes productos de degradación a través de reacciones simuladas

y controladas de degradación. Para esto se someten a degradación por las vías más comunes: hidrólisis ácida, básica, oxidación y fotólisis, a principios activos, placebo ó formulación.

a) Criterio:

Se seleccionan las condiciones adecuadas de degradación hasta obtener una descomposición de la molécula del 10 al 30 %, con lo cual se asegura que los productos de degradación obtenidos se encuentran en una concentración tal que puede ser detectada por el método analítico.

EXACTITUD.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina, cuando menos, por el estudio de 6 placebos cargados al 100% de la cantidad a analizar.

a) Criterio:

1. $CV < 2 \%$
2. $LIIC < 100 < LSIC$
3. $102 \% > \mu > 98 \%$

LINEALIDAD.

Se establece comprobando que la gráfica obtenida de la cantidad adicionada (de placebos adicionando diferentes cantidades de la substancia de interés) contra la cantidad recuperada (cantidad cuantificada de principio activo con el método de análisis propuesto) tenga un comportamiento de $y = mx + b$, donde m y b no son

estadísticamente diferente de 1 y 0 respectivamente.

a) Criterios:

1. Coeficiente de Correlación (r)

$$r \geq 0.98$$

2. Coeficiente de Determinación (r^2)

$$r^2 \geq 0.98$$

3. b = Intercepto

$$t \text{ cal.} < t_{0.995, n-2, 91}$$

Ho: Intercepto = 0

Ha: Intercepto \neq 0

$$LIIC < 0 > LSIC$$

4. m = Pendiente

$$t \text{ cal} < t_{0.995, n-2, 91}$$

Ho: Pendiente = 1

Ha: Pendiente \neq 1

$$LIIC < 1 > LSIC$$

5. Intervalo de Confianza

$$102\% > \mu > 98\%$$

PRECISION.

Es el grado de concordancia de medidas individuales cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación. Se puede medir de la siguiente manera:

1) Repetibilidad.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes

realizadas por un solo analista, utilizando los mismos aparatos y técnicas.

Se analizan 6 muestras al menos de una muestra homogénea utilizando el método propuesto.

a) Criterios:

C.V. < 2%

II) Reproducibilidad.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes aparatos.

Se analiza una muestra homogénea por triplicado por cada uno de dos analistas en dos días diferentes, utilizando un modelo anidado, de dos factores (A:analista, D:día).

a)Criterios:

CV < 2%

VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	F teo
ANALISTA	$gla=a-1$	Sca	$\frac{Sca}{gla}$ Mca=-----	$\frac{Mca}{Mcd}$ Fa=-----	$\frac{F gla}{gld}$ -----
DIA	$gld=(d-1)$	Scd	$\frac{Scd}{gld}$ Mcd=-----	$\frac{Mcd}{Mce}$ Fd=-----	$\frac{F gld}{gle}$ -----
ERROR	$gle=(r-1)$	Scce	$\frac{Scce}{gle}$ Mce=-----	-----	-----

TABLA 6. CALCULOS EN EL ANALISIS DE VARIANZA.

ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE LA MUESTRA.

Es el tiempo mediante el cual una muestra lista para su análisis permanece sin cambio bajo condiciones de almacenamiento. Se determina cuantificando una sola muestra preparada para su análisis después de un tiempo razonable, almacenado a diferentes condiciones.

a) Criterios:

No más del 2 % de diferencia en la cuantificación de cada una de las muestras, a las condiciones probadas, con respecto al análisis inicial.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a la gran frecuencia de aparición y gravedad de las infecciones micóticas se propició la búsqueda de agentes terapéuticos específicos, encontrando compuestos antimicóticos prácticos para todas las enfermedades ocasionadas por hongos, entre los cuales se encuentra la griseofulvina que es un antibiótico antimicótico, con la propiedad de ser un fármaco extremadamente liposoluble y por consecuencia difícil de ser absorbido, por lo que se pretende en la actualidad llevar a cabo un proceso en el que se pueda preparar a la griseofulvina con microacarreadores. En consecuencia, para que un proceso pueda considerarse confiable y consistente se debe tener bajo control materias primas y materiales, por tanto en este trabajo se pretende implementar un método analítico para griseofulvina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución que determine el principio activo en la muestra principalmente, y la validación del método analítico para tener confiabilidad y consistencia en él.

Para llevar a cabo la validación de un método analítico es necesario determinar ciertos parámetros estadísticos, como son: Linealidad, Exactitud, Precisión, Especificidad, Estabilidad de la muestra y Sensitividad.

La implementación y el desarrollo del método analítico se realizara empleando Cromatografía Líquida de alta Resolución con un cromatógrafo Perkin-Elmer HPLC 3D con detector U.V. (254 nm), localizado en la Planta Piloto de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Todo esto con el propósito de cimentar un panorama más

amplio con respecto a los conceptos de validación y de CLAR., para los futuros profesionistas del área farmacéutica, proporcionándoles también las herramientas indispensables para poder enfrentarse al desarrollo tecnológico que se tiene en las técnicas analíticas cada día.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Implementar un método analítico empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución para cuantificar griseofulvina como materia prima, y realizar la validación del método propuesto.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Desarrollar un protocolo de validación para la griseofulvina, con las instalaciones y equipo con que cuenta la Planta Piloto de la FES-Zaragoza.

- Puntualizar el método de análisis y llevar a cabo la validación.

- Recopilar datos y analizar los parámetros obtenidos de el método analítico.

V. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Al considerar la solubilidad de la griseofulvina, se podrá establecer con suficiente criterio la fase móvil que permitirá cuantificarla por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, asimismo al evaluar los parámetros indispensables para dar confiabilidad a un método analítico como son: precisión, exactitud, especificidad y estabilidad de la muestra, es posible decir que el método puede estar validado, siempre y cuando dichos parámetros se encuentren dentro de los límites establecidos oficialmente.

