

300627  
45



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

"VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA  
DETERMINACION DE CLORURO DE BENZALCONIO  
EN UNA SOLUCION OFTALMICA"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

**LAURA LORENA VALLARTA GONZALEZ**

ASESOR DE TESIS:  
Q.F.B. MA. LETICIA LINARES ESTUDILLO

MEXICO. D. F.

1995

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 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.

*Papas:*

*Gracias por ser mi guía, y sembrar con  
positividad mi camino.*

*Mis padres, Luis Carlos y Laura:*

*Gracias por permitirme la satisfacción de  
adquirir lo que me gusta con el producto  
del esfuerzo de mi trabajo, por enseñarme  
a no desdénar el oro, más no dejar que el  
oro señoree mi vida y por corregir mis fallas.*

*Gracias por nunca cerrarme la puerta de su corazón.*

*Los Quiero.*

*Carlos, Diana y Rocío:*

*Vivimos una relación siempre positiva, que valoro  
y quiero conservar. Cada uno de nosotros es una  
persona diferente con derecho a escoger sus  
propias ideas y a desarrollar sus propios valores,  
para que cada uno de nosotros pueda esforzarse  
para llegar a ser lo que es capaz de ser.  
Esperando que este trabajo sirva de inspiración,  
con respeto y amor.*

Laboratorio Lambda Científica, S.A. de C.V.

Gracias por permitirnos dar un paso más  
como profesionista, para demostrar lo que aprendí  
durante el tiempo de estudiante.

D.F.B. Ma Estelita Linares Estudillo:

Un especial agradecimiento por su gran apoyo, comprensión,  
consejos y paciencia, tan importante para la culminación de este  
trabajo.

Universidad La Salle :

A la comunidad La Salle por su invaluable apoyo en  
la construcción de mi carrera profesional, por un futuro mejor.  
Gracias a mis maestros, compañeros y a todas aquellas personas  
que ayudaron y compartieron mi educación universitaria.

*Parábola de la educación.*

*Iba un hombre caminando por el desierto cuando oyó una voz que le dijo :*

*Levanta unos guijarros, míllos a tu bolsillo y mañana te sentirás a la vez triste y contento.*

*Aquel hombre obedeció. Se inclinó, recogió un puñado de guijarros y se los metió en el bolsillo.*

*A la mañana siguiente, vio que los guijarros se habían convertido en diamantes, rubíes y esmeraldas.*

*Y se sintió feliz y triste.*

*Feliz, por haber recogido los guijarros; triste, por no haber recogido más.*

*Lo mismo ocurre con la educación.*

*William Cunningham.*

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| I.- Introducción   | 2  |
| II.- Objetivo  | 3  |
| III.- Generalidades  |    |
| 3.1. Cloruro de benzalconio  | 4  |
| 3.1.1. Características físicas y químicas del activo   |    |
| 3.1.2. Propiedades farmacológicas  |    |
| 3.1.3. Dosis y vías de administración  |    |
| 3.1.4. Contraindicaciones y precauciones   |    |
| 3.1.5. Reacciones adversas   |    |
| 3.2. Validación de métodos analíticos  | 7  |
| 3.3. Espectrofotometría  | 10 |
| Principios básicos e Instrumentación   |    |
| IV.- Métodos analíticos.   |    |
| 4.1. Método F.N.E.U.M. 5a. Edición   | 13 |
| 4.2. Método desarrollado en base al método F.N.E.U.M. 5a. Edición  | 14 |
| V.- Experimentación  | 16 |
| Metodología propuesta para la validación de un método analítico para la determinación de cloruro de benzalconio en una solución oftálmica. |    |
| VI.- Estadística de la validación  | 23 |
| VII.-Resultados.   | 32 |
| 7.1 Calibración del espectrofotómetro  | 32 |
| 7.2 Calibración de la balanza analítica  | 33 |
| 7.3 Valoración química del Cloruro de benzalconio  | 34 |
| 7.4 Linealidad del sistema   | 35 |
| 7.5 Precisión del sistema  | 39 |
| 7.6 Linealidad del método  | 41 |
| 7.7 Exactitud y repetibilidad al 100 %   | 44 |
| 7.8 Precisión del método   | 46 |
| 7.9 Especificidad del método   | 51 |
| VIII.- Análisis de resultados  | 52 |
| IX.- Conclusiones  | 53 |
| X.- Bibliografía   | 58 |

## INDICE DE GRAFICAS

| No. de gráfica | Descripción  | Página |
|----------------|--|--------|
| 1              | Calibración Espectrofotómetro                                      | 32     |
| 2              | Linealidad del sistema ( 1a. Evaluación)                           | 35     |
| 3              | Linealidad del sistema ( 2a. Evaluación)                           | 37     |
| 4              | Precisión del sistema  | 39     |
| 5              | Curva de calibración para la linealidad del método                 | 41     |
| 6              | Linealidad del método analítico                                    | 42     |
| 7              | Curva de calibración para la exactitud y repetibilidad al 100%     | 44     |
| 8              | Exactitud y repetibilidad al 100%                                  | 45     |
| 9              | Curva de calibración para la precisión del método Analista 1/día 1 | 46     |
| 10             | Curva de calibración para la precisión del método Analista 2/día 1 | 47     |
| 11             | Curva de calibración para la precisión del método Analista 1/día 2 | 48     |
| 12             | Curva de calibración para la precisión del método Analista 2/día 2 | 49     |

## INDICE DE TABLAS

| No.ºTabla | Descripción   | Página |
|-----------|---|--------|
| 1         | Análisis de la varianza para la linealidad del sistema (1ª Evaluación)          | 36     |
| 2         | Análisis de varianza para la linealidad del sistema (2ª Evaluación)             | 38     |
| 3         | Análisis de la varianza para la linealidad del método analítico                 | 43     |
| 4         | Análisis de la varianza para la precisión del Método analítico                  | 50     |
| 5         | Valores de la distribución t de student con una probabilidad acumulada de 0.975 | 54     |
| 6         | Valores de la distribución f de fisher con una probabilidad acumulada de 0.975  | 55     |
| 7         | Valores de la distribución f de fisher con una probabilidad acumulada 0.95      | 56     |
| 8         | Valores de la distribución f de fisher con una probabilidad acumulada de 0.99   | 57     |

## INDICE DE FIGURAS

| No. Figura | Descripción                           | Página |
|------------|---------------------------------------|--------|
| 1          | Estructura del Cloruro de benzalconio | 4      |
| 2          | Espectro Electromagnético             | 10     |
| 3          | Componentes de un espectrofotómetro   | 11     |



# **INTRODUCCION**

## I.INTRODUCCION.

Los problemas que se presentan en el campo del análisis farmacéutico son cada día mayores debido al gran incremento de nuevos productos, con moléculas activas nuevas y excipientes novedosos, que requieren de métodos de análisis apropiados. Sin embargo, contamos ahora con instrumentación analítica más sofisticada, de gran precisión y sensibilidad que nos puede ayudar a resolver los problemas analíticos que se nos presenten siempre y cuando se elija la técnica apropiada. (22)

Una vez resuelto esto, el problema será buscar el método para conocer si la técnica empleada nos va a proporcionar resultados confiables, lo cual solo podrá conseguirse mediante la validación adecuada del método. (22)

Como principio definiremos validación en general :

"Es todo un proceso basado en principios científicos adecuados y que han sido optimizados para propósitos de medición " (7)

La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método. (7,9)

Si la evaluación es un éxito, quedará establecido que el método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas y el proceso recibirá confirmación o aprobación oficial.(1)

La importancia de la validación de métodos analíticos radica en que estas técnicas son aplicadas en la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos , que por su naturaleza tienen que ver con la salud.(8)

Este trabajo consiste en la validación de un método analítico para una solución oftálmica conteniendo cloruro de benzalconio, el método propuesto es el resultado de las modificaciones realizadas al método analítico F.N.E.U.M. 5a. edición para la cuantificación del mismo activo.

El método fue desarrollado por un Laboratorio de Control analítico, auxiliar a la industria farmacéutica, con la finalidad de disminuir el tiempo del análisis de tercería de un producto en particular, para ofrecer un mejor servicio a una industria farmacéutica.

## **OBJETIVO**

## **II. OBJETIVO :**

**1. Establecer un sistema de validación para el método analítico propuesto, considerando los parámetros establecidos para su validación de acuerdo con el documento publicado por el Colegio Nacional de Q.F.B.**

**2. Documentar y validar el método analítico optimizado para garantizar su capacidad analítica.**

# **GENERALIDADES**

### III. GENERALIDADES.

#### 3.1. CLORURO DE BENZALCONIO.

##### 3.1.1. Características físicas y químicas del activo.

Es una mezcla de cloruros de alquilbencilidimetilamonio, con la fórmula general  $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$ , en la cual R representa una mezcla alquilar, que va desde  $C_8H_{17}$  hasta el  $C_{18}H_{37}$  (10)

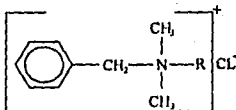


Figura 1. Estructura del Cloruro de Benzalconio. (FNEUM) (10)

El cloruro de benzalconio se encuentra como un gel espeso o bien en forma de trozos gelatinosos, blanco o blanco amarillento con olor ligeramente aromático y sabor muy amargo. No contiene más de un 15% de agua, es muy soluble en agua, alcohol y acetona; la solución anhidra es muy soluble en benceno y prácticamente insoluble en éter. Su solución acuosa es ligeramente alcalina y cuando se agita produce espuma en abundancia. (23,29)

Es incompatible con jabones y otros surfactantes aniónicos, citratos, iodatos, nitratos, permanganatos, salicilatos, sales de plata, tartratos, sulfato de zinc y álcalis. Se ha demostrado que es incompatible con algunos ingredientes de algunas mezclas de plásticos comerciales, así como con algunas otras sustancias incluyendo al aluminio, fluoresceína de sodio, peróxido de hidrógeno, caolín y algunas sulfamidas. (23)

##### 3.1.2. Propiedades Farmacológicas.

El cloruro de benzalconio es el prototipo de compuestos cuaternarios de amonio con actividad antimicrobiana y detergente que, en 1935, Domagk denominó zephírol. Es un antiséptico local tensioactivo, de naturaleza catiónica, con propiedades germicida y detergente, que residen en el catión, incompatible con cualquier detergente aniónico, como el jabón común y corriente. Los detergentes aniónicos y catiónicos, como el benzalconio, además de ser humectantes, emulsifican el material sebáceo, que después se desprende mezclado con la mugre y los microbios. El leve efecto descamatorio de los compuestos cuaternarios de amonio ayuda a limpiar la piel. Al efecto humectante y detergente, se agrega su fijación, por adsorción, sobre la membrana celular bacteriana, alterando su permeabilidad, con la consecuente pérdida de metabolitos esenciales y alterando sistemas enzimáticos indispensables. El cloruro de benzalconio es activo contra bacterias grampositivas y gramnegativas, algunos hongos y ciertos protozoarios, como la *Trichomona vaginalis*. El género *Pseudomona* suele ser resistente y por este motivo se han registrado epidemias en hospitales, producidas por estos microorganismos, por el uso de instrumental quirúrgico, supuestamente esterilizado por inmersión, en soluciones con las concentraciones óptimas de este quimioterápico. Es relativamente inefectivo contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Clostridia*. Los virus usualmente son resistentes y las esporas permanecen viables después de un contacto prolongado con este antiséptico. Prácticamente no se absorbe a través de la piel, pero puede absorberse cuando se emplea sobre las mucosas. El etanol acrecenta la actividad antiséptica local, por lo tanto se considera más útil y efectiva la tintura alcohólica que la solución acuosa. Su efecto germicida es más bien lento, comparado con la tintura de yodo al 2%. (26)

### **3.1.3. Dosis y vías de administración.**

El cloruro de benzalconio por sus propiedades germicidas y detergentes tiene varias aplicaciones en la industria farmacéutica; es utilizado en la preparación de una serie de productos destinados a la limpieza, conservación y el más comodo uso de los lentes de contacto. Una solución limpiadora debe contener los ingredientes necesarios para eliminar grasas y depósitos de las superficies de los lentes para permitir de esa forma la máxima hidratación de las mismas y facilitar la acción humectante de las lágrimas.(18,27)

Las soluciones conservadoras como el resto de los líquidos al cuidado de los lentes de contacto, están muy expuestas a la contaminación; por ello, es necesario impartirles una actividad bactericida, generalmente mediante la incorporación de una sal de amonio cuaternario, como el cloruro de benzalconio, las que potencian su acción asociados con etilendiamino tetracetato disódico. Esa droga y otros agentes quelantes ablandan el agua e impiden la formación de película sobre la superficie del lente. También anula la integridad lipoproteica de la pared celular, aumentando la permeabilidad de los agentes bactericidas.(18)

La concentración generalmente empleada de cloruro de benzalconio en la elaboración de estos de productos, varía entre un 0.004 % a un 0.020%(18,23)

El cloruro de benzalconio puede ser usado como antiséptico local en la limpieza pre-operatoria de la piel intacta y de material médico-quirúrgico, su empleo como desinfectante para instrumentos u otra clase de material médico-quirúrgico, debe evaluarse bien antes de ser llevado a cabo, por la existencia de agentes patógenos resistentes y la posible adsorción que puede reducir la concentración del medicamento a un nivel por debajo del límite bactericida. (23,26)

Algunas fuentes calificadas recomiendan las siguientes concentraciones : para uso sobre la piel intacta, tintura alcohólica o solución acuosa al 1:750; para membranas mucosas y piel lastimada, solución acuosa al 1:2000 a 1:5000; para desinfección de instrumentos o algún otro material médico-quirúrgico, solución acuosa 1:750 a 1:5000. (12,23,26)

En concentraciones del 0.012% es usado en cremas para prevenir el salpullido y en forma de tabletas es usado para el tratamiento superficial de infecciones de boca y garganta, etc.(23,26)

### **3.1.4. Contraindicaciones y precauciones.**

Las soluciones para desinfección por inmersión deben ser verificadas periódicamente por la posible contaminación con microorganismos resistentes, esporas y para mantener concentraciones bactericidas efectivas. Los compuestos cuaternarios de amonio son adsorbidos e inactivados por material de algodón, esponjas de celulosa, ciertos plásticos, como aquellos de cloruro de polivinilo y otros materiales porosos, cuando se inmergen en sus soluciones. Por este motivo este medicamento es de eficacia incierta para la esterilización fría de catéteres, endoscopios flexibles u otros instrumentos.(26)

Se recomienda agregar un agente antioxidante cuando se va a desinfectar instrumentos metálicos, para retardar y tratar de evitar el deterioro. La materia orgánica, como fragmentos tisulares y pus, el jabón y otras sustancias de naturaleza aniónica inactivan el cloruro de benzalconio. Es conveniente lavar la piel intacta con agua y alcohol al 70% antes de aplicar este antiséptico local. Cuando se aplica sobre la piel tiende a formar una película, debajo de la cual las bacterias son viables. Las soluciones concentradas, pueden producir necrosis profunda y ulceraciones, cuando se trata de irrigar cavidades del cuerpo, puede producir debilidad muscular del tipo curariforme. (26,27)

### **3.1.5. Reacciones adversas.**

Las diluciones adecuadas ordinariamente no son irritantes o capaces de sensibilizar. Puede haber irritación, a pesar de la concentración terapéutica, cuando se emplea el benzalconio en apósitos cerrados. El uso rutinario puede facilitar la sensibilización del paciente con la consecuente aparición de manifestaciones alérgicas, como son : conjuntivitis e irritaciones severas en pacientes que han usado soluciones oftálmicas conteniendo cloruro de benzalconio y daños epidérmicos debido a que este surfactante catiónico interactúa con la queratina de la piel. (23,26)



