



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINACION DE
GRISEOFULVINA EN SANGRE POR HPLC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MA. ISABEL GARDUÑO POZADAS

ASESORES: O.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
O.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

ENERO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Agradezco a DIOS el que
me acompañe siempre
vaya donde vaya**

Dedico este trabajo

**Con admiración, respeto y cariño
a mis Padres: Crescencio y Victoria
porque no sólo me dieron la vida,
sino porque la han hecho maravillosa.**

**Con cariño a mis hermanos y cuñados
porque este es uno de los muchos
logros que hemos conseguido juntos.**

**A mis sobrinos, a quienes espero
dar siempre un buen ejemplo.**

**A mis Tíos, en especial a Oliva, Alex
y Jose Luis, por su ayuda, consejos
y motivación.**

**A mis compañeros y amigos a Gloria,
Juan, Raúl, Arturo, Yolanda, Luz,
Angélica, Luis y Dolores; porque a ellos
debo el haber dado este paso, gracias por
su amistad y apoyo.**

**A mis amigos del FPST, por su ayuda
en la realización de este trabajo.
Gracias Chuy, Claus, Sara, Beto, Mary,
Graciela, Carmen y Maricela.**

**A Paty, Ramón y Toño, porque con nada agradezco, su apoyo, paciencia y enseñanzas, pero sobre todo su amistad y confianza.
¡Muchas Gracias!**

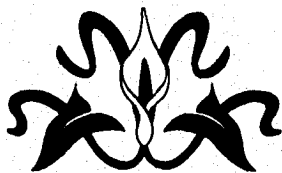
A mis Profesores en general, pues de una u otra manera han inculcado en mí un sentido de responsabilidad y ética en todo lo que haga.

A Lety y Oscar, quienes me brindaron su ayuda y amistad incondicionalmente.

Con un agradecimiento muy especial a: Antonino Saenz Prieto, Armando Ramirez Morales y Enrique De Nova R. Por su colaboración en la realización del mismo

Con mi mas grande agradecimiento a la empresa Perkin-Elmer y muy especialmente al Q. Emilio Esleva, quien colaboró enormemente para llevar a cabo el presente proyecto.

**A VICTOR, el amor de mi vida,
motivo de mi superación
personal y profesional y sobre todo,
mi motivo de vivir.
¡TE QUIERO!
Gracias por formar parte de mi vida.**



INDICE

GLOSARIO INTRIDUCCION

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	1
1.1. Cromatografía	7
1.1.1. Tipos de Cromatografía	1
- Cromatografía de gases	2
- Cromatografía de líquidos	2
- Cromatografía de exclusión	3
- Cromatografía de adsorción	3
- Cromatografía de partición	4
- Cromatografía de intercambio iónico	4
1.2. Equipo	5
1.2.1. Depósito de disolventes	6
1.2.2. Sistema de bombeo	6
1.2.3. Sistema de inyección	7
1.2.4. Columna	7
1.2.5. Detectores	8
- Detector de Índice de Refracción	9
- Detector de Fluorescencia	9
- Detector Electroquímico	9
- Detector Ultravioleta	10
- Detector de Arreglo de Diodos	10
1.3. Generalidades sobre griseofulvina	10
1.3.1. Antecedentes	10
1.3.2. Características generales	11
1.3.3. Farmacología	12
1.3.4. Métodos de análisis	14
1.4. Validación	15
1.4.1 Definiciones	17
- Linealidad	17
- Exactitud	17
- Precisión	18
- Límite de detección	19
- Especificidad	19
- Estabilidad	19
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. OBJETIVOS	21

IV. HIPOTESIS	22
V. MATERIAL Y EQUIPO	23
VI. METODOLOGIA	24
6.1. Preparación de fase móvil.....	24
6.2. Preparación de referencia	24
6.3. Preparación de muestra	24
6.4. Procedimiento	24
6.5. Validación del método.....	25
6.5.1. Linealidad del sistema	25
6.5.2. Precisión del sistema	25
6.5.3. Linealidad del método	25
6.5.4. Exactitud y repetibilidad al 100 %	25
6.5.5. Precisión (reproducibilidad).....	26
6.5.6. Especificidad	26
6.5.7. Límite de detección	26
6.5.8. Estabilidad	26
VII. RESULTADOS	27
7.1. Implementación del método	27
7.1.1. Solubilidad de griseofulvina	27
7.1.2. Ajuste de parámetros	27
7.1.3. Límite de cuantificación	27
7.2. Análisis y Validación.....	28
7.2.1. Especificidad	28
7.2.2. Linealidad del Sistema	29
7.2.3. Precisión del Sistema	30
7.2.4. Linealidad del Método	30
7.2.5. Exactitud y Repetibilidad al 100%	31
7.2.6. Reproducibilidad	32
7.2.7. Estabilidad de la muestra	34
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS	35
IX. CONCLUSIONES	38
X. BIBLIOGRAFIA	39
ANEXO.....	44

GLOSARIO

b:	Ordenada al origen
r:	Coefficiente de correlación
r²:	Coefficiente de determinación
CV:	Coefficiente de variación
IC:	Intervalo de confianza a 95%
Σ:	Sumatoria
m:	Pendiente
n:	Número de replicaciones
t:	Número de diluciones
y:	Media aritmética
N:	Número total de determinaciones
S²:	Varianza
DE:	Desviación Estándar
x:	Dilución o cantidad recuperada
y:	Propiedad medida o cantidad recuperada
R:	Porcentaje recuperado
R:	Promedio del porcentaje recuperado
F:	Factor para cálculos de linealidad del sistema
I:	Factor para cálculos en la estabilidad de la muestra
S^p:	Varianza ponderada
F:	Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0,975
gl:	Grados de libertad
y...:	y total
c:	Número de comparaciones en la prueba de t de Dunnet.
LC:	Límite de confianza
IC:	Intervalo de confianza
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 referente al analista
MCd:	Media de cuadrados referente al día

INTRODUCCION

Las micosis más frecuentes, son las llamadas Dermatomicosis, debido a que los agentes productores son los hongos Dermatofitos, principalmente los pertenecientes a los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*.

En base a lo anterior, para su tratamiento, se han desarrollado diversas formulaciones farmacéuticas; sin embargo, ante estas situaciones se recurre a un antibiótico antimicótico, cuyo principio activo es Griseofulvina pues para tal efecto, resulta muy eficaz.

Toda formulación farmacéutica requiere de un análisis que asegure la calidad y función para la que fue creada. Para dicho análisis se han desarrollado varios métodos con una sensibilidad y especificidad determinada, métodos que van desde los más simples hasta los más sofisticados y los cuales, cada laboratorio adapta a sus necesidades y posibilidades.

En el presente trabajo, se implementó un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de griseofulvina en plasma y para asegurar la confiabilidad de éste, se realizó la validación.

Considerando los resultados obtenidos, se deduce la aceptación del método como alternativa de análisis de griseofulvina puesto que cumple con los requisitos establecidos por los criterios de validación; y con base en esto, se concluye que el método es lineal, específico, preciso, exacto y reproducible además de sencillo.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1. CROMATOGRAFIA

En Química Analítica siempre se ha recurrido a métodos de separación para los análisis de sustancias. Inicialmente la precipitación fue el método de separación y análisis elegido, sin embargo, debido a las necesidades de los analistas, surgieron nuevos métodos que implican o requieren de un mínimo de separación. (1)

Entre los métodos recientes encontramos la extracción y la cromatografía; ambos basados en las diferencias de distribución de los componentes de la muestra entre dos fases.(1)

Cromatografía es una palabra proveniente del griego que significa "escritura en color", y comprende técnicas capaces de separar los componentes de una mezcla considerando las propiedades físicas y químicas de dichos componentes; características que permiten su distribución entre dos fases, una denominada fase móvil y otra, fase estacionaria; es decir, en este sistema es responsable de la fase móvil "acarrear" los componentes a través de la fase estacionaria. (2,3,4)

La Cromatografía en sus diferentes tipos es un método empleado con frecuencia en los últimos tiempos debido a que, como método de separación, presenta gran poder de resolución y no sólo permite separar, sino cuantificar las sustancias separadas; incluso ofrece la posibilidad de trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra. (1)

Continuamente se han perfeccionado las técnicas de análisis y se han desarrollado nuevas y variadas, debido a estos avances científicos y tecnológicos, se ha llegado a la HPLC, siglas del nombre en inglés (CLAR en español) para designar a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución la cual ha adquirido gran auge en los últimos años.

