

FALLA DE ORIGEN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA "GRISEOFULVINA", EN CONTROL DE CALIDAD Y EN SANGRE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

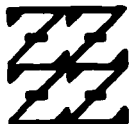
CAROLINA REYES TURRENT

ASESORES

Q. F. B. PATRICIA PARRA CERVANTES

Q. F. B. RAMON SOTO VAZQUEZ

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LA UNAM
EN EL MUNDO**

ENERO DE 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTOS TEORICOS	
A. Características de la griseofulvina	2
B. Espectrofotometría visible y ultravioleta	7
a) Aparatos	8
C. Validación de métodos analíticos	10
a) Definiciones	13
1. Linearidad	13
2. Exactitud	13
3. Precisión	13
3.1. Reproducibilidad	14
3.2. Repetibilidad	14
4. Límite de detección	14
5. Especificidad	14
D. Determinaciones	15
1. Linearidad del sistema	15
2. Precisión del sistema	15
3. Linearidad del método	16
4. Exactitud y repetibilidad al 100 %	16
4.1. Precisión (reproducibilidad)	17
5. Especificidad para métodos indicadores de estabilidad	18
6. Límite de detección	19
E. Desarrollo del método de validación para fluidos biológicos	19
1. Linearidad del sistema	20
2. Linearidad del método	21
3. Exactitud y precisión	22
4. Límite de detección	22

5. Límite de cuantificación	22
6. Reproducibilidad	22
7. Especificidad	23
8. Estabilidad	24
9. Tolerancia	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. OBJETIVOS	26
IV. HIPOTESIS	27
V. MATERIAL Y METODO	
A. Material	28
B. Reactivos	29
C. Sustancias de análisis	29
D. Equipo	29
VI. METODOLOGIA GENERAL	30
A. Método experimental para la cuantificación de griseofulvina materia prima	30
B. Validación del método para cuantificación de griseofulvina materia prima	31
C. Método experimental para la cuantificación de griseofulvina en sangre	32
D. Validación del método para cuantificación de griseofulvina en sangre	34
VII. RESULTADOS	
A. Materia prima	

1. Linealidad del sistema	37
2. Linealidad del método	39
3. Exactitud	43
4. Precisión	
a) Repetibilidad	44
b) Reproducibilidad	46
5. Estabilidad de la muestra analítica	49
B. Sangre	60
1. Linealidad del método	60
2. Precisión	63
a) Repetibilidad	63
b) Reproducibilidad	64
3. Exactitud	68
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS	70
A. Validación de materia prima	70
B. Validación sangre (plasma)	72
IX. CONCLUSIONES	74
X. BIBLIOGRAFIA	75
ANEXO 1.	77
ANEXO 2.	81
ANEXO 3.	82
ANEXO 4.	86
ANEXO 5.	88
ANEXO 6.	92

INTRODUCCION

La griseofulvina es un antimicótico efectivo y ampliamente utilizado en el tratamiento de micosis cutánea, del pelo y de las uñas causada por especies de *Microsporum*, *Tricophyton* y *Epidermophyton*.

Las formas de dosificación más usuales son tabletas y pomadas.

Para lograr la cuantificación exacta de griseofulvina se requieren técnicas sensibles. Se han reportado varios métodos en la literatura para su cuantificación entre los que se encuentran la cromatografía en gel, capa fina, líquidos de alta resolución, colorimetría, iodometría, que requieren de procedimientos complicados que involucran mucho tiempo.

En el presente trabajo, se desarrolló un método espectrofotométrico ultravioleta para la cuantificación de griseofulvina como materia prima y en sangre (plasma); y posteriormente se realizó la validación de los métodos propuestos.

Los resultados obtenidos permiten proponer a dichos métodos como una alternativa de análisis rutinario de la griseofulvina por sus características de linealidad, precisión, reproducibilidad, exactitud, rapidez y bajo costo, lo que los convierte en métodos confiables.

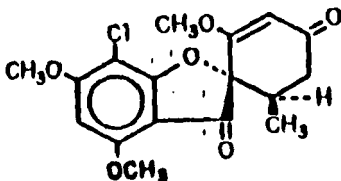
I. FUNDAMENTOS TEORICOS

A. Características de la Griseofulvina

Nombre químico:

7-cloro-2',4,6-trimetoxi-6'metilespiro[benzofuran-2(3H),1'-[2] ciclohexano]-3,4'-diona;7-cloro-4,6-dimetoxicumaran-3-ona-2-espiro-1'(2'-metoxi-6'-metilciclohex-2'-en-4'-ona)

Fórmula y peso molecular: ⁽²⁾



$C_{17}H_{17}ClO_6$

Peso molecular = 352.77 g/mol

Su potencia es no menos de 900 μg de $C_{17}H_{17}ClO_6$ por mg.

Descripción:

Se presenta como polvo blanco, inodoro y cristalino o amarillo pálido. ⁽²⁾

Punto de fusión:

Entre 217 °C y 224 °C.

Pérdida por secado:

En un frasco provisto con tapón con un capilar secar 100 mg de la muestra al vacío a presión que no exceda en 5 mm de mercurio a 60 °C durante 3 horas. Pierde no más de 1 por ciento. ⁽¹⁾

Identificación:

A. Disolver 5 mg de la muestra en 1 ml de ácido sulfúrico y agregar 5 mg de dicromato de potasio en polvo, se produce color rojo vino. ⁽²⁾

Solubilidad:

Fácilmente soluble en 1,1,2,2-tetracloroetano; Muy soluble en dimetilformamida, soluble en cloroformo, ligeramente soluble en etanol, metanol, muy ligeramente soluble en agua. ⁽²⁾

Espectro ultravioleta:

El espectro ultravioleta de griseofulvina en solución etanólica anhidra a 25 °C presenta máximos a: ⁽³⁾

Longitud de onda de 324 nm

Longitud de onda de 291 nm

Longitud de onda de 235 nm

Valoración:

Disolver 100 mg de la muestra en suficiente etanol para obtener 200 ml, diluir 2 ml de esta solución hasta 100 ml con etanol. Determinar la absorbancia de esta solución en una celda de 1 cm a un máximo de 291 nm aproximadamente y calcular el contenido de $C_{17}H_{17}ClO_8$ utilizando el valor de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ igual a 686.

La griseofulvina aparece reportada en las farmacopeas The United States Pharmacopoeia (USP), The British Pharmacopoeia, The European Pharmacopoeia, y Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM); para efectos de este trabajo se consideraron sólo las especificaciones reportadas en la FEUM ya que son las que se encuentran vigentes oficialmente en nuestro país.

Prueba	F E U M
Identificación	Griseofulvina. No secar
Ensayo	291 nm
Pérdida por secado	-1.0 %
Residuo de ignición	-0.2 %
Valoración	
Temperatura de fusión	217 °C - 224 °C
Acidez	-1.0 ml

Cuadro I. Especificaciones farmacopeicas de la griseofulvina.

Propiedades farmacológicas

Usos:

La griseofulvina por su actividad antimicótica se utiliza en micosis cutánea, del pelo y de las uñas causada por especies de *Microsporium*, *Tricophyton* y *Epidernophyton*.

El fármaco no tiene efecto sobre bacterias ni sobre otros hongos, levaduras, *Actinomyces* ni *Nocardia*. El fármaco puede destruir células jóvenes y activamente metabólicas, pero a los elementos más viejos, más pasivos sólo los inhibe. ⁽⁴⁾

Mecanismo de acción:

La acción de la griseofulvina es la producción de células multinucleadas, y la droga inhibe así la mitosis fúngica. La griseofulvina produce una interrupción del huso mitótico por interacción con los microtúbulos polimerizados. ⁽⁵⁾

Absorción, distribución y excreción:

La administración oral de griseofulvina produce concentraciones plasmáticas máximas después de unas 4 horas, aproximadamente 1 µg/ml con una sola dosis de 0.5 g, siendo estos valores muy variables, debido quizá a la insolubilidad de la griseofulvina. La absorción se incrementa si se administra el fármaco con una comida grasa.

La griseofulvina tiene una vida media en plasma de aproximadamente un día, y alrededor del 50% de la dosis oral puede ser detectada en orina en el curso de 5 días, principalmente en forma de metabolitos. El metabolito principal es la 6-metilgriseofulvina. ⁽⁵⁾

Preparado, vías de administración y dosis:

La griseofulvina (Fulvicin U/F, grifoluin V micionizada) se vende en cápsulas que contienen 125 o 250 mg, y en tabletas que contienen 250 mg. o 500 mg, también se,

obtiene en suspensión oral (125 mg/5 ml). La dosis diaria recomendada para niños es 10 mg/kg; para adultos, 500 mg a 1 g.

Tabletas que contienen un preparado "ultramicrocristalino" (Fulvicin P/G, Gris-PEG) contienen 125 a 130 mg de griseofulvina. ⁽⁵⁾

La griseofulvina puede ser cuantificada por diversos métodos, de los más sencillos podemos encontrar a la espectrofotometría ultravioleta ^(6,9). Otros métodos incluyen polarografía ⁽¹⁰⁾, Cromatografía gas-líquido ^(11,12), espectrofluorometría ^(13,14), colorimetría ^(15,16), iodometría ⁽¹⁷⁾, cromatografía en papel ⁽¹⁸⁾, y cromatografía en capa fina ^(19,20).

La griseofulvina puede ser cuantificada en fluidos biológicos y en tejidos por espectrofluorometría ⁽²¹⁾, cromatografía de gases ⁽²²⁾, cromatografía de líquidos de alta resolución ⁽²³⁾, la cromatografía de capa fina en gel de sílice y la espectrofotometría de absorción son utilizadas para el análisis de griseofulvina en plasma. ⁽²⁴⁾

La espectrofotometría de absorción, es indudablemente una de las técnicas analíticas más interesantes de las descubiertas hasta la fecha. A pesar de los nuevos avances en la química analítica, probablemente permanecerá como un instrumento útil debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de muchos problemas; estas ventajas son entre otras: el amplio intervalo de longitudes de onda o frecuencias de energía radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia; la existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos; las ventajas inherentes al método.