VI. PARTE EXPERIMENTAL.

6.1. EQUIPO, MATERIAL Y METODO.

EQUIPO.

- Sistema Perkin-Elmer HPLC 3D, consta de dos unidades:
Bomba serie 100
Detector TriDet (incluye inyector).
- Balanza analítica Mettler H35AR
- Baño de ultrasonido Cole-Palmer modelo 8851
- Registrador Perkin-Elmer

MATERIAL.

- Microjeringa de 100 μ l.
- Equipo de filtración Millipore
- Membrana de filtración FP Vericel 45 μ m.
- Columna C. μ Bondapak de acero inoxidable 3.9 mm x 300 mm.

METODO.

Protocolo para llevar a cabo la validación del método analítico:

1) Muestras

Materia Prima: Griseofulvina.

Estándar Secundario: Griseofulvina.

2) Condiciones Cromatográficas:

Columna de acero inoxidable empacada con fase reversa químicamente unida C₈.

Fase Móvil: Acetonitrilo-Agua (1:1) grado HPLC.

Flujo: 1.5 ml/min.

Temperatura: 27°C.

Detector Ultravioleta 254 nm, trabajando con atenuación de 8.

Registrador: Determinar los parámetros en base al pico obtenido en un principio.

3) Análisis de la Muestra.

- Curva de calibración: Se prepararon 5 diluciones de griseofulvina con concentraciones de 6.0, 30, 50, 100 y 150 µg/ml por duplicado.

Las diluciones y los aforos correspondientes a la preparación de muestras para la curva de calibración se llevaron a cabo con fase móvil. La preparación de la muestra de griseofulvina se realizó de la misma forma que la del estándar secundario.

Se inyectaron 20 µl de preparación de griseofulvina por triplicado. Se graficó área vs concentración. Se trazó la recta de regresión y reportó el coeficiente de variación y ordenada al origen con su intervalo de confianza.

Preparación de la muestra. Se pesó 125 mg de griseofulvina, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver con 25 ml de fase móvil colocándolo en el baño de ultrasonido por 2 min con agitación constante y llevar al aforo con la misma fase móvil. Se tomó una alícuota de 1 ml, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 ml y se llevo al aforó con fase móvil. Se filtró la solución a través de un filtro con diámetro de poro de 0.45μ en un vial, se agitó en baño de ultrasonido por 5 minutos y se inyectaron $20 \mu\text{l}$, se midió la curva de correlación, así como se realizan los cálculos matemáticos necesarios para determinar el contenido de griseofulvina en la muestra.

4) Preparación de la Fase Móvil.

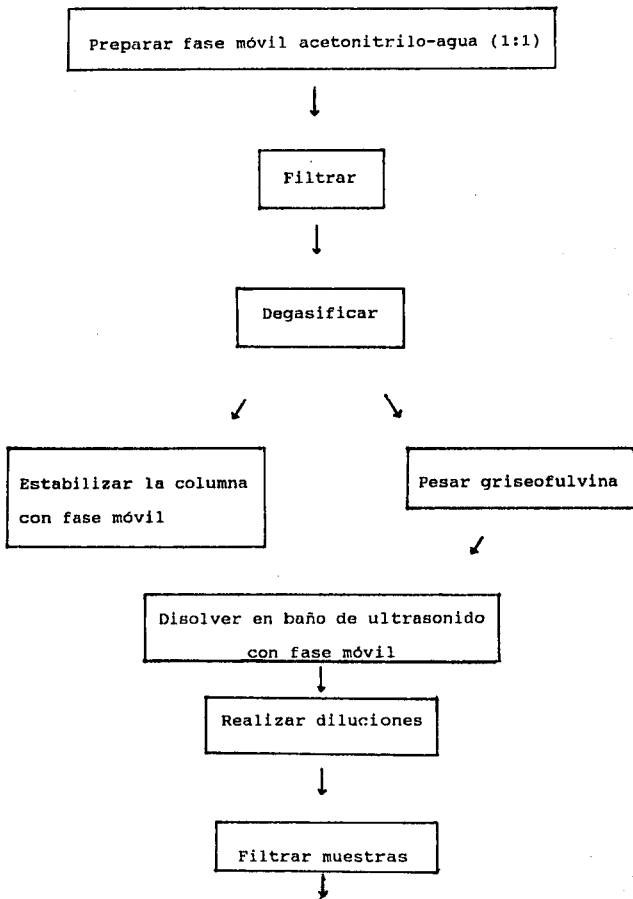
Fase móvil: Acetonitrilo-Agua (1:1). Se adicionaron cantidades iguales de acetonitrilo y de agua grado CLAR en un matraz Erlenmeyer, con una pipeta volumétrica.

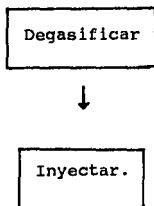
La fase móvil se pasó por el equipo de filtración con un filtro de poro 0.5μ y se colocó en el baño de ultrasonido por 5 min.

5) Preparación de el Estándar Secundario.

Se pesó la cantidad necesaria de griseofulvina para obtener la concentración para la evaluación de cada parametro, se adicionó cuantitativamente a un matraz volumétrico se agregó una parte de la fase móvil. Se disolvió en baño de ultrasonido por tres minutos, posteriormente se adicionó la fase móvil hasta el aforo.

DIAGRAMA DE FLUJO





PARAMETROS DE VALIDACION EVALUADOS.

Linealidad del sistema. Se llevó a cabo mediante la preparación de un stock de griseofulvina, se pesó 125 mg de griseofulvina en matraces volumétricos de 50 ml y se llevó al aforo con fase móvil, se tomaron alícuotas de 0.5, 3, 0.5, 1 y 5 ml, se pasaron a matraces volumétricos y se llevó al aforo. Se filtraron con ayuda de una jeringa a través de membrana de 0.45 μ , se inyectaron al cromatógrafo.