1.1.1. TIPOS DE CROMATOGRAFIA

Debido a la gran variedad de técnicas cromatográficas, se ha recurrido a una clasificación, la cual se basa en las características ya sea de la fase móvil o de la fase estacionaria; de la siguiente manera:

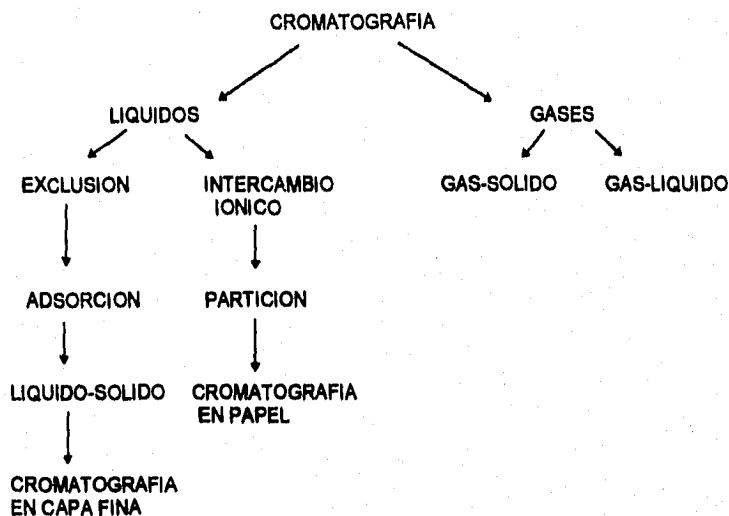


Figura 1. Clasificación de cromatografías (4)

Cromatografía de gases (2,5)

Es muy similar a la Cromatografía de líquidos, en ambos procesos se emplea un sistema similar para suministrar la fase móvil y también un mecanismo similar para introducir la muestra, así como columnas cromatográficas para realizar las separaciones y sistemas de detección que dan lugar a los correspondientes cromatogramas; la diferencia radica en que la fase móvil empleada en la cromatografía gaseosa es precisamente gas, mientras que en cromatografía líquida, dicha fase móvil, es un líquido.

Dentro de la cromatografía de gases encontramos por un lado, la denominada Gas-sólido en la que la retención se basa en la adsorción física del soluto por la fase sólida; esta es la técnica usada para conseguir la separación de sustancias de bajo peso molecular y no tiene aplicación en Química Analítica. Mientras por otra parte, encontramos la cromatografía Gas-líquido, la cual contempla la solubilidad de un soluto en un líquido que actúa como fase estacionaria.

Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos ha tenido gran aceptación en la Industria, este tipo de cromatografía puede analizar compuestos solubles pero no volátiles; sus principales aplicaciones se dan en el análisis de fármacos, principalmente en la

monitorización terapéutica de fármacos y en la determinación de fármacos de abuso. (12)

Cromatografía de exclusión

Está basada en las diversas penetrabilidades de las moléculas en los poros; en ella no se presentan fuerzas como en otros tipos de cromatografía, sino una mayor o menor probabilidad de entrar, en mayor o menor grado en los poros que presentan las partículas del relleno, por esto se dispone de un relleno con poros de determinado tamaño, en el cual las moléculas de gran tamaño no entran en ellos y permanecen menos tiempo en la columna; en cambio, las de menor tamaño entran en los poros que encuentran a su paso. (1)

Hablar de cromatografía de exclusión implica mencionar cromatografía de filtración y permeación en gel; esto es, cuando se emplea como fase estacionaria un gel reticulado, se denominará al proceso "cromatografía de filtración en gel"; mientras que, si la fase estacionaria se trata de un polímero rígido, se denominará "cromatografía de permeación en gel", pero ambos procesos se basan en la diferencia de pesos moleculares.(5)

Cromatografía de adsorción

Algunos de los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los diferentes componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, consiguiéndose la separación gracias a los coeficientes de distribución de dichos componentes, tal es el caso de la cromatografía de adsorción en la que la fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil bien puede ser un líquido o un gas. La separación en esta técnica, se basa en repetidas etapas de adsorción y desorción en donde el grado de separación depende de la superficie del sólido y por consiguiente del tamaño de partícula sólida el cual debe ser el menor posible ya que de esa manera se tiene una mayor superficie activa en relación al volumen de empaque. (2, 5)

En este tipo de cromatografía se requiere que la fase estacionaria presente una gran polaridad, los sólidos más empleados son la alúmina y la gel de sílice; debido a esto, es una técnica muy útil, se aplica a moléculas de baja o media polaridad y de peso molecular no mayor de 1000. (1)

La actividad de la fase estacionaria se ve afectada con frecuencia por la retención de moléculas de alta polaridad como alcoholes, agua, etc., lo que dificulta la reproducción de los resultados obtenidos en los análisis ya que las características de la superficie han sufrido cambios. En consecuencia la gel de sílice empleada en CLAR es comunmente sometida a procesos de desactivación,

con el fin de disminuir la retención de moléculas muy polares y así mantener uniformes las condiciones de la superficie, para de esta manera, mejorar la reproducibilidad de los análisis. (1)

Cromatografía de Partición

La separación no se basa en la adsorción, sino en la partición entre ambas fases. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un líquido sostenido por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. (2,5)

En la cromatografía de partición se satura la fase estacionaria por la fase móvil y viceversa, de tal forma que se efectúa la separación entre ambas fases debido a las diferentes afinidades de los componentes por cada una de ellas, esto es, en base a la diferencia de sus coeficientes de partición. (5,6)

Son dos las formas en que se presenta la partición, una es denominada fase normal, en donde la fase móvil es un líquido de baja polaridad y el líquido de la fase estacionaria es de naturaleza polar; otra, llamada fase reversa, en la que la fase estacionaria es de tipo no polar mientras que la fase móvil es un líquido polar. (6)

Los líquidos comúnmente empleados en la fase estacionaria son nitrogenato, etilenglicol, dimetilsulfóxido y agua entre otros, soportados en sólidos como gel de sílice de gran porosidad o la tierra diatomea que como soporte son los más utilizados. (6)

En este proceso de separación se encuentra el líquido de la fase estacionaria ligado (químicamente) a las partículas de sílice o de alúmina, produciendo una cromatografía de fase químicamente unida, la cual, sobre todo en su fase inversa, es una de las técnicas cromatográficas más empleadas en la actualidad. (6)

Cromatografía de Intercambio Iónico (2)

Este método de separación, se basa en la atracción de la fase estacionaria por las moléculas del soluto, es decir, en comparación con las fuerzas tendientes a disolver ese soluto en la fase móvil. La fase estacionaria está constituida por resina de granulometría fina, contando comúnmente con una matriz de poliestirenodivinilbenceno y una estructura de poros muy grandes; además presenta una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la de la muestra.

En base a esto, dependiendo de la carga de la muestra será el nombre asignado; es decir, si la muestra presenta una carga catiónica, la cromatografía

se denominará de intercambio catiónico, de lo contrario se hablará de cromatografía de intercambio aniónico.

Con respecto a la fase móvil, ésta es una solución acuosa tampón en la que el pH y la polaridad se emplean para controlar el tiempo de elución.

Esta técnica emplea una celda conductimétrica y casi exclusivamente se aplica a muestras iónicas o ionizables; en cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será la atracción hacia la superficie iónica y por lo mismo, mayor será su tiempo de elución.

1.2 EQUIPO (4,7,8)

Un equipo para este tipo de técnicas analíticas debe tener además de gran sensibilidad y resolución, un alto grado de reproducibilidad. En general, un equipo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución, consta principalmente de un depósito de disolventes en el cual se encuentra contenida la fase móvil, un sistema de bombeo para impulsar la fase móvil, un sistema de inyección por medio del que se introduce la muestra, una columna en donde se lleva a cabo la separación, un detector y finalmente un registrador.

Depósito de disolventes → Bomba → Inyección → Columna → Detector → Registrador

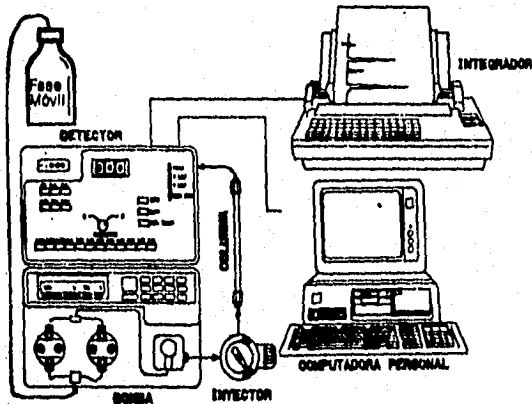


Figura 2. Componentes esenciales de un cromatógrafo de líquidos

1.2.1. Depósito de disolventes

Esta parte del equipo puede ser desde un sencillo frasco de vidrio hasta un sofisticado sistema capaz de filtrar y desoxigenar el disolvente contenido, el cual fungirá como fase móvil y que, por ser parte activa del sistema de Cromatografía de Líquidos, su elección es muy importante, debido a ésto, dicha elección debe considerar las siguientes características:

- Elevada pureza
- Temperatura de ebullición de 20° a 50° C
- Baja viscosidad
- Reactividad nula para evitar interacción con los solutos o con el empaque
- Limitada toxicidad e inflamabilidad
- Polaridad adecuada
- Solubilidad compatible con la muestra.

Es indispensable que la fase móvil esté libre de partículas pues podrían obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna, lo cual puede conseguirse con una filtración previa; sin embargo el sistema cromatográfico cuenta con un filtro en la "toma" de la fase móvil para asegurar que no pasará partícula alguna al sistema. También es necesario eliminar los gases presentes en el disolvente pues algunos (como el oxígeno) tienden a disolverse produciendo burbujas, lo que puede afectar el funcionamiento del equipo. (5, 6)

1.2.2. Sistema de bombeo

Tiene como objetivo impulsar la fase móvil a través de la columna y se debe cumplir con ciertas especificaciones de reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante. En general, un sistema de bombeo debe presentar las siguientes características:

- Flujo entre 0.5 y 10 ml/min
- Presión máxima de flujo 400 atmósferas (5600 psi)
- Reproducibilidad y flujo constantes
- Independiente de presión y viscosidad
- Sin pulsaciones
- Resistencia a líquidos corrosivos.