Generalmente, el análisis es muy rápido, una vez que se ha establecido el método, a no ser que se requiera un tratamiento previo para eliminar interferencias. El método es muy

cómodo para medidas repetidas de un mismo constituyente, como sucede en la rutina del análisis de control. Además, el método es, en general, aplicable a la determinación exacta de cantidades de constituyentes mucho menores que con los métodos gravimétricos o volumétricos. Con frecuencia es un método no destructivo de la muestra, lo que puede ser importante cuando la muestra es muy valiosa, como sustancias bioquímicas.

Las mediciones espectrofotométricas son aplicadas ampliamente en química analítica, farmacéutica y orgánica.

B. Espectrofotometría visible y ultravioleta:

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las cortas longitudes de onda de la zona ultravioleta (190-380 nm) hasta la zona visible del espectro (380-780 nm).

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la cubeta y la concentración, por lo cual la concentración se puede determinar fotométricamente.

a) Aparatos

Básicamente todos los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática a través de la sustancia problema, convenientemente preparada y hagan posible la medición de la fracción de radiación transmitida.

El espectrofotómetro consta como se puede observar en la **Figura 1**, de una fuente de energía, de un sistema dispersivo con rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, una celda o recipiente para la sustancia problema, un detector de la energía radiante y dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.

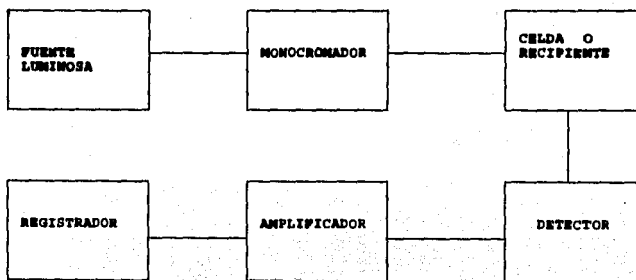


Figura 1. Representación esquemática de un espectrofotómetro

Las celdas que suelen emplearse en la zona espectral son celdas de absorción de 1 cm de vidrio o de sílice con ventanas. También pueden emplearse otros espesores. Las celdas utilizadas para la solución problema y para el blanco deben tener la misma transmitancia espectral cuando sólo contienen el disolvente; de lo contrario habrá que hacer la corrección apropiada.

La absorbancia de la celda del disolvente y su contenido no debe exceder de 0.4 por cm del espesor atravesado por la energía luminosa cuando se mide con referencia al aire a la misma longitud de onda. El disolvente contenido en dicha celda debe ser del mismo lote que el empleado para preparar la solución.

Las valoraciones espectrofotométricas requieren, por lo general, una comparación de la absorbancia producida por la solución de la sustancia problema, con la absorbancia de una solución de referencia (SRef). En estos casos, las mediciones espectrofotométricas se hacen primero con la solución de referencia y después con la muestra a analizar. La segunda medición se practica lo más rápidamente posible después de la primera utilizando las mismas condiciones experimentales.

Además de ésta técnica pueden utilizarse las técnicas de curva patrón y adición de un estándar.

Curva patrón:

Con una solución de referencia se preparan diferentes concentraciones que se comportan de manera lineal, al tener como variable dependiente la absorbancia. La absorbancia de la muestra problema es extrapolada en la gráfica obteniéndose de esta manera la concentración de la solución analizada.

Adición con un estándar:

Consiste en la determinación de la absorbancia de una muestra problema de volumen conocido, a la que se le adiciona un volumen exacto de una solución estándar de concentración conocida obteniéndose la absorbancia total para que posteriormente, mediante la relación:

$$\frac{A_x}{C_x} = \frac{A_{x+st}}{C_x V_x + C_{st} V_{st}} \cdot \frac{V_x + V_{st}}{V_x + V_{st}}$$

donde:

A_x = Absorbancia de la muestra problema

C_x = Concentración a determinar de la muestra problema

V_x = Volumen de la muestra problema

C_{st} = Concentración del estándar

V_{st} = Volumen del estándar

A_{x+st} = Absorbancia total (muestra problema + estándar)

para obtener la concentración real de la solución problema.

C. Validación de métodos analíticos:

En los últimos años en la industria farmacéutica se han realizado cambios significativos en la forma de apreciar y conseguir que un método analítico desarrollado sea validado para comprobar su confiabilidad y funcionalidad debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

En nuestros días el empleo de una técnica analítica implica un riesgo si dicha técnica no ha demostrado ser confiable por lo cual es necesario realizar la validación del mismo. La validación de un método analítico se define como el proceso por el que queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. ¹¹

El proceso de validación para métodos analíticos es una parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica ya que con ello se prueba que la evaluación realizada está cumpliendo con los propósitos para los que fue diseñado.

La validación debe ser realizada tomando en cuenta una serie de consideraciones tales como: método de análisis, compuesto a analizar, forma farmacéutica, niveles de concentración, etc. Por lo cual para seleccionar los puntos para validar un método analítico dependen de la aplicación del método, de las necesidades particulares, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza. Los parámetros de evaluación más comunes para la validación de métodos analíticos son los siguientes:

1. Exactitud
2. Linealidad
 - a) Linealidad del método
 - b) Linealidad del sistema
3. Precisión
 - a) Repetibilidad
 - b) Reproducibilidad
4. Especificidad

Existen otros parámetros menos comunes, que se utilizan según lo requiera el método y son: sensibilidad, tolerancia del sistema, cantidad mínima detectable, cantidad mínima cuantificable, estabilidad de la muestra, etc.

Como existen muchas aplicaciones de los métodos, cada uno debe tener un esquema de validación particular como se muestra en la **Tabla 2**:

PARAMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD		BIODISPONIBILIDAD
		BAJAS CONCENTRACIONES	ALTAS CONCENTRACIONES	
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X	X
Límite de detección		X		X
Límite de cuantificación		X		X
Exactitud y repetibilidad al 100%	X	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X	X
Precisión (reproducibilidad)	X	X	X	X
Especificidad (control de calidad)	X	X	X	X
Especificidad (estabilidad)		X	X	
Tolerancia del sistema		X	X	X
Estabilidad de la muestra	X	X	X	X

Tabla 2. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método.

a) DEFINICIONES:

1. Linearidad

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. “

2. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de una sustancia. “

3. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar (D.E) o del Coeficiente de Variación (C.V).

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación. “

3.1 Reproducibilidad

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc).⁴¹

3.2 Repetibilidad

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre varias determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc).⁴¹

4. Límite de detección

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cuál puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.⁴¹

5. Especificidad

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra o a los productos de degradación.⁴¹

D. Determinaciones

1. Linealidad del sistema

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %.

Criterio de aceptación

$$C.V. = 1.5 \%$$

$$r = 0.99$$

$$r^2 = 0.98$$

2. Precisión del sistema

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Criterio de aceptación

$$C.V. = 1.5 \%$$

3. Linealidad del método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 %.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones el método, (Control de Calidad, Estudios de Estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio de aceptación

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$, $r^2 = 0.98$

Los porcentos recuperados y los C.V. a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la **tabla 1**.

NOTA: *En métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos, la amplitud del estudio dependerá de las cantidades mínima y máxima esperada.*

4. Exactitud y repetibilidad al 100%

Se determina con, cuando menos 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %,

utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio de aceptación

El por ciento recuperado y el C.V. deberán estar de acuerdo con la **tabla 3**.

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	C.V.
Cromatográficos	98 - 102 %	≤ 2 %
Titrimétricos	98 - 102 %	≤ 2 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %	≤ 3 %
Microbiológicos	95 - 105 %	≤ 5 %

Tabla 3. Criterio de aceptación de coeficientes de variación para diferentes métodos.

4.1 Precisión (Reproducibilidad)

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Criterio de aceptación

El C.V. total debe cumplir con los siguientes criterios.

METODO	C.V.
Cromatográficos	2 %
Químicos y espectrofotométricos	3 %
Microbiológicos	5 %

Tabla 4. Criterios de aceptación de coeficiente de variación para diferentes métodos.

5. Especificidad para métodos indicadores de estabilidad

En caso de contar con los posibles productos de degradación preparar muestras con placebo añadido de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto. Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones.

La degradación debe ser tal que la concentración de la sustancia en estudio esté disminuida por lo menos en un 25 % con respecto a la original.

1. Colocar la sustancia de interés a reflujo por 4 horas para degradación por hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico al 10%).

Criterio de aceptación

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Ajustar las condiciones de operación para obtener la máxima resolución.

6. Límite de detección

Se determina adicionando cantidades exactas de una muestra correspondiente a 1, 2, 4, 5, 6 y 8 % de la concentración máxima esperada.

Criterio de aceptación

Se determina realizando una recta paralela a la recta de regresión a una distancia de 1.96 de desviación estándar (Sy/x) con respecto al valor de "Y" obtenido y dará el intercepto igual al límite de detección.

E. Desarrollo del método de validación para fluidos biológicos

Antes de iniciar cualquier estudio es necesario contar con métodos analíticos validados para poder cuantificar el fármaco y/o alguno de sus metabolitos en sangre, plasma o suero.

Los materiales para el almacenamiento de las muestras y los que se utilicen durante el procedimiento de análisis deberán estar perfectamente limpios e identificados, de acuerdo a los procedimientos de operación previamente aprobados.

Es necesario y conveniente revisar los últimos 5 años de la literatura con objeto de obtener información del método analítico y poder establecer los intervalos de concentración que se utilizarán en la validación del mismo.

Los métodos deberán cumplir con los siguientes criterios:

Linealidad

Exactitud

Precisión

Reproducibilidad

Especificidad

Límite de detección

Límite de cuantificación

Tolerancia

Además es indispensable conocer la estabilidad del fármaco y/o su o sus metabolitos tanto en fluidos biológicos como en el disolvente en donde se hará la cuantificación de la sustancia de interés.

Este trabajo se enfoca a los procedimientos espectrofotométricos ya que cumplen con los criterios de validación mencionados anteriormente.

1. Linealidad del sistema

En base a los datos de concentración de fármaco reportados en la literatura, seleccionar entre 7 y 10 concentraciones para determinar la linealidad del sistema.

Pesar una cantidad del fármaco y preparar una solución patrón en el disolvente de elección, a partir de la cual se obtendrán por diluciones las concentraciones seleccionadas para generar la curva estándar. De preferencia utilizar el estándar a una sola concentración para todos los puntos de la curva estándar y adicionarlo desde el inicio del procedimiento. Preparar suficiente cantidad, distribuirla en alícuotas y congelarlas, para hacer la cuantificación del fármaco diariamente y por duplicado a cada nivel de

concentraciones, durante el desarrollo y validación del método analítico. Hacer la determinación inicial de la linealidad, analizando cada uno de los niveles de concentración seleccionados por triplicado.