### **3.2. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.**

El principal objetivo a conseguir por cualquier persona que trabaje en una planta farmacéutica, tanto en producción como en control de calidad, es fabricar productos que cumplan los requisitos de calidad al costo más bajo posible. La validación es esencial para la obtención de este objetivo, ya que permite hacer el trabajo bien desde el principio y una sola vez. Además, un procedimiento controlado y científicamente estudiado evita que productos defectuosos sean enviados al cliente. (22)

Por lo tanto, existen tres razones principales, por las cuales la industria farmacéutica está preocupada por que sus procesos sean validados : (8,22)

- 1) Normas legales y reglamentaciones oficiales.
- 2) La garantía de calidad
- 3) La reducción de costos

#### **1) Normas legales y reglamentaciones oficiales.**

En México, la Ley General de Salud, que regula las actividades de los establecimientos que se dedican al proceso de medicamentos; asigna un status legal a esta actividad, al establecer que los controles analíticos de materias primas, productos en proceso y productos terminados, deben emplear, proceso de validación; por lo tanto, el establecimiento es responsable ante las actividades sanitarias de esta actividad.(8)

Un requerimiento legal similar existe en muchos otros países. También el concepto de validación esta claramente implícito a lo largo de todas las buenas prácticas de manufactura.(5)

La FDA ha publicado un segundo borrador de una "Gula sobre Principios Generales de Validación de Procesos", cuyo propósito es describir los principios generales que la FDA considera partes aceptables de la validación de procesos farmacéuticos para uso humano, veterinario y artefactos médicos.(5,8)

#### **2)Garantía de la calidad.**

Sin una validación de proceso, que implica que el proceso está bien entendido y bajo control, no es posible confiar en la calidad de los productos fabricados. (22)

Las buenas prácticas de manufactura y las validaciones de proceso, dos conceptos inseparables, son esenciales para obtener una garantía de calidad.(14,22)

Frecuentemente la validación de un proceso conduce, además de una calidad más consistente, a una mejora de la misma.(8)

#### **3)Reducción de costos.**

La experiencia y el sentido común indican que un proceso validado es un proceso más eficiente, que produce menos reprocesos, rechazos, pérdidas, etc. Una validación de proceso es fundamentalmente un excelente negocio. Aunque el cumplimiento de las disposiciones legales es importante, la principal razón para validar un proceso es garantizar la calidad a un costo reducido.(5)

Aunque los estudios de validación se han venido realizando en la industria farmacéutica desde hace tiempo, hay ahora un creciente interés en los procesos de validación, debido al gran énfasis puesto por la industria sobre la garantía de calidad y las mejoras de productividad. La validación de un proceso es una parte esencial de un programa de garantía de calidad y es fundamental para conseguir una eficiente operación de producción.(5,22)

Además se ha comprendido claramente que el análisis del producto final presenta ciertas limitaciones si queremos asegurar la calidad. De aquí, el remarcado énfasis puesto en la garantía de calidad, buenas prácticas de manufactura, construcción de calidad, control de proceso, etc., todos los cuales implican y requieren que los procesos sean validados. (24)

Un estudio de validación de un proceso, requiere la calificación de cada uno de sus elementos más importantes, algunos de los componentes generalmente considerados son: (22,31)

- Métodos analíticos
- Calibración de instrumentos.
- Sistemas de apoyo críticos.
- Calificación del operario.
- Materia prima y material de empaque.
- Equipo.
- Instalaciones.
- Etapas de fabricación.
- Diseño del producto.

La Industria Farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos, debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis que permitan realizar en forma confiable y rápida la cuantificación del principio activo del medicamento. (7,8)

Desde los años 40's se empezaron a realizar trabajos colaborativos en los que se hablaba de los parámetros asociados con la validación, se hicieron trabajos sobre la exactitud, precisión y reproducibilidad, inicialmente se aplicó a los procesos de esterilización por vía húmeda y vía seca y después se adaptó a metodología analítica. En 1962 se empezó a publicar sobre validación y el término como tal se definió en la época de los 70's. En 1984 en un Forum de la U.S.P. se establecen los lineamientos mínimos que aparecen en un apartado en la U.S.P. XXII y en 1989, el comité de validación del Colegio Nacional de Q.F.B. edita un documento en el que se establecen los requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos. (3,20)

La validación de un método analítico se define como:

**"El proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas."** (7)

Los parámetros a evaluar comúnmente son: (7,19,25)

**a) 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.

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

**b) Linealidad.**

La linealidad de un sistema o de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

**c) Exactitud.**

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

**d) Especificidad.**

Se define como la medida del grado de interferencia en el análisis de mezclas complejas, o bien como, 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.

**e) Límite de detección.**

Es la mínima concentración del activo que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones normales de operación.

**f) Límite de cuantificación.**

Es la mínima concentración del activo que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones normales de operación.

Existe un esquema de validación que clasifica las categorías que cada método necesita para su validación. La categoría I contempla a los métodos analíticos que cuantifican componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos, incluyen conservadores en producto terminado. La categoría II contempla a los métodos analíticos que determinan impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en producto terminado como son análisis cuantitativos y pruebas límites. La categoría III contempla a métodos analíticos que determinan las características físicas como disolución y liberación del principio activo. (30)

**REQUISITOS PARA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

| PARAMETROS ANALITICOS    | CATEGORIA I | CATEGORIA II |                  | CATEGORIA III |
|--------------------------|-------------|--------------|------------------|---------------|
|                          |             | CUANTITATIVO | LIMITE DE PRUEBA |               |
| PRECISION                | SI          | SI           | NO               | SI            |
| EXACTITUD                | SI          | SI           | *                | *             |
| LIMITE DE DETECCION      | NO          | NO           | SI               | *             |
| LIMITE DE CUANTIFICACION | NO          | SI           | NO               | *             |
| ESPECIFICIDAD            | SI          | SI           | SI               | *             |
| LINEALIDAD               | SI          | SI           | NO               | *             |
| REPRODUCIBILIDAD         | SI          | SI           | SI               | SI            |

\* Puede ser requerido dependiendo de la prueba específica. (30)

La validación de un método analítico también implica muchos instrumentos de medición para controlarlo, por lo que su adecuada calibración es crítica para el proceso. Algunos ejemplos de estos son: termómetros, espectrofotómetros, balanzas, refractómetros, etc. Se puede definir la calibración como la comparación de una medida estándar o de un instrumento de exactitud conocida, con otro instrumento, para detectar, correlacionar, informar y/o eliminar por ajuste cualquier variación en la exactitud del aparato que esta siendo comparado. Validar significa controlar las variables. (9,22)

### 3.3. ESPECTROFOMETRIA.

Uno de los métodos fisicoquímicos más empleados en análisis es el de la medida de la absorción o emisión de la energía radiante. La gran difusión de esta técnica es consecuencia de los factores siguientes: (2)

- (1) El amplio intervalo de longitudes de onda o de frecuencia de energía radiante y sus diferentes modos de interacción con la materia;
- (2) La existencia en el mercado de instrumentos de medida cada vez más precisos;
- (3) Las ventajas inherentes al método.

Generalmente, el análisis es muy rápido, una vez que se ha establecido el método, a no ser de que se requiera de un tratamiento previo para eliminar interferencias. El método es, por tanto, 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; es, por tanto, muy adecuado para el análisis de trazas. Se cree por lo general equivocadamente que los métodos espectrofotométricos son aplicables solo a pequeñas cantidades de constituyentes; nada más lejos de la realidad. Con frecuencia es un método no destructivo de la muestra, lo que puede ser importante cuando el constituyente es muy valioso. (2,33)

Los métodos espectrofotométricos tienen tal importancia, que son lo más utilizados en casi todos los laboratorios industriales, clínicos, de investigación o de enseñanza. (2)

#### Naturaleza de la energía radiante.

La energía radiante se define como la energía transmitida en forma de radiación electromagnética, esta puede ser transmitida, reflejada y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación, si la radiación incidente tiene una longitud de onda apropiada. Las radiaciones electromagnéticas tienen propiedades de onda y de partícula (fotones). (2,28)

El espectro electromagnético completo abarca más de 20 órdenes de magnitud de longitudes de onda; la figura 2 indica las distintas regiones caracterizadas por nombre, longitud de onda y frecuencia. (15,28)

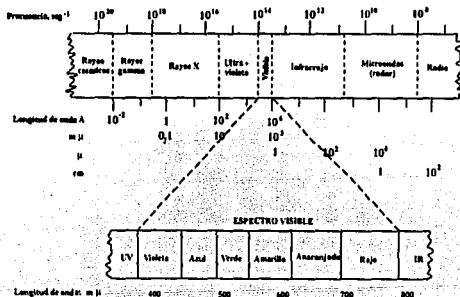


Figura 2. Espectro electromagnético. (Ayres) (2)

La longitud de onda,  $\lambda$ , es la distancia entre dos crestas o dos valles, se expresa en unidades de micra (u), milimicra (mu) o angstrom ( $\text{\AA}$ ).(28)

La frecuencia,  $\nu$ , es el número de ondas por unidad de tiempo, se expresa en Hertz o ciclos /seg.

La frecuencia y la longitud de onda vienen relacionadas por : (28)

$$\nu = c / \lambda.$$

La sensación de color es la respuesta a una serie de estímulos combinados físicos, químicos y biológicos de ciertas partes de la retina del ojo para la energía radiante de determinadas longitudes de onda o frecuencias. El ojo humano es sensible a una pequeña porción del espectro electromagnético, es decir, desde unas 400 a 750 mu. La colorimetría, en su significado usual, se emplea para designar la medida de la fracción de luz blanca de una lámpara incandescente que pasa a través de un medio líquido o en disolución (o es reflejada por una superficie sólida).(2)

En espectrofotometría, la energía que incide sobre la muestra es una radiación monocromática, las medidas de la radiación transmitida se realizan mediante aparatos muy sensibles, como fotocélulas, tubos fotomultiplicadores y termopares.(15,28)

Algunos de los componentes básicos de los diversos tipos de espectrofotómetros se muestran en la siguiente figura. El diagrama es esquemático y no trata de representar ningún aparato en particular.(2)

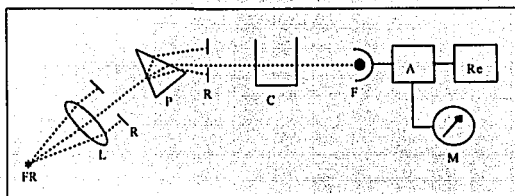


Figura No.3 Componentes de un espectrofotómetro. FR, fuente de radiación; L, lente; R, rendija; P, selector de longitud de onda (prisma); C, célula de absorción; F, fotocélula; A, amplificador; M, medidor; Re, registrador.(Ayres)(2)

### Leyes de la Espectrofotometría.

Cuando se hace pasar un haz de energía radiante monocromática, sobre una capa homogénea de una sustancia "transparente", parte de la energía es absorbida y el resto transmitida, dependiendo de la frecuencia de la misma y de la estructura de la molécula que atraviesa. Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda de la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida. Estas generalizaciones tienen su base cuantitativa en las leyes de la espectrofotometría. (2,28)

La ecuación de Lambert y Beer es la ley fundamental que rige a la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética: (15,28)

$$A = -abc$$

Donde: A = Absorbancia, relación entre la radiación transmitida y la incidente.  
a = Constante de proporcionalidad, absorbtividad.  
c = Concentración de la solución.

Esta ecuación indica que la absorbancia de la solución es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes cuando la longitud de la trayectoria luminosa es fija. (15,28)

#### **Instrumentos comerciales.**

No se trata aquí de dar una descripción detallada o una lista completa de los muchos espectrofotómetros disponibles en el mercado, se mencionarán brevemente algunos de los aparatos que ha tenido mayor difusión.

Las siguientes casas comerciales suministran espectrofotómetros baratos: Photovolt Corp., el modelo Lumetron; Rubicon Co., el Evelyn; Klett Mfg. Co., el Klett- Summerson; Central Scientific Co. y Fisher Scientific Co.

El modelo Bausch and Lomb Spectronic 20, tiene lectura directa en transmitancias y absorbancias. El bajo costo y el estrecho paso de la banda espectral le hacen especialmente adecuado para aplicaciones analíticas en trabajos de rutina.

El espectrofotómetro Beckmann Modelo B, es un aparato de precio medio, que cubre la zona de longitudes de onda comprendidas entre 325 y 1000  $\mu$ . El Beckman Modelo DU y DB tienen óptica de cuarzo y cubren las zonas de longitudes de onda de 200 a 2000 $\mu$ . Están provistos de conexiones para un accesorio de registro gráfico.

Los espectrofotómetros de registro gráfico más caro son los de Beckman, Modelos DK-1 y DK-2 y el Cary, Modelo 14. Estos aparatos cubren las regiones del ultravioleta visible e infrarrojo próximo, con alto poder de resolución.

Los espectrofotómetros de infrarrojo de registro gráfico (Perkin-Elmer, Baird, Beckman) cubren la zona de longitudes de onda de 2 a 16  $\mu$ . (2)

# **METODOS ANALITICOS**

#### IV. METODOS ANALITICOS.

##### 4.1. METODO F.N.E.U.M. 5a. EDICION.

En un embudo de separación de 250 ml que contenga 25 ml de cloroformo, depositar con ayuda de 35 ml de agua, una porción de la muestra equivalente a 500 mg de cloruro de benzalconio anhidro. Agregar 10 ml de solución 1:20 de yoduro de potasio, recientemente preparada, tapar el embudo de separación, agitar bien y dejar separar las capas. Desechar la capa clorofórmica y lavar la capa acuosa con tres porciones de cloroformo de 10 ml cada una. Desechar los lavados y pasar la capa acuosa a un matraz de 250 ml con tapón esmerilado; enjuagar el embudo de separación con tres porciones de agua de 5 ml cada una, agregando estos lavados al contenido del matraz. Agregar 40 ml de ácido clorhídrico previamente enfriado; mezclar y valorar con solución 0.05 M de yodato de potasio hasta que la solución toma coloración café clara. Agregar 5 ml de cloroformo, tapar el matraz y agitar fuertemente. Continuar la valoración gota a gota, agitando después de cada adición hasta que la capa clorofórmica se vuelva incolora y la capa acuosa toma coloración amarilla clara. Efectuar una prueba en blanco, empleando 20 ml de agua como muestra.

La diferencia entre las dos titulaciones representa la cantidad de yodato de potasio que equivale al peso de cloruro de benzalconio en la muestra. Cada ml de solución 0.05 M de yodato de potasio, equivale a 36 mg de cloruro de benzalconio.



## **4.2. METODO DESARROLLADO EN BASE AL METODO F.N.E.U.M. 5a. EDICION.**

Preparación de soluciones:

### **4.2.1. Solución buffer pH = 10.**

Disolver 3.0 g de ácido bórico, 3.72 g de cloruro de potasio y 1.75 g de hidróxido de sodio, en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a  $10 \pm 0.1$  con ácido bórico o borato de sodio.

### **4.2.2. Solución de anaranjado de metilo (20 mcg/ml)**

Pesar exactamente 50 mg de anaranjado de metilo, previamente pulverizado en un mortero, transferir el polvo a un vaso de precipitados de 100 ml, adicionar 35 ml de agua, agitar y calentar ligeramente para su completa disolución, pasar esta solución a un matraz volumétrico de 50 ml, lavar con unos mililitros de agua el vaso de precipitados y transferir los lavados al volumétrico, llevar a la marca con agua. Tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con solución buffer pH = 10, filtrar si es necesario y pasar a un frasco ámbar. Guardar en refrigeración.  
Concentración : 20 mcg/ ml.