Precisión del sistema. Se llevó a cabo con 6 muestras de una misma solución estándar correspondiente al 100% de griseofulvina.

Especificidad del método. Con el método propuesto se realizó el análisis para la griseofulvina como materia prima, estándar, y materia prima más estándar a la misma concentración.

Linealidad del método. Se realizó por triplicado el análisis, con 5 diferentes niveles de concentración que fueron: 6%, 30%, 50%, 100% y 120%, los cuales se realizaron mediante pesadas independientes

Exactitud y Repetibilidad al 100%. Utilizando el método propuesto

y haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación, se determinaron 6 muestras iguales de manera independiente equivalentes al 100% de griseofulvina.

Precisión. Apartir de una muestra homogénea de griseofulvina al 100% y en las mismas condiciones de operación para el método propuesto, la muestra se analiza por triplicado con dos analistas en dos días diferentes.

Estabilidad de la muestra. Se realizó analizando con el método propuesto 3 muestras con el 100% de griseofulvina, reanalizando las mismas muestras después de permanecer 24 hrs. en viales de plástico a temperatura ambiente y refrigeración, y comparando con una muestra de preparación reciente.

VII. RESULTADOS.

7.1 IMPLEMENTACION DEL METODO.

FASE INICIAL (Utilizando un Graficador GOW MAC
INSTRUMENT CO. MODELO 70-750)

SOLUBILIDAD

Acetonitrilo	+
Metanol	+
Agua-acetonitrilo (26:74)	+ + +
Agua-acetonitrilo (40:60)	+ +
Agua-acetonitrilo (50:50)	+ +

+ = significa la velocidad de disolución de la
griseofulvina en el disolvente.

AJUSTE DE PARAMETROS DEL CROMATOGRAFO

ATENUACION	VELOCIDAD DE CARTA (cm/hr)	VELOCIDAD DE FLUJO (ml/min)	TIEMPO DE RETENCION (seg)	RESULTADOS
4	20	1.0	7.13	PICOS MUY PEQUEÑOS Y ASIMETRICOS
16	20	1.0	7.15	PICOS MUY PEQUEÑOS Y ASIMETRICOS
4	20	1.5	4.30	PICOS PEQUEÑOS SIMETRICOS
16	20	1.5	4.43	PICOS SIMETRICOS

LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de cuantificación mínimo se realizaron a concentraciones de: 3, 2, 1, 0.5, 0.1 y 0.05 $\mu\text{g/ml}$. Y se logró medir el área bajo la curva únicamente de la concentración de 3.1 $\mu\text{g/ml}$.

El límite de cuantificación máximo se realizaron a concentraciones de: 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron picos medibles con 50 , 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

La implementación del método se realizó en un graficador GOW MAC, posteriormente debido a un problema de medición en el área bajo la curva de los picos obtenidos, nos llevó a utilizar un integrador Perkin-Elmer.

FASE FINAL (Utilizando un Integrador Perkin-Elmer)

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (1:1)

Velocidad de flujo: 1.5 ml/min

Atenuación: 8

Tipo del cálculo del pico: Area bajo la curva (ABC)

Integración del pico: base a base

Sensibilidad del área de inyección: 50

Velocidad de carta: 10 mm/min

7.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$) X	RESPUESTA (AREA BAJO LA CURVA)	
	Y.1	Y.2
6.000	87736	87529
30.080	450926	449644
50.400	736900	732881
99.920	1543595	1549999
128.320	2121584	2142344

**TABLA 7: RESULTADOS ANALITICOS DE CONCENTRACION VS RESPUESTA
PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

CALCULOS.

COEFICIENTE DE CORRELACION, COEFICIENTE DE DETERMINACION,
PENDIENTE Y LA ORDENADA AL ORIGEN.

Cálculos Preliminares.

$$EX=629.444$$

$$EY=9903138$$

$$EX^2=59861.9904$$

$$EY^2=1.5376947999e9$$

EXY=958476851.4

Cálculos Finales..

$r=0.9980$

$r^2=0.9961$

$m=16555.93$

$b=-51782.673$

COEFICIENTE DE VARIACION.

PORCIENTO ADICIONADO	PORCIENTO RECUPERADO	
100.000	98.881	97.751
100.000	99.484	99.700
100.000	99.610	99.066
100.000	98.093	98.500
100.000	98.363	99.325

TABLA 8. PORCIENTO RECUPERADO PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Cálculos Preliminares.

$\bar{X}=98.927$

DE=0.7410

Cálculos Finales

CV=0.7490

CONTRASTE DE HIPOTESIS.

PENDIENTE

INTERCEPTO

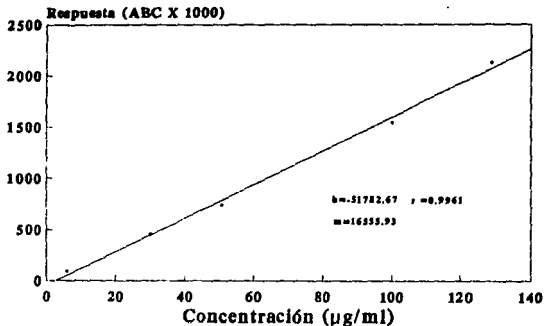
tcal=48.13

tcal=-0.5836

LC_a=(17349<1<15762)

LC_a=(-124566<0<4842)

GRAFICA.



Gráfica 1: Linealidad del sistema por CLAR para Griseofulvina (Materia prima).

7.3 PRECISION DEL SISTEMA.

CANTIDAD ADICIONADA ($\mu\text{g/ml}$)	RESPUESTA (ABC)
100.000	1181506
100.000	1212839
100.000	1193485
100.000	1198418
100.000	1212506

TABLA 9. RESULTADOS ANALITICOS PARA LA PRECISION DEL SISTEMA.

CALCULOS.

COEFICIENTE DE VARIACION.