Hoy en día existen diversos tipos de sistemas de bombeo: La bomba de flujo constante que consiste en un pistón accionado por un tornillo, con los cuales se controla la presión de operación y una vez que el sistema ha alcanzado esa presión, la velocidad de flujo será constante. La más empleada es la bomba

recíproca que proporciona un flujo constante de la fase móvil a la columna cromatográfica.

Por otro lado están las bombas a presión constante, que consisten en un tubo de acero inoxidable en forma de espiral que contiene la fase móvil; este tubo se encuentra colocado por un extremo a la columna y por el otro a una fuente de gas. Al accionar el suministro de gas, éste desplaza a la fase móvil forzándola por el sistema. En este caso es indispensable mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes ya que, controlando estos parámetros, las pulsaciones también se controlan. (4,5,9)

1.2.3. Sistema de inyección

Como su nombre lo indica es la parte del equipo cromatográfico que permite la introducción de la muestra para su posterior separación. Es muy importante la introducción de la muestra para obtener una buena resolución y separación; ésta debe hacerse en forma de paquete pequeño para ayudar a la obtención de picos simétricos, para ello, generalmente se emplean válvulas que permiten incorporar la muestra a la fase móvil y posteriormente a la columna sin pérdida de presión que pueda alterar el flujo constante. (4)

Existen varios mecanismos para introducir la muestra pudiéndose clasificar en: manuales y automatizados. Un inyector manual generalmente emplea válvulas inyectoras de alta presión con 4 a 6 puertas y dos posiciones; una de las posiciones comunica la bomba con la columna mientras que por otra se introduce la muestra a baja presión a un capilar externo de volumen conocido, este capilar se conoce como "loop". En tanto que, un inyector automático introduce las muestras por sí solo disminuyendo el error en la medición y controlando el volumen a inyectar, con lo que aumenta la reproducibilidad de los resultados. (4, 6)

1.2.4. Columna (4,5,6)

Es la parte fundamental en cromatografía porque aquí se lleva a cabo la separación. Generalmente, la columna es un tubo de acero inoxidable (en algunos casos se emplea vidrio o titanio) con una longitud de 7.5 a 30 cm de largo con un diámetro interno de 2 a 5 mm; la cual contiene a la fase estacionaria.

El material de empaque de la columna está formado de microesferas que usualmente son de sílice porosa con la superficie modificada, aunque pueden emplearse diferentes materiales. Dichas modificaciones de la superficie de sílice se realizan por medio de reacciones químicas, en las que con frecuencia se une una monocapa de grupos octadecil, octilo, amino, nitrilo, etc. Dando lugar a un producto con diferentes características cromatográficas.

En CLAR, el relleno debe producir la mayor resolución en el menor tiempo posible, tener una capacidad aceptable de muestra, además de ser fácil de empacar, ser barato y producir pequeñas caídas de presión, lo cual debe considerarse puesto que este empaque puede servir como fase estacionaria o como soporte de la misma; su elección dependerá de la separación que desee hacerse ya que de una buena selección de la fase estacionaria, depende el éxito de la separación de solutos con características y propiedades diferentes.

Como se mencionó, el material de empaque está formado por microesferas de sílice, la cual está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano con grupos silanol de superficie que pueden interactuar con las moléculas de la muestra. Los grupos hidroxilo son los más importantes y de los que existen dos tipos: los libres y los reactivos; éstos últimos constituyen agentes enlazantes que pueden absorber permanentemente los compuestos polares de la muestra y absorben el agua en la gel.

Por otra parte, los grupos silanol se hacen reaccionar con agentes silanzantes para producir la fase C-18, debido a un impedimento estérico del radical C-18 sobre los grupos silanol, sólo del 30 al 40 % de los silanoles se recubren. Posteriormente se presenta una reacción con una molécula más pequeña para recubrir una cantidad adicional de radicales -O-OH, lo que se conoce como "end-capping" o recubrimiento final. (10)

1.2.5. Detectores (4, 6, 10)

La detección del soluto fue durante mucho tiempo una de las principales dificultades en CLAR, sin embargo, los cromatógrafos actuales poseen un amplio intervalo operativo que normalmente permite trabajar en un mismo aparato a escala analítica o preparativa y presenta gran sensibilidad, lo cual facilita la detección de cantidades pequeñas (hasta nanogramos de muestra).

En general existen dos tipos de detectores: uno denominado detector específico que presenta una respuesta variable dependiendo del tipo de molécula, debido a esto se requiere de detectores que tengan una respuesta mínima con respecto al eluyente y máxima con respecto al soluto; mientras que el otro tipo de detector, detector universal, detecta el eluyente y funciona por diferencia entre la respuesta del soluto y la del disolvente, no obstante, este tipo de detectores tiene una sensibilidad limitada.

Cuando se elige un detector se debe buscar que sea altamente sensible, estable, de lectura continua y respuesta universal, con lo que conseguirá una respuesta lineal con respecto a la concentración; para ello, es necesario considerar que la molécula problema produzca una señal en el detector, es decir, la sustancia debe ser capaz de modificar la propiedad física medida por éste y la intensidad de la señal ha de ser proporcional al número de moléculas que pasan

por la celda de flujo continuo. En este sentido se consideran tres parámetros: límite de detección, linealidad y sensibilidad; donde límite de detección se refiere a la cantidad mínima detectable de un soluto determinado. Linealidad, por su parte, se refiere a que la señal generada por el detector debe ser proporcional a la concentración de la muestra, y por último, la sensibilidad se refiere a la relación entre la señal generada y la cantidad de soluto que produce dicha señal.

CLAR cuenta con una variedad de detectores basándose en diversos principios de operación, dentro del grupo de detectores más utilizados encontramos los siguientes:

- Detector de índice de refracción
- Detector de fluorescencia
- Detector Ultra Violeta
- Detector electroquímico
- Detector de infrarrojo
- Detector de conductividad

Detector de índice de refracción

Este detector determina la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil sola y de la fase móvil que contiene el compuesto en cuanto emerge de la columna, de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil, no obstante es menos sensible que un detector ultra violeta o de Fluorescencia.

Detector de fluorescencia

Los detectores de fluorescencia son sensitivos a compuestos que presentan fluorescencia inherente o que pueden ser convertidos a derivados fluorescentes por transformación química de otros compuestos, o bien por unirse a agentes fluorescentes en grupos funcionales específicos.

Detector electroquímico

Estos detectores, al igual que los potenciométricos o voltamétricos, son empleados en la cuantificación de especies capaces de oxidarse o reducirse, son muy selectivos, sensitivos y confiables pero requieren de fase móvil conductora libre de oxígeno y iones metálicos reductores.

Detector ultra violeta (1,2,3,6)

En CLAR, es el detector más utilizado, se basa en la absorción de luz provocada por el soluto al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta; generalmente se usa como fuente de luz, una lámpara de mercurio de baja presión, ese haz de luz es colimado y posteriormente se hace pasar a través de dos celidas, una de ellas de referencia; los rayos de luz emergentes se hacen pasar después, 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. De estos, hay dos detectores: uno de longitud de onda variable, el cual emplea como fuente luminosa una lámpara de deuterio, lo que permite alcanzar longitudes de onda de 190 a 600 nm; y el detector de longitud de onda fija, en donde la fuente de luz es una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una longitud de onda de 254 nm.

Detector de arreglo de diodos

Es el más moderno de los detectores cuya característica es poder realizar la detección de los diferentes componentes de una muestra en un rango de longitud de onda, que va desde el ultravioleta hasta cerca del infrarrojo. Con él es posible obtener cromatogramas en tercera dimensión.

1.3. GENERALIDADES SOBRE GRISEOFULVINA

1.3.1. Antecedentes

Las infecciones fúngicas se clasifican como micosis superficiales, subcutáneas y profundas. Las micosis más comunes son las superficiales entre las que se encuentran: Tiña capitis, Tiña corporis, Tiña cruris, Tiña pedis y Tiña versicolor; las cuales, en conjunto son también denominadas Dermatomicosis, nombre que reciben precisamente porque son los hongos Dermatofitos los causantes, principalmente los pertenecientes a los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*.

Este tipo de enfermedades, cuando se presentan, requieren de muchos cuidados y largos tratamientos, sin embargo, se han desarrollado fármacos con el fin de ayudar en la pronta recuperación del paciente que las padece. Para ello existen antibióticos de amplio espectro, no obstante, el primero al que se recurre en estos casos, es a griseofulvina ya que actúa de manera eficaz frente a este tipo de infecciones.

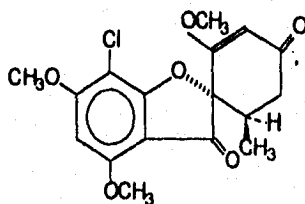
1.3.2. CARACTERISTICAS GENERALES (11,12)

Nombre común: Griseofulvina

Nombre científico: 7-cloro-2,4,6-trimetoxi-6-beta-metilspiro-(benzofuran-2(3H),1-(2)-ciclohexeno)-3,4- diona.

7 -cloro-4,6-dimetoxicumarán-3-ona-2-spiro-1-(2-metoxi-6-metilciclohex-2-en-4-ona).

Estructura química: $C_{17}H_{17}ClO_6$



Peso molecular: 352.77 g/mol

Potencia: No menos de 900Ug de $C_{17}H_{17}ClO_6$ por mg:

Descripción: Polvo blanco o amarillo pálido, inodoro y cristalino.

Solubilidad: Soluble en cloroformo, ligeramente soluble en alcohol y metanol, muy ligeramente soluble en agua y fácilmente soluble en 1,1,2,2-tetracloroetano.