### **4.2.3. Solución estándar (200 mcg/ml).**

Pesar el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio en un vaso de precipitados de 100 ml, adicionar 40 ml de agua y mezclar, transferir el contenido del vaso a un matraz volumétrico de 100 ml, hacer cinco lavados con agua y transferirlos al matraz volumétrico, llevar a la marca con agua y mezclar.  
Concentración: 20 mg/ml.

De la solución de 20 mg/ml tomar una alícuota de 1.0 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con agua y mezclar. Concentración 200 mcg/ml.

### **4.2.4. Solución Problema (40 mcg/ml).**

En un vaso de precipitados de 250 ml, pesar 1.0 g de alcohol polivinílico y 25.0 mg de E.D.T.A., adicionar 50.0 ml de agua destilada y agitar durante 30 minutos. Pesar el equivalente a 4.0 mg de cloruro de benzalconio, adicionarlo al vaso de precipitados, agregar otros 50.0 ml de agua destilada y agitar por 15 minutos. Pasar la solución a un frasco ámbar y guardar en refrigeración. Concentración 40 mcg/ml.

Metodología:

### **4.2.5. Curva de calibración.**

De la solución estándar (200 mcg/ml), tomar las siguientes alícuotas : 0.2, 0.9, 1.5, 2.1 y 2.7 ml, ponerlas en cada uno de cinco tubos de 50.0 ml de tapón de rosca , previamente identificados con la dilución correspondiente. Adicionar respectivamente 7.3, 6.6, 6.0, 5.4 y 4.8 ml de agua destilada, y a cada uno de los tubos adicionar 7.5 ml de solución buffer pH=10 y 10 ml de anaranjado de metilo. Mezclar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 459 nm usando como blanco solución buffer pH = 10.

Hacer los cálculos de los mg recuperados de cloruro de benzalconio por regresión lineal.

#### 4.2.6. Determinación del Problema.

A dos tubos de 50.0 ml adicionar 7.5 ml de la solución problema (300 mcg/ml), 7.5 ml de solución buffer pH= 10 y 10 ml de anaranjado de metilo. Mezclar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotometro a 459 nm usando como blanco solución buffer pH= 10

Hacer los cálculos de los mg recuperados de cloruro de benzalconio por regresión lineal.

|  | TUBO #1  | TUBO #2 | TUBO #3 | TUBO #4 | TUBO #5 | TUBO #6 | TUBO #7 |
|--|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| SOLUCION STANDAR<br>300 mcg/ml                     | 0.2 ml   | 0.9 ml  | 1.5 ml  | 2.1 ml  | 2.7 ml  | _____   | _____   |
| SOLUCION PROBLEMA<br>40 mcg/ml                     | _____  | _____   | _____   | _____   | _____   | 7.5 ml  | 7.5 ml  |
| AGUA DESTILADA                                     | 7.3 ml   | 6.6 ml  | 6.0 ml  | 5.4 ml  | 4.8 ml  | _____   | _____   |
| SOLUCION BUFFER<br>pH=10                           | 7.5 ml   | 7.5 ml  | 7.5 ml  | 7.5 ml  | 7.5 ml  | 7.5 ml  | 7.5 ml  |
| SOLUCION DE ANARAN-<br>JADO DE METILO<br>20 mcg/ml | 10 ml  | 10 ml   | 10 ml   | 10 ml   | 10 ml   | 10 ml   | 10 ml   |
|  | MEZCLAR Y DEJAR REPOSAR POR 35 MINUTOS DESPUES DE LA ADICION DEL ANARANJADO DE METILO. |         |         |         |         |         |         |
| CONCENTRACION:<br>mcg/ml                           | 1.6  | 7.2     | 12      | 16.8    | 21.6    | _____   | _____   |

# **EXPERIMENTACION**

## V. EXPERIMENTACION.

### METODOLOGIA PROPUESTA PARA LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DE CLORURO DE BENZALCONIO EN UNA SOLUCION OFTALMICA.

#### 5.1 PREPARACION DE SOLUCIONES:

##### 5.1.1 Solución A :

Su preparación depende del parámetro analítico a aplicar durante la validación del método.

##### 5.1.2 Solución B (Placebo).

Pesar 15.0 g de alcohol polivinílico, 375.0 mg de E.D.T.A. y 4.1 g de natrazol 250 HNR, transferir a un matraz erlen meyer de 2.0 lt, adicionar 1200 ml de agua destilada y agitar durante una hora o hasta completa disolución, con la ayuda de un agitador magnético.

##### 5.1.3 Solución C (Solución buffer pH=10).

Pesar 6.0 g de ácido bórico, 7.45 g de cloruro de potasio, y 3.51 g de hidróxido de sodio, transferir a un matraz volumétrico de 2.0 lt, disolver en 1000 ml de agua destilada, llevar a la marca con agua destilada y mezclar.

##### 5.1.4 Solución D.

Pesar exactamente 50.0 mg de anaranjado de metilo, previamente pulverizado en un mortero, transferir el polvo a un vaso de precipitados de 100 ml, adicionar 35 ml de agua, agitar y calentar ligeramente para su completa disolución, pasar esta solución a un matraz volumétrico de 50 ml, lavar con unos mililitros de agua el vaso de precipitados y transferir los lavados al volumétrico, llevar a la marca con agua destilada y mezclar. Tomar una alícuota de 2 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con solución buffer pH=10, filtrar si es necesario y pasar a un frasco ámbar. Guardar en refrigeración. Concentración : 20.0 mcg/ml.

#### 5.2. METODOLOGIA

##### 5.2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.

Se determina construyendo una curva de calibración (cantidad adicionada contra respuesta medida) de una misma solución el patrón, utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

##### Preparación de la solución A.

En un vaso de precipitados de 50 ml, pesar el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, adicionar 20 ml de agua y mezclar para disolver completamente, pasar el contenido del vaso a un matraz volumétrico de 100 ml, hacer cuatro lavados de 10 ml al vaso de precipitados y transferirlos al volumétrico, llevar a la marca con agua y mezclar. Tomar una alícuota de 5.0 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución, transferir una alícuota de 6 ml a un matraz volumétrico de 150 ml, llevar a la marca con agua y mezclar. Guardar en frasco ámbar. Concentración : 40 mcg/ml.

### **Análisis**

Realizar las siguientes diluciones de la solución patrón (por duplicado), en 5 tubos de 50 ml, previamente identificados, tomar una alícuota de 3.0 , 5.3, 7.5, 9.5, y 13.0 ml de solución A respectivamente, y proceder a su análisis de acuerdo al método:

**Dilución 1 : 40%**

3.0ml Sol.A(120mcg) + 4.5 ml agua + 7.5 ml sol.C + 10 ml sol.D

**Dilución 2 : 70.6%**

5.3ml Sol.A(212mcg) + 2.2 ml agua + 7.5 ml sol.C + 10 ml sol.D

**Dilución 3 : 100%**

7.5ml Sol. A(300mcg) + 0 ml agua + 7.5 ml sol. C + 10 ml sol.D

**Dilución 4 : 126.6%**

9.5ml Sol.A(380mcg) + 0 ml agua + 5.5 ml sol. C + 10 ml sol.D

**Dilución 5 : 173.3%**

13 ml Sol. A(520mcg) + 0 ml agua + 2.0 ml sol. C + 10 ml sol.D

Mezclar y dejar reposar durante 35 minutos.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

Leer a 459 nm usando como blanco buffer pH= 10.

### **5.2.2. PRECISION DEL SISTEMA.**

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución patrón, correspondiente al 100% de lo establecido en la linealidad del sistema , bajo las mismas condiciones de medición.

$$100\% = 12 \text{ mcg/ml}$$

#### **Preparación de la solución A:**

Pesar el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, en un vaso de precipitados de 50 ml, adicionar 20 ml de agua y mezclar para disolver completamente, pasar el contenido del vaso a un matraz volumétrico de 100 ml, hacer cuatro lavados de 10 ml al vaso de precipitados y transferirlos al volumétrico, llevar a la marca con agua y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución, transferir una alícuota de 6 ml a un matraz volumétrico de 150 ml, llevar a la marca con agua y mezclar. Guardar en frasco ámbar.  
Concentración : 40.0 mcg/ml.

#### **Análisis:**

En cada uno de seis tubos de 50 ml de tapón de rosca, hacer la siguiente dilución, de la solución A tomar una alícuota de 7.5 ml (300 mcg/ml) , adicionar 7.5 ml de la solución C y 10 ml de la solución D. Agitar cada uno de los tubos en el vortex, dejar reposar durante 35 minutos, y leer en el espectrofotómetro a 459 nm, usando como blanco la solución buffer pH= 10.

Correr curva calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 2) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 3) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 4) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 5) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 6) 7.5 ml sol.A (300mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D

### 5.2.3. LINEALIDAD DEL METODO.

Se determina con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a tres diferentes concentraciones, incluyendo al 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

$$100 \% = 12 \text{ mcg / ml}$$

#### **Solución placebo cargada al 70% .**

Solución A :

Pesar en un matraz volumétrico de 100 ml, el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, disolver, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución transferir a un matraz volumétrico de 100 ml una alícuota de 5 ml, llevar a la marca con agua y mezclar.

Concentración : 1000 mcg/ml.

Muestra:

En cada uno de tres vasos de precipitados de 50 ml, medir una alícuota de 20 ml de sol. B, adicionar a cada uno 0.7 ml de solución A y 4.3 ml de agua, mezclar.

Concentración del principio activo : 28 mcg/ml

Análisis :

En tres tubos de 50 ml de tapón de rosca, hacer la siguiente dilución, adicionar una alícuota de 7.5 ml de la muestra (210 mcg), 7.5 ml de la solución C y 10 ml de la solución D. Agitar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 459 nm, usando como blanco solución buffer pH=10.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml de muestra (210 mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol.D
- 2) 7.5 ml de muestra (210 mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol.D
- 3) 7.5 ml de muestra (210 mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol.D

### **Solución Placebo cargada al 100 %**

#### **Solución A :**

Pesar en un matraz volumétrico de 100 ml, el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, disolver, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución transferir a un matraz volumétrico de 100 ml una alcuota de 5 ml, llevar a la marca con agua y mezclar.  
Concentración : 1000 mcg/ml.

#### **Muestra:**

En cada uno de tres vasos de precipitados de 50 ml, medir una alcuota de 20 ml de sol. B, adicionar a cada uno 1 ml de sol. A y 4 ml de agua. Mezclar.  
Concentración del principio activo: 40 mcg/ml.

#### **Análisis :**

En tres tubos de 50.0 ml de tapón de rosca, hacer la siguiente dilución, adicionar una alcuota de 7.5 ml de la muestra A (300 mcg), 7.5 ml de la solución C y 10.0 ml de la solución D. Agitar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 459 nm, usando como blanco solución buffer pH=10.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol. C + 10.0 ml sol. D
- 2) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol. C + 10.0 ml sol. D
- 3) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol. C + 10.0 ml sol. D

### **Solución placebo cargada al 130%**

#### **Solución A :**

Pesar en un matraz volumétrico de 100 ml, el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, disolver, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución transferir a un matraz volumétrico de 100 ml una alcuota de 5 ml, llevar a la marca con agua y mezclar.  
Concentración : 1000 mcg/ml.

#### **Muestra:**

En cada uno de tres vasos de precipitados de 50 ml, medir una alcuota de 20 ml de sol. B, adicionar a cada uno 1.3 ml de sol. A y 3.7 ml de agua. Mezclar.  
Concentración del principio activo: 52 mcg/ml.

#### **Análisis:**

En tres tubos de 50 ml de tapón de rosca, hacer la siguiente dilución, adicionar una alcuota de 7.5 ml de la muestra A (390 mcg), 7.5 ml de la solución C y 10.0 ml de la solución D. Agitar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 459 nm, usando como blanco solución buffer pH=10.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml muestra (390mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 2) 7.5 ml muestra (390mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D
- 3) 7.5 ml muestra (390mcg) + 7.5 ml sol. C+ 10.0 ml sol. D

#### 5.2.4. EXACTITUD AL 100%

Se deben cuando menos analizar 6 placebos cargados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100% del principio activo, establecido en la linealidad del método, utilizando el método propuesto y haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

##### **Solución Placebo cargada al 100 %**

##### **Solución A :**

Pesar por sextuplicado en matraces volumétricos de 100 ml, el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, llevar a la marca con agua y mezclar. De esta solución transferir a un matraz volumétrico de 100 ml un alícuota de 5 ml, llevar a la marca con agua y mezclar.  
Concentración : 1000 mcg/ml.

##### **Muestra:**

En cada uno de seis vasos de precipitados de 50 ml, medir una alícuota de 20 ml de sol. B, adicionar a cada uno 1 ml de sol. A y 4 ml de agua. Mezclar.  
Concentración del principio activo: 40 mcg/ml.

##### **Análisis :**

En seis tubos de 50 ml de tapón de rosca, hacer la siguiente dilución, adicionar una alícuota de 7.5 ml de la muestra A (300 mcg), 7.5 ml de la solución C y 10.0 ml de la solución D. Agitar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 459 nm, usando como blanco solución buffer pH=10.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 2) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 3) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 4) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 5) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 6) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D



### 5.2.5. PRECISION DEL METODO ANALITICO. ( REPRODUCIBILIDAD )

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado para cada muestra. Se trabajará de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto con una concentración cercana al 100 % de la concentración teórica.

#### Preparación de la muestra:

##### Solución A:

Pesar el equivalente a 2000 mg de cloruro de benzalconio, en un vaso de precipitados de 50 ml, adicionar 20 ml de agua y mezclar para disolver completamente, pasar el contenido del vaso a un matraz aforado de 100 ml, hacer cuatro lavados de 10 ml al vaso de precipitados y transferirlos al aforado, llevar a la marca con agua y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a la marca con agua y mezclar.  
Concentración: 1000 mcg/ml.

##### Muestra :

En un vaso de precipitados de 100 ml, medir una alícuota de 40 ml de sol. B, 2 ml de sol. A y 8 ml de agua, mezclar y guardar en frasco ámbar.  
Concentración : 40 mcg / ml.

#### ANALISTA 1 y 2:

##### Análisis:

Tomar una alícuota de 7.5 ml de la muestra y transferirla a un tubo de 50 ml de tapón de rosca, que corresponden al 100 % de la concentración teórica y proceder a su análisis, adicionando 7.5 ml de solución C y 10 ml de solución D. Correr la prueba por triplicado.

- 1) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C + 10 ml sol.D
- 2) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C + 10 ml sol.D
- 3) 7.5 ml muestra (300mcg) + 7.5 ml sol.C + 10 ml sol.D

Agitar en vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Correr curva de calibración de acuerdo al método. Leer a 459 nm usando como blanco buffer pH= 10.

### 5.2.6. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

Se determina por el análisis de placebos del producto con el método de medición, para identificar si hay respuesta de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

#### **Solución Placebo:**

En cada uno de seis vasos de precipitados de 50 ml, medir una alícuota de 20 ml de solución B y adicionar a cada uno 5ml de agua destilada.

#### **Análisis :**

De cada uno de los vasos de precipitados, tomar una alícuota de 7.5 ml y transferirlas a tubos de 50 ml de tapón de rosca, adicionar 7.5 ml de solución C y 10 ml de solución D. Agitar con vortex y dejar reposar durante 35 minutos. Leer en el Espectrofotómetro a 459 nm usando como blanco buffer pH = 10.

Correr curva de calibración de acuerdo al método.