Cálculos Preliminares.

$$\Sigma Y = 5998754$$

$$\Sigma Y^2 = 7.1977 \times 10^{12}$$

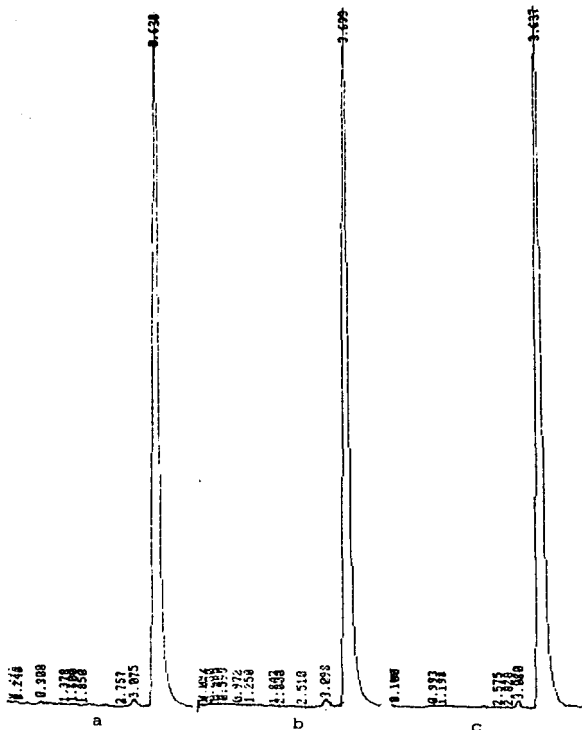
$$\bar{Y} = 1199750.8$$

$$DE = 13303.2457$$

Cálculos Finales.

$$CV = 1.1088$$

7.4 ESPECIFICIDAD DEL METODO.



Cromatograma que muestran la especificidad del método. (a) Solución estándar, (b) solución Materia prima y (c) Materia prima-estándar (1:1).

7.5 LINEALIDAD DEL METODO.

CANTIDAD ADICIONADA ($\mu\text{g/ml}$)			CANTIDAD RECUPERADA ($\mu\text{g/ml}$)		
X.1	X.2	X.3	Y.1	Y.2	Y.3
5.960	5.960	6.040	6.040	5.916	5.900
29.760	29.760	30.008	30.576	29.263	30.280
50.000	50.000	50.000	49.693	49.005	48.512
100.080	100.160	100.160	102.205	100.250	101.541
137.440	137.440	137.600	138.521	135.262	139.565

TABLA 10. RESULTADOS ANALITICOS DE CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA PARA LA LINEALIDAD DEL METODO.

CALCULOS.

COEFICIENTE DE CORRELACION, COEFICIENTE DE DETERMINACION,
PENDIENTE Y LA ORDENADA AL ORIGEN.

Cálculos Preliminares.

$$\Sigma X = 970.84$$

$$\Sigma Y = 972.28$$

$$\Sigma X^2 = 97117.13$$

$$\Sigma Y^2 = 97793.10$$

$$\Sigma XY = 97444.22$$

Cálculos Finales

$$r=0.9997$$

$$r^2=0.9994$$

$$m=1.0068$$

$$b=-0.03449$$

PORCIENTO ADICIONADO	PORCIENTO RECUPERADO		
100.00	98.665	99.266	97.686
100.00	102.880	98.333	99.828
100.00	99.386	98.011	96.254
100.00	102.287	100.090	101.678
100.00	100.780	98.416	101.428

TABLA 11. PORCIENTO RECUPERADA PARA LA LINEALIDAD DEL METODO

CALCULOS CON LOS PORCIENTOS DE RECOBRO PARA EL COEFICIENTE DE VARIACION.

Cálculos Preliminares.

$$\bar{R}=99.6661$$

$$ER=1494.99$$

$$ER^2=149048.80$$

DE=1.8646

Cálculos Finales.

CV=1.8709

INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL PORCIENTO DE RECOBRO.

Cálculos Preliminares.

$\bar{R}=99.6661$

DE=1.8646

Cálculos Finales.

IC=(98.6260 < μ < 100.7061)

El intervalo de confianza anterior se realizó tomando en cuenta una t de student con n-1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

CONTRASTE DE HIPOTESIS.

PENDIENTE

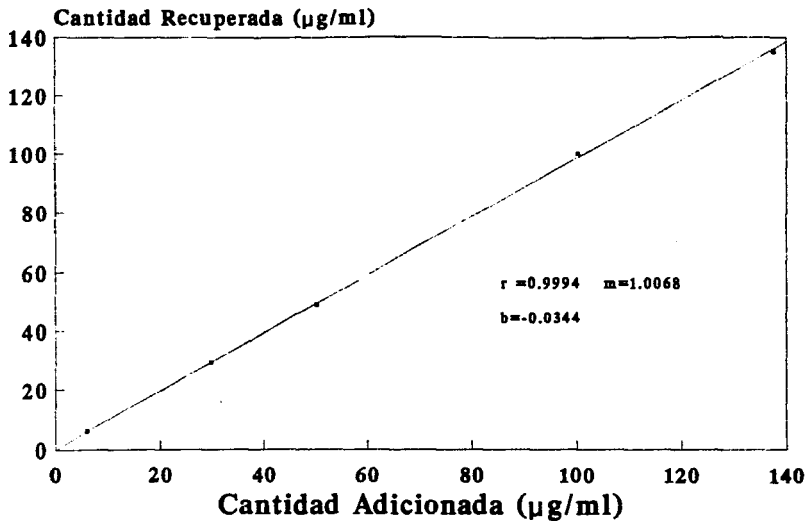
tcal=1.0229

LC_s=(0.9925 < 1 < 1.021)

INTERCEPTO

tcal=0.1613

LC_s=(-0.1524 < 0 < 0.0836)



Gráfica 2: Linearidad de método por CLAR para Griseofulvina (Materia prima).

7.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.