Temperatura de fusión: 217 °C y 224°C

Rotación óptica: +348° y +364°, determinada en solución de dimetilformamida conteniendo 10 mg/ml.

Identificación

Disolver 5 mg de la muestra en 1 ml de ácido sulfúrico y agregar 5 mg de dicromato de potasio en polvo, se produce una solución color vino.

Espectro

En solución etanólica anhidra a 25°C presenta máximos a 324, 291 y 235 nm. El espectro de absorción en la región UV de una solución 1:100000 exhibe absorción máxima y mínima a las mismas longitudes de onda que una solución de referencia de griseofulvina.

Acidez

Suspender 250 mg de la muestra en 20 mg de alcohol y valorar con una solución 0.02M de NaOH utilizando fenoftaleína como indicador. No se requiere más de 1 ml de solución 0.02 M de NaOH para cambiar el color de la solución de griseofulvina.

Pérdida por secado

No más de 1%. En frasco provisto con tapón, con un capilar secar 100 mg de la muestra al vacío a presión, de forma que no exceda en 5 mm de mercurio a 60 °C durante 3 hs.

Residuos de ignición: No más de 0.2%

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 griseofulvina utilizando el valor de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 686$.

1.3.3. FARMACOLOGIA (13,14)

La griseofulvina es un antibiótico antifúngico, de espectro reducido que se extrae de cultivos de *Penicillium griseofulvum*, derivado del benzofurano. Posee una acción especialmente fungistática "in vitro", sobre los hongos Dermatofitos que producen las micosis cutáneas (Infecciones en pelo, piel y uñas) o Dermatoficosis con concentraciones bajas (0.4 µg/ml) son capaces de inhibir el crecimiento de hongos de los géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, excepto en Tiña versicolor.

Se considera un antimicótico de espectro reducido ya que no actúa sobre los hongos causantes de micosis profundas o sistémicas, ni sobre *Candida albicans*, ni sobre bacterias.

Mecanismo de acción

Actúa como fungistático e interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos (especialmente DNA), por un mecanismo de competencia, ya que el fármaco es antagonista de precursores de los ácidos nucleicos como las purinas y sus derivados.

La griseofulvina se une con el RNA fúngico e interfiere en los microtúbulos del haz mitótico y el citoplasma. Estos microtúbulos transportan material a través del citoplasma hacia la pared celular. El daño de los túbulos altera la síntesis de la pared celular en los extremos en crecimiento de las hifas, por lo tanto, sólo es efectiva el fármaco contra microorganismos en crecimiento.

Farmacocinética

Se administra por vía oral y parenteral, la velocidad de absorción y la cantidad absorbida son aumentadas si se acompaña de una dieta rica en grasas.

Con una dosis de 1 g se alcanzan niveles séricos pico de 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un tiempo de 4 y hasta 8 hs. Después de su ingestión. El 50% de la dosis es eliminado en 12 hs.

La griseofulvina se distribuye ampliamente en el organismo, en particular en el hígado, tejido adiposo y músculos; se distribuye hacia la piel, pelo y uñas y es activamente secretada desde las glándulas sudoríparas. Se concentra en las células precursoras de la queratina, mientras que en sangre se encuentra combinada con las proteínas en un 80 %. La mayor parte es desalquilada en el hígado y los metabolitos son depurados a través de los riñones, menos del 1% es eliminado sin metabolizar, una parte considerable es excretada en heces sin modificar.

Efectos adversos comunes: Cefaleas.

Reacciones adversas

Son raras, incluyen leucopenia, eritema y hepatotoxicidad, disgenesia, xerostomía, vómitos y diarrea, atralgias, neuritis periférica y fiebre, rara vez produce olvidos o pérdida de la memoria, es teratogénico en animales y está contraindicado durante el embarazo.

En dosis elevadas en ratas, puede provocar lesiones hepáticas y sobre todo, lesiones en tubos seminíferos del testículo con detención de la mitosis en la metafase por inhibición del metabolismo del DNA (induce a las enzimas hepáticas).

Interacción medicamentosa

La griseofulvina induce a las enzimas hepáticas; las interacciones farmacológicas con los agentes metabolizados en el hígado son comunes, los

barbitúricos reducen la absorción sistémica de la griseofulvina y pueden ser necesarias concentraciones elevadas para lograr el efecto terapéutico.

Los efectos del alcohol incluyendo la taquicardia y eritema pueden ser potenciados por la griseofulvina. Es posible la disminución en la eficacia de los anticonceptivos orales debido a la estimulación del metabolismo hepático.

El fenobarbital es capaz de aumentar el metabolismo de la griseofulvina con disminución de su acción por el mecanismo de inducción enzimática. También puede aumentar su metabolismo si se emplean anticoagulantes sintéticos por inducción enzimática con disminución de sus efectos.

Preparados comerciales de griseofulvina

Forma farmacéutica	Dosis	Nombre
Tabletas	125 y 250 mg	Griseofulvina
	125 y 250 mg	Fulvicin P/6
	125, 250 y 500 mg	Grisactin
	125, 250 y 330 mg	Grisactin ultra
	165 y 330 mg	Fulvicin P/6
	250 y 500 mg	Fulvicin U/F
	250 mg	Grisovin FP
	250 y 500 mg	Grifulvin V
Suspensión	125 mg/ 5 ml	Grifulvin V
	1 gr/ ml	SSKI

Tabla 1. Presentaciones de Griseofulvina (15)

1.3.4. METODOS DE ANALISIS (2,11,12)

Entre los métodos de análisis para griseofulvina, el más sencillo resulta ser el espectrofotométrico, sin embargo existe una variedad de ellos que incluye polarográficos, cromatografía gas-líquido, espectrofluorimetría, métodos colorimétricos, cromatografía en papel y en capa fina. Algunos de los cuales, permiten la cuantificación de griseofulvina en fluidos biológicos y en tejidos, tal es el caso de cromatografía de gases, espectrofluorimetría, cromatografía en capa fina en gel de sílice, espectrofotometría de absorción y, por supuesto, CLAR.

Este último es un método sencillo que, a diferencia de otros métodos (como espectrofotometría por ejemplo), permite realizar el análisis con volúmenes pequeños y como se ha mencionado, es factible cuantificar cantidades pequeñas

de muestra. En la tabla 2 se presentan los parámetros a controlar en un análisis por CLAR.

COLUMNA	FASE MOVIL	CROMATO.	DETECTOR	VELOCIDAD (ml/min)	TIEMPO DE RETENCION
mBondapak C	Acetonitrilo: agua (1:1)	Fase reversa	F 260 nm	2	3.8 min.
mBondapak C	45%Acetonitrilo: agua pH 3.4	Fase reversa	UV 290 nm F 280 nm	1	-----
Zorbax CN	Metano:agua 3:2	Fase reversa	UV 254 nm	1 a 2	6.3 min
Zorbax CN	Acetonitrilo en 45 mM de fosfato ácido de potasio pH 3	Fase reversa	UV 295 nm	2.5	4.8 min.

Tabla 2. Métodos analíticos por CLAR para griseofulvina (16)

1.4. VALIDACION (17)

Ultimamente la Industria Farmacéutica se ha preocupado por encontrar métodos analíticos que sean funcionales y confiables en la determinación de la calidad de los productos que así lo requieran.

Por esta razón se han desarrollado numerosos métodos de análisis para dichos productos, métodos que deben cumplir con ciertos parámetros; de aquí que sea necesaria la validación para asegurar el cumplimiento de los objetivos para los que fue creado.

La validación de un método se puede definir como el proceso mediante el cual queda establecido de forma experimental, que la capacidad del mismo satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; en términos analíticos: exactitud conocida y variabilidad establecida.

La determinación de los puntos para validar un método depende de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicatividad del método, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza.

La validación debe realizarse tomando en cuenta consideraciones como método de análisis, forma farmacéutica, sustancia analizada, concentración, condiciones de análisis, etc.

Los parámetros de evaluación comúnmente considerados en la validación de métodos analíticos son:

- Exactitud
- Linealidad
 - Linealidad del método
 - Linealidad del sistema
- Precisión
 - Reproducibilidad
 - Repetibilidad
- Especificidad

Y de requerirlo el método, pueden considerarse los siguientes:

- Sensibilidad
- Tolerancia del sistema
- Cantidad mínima detectable
- Cantidad mínima cuantificable
- Estabilidad de la muestra

Debido a la variabilidad de aplicaciones de los métodos, los procesos de validación son diferentes como se puede apreciar en la siguiente tabla.

PARAMETRO	CONTROL CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD DE CONCENTRACION		INDISPONIBILIDAD
		BAJA	ALTA	
Linealidad del sistema	X	X	X	X
Precisión del sistema	X	X	X	X
Límite de detección		X		X
Límite de cuantificación		X		X
Exactitud al 100%	X	X	X	X
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 3. Parámetros a evaluar dependiendo de la aplicación del método (17)

1.4.1. DEFINICIONES (17)

LINEALIDAD

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.