- 1) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 2) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 3) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 4) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 5) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D
- 6) 7.5 ml Placebo + 7.5 ml sol.C+ 10 ml sol.D

# **ESTADISTICA DE LA VALIDACION**

## VI. ESTADÍSTICA DE LA VALIDACION

### 6.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Criterio :

$$b \approx 0, r \geq 0,99, r^2 \geq 0,98$$

$$cv \leq 1,5\%$$

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato :

| Concentración de la dilución de la solución patrón (x) | Propiedad medida (y) |
|--|----------------------|
| x1   | y11, y12 ..... y1n   |
| x2   | y21, y22 ..... y2n   |
| .  | .                    |
| .  | .                    |
| .  | .                    |
| .  | .                    |
| xt   | yt1, yt2 ..... ytn   |

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 :

$$S_x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

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

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

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

$$S_{xy} = x_1 (y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

3) Cálculos finales :

$$m = \frac{nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)}{nt(S_x^2) - (S_x)^2}$$

$$b = \frac{S_y - m(S_x)}{nt}$$

$$r = \left[ \frac{[m(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[m(S_x^2) - (S_x)^2][m(S_y^2) - (S_y)^2]} \right]^{-1/2}$$

$$r^2 = \frac{[m(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[m(S_x^2) - (S_x)^2][m(S_y^2) - (S_y)^2]}$$

4) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

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

$$F = \frac{\text{Propiedad medida (y)}}{\text{conc. de la dilución de la sol. patrón (x)}}$$

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

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

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

$$F_{t1} = \frac{y_{t1}}{x_t}$$

$$F_{t2} = \frac{y_{t2}}{x_t}$$

$$F_{tn} = \frac{y_{tn}}{x_t}$$

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

$$SF = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$SF^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$\bar{F} = \frac{\sum F}{N} \quad \text{donde } N = \text{número de puntos de la linealidad del sistema.}$$

5) Cálculos finales para el coeficiente de variación:

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

$$CV = \frac{DE}{F} \cdot 100$$

## 6.2.PRECISION DEL SISTEMA.

Criterio :

$$CV \leq 1.5\%$$

Los porcentos recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla 6.

1) Tabular los resultados .

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$$

2) Cálculos preliminares.

$$Sy = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$Sy^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

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

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

3) Cálculos finales.

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \cdot 100$$

### 6.3.LINEALIDAD DEL METODO.

Criterio :

$$m \approx 1, b \approx 0, r^2 \geq 0.98$$

Los por cientos recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla 6.

#### 6.3.1. Cantidad adicionada - Cantidad recuperada.

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato :

| Cantidad adicionada (x) | Cantidad recuperada (y) |
|-------------------------|-------------------------|
| x11, x12, ..., x1n      | y11, y12, ..., y1n      |
| x21, x22, ..., x2n      | y21, y22, ..., y2n      |
| ⋮                       | ⋮                       |
| ⋮                       | ⋮                       |
| ⋮                       | ⋮                       |
| xt1, xt2, ..., xtn      | yt1, yt2, ..., ytn      |

t= número de cantidades adicionadas.

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

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones), de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

#### 2) Cálculos preliminares :

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

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

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

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

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

Cálculos finales :

$$m = \frac{nt(S_{xy}) - (S_x)(S_y)}{nt(S_x^2) - (S_x)^2}$$

$$b = \frac{Sy - m(Sx)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(Sx) - (Sx)(Sy)]^2}{[nt(Sx^2) - (Sx)^2][nt(Sy^2) - (Sy)^2]}$$

### 6.3.2. Porcentaje recuperado.

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

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

1) Tabular los resultados :

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

2) Cálculos preliminares :

$$SR = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$SR^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

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

3) Cálculos finales :

Intervalo de confianza para la media :

$$\bar{R} \pm \frac{DE}{n^{1/4}}$$

t = Valor de la t de Student, con N-1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975. (tabla 5)

Coefficiente de variación:

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



#### 6.4.EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

Criterio:

El porcentaje recuperado y el CV deberán estar de acuerdo con la tabla 6.

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 :

$$SR = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$SR^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{SR}{N}$$

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

3. Cálculos finales :

Intervalo de confianza para la media :

$$\bar{y} \pm t \frac{DE}{n^{1/2}}$$

t = Valor de la t de student con N-1 grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975. (tabla 5)

Coefficiente de variación :

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

### 6.5.PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD)

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

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o analista y/o recobros por analista y día, se sugiere que se consulte a un estadístico.

Criterio :  $CV \leq 3.0 \%$

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

|            |   | ANALISTA (j) |      |
|------------|---|--------------|------|
|            |   | 1            | 2    |
| DIA<br>(i) | 1 | y111         | y111 |
|            |   | y112         | y212 |
|            |   | y113         | y213 |
|            | 2 | y121         | y221 |
|            |   | y122         | y222 |
|            |   | y123         | y223 |

2. Cálculos preliminares :

$$y_{...} = y111 + y112 + y113 + y121 + y122 + y123 + y211 + y212 + y213 + y221 + y222 + y223$$

$$Sy^2_{...} = y111^2 + y112^2 + y113^2 + y121^2 + y122^2 + y123^2 + y211^2 + y212^2 + y213^2 + y221^2 + y222^2 + y223^2$$

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

$$DE = \left\{ \frac{N(Sy^2_{...}) - (Sy_{...})^2}{N(N-1)} \right\}^{1/2}$$

N = número total de determinaciones.

### 3. Cálculos finales :

Coefficiente de variación :

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

Si se desea determinar la reproducibilidad Interanalista, interdía/analista, y la repetibilidad es necesario efectuar el siguiente procedimiento :

Cálculos preliminares :

1. Calcular la suma de las combinaciones analista-día (Yij.):

$$y11. = y111 + y112 + y113$$

$$y12. = y121 + y122 + y123$$

$$y21. = y211 + y212 + y213$$

$$y22. = y221 + y222 + y223$$

2. Calcular la suma para cada analista (yi...):

$$y1.. = y111 + y112 + y113 + y121 + y122 + y123$$

$$y2.. = y211 + y212 + y213 + y221 + y222 + y223$$

3. Calcular la suma total (y...):

$$y... = y1... + y2...$$

4. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$SSyij^2 = (y11.)^2 + (y12.)^2 + (y21.)^2 + (y22.)^2$$

5. Calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días :

$$Syl..^2 = (y1..)^2 + (y2..)^2$$

6. Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado :

$$SSSyijk^2 = (y111)^2 + (y112)^2 + (y113)^2 + (y121)^2 + (y122)^2 + (y123)^2 + (y211)^2 + (y212)^2 + (y213)^2 + (y221)^2 + (y222)^2 + (y223)^2$$

7. Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor del analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{Syl^2 \dots}{dr} - \frac{y^2 \dots}{adr}$$

8. Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula :

$$Scd = \frac{SSyij^2}{r} - \frac{Syt^2}{dr}$$

9. Calcular la sumas de cuadrados del error (SCe) con la siguiente fórmula :

$$Sce = SSSyijk^2 - \frac{SSyij^2}{r}$$

Cálculos finales :

1. Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de la varianza (ANAEVA).

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados      | Fcal                   | FO.05*             |
|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|
| Analista<br>(α)     | gla = a - 1        | Sca               | $Mca = \frac{Sca}{gla}$ | $Fa = \frac{Mca}{Mcd}$ | $\frac{Fgla}{gld}$ |
| Día<br>(δ)          | gld = (d - 1)a     | SCd               | $Mcd = \frac{SCd}{gld}$ | $Fd = \frac{Mcd}{Mce}$ | $\frac{Fgld}{gle}$ |
| Error<br>(ε)        | gle = (r - 1)ad    | Sce               | $Mce = \frac{Sce}{gle}$ |                        |                    |

FO.05\* = TABLA 6: Valores de la distribución f de fisher con una probabilidad acumulada de 0.975

2. Realizar la interpretación de los resultados :

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Si $Fa < Fgla, gld; 0.05$    | El método analítico es reproducible por los analistas.                          |
| Si $Fa \geq Fgla, gld; 0.05$ | El método analítico no es reproducible por los analistas.                       |
| Si $Fd < Fgld, gle; 0.05$    | El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.    |
| Si $Fd \geq Fgld, gle; 0.05$ | El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista. |

Repetibilidad del método analítico:

Calcular la repetibilidad del método con la siguiente ecuación :

$$\text{Repetibilidad} = \pm (MCE)^{1/2}$$

## GLOSARIO.

- b** = Ordenada al origen o Intercepto.
- r** = Coeficiente de Correlación.
- r<sup>2</sup>** = Coeficiente de determinación.
- CV** = Coeficiente de Variación.
- IC** = Intervalo de Confianza al 95 % .
- m** = Pendiente.
- n** = Número de replicaciones.
- R.L.** = Regresión Lineal
- S** = Sumatoria.
- t** = Número de diluciones o número de cantidades adicionadas.
- $\bar{y}$**  = Media aritmética.
- N** = Número total de determinaciones.
- S<sup>2</sup>** = Varianza.
- DE** = Desviación estándar.
- x** = Dilución o cantidad adicionada.
- R** = Por ciento recuperado.
- $\bar{R}$**  = Promedio aritmético del por ciento recuperado.
- t** = Valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de **0.975**
- F** = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de **0.975**
- gi** = Grados de libertad.
- y...** = y total
- F** = Factor para cálculos en la linealidad del sistema.

## **RESULTADOS**

## VII. RESULTADOS

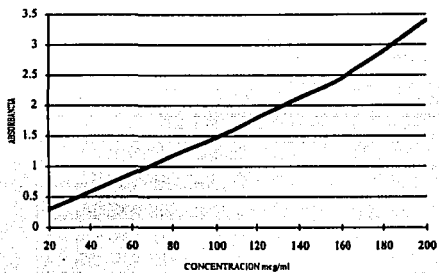
### 7.1 CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO

Marca : Perkin-Elmer.  
Modelo : Lambda.  
Serie : 69144

#### LINEALIDAD CON DICROMATO DE POTASIO EN ACIDO SULFURICO 0.01N

| Concentración<br>mcg/ml | Lecturas<br>Abs 257 nm |
|-------------------------|------------------------|
| 20                      | 0.303                  |
| 40                      | 0.583                  |
| 60                      | 0.880                  |
| 80                      | 1.174                  |
| 100                     | 1.470                  |
| 120                     | 1.787                  |
| 140                     | 2.111                  |
| 160                     | 2.442                  |
| 180                     | 2.887                  |
| 200                     | 3.401                  |

GRAFICA I  
CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO  
PERKIN-ELMER



Coefficiente de correlación : 0.9955

Resultado: Aceptable

## 7.2 CALIBRACION DE LA BALANZA ANALITICA

Marca : Sartorius

Serie: H 110

| <u>PESA<br/>CALIBRADA</u> | <u>PESA<br/>PATRON</u> | <u>(1)</u> | <u>PESO EN LA<br/>BALANZA</u> |
|---------------------------|------------------------|------------|-------------------------------|
| 10.0000 mg                | 10.0 mg                | 0.21       | 10.0000 mg                    |
| 20.1000 mg                | 20.0 mg                | 0.26       | 20.0000 mg                    |
| 50.0000 mg                | 50.0 mg                | 0.34       | 50.1000 mg                    |
| 200.1000 mg               | 200.0 mg               | 0.54       | 200.1000 mg                   |
| 299.9000 mg               | 300.0 mg               | 0.61       | 300.0000 mg                   |
| 500.1000 mg               | 500.0 mg               | 0.72       | 500.0000 mg                   |
| 999.2000 mg               | 1.0 g                  | 0.90       | 999.2000 mg                   |
| 1.9984 g                  | 2.0 g                  | 1.10       | 1.9999 g                      |
| 3.0046 g                  | 3.0 g                  | 1.30       | 3.0000 g                      |
| 5.0008 g                  | 5.0 g                  | 1.50       | 5.0003 g                      |
| 10.0014 g                 | 10.0 g                 | 2.00       | 10.0037 g                     |
| 19.9947 g                 | 20.0 g                 | 4.00       | 20.0005 g                     |

(1) = Incertidumbre o tolerancia a su clase.

Resultado : Aceptable



### **7.3 ° VALORACION QUIMICA DE CLORURO DE BENZALCONIO.**

#### **METODO DE ANALISIS : F.N.E.U.M. 5a.EDICION p.p.532-534**

Valoración volumétrica con Yodato de Potasio 0.05 M, en la que cada ml de esta solución, equivale a 36.0 mg de cloruro de benzalconio.

Título real de la solución de yodato de potasio: 0.04977M

| Muestra<br>N° | Peso<br>(mg) | Yodato de potasio<br>0.04977M (ml) |
|---------------|--------------|------------------------------------|
| Blanco        | 0            | 32.4                               |
| 1             | 500          | 18.0                               |
| 2             | 500          | 17.0                               |
| 3             | 500          | 17.0                               |
| 4             | 500          | 18.0                               |

Corrección de volúmenes:

Muestra 1: 32.4ml - 18.0ml = 14.4 ml

Muestra 2: 32.4ml - 17.0ml = 15.4 ml

Muestra 3: 32.4ml - 17.0ml = 15.4 ml

Muestra 4: 32.4ml - 18.0ml = 14.4 ml

volumen promedio: 14.9 ml

Si :

1.0 ml de Yodato equivale a: 36.0 mg de Cloruro de  
de Potasio 0.05M ----- Benzalconio

entonces :

1.0ml de Yodato equivale a: 35.8344 mg de Cloruro de  
de Potasio 0.04977M ----- Benzalconio

Por lo tanto :

14.9 ml de Yodato equivale a: 534mg  
de Potasio 0.04977M ----- de cloruro de benzalconio

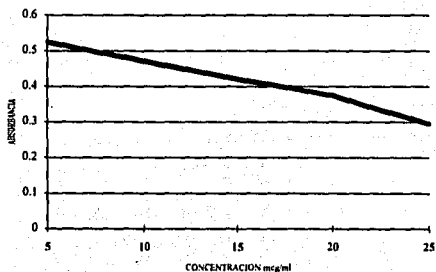
\* Cloruro de Benzalconio a utilizar como principio activo en la validación del método analítico.