PORCIENTO ADICIONADO	PORCIENTO RECUPERADO
100.000	98.116
100.000	99.796
100.000	99.225
100.000	99.009
100.000	99.050
100.000	100.630

TABLA 12. RESULTADOS ANALITICOS DEL PORCIENTO RECUPERADO PARA LA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.

CALCULOS.

COEFICIENTE DE VARIACION.

Cálculos Preliminares.

$$ER=595.82$$

$$ER^2=59172.16$$

$$\bar{R}=99.3047$$

$$DE=0.8446$$

Cálculos Finales.

CV=0.8505

INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL PORCIENTO DE RECOBRO.

Cálculos Preliminares.

$\bar{R}=99.3047$

DE=0.8446

Cálculos Finales.

El siguiente intervalo de confianza se realiza tomando en cuenta una t de student con n-1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

IC=(98.4886 < μ < 100.1193)

7.7 PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).

		A N A L I S T A (i)	
		1	2
D	1	96.50	100.48
		99.35	100.49
		97.94	99.34
I	2	97.42	99.32
		100.53	100.36
		98.54	98.49
A	(j)		

TABLA 13. PORCIENTO DE RECOBRO POR DIA Y POR ANALISTA,
PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

CALCULOS.

COEFICIENTE DE VARIACION.

Cálculos Preliminares.

$$EY=1188.8095$$

$$EY=117791.56$$

$$\bar{Y}=99.0674$$

DE=1.3221

Cálculos Finales.

CV=1.3354

ANALISIS DE VARIANZA.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal	F teo
ANALISTA	1	5.7176	5.7176	5.6898	38.51
DIA	2	1.9746	0.9873	0.6787	6.06
ERROR	8	11.6374	1.4546	----	----

TABLA 14. ANALISIS DE VARIANZA PARA CADA UNA DE LAS FUENTES DE VARIACION EN LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO.

El valor del F teorico es tomando en cuenta los grados de libertad del denominador y con una probabilidad acumulada de 0.975.

7.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

PORCIENTO ADICIONADO t ₀	PORCIENTO RECUPERADO	
	Temperatura ambiente t ₂₄	Refrigeración t ₂₄
100.60	95.604	101.324
103.35	97.144	100.165

TABLA 15. PORCENTAJE RECUPERADO DEL ANALISIS INICIAL Y 24 HORAS DESPUES A TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACION PARA LA MUESTRA ANALITICA.

CALCULOS.

INTERVALOS DE CONFIANZA.

Cálculos Preliminares.

Temperatura Ambiente.

$$\bar{Y}=96.3745$$

$$S^2=1.0890$$

Refrigeración.

$$\bar{Y}=100.7451$$

$$S^2=0.8199$$

Cálculos Finales.

El valor de t de Dunnett contemplado para el cálculo de este intervalo es tomando en cuenta dos comparaciones 4 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Temperatura Ambiente (24 hrs):

IC=(-3.161 a -8.0576)

Refrigeración (24hrs):

IC=(-3.3521 a 0.8747)

FACTOR I.

Temperatura Ambiente:

$\bar{I}=94.5066$

Refrigeración:

$\bar{I}=98.8108$

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.

8.1. METODO ANALITICO IMPLEMENTADO.

Nation L. Roger (6) describe un método por CLAR para la determinación cuantitativa de griseofulvina. Las condiciones de trabajo son: velocidad de flujo de 2.0 ml/min y fase móvil:Acetonitrilo-agua(1:1), se obtuvo un tiempo de retención de 3.8 min, por otro lado el presente trabajo utilizó una velocidad de flujo de 1.5 ml/min dando un tiempo de retención 3.6 min promedio. National utilizó un detector de fluorescencia a una longitud de onda de 290 nm, en donde la molécula de griseofulvina presenta un máximo de absorción, mientras que en este caso el detector con el cual se trabajo fue ultravioleta de longitud de onda fija en 254 nm, sin embargo estas modificaciones no manifiestan interferencia en la detección de la molécula.

La griseofulvina se disolvió a mayor velocidad en la mezcla agua-acetonitrilo (40:60) y (50-50), por lo que se decidió trabajar la fase móvil en la proporción agua-acetonitrilo (50-50) al comprobar que esta daba un buen tiempo de retención y un pico simétrico.

Después de ajustar las condiciones de la cromatografía, se establecieron las siguientes:

Fase móvil: Acetonitrilo:agua (1:1)

Velocidad de flujo: 1.5 ml/min

Atenuación: 8

Tipo del cálculo del pico: Area bajo la curva

Integración del pico: base a base

Sensibilidad del área de inyección: 50.

Velocidad de carta: 10 mm/min.

8.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Los resultados obtenidos en la evaluación de linealidad del sistema muestran que $r=0.9980$ es mayor que la $r=0.98$ sugerida para el coeficiente de correlación, por tanto existe una probabilidad de 0.99 para la variación de 0.01% de los resultados obtenidos respecto a la mejor línea de ajuste. Dando una pendiente de 16555.93 y una ordenada al origen de -51782.67 no se tiene una relación proporcional entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. Obteniendo una $t_{cal}= 0.5813$ menor que la t teórica para el intercepto y un intervalo de confianza en donde se incluye al cero, para la pendiente una $t_{cal}= 48.13$ mayor que la teórica y un intervalo de confianza que no incluye al 1, por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero y la pendiente si es significativamente diferente de uno. Siendo el coeficiente de variación igual a 0.7490% menor que el sugerido por el Manual de Validación de Métodos Analíticos, se acepta la variabilidad en todo el intervalo de concentración dentro del cual se trabajó.

PRECISION DEL SISTEMA.

Siendo el $CV=1.1088\%$ menor que el valor especificado de 1.5%, se dice que el sistema de medición del método probado es preciso para las condiciones experimentales, en que fue trabajado.

LINEALIDAD DEL METODO.