Criterios de aceptación

1. Coeficiente de Variación < 1.5
2. Coeficiente de correlación > 0.99
3. Coeficiente de determinación > 0.98
4. La estadística inferencial través del contraste de hipótesis para el intercepto y la pendiente

Intercepto (b)

$$t_{\text{calc.}} < t_{0.975, n-1, \text{gl}}$$

H₀: Intercepto = 0

H_a: Intercepto $\neq 0$

LIIC $< 0 >$ LSIC

Pendiente (m)

$$t_{\text{calc.}} < t_{0.975, n-1, \text{gl}}$$

H₀: Pendiente = 1

H_a: Pendiente $\neq 1$

LIIC $< 1 >$ LSIC

IC 102% $> \mu >$ 98%

donde: LIIC: Límite Inferior de Intervalo de Confianza

LSIC: Límite Superior de Intervalo de Confianza

IC: Intervalo de Confianza

EXACTITUD

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

Criterio de aceptación

1. CV = 2

2. Utilizando el estadígrafo de contraste t de student

$$t_{\text{calc.}} < t_{\text{tab } n-1 \text{ gl}}$$

$$LIIC < 100 < LSIC$$

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

PRECISION

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

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

A) REPETIBILIDAD

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

Criterio de aceptación

1. $CV = 2$
2. Empleando el estadígrafo χ^2

$$\chi^2_{\text{calc.}} < \chi^2_{\text{tab } n-1 \text{ gl}}$$

B) REPRODUCIBILIDAD

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

Criterio de aceptación

1. $CV < 2$
Promedio de recobro 98-102%
2. Empleando ANADEV (Tabla de Análisis de Varianza) y el estadígrafo F de Fisher

$$F_{\text{CALC}} < F_{\text{TABLAS}}$$

VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{CALC}
Analista	$gla = a - 1$	SCa	$MCa = \frac{SCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$
Día	$gld = d - 1$	SCd	$MCd = \frac{SCd}{gld}$	$Fa = \frac{MCd}{MCE}$
Error	$gle = r - 1$	SCe	$MCE = \frac{SCe}{gle}$	-----

Tabla 4. Cálculos de Análisis de Varianza (17)

LIMITE DE DETECCION

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

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.

ESTABILIDAD

Es el tiempo mediante el cual, una muestra permanece sin cambio bajo condiciones de almacenamiento normales.

Criterio de aceptación

No más del 2% de diferencia en la cuantificación de cada muestra.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el desarrollo de todo proceso farmacéutico no sólo se contempla la formulación y forma farmacéutica del principio activo, sino también los métodos o técnicas analíticas de los que se auxiliará para determinar si el producto cumple los requerimientos para lo cual fue creado. Asimismo, dicho proceso debe acompañarse de la validación que permita asegurar tanto la calidad del producto, como la confiabilidad del método de análisis que se empleará.

La griseofulvina, un antibiótico del tipo de los antimicóticos que actúa de manera eficaz frente a infecciones en piel, pelo y uñas, causadas por hongos Dermatofitos, no ha sido la excepción, y su análisis se ha efectuado empleando diferentes métodos; cada uno de los parámetros de importancia que este fármaco debe cumplir, se ha analizado por métodos espectrofotométricos, fluorométricos y últimamente por cromatografía de líquidos, la cual ha adquirido gran auge en la Industria Farmacéutica.(3,13)

Para que tanto la griseofulvina, como cualquier otro fármaco pueda considerarse de calidad y ofrezca seguridad, es necesario que él o los métodos de análisis sean validados; esto es, siendo la validación un proceso mediante el cual se establece que la capacidad de éste, satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas que aseguren que dicho método proporciona las especificaciones para satisfacer los requisitos de calidad, la validación aseguraría tanto la calidad del producto, como la del método analítico. (17)

Considerando que las micosis son infecciones que requieren de largos tratamientos, y dado que griseofulvina es el fármaco de elección (tratándose de Dermatomicosis), y puede presentar reacciones adversas serias en el paciente que la ingiere, se están desarrollando formulaciones farmacéuticas que minimicen dichas reacciones; para esto es necesaria la implementación de un método analítico para cuantificación de griseofulvina en plasma, debido a que, dentro de los parámetros a analizar en dichos procesos farmacéuticos, se encuentra el análisis de biodisponibilidad, lo cual se ha podido conseguir satisfactoriamente con Cromatografía Líquida de Alta Resolución, debido a que presenta características que lo hacen un método práctico, específico y confiable.

Por estas razones, aunadas a la de un bajo consumo de reactivos (a diferencia de otros métodos), se requiere de la implementación de un método que, con los resultados obtenidos, nos lleven al aseguramiento de la calidad de los productos, así como su distribución biológica.

III. OBJETIVOS

GENERAL:

Implementar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para determinación de griseofulvina en sangre.

PARTICULARES:

- Implementar un método analítico para determinación de griseofulvina en sangre.

- Validar el método de análisis.

IV. HIPOTESIS

Dado que la griseofulvina es un compuesto que por su estructura molecular presenta absorción en el rango ultravioleta del espectro, es posible que, empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución con un detector ultravioleta como método analítico, se pueda cuantificar la presencia de dicho compuesto en plasma ya que CLAR es un método específico, preciso y lineal, lo cual puede comprobarse con los resultados de la validación.

V. MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL

Matraz aforado Pyrex	10 ml
Matraz aforado Pyrex	25 ml
Matraz aforado Pyrex	50 ml
Pipeta volumétrica Pyrex	1 ml
Pipeta volumétrica Pyrex	2 ml
Pipeta volumétrica Pyrex	5 ml
Pipetas Pasteur	
Tubos de ensayo Pyrex	13 x100
Bureta graduada Pyrex	10 ml
Probeta Pyrex	500 ml
Vaso de precipitado Pyrex	250 ml
Microjeringa HAMILTON	0.1 ml
Perilla de succión	
Membrana para filtrar Millipore	0.25 μ M
Sistema de filtración Millipore	0.45 μ M

SUSTANCIAS

Griseofulvina Grisovin Tabletas 500 mg
Griseofulvina Glaxo SRef. Lote 17A6 Planta Pikoto

DISOLVENTES

Acetonitrilo grado HPLC J.T.Baker
Cloroformo grado RA J.T. Baker
Agua grado HPLC

EQUIPO

Balanza analítica OHAUS (0.0001 mg)
Balanza granataria de dos platillos OHAUS (2 Kg)
Centrifuga SOL-BAT J-12 (8 Tubos)
Cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer TriDet
Ultrasonido Branson
Integrador Perkin-Elmer Nelson 1022
Impresora EPSON LX-300
Columna C18 mBondapak

VI. METODOLOGIA

Se prepararon 3 mezclas de acetonitrilo:agua en proporciones 70:30, 60:40 y 50:50, las cuales se emplearon como fase móvil y con las que se realizaron corridas de una muestra estándar de griseofulvina con el fin de optimizar los parámetros cromatográficos como son la fase móvil, velocidad de flujo de la misma, sensibilidad, tiempo de retención y atenuación.

6.1. FASE MOVIL: Se mezcló acetonitrilo con agua en proporción 70:30 (ambos, grado HPLC), se filtró a través de una membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 μM y se desgasificó en baño de ultrasonido. Se preparó una solución de acetonitrilo:agua en proporción 60:40 se filtró a través de una membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 μM y se desgasificó en baño de ultrasonido. Se mezcló acetonitrilo con agua en proporción 50:50 se filtró a través de una membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 μM y se desgasificó en baño de ultrasonido.

6.2. PREPARACION DE REFERENCIA: Se pesaron 2.5 mg de griseofulvina, se adicionó 1 ml de plasma en un matraz volumétrico con capacidad para 25 ml; se llevó al aforo con fase móvil, se transfirió 1 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml y se llevó al aforo con fase móvil. De esta última solución se colocaron 2 ml en un tubo de ensaye, se adicionaron 2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente, se sometió a centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se separó la porción clorofórmica y se evaporó el cloroformo a sequedad en baño María. Al residuo se le resuspendió con fase móvil y se filtró a través de una membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 μM .

6.3. PREPARACION DE LA MUESTRA: Se administraron 2 tabletas de 500 mg de griseofulvina a un paciente, quien requirió de una dieta rica en grasas con la finalidad de obtener una mejor absorción del fármaco. Se extrajeron 5 ml de sangre del paciente 4 hrs. después de la ingesta. Se separó el plasma del paquete celular mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 mins. Se transfirieron 2 ml de plasma a un tubo de ensaye. Se adicionaron 2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente, se sometió a centrifugación a 2500 rpm durante 5 min. Se separó la fase clorofórmica y se evaporó a sequedad en baño María. Al residuo se le resuspendió con fase móvil y se filtró a través de una membrana Millipore con apertura de poro de 0.25 μM .

6.4. PROCEDIMIENTO: La temperatura de operación del equipo fue de 25 °C, se ajustaron los parámetros. Se inyectaron 20 μl de la solución de referencia y posteriormente 20 μl de la solución problema. Se midieron las respuestas del área

del pico a tiempo de retención equivalente, obtenidas con la solución muestra y de referencia. Se calculó la cantidad en mg de griseofulvina en la porción de la muestra tomada, por medio de la fórmula $1000C (A_m/A_{ref})$ donde: C equivale a la concentración en mg de la solución de referencia de griseofulvina; A_m y A_{ref} son las respuestas de las áreas obtenidas a tiempo de retención equivalente a la preparación de la solución muestra y de referencia.

6.5. VALIDACION DEL METODO (17)

6.5.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA: Se determinó, construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón equivalentes a 50, 75, 100, 125 y 150 % y haciendo un análisis por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar depende del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, debe estar incluida la concentración seleccionada como 100%.

6.5.2. PRECISION DEL SISTEMA: Se realizó el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

6.5.3. LINEALIDAD DEL METODO: Se determinó a partir de placebos adicionados de 5 muestras independientes de concentraciones equivalentes a 50, 75, 100 125 y 150 % . Se realizó el procedimiento por triplicado para cada dilución. 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 el correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio depende del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudios de estabilidad,) y debe llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

6.5.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %: Se determinó con 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.