#### Z.4.LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.

Primera Evaluación :

|            | CONCENTRACION DE LA<br>DILUCION DE LA<br>SOLUCION PATRON<br>mcg / ml (X) | %      | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS<br>(Y) |
|------------|--|--------|---------------------------------|
| Blanco     | 0.0000   | 0.00   | 0.000, 0.000                    |
| Estándar 1 | 4.8700   | 40.00  | 0.525, 0.526                    |
| Estándar 2 | 8.6038   | 70.66  | 0.472, 0.475                    |
| Estándar 3 | 12.1752  | 100.00 | 0.421, 0.422                    |
| Estándar 4 | 15.4219  | 126.66 | 0.375, 0.373                    |
| Estándar 5 | 21.1036  | 173.33 | 0.295, 0.294                    |

GRAFICA 2  
LINEALIDAD DEL SISTEMA  
(1ª EVALUACION)



**TABLA 1 : ANALISIS DE LA VARIANZA (1ª Evaluación)**

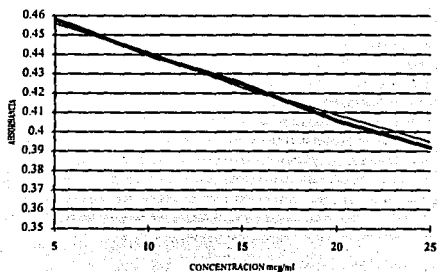
| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F crítica |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|-----------|
| Regresión           | 1                  | 0.0636            | 0.0636             | 3.84E+04    | 11.26     |
| Error de regresión  | 8                  | 1.30E-05          | 2.0E-06            |             |           |
| Falta de ajuste     | 3                  | 5.0E-06           | 2.0E-06            | 1.099       | 5.41      |
| Error puro          | 5                  | 8.0E-06           | 2.0E-06            |             |           |

| PARAMETRO        | VALOR OBTENIDO |
|------------------|----------------|
| m=               | -0.014280      |
| b=               | 0.595409       |
| r=               | 0.999890       |
| r <sup>2</sup> = | 0.999790       |
| DE=              | 0.035070       |
| CV=              | 0.31%          |

Segunda Evaluación

|            | CONCENTRACION DE LA<br>DILUCION DE LA<br>SOLUCION PATRON<br>mcg / ml (X) | %      | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS<br>(Y) |
|------------|--|--------|---------------------------------|
| Blanco     | 0.0000   | 0.00   | 0.000, 0.000                    |
| Estándar 1 | 4.8700   | 80.00  | 0.458, 0.456                    |
| Estándar 2 | 8.6038   | 90.66  | 0.440, 0.441                    |
| Estándar 3 | 12.1752  | 100.00 | 0.425, 0.423                    |
| Estándar 4 | 15.4219  | 110.66 | 0.406, 0.409                    |
| Estándar 5 | 21.1036  | 120.00 | 0.392, 0.395                    |

GRAFICA 3  
LINEALIDAD DEL SISTEMA  
(2ª EVALUACION)



**TABLA 2 : ANALISIS DE LA VARIANZA (2ª Evaluación)**

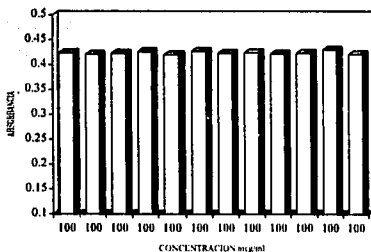
| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F crítica |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|-----------|
| Regresión           | 1                  | 5.1215E-03        | 5.1215E-03         | 2417        | 11.26     |
| Error de regresión  | 8                  | 1.7E-05           | 2.1E-06            |             |           |
| Falta de ajuste     | 3                  | 3.5E-06           | 1.2E-06            | 0.42620     | 5.41      |
| Error puro          | 5                  | 1.35E-05          | 2.75E-06           |             |           |

| PARAMETRO        | VALOR OBTENIDO |
|------------------|----------------|
| m=               | -0.013141      |
| b=               | 0.584905       |
| r=               | 0.998340       |
| r <sup>2</sup> = | 0.996690       |
| DE=              | 0.005740       |
| CV=              | 0.34%          |

## 7.5 PRECISION DEL SISTEMA.

| MUESTRA | (12.1752 mcg/ml)<br>% (X) | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS<br>(Y) |
|---------|---------------------------|---------------------------------|
| 1       | 100                       | 0.424                           |
| 2       | 100                       | 0.421                           |
| 3       | 100                       | 0.423                           |
| 4       | 100                       | 0.426                           |
| 5       | 100                       | 0.420                           |
| 6       | 100                       | 0.427                           |
| 7       | 100                       | 0.423                           |
| 8       | 100                       | 0.424                           |
| 9       | 100                       | 0.422                           |
| 10      | 100                       | 0.423                           |
| 11      | 100                       | 0.430                           |
| 12      | 100                       | 0.421                           |

GRAFICA 4  
PRECISION DEL SISTEMA



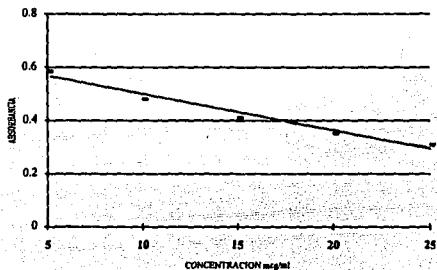
| PARAMETRO         | VALOR OBTENIDO |
|-------------------|----------------|
| Sy=               | 5.0840         |
| Sy <sup>2</sup> = | 2.1540         |
| $\bar{y}$ =       | 0.4236         |
| DE=               | 0.0028         |
| CV=               | 0.674%         |

## 7.6 LINEALIDAD DEL METODO.

CURVA DE CALIBRACION:

|            | CONCENTRACION DE LA<br>DILUCION DE LA<br>SOLUCION PATRON<br>mcg / ml (X) | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS<br>(Y) |
|------------|--|---------------------------------|
| Blanco     | 0.0000   | 0.000                           |
| Estándar 1 | 1.6233   | 0.585                           |
| Estándar 2 | 7.3051   | 0.480                           |
| Estándar 3 | 12.1752  | 0.410                           |
| Estándar 4 | 17.0453  | 0.352                           |
| Estándar 5 | 21.9153  | 0.310                           |

GRAFICA 5  
CURVA DE CALIBRACION POR R.L.

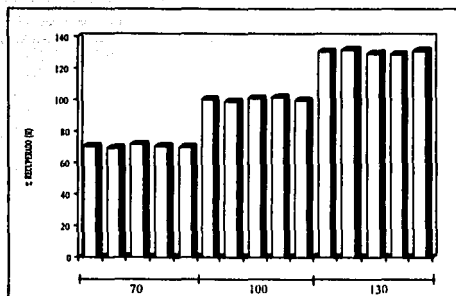


$m = -0.0135$   
 $b = 0.5899$   
 $r = 0.9896$



| CANTIDAD ADICIONADA (X) | % ADICIONADO | LECTURAS ABSORBIENCIAS | CANTIDAD RECUPERADA (Y) | % RECUPERADO (R) |
|-------------------------|--------------|------------------------|-------------------------|------------------|
| 8.5226                  | 70           | 0.474                  | 8.5684                  | 70.37            |
| 8.5226                  | 70           | 0.476                  | 8.4205                  | 69.16            |
| 8.5226                  | 70           | 0.472                  | 8.7162                  | 71.59            |
| 8.5226                  | 70           | 0.474                  | 8.5684                  | 70.37            |
| 8.5226                  | 70           | 0.475                  | 8.4944                  | 69.77            |
| 12.1752                 | 100          | 0.425                  | 12.1902                 | 100.12           |
| 12.1752                 | 100          | 0.427                  | 12.0424                 | 98.91            |
| 12.1752                 | 100          | 0.424                  | 12.2641                 | 100.73           |
| 12.1752                 | 100          | 0.423                  | 12.3381                 | 101.33           |
| 12.1752                 | 100          | 0.426                  | 12.1163                 | 99.51            |
| 15.8277                 | 130          | 0.375                  | 15.8859                 | 130.48           |
| 15.8277                 | 130          | 0.373                  | 16.0338                 | 131.69           |
| 15.8277                 | 130          | 0.377                  | 15.7381                 | 129.26           |
| 15.8277                 | 130          | 0.378                  | 15.6642                 | 128.65           |
| 15.8277                 | 130          | 0.374                  | 15.9298                 | 130.83           |

GRAFICA 6  
LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO



**TABLA 3 : ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO.**

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F crítica |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------|-----------|
| Regresión           | 1                  | 8994.000          | 8994.000           | 8779        | 9.07      |
| Error de regresión  | 13                 | 13.300            | 1.000              |             |           |
| Falta de ajuste     | 1                  | 0.000             | 0.000              | 4.49E-02    | 4.75      |
| Error puro          | 12                 | 13.300            | 1.100              |             |           |

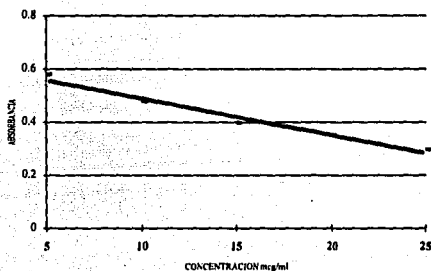
| PARAMETRO        | VALOR OBTENIDO       |
|------------------|----------------------|
| m=               | 0.9997               |
| b=               | 0.2346               |
| r=               | 0.9992               |
| r <sup>2</sup> = | 0.9985               |
| DE=              | 1.0074               |
| CV=              | 1.0052%              |
| IC (b) =         | -4.16 < b < 4.63     |
| IC (m) =         | -0.979 < m < 1.01768 |

## 7.7 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

### CURVA DE CALIBRACION:

|            | CONCENTRACION DE LA<br>DILUCION DE LA<br>SOLUCION PATRON<br>mcg / ml (X) | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS<br>(Y) |
|------------|--|---------------------------------|
| Blanco     | 0.0000   | 0.000                           |
| Estándar 1 | 1.6233   | 0.580                           |
| Estándar 2 | 7.3051   | 0.478                           |
| Estándar 3 | 12.1752  | 0.399                           |
| Estándar 4 | 17.0453  | 0.352                           |
| Estándar 5 | 21.9153  | 0.298                           |

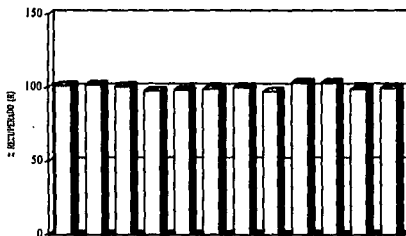
GRAFICA 7  
CURVA DE CALIBRACION POR R.L.



m= -0.01374  
b= 0.58650  
r= -0.99080

| *CANTIDAD ADICIONADA<br>mcg/ml | LECTURAS ABSORBANCIAS | CANTIDAD RECUPERADA<br>mcg/ml | % RECUPERADO (R) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|
| 12.1752                        | 0.417                 | 12.3406                       | 101.36           |
| 12.1752                        | 0.416                 | 12.4133                       | 101.95           |
| 12.1752                        | 0.418                 | 12.2678                       | 100.76           |
| 12.1752                        | 0.423                 | 11.9039                       | 97.77            |
| 12.1752                        | 0.422                 | 11.9767                       | 98.37            |
| 12.1752                        | 0.421                 | 12.0495                       | 98.96            |
| 12.1752                        | 0.419                 | 12.1956                       | 100.16           |
| 12.1752                        | 0.424                 | 11.8311                       | 97.17            |
| 12.1752                        | 0.414                 | 12.5589                       | 103.15           |
| 12.1752                        | 0.414                 | 12.5589                       | 103.15           |
| 12.1752                        | 0.421                 | 12.0495                       | 98.96            |
| 12.1752                        | 0.420                 | 12.1222                       | 99.56            |

GRAFICA 8  
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%



\* Se prepararon el doble de placebos de lo indicado en el documento de validación de métodos analíticos, editado por el Colegio Nacional de Q.F.B.\*

| PARAMETRO         | VALOR OBTENIDO      |
|-------------------|---------------------|
| Sy =              | 1,201.3200          |
| Sy <sup>2</sup> = | 120,308.0958        |
| y =               | 100.1100            |
| DE =              | 1.9988              |
| CV =              | 1.9967%             |
| t(n-1, 0.975) =   | 220.10%             |
| IC =              | 98.94% <y > 101.38% |

## 7.8. PRECISION DEL METODO ANALITICO (REPRODUCIBILIDAD)

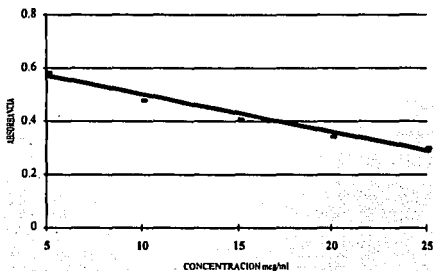
DIA 1

ANALISTA 1

### CURVA DE CALIBRACION

|            | CONCENTRACION<br>mcg / ml | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| Blanco     | 0.0000                    | 0.000                    |
| Estándar 1 | 1.6233                    | 0.583                    |
| Estándar 2 | 7.3051                    | 0.478                    |
| Estándar 3 | 12.1752                   | 0.407                    |
| Estándar 4 | 17.0453                   | 0.342                    |
| Estándar 5 | 21.9153                   | 0.299                    |

GRAFICA 9  
CURVA DE CALIBRACION PARA LA PRECISION DEL METODO  
ANALISTA 1 DIA 1



$m = -0.0140$   
 $b = 0.5902$   
 $r = -0.9916$

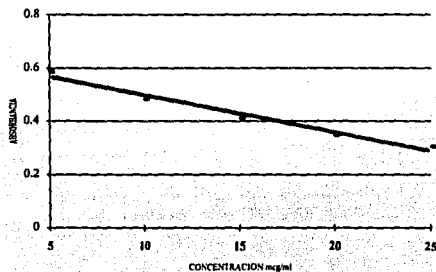
DIA 1

ANALISTA 2

CURVA DE CALIBRACION

|            | CONCENTRACION<br>mcg / ml | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| Bianco     | 0.0000                    | 0.000                    |
| Estándar 1 | 1.6233                    | 0.587                    |
| Estándar 2 | 7.3051                    | 0.483                    |
| Estándar 3 | 12.1752                   | 0.412                    |
| Estándar 4 | 17.0453                   | 0.347                    |
| Estándar 5 | 21.9153                   | 0.306                    |

GRAFICA 10  
CURVA DE CALIBRACION PARA LA PRECISION DEL METODO  
ANALISTA 2 DIA 1



$m = -0.0138$

$b = 0.5940$

$r = -0.9910$

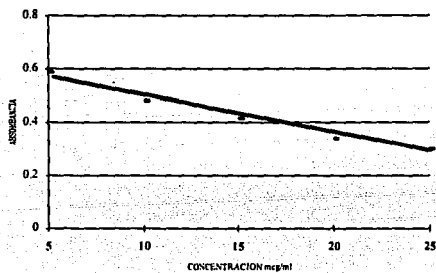
DIA 2

ANALISTA 1

CURVA DE CALIBRACION

|            | CONCENTRACION<br>mcg / ml | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| Blanco     | 0.0000                    | 0.000                    |
| Estándar 1 | 1.6233                    | 0.587                    |
| Estándar 2 | 7.3051                    | 0.479                    |
| Estándar 3 | 12.1752                   | 0.415                    |
| Estándar 4 | 17.0453                   | 0.339                    |
| Estándar 5 | 21.9153                   | 0.300                    |

GRAFICA 11  
CURVA DE CALIBRACION PARA LA PRECISION DEL METODO  
ANALISTA 1 DIA 2



$m = -0.0142$   
 $b = 0.5948$   
 $r = -0.9913$

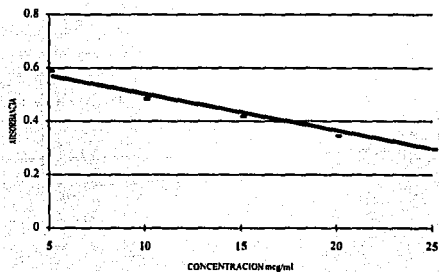
DIA 2

ANALISTA 2

CURVA DE CALIBRACION

|            | CONCENTRACION<br>mcg / ml | LECTURAS<br>ABSORBANCIAS |
|------------|---------------------------|--------------------------|
| Blanco     | 0.0000                    | 0.000                    |
| Estándar 1 | 1.6233                    | 0.588                    |
| Estándar 2 | 7.3051                    | 0.485                    |
| Estándar 3 | 12.1752                   | 0.417                    |
| Estándar 4 | 17.0453                   | 0.345                    |
| Estándar 5 | 21.9153                   | 0.296                    |

GRAFICA 12  
CURVA DE CALIBRACION PARA LA PRECISION DEL METODO  
ANALISTA 2 DIA 2



m = -0.0144  
b = 0.5993  
r = -0.9951



|       |  | ANALISTA 1      |                 | ANALISTA 2      |                 |
|-------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       |  | LECTURAS<br>ABS | %<br>RECUPERADO | LECTURAS<br>ABS | %<br>RECUPERADO |
| DIA 1 |  | 0.416           | 102.12          | 0.421           | 102.27          |
|       |  | 0.420           | 99.78           | 0.420           | 102.86          |
|       |  | 0.421           | 99.19           | 0.423           | 101.09          |
| DIA 2 |  | 0.419           | 101.61          | 0.424           | 99.98           |
|       |  | 0.420           | 101.04          | 0.423           | 100.55          |
|       |  | 0.422           | 99.88           | 0.421           | 101.69          |

**TABLA 4: ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA PRECISION DEL METODO ANALITICO**

| Fuente de<br>variación | Grados de<br>libertad | Suma de<br>cuadrados | Medio de<br>cuadrados | F<br>calculada | F<br>crítica |
|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|--------------|
| Analista               | 1                     | 0.54613              | 0.54613               | 0.124059       | 38.51        |
| Día                    | 2                     | 4.40217              | 2.20108               | 1.85863        | 6.06         |
| Error                  | 8                     | 9.47400              | 1.18425               |                |              |

| PARAMETRO | VALOR OBTENIDO |
|-----------|----------------|
| DE=       | 1.1460         |
| CV=       | 1.13455%       |
| REP=      | 1.0882         |
|           | -1.0882        |

### 7.9. ESPECIFICIDAD DEL METODO.

| MUESTRA | %<br>ADICIONADO | %<br>RECUPERADO |
|---------|-----------------|-----------------|
| 1       | 0               | 0               |
| 2       | 0               | 0               |
| 3       | 0               | 0               |
| 4       | 0               | 0               |
| 5       | 0               | 0               |
| 6       | 0               | 0               |

## **ANALISIS DE RESULTADOS**

## VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.

Sabemos que cualquier método analítico es un proceso de medición, cuyo objetivo es obtener un valor estimado del valor verdadero, ya que nunca se podrá conocer el valor real. Esto se debe a que ninguna medición se encuentra libre de error.