Para la linealidad del método se obtuvo una pendiente $=1.0068$ y una ordenada al origen de -0.0344 dándose una relación proporcional entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. Siendo $r=0.9997$ menor que el sugerido por el Manual de Validación del Métodos Analíticos se dice que hay una variación de los resultados obtenidos de 0.01% respecto a la mejor línea de ajuste. Además la $t_{cal}=0.1624$ para el intercepto es menor que la $t_{teo}=2.447$, incluyendo en el intervalo de confianza experimental al cero se dice entonces que no es diferente de cero el intercepto; en tanto la $t_{cal}=1.032$ para la pendiente y en el intervalo de confianza se incluye al 1 por tanto la pendiente no es diferente de uno, y el coeficiente de variación siendo igual a 1.8709 se dice que el método es lineal.

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.

Debido a que el intervalo de confianza es de $98.4886 < \mu < 100.1193$ (encontrándose dentro de el rango sugerido 98 a 102%) se dice que el método es exacto, y reproducible al ser el coeficiente de variación igual a 0.8505% menor que el sugerido de 2% .

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

Para la precisión del método los coeficientes de variación del porciento de recobro para los dos analistas en los dos días diferentes deben de ser menor o igual al 2% para que este sea preciso; siendo en este caso el $CV=1.3354$ se dice que el método es preciso.

Las fuentes de variación se establecen mediante un análisis de varianza, en el cual es reproducible el método para cada fuente cuando la F_{cal} es menor a la F teórica. Siendo la $F_{cal}=5.6898$ menor que la $F_{95\%}=38.51$ para el efecto del analista y la $F_{cal}=0.6787$ menor que la $F_{95\%}=6.06$ para el efecto del día, se dice que el método analítico es reproducible por los dos analistas y reproducible en distintos días por un mismo analista, no existiendo efecto significativo por analista y por día.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se dice que la muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto (factor I) se encuentra entre el 98% y 102%. Siendo el intervalo de confianza de -3.3521 a 0.8447 bajo condiciones de refrigeración, y el factor I de 98.8108 se dice que la muestra de griseofulvina es estable bajo la condición de refrigeración; en cambio a temperatura ambiente el intervalo de confianza no incluye al cero y el factor I siendo de 94.5066 por lo que no es recomendable trabajar la muestra bajo esta condición.

ESPECIFICIDAD DEL METODO.

En base a los cromatogramas obtenidos en especificidad se observa que en el método analítico no existe interferencia alguna al cuantificar la griseofulvina como muestra y estándar, por lo que se considera al método específico.

IX. CONCLUSIONES.

1) Se desarrolló un método analítico para griseofulvina similar al realizado por Nation L. Roger, en el cual se implementaron algunas variantes en el desarrollo de este método, se obtubieron modificaciones en los resultados cromatográficos de las cuales se destaca disminución en el tiempo de retención.

2) La técnica desarrollada es sencilla de realizarse, no presenta problemas en cuanto al manejo excesivo de muestras, no se excede en el uso de reactivos. Por tanto se considera que es factible para ser aplicada a nivel docencia.

3) Después de analizar los datos obtenidos de validación del método se encontró que el método es lineal, específico, exacto, preciso y estable en condiciones de refrigeración. En lo referente al sistema, este es lineal y preciso. Por lo anterior, se dice que cumple con los requisitos mínimos para la validación de un método analítico sugeridos en el Manual de Validación de Métodos Analíticos.

4) Se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo.

X. ANEXOS.

PRECISION:

$$CV = (s / \bar{x}) 100$$

LINEALIDAD:

Pendiente (B):

$$B = n \sum xy - \sum x \sum y / n \sum x^2 - (\sum x)^2$$

Intercepto (A):

$$A = y - B x$$

Coefficiente de determinación (r^2)

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

Error estándar ($\hat{S}_{y/x}$)

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\sum y^2 - A (\sum y) - B (\sum xy) / n - 2}$$

Desviación Estándar (DE)

$$DE = [(N(\sum x^2) - (\sum x)^2) / (N(N-1))]^{1/2}$$

Coefficiente de Variación (CV)

$$CV = (DE / \bar{x}) 100$$

Límite de Confianza 97.5% para la Pendiente.

$$LC_{\pm} = B \pm t_{1.975} [S_{y/x} / (\sum x \sqrt{n})]$$

Límite de Confianza 97.5% para el Intercepto

$$LC_A = A \pm t_{0.975} S_{y/x} \sqrt{[\Sigma x^2 / n \Sigma(\bar{x} - x)^2]}$$

con $\alpha=0.05$, $n-2$ gl.

$t_{0.975}$ para el Intercepto

$$t_{0.975} = A - A_0 / S_{y/x} \sqrt{[\Sigma x^2 / \Sigma(\bar{x} - x)^2]}$$

donde:

n = número de replicaciones hechas a cada nivel.

x = cantidad adicionada, (concentración ó mg agregados)

\bar{x} = promedio de la cantidad adicionada en x .

y = propiedad medida, (respuesta ó mg recuperados)

\bar{y} = promedio de la propiedad medida.

S_x = desviación estándar de las "x" $n - 1$ grados de libertad

Σx = Sumatoria de la cantidad adicionada.

Σx^2 = Sumatoria de los cuadrados de la cantidad adicionada.

Σy = Sumatoria de la propiedad medida.

Σy^2 = Sumatoria de los cuadrados de la propiedad medida.

Σxy = Sumatoria del producto de la cantidad adicionada y la propiedad medida.