6.5.5. PRECISION (Reproducibilidad): Se prepararon 6 muestras individuales correspondientes al 100% de la concentración teórica. Y se analizaron por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

6.5.6. ESPECIFICIDAD : Se prepararon 4 muestras en el siguiente orden: una primera muestra de griseofulvina estándar equivalente a 2 µg/ml en fase móvil; una segunda muestra adicionando plasma más fase móvil. La tercer muestra correspondió a una solución de plasma en fase móvil; y la cuarta y última muestra corresponde a la preparada a partir del plasma de un paciente que previamente ingirió griseofulvina; y a todas se les aplicó el método propuesto.

6.5.7. LIMITE DE DETECCION: Se determinó adicionando cantidades exactas de una muestra correspondiente a 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5 µg/ml. Y se realizó el procedimiento de análisis.

6.5.8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA: Se colocaron 3 muestras independientes equivalentes al 100 % de la concentración a temperatura ambiente y 3 muestras en temperatura de refrigeración, se realizó el análisis con el método propuesto a las 24, 48 y 72 hs. de su preparación.

VII. RESULTADOS

7.1. IMPLEMENTACION DEL METODO

7.1.1. SOLUBILIDAD DE GRISEOFULVINA

DISOLVENTE	VELOCIDAD DE DISOLUCION
Acetonitrilo	+
Acetonitrilo:Agua 70:30	+++
Acetonitrilo:Agua 60:40	++
Acetonitrilo:Agua 50:50	++

Tabla 5. Resultados de pruebas de solubilidad

7.1.2. AJUSTE DE PARAMETROS DEL CROMATOGRAFO

ATENUACION	VELOCIDAD DE LA CARTA cm/hr.	VELOCIDAD DE FLUJO ml/min.	RESULTADOS
4	10	1.0	Picos pequeños y simétricos
4	10	1.5	Picos pequeños y simétricos
4	10	2.0	Picos pequeños y asimétricos
8	10	1.0	Picos pequeños y simétricos
8	10	1.5	Picos pequeños y simétricos
8	10	2.0	Picos grandes asimétricos y pulsaciones

Tabla 6. Resultados del análisis cromatográfico

7.1.3. LIMITE DE CUANTIFICACION

Se prepararon muestras de griseofulvina estándar de concentraciones equivalentes a 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 $\mu\text{g/ml}$; la cuales se sometieron al análisis con el método propuesto y se consiguió respuesta por parte del equipo cromatográfico sólo para las muestras correspondientes a las concentraciones de 0.8, 0.9 y 1 $\mu\text{g/ml}$.

7.2 RESULTADOS DEL ANALISIS

7.2.1. ESPECIFICIDAD: Los siguientes cromatogramas se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

Fase móvil: Acetonitrilo:Agua en proporción 50:50

Velocidad de flujo de la fase móvil: 1.5 ml/min

Atenuación: 8 AUFS

Tipo del cálculo del pico: Area en porcentaje

Integración del pico: De base a base

Sensibilidad del área de inyección: 50

Velocidad de la carta: 10 mm/min

Estándar externo: Griseofulvina Glaxo (2 µg/ml)

Solución problema de griseofulvina: Grisovin, Tabletas 500 mg

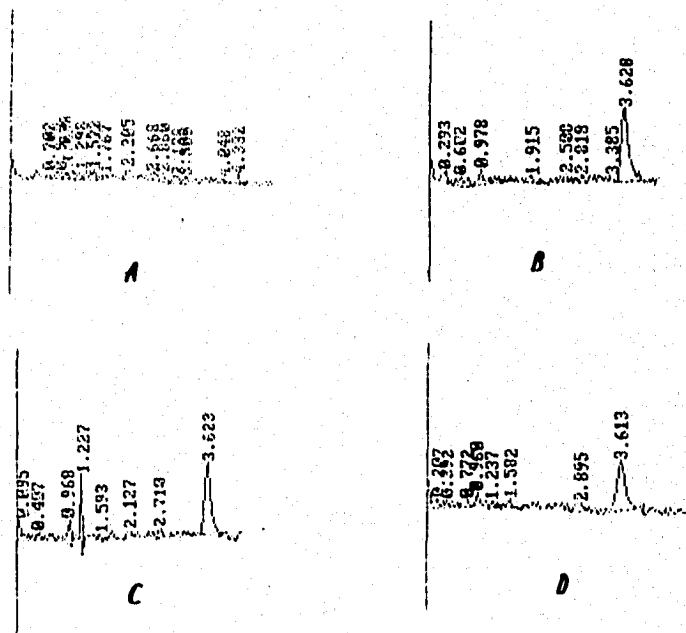


Fig. 3 CROMATOGRAMAS

En las gráficas se pueden observar cuatro cromatogramas, en donde el cromatograma A representa al plasma, el B a la solución de griseofulvina

estándar; el cromatograma C, representa a la solución de griseofulvina problema en plasma, y finalmente el cromatograma D representa al placebo cargado.

7.2.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

CANTIDAD ADICIONADA $\mu\text{g/ml}$	RESPUESTA AREA EN %		% RECOBRO	
1.0	38513	38490	100.02	99.96
1.5	46259	46739	99.48	100.51
2.0	53175	53399	99.78	100.21
2.5	61794	61731	100.05	99.94
3.0	70691	70547	100.10	99.89

Tabla 7. Resultados para determinación de linealidad del sistema.

$$\Sigma x = 20$$

$$\Sigma y = 541338$$

$$\Sigma x^2 = 45$$

$$\Sigma y^2 = 3.05710 \times 10^{10}$$

$$\Sigma xy = 1182174.5$$

$$r = 0.9988$$

$$r^2 = 0.9977$$

$$m = 15899.7$$

$$b = 22334.4$$

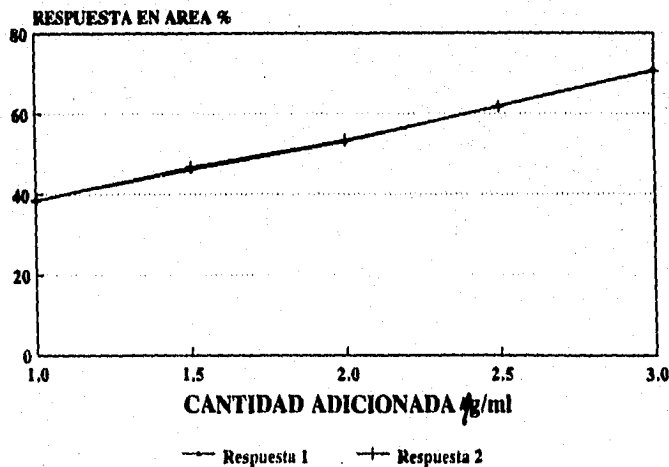
$$\Sigma R = 999.94$$

$$R = 99.994$$

$$DE = 0.2693$$

$$CV = 0.2693445$$

LINEALIDAD DEL SISTEMA



GRÁFICA 1

7.2.3. PRECISION DEL SISTEMA

CANTIDAD ADICIONADA	RESPUESTA AREA %
2.0 µg/ml	16404
2.0 µg/ml	16560
2.0 µg/ml	16116
2.0 µg/ml	16360
2.0 µg/ml	16121
2.0 µg/ml	16215

Tabla 8. Resultados analíticos para precisión

$$\begin{aligned} \Sigma y &= 97776 \\ y &= 16296 \\ \Sigma y^2 &= 1593512738 \\ DE &= 176.092 \\ CV &= 1.0805 \end{aligned}$$

7.2.4. LINEALIDAD DEL METODO

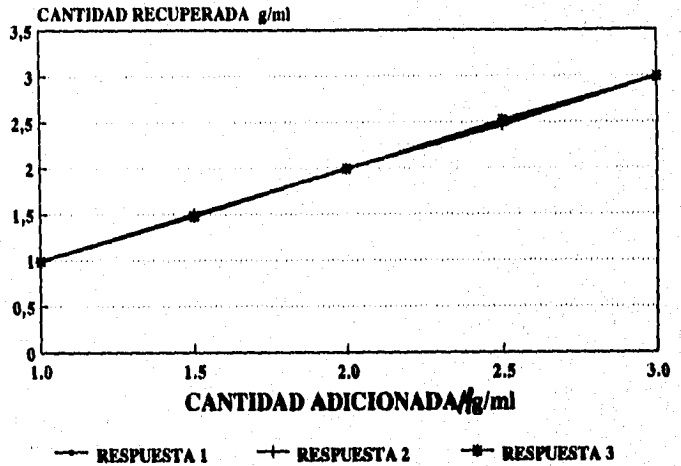
CANTIDAD ADICIONADA µg/ml	CANTIDAD RECUPERADA µg/ml			% RECOBRO		
	1.0	1.003	0.998	0.997	100.3	99.8
1.5	1.504	1.506	1.489	100.2	100.4	99.2
2.0	2.007	1.993	1.998	100.3	99.6	99.9
2.5	2.491	2.479	2.529	99.6	99.1	101.1
3.0	3.003	2.997	2.998	100.1	99.9	99.9