Ya establecida como una fuente de variación a los instrumentos analíticos a utilizar en la ejecución de la validación, que en este caso son la balanza analítica marca: Sartorius y el Espectrofotómetro marca: Perkin- Elmer, se procedió a la verificación del programa de mantenimiento preventivo de cada uno (calibración, ajuste, limpieza, etc) así como también se realizó una calibración la cual se incluye en los resultados, de tal manera que se disminuye al mínimo la influencia de este error.

Otro factor involucrado, es el error del método analítico, cuya calificación requiere demostrar la linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad y especificidad satisfactorias, para esto se recurrió a su validación de acuerdo a lo establecido por el C.N.Q.F.B.

El primer parámetro analítico evaluado fue la linealidad del sistema, que demostró que presenta una relación lineal correcta a concentraciones del 40%, 70.66%, 100%, 126.66% y 173.33%, en esta evaluación los resultados arrojan un  $CV = 0.31\%$ , por lo tanto se cumple con el criterio de aceptación para la linealidad del sistema ( $CV \leq 1.5\%$ ), se construyó la tabla de análisis de la varianza correspondiente y se observó que existe una relación altamente significativa entre la concentración y la propiedad medida, ya que la F calculada para el error de regresión es mayor que la F crítica y que no existe una falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada y propiedad medida ya que la F de la falta de ajuste es menor que la F crítica.

Se verificó la capacidad del método, cerrando el rango, por lo que se evaluó este parámetro a concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, obteniéndose un  $CV = 0.34\%$ , que también cumple con el criterio de aceptación; se construyó la tabla de análisis de la varianza y los resultados demuestran que en este intervalo la F de regresión es mayor a la F crítica por lo que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida y la F calculada para la falta de ajuste es menor que la F crítica, por lo que no existe una falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida.

El segundo parámetro evaluado fue la precisión del sistema, que se determinó por el análisis repetido de muestras de una misma solución estándar, correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema, cuyos resultados arrojan un  $CV = 0.67013$ , por lo que cumple con el criterio establecido por el C.N.Q.F.B. para la precisión del sistema ( $CV \leq 1.5\%$ ).

En cuanto a la linealidad del método, es bastante buena, su coeficiente de correlación es cercano a uno, la pendiente es muy cercana a uno, y la ordenada al origen a cero. Todo esto le confiere al método una buena capacidad de respuesta.

En los resultados para la exactitud y repetibilidad al 100%, el intervalo de confianza para la media, incluye el 100% y el  $CV = 1.9967$ , por lo que el método cumple con el propósito para el cual va a ser empleado.

En los resultados de la reproducibilidad, se puede visualizar de manera rápida que todos los parámetros cumplen y que el método da buenos resultados en dos días distintos y así mismo con diferentes analistas.

La evaluación de la especificidad muestra que no hay interferencia de los excipientes, por lo que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés.

Los errores de operación, incluyen los errores personales, estos se redujeron por la experiencia y el cuidado que se puso en la manipulaciones físicas que se efectuarán.

## **CONCLUSIONES**

## IX. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se estableció un sistema de validación adecuado al método analítico propuesto, en el que mediante un modelo estadístico se permite demostrar si el principio activo está presente o ausente y en el que la medida de la respuesta analítica puede ser evaluada estudiando de manera experimental los parámetros que se denominan como linealidad del sistema, exactitud, linealidad del método y precisión.
2. Por medio de este sistema de validación se pueden programar futuras validaciones, partiendo de la categoría en la que está el producto, es decir si es materia prima o producto terminado. También se puede calendarizar y evaluar una validación conforme fácilmente, siempre y cuando se parta de métodos calificados.
3. Los resultados obtenidos de la validación del método analítico para la determinación de cloruro de benzalconio en una solución oftálmica, demuestran la capacidad analítica del mismo, ya que el método es específico, preciso, lineal y reproducible a 12.1754mg (100% teórico) de cloruro de benzalconio.
4. El método analítico garantiza su capacidad de cumplir con los requerimientos legales establecidos por las autoridades sanitarias del país (La Ley General de Salud) y cumple así también con los requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos establecidos por el Colegio Nacional de Q.F.B.
5. Esta validación trajo como resultado una optimización de reactivos, así como un menor esfuerzo y una reducción en el tiempo de análisis.
6. El método analítico es confiable, ya que con la validación se demostró su capacidad analítica.
7. La validación del método analítico garantiza su uso en el análisis rutinario de muestras.

Para realizar la evaluación debemos de tener presente las siguientes recomendaciones, para obtener mejores resultados en la aplicación del método analítico en el análisis de muestras o bien para futuras validaciones:

- Únicamente trabajar con el analito en estudio, no en combinación con otros principios activos.
- Tomar en cuenta que la variación de la respuesta analítica (y) es explicada por la concentración (x) por lo que es necesario que el análisis se realice en el intervalo de concentración estudiado; si no es posible cumplir con el requisito, el sistema de medición afectará la respuesta analítica y por lo tanto la exactitud del método.
- Se hace hincapié invariablemente, en la necesidad de calibrar todo el equipo y de verificar el programa de mantenimiento preventivo.
- Se deben desarrollar procedimientos generales para: evaluar cada parámetro analítico en específico, archivar la evidencia documentada de la validación; emitir los documentos maestros del método analítico y certificar el método analítico entre otros.

En síntesis, se concluye que este trabajo cumplió con los objetivos planteados, ya que la validación permitió darle comprobación oficial a un nuevo método analítico para la cuantificación de cloruro de benzalconio en una solución oftálmica, que proporciona resultados que satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, de una manera rápida y confiable.

VALORES DE LA DISTRIBUCION T DE STUDENT

|     | .40  | .25   | .10   | .05   | .025*  | .01    | .005   | .0025   | .001    | .0005   |
|-----|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| 1   | .325 | 1.000 | 3.078 | 6.314 | 12.706 | 31.821 | 63.657 | 127.320 | 318.310 | 636.620 |
| 2   | .289 | .816  | 1.886 | 2.920 | 4.303  | 6.965  | 9.925  | 14.089  | 23.326  | 31.598  |
| 3   | .277 | .765  | 1.638 | 2.353 | 3.182  | 4.541  | 5.841  | 7.453   | 10.213  | 12.924  |
| 4   | .271 | .741  | 1.533 | 2.132 | 2.776  | 3.747  | 4.604  | 5.598   | 7.173   | 8.610   |
| 5   | .267 | .727  | 1.476 | 2.015 | 2.571  | 3.365  | 4.032  | 4.773   | 5.893   | 6.869   |
| 6   | .265 | .727  | 1.440 | 1.943 | 2.447  | 3.143  | 3.707  | 4.317   | 5.208   | 5.959   |
| 7   | .263 | .711  | 1.415 | 1.895 | 2.365  | 2.998  | 3.499  | 4.019   | 4.785   | 5.408   |
| 8   | .262 | .706  | 1.397 | 1.860 | 2.306  | 2.896  | 3.355  | 3.833   | 4.501   | 5.041   |
| 9   | .261 | .703  | 1.383 | 1.833 | 2.262  | 2.821  | 3.250  | 3.690   | 4.297   | 4.781   |
| 10  | .260 | .700  | 1.372 | 1.812 | 2.228  | 2.764  | 3.169  | 3.581   | 4.144   | 4.587   |
| 11  | .260 | .697  | 1.363 | 1.796 | 2.201  | 2.718  | 3.106  | 3.497   | 4.025   | 4.437   |
| 12  | .259 | .695  | 1.356 | 1.782 | 2.179  | 2.681  | 3.055  | 3.428   | 3.930   | 4.318   |
| 13  | .259 | .694  | 1.350 | 1.771 | 2.160  | 2.650  | 3.012  | 3.372   | 3.885   | 4.221   |
| 14  | .258 | .692  | 1.345 | 1.761 | 2.145  | 2.624  | 2.977  | 3.326   | 3.787   | 4.140   |
| 15  | .258 | .691  | 1.341 | 1.753 | 2.131  | 2.602  | 2.947  | 3.286   | 3.733   | 4.073   |
| 16  | .258 | .690  | 1.337 | 1.746 | 2.120  | 2.583  | 2.921  | 3.252   | 3.686   | 4.015   |
| 17  | .257 | .689  | 1.333 | 1.740 | 2.110  | 2.567  | 2.898  | 3.222   | 3.646   | 3.963   |
| 18  | .257 | .688  | 1.330 | 1.734 | 2.101  | 2.552  | 2.878  | 3.197   | 3.610   | 3.922   |
| 19  | .257 | .688  | 1.328 | 1.729 | 2.093  | 2.539  | 2.861  | 3.174   | 3.579   | 3.883   |
| 20  | .257 | .687  | 1.325 | 1.725 | 2.086  | 2.528  | 2.845  | 3.153   | 3.552   | 3.850   |
| 21  | .257 | .686  | 1.323 | 1.721 | 2.080  | 2.518  | 2.831  | 3.135   | 3.527   | 3.819   |
| 22  | .256 | .686  | 1.321 | 1.717 | 2.074  | 2.508  | 2.819  | 3.119   | 3.505   | 3.792   |
| 23  | .256 | .685  | 1.319 | 1.714 | 2.069  | 2.500  | 2.807  | 3.104   | 3.485   | 3.767   |
| 24  | .256 | .685  | 1.318 | 1.711 | 2.064  | 2.492  | 2.797  | 3.091   | 3.467   | 3.745   |
| 25  | .256 | .684  | 1.316 | 1.708 | 2.060  | 2.485  | 2.787  | 3.078   | 3.450   | 3.725   |
| 26  | .256 | .684  | 1.315 | 1.706 | 2.056  | 2.479  | 2.779  | 3.067   | 3.435   | 3.707   |
| 27  | .256 | .684  | 1.314 | 1.703 | 2.052  | 2.473  | 2.771  | 3.057   | 3.421   | 3.690   |
| 28  | .256 | .683  | 1.313 | 1.701 | 2.048  | 2.467  | 2.763  | 3.047   | 3.408   | 3.674   |
| 29  | .256 | .683  | 1.311 | 1.699 | 2.045  | 2.462  | 2.756  | 3.038   | 3.396   | 3.659   |
| 30  | .256 | .683  | 1.310 | 1.697 | 2.042  | 2.457  | 2.750  | 3.030   | 3.385   | 3.646   |
| 40  | .255 | .681  | 1.303 | 1.684 | 2.021  | 2.423  | 2.704  | 2.971   | 3.307   | 3.551   |
| 60  | .254 | .679  | 1.296 | 1.671 | 2.000  | 2.390  | 2.660  | 2.915   | 3.232   | 3.460   |
| 120 | .254 | .677  | 1.289 | 1.658 | 1.980  | 2.358  | 2.617  | 2.860   | 3.160   | 3.373   |
| ∞   | .253 | .674  | 1.282 | 1.645 | 1.960  | 2.326  | 2.576  | 2.807   | 3.090   | 3.291   |