$t_{0.975, n-2, gl}$ = t de Student a una probabilidad acumulada de 0.975 y $n-2$ grados de libertad.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

EXACTITUD:

Porcentaje recuperado por cada recobro (x)

$$X = (y / x) 100$$

Media del porcentaje recuperado (\bar{x})

$$\bar{x} = \Sigma x / n$$

Desviación Estándar del porcentaje recuperado (S)

$$S \sqrt{ [\Sigma(\bar{x} - x)^2 / n-2] }$$

Coefficiente de Variación (CV)

$$CV = (S / \bar{x}) 100$$

t de Student

$$t_{cal} = \bar{X} - \mu / (S / \sqrt{n}) \qquad \mu = 100 \%$$

Intervalo de Confianza para la Media

$$I = \bar{x} \pm t_{1-\alpha/2} (S / \sqrt{n})$$

donde:

n = número de recobros independientes

x = cantidad adicionada

y = cantidad recuperada

t _{0.975, n-2} = t Student a una probabilidad acumulada de 0.975

y n-2 grado de libertad.

LINEALIDAD DEL METODO:

Pendiente (B). *

Intercepto (A). *

Coefficiente de Determinación. *

Desviación Estándar de la Recta de Regresión. *

Coefficiente de Variación. *

Límite de Confianza 97.5 para la pendiente. *

Límite de Confianza 97.5% para el Intercepto. *

t_{α} para la Pendiente

$$t_{\alpha} = (B - B_0) (S_x \sqrt{n}) / S_{y/x} \quad B_0 = 1$$

t_{α} para el Intercepto. *

*. Calcular de acuerdo a las fórmulas indicadas en la evaluación de la linealidad del sistema.

REPETIBILIDAD:

Calcular la Media del Porcentaje Recuperado. **

Calcular la Desviación Estándar del Porcentaje recuperado.**

Calcular el Coeficiente de Variación. **

** Ver cálculos de Exactitud.

REPRODUCIBILIDAD:

ANALISIS DE VARIANZA.

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + \epsilon_k(ij)$$

Y_{ijk} = El ensayo de la sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el i ésimo analista en j ésimo día.

μ = Media poblacional de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = Efecto del analista en el ensayo (donde $i=1$ hasta a).

$\delta_i(j)$ = Efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1$ hasta d).

$\epsilon_k(ij)$ = Error del método analítico (donde $k=1$ hasta r).

a = Número de analistas (donde $a=2$).

d = Número de días (donde $d=2$).

r = Número de replicaciones (donde $r=3$).

$$Y_{11.} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{12.} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{21.} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{22.} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

$$\Sigma\Sigma(Y_{ij.})^2 = (Y_{11.})^2 + (Y_{12.})^2 + (Y_{21.})^2 + (Y_{22.})^2$$

$$\Sigma((Yi..)^2 = (Y1..)^2 + (Y2..)^2$$

$$\Sigma\Sigma(Yijk)^2 = Y111^2 + Y112^2 + Y113^2 + \dots + Y221^2 + Y222^2 + Y223^2.$$

$$SCa = \Sigma(Yi..)^2 / dr - (\Sigma Y...)^2 / adr$$

$$SCd = \Sigma\Sigma(Yij.)^2 / r - \Sigma(Yi..)^2 / dr$$

$$SCe = \Sigma\Sigma\Sigma(Yijk)^2 - \Sigma\Sigma(Yij.)^2 / r$$

donde:

SCa = Suma de cuadrados referente al analista.

SCd = Suma de cuadrados referente al día.

SCe = Suma de cuadrados referente al error.

Mca = Media de cuadrados referentes al analista.

Mcd = Media de cuadrados referente al día.

F = Valor de la distribución de F de Fischer con una probabilidad acumulada de 0.975.

gl = Grados de libertad.

Grados de libertad	Probabilidad													
	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.001	
1	0.158	0.259	0.410	0.727	1.000	1.375	1.963	2.708	3.514	4.296	5.024	5.821	6.581	
2	0.167	0.289	0.440	0.717	0.914	1.061	1.385	1.887	2.570	3.303	4.049	4.808	5.591	
3	0.177	0.277	0.424	0.684	0.770	0.878	1.200	1.633	2.157	2.797	3.471	4.177	4.918	
4	0.184	0.271	0.418	0.660	0.743	0.841	1.150	1.531	2.007	2.597	3.216	3.877	4.571	
5	0.189	0.267	0.415	0.650	0.727	0.820	1.150	1.476	1.915	2.521	3.173	3.853	4.547	
6	0.193	0.265	0.414	0.645	0.720	0.810	1.144	1.461	1.903	2.497	3.163	3.847	4.541	
7	0.196	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
8	0.198	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
9	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
10	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
11	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
12	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
13	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
14	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
15	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
16	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
17	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
18	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
19	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
20	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
21	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
22	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
23	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
24	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
25	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
26	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
27	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
28	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
29	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
30	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
40	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
60	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
120	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	
∞	0.199	0.264	0.413	0.640	0.715	0.805	1.141	1.451	1.892	2.485	3.159	3.843	4.538	

TABLA 16. Valores de la distribución de t de Student.

TABLA 17. Valores de la distribución F de Fischer con una probabilidad acumulada de 0.975.