Determinar la linealidad del sistema obteniendo la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación.

2. Linealidad del método

Seleccionar 7 concentraciones, de preferencia iguales a los niveles ya estudiados para la linealidad del sistema. Se recomienda a partir de la misma solución patrón, adicionada al plasma, suero o sangre total. Distribuir en alícuotas y congelar suficientes muestras para realizar la cuantificación por duplicado por lo menos durante 5 días.

Determinar la linealidad del método tratando cada muestra de acuerdo al procedimiento analítico propuesto. Interpolare los resultados en la curva estándar.

Obtener las curvas promedio, tanto de la curva estándar como de los problemas y determinar los siguientes parámetros:

a) Parámetros de regresión lineal:

Intercepto

Pendiente

Coefficiente de determinación

b) Media aritmética.

c) Por ciento recuperado (resultados absolutos)

d) Coeficiente de variación por nivel de concentración y por todo el intervalo

3. Exactitud y Precisión

Determinar la exactitud y precisión del método en el plasma considerando los resultados absolutos de cada uno de los puntos en las curvas de linealidad.

4. Límite de detección.

Determinar el límite de detección, que por criterio universal se considera como dos veces la magnitud de la señal del ruido del aparato.

5. Límite de cuantificación.

Determinar la cantidad mínima cuantificable, siendo ésta, la cantidad mínima que cumpla con los siguientes criterios:

- La mínima cantidad que presente un coeficiente de variación menor o igual al 15 % siempre y cuando la determinación se lleve a cabo cuando menos por duplicado y por lo menos durante tres días.
- La mínima cantidad que por su promedio de por ciento recuperado esté comprendida entre el valor real dos veces la desviación estándar.

6. Reproducibilidad

Se deberá determinar por dos analistas durante dos días a dos concentraciones distintas y por triplicado.

- Todas las muestras para el estudio deberán ser preparadas el mismo día por un analista y congelarse hasta el día del análisis. Los analistas deberán preparar individualmente el estándar que será igual al nivel considerado como 100 %.

Obtener la concentración del estándar y determinar por analista los siguientes parámetros:

- a) Porcentaje recuperado, (resultados absolutos).
- b) Media aritmética
- c) Coeficiente de variación para la concentración

7. Especificidad

La manera más adecuada de conocer la especificidad de un método es obtener los metabolitos e inyectarlos junto con la sustancia de interés con el objeto de asegurarse que no interfieren en el análisis. Esto no siempre será posible, por lo que es necesario buscar en la literatura un método que esté reportado como específico y trabajarlo de la misma manera.

El primer paso es demostrar que los elementos normales del plasma no interfieren con el análisis por lo que es necesario aplicar el método a un placebo de plasma, sangre, suero u orina y comprobar que no existen interferencias.

Si no es posible concluir que el método es específico será necesario analizar la muestra utilizando otro sistema, otro método de detección u otra técnica analítica, (por ejemplo cromatografía de gases o de líquidos de alta resolución).

El estándar interno deberá ser el adecuado para que no interfiera con los metabolitos, y de preferencia una sustancia relacionada químicamente con el fármaco de interés.

Si no se cuenta con suficiente información sobre los metabolitos, es recomendable trabajar con dos estándares internos con diferente tiempo de retención, con el objeto de tomar una decisión de cuál es el más adecuado.

Deberá llevarse a cabo una prueba con objeto de comprobar si el anticoagulante de los tubos no interfiere con el análisis.

Sería conveniente probar el método de análisis, adicionando a las muestras del plasma

conteniendo el compuesto de interés, fármacos utilizados comúnmente, como analgésicos, antibióticos, etc.

Es necesario comprobar que el plasma adquirido para el desarrollo del método analítico, no contiene fármacos o drogas que pueden interferir con los resultados.

8. Estabilidad

Se debe probar la estabilidad de la sustancia a analizar en el disolvente en el cual se va a cuantificar a intervalos razonables de tiempo a temperatura ambiente y mantenidas en refrigeración y/o congelación, con objeto de determinar por cuanto tiempo y en que condiciones se pueden mantener las muestras antes del análisis.

Se debe también determinar la estabilidad de la sustancia de interés en las muestras biológicas para conocer en que condiciones deben mantenerse mientras se analizan. Este estudio se hará a intervalos razonables, dependiendo del tiempo que se necesite para el análisis de las muestras del estudio y deberá hacerse también a diferentes condiciones, refrigeración, congelación, y si es necesario a temperaturas de -20°C o inferiores.

También es necesario hacer un estudio de estabilidad en intervalos cortos de tiempo, 8 a 24 hrs, para conocer si las muestras se pueden mantener sin descomposición durante su manipulación para su análisis.

9. Tolerancia

Es necesario comprobar que tan tolerante es el método a pequeñas variaciones que pueden ocurrir en los parámetros analíticos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para que un medicamento tenga calidad y ofrezca seguridad es necesario contar con un método de análisis apropiado por lo cuál es necesario realizar la validación del o los métodos analíticos empleados para su análisis; como se mencionó la validación es el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad de éste satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, que aseguran que este método proporciona además de forma homogénea y reproducible, las especificaciones para satisfacer los requisitos de calidad.

Debido a que en México existe una gran necesidad de mejorar los medicamentos antimicóticos sobre todo a causa de la frecuencia de infecciones micóticas de diseminación general en pacientes, y que por ser la griseofulvina el medicamento utilizado en primera instancia en estos casos en forma tópica u oral es importante realizar estudios en varias formas farmacéuticas para lo cual es necesario primero desarrollar un método de análisis que cumpla con los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y especificidad que permitan garantizar la biodisponibilidad de los medicamentos desarrollados.

Sabiendo que la biodisponibilidad de un fármaco es un factor importante a considerar al elaborar nuevos productos farmacéuticos, es necesario desarrollar un método de cuantificación para griseofulvina en fluidos biológicos, en este caso en plasma considerando sus propiedades fisicoquímicas (absorbancia, etc.) y validar éste método para asegurar así su utilización.

III. OBJETIVOS

GENERALES

Desarrollar y validar un método analítico espectrofotométrico para griseofulvina como materia prima y en sangre.

ESPECIFICOS

Desarrollar un método de análisis para griseofulvina como materia prima.

Validar el método de análisis desarrollado para griseofulvina como materia prima.

Implementar un método analítico para cuantificar griseofulvina en sangre.

Validar el método de análisis implementado para griseofulvina en sangre.

IV. HIPOTESIS

La griseofulvina es un compuesto que presenta absorción ultravioleta a 291 nm por lo que es posible cuantificarla por espectrofotometría.

Siendo este método espectrofotométrico específico, exacto, preciso y lineal, se puede utilizar de manera confiable para análisis de control de calidad, en estudios de estabilidad y en sangre.

V. MATERIAL Y EQUIPO

A. Material

MATERIAL	CAPACIDAD
Matraz aforado	10 ml. PYREX
Matraz aforado	25 ml. PYREX
Matraz aforado	50 ml. PYREX
Matraz aforado	100 ml. PYREX
Vaso de precipitado	50 ml. PYREX
Vaso de precipitado	100 ml. PYREX
Vaso de precipitado	250 ml. PYREX
Pipeta volumétrica	1 ml. PYREX
Pipeta volumétrica	2 ml. PYREX
Pipeta volumétrica	3 ml. PYREX
Pipeta volumétrica	5 ml. PYREX
Pipeta volumétrica	10 ml. PYREX
Pipeta graduada	5 ml. PYREX
Pipeta pasteur	3 ml. KIMAX
Tubo de ensayo	13 x 100 mm. PYREX
Bureta graduada	25 ml. PYREX
Matraz erlenmeyer	125 ml. PYREX
Barra de agitación magnética	
Soporte universal	
Crisoles de porcelana	

B. Reactivos

Alcohol etílico absoluto	J.T.BAKER	R.A
Alcohol metílico absoluto	J.T.BAKER	R.A
Cloroformo	J.T.BAKER	R.A
Acido sulfúrico	J.T.BAKER	R.A
Dicromato de potasio	J.T.BAKER	R.A
Hidróxido de sodio	J.T.BAKER	R.A
Fenolftaleína	J.T.BAKER	

C. Sustancias de análisis

Griseofulvina materia prima	LABORATORIO GLAXO
Sustancia de referencia	GRISEOFULVINA LOTE 17A6

D. Equipo

Espectrofotómetro	PERKIN ELMER Lamba 2 UV/VIS
Balanza analítica	SARTORIUS 2842
Balanza granataria de dos platillos	OHAUS (2 Kg)
Centrifuga clínica	SOL-BAT MOD J-12
Mufla	THERMOLYNE TYPE 1400 Furnace
Estufa de vacío	PRECISION CAT No.31463-29 Model 19

VI. METODOLOGIA GENERAL

Para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo se desarrolló un método para identificar y cuantificar griseofulvina en materia prima y en sangre (plasma).

Basándose en las propiedades fisicoquímicas de la griseofulvina, específicamente la absorción ultravioleta a 291 nm se utilizó este comportamiento para trabajar con el método espectrofotométrico.

A. Método experimental para la cuantificación de griseofulvina materia prima.

1. Solución problema:

Se pesó 0.1 g de la muestra de griseofulvina, se agregó 50 ml de metanol, se disolvió y se llevó a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con metanol. De ésta solución se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó a 100 ml con metanol en otro matraz volumétrico, se homogenizó la solución.

2. Solución estándar:

En un matraz volumétrico de 100 ml se colocó 0.1 g de griseofulvina estándar, exactamente pesados, se adicionaron 50 ml de metanol, se agitó para disolver, enseguida se aforó con metanol y se homogenizó la solución, de ésta solución se tomó una alícuota de 1 ml y se llevaron a un matraz volumétrico de 100 ml, se aforó con metanol y se agitó. (Concentración final 10 $\mu\text{g/ml}$).

Se determinó la absorbancia de la solución problema y estándar a 291 nm utilizando metanol como blanco.

B. Validación del método para cuantificación de griseofulvina materia prima.

Para realizar la validación del método de cuantificación de griseofulvina materia prima se evaluaron los parámetros analíticos de la siguiente manera:

1. Linearidad del sistema.

Se realizó con seis niveles de concentración por duplicado cada uno, equivalentes a 2.5, 5, 8, 10, 12 y 15 $\mu\text{g/ml}$ de griseofulvina respectivamente para llevar a cabo el análisis.