Tabla 9. Resultados para determinación de linealidad del método

$$\begin{aligned} \Sigma x &= 30 \\ \Sigma y &= 29.992 \\ \Sigma x^2 &= 67.5 \\ \Sigma y^2 &= 67.4696 \\ \Sigma xy &= 67.484 \\ r &= 0.9998 \\ r^2 &= 0.9997 \\ \eta &= 1 \\ b &= -5.33 \text{ E}^{-4} \\ \Sigma R &= 1499.1 \end{aligned}$$

R = 99.94
 DE = 0.4982
 CV = 0.4985445

LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA 2

7.2.5. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

CANTIDAD ADICIONADA $\mu\text{g/ml}$	CANTIDAD RECUPERADA $\mu\text{g/ml}$	% Recobro
2.00	2.03	101.53
1.92	1.918	99.94
1.92	1.88	97.97
2.08	2.07	99.92
2.16	2.13	98.78
2.24	2.25	100.85

Tabla 10. Porcentaje de recobro para exactitud y repetibilidad

$\Sigma R = 598.89$
 $\Sigma R^2 = 59806.6827$
 R = 99.83
 DE = 1.3048
 CV = 1.30

EXACTITUD**CONTRASTE DE HIPOTESIS**

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

$$t_{\text{calc.}} = -0.31913$$

$$t_{\text{tab } n-1 \text{ gl}} = 2.015$$

$$IC = 98.756 < \mu < 100.90$$

REPETIBILIDAD

$$H_0: \alpha < 2$$

$$H_a: \alpha > 2$$

$$X^2_{\text{calc.}} = 2.1218$$

$$X^2_{\text{tab } n-1 \text{ gl}} = 12.83$$

7.2.6. REPRODUCIBILIDAD

ANALISTA (I)		
	1	2
DIA(j)		
1	99.35	100.8
	100.8	98.8
	100.7	98.2
2	100.46	100.13
	98.75	99.84
	100.8	101.7

Tabla 11. Porcentaje de recobro para
Análisis de Varianza

$$y_{\dots} = 1197.93$$

$$\Sigma y^2 = 119606.8431$$

$$y = 99.8275$$

DE = 1.364685

CV = 1.367

Datos para Análisis de varianza

$l = 2$

$j = 2$

$k = 3$

$a = 2$

$d = 2$

$r = 3$

$y_{...} = 1197.93$

$y_{.j} = 1197.93$

$y_{11} = 300.85$

$y_{12} = 300.01$

$y_{21} = 295.8$

$y_{22} = 301.47$

$y_1 = 600.86$

$y_2 = 597.07$

$SSy^2_{.j} = 358780.2435$

$Sy^2_{.j} = 717525.3245$

$SSSy^2_{jk} = 119608.8431$

$SCa = 1.197$

$SCd = 5.8604$

$SCe = 13.4286$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA DE TABLAS
ANALISTA	1	SCa = 1.197	MCa = 1.197	Fa = 0.6723
DIA	2	SCd = 5.8604	MCd = 2.9302	Fd = 1.74564
ERROR	8	SCe = 134286	MCe = .678575	-----

Tabla 12. Resultados de Análisis de varianza

$F_{\alpha, 0.05} = 38.51$

$F_{d, 0.05} = 6.06$

7.2.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

INICIAL (Y ₀)	TA/24 hrs.(Y ₁)	TA/48 hrs.(Y ₂)	TR/24 hrs.(Y ₃)	TR/48 hrs.(Y ₄)
1.- 100.9	103.4	109	100.7	102.8
2.- 99.75	100.9	105.7	100.37	102.7
3.- 99.02	104.2	108	95.47	99.9

Tabla 13. Por ciento de recobro de muestras expuestas a diferentes temperaturas.

Donde TA significa temperatura ambiente; TR temperatura de refrigeración

$$\begin{array}{ll}
 Y_0 = 99.89 & S_0^2 = 0.8982 \\
 Y_1 = 102.86 & S_1^2 = 3.074 \\
 Y_2 = 107.56 & S_2^2 = 2.863 \\
 Y_3 = 98.84 & S_3^2 = 8.578 \\
 Y_4 = 101.8 & S_4^2 = 2.709
 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll}
 S_{p_1}^2 = 1.324 & IC_1 = 0.8035 \text{ a } 5.136 \\
 S_{p_2}^2 = 1.253 & IC_2 = 5.562 \text{ a } 9.777 \\
 S_{p_3}^2 = 3.158 & IC_3 = -4.410 \text{ a } 2.310 \\
 S_{p_4}^2 = 1.202 & IC_4 = -0.154 \text{ a } 3.974
 \end{array}$$

T A/24 hrs.	T A/48 hrs.	T R/24 hrs.	T R/48 hrs.
I ₁ .- 102.47	106.02	99.80	101.88
I ₂ .- 101.15	105.96	100.62	102.95
I ₃ .- 105.31	109.06	98.41	100.88
I = 102.97	107.88	98.94	101.90

Tabla 14. Determinación de factores para estabilidad

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

8.1 IMPLEMENTACION DEL METODO

Al determinar las condiciones de trabajo, se sometió la muestra de griseofulvina a pruebas de solubilidad para establecer la fase móvil y el arrastre de la muestra en la columna; los resultados obtenidos muestran que la polaridad obtenida con la mezcla acetonitrilo:agua permite la mejor disolución de la griseofulvina (en orden descendente) en proporciones 70:30, 60:40 y 50:50.

Una vez determinada la fase móvil se estableció el tiempo de retención obteniéndose tiempos menores mientras mayor es la concentración de acetonitrilo en la mezcla, es decir, se obtuvieron tiempos de retención de 2.3 min. usando la

VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS

Especificidad

Considerando los cromatogramas obtenidos, se deduce que el método es específico puesto que no se observe interferencia por alguna otra sustancia contaminante o por alguno de los componentes del plasma, lo cual puede observarse en los cromatogramas expuestos en la página 28 pues en el cromatograma A (placebo), no se observa un pico, como en los demás cromatogramas (B,C y D) que indique la presencia de griseofulvina.

Precisión del sistema

Los resultados arrojados indican que el sistema es preciso bajo las condiciones de trabajo ya mencionadas, pues el valor para el coeficiente de variación obtenido mediante los resultados experimentales (1.080) es menor al valor establecido por los criterios de validación para métodos cromatográficos (1.5%).

Linealidad

Con los resultados de la validación del método cromatográfico, se estableció que éste es adecuado para el análisis propuesto, ya que tanto en la

determinación de la linealidad del sistema como en la del método, se observa proporcionalidad entre la respuesta y los diferentes niveles de concentración, niveles que van desde 50,75,100,125, y hasta 150%; es decir, el método implementado es lineal a estos niveles de concentración, según lo indica el valor del coeficiente de correlación, que de los parámetros estadísticos es el que tiene mayor peso como criterio de aceptación.

Con respecto a la linealidad del método, no se observa solamente, un valor del coeficiente de correlación aceptable dentro de los criterios de validación, sino que además los valores obtenidos para la pendiente ($m=1$) y la ordenada al origen ($b=-5.3 \times 10^{-4}$) que presenta una tendencia hacia cero, también son indicativos de la linealidad del método.

Exactitud y Repetibilidad al 100%

Para determinar la exactitud y repetibilidad del método es necesaria la comparación de los resultados con los valores ya establecidos. Observando sólo el valor del coeficiente de variación, se puede decir que el método es exacto ya que el valor experimental ($CV=1.30$) es menor al que establecen los criterios de validación ($CV=2\%$).

En base a los resultados obtenidos por estadística inferencial, también se deduce que es exacto y repetible puesto que el valor del estadígrafo calculado (t de student para evaluar exactitud y J cuadrada para evaluar repetibilidad) es menor al valor obtenido de tablas; esto es, $t_{calc.} = -0.31913$, $t_{tab.} = 2.015$, $Xi^2_{calc.} = 2.128$, y $Xi^2_{tab.} = 12.83$. Además de que los valores de por ciento de recobro caen dentro de los límites establecidos de 98 a 102%.

Reproducibilidad

Considerando el valor del coeficiente de variación, se observa que éste, siendo de 1.367 es menor que el establecido ($CV < 2\%$), por lo que se deduce que el método es reproducible a las condiciones establecidas y que no hay gran variación en el valor de los resultados al aplicar el método por diferentes analista ni en días diferentes, lo cual es avalado por los valores obtenidos para el porcentaje de recobro que se encuentran en el límite de 98 a 102 %, y por el análisis de varianza en el que el valor del estadígrafo F de Fisher, calculada experimentalmente, es menor ($F_{calc.} = 0.6723$) que el valor obtenido de tablas ($F_{tab.} = 38.51$) con respecto al analista, de igual manera que para el análisis de varianza con respecto al día ($F_{d,calc.} = 1.745$ y $F_{d,tab.} = 6.06$).

Estabilidad de la muestra

Se dice que la muestra es estable, es decir, que sus características fisicoquímicas no cambian de manera considerable si el valor del Intervalo de confianza para la diferencia de la media de análisis incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto se encuentra entre 98 y 102 %. En base a esto, aunado a los resultados obtenidos, se establece que la muestra es estable bajo condiciones de refrigeración, pues el valor de la media de los factores $I_{TR/24hrs.} = 98.94\%$ y $I_{TR/48hrs.} = 101.90$ respectivamente, se encuentran dentro del límite; además de los intervalos de confianza respectivos son de -4.410 a 2.310 y -0.154 a 3.974 , los cuales incluyen al cero como está establecido.