\* PROBABILIDAD ACUMULADA DE 0.975

GRADOS DE LIBERTAD

FALLA DE ORIGEN

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

|     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 12     | 15     | 20     | 24     | 30      | 40      | 60      | 120     | ∞       |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1   | 417.80 | 799.50 | 864.20 | 899.60 | 921.80 | 937.10 | 948.20 | 956.70 | 963.30 | 968.60 | 974.70 | 980.90 | 987.10 | 992.20 | 1001.00 | 1006.00 | 1010.00 | 1014.00 | 1018.00 |
| 2   | 38.51  | 39.00  | 39.17  | 39.25  | 39.30  | 39.33  | 39.36  | 39.37  | 39.39  | 39.40  | 39.41  | 39.45  | 39.46  | 39.46  | 39.47   | 39.48   | 39.49   | 39.49   | 39.50   |
| 3   | 17.44  | 16.04  | 15.44  | 15.10  | 14.88  | 14.73  | 14.62  | 14.54  | 14.47  | 14.42  | 14.34  | 14.25  | 14.17  | 14.12  | 14.08   | 14.04   | 13.99   | 13.95   | 13.90   |
| 4   | 12.22  | 10.65  | 9.98   | 9.60   | 9.36   | 9.20   | 9.07   | 8.98   | 8.90   | 8.84   | 8.75   | 8.66   | 8.56   | 8.51   | 8.46    | 8.41    | 8.36    | 8.31    | 8.26    |
| 5   | 10.01  | 8.43   | 7.76   | 7.39   | 7.15   | 6.98   | 6.85   | 6.76   | 6.68   | 6.62   | 6.52   | 6.43   | 6.33   | 6.28   | 6.23    | 6.18    | 6.12    | 6.07    | 6.02    |
| 6   | 8.81   | 7.26   | 6.60   | 6.23   | 5.99   | 5.82   | 5.70   | 5.60   | 5.52   | 5.46   | 5.37   | 5.27   | 5.17   | 5.12   | 5.07    | 5.01    | 4.96    | 4.90    | 4.85    |
| 7   | 8.07   | 6.54   | 5.89   | 5.52   | 5.29   | 5.12   | 4.99   | 4.90   | 4.82   | 4.76   | 4.67   | 4.57   | 4.47   | 4.42   | 4.36    | 4.31    | 4.25    | 4.20    | 4.14    |
| 8   | 7.57   | 6.06   | 5.42   | 5.05   | 4.82   | 4.65   | 4.58   | 4.49   | 4.41   | 4.36   | 4.28   | 4.20   | 4.10   | 4.05   | 3.99    | 3.94    | 3.88    | 3.83    | 3.77    |
| 9   | 7.21   | 5.71   | 5.08   | 4.72   | 4.48   | 4.32   | 4.20   | 4.10   | 4.03   | 3.96   | 3.87   | 3.77   | 3.67   | 3.61   | 3.56    | 3.51    | 3.45    | 3.39    | 3.33    |
| 10  | 6.94   | 5.46   | 4.83   | 4.47   | 4.24   | 4.07   | 3.95   | 3.85   | 3.78   | 3.72   | 3.62   | 3.52   | 3.42   | 3.37   | 3.31    | 3.26    | 3.20    | 3.14    | 3.08    |
| 11  | 6.72   | 5.26   | 4.63   | 4.28   | 4.04   | 3.88   | 3.76   | 3.66   | 3.59   | 3.53   | 3.43   | 3.33   | 3.23   | 3.17   | 3.12    | 3.06    | 3.00    | 2.94    | 2.88    |
| 12  | 6.55   | 5.10   | 4.47   | 4.12   | 3.89   | 3.73   | 3.61   | 3.51   | 3.44   | 3.37   | 3.28   | 3.18   | 3.07   | 3.02   | 2.96    | 2.91    | 2.85    | 2.79    | 2.72    |
| 13  | 6.41   | 4.97   | 4.35   | 4.00   | 3.77   | 3.60   | 3.48   | 3.39   | 3.31   | 3.25   | 3.15   | 3.05   | 2.95   | 2.89   | 2.84    | 2.78    | 2.72    | 2.66    | 2.60    |
| 14  | 6.30   | 4.86   | 4.24   | 3.89   | 3.66   | 3.50   | 3.38   | 3.29   | 3.21   | 3.15   | 3.05   | 2.95   | 2.84   | 2.79   | 2.73    | 2.67    | 2.61    | 2.55    | 2.49    |
| 15  | 6.20   | 4.77   | 4.15   | 3.80   | 3.58   | 3.41   | 3.29   | 3.20   | 3.12   | 3.06   | 2.96   | 2.86   | 2.76   | 2.70   | 2.64    | 2.59    | 2.52    | 2.46    | 2.40    |
| 16  | 6.12   | 4.69   | 4.08   | 3.73   | 3.50   | 3.34   | 3.22   | 3.12   | 3.05   | 2.99   | 2.89   | 2.79   | 2.68   | 2.63   | 2.57    | 2.51    | 2.45    | 2.38    | 2.32    |
| 17  | 6.04   | 4.62   | 4.01   | 3.66   | 3.44   | 3.28   | 3.16   | 3.06   | 2.98   | 2.92   | 2.82   | 2.72   | 2.62   | 2.56   | 2.50    | 2.44    | 2.38    | 2.32    | 2.25    |
| 18  | 5.96   | 4.56   | 3.95   | 3.61   | 3.38   | 3.22   | 3.10   | 3.01   | 2.93   | 2.87   | 2.77   | 2.67   | 2.56   | 2.50   | 2.44    | 2.38    | 2.32    | 2.26    | 2.19    |
| 19  | 5.92   | 4.51   | 3.90   | 3.56   | 3.33   | 3.17   | 3.05   | 2.96   | 2.88   | 2.82   | 2.72   | 2.62   | 2.51   | 2.45   | 2.39    | 2.33    | 2.27    | 2.20    | 2.13    |
| 20  | 5.87   | 4.46   | 3.86   | 3.51   | 3.29   | 3.13   | 3.01   | 2.91   | 2.83   | 2.77   | 2.68   | 2.57   | 2.46   | 2.41   | 2.35    | 2.29    | 2.22    | 2.16    | 2.09    |
| 21  | 5.83   | 4.42   | 3.82   | 3.48   | 3.25   | 3.09   | 2.97   | 2.87   | 2.80   | 2.73   | 2.64   | 2.53   | 2.42   | 2.37   | 2.31    | 2.25    | 2.18    | 2.11    | 2.04    |
| 22  | 5.79   | 4.38   | 3.78   | 3.44   | 3.22   | 3.06   | 2.93   | 2.84   | 2.76   | 2.70   | 2.60   | 2.50   | 2.39   | 2.33   | 2.27    | 2.21    | 2.14    | 2.06    | 2.00    |
| 23  | 5.75   | 4.35   | 3.75   | 3.41   | 3.18   | 3.02   | 2.90   | 2.81   | 2.73   | 2.67   | 2.57   | 2.47   | 2.36   | 2.30   | 2.24    | 2.18    | 2.11    | 2.04    | 1.97    |
| 24  | 5.72   | 4.32   | 3.72   | 3.38   | 3.15   | 2.99   | 2.87   | 2.78   | 2.70   | 2.64   | 2.54   | 2.44   | 2.33   | 2.27   | 2.21    | 2.15    | 2.08    | 2.01    | 1.94    |
| 25  | 5.69   | 4.29   | 3.69   | 3.35   | 3.13   | 2.97   | 2.85   | 2.75   | 2.68   | 2.61   | 2.51   | 2.41   | 2.30   | 2.24   | 2.18    | 2.12    | 2.05    | 1.98    | 1.91    |
| 26  | 5.65   | 4.27   | 3.67   | 3.33   | 3.10   | 2.94   | 2.82   | 2.73   | 2.65   | 2.59   | 2.49   | 2.39   | 2.28   | 2.22   | 2.16    | 2.09    | 2.03    | 1.95    | 1.88    |
| 27  | 5.63   | 4.24   | 3.65   | 3.31   | 3.08   | 2.92   | 2.80   | 2.71   | 2.63   | 2.57   | 2.47   | 2.36   | 2.25   | 2.19   | 2.13    | 2.07    | 2.00    | 1.93    | 1.85    |
| 28  | 5.61   | 4.22   | 3.63   | 3.29   | 3.06   | 2.90   | 2.78   | 2.69   | 2.61   | 2.55   | 2.45   | 2.34   | 2.23   | 2.17   | 2.11    | 2.05    | 1.98    | 1.91    | 1.83    |
| 29  | 5.59   | 4.20   | 3.61   | 3.27   | 3.04   | 2.88   | 2.76   | 2.67   | 2.59   | 2.53   | 2.43   | 2.32   | 2.21   | 2.15   | 2.09    | 2.03    | 1.96    | 1.89    | 1.81    |
| 30  | 5.57   | 4.18   | 3.59   | 3.25   | 3.03   | 2.87   | 2.75   | 2.65   | 2.57   | 2.51   | 2.41   | 2.31   | 2.20   | 2.14   | 2.07    | 2.01    | 1.94    | 1.87    | 1.79    |
| 40  | 5.42   | 4.05   | 3.46   | 3.13   | 2.90   | 2.74   | 2.62   | 2.53   | 2.45   | 2.39   | 2.30   | 2.18   | 2.07   | 2.01   | 1.94    | 1.88    | 1.80    | 1.72    | 1.64    |
| 60  | 5.29   | 3.93   | 3.34   | 3.01   | 2.79   | 2.63   | 2.51   | 2.41   | 2.33   | 2.27   | 2.17   | 2.06   | 1.94   | 1.88   | 1.82    | 1.74    | 1.67    | 1.58    | 1.48    |
| 120 | 5.15   | 3.80   | 3.23   | 2.89   | 2.67   | 2.52   | 2.39   | 2.30   | 2.22   | 2.16   | 2.05   | 1.94   | 1.82   | 1.76   | 1.69    | 1.61    | 1.53    | 1.43    | 1.31    |
| ∞   | 5.02   | 3.69   | 3.12   | 2.79   | 2.57   | 2.41   | 2.29   | 2.19   | 2.11   | 2.05   | 1.94   | 1.83   | 1.71   | 1.64   | 1.57    | 1.48    | 1.39    | 1.27    | 1.00    |

GRADOS DE LIBERTAD

55

FALLA DE ORIGEN



VALORES DE LA DISTRIBUCION F DE FISHER  
CON UNA PROBABILIDAD ACUMULADA DE 0.95

|     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 12     | 15     | 20     | 24     | 30     | 40     | 60     | 120    | ∞      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | 161.40 | 199.50 | 215.70 | 224.60 | 230.20 | 234.00 | 236.00 | 238.00 | 240.50 | 241.90 | 243.90 | 245.90 | 248.00 | 249.10 | 250.10 | 251.10 | 252.20 | 253.30 | 254.90 |
| 2   | 18.51  | 19.00  | 19.16  | 19.25  | 19.30  | 19.33  | 19.35  | 19.37  | 19.38  | 19.40  | 19.41  | 19.43  | 19.45  | 19.45  | 19.46  | 19.47  | 19.48  | 19.49  | 19.50  |
| 3   | 10.13  | 9.55   | 9.28   | 9.12   | 9.01   | 8.94   | 8.89   | 8.85   | 8.81   | 8.79   | 8.74   | 8.70   | 8.68   | 8.64   | 8.62   | 8.59   | 8.57   | 8.55   | 8.53   |
| 4   | 7.71   | 6.94   | 6.59   | 6.39   | 6.26   | 6.16   | 6.08   | 6.04   | 6.00   | 5.96   | 5.91   | 5.86   | 5.80   | 5.77   | 5.75   | 5.72   | 5.69   | 5.66   | 5.63   |
| 5   | 6.61   | 5.79   | 5.41   | 5.19   | 5.05   | 4.95   | 4.88   | 4.82   | 4.77   | 4.74   | 4.68   | 4.62   | 4.56   | 4.53   | 4.50   | 4.46   | 4.43   | 4.40   | 4.36   |
| 6   | 5.99   | 5.14   | 4.76   | 4.53   | 4.39   | 4.28   | 4.21   | 4.15   | 4.10   | 4.06   | 4.00   | 3.94   | 3.87   | 3.84   | 3.81   | 3.77   | 3.74   | 3.70   | 3.67   |
| 7   | 5.59   | 4.74   | 4.35   | 4.12   | 3.97   | 3.87   | 3.79   | 3.73   | 3.68   | 3.64   | 3.57   | 3.51   | 3.44   | 3.41   | 3.38   | 3.34   | 3.30   | 3.27   | 3.23   |
| 8   | 5.32   | 4.46   | 4.07   | 3.84   | 3.69   | 3.58   | 3.50   | 3.44   | 3.39   | 3.35   | 3.28   | 3.22   | 3.15   | 3.12   | 3.08   | 3.04   | 3.01   | 2.97   | 2.93   |
| 9   | 5.12   | 4.26   | 3.86   | 3.63   | 3.48   | 3.37   | 3.29   | 3.23   | 3.18   | 3.14   | 3.07   | 3.01   | 2.94   | 2.90   | 2.86   | 2.83   | 2.79   | 2.75   | 2.71   |
| 10  | 4.96   | 4.10   | 3.71   | 3.48   | 3.33   | 3.22   | 3.14   | 3.07   | 3.02   | 2.98   | 2.91   | 2.85   | 2.77   | 2.74   | 2.70   | 2.66   | 2.62   | 2.58   | 2.54   |
| 11  | 4.84   | 3.98   | 3.59   | 3.36   | 3.20   | 3.09   | 3.01   | 2.95   | 2.90   | 2.85   | 2.79   | 2.72   | 2.65   | 2.61   | 2.57   | 2.53   | 2.49   | 2.45   | 2.40   |
| 12  | 4.75   | 3.89   | 3.49   | 3.26   | 3.11   | 3.00   | 2.91   | 2.85   | 2.80   | 2.75   | 2.69   | 2.62   | 2.54   | 2.51   | 2.47   | 2.43   | 2.38   | 2.34   | 2.30   |
| 13  | 4.67   | 3.81   | 3.41   | 3.18   | 3.03   | 2.92   | 2.83   | 2.77   | 2.71   | 2.67   | 2.60   | 2.53   | 2.46   | 2.42   | 2.38   | 2.34   | 2.30   | 2.25   | 2.21   |
| 14  | 4.60   | 3.74   | 3.34   | 3.11   | 2.96   | 2.85   | 2.76   | 2.70   | 2.65   | 2.60   | 2.53   | 2.46   | 2.39   | 2.35   | 2.31   | 2.27   | 2.22   | 2.18   | 2.13   |
| 15  | 4.54   | 3.68   | 3.29   | 3.06   | 2.90   | 2.79   | 2.71   | 2.64   | 2.59   | 2.54   | 2.48   | 2.40   | 2.33   | 2.29   | 2.25   | 2.20   | 2.16   | 2.11   | 2.07   |
| 16  | 4.49   | 3.63   | 3.24   | 3.01   | 2.85   | 2.74   | 2.66   | 2.59   | 2.54   | 2.49   | 2.42   | 2.35   | 2.28   | 2.24   | 2.19   | 2.15   | 2.11   | 2.06   | 2.01   |
| 17  | 4.45   | 3.59   | 3.20   | 2.96   | 2.81   | 2.70   | 2.61   | 2.55   | 2.49   | 2.45   | 2.38   | 2.31   | 2.23   | 2.19   | 2.15   | 2.10   | 2.06   | 2.01   | 1.96   |
| 18  | 4.41   | 3.55   | 3.16   | 2.93   | 2.77   | 2.66   | 2.58   | 2.51   | 2.46   | 2.41   | 2.34   | 2.27   | 2.19   | 2.15   | 2.11   | 2.06   | 2.02   | 1.97   | 1.92   |
| 19  | 4.38   | 3.52   | 3.13   | 2.90   | 2.74   | 2.63   | 2.54   | 2.48   | 2.42   | 2.38   | 2.31   | 2.23   | 2.16   | 2.11   | 2.07   | 2.03   | 1.98   | 1.93   | 1.88   |
| 20  | 4.35   | 3.49   | 3.10   | 2.87   | 2.71   | 2.60   | 2.51   | 2.45   | 2.39   | 2.35   | 2.28   | 2.20   | 2.12   | 2.08   | 2.04   | 1.99   | 1.95   | 1.90   | 1.84   |
| 21  | 4.32   | 3.47   | 3.07   | 2.84   | 2.68   | 2.57   | 2.49   | 2.42   | 2.37   | 2.32   | 2.25   | 2.18   | 2.10   | 2.05   | 2.01   | 1.95   | 1.92   | 1.87   | 1.81   |
| 22  | 4.30   | 3.44   | 3.05   | 2.82   | 2.66   | 2.55   | 2.46   | 2.40   | 2.34   | 2.30   | 2.23   | 2.15   | 2.07   | 2.03   | 1.98   | 1.94   | 1.89   | 1.84   | 1.78   |
| 23  | 4.28   | 3.42   | 3.03   | 2.80   | 2.64   | 2.53   | 2.44   | 2.37   | 2.32   | 2.27   | 2.20   | 2.13   | 2.05   | 2.01   | 1.96   | 1.91   | 1.86   | 1.81   | 1.76   |
| 24  | 4.26   | 3.40   | 3.01   | 2.78   | 2.62   | 2.51   | 2.42   | 2.36   | 2.30   | 2.25   | 2.18   | 2.11   | 2.03   | 1.98   | 1.94   | 1.89   | 1.84   | 1.79   | 1.73   |
| 25  | 4.24   | 3.39   | 2.99   | 2.76   | 2.60   | 2.49   | 2.40   | 2.34   | 2.28   | 2.24   | 2.16   | 2.09   | 2.01   | 1.96   | 1.92   | 1.87   | 1.82   | 1.77   | 1.71   |
| 26  | 4.23   | 3.37   | 2.98   | 2.74   | 2.59   | 2.47   | 2.39   | 2.32   | 2.27   | 2.22   | 2.15   | 2.07   | 1.99   | 1.95   | 1.89   | 1.85   | 1.80   | 1.75   | 1.69   |
| 27  | 4.21   | 3.35   | 2.96   | 2.73   | 2.57   | 2.46   | 2.37   | 2.31   | 2.25   | 2.20   | 2.13   | 2.06   | 1.97   | 1.93   | 1.88   | 1.84   | 1.79   | 1.73   | 1.67   |
| 28  | 4.20   | 3.34   | 2.95   | 2.71   | 2.56   | 2.45   | 2.36   | 2.29   | 2.24   | 2.19   | 2.12   | 2.04   | 1.96   | 1.91   | 1.87   | 1.82   | 1.77   | 1.71   | 1.65   |
| 29  | 4.18   | 3.33   | 2.93   | 2.70   | 2.55   | 2.43   | 2.35   | 2.28   | 2.22   | 2.18   | 2.10   | 2.03   | 1.94   | 1.90   | 1.85   | 1.81   | 1.75   | 1.70   | 1.64   |
| 30  | 4.17   | 3.32   | 2.92   | 2.69   | 2.53   | 2.42   | 2.33   | 2.27   | 2.21   | 2.16   | 2.09   | 2.01   | 1.93   | 1.89   | 1.84   | 1.79   | 1.74   | 1.68   | 1.62   |
| 40  | 4.08   | 3.23   | 2.84   | 2.61   | 2.45   | 2.34   | 2.25   | 2.18   | 2.12   | 2.08   | 2.00   | 1.92   | 1.84   | 1.79   | 1.74   | 1.69   | 1.64   | 1.58   | 1.51   |
| 60  | 4.00   | 3.15   | 2.76   | 2.53   | 2.37   | 2.25   | 2.17   | 2.10   | 2.04   | 1.99   | 1.92   | 1.84   | 1.75   | 1.70   | 1.65   | 1.59   | 1.53   | 1.47   | 1.39   |
| 120 | 3.92   | 3.07   | 2.68   | 2.45   | 2.29   | 2.17   | 2.09   | 2.02   | 1.96   | 1.91   | 1.83   | 1.75   | 1.66   | 1.61   | 1.55   | 1.50   | 1.43   | 1.35   | 1.25   |
| ∞   | 3.84   | 3.00   | 2.60   | 2.37   | 2.21   | 2.10   | 2.01   | 1.94   | 1.88   | 1.83   | 1.75   | 1.67   | 1.57   | 1.52   | 1.46   | 1.39   | 1.32   | 1.22   | 1.10   |