Denominador d1'	Numerador d1																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞					
1	1814	1895	2157	2248	2307	2340	2368	2389	2405	2419	2433	2459	2480	2491	2501	2511	2522	2532	2543	2543				
2	1851	1900	1916	1925	1920	1923	1926	1928	1930	1932	1934	1936	1938	1940	1941	1943	1945	1946	1947	1948				
3	1013	955	978	972	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971	971				
4	771	694	659	639	626	616	609	604	600	598	591	586	580	577	575	573	572	569	568	563				
5	661	578	541	519	505	495	488	482	477	474	468	462	456	453	450	446	443	440	438	436				
6	599	514	476	453	438	428	421	415	410	406	400	394	387	384	381	377	374	370	367	367				
7	558	474	435	412	397	387	379	373	368	364	357	351	344	341	338	334	330	327	323	323				
8	532	448	407	384	369	358	350	344	339	335	328	322	315	312	308	304	301	297	293	293				
9	512	429	386	363	348	337	329	323	318	314	307	301	294	290	286	283	279	275	271	271				
10	496	410	371	348	333	322	314	307	302	298	291	285	277	274	270	266	262	258	254	254				
11	484	398	358	336	320	309	301	295	290	285	279	272	265	261	257	253	249	245	240	240				
12	475	389	349	326	311	300	291	285	280	275	268	262	255	251	247	243	238	234	230	230				
13	467	381	341	318	303	292	283	277	271	267	260	253	246	242	238	234	230	225	221	221				
14	460	374	334	311	296	285	276	270	265	260	253	246	239	235	231	227	222	218	214	214				
15	454	368	329	306	290	279	271	264	258	254	248	241	234	230	226	222	217	213	209	209				
16	449	363	324	301	285	274	266	259	254	249	242	235	228	224	220	216	211	207	203	203				
17	445	359	320	296	281	270	261	254	249	244	237	230	223	219	215	210	206	201	196	196				
18	441	355	316	293	277	266	257	250	245	240	233	226	219	215	211	206	202	197	192	192				
19	438	352	313	290	274	263	254	247	242	237	230	223	216	212	207	203	198	193	188	188				
20	435	349	310	287	271	260	251	244	239	234	227	220	213	209	204	199	194	189	184	184				
21	432	347	307	284	268	257	248	241	236	231	224	217	210	206	201	196	191	186	181	181				
22	430	344	305	282	266	255	246	239	234	229	222	215	208	204	199	194	189	184	179	179				
23	428	342	303	280	264	253	244	237	232	227	220	213	206	202	197	192	187	182	177	177				
24	426	340	301	278	262	251	242	235	230	225	218	211	204	199	194	189	184	179	174	174				
25	424	338	299	276	260	249	240	233	228	224	216	209	202	197	192	187	182	177	172	172				
26	423	337	298	274	259	247	238	231	226	221	214	207	200	195	190	185	180	175	170	170				
27	422	335	296	272	257	245	236	229	224	219	212	205	198	193	188	183	178	173	168	168				
28	420	334	295	271	256	245	236	229	224	219	212	205	198	193	188	183	178	173	168	168				
29	418	333	293	270	255	243	234	227	222	217	210	203	196	191	186	181	176	171	166	166				
30	417	332	292	268	253	242	233	226	221	216	209	202	195	190	185	180	175	170	165	165				
40	392	323	284	261	245	234	225	218	212	206	200	192	184	179	174	169	164	159	154	154				
60	380	315	276	253	237	225	217	210	204	198	192	184	175	170	165	160	155	150	145	145				
120	367	307	266	243	227	215	207	200	194	188	181	173	164	159	154	149	144	139	134	134				
∞	346	300	260	237	221	210	202	195	189	182	175	167	158	152	146	140	135	130	125	125				

XI. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. Florey k., *Analytical Profiles of Drug Sustances*, vol. 2 y 5, Academic Press, INC, New York, 1976, pag. 220; 587.
2. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 5ª ed. México 1988, pag. 705.
3. Hossein Zia, Woodrow J. *Chromatographic Analisis of Griseofulvin and Metabolites in Biological Fluids*, J. of Chromatogr., 181, 77-84 (1980).
4. Hackett L. and Dusi L., *Determination of Ggriseofulvin in Human Serum Using High-Performance Liquid Chromatography*. J. of Chromatogr. ,155, 206-208 (1978).
5. Papp E., et al., *Liquid-Solid Chromatographic Determination of 6-Demethylgriseofulvin in Urine* J. Pharm. Sci., 65(3), 441-443 (1976).
6. Roger L. et al., *Simple, Rapid an Micro-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Plasma Griseofulvin Levels*, J. Pharm. Sci., 67(6), 805-808 (1978).
7. *To the Editor.*, *Identification of Griseofulvic Acid as a Urine Metabolite of Griseofulvin in Humans* J. Pharm. Sci., 68(10), 1335-1336 (1979).
8. Townley E. et al., *High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Griseofulvin in Drug substance and Solid Dosage Forms, Separation of Impurites and Metabolites.*, J. Pharm. Sci., 69(5), 523-526 (1980).
9. Bailey F. et al., *Higt-Efficiency Liquid Chromatographic in Pharmaceutical Analysis.*, J. of Chromatogr., 83, 431-437 (1973)

10. Goodman A., **Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica**, 8a ed., Ed. Medico Panamericana , México 1991. Pag. 1135-1137.
11. García A. et al., **Cromatografía Líquida de Alta Presión**, Ed.Limusa, México 1988. Pag. 23, 73, 129.
12. Luz Elena Vera y Michel Thibert, **Manual de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia**, Leacsa, S.A.de C.V. Pag. 1 - 34.
13. Care and Use Manual Silica Analitical Column; Boletín informativo, Division of Millipore. Pag 1-3.
14. Harold M. y Esquibel B., **Cromatografía Líquida de Alta Presión**, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos Washington, D.C. 1973. Pag. 32 -46.
15. Bello G., **La Cromatografía Líquida de Alta Resolución**, Pharma News, 2a parte, (1986), Pag.19 - 21.
- 16.- Noticias Millipore Waters, Boletín Informativo No.1, Waters Chromatography Division y Millipore Corporation, Pag. 1 - 3.
- 17.- Bello G., Consideración Química Acerca de la Separación en HPLC de Aminas en una Columna C-18 (ODS), Boletín informativo Beckman Instrumens, Pag. 1 - 6.
- 18.- United States Pharmacopea, Twenty second revision, Mack Publishing Company, U.S.A. 1989.
- 19.- Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., Pag. 1 - 34.
- 20.- Quattrocchi A. y Andrizzi S., **Introducción a la HPLC**, Ed. Buenos Aires, Argentina 1992, pp. 302-325.

- 21.- Johnny Guerra, Validation of analytical methods by FDA laboratories, Pharm. Tech., 3, 75-78, 1986.
- 22.- Lual, Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos, Pharma News, 4, (7) y 4, (9) y 4 (10), 16-41, EE.