2. Precisión del sistema.

Se analizaron nueve muestras correspondientes al 100% de griseofulvina igual a 10 $\mu\text{g/ml}$.

3. Linearidad del método.

Se realizó con cinco niveles de concentración por triplicado equivalentes a 5.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 15.0 $\mu\text{g/ml}$ de griseofulvina respectivamente en cada muestra.

4. Exactitud

Se prepararon nueve muestras individuales al 100 % de griseofulvina equivalente a 10 $\mu\text{g/ml}$.

5. Precisión

a. Repetibilidad del método

Se realizó a través de nueve determinaciones al 100 % de griseofulvina igual a 10 $\mu\text{g/ml}$.

b. Reproducibilidad del método

Se prepararon tres muestras individuales al 100 % de griseofulvina siguiendo el método descrito anteriormente, en dos diferentes días y por dos diferentes analistas.

C. Método experimental para la cuantificación de griseofulvina en sangre

1. Solución estándar

Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 10 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesó una muestra de 100 mg de griseofulvina estándar, se adicionó a una muestra de 4 ml del plasma obtenido por centrifugación. Se adicionaron 4 ml de cloroformo, se agitó y centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, se separó la porción clorofórmica, se tomó una alícuota de 1 ml de ésta solución y se llevó a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico, de esta solución se tomó una alícuota de 1 ml de ésta solución y se llevó a 100 ml con cloroformo en un matraz volumétrico. Se determinó la absorbancia de la solución estándar a 291 nm utilizando cloroformo como blanco.

2. Estabilidad de la muestra analítica

Se determinó la estabilidad de la muestra de análisis griseofulvina materia prima por espectrofotometría, reanalizando las muestras preparadas bajo las siguientes condiciones: Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 10 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesó una muestra de 100 mg de griseofulvina materia prima, se adicionó a una muestra de 4 ml del plasma obtenido por centrifugación. Se adicionaron 4 ml de cloroformo, se agitó y centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, se separó la porción clorofórmica, se tomó una alícuota de 1 ml de ésta solución y se llevó

a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico, se tomaron 10 alícuotas de 1 ml de ésta solución y se llevaron a 100 ml con cloroformo en matraces volumétricos.

Estas soluciones fueron almacenadas bajo las siguientes condiciones, en los tiempos indicados.

TEMPERATURA	TIEMPO
ambiente	1 hora
ambiente	3 horas
ambiente	5 horas
ambiente	24 horas
ambiente	72 horas
4 °C	1 hora
4 °C	3 horas
4 °C	5 horas
4 °C	24 horas
4 °C	72 horas

Se determinaron las absorbancias por triplicado utilizando una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

D. Validación del método para cuantificación de griseofulvina en sangre

1. Linealidad del método

Se extrajo una muestra de 20 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 20 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesaron 5 muestras de 100 mg de griseofulvina materia prima, se adicionaron cada una a 1 ml del plasma obtenido anteriormente. Se adicionaron 4 ml de cloroformo a cada muestra, se agitaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos por separado, de la porción clorofórmica se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las muestras y se llevaron a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando la solución. Se tomaron tres muestras de cada uno de los matraces anteriores de la siguiente manera:

matraz 1:	0.5 ml
matraz 2:	0.8 ml
matraz 3:	1.0 ml
matraz 4:	1.2 ml
matraz 5:	1.5 ml

y se llevaron a 100 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando las soluciones.

Se determinaron las absorbancias utilizando una solución de referencia recientemente preparada, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

Se determinó la absorbancia de la solución estándar a 291 nm utilizando cloroformo como blanco.

Estas soluciones son equivalentes a 5, 8, 10, 12 y 15 μg por ml de griseofulvina respectivamente.

2. Exactitud

Se extrajo una muestra de 20 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 20 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesaron 9 muestras de 100 mg de griseofulvina materia prima, se adicionaron cada una a 1 ml del plasma obtenido anteriormente. Se adicionaron 4 ml de cloroformo a cada muestra, se agitaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos por separado, de la porción clorofórmica se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las muestras y se llevaron a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando la solución. Se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los matraces anteriores, y se llevaron a 100 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando las soluciones.

Se determinaron las absorbancias utilizando una solución de referencia recientemente preparada, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

Se determinó la absorbancia de la solución estándar a 291 nm utilizando cloroformo como blanco.

Estas soluciones son equivalentes a 10 μg por ml de griseofulvina.

3. Precisión

a. Repetibilidad del método

Se prepararon nueve muestras equivalentes a 10 μg de griseofulvina de la siguiente manera:

Se extrajo una muestra de 20 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 20 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesaron 9 muestras de 100 mg de griseofulvina materia prima, se adicionaron cada una a 1 ml del plasma obtenido anteriormente. Se adicionaron 4 ml de cloroformo a cada muestra, se agitaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 5

minutos por separado, de la porción clorofórmica se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las muestras y se llevaron a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando la solución. Se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los matraces anteriores, y se llevaron a 100 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando las soluciones.

Se determinaron las absorbancias utilizando una solución de referencia recientemente preparada, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

Se determinó la absorbancia de la solución estándar a 291 nm utilizando cloroformo como blanco.

b. Reproducibilidad del método

Se prepararon tres muestras individuales al 100 % de concentración de griseofulvina en dos diferentes días y por dos diferentes analistas, de la siguiente manera:

Se extrajo una muestra de 20 ml de sangre a un sujeto, se centrifugaron los 20 ml de la sangre extraída durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Se separó el plasma del paquete celular. Se pesaron 3 muestras de 100 mg de griseofulvina materia prima, se adicionaron cada una a 1 ml del plasma obtenido anteriormente. Se adicionaron 4 ml de cloroformo a cada muestra, se agitaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos por separado, de la porción clorofórmica se tomó una alícuota de 1 ml de cada una de las muestras y se llevaron a 25 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando la solución. Se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los matraces anteriores, y se llevaron a 100 ml con cloroformo en un matraz volumétrico homogenizando las soluciones.

Se determinaron las absorbancias utilizando una solución de referencia recientemente preparada, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

Se determinó la absorbancia de la solución estándar a 291 nm utilizando cloroformo como blanco.

VII. RESULTADOS

A. Materia prima

1. Linealidad del sistema

CONCENTRACION EN $\mu\text{g/ml}$	ABSORBANCIA
2.958	0.187
2.991	0.189
5.633	0.356
5.680	0.359
8.892	0.562
8.766	0.554
10.744	0.679
10.791	0.682
13.117	0.829
13.259	0.838
16.503	1.043
16.361	1.034

Tabla No. 5 Resultados obtenidos experimentalmente de linealidad del sistema

$$\Sigma x = 115.965$$

$$\Sigma y = 7.312$$

$$\Sigma x^2 = 1357.366671$$

$$\Sigma y^2 = 5.421722$$

$$\Sigma xy = 85.786157$$

Coefficiente de determinación y coeficiente de correlación.

$$r = \sqrt{\frac{[12 (85.786157) - (115.695) (7.312)]^2}{[12 (1357.366671) - (115.695)^2] [12(5.421722) - (7.312)^2]}}$$

$$r = 0.999999998$$

$$r^2 = \frac{[12 (85.786157) - (115.695) (7.312)]^2}{[12 (1357.366671) - (115.695)^2] [12(5.421722) - (7.312)^2]}$$

$$r^2 = 0.9999999997$$

Coefficiente de variación

$$\Sigma F = 0.758409$$

$$\Sigma F^2 = 0.479320$$

$$F = 0.06320075$$

$$D.E. = \sqrt{\frac{12 (0.0479321) - (0.758409)^2}{12 (12 - 1)}}$$

$$D.E. = 9.53462 \times 10^{-5}$$

$$C.V = \frac{9.53462 \times 10^{-5}}{0.06320075} \times 100 \quad C.V = 0.15086 \%$$

Debido a que $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ y $C.V. \leq 1.5 \%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema.

2. Linealidad del método

CANTIDAD ADICIONADA (X) μg	CANTIDAD RECUPERADA (y) μg		
5.0	5.348	5.981	5.427
8.0	9.241	8.623	8.908
10.0	10.806	10.902	10.759
12.0	13.196	13.054	13.101
15.0	16.250	16.250	15.981

Tabla No. 6 Resultados obtenidos experimentalmente de linealidad del método

$$\Sigma x = 150$$

$$\Sigma y = 163.827$$

$$\Sigma x^2 = 1674$$

$$\Sigma y^2 = 1984.0047$$

$$\Sigma xy = 1822.053$$

Pendiente

$$m = \frac{15 (1822.053) - (150)(163.827)}{15 (1674) - (150)^2}$$

$$m = 1.056224$$

Ordenada al origen

$$b = \frac{163.827 - 1.056224 (150)}{15}$$

$$b = 0.35956$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[15 (1822.053) - 150 (163.827)]^2}{[15 (1674) - (150)^2] [15 (1984.0047) - (163.827)^2]}$$

$$r^2 = 0.996903585$$

Coefficiente de variación y porciento recuperado

$$\Sigma R = 1645.545$$

$$\Sigma R^2 = 180693.375$$

$$\bar{R} = 109.703$$

$$D.E. = \sqrt{\frac{15 (180693.375) - (1645.545)^2}{15 (15 - 1)}}^{1/2}$$

$$D.E = 3.506645$$

$$C.V = \frac{3.506645}{109.703} \times 100 \quad C.V = 3.19648 \%$$

Determinación de los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente

$$McErrReg = \frac{1984.0047 - 1,056 (1822.05) - 0.35956 (163.827)}{15 - 2}$$

$$McErrReg = 0.0463818$$

$$McReg = 0.35956 (163.827) + 1.056 (1822.05) - [(163.827)^2/15]$$

$$McReg = 194.1160151$$

$$S_m = [0.0463818 \left(\frac{10}{15(1674) - (150)^2} + \frac{1}{15} \right)]^{1/2}$$

$$S_m = 0.0573174$$

$$S_b = [194.1160151 \left(\frac{1}{15(1974) - (150)^2} \right)]^{1/2}$$

$$S_b = 0.272715881$$

$$t_{\text{calc } m} = \frac{1 - 1.056224}{0.0573174}$$

$$t_{\text{calc } m} = -0.9809237$$

$$t_{\text{calc } b} = \frac{0 - 0.35956}{0.27271588}$$

$$t_{\text{calc } b} = -1.318441734$$

t_{tabla} con $n-1$ grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95, = 1,761

Criterios de aceptación

Para la pendiente y la ordenada al origen.

| -1.3184 | < 1.761 estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

| -0.9809 | < 1.761 estadísticamente la pendiente es igual a uno.