GRADOS DE LIBERTAD

VALORES DE LA DISTRIBUCION F DE FISHER  
CON UNA PROBABILIDAD ACUMULADA DE 0.99

|     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 12     | 15     | 20     | 24     | 30     | 40     | 60     | 120    | ∞      |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1   | 403.00 | 499.50 | 540.00 | 562.00 | 574.00 | 589.00 | 598.00 | 602.00 | 605.00 | 606.00 | 617.00 | 629.00 | 638.00 | 641.00 | 643.00 | 647.00 | 651.00 | 653.00 | 654.00 |
| 2   | 98.50  | 99.00  | 99.17  | 99.30  | 99.33  | 99.36  | 99.37  | 99.38  | 99.40  | 99.42  | 99.43  | 99.46  | 99.47  | 99.47  | 99.48  | 99.48  | 99.49  | 99.50  | 99.50  |
| 3   | 34.12  | 30.82  | 29.46  | 28.71  | 28.24  | 27.91  | 27.67  | 27.49  | 27.35  | 27.23  | 27.05  | 26.87  | 26.69  | 26.60  | 26.50  | 26.41  | 26.32  | 26.22  | 26.13  |
| 4   | 21.20  | 18.00  | 16.69  | 15.98  | 15.52  | 15.21  | 14.98  | 14.80  | 14.66  | 14.55  | 14.37  | 14.20  | 14.02  | 13.93  | 13.84  | 13.75  | 13.65  | 13.56  | 13.46  |
| 5   | 16.26  | 13.27  | 12.06  | 11.30  | 10.97  | 10.67  | 10.46  | 10.29  | 10.16  | 10.05  | 9.89   | 9.72   | 9.55   | 9.47   | 9.38   | 9.29   | 9.20   | 9.11   | 9.02   |
| 6   | 13.75  | 10.92  | 9.78   | 9.15   | 8.75   | 8.47   | 8.26   | 8.10   | 7.98   | 7.87   | 7.72   | 7.53   | 7.40   | 7.31   | 7.23   | 7.14   | 7.06   | 6.97   | 6.88   |
| 7   | 12.25  | 9.55   | 8.45   | 7.85   | 7.46   | 7.19   | 6.99   | 6.84   | 6.72   | 6.62   | 6.47   | 6.31   | 6.16   | 6.07   | 5.99   | 5.91   | 5.82   | 5.74   | 5.65   |
| 8   | 11.26  | 8.65   | 7.59   | 7.01   | 6.63   | 6.37   | 6.18   | 6.03   | 5.91   | 5.81   | 5.67   | 5.52   | 5.35   | 5.28   | 5.20   | 5.12   | 5.03   | 4.95   | 4.86   |
| 9   | 10.36  | 8.02   | 6.99   | 6.42   | 6.06   | 5.80   | 5.61   | 5.47   | 5.35   | 5.26   | 5.11   | 4.96   | 4.81   | 4.73   | 4.65   | 4.57   | 4.48   | 4.40   | 4.31   |
| 10  | 10.04  | 7.56   | 6.55   | 5.99   | 5.64   | 5.39   | 5.20   | 5.06   | 4.94   | 4.85   | 4.71   | 4.56   | 4.41   | 4.33   | 4.25   | 4.17   | 4.08   | 4.00   | 3.91   |
| 11  | 9.65   | 7.21   | 6.22   | 5.67   | 5.32   | 5.07   | 4.89   | 4.74   | 4.63   | 4.54   | 4.40   | 4.25   | 4.10   | 4.02   | 3.94   | 3.86   | 3.78   | 3.69   | 3.60   |
| 12  | 9.33   | 6.93   | 5.95   | 5.41   | 5.06   | 4.82   | 4.64   | 4.50   | 4.39   | 4.30   | 4.16   | 4.01   | 3.83   | 3.78   | 3.70   | 3.62   | 3.54   | 3.45   | 3.36   |
| 13  | 9.07   | 6.70   | 5.74   | 5.21   | 4.86   | 4.62   | 4.44   | 4.30   | 4.19   | 4.10   | 3.96   | 3.82   | 3.66   | 3.59   | 3.51   | 3.43   | 3.34   | 3.25   | 3.17   |
| 14  | 8.86   | 6.51   | 5.56   | 5.04   | 4.69   | 4.46   | 4.28   | 4.14   | 4.03   | 3.94   | 3.80   | 3.66   | 3.51   | 3.43   | 3.35   | 3.27   | 3.18   | 3.09   | 3.00   |
| 15  | 8.68   | 6.36   | 5.42   | 4.89   | 4.56   | 4.32   | 4.14   | 4.00   | 3.89   | 3.80   | 3.67   | 3.52   | 3.37   | 3.29   | 3.21   | 3.13   | 3.05   | 2.96   | 2.87   |
| 16  | 8.53   | 6.21   | 5.29   | 4.77   | 4.44   | 4.20   | 4.02   | 3.89   | 3.78   | 3.69   | 3.55   | 3.41   | 3.26   | 3.18   | 3.10   | 3.02   | 2.93   | 2.84   | 2.75   |
| 17  | 8.40   | 6.11   | 5.18   | 4.67   | 4.34   | 4.10   | 3.93   | 3.79   | 3.68   | 3.59   | 3.46   | 3.31   | 3.16   | 3.08   | 3.00   | 2.92   | 2.83   | 2.75   | 2.65   |
| 18  | 8.29   | 6.01   | 5.09   | 4.58   | 4.25   | 4.01   | 3.84   | 3.71   | 3.60   | 3.51   | 3.37   | 3.23   | 3.08   | 3.00   | 2.92   | 2.84   | 2.75   | 2.66   | 2.57   |
| 19  | 8.18   | 5.93   | 5.01   | 4.50   | 4.17   | 3.94   | 3.77   | 3.63   | 3.52   | 3.43   | 3.30   | 3.15   | 3.00   | 2.92   | 2.84   | 2.76   | 2.67   | 2.58   | 2.49   |
| 20  | 8.10   | 5.85   | 4.94   | 4.43   | 4.10   | 3.87   | 3.70   | 3.56   | 3.46   | 3.37   | 3.23   | 3.09   | 2.94   | 2.86   | 2.78   | 2.69   | 2.61   | 2.52   | 2.43   |
| 21  | 8.02   | 5.78   | 4.87   | 4.37   | 4.04   | 3.81   | 3.64   | 3.51   | 3.40   | 3.31   | 3.17   | 3.03   | 2.88   | 2.80   | 2.72   | 2.64   | 2.55   | 2.46   | 2.36   |
| 22  | 7.95   | 5.72   | 4.82   | 4.31   | 3.99   | 3.76   | 3.59   | 3.45   | 3.35   | 3.26   | 3.12   | 2.98   | 2.83   | 2.75   | 2.67   | 2.58   | 2.50   | 2.40   | 2.31   |
| 23  | 7.88   | 5.66   | 4.76   | 4.26   | 3.94   | 3.71   | 3.54   | 3.41   | 3.30   | 3.21   | 3.07   | 2.93   | 2.78   | 2.70   | 2.62   | 2.54   | 2.45   | 2.35   | 2.26   |
| 24  | 7.82   | 5.61   | 4.72   | 4.22   | 3.90   | 3.67   | 3.50   | 3.36   | 3.26   | 3.17   | 3.03   | 2.89   | 2.74   | 2.66   | 2.58   | 2.49   | 2.40   | 2.31   | 2.21   |
| 25  | 7.77   | 5.57   | 4.68   | 4.18   | 3.85   | 3.63   | 3.46   | 3.32   | 3.22   | 3.13   | 2.99   | 2.85   | 2.70   | 2.62   | 2.54   | 2.45   | 2.36   | 2.27   | 2.17   |
| 26  | 7.72   | 5.53   | 4.64   | 4.14   | 3.82   | 3.59   | 3.42   | 3.29   | 3.18   | 3.09   | 2.96   | 2.81   | 2.66   | 2.58   | 2.50   | 2.42   | 2.33   | 2.23   | 2.13   |
| 27  | 7.68   | 5.49   | 4.60   | 4.11   | 3.78   | 3.56   | 3.39   | 3.26   | 3.15   | 3.06   | 2.93   | 2.78   | 2.63   | 2.55   | 2.47   | 2.38   | 2.29   | 2.20   | 2.10   |
| 28  | 7.64   | 5.45   | 4.57   | 4.07   | 3.75   | 3.53   | 3.36   | 3.23   | 3.12   | 3.03   | 2.90   | 2.75   | 2.60   | 2.52   | 2.44   | 2.35   | 2.26   | 2.17   | 2.06   |
| 29  | 7.60   | 5.42   | 4.54   | 4.04   | 3.73   | 3.50   | 3.33   | 3.20   | 3.09   | 3.00   | 2.87   | 2.73   | 2.57   | 2.49   | 2.41   | 2.33   | 2.23   | 2.14   | 2.03   |
| 30  | 7.56   | 5.39   | 4.51   | 4.02   | 3.70   | 3.47   | 3.30   | 3.17   | 3.07   | 2.97   | 2.84   | 2.70   | 2.55   | 2.47   | 2.39   | 2.30   | 2.21   | 2.11   | 2.01   |
| 40  | 7.31   | 5.18   | 4.31   | 3.83   | 3.51   | 3.29   | 3.12   | 2.99   | 2.89   | 2.80   | 2.67   | 2.53   | 2.37   | 2.29   | 2.20   | 2.11   | 2.02   | 1.92   | 1.80   |
| 60  | 7.08   | 4.98   | 4.13   | 3.65   | 3.34   | 3.12   | 2.95   | 2.82   | 2.72   | 2.63   | 2.50   | 2.35   | 2.20   | 2.12   | 2.03   | 1.94   | 1.84   | 1.73   | 1.60   |
| 120 | 6.85   | 4.79   | 3.95   | 3.48   | 3.17   | 2.96   | 2.79   | 2.66   | 2.56   | 2.47   | 2.34   | 2.19   | 2.03   | 1.95   | 1.86   | 1.76   | 1.66   | 1.53   | 1.38   |
| ∞   | 6.63   | 4.60   | 3.78   | 3.32   | 3.02   | 2.80   | 2.64   | 2.51   | 2.41   | 2.32   | 2.18   | 2.04   | 1.88   | 1.79   | 1.70   | 1.59   | 1.47   | 1.32   | 1.00   |

GRADOS DE LIBERTAD

57

FALLA DE ORIGEN

## **BIBLIOGRAFIA**

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Anal Chem. Validation of Analytical Methods, Vol. 6, 600A-608A. 1983.
2. Ayres G.H. Análisis Químico Cuantitativo, Ed. Harla. 2a. edición. Cap. 31. México 1970.
3. Boehleret, J.P., Ph.D. Assay development in stability test methods, Drug Dev. Ind. Pharm , 10 (889), 1343-1371 (1984).
4. Brewster, Mcewem, Van der Werf. Curso práctico de Química Orgánica, Ed. Alhambra. España 1982.
5. Carleton Frederick J. ex Agalloco James P. Validation Pharmaceutical Processes, Ed. Marcel Dekker, Inc. Cap.I,II y IV. U.S.A. 1990.
6. Charlot Gaston. Química Analítica, Ed. El Aguila. México 1990, p.p. 141-143.
7. Colegio Nacional de Q.F.B. Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos.
8. Componentes para un programa de validación de métodos analíticos, Pharma News. Mayo (1993). Vol. 4, No.5. p.p. 39-40.
9. Current concept for the validation of compendial assays, Pharmacopelal Forum. The United States Pharmacopelal Convetlon, Inc. 1986.
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. edición. México, 1988.
11. Felgenbaun A. U. Control total de calidad. Ed. CECSA México, 1984.
12. Goodman-Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7a. edición. Ed. Médica Panamericana. México, 1990.p.p. 906,925-926.
13. Grant E. and Leavenworth R. Control Estadístico de Calidad . Ed. CECSA. México, 1984.
14. Guideline on General Principles of Process Validation, Working Draft revised March 1984. Prepared by:Center for Drugs & Biologics and Center por Devices & Radlological Health, Food and Drug Administration.
15. Fritz S.J. Química Analítica Cuantitativa, Ed. Limusa . 3a. edición. México 1979.
16. Guerra, J. Validation of analytical methods by FDA Laboratories, Pharm. Technol. March 1986.
17. Haber/Runyon. Estadística General, Addison-Wesley Iberoamericana. 4a. edición. México, 1989.
18. Helman José. Farmacotecnia teórica y práctica, Ed. CECSA. Tomo VI Cap. 53 y Tomo VII Cap. 63. México, 1981.
19. IMSS. Requisitos mínimos para validación de métodos analíticos, 1989.
20. Imman,E.L., Frischman J.K., Jiménez P.J., Winkel G.D., Persinger M.L. and Rutherford B.S. General method validation guidelines for pharmaceutical samples, J.Chrom. Sci. Vol. 25, June 1987.
21. Litter Manuel. Farmacología Ed. El Ateneo. Argentina. Capítulos 26 y 27.

22. Loftus Bernard T. & Nash Robert A, Pharmaceutical Process Validation Ed. Marcel Dekker, Inc. Cap.I, IX y X. U.S.A. 1984.
23. Martindale. The Extra Pharmacopela , The Parmaceutical Press, 28 th edition. 1982. p.p. 501 - 502.
24. Massart, D.L., Dijkstra A. and Kaufam L. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co. 1978.
25. Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. Pharma News. Julio (1993), Vol. 4, No.7. p.p. 32-44.
26. Rodríguez Carranza Rodolfo. Vademecum Académico de Medicamentos. 1a. edición. Vol. I. Editorial UNAM. México, 1984.
27. Remington . Pharmaceutical Sciences. Merck Publishing Company, USA. 14 th Edition. Cap. 34 y Cap. 41.
28. Skoog, West. Análisis Instrumental. Ed. Interamericana, Cap. 2. México, 1983.
29. The Merck Index. 11 th edition. Merck and Co. Inc. USA, 1989.p.p. 1072.
30. U.S. Pharmacopela National Formulary XXII, National Formulary, USP XXII.
31. Vanderwielen,A.J., Hardwidge,E.A. Guidelines for assay validation. The Up John Company.
33. Velazquez P.P; González H. ; Ramos C. & Madrigal M. Desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría para el control de calidad y estabilidad en tabletas que contienen ácido acetilsalicílico. Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas. 19 (2), 19-22, 1988.
34. Watty Margarita. Química Analítica. Ed. Alhambra Universidad. México, 1982. p.p. 115-128.
35. Yamane T. Estadística, 3a. edición. Ed. Harla. México, 1979.

59 **ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**