No se recomienda mantener muestras para su análisis a temperatura ambiente ni siquiera 24 hre después de su preparación, pues los resultados indican que las muestras no son estables ya que el IC presenta valores de 0.8035 a 5.136 para $TA/24hrs$ (almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 hrs.) y de 5.562 a 9.777 en almacenamiento durante 48 hrs.; valores que no incluyen al cero, además del resultado obtenido para el factor I el cual es de 102.97 y 107.68 respectivamente. Dichos resultados no caen dentro de los límites del 98 al 102%.

IX. CONCLUSIONES

- 1.- Se implementó un método analítico para la cuantificación de griseofulvina en plasma bajo las condiciones mencionadas.
- 2.- La muestra es estable bajo condiciones de refrigeración hasta por 72 horas después de su preparación, para este método de análisis.
- 3.- Se validó el método implementado para la cuantificación de griseofulvina en plasma con lo que se concluye que el método es específico, lineal, reproducible, exacto y preciso.
- 4.- Considerando las características de la griseofulvina, se logró la implementación del método de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución empleando un detector de ultravioleta, asimismo su validación lo cual lleva a la conclusión de aceptar la hipótesis ya que el método resultó ser preciso, específico, lineal, exacto, repetible y reproducible.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Vera L.E. y Thibert M. Manual de cromatografía líquida de alta eficiencia. LEACSA. 1-34.
- 2.- Bender T. Gary. Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica. España; Editorial ACRIBIA, 1987: 187-248.
- 3.- Skoog D.A. West D.M. Análisis Instrumental. México: Editorial Interamericana, 1983.
- 4.- Yost R.W. Etre L.S. Conlon R.S. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica U.S.A.: Perkin Elmer 1980.
- 5.- Hargis L.G. Analytical Chemistry, Principles and Techniques. USA:Editorial Prentice Hall Inc., 1988
- 6.- García A. Cromatografía líquida de alta presión. Limusa. México 1988: 23,73,129.
- 7.- Quattrocchi O.A. Andrizzi S.A. Laba R.F. Introducción a la HPLC , Aplicación y práctica. Argentina: Editorial Artes Gráficas Ferro, 1992.
- 8.- Bello G. La cromatografía líquida de alta resolución. Pharm. News. 1991; 2 (1): 23-26
- 9.-Boletín informativo . Care and use manual silica analytical column. División of Millipore. 1-3.
- 10.- Bello G. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Pharma News 2ª parte. 1986, 19-21.
- 11.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 5ª Edición
- 12.-United States Pharmacopea XXII, U.S.A. 1989.
- 13.- Smith C. Reynar D.A. Farmacología. Panamericana. Buenos Aires. 1992.
- 14.- Litter M. Compendio de farmacología. 4ª edición. Argentina: editorial El Ateneo, 1988.
- 15.- Reyes T.C. Desarrollo y validación de un método analítico para Griseofulvina en control de calidad y en sangre. México: UNAM, Tesis, 1993.

- 16.- Juárez L. Desarrollo y validación de un método para análisis de griseofulvina por HPLC. México: UNAM, Tesis 1994.
- 17.- Validación de métodos analíticos. Manual. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México A.C.
- 18.- Murray P. Microbiología Médica. Mosby Year Book. España, 1993
- 19.- Guerra J. Finkelson M.J. Validation of analytical methods by FDA laboratories Part I and Part II Pharm Tech 1986; 10(3): 74-76.
- 20.- Vander Wielen A.J. Hardwidge E.A. Guidelines for assay validation. Pharm Tech 1982; 66-76.
- 21.- Sheinin E.B. Laboratory evaluation of proposed NDA analytical methodology. Pharm Tech; 1986 : 83-96
- 22.-Fontani F. Prelini R. Ronchi M.C. Zanutti G.A. Validación de métodos analíticos para productos farmacéuticos Boll. Chim.Farm 1987; 126(2): 66-74
- 23.- Guerra J. Audit of computer systems in analytical laboratories. Pharm Tech 1988; : 142-152
- 24.- Kaplan S.A. Riegelman S. J.Pharm Sci. 1966; 55(1): 14-18.
- 25.- Remington, Farmacia Tomo I 17ª edición. editorial Panamericana, Argentina, 1987; 892-908
- 26.- Waters Sourcebook for analytical HPLC Columns, waters division of Millipore 1989.
- 27.- Florey K. Analytical profiles of drugs substances. Editorial Academic Press Inc. 1986; 8: 219-249.
- 28.- Isaaq H.J. Barr E.W. Wei T. Meyers C. and Aszalos A. J.Chrom. 1977. 133,291
- 29.- Hackett L.P. and Dusi L.J. J. Chrom. 1978; 155-206.
- 30.- Boletín informativo 1 Water Chromatography Noticias Millipore waters. División Millipore.
- 31.- Koneman E.W. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana. 1991. México. 428-469.

ANEXO

Linealidad

Cálculos de coeficiente de correlación (r)

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

Coefficiente de determinación (r²)

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

Desviación estandar (DE)

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

Coefficiente de variación (CV)

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

Límite de confianza 97.5% para la pendiente

$$LC_B = B \pm t_{1-\alpha/2} [S_{yx}/(\Sigma x \sqrt{n})]$$

Límite de confianza 97.5% para el intercepto

$$LC_A = a + t_{1-\alpha/2} S_{yx} \sqrt{\Sigma x^2 / n \Sigma (\bar{x} - x)^2}$$

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

Precisión**Media aritmética**

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

Desviación estandar

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

Coefficiente de variación

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

Exactitud y Repetibilidad**Porcentaje de recobro (R)**

$$R = (Y / X) 100$$

Media del porcentaje de recobro (R)

$$\bar{R} = \frac{\Sigma R}{n}$$

Desviación estandar del porcentaje de recobro (R)

$$DE = \Sigma (\bar{R} - R)^2 / n-2$$

Coefficiente de variación (CV)

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

t de Student

$$t_{cal} = X - \mu / (DE / \sqrt{n})$$

$$\mu = 100 \%$$

Intervalo de confianza para la media

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

Reproducibilidad

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

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

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

TABLA II

VALORES DE LA DISTRIBUCION t DE STUDENT

n	df	Probabilidad									
		0.99	0.95	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70	0.65	0.60	0.55
1	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	14	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16	15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	16	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18	17	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
19	18	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
20	19	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
21	20	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
22	21	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
23	22	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
24	23	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
25	24	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
26	25	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
27	26	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
28	27	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
29	28	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
30	29	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
40	39	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
60	59	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
100	99	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
120	119	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
150	149	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
200	199	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

* Probabilidad de la cola izquierda de t.

TABLE F

VALORES DE LA DISTRIBUCION F DE FISHER
 (CON UNA PROBABILIDAD ACUMULADA DE 0.975)

		GRADOS DE LIBERTAD DEL NUMERADOR																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	25	30	40	50	60	∞
GRADOS DE LIBERTAD DEL DENOMINADOR	1	162.5	19.0	14.0	11.0	9.0	8.0	7.5	7.2	7.0	6.9	6.8	6.7	6.6	6.5	6.4	6.3	6.2	6.1	6.0
	2	19.0	18.5	18.0	17.5	17.0	16.8	16.6	16.5	16.4	16.3	16.2	16.1	16.0	15.9	15.8	15.7	15.6	15.5	15.4
	3	14.0	17.5	17.0	16.5	16.0	15.8	15.6	15.5	15.4	15.3	15.2	15.1	15.0	14.9	14.8	14.7	14.6	14.5	14.4
	4	11.0	16.5	16.0	15.5	15.0	14.8	14.6	14.5	14.4	14.3	14.2	14.1	14.0	13.9	13.8	13.7	13.6	13.5	13.4
	5	9.0	15.0	14.5	14.0	13.5	13.3	13.2	13.1	13.0	12.9	12.8	12.7	12.6	12.5	12.4	12.3	12.2	12.1	12.0
	6	8.0	14.0	13.5	13.0	12.5	12.3	12.2	12.1	12.0	11.9	11.8	11.7	11.6	11.5	11.4	11.3	11.2	11.1	11.0
	7	7.5	13.5	13.0	12.5	12.0	11.8	11.7	11.6	11.5	11.4	11.3	11.2	11.1	11.0	10.9	10.8	10.7	10.6	10.5
	8	7.2	13.0	12.5	12.0	11.5	11.3	11.2	11.1	11.0	10.9	10.8	10.7	10.6	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1	10.0
	9	7.0	12.8	12.3	11.8	11.3	11.1	11.0	10.9	10.8	10.7	10.6	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8
	10	6.9	12.6	12.1	11.6	11.1	10.9	10.8	10.7	10.6	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6
	12	6.8	12.4	11.9	11.4	10.9	10.7	10.6	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4
	15	6.7	12.2	11.7	11.2	10.7	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2
	20	6.6	12.0	11.5	11.0	10.5	10.3	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
	25	6.5	11.9	11.4	10.9	10.4	10.2	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9
	30	6.5	11.8	11.3	10.8	10.3	10.1	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8
	40	6.4	11.7	11.2	10.7	10.2	10.0	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7
	50	6.4	11.6	11.1	10.6	10.1	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6
	60	6.3	11.5	11.0	10.5	10.0	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5
	70	6.3	11.4	10.9	10.4	9.9	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5	8.4
	80	6.3	11.3	10.8	10.3	9.8	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5	8.4	8.3
	100	6.2	11.2	10.7	10.2	9.7	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5	8.4	8.3	8.2
	∞	6.2	11.2	10.7	10.2	9.7	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5	8.4	8.3	8.2