3. Exactitud

Por ciento recuperado para cada recobro (x)

#R ADICIONADOS	#R RECUPERADOS	(Y) % RECOBRO
10.0	10.087	100.87
10.0	10.103	101.03
10.0	10.029	100.29
10.0	10.117	101.17
10.0	10.161	101.61
10.0	10.043	100.43
10.0	10.293	102.93
10.0	9.780	97.80
10.0	10.263	102.63

Tabla 7. Resultados obtenidos experimentalmente para la exactitud

$$\Sigma R = 908.76$$

$$\Sigma R^2 = 91778.3896$$

$$\bar{R} = 100.9733$$

$$D.E = \left[\frac{9(91778.3896) - (908.76)^2}{9(9-1)} \right]^{1/2}$$

$$D.E = 1.494289$$

Coefficiente de variación

$$C.V = \frac{1.494289}{100.9733} \times 100 \quad C.V = 1.49228284 \%$$

Es exacto ya que el C.V. < 3 % y \bar{R} se encuentra entre 97-103 %

Exactitud a través del contraste de hipótesis

$$H_0 = \mu = 100$$

$$H_a = \mu \neq 100$$

estadígrafo

$$t_{\text{calc}} = \frac{100.9733 - 100}{1.0755 / (9)^{1/2}}$$

$$t_{\text{calc}} = 1.8540394$$

$$t_{\text{tab}} (1-\alpha/2) = 1.860$$

Criterio de aceptación

$$1.854039 < 1.860$$

Por lo tanto el método es exacto, se acepta H_0 .

4. Precisión

a) Repetibilidad

$$\Sigma R = 908.76$$

$$\Sigma R^2 = 91778.3896$$

$$\bar{R} = 100.9733$$

$$D.E = \left[\frac{9 (91778.3896) - (908.21)^2}{9 (9-1)} \right]^{1/2}$$

$$D.E = 1.494289$$

Coefficiente de variación

$$C.V = \frac{1.494289}{100.9733} \times 100$$

$$C.V = 1.492282844 \%$$

Como el C.V. < 3% se cumple con el criterio para métodos espectrofotométricos.

Repetibilidad por contraste de hipótesis

$$H_0: \alpha \leq 2$$

$$H_a: \alpha > 2$$

estadígrafo

$$X_{1\text{ calc}}^2 = \frac{(9-1)(1.494289)^2}{4}$$

$$X_{1\text{ calc}}^2 = 4.465799231$$

$$X_{1\text{ tab}}^2 = 17.53$$

Criterio de aceptación

$$4.465799231 < 17.53$$

Por lo tanto el método es repetible, se acepta H_0 .

b) Reproducibilidad

ANALISTA

1	2
98.9644	100.1481
98.3728	100.1852
98.2248	100.1481
99.1858	100.2217
98.2975	99.3348
100.2221	99.7782

Tabla 8. Resultados obtenidos experimentalmente para reproducibilidad.

$$y_{\dots} = 1194.0835$$

$$\Sigma y^2 = 118829.1717$$

$$\bar{y} = 99.50695$$

$$D.E. = \left[\frac{12 (118829.1717) - (1194.0835)^2}{12 (12-1)} \right]^{1/2}$$

$$D.E. = 0.868605303$$

Coefficiente de variación

$$C.V. = \frac{0.868605303}{99.50695}$$

$$C.V. = 0.008729091 \%$$

Como el C.V. < 3% se cumple con el criterio para métodos espectrofotométricos.

Análisis de varianza para factores anidados

$$i = 2$$

$$j = 2$$

$$k = 3$$

$$a = 2$$

$$d = 2$$

$$r = 3$$

$$y_{...} = 1194,0385$$

$$y_{ij} = 1194,0835$$

$$y_{11.} = 295,562$$

$$y_{12.} = 297,7054$$

$$y_{21.} = 301,4814$$

$$y_{22.} = 299,3347$$

$$y^{1..} = 593,2674$$

$$y_{2..} = 600,8161$$

$$\Sigma \Sigma y_{ij}^2 = 356477,6982$$

$$(\Sigma y_{i.})^2 = 712946,1939$$

$$\Sigma \Sigma \Sigma ijk^2 = 118829,188$$

$$SCa = \frac{712946.1939}{2(3)} - \frac{(1194.0835)^2}{2(2)3}$$

$$SCa = 4.748569$$

$$SCd = \frac{356477.6982}{3} - \frac{712946.1939}{2(3)}$$

$$SCd = 1.53375$$

$$SCe = 118829.188 - \frac{356477.6982}{3}$$

$$SCe = 3.2886$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. CALCULADA
ANALISTA	1	SCa = 4.74856	MCa = 4.74856	Fa = 6.192103
DIA	2	SCd = 1.53375	MCD = 0.77668	Fd = 1.865558
ERROR	8	SCe = 3.28864	MCe = 0.41107	-----

Tabla 9. Análisis de la varianza

$$F_{a\ 0.05} = 8.51$$

$$F_{d\ 0.05} = 6.06$$

Criterio de aceptación

6.192103 < 38.51 El método analítico es reproducible por los analistas

1.865558 < 6.06 El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

5. Estabilidad de la muestra analítica

CONDICION / TIEMPO

INICIAL	T.A/ 1 HR	T.A/ 3 HR	T.A/ 5 HR	T.A/ 24 HR	T.A/ 72 HR
100.726	100.436	100.291	100.581	100.726	100.872
99.709	99.273	98.837	98.982	99.418	99.563
100.581	100.000	99.709	99.854	100.581	100.436

Tabla 10. Resultados experimentales de estabilidad

CONDICION / TIEMPO

REFR/ 3 HR	REFR/ 3 HR	REFR/ 5 HR	REFR/ 24 HR	REFR/ 72 HR
101.308	100.872	101.017	101.308	101.017
101.017	100.436	100.726	101.162	100.581
99.273	98.255	98.110	98.546	98.110

Tabla 10. Resultados experimentales de estabilidad

Media

$$Y_0 = 100.338$$

$$Y_1 = 99.903$$

$$Y_2 = 99.612$$

$$Y_3 = 99.806$$

$$Y_4 = 100.242$$

$$Y_5 = 100.290$$

$$Y_6 = 100.532$$

$$Y_7 = 98.854$$

$$Y_8 = 99.951$$

$$Y_9 = 100.339$$

$$Y_{10} = 99.903$$

Varianza

$$S_0^2 = 0.3026$$

$$S_1^2 = 0.3452$$

$$S_2^2 = 0.5355$$

$$S_3^2 = 0.6409$$

$$S_4^2 = 0.5141$$

$$S_5^2 = 0.4443$$

$$S_6^2 = 1.2112$$

$$S_7^2 = 1.9659$$

$$S_8^2 = 2.5631$$

$$S_9^2 = 2.4156$$

$$S_{10}^2 = 2.4578$$

Varianza ponderada

$$Sp_1^2 = \frac{2(0.3026) + 2(0.3452)}{2(5 + 1)} = 0.107966$$

$$Sp_2^2 = \frac{2(0.3026) + 2(0.5355)}{2(5 + 1)} = 0.139683$$

$$Sp_3^2 = \frac{2(0.3026) + 2(0.6409)}{2(5 + 1)} = 0.157253$$

$$Sp_4^2 = \frac{2(0.3026) + 2(0.5141)}{2(5 + 1)} = 0.136117$$

$$Sp_5^2 = \frac{2(0.3026) + 2(0.4443)}{2(5 + 1)} = 0.124483$$

$$Sp_6^2 = \frac{2(0.3026) + 2(1.2112)}{2(5 + 1)} = 0.2523$$

$$Sp_7^2 = \frac{2(0.3026) + 2(1.9659)}{2(5 + 1)} = 0.378083$$

$$Sp_8^2 = \frac{2(0.3026) + 2(2.5631)}{2(5 + 1)} = 0.477616$$

$$Sp_9^2 = \frac{2(0.3026) + 2(2.4156)}{2(5 + 1)} = 0.453033$$

$$Sp_{10}^2 = \frac{2(0.3026) + 2(2.4578)}{2(5 + 1)} = 0.460067$$

Intervalo de confianza:

Para temperatura ambiente / 1 hora

$$I.C = (99.903-100.338) + 2.90 [0.10796 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.037658796 \text{ a } 0.167658795$$

Para temperatura ambiente / 3 horas

$$I.C = (99.612-100.338) + 2.90 [0.13968 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.59723671 \text{ a } 0.08772367$$

Para temperatura ambiente / 5 horas

$$I.C = (99.806-100.338) + 2.90 [0.15725 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.2593163 \text{ a } 0.195316299$$

Para temperatura ambiente 24 horas

$$I.C = (100.142-100.338) + 2.90 [0.13612 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -0.77268031 \text{ a } 0.58068031$$

Para temperatura ambiente 72 horas

$$I.C = (100.290-100.338) + 2.90 [0.12448 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -0.695118089 \text{ a } 0.599118089$$

Las muestras son estables a condiciones ambientales durante 1, 3, 5, 24 y 72 horas ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor cero.

Para refrigeración 1 hora

$$I.C = (100.532-100.338) + 2.90 [0.2553 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -0.732730381 \text{ a } 1.120730382$$

Para refrigeración 3 horas

$$I.C = (98.854-100.338) + 2.90 [0.37808(2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -2.611773125 \text{ a } 2.61773125$$

Para refrigeración 5 horas

$$I.C = (99.951-100.338) + 2.90 [0.4776 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.654557589 \text{ a } 0.880557589$$

Para refrigeración 24 horas

$$I.C = (100.339-100.338) + 2.90 [0.4530 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.233505619 \text{ a } 1.235505619$$

Para refrigeración 72 horas

$$I.C = (99.903-100.338) + 2.90 [0.46006 (2 / 5)]^{1/2}$$

$$I.C = -1.679051544 \text{ a } 0.809051544$$

Las muestras son estables a condiciones de refrigeración durante 1, 3, 5, 24 y 72 horas ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor cero

Factor I

Para temperatura ambiente 1 hora

$$I_1 = \frac{100.436}{100.726} \times 100 = 99.7121$$

$$I_2 = \frac{99.273}{99.709} \times 100 = 99.5627$$

$$I_3 = \frac{100}{100.581} \times 100 = 99.4224$$

$$\bar{I} = 99.5657$$

Para temperatura ambiente 3 horas

$$I_4 = \frac{100.291}{100.726} \times 100 = 99.5681$$

$$I_5 = \frac{98.837}{99.709} \times 100 = 99.1255$$

$$I_6 = \frac{99.709}{100.581} \times 100 = 99.1330$$

$$\bar{I} = 99.2755$$

Para temperatura ambiente 5 horas

$$I_7 = \frac{98.255}{100.726} \times 100 = 99.8560$$

$$I_8 = \frac{99.982}{99.709} \times 100 = 100.2738$$

$$I_9 = \frac{99.854}{100.581} \times 100 = 99.2772$$

$$\bar{I} = 99.8023$$

Para temperatura ambiente 24 horas

$$I_{10} = \frac{100.726}{100.726} \times 100 = 100$$

$$I_{11} = \frac{99.418}{99.709} \times 100 = 99.7082$$

$$I_{12} = \frac{100.581}{100.581} \times 100 = 100$$

$$\bar{I} = 99.9027$$

Para temperatura ambiente 72 horas

$$I_{13} = \frac{100.872}{100.726} \times 100 = 100.1449$$

$$I_{14} = \frac{99.563}{100.436} \times 100 = 99.1367$$

$$I_{15} = \frac{100.436}{100.581} \times 100 = 99.8558$$

$$\bar{I} = 99.7125$$

La muestra es estable a condiciones ambientales por 1, 3, 5, 24 y 72 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97 - 103 %

Para refrigeración 1 hora

$$I_{16} = \frac{101.308}{100.726} \times 100 = 100.5778$$

$$I_{17} = \frac{101.017}{99.709} \times 100 = 100.3089$$

$$I_{18} = \frac{99.273}{100.581} \times 100 = 98.6995$$

$$\bar{I} = 99.8621$$

Para refrigeración 3 horas

$$I_{19} = \frac{100.872}{100.726} \times 100 = 100.1450$$

$$I_{21} = \frac{100.436}{99.709} \times 100 = 100.7291$$

$$I_{22} = \frac{98.255}{100.581} \times 100 = 97.6874$$

$$\bar{I} = 99.5205$$

Para refrigeración 5 horas

$$I_{21} = \frac{101.017}{100.726} \times 100 = 100.2889$$

$$I_{22} = \frac{100.726}{99.709} \times 100 = 101.0199$$

$$I_{24} = \frac{98.110}{100.581} \times 100 = 97.5333$$

$$\bar{I} = 99.6140$$

Para refrigeración 24 horas

$$I_{21} = \frac{101.308}{100.726} \times 100 = 100.5778$$

$$I_{22} = \frac{101.162}{99.709} \times 100 = 101.4572$$

$$I_{72} = \frac{96.546}{100.581} \times 100 = 97.9767$$

$$\bar{I} = 100.0039$$

Para refrigeración 72 horas

$$I_{24} = \frac{101.017}{100.726} \times 100 = 100.2889$$

$$I_{36} = \frac{100.581}{99.709} \times 100 = 100.8745$$

$$I_{30} = \frac{98.110}{100.581} \times 100 = 97.5333$$

$$\bar{I} = 99.5656$$

La muestra es estable a condiciones de refrigeración por 1, 3, 5, 24 y 72 horas, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 97 - 103 %

B. Sangre

1. Linealidad del método

CANTIDAD ADICIONADA (X) μg	CANTIDAD RECUPERADA (y) μg		
5.0	4.853	4.397	4.735
8.0	7.294	7.118	7.103
10.0	9.176	8.956	9.088
12.0	10.735	10.691	10.794
15.0	13.500	13.926	13.250

Tabla 11. Resultados obtenidos experimentalmente para linealidad del método en sangre.

$$\Sigma x = 150$$

$$\Sigma y = 135.6176$$

$$\Sigma x^2 = 1674$$

$$\Sigma y^2 = 1364.4562$$

$$\Sigma xy = 1511.0441$$

Pendiente

$$m = \frac{15 (1511.0441) - (150)(135.6176)}{15 (1674) - (150)^2}$$

$$m = 0.8900441$$

Ordenada al origen

$$b = \frac{135.6176 - 0.8900441 (150)}{15}$$

$$b = 0.1407346$$

Coefficiente de determinación

$$r = \frac{[15 (1511.0441) - 150 (135.6176)]^2}{[15 (1674) - (150)^2] [15 (1364.4562) - (135.6176)^2]}$$

$$r^2 = 0.9965713$$

$$r = 0.9982842$$

Coefficiente de variación

$$\Sigma R = 1360.5269$$

$$\Sigma R^2 = 123491.03$$

$$\bar{R} = 90.701793$$

$$D.E. = \left[\frac{15 (123491.03) - (1360.5269)^2}{15 (15 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$D.E. = 2.5185975$$

$$C.V. = \frac{2.5185975}{90.701793} \times 100$$

$$C.V. = 2.7767891 \%$$

Determinación de los valores de t de Student, para evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente.

$$\text{McErrReg} = \frac{1364.4562 - 0.890(1511.04) - 0.14073 (135.617)}{15 - 2}$$

$$\text{McErrReg} = 0.03647887$$

$$\text{McReg} = 0.140734 (135.617) + 0.890 (1511.044) - [(135.617)^2/15]$$

$$\text{McReg} = 137.8397746$$

$$S_m = [137.83977 \left(\frac{10}{15(1674) - (150)^2} + \frac{1}{15} \right)]^{1/2}$$

$$S_m = 3.11728086$$

$$S_b = 137.83977 \left(\frac{1}{15(1674) - (150)^2} \right)^{1/2}$$

$$S_b = 0.229808995$$

$$t_{\text{calc } m} = \frac{1 - 0.8900441}{3.11728086}$$

$$t_{\text{calc } m} = 0.035273016$$

$$t_{\text{calc } b} = \frac{0 - 0.1407346}{0.22980899}$$

$$t_{\text{calc } b} = -0.612398135$$

t_{tablas} con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95. = 1.761

Criterios de aceptación

Para la pendiente y la ordenada al origen.

$0.0355273 < 1.761$ estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

$-0.612398 < 1.761$ estadísticamente la pendiente es igual a 1.

2. Precisión

a) Repetibilidad

$$\Sigma R = 575.794$$

$$\Sigma R^2 = 55256.714$$

$$\bar{R} = 95.965667$$

$$D.E. = \left[\frac{6 (55256.714) - (575.794)^2}{6 (6 - 1)} \right]^{1/2}$$

$$D.E. = 0.228035$$

Coefficiente de variación

$$C.V. = \frac{0.228035}{95.965667} \times 100 \quad C.V. = 0.2376215 \%$$

Como el C.V. < 3 % se cumple con el criterio para métodos espectrofotométricos.

Evaluación de repetibilidad por contraste de hipótesis del método.

$$H_0 = \sigma \leq 2$$

$$H_a = \sigma > 2$$

estadígrafo

$$X_{1\text{ calc}}^2 = \frac{(15 - 1)(0.228035)^2}{2} = 0.3639997$$

$$X_{1\text{ tablas}}^2 = 12.83$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{grados de libertad} = 6 - 1$$

Criterio de aceptación

$$0.363999 < 12.83$$

Por lo tanto el método es repetible, se acepta H_0 .

b) Reproducibilidad

ANALISTA

1	2
100.1602	99.5200
98.3896	100.8000
98.0676	101.2800
99.8395	99.6845
97.7528	99.5268
99.6789	100.3154

Tabla 12. Resultados obtenidos experimentalmente para reproducibilidad.

$$y_{...} = 1195.5225$$

$$\Sigma y^2 = 119117.5894$$

$$\bar{y} = 99.626875$$

$$D.E. = \left(\frac{12 (119117.5894) - (1195.5225)^2}{12 (12-1)} \right)^{1/2}$$

$$D.E. = 1.018856311$$

Coefficiente de variación

$$C.V. = \frac{1.018856311}{99.626875}$$

$$C.V. = 0.0102267 \%$$

Análisis de varianza para factores anidados

$$i = 2$$

$$j = 2$$

$$k = 3$$

$$a = 2$$

$$d = 2$$

$$r = 3$$

$$y_{...} = 1195.0161$$

$$y_{.i} = 1195.0161$$

$$y_{.11} = 296.6182$$

$$y_{.12} = 297.2712$$

$$y_{21} = 301.6$$

$$y_{22} = 299.5267$$

$$y_{1..} = 593.8894$$

$$y_{2..} = 601.1267$$

$$\Sigma\Sigma y_{ij}^2 = 357031.3269$$

$$(\Sigma y_{i.})^2 = 714057.9289$$

$$\Sigma\Sigma\Sigma_{ijk}^2 = 119017.6808$$

$$SCa = \frac{714057.9289}{2(3)} - \frac{(1195.5225)^2}{2(2)3}$$

$$SCa = 4.3648$$

$$SCd = \frac{357031.3269}{3} - \frac{714057.9289}{2(3)}$$

$$SCd = 0.787483$$

$$SCe = 119017.6808 - \frac{357031.3269}{3}$$

$$SCe = 7.2385$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMIA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. CALCULADA
ANALISTA	1	SCa=4.3648	MCa=4.3648	Fa= 11.085
DIA	2	SCd=0.7874	MCd=0.3937	Fd= 0.43516
ERROR	8	SCe=7.2385	MCe=0.9048	-----

Tabla 13. Análisis de la varianza

$$F_{0.05 \text{ a}} = 38.51$$

$$F_{0.05 \text{ d}} = 6.06$$

Criterio de aceptación

$$11.085445 < 38.51$$

El método analítico es reproducible por los analistas.

$$0.435163 < 6.06$$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

3. Exactitud

#E adicionados	#B recuperados	(Y) % recobro
10.0	9.7915	97.915
10.0	9.8067	98.067
10.0	9.8369	98.369
10.0	9.8764	97.764
10.0	9.7764	97.764
10.0	9.7915	97.915
10.0	9.8067	98.067
10.0	9.8369	98.369
10.0	9.8257	98.257

Tabla 14. Resultados obtenidos experimentalmente para exactitud en sangre.

$$\Sigma R = 882.487$$

$$\Sigma R^2 = 86531.92519$$

$$\bar{R} = 98.054111$$

$$D.E = \frac{9(86531.925) - (882.487)^2}{9(9-1)}$$

$$D.E = 0.055854597$$

Coefficiente de variación

$$C.V = \frac{0.05585459}{98.054111} \times 100 \quad C.V = 0.05696034 \%$$

Es exacto ya que el C.V. < 3 % y \bar{R} se encuentra entre 97 - 103 %

Exactitud a través del contraste de hipótesis

$$H_0 = \mu = 100$$

$$H_a = \mu \neq 100$$

estadístico

$$t_{\text{calc}} = \frac{98.054111 - 100}{0.05585459 / 9}$$

$$t_{\text{calc}} = -104.515426$$

$$t_{\text{tab}} = 1.860$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{grados de libertad} = 9 - 1$$

Criterio de aceptación

$$-104.515426 < 1.860$$

Por lo tanto el método es exacto, se acepta H_0 .

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos con el método desarrollado son buenos, ya que se logró diseñar un método analítico con grandes ventajas prácticas y técnicas. de esta manera se tiene un método capaz de cuantificar a la griseofulvina materia prima; éste método además puede aplicarse a la cuantificación de griseofulvina en sangre (plasma), realizando un proceso de extracción y separación con un procedimiento sencillo y rápido.

A. Validación de materia prima

Mediante la validación del método espectrofotométrico de cuantificación de griseofulvina materia prima se determinó que el sistema es adecuado, es decir, existe una relación proporcional en cuanto a los diferentes niveles de concentración en el intervalo utilizado (25, 50, 80, 120, y 150 %).

El resultado del coeficiente de correlación indica que el sistema es lineal a los diferentes niveles de concentración utilizados. En la tabla 5 se muestra la linealidad del sistema observándose que la dispersión de los puntos es aceptable.

Los valores obtenidos para el coeficiente de variación para la linealidad del método muestran que el método utilizado es lineal debido a que cumple con los criterios de que el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3 %, en este caso es de 3.2 % siendo este no significativo para su aceptación. Evaluando la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente por medio de los valores de la distribución de t de Student, éstos indican que la ordenada al origen es igual a cero y la pendiente a uno por lo que se considera que el método es lineal.

Para evaluar la precisión (*repetibilidad*) y exactitud se utilizaron los mismos datos determinando que el método es repetible y exacto considerando que para esto se toma el criterio de que el coeficiente de variación debe ser menor al 3 % para métodos espectrofotométricos; además se evaluaron ambos parámetros estadísticamente por contraste de hipótesis obteniéndose también por este proceso que el método es exacto ya que $t_{calculada}$ es menor que t_{tablas} y es repetible ya que $Xi_{calculada}$ es menor que Xi_{tablas} .

La reproducibilidad del método se evaluó utilizando dos criterios, el primero fue evaluando el coeficiente de variación considerando que para que sea reproducible el método es necesario que el coeficiente de variación experimental sea menor al 3 % en métodos espectrofotométricos dando como resultado por este criterio que el método es reproducible ya que el coeficiente de variación experimental es de 0.00872; y evaluándolo mediante un análisis de varianza, considerando en este caso y en el anterior dos días y dos analistas, en éste segundo caso los valores obtenidos en la distribución F indican que el método analítico espectrofotométrico utilizado es reproducible por los analistas y además es reproducible en distintos días por un mismo analista ya que son menores a los de tablas.

Otro parámetro importante a considerar dentro de la validación es la estabilidad de la muestra ya que ella nos proporciona la información necesaria para establecer las condiciones de manejo de las muestras de griseofulvina durante su cuantificación o también puede proporcionar la información de las condiciones bajo las cuales un analista que no pudo concluir su análisis puede seguir realizándolo.

Considerando la importancia de lo anterior se realizó la estabilidad de la muestra de griseofulvina a condiciones de análisis de 0, 1, 3, 5, 24 y 72 horas a temperatura ambiente y en refrigeración. Como puede observarse en los resultados de las muestras, todas ellas son estables, es poco probable una degradación en tiempo o temperatura, por lo que puede decirse que si el analista no puede concluir su análisis, éste puede realizarse hasta 72 horas después de la preparación de las muestras sin ningún problema.

B. Validación sangre (plasma)

Realizando la validación del método espectrofotométrico de cuantificación de griseofulvina en sangre (plasma) se determinó que es adecuado ya que existe una relación proporcional a los diferentes niveles de concentración en el intervalo utilizado (25, 50, 80, 100, 120 y 150 %).

El resultado del coeficiente de correlación indica que el método espectrofotométrico es lineal a los diferentes niveles de concentración utilizados.

El valor obtenido del coeficiente de variación para la linealidad del método indica que es lineal ya que cumple con el criterio de que el coeficiente de variación experimental debe ser menor o igual al 3 % siendo en este caso de 2.518.

Al evaluar la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente por medio de los valores de la t de Student, éstos indican que la ordenada al origen es igual a cero y la pendiente a uno, por lo que se puede considerar lineal este método estadísticamente.

La precisión (*repetibilidad*) y exactitud se evaluaron determinándose que el método es repetible y exacto utilizando el criterio de que el coeficiente de variación debe ser menor al 3 % para métodos espectrofotométricos, además se evaluaron ambos parámetros estadísticamente por contraste de hipótesis obteniéndose por este proceso que el método es exacto ya que $t_{calculada}$ es menor a t_{tablas} y es repetible ya que $Xi_{calculada}$ es menor que Xi_{tablas} .

La reproducibilidad del método se evaluó por el coeficiente de variación considerando que para ser reproducible debe ser menor al 3 % para el método espectrofotométrico obteniendo el coeficiente de variación experimental de 0.0102 %.

Evaluando la reproducibilidad estadísticamente por análisis de varianza considerando dos

días y dos analistas los valores obtenidos en la distribución F indican que el método analítico espectrofotométrico de cuantificación de griseofulvina utilizado es reproducible por dos analistas y además es reproducible en distintos días por un mismo analista ya que los valores de $F_{calculada}$ son menores que los de F_{tablas} .

Los resultados obtenidos de las validaciones permiten establecer que el método espectrofotométrico cumple con las especificaciones necesarias para la cuantificación de griseofulvina materia prima y en sangre (plasma) por lo que es posible su utilización ya que es un método efectivo.

IX. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método espectrofotométrico para la cuantificación de griseofulvina materia prima.
2. Se validó el método espectrofotométrico desarrollado para la cuantificación de griseofulvina materia prima.
3. Los resultados de la validación del método espectrofotométrico para la cuantificación de griseofulvina materia prima indican que es lineal en el intervalo de 25 a 150 %, además es exacto, preciso y reproducible.
4. Las muestras analizadas de griseofulvina materia prima son estables a temperatura ambiente y en refrigeración durante 72 horas.
5. Se desarrolló un método espectrofotométrico para la cuantificación de griseofulvina en sangre (plasma).
6. Se validó el método espectrofotométrico desarrollado para la cuantificación de griseofulvina en sangre (plasma).
7. Los resultados de la validación del método espectrofotométrico para la cuantificación de griseofulvina en sangre (plasma) indican que es lineal en el intervalo de 25 a 150 %, además es exacto, preciso y reproducible.
8. Se cumplió con los objetivos de desarrollar y validar un método de cuantificación de griseofulvina materia prima y en sangre.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Guía para validación de métodos analíticos
2. Stecher, P.G., ed. (1989). The Merck Index, 11th ed., Rahway, N.J., Merck and Co, 4392.
3. Florey Klaus. "Analytical profiles of drug substances", Ed. Academic Press Inc. 1986. Vol. 8 219-249
4. Domínguez I, Vargas R., R. M. L y Garzón A. Estudio de estabilidad de cafeína, griseofulvina y dipiridamol, sustancias de referencia COSUFAR. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 20, (3).38-42 (1989).
5. Goodman y Gilman. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica". 7a ed. Editorial Panamericana. 1986. 1162-1163.
6. Skoog, A. Douglas. Fundamentos de Química Analítica. 3a edición. Editorial Reverté, 1981. 771-777
7. Connors, K. Curso de análisis farmacéutico. 2a edición. Editorial Reverte. España. 1980 p.145
8. "British Pharmacopoeia 1973," Her Majesty's Stationery Office. London, England, 1973, p. 221
9. "European Pharmacopoeia," European Treaty Series No.50, vol 2, Maisonneuve S.A., Sainte-Ruffine, France, 1971, p. 234

10. H.W. Unteriman and A. Duca, Isr. J. Chem 12, 985 (1974)
11. M.Margosis, J. Chromatogr., 70, 73 (1972)
12. M Margosis, J. Pharm. Sci., 64, 1020 (1975)
13. W.C. Neely and J.R. McDuffie, J. Assoc. Off. Anal Chem. 51 1300 (1972)
14. R. L. Nation, G. W. Peng, V. Smith, and W.L. Chiou, J. Pharm Sci. 67, 805 (1978)
15. H. W. Unteriman, Rev. Chim (Bucharest), 16, 286 (1965)
16. H. W. Unteriman and A. Duca, Lucr. Conf. Nat. Chim. Anal 1971, 3, 311 (Rom)
17. H. W. Unteriman and A. Duca, Chim. Anal (Bucharest), 2, 12 (1972)
18. S. Symochowicz and K. K. Wong, Biochem. Pharmacol., 15, 159 (1966)
19. R. J. Cole, J. W. Kirksey, and C. E. Holaday, Appl. Microbiol., 19, 106 (1970)
20. H. J. Isaaq, E. W. Barr, T. Wei, C. Meyers, and A. Aszalos, J. Chromatogr. 133, 291 (1977)
21. C. Bedford, K. J. Child and E.G. Tomich, Nature, 184, 364 (1959)
22. R. J. Cole, J. W. Kirksey and C. E. Holaday, Appl. Microbiol., 19, 106, (1970)
23. L. P. Hackett and L. J. Dusi, J. Chromatog., 155, 206 (1978)
24. PHARMEUROPA, Vol 2, No.3, Décembre 1990, 176-177,

ANEXO I

Fórmulas para evaluar la linealidad del sistema ⁽¹⁾

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de la solución patrón (x)	Propiedad medida (y)
x_1	$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$
x_2	$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$
·	·
·	·
x_3	$y_{31}, y_{32}, \dots, y_{3n}$

t = número de diluciones

n = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución sean equivalentes.

2. Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + \dots + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{i1}^2 + y_{i2}^2 + \dots + y_{in}^2$$

$$\Sigma xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_i (y_{i1} + y_{i2} + \dots + y_{in})$$

3. Cálculos Finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \left[\frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

4.1 Calcular para cada punto de la linealidad del sistema factor:

$$F = \frac{\text{propiedad medida (y)}}{\text{concentración de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = \frac{y_{11}}{x_1}$$

$$F_{12} = \frac{y_{12}}{x_1}$$

$$F_{1n} = \frac{y_{1n}}{x_1}$$

⋮

$$F_{i1} = \frac{y_{i1}}{x_i}$$

$$F_{i2} = \frac{y_{i2}}{x_i}$$

$$F_{in} = \frac{y_{in}}{x_i}$$

4.2 Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{i1} + F_{i2} + F_{in}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{i1}^2 + F_{i2}^2 + F_{in}^2$$

$$\bar{F} = \frac{F}{N}$$

donde: N = número de puntos de la linealidad del sistema.

5. Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$D.E = \frac{N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N (N - 1)}$$

$$C.V = \frac{D.E}{\bar{F}} \times 100$$

ANEXO 2

Fórmulas para evaluar la precisión del sistema. ⁽¹⁾

1. Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_N$$

2. Cálculos preliminares.

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$D.E = \frac{N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}$$

3. Cálculos finales.

Coefficiente de variación:

$$C.V. = \frac{D.E}{\bar{y}} \times 100$$

ANEXO 3

Fórmulas para evaluar la linealidad del método.

A. Cantidad Adicionada - Cantidad Recuperada

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad Adicionada (x)	Cantidad Recuperada (y)
$x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1n}$	$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$
$x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2n}$	$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$
$\vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \vdots$	$\vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \vdots$
$x_{t1}, x_{t2}, \dots, x_{tn}$	$y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn}$

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cantidad adicionada.

2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{t1} + x_{t2} + \dots + x_{tn}$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} + \dots + x_{1n} y_{1n} + x_{21} y_{21} + x_{22} y_{22} + \dots + x_{2n} y_{2n} + \dots + x_{t1} y_{t1} + x_{t2} y_{t2} + \dots + x_{tn} y_{tn}$$

3. Cálculos Finales:

$$m = \frac{nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{y - m (\Sigma x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{nt (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

B. Porcentaje Recuperado

1. Calcular el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$\bar{R} = (y / x) 100$$

2. Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

3. Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$R = (\Sigma R)/N$$

$$DE = \left| \frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N - 1)} \right|$$

4. Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

$$CV = (DE / R) 100$$

C. Evaluación de la ordenada al origen y la pendiente estadísticamente determinando los valores de t de Student.

$$McErrReg = \frac{\Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)}{n - 2}$$

$$McReg = b(\Sigma y) + m(\Sigma xy) - [(\Sigma y)^2/n]$$

$$Sm = \left\{ (McErrReg \left(\frac{\bar{x}^2}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} + \frac{1}{n} \right))^{1/2} \right\}$$

$$Sb = \left\{ (McErrReg \left(\frac{1}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \right))^{1/2} \right\}$$

Donde

McErrReg = Media cuadrática del error de regresión.

McReg = Media cuadrática de regresión.

Sm = Desviación estándar para la pendiente.

Sb = Desviación estándar para la ordenada al origen.

\bar{x} = Promedio de x

n = número de datos

$$t_{calc} m = \frac{l - m}{Sm}$$

$$t_{\text{calc}} b = \frac{0 - b}{S_b}$$

La t de tablas se determina con $n-1$ grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95.

Criterios de aceptación

Para la pendiente y la ordenada al origen: Se comparan el valor de t_{obs} contra los valores calculados de t_m y t_b .

Si :

$|t_b| < t_{\text{obs}}(n-1, 0.95)$ estadísticamente la ordenada al origen es igual a cero.

$|t_m| < t_{\text{obs}}(n-1, 0.95)$ estadísticamente la pendiente al origen es igual a 1.

ANEXO 4

Fórmulas para evaluar exactitud y repetibilidad al 100 % ⁽¹⁾

1. Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2. Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_N$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2, R_2^2, R_3^2, \dots, R_N^2$$

$$R = (\Sigma R)/N$$

$$DE = \left\{ \frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N - 1)} \right\}^{1/2}$$

3. Cálculos finales:

Coefficiente de variación:

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

4. Evaluación de repetibilidad por contraste de hipótesis del método.

$$H_0 = \delta \leq 2$$

$$H_a = \delta > 2$$

estadígrafo

$$X_{i, \text{calc}}^2 = \frac{(N - 1)(D.E.)_{\text{experimental}}^2}{\alpha_{\text{teórica}}^2}$$

$$\alpha = 0.05$$

grados de libertad = n - 1

$$X_{i, \text{calc}}^2 \leq X_{i, \text{tablas}}^2$$

5. Exactitud a través del contraste de hipótesis

$$H_0 = \mu = 100$$

$$H_a = \mu \neq 100$$

estadígrafo

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{R} - \mu_{\text{teórica}}}{D.E. / (N)^{1/2}} \quad \mu_{\text{teórica}} = 100$$

$$t_{\text{tab}} (1 - \alpha/2)$$

$$\alpha = 0.05$$

grados de libertad = N - 1

Criterio de aceptación

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}}$$

ANEXO 5

Fórmulas para evaluar precisión (reproducibilidad) ⁽¹⁾

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

ANALISTA

DIA	1	2
1	y ₁₁₁ y ₁₁₂ y ₁₁₃	y ₂₁₁ y ₂₁₂ y ₂₁₃
2	y ₁₂₁ y ₁₂₂ y ₁₂₃	y ₂₂₁ y ₂₂₂ y ₂₂₃

2. Cálculos preliminares:

$$y... = \frac{y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}}{12}$$

$$\Sigma y^2 = \frac{y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2}{12}$$

$$\bar{y} = y... / N$$

$$D E = \left[\frac{N(\Sigma y^2) - (y...)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

N = número total de determinaciones
(en este caso específico N = 12)

3. Cálculos finales:

Coefficiente de variación

$$C.V. = (D.E. / y) 100$$

4. Análisis de varianza para factores anidados

i = analista

j = día

k = número de muestras

a = número de analistas

d = número de días

r = número de réplicas

$$y_{...} = y_{111} + y_{112} + \dots + y_{223}$$

$$y_{ij} = y_{11} + y_{12} + y_{21} + y_{22}$$

$$y_{i1} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{i2} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

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

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

Cálculo de la suma del cuadrado de cada analista en cada día.

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

Cálculo de la suma del cuadrado de cada analista en los dos días.

$$\Sigma y_{i..}^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

Cálculo de la suma de cada dato elevado al cuadrado.

$$\Sigma\Sigma y_{ijk}^2 = y_{(111)}^2 + y_{(112)}^2 + y_{(113)}^2 + y_{(121)}^2 + y_{(122)}^2 + y_{(123)}^2 + y_{(211)}^2 + y_{(212)}^2 + y_{(213)}^2 + y_{(221)}^2 + y_{(222)}^2 + y_{(223)}^2$$

Cálculo de la suma de cuadrados del analista (SCa) efecto del factor del analista

$$SCa = \frac{\Sigma y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd)

$$SCd = \frac{\Sigma\Sigma y_{i.}^2}{r} - \frac{\Sigma y_{i..}^2}{dr}$$

Cálculo de la suma de cuadrados del error (SCe)

$$SCe = \Sigma\Sigma y_{ijk}^2 - \frac{\Sigma\Sigma y_{i.}^2}{r}$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F. CALCULADA
A_i	$g.l.a = a-1$	SCa	$MCa = \frac{SCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$
D_j	$g.l.d = (d-1)a$	SCd	$MCd = \frac{SCd}{gld}$	$Fd = \frac{MCd}{MCe}$
E_{ij}	$g.l.e = (r-1)ad$	SCe	$MCe = \frac{SCe}{gld}$	-----

$$Fa_{0.05} = F_{gla/gld}$$

$$Fd_{0.05} = F_{gld/gle}$$

$F_{0.05}$ = Los valores de $F_{0.05}$ se obtienen de la tabla de F . localizando el cruce del valor de los grados de libertad (g.l) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para un $\alpha = 0.05$

Criterio de aceptación

Si $F_{calc} \leq F_{tab}$ No hay efecto por analista

Si $F_{calc} > F_{tab}$ Si hay efecto por analista

Si $F_{calc,d} \leq F_{tab}$ No hay efecto por día anidado en el analista.

Si $F_{calc,d} > F_{tab}$ Si hay efecto por día anidado en el analista.

ANEXO 6

Fórmulas para calcular la estabilidad de la muestra analítica. (1)

- 1. Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:**

CONDICION / TIEMPO

INICIAL	1	2	m
Y_1	Y_4	Y_7	Y_{n-2}
Y_2	Y_5	Y_8	Y_{n-1}
Y_3	Y_6	Y_9	Y_n

- 2. Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:**

Media	\bar{Y}_0	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_m
Varianza	S_0^2	S_1^2	S_2^2	S_m^2

Varianza ponderada:

$$Sp_1^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c + 1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c + 1)}$$

$$Sp_m^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c + 1)}$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza:

Para cada condición x tiempo:

$$I.C. = (\bar{Y}_i - Y_0) + t^* \times \{Sp_1^2 (2/3)\}^{1/2}$$

Donde:

t^* = valor de la t de Dunnet con c comparaciones y $2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

Para cada condición/tiempo/muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/condición/tiempo } i)}{(\text{análisis inicial } i)}$$

$$I_1 = \frac{Y_4}{Y_1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{Y_5}{Y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{Y_{n-1}}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_3} \times 100$$

Para cada condición/tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$\bar{I} = \frac{\Sigma (\text{condición/tiempo})}{N}$$

donde:

N = número de muestras por cada condición/tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del factor (para cada condición/tiempo) deberá cumplir con los siguientes criterios:

METODO	VALOR DE \bar{I}
Cromatográficos	98 - 102 %
Titrimétricos	98 - 102 %
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103 %
Microbiológicos	95 - 105 %