

24
m



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"INSTALACION, CALIFICACION Y CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE BECKMAN DU 640"



T E S I S

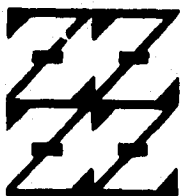
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

VERONICA ARACELI HERNANDEZ HERNANDEZ

DIRECTOR: Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ



LO MUESTRO EN
DE MUESTRA, REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

29
m



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**"INSTALACION, CALIFICACION Y
CALIBRACION DEL ESPECTROFOTOMETRO
UV-VISIBLE BECKMAN DU 640"**



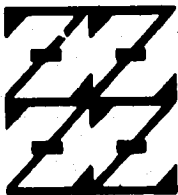
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

VERONICA ARACELI HERNANDEZ HERNANDEZ

DIRECTOR: Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ



**LO MURANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO D. F.

1996

*"Los seres que triunfan en la vida, en
cualquier aspecto, son los que tienen la audacia de decidirse a
salir del anonimato..."*

Anamaria Rabatté

Reflexión

Tengo una familia que amo y me apoya en todo momento, una labor que ha sido el comienzo y realización en mi vida, un compromiso con el mundo que me permite integrarme a una lucha continua ante la crisis y la adversidad.

Todo esto es muy bello y casi perfecto, pero mi actitud ante ellos no siempre ha sido muy positiva; me doy cuenta que los momentos desagradables, de problemas, de angustias y de desilusión yo los he provocado con mi actitud negativa. Estoy convencida de que soy mi peor enemigo y mi principal obstáculo para disfrutar lo que tengo.

Es que al no buscar tiempo para reflexionar y cambiar mi forma interna, cierro las posibilidades de resolver los problemas existentes con mi persona y con mi familia. Y cuando decido apoyar a ese "yo", a amarlo, a aceptarlo tal y como es, comprendo que soy todo lo que tengo y que al emprender el viaje final sólo me llevaré la satisfacción de haber luchado por vivir esos cambios que me corresponde realizar y al entender mi mundo interior contribuyo con un granito de arena para hacer un mundo mejor, es justo, más humano, más feliz y sobre todo tener presente que

... Aún es tiempo para cambiar

A la Universidad Nacional Autónoma de México y
especialmente a la Facultad de Estudios Superiores
Jaragoza, por haberme proporcionado una educación y
formación invaluable.

A el Laboratorio Nacional de Salud Pública por
brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la D.F.B. Angélica Aguilar y a la D.F.B. Albalá
Flores por el apoyo brindado en la realización del
presente trabajo

Y especialmente a la D. Celia Gómez Tagle y Ordo, por
su constante apoyo y dedicación.

A mis padres Elic y Domitilo, por la vida, cariño y
dedicación recibidos, con los que supieron llevarme por el
buen camino enseñándome a confiar en mí, a soñar y
a hacerme metas y luchar por conseguirlas.

Con lo cual he logrado terminar mi carrera profesional
que es la mejor de las herencias.

Gracias queridos padres

A mis hermanos Jorge Luis y Miguel, por el apoyo y
comprensión que me han brindado en todo momento.

Gracias por todo lo que hemos compartido juntos y en
especial por el cariño que nos mantiene unidos.

A mis primos y sobrinos como muestra de que se debe
luchar por conseguir todo lo que uno desea y nunca
darse por vencido por muy grande que sea el obstáculo.

Con respeto y cariño a mis tíos, gracias por brindarnos
su apoyo en los momentos difíciles

A mis mejores amigos por los momentos felices que
compartimos juntos.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
DEPARTAMENTO DE EVALUACION SANITARIA DE
MEDICAMENTOS Y COSMETICOS DEL LABORATORIO
NACIONAL DE SALUD PUBLICA BAJO LA ASESORIA DE:**

Q.F.B. ANGELICA PATRICIA AGUILAR OCHOA

Q.F.B. IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

CONTENIDO

INTRODUCCION

1.FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	1
1.1. ESPECTROFOTOMETRIA.....	1
1.2. CALIBRACION Y CERTIFICACION.....	5
2.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. HIPOTESIS.....	22
5. MATERIAL Y METODOS.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
7. CONCLUSIONES.....	75
8. BIBLIOGRAFIA.....	76
9. ANEXOS.....	79

INTRODUCCION

Las exigencias de calidad de los productos aumentan continuamente, es por esto que resulta indispensable un adecuado control de calidad de los productos manufacturados. En los laboratorios farmacéuticos, se realiza control de calidad empleando mediciones espectrofotométricas; por ello es de vital importancia contar con instrumentos perfectamente calibrados y certificados, con el fin de obtener resultados precisos y exactos en un análisis rutinario.

Por tanto se deben establecer las condiciones de operación adecuadas, para realizar análisis altamente satisfactorios. Actualmente existen normas emitidas por organismos encargados del control y verificación de instrumentos y equipos, las cuales deben ser evaluadas en cada uno de ellos.

Además con el desarrollo de nuevas tecnologías y de la electrónica principalmente, la industria Farmacéutica se ha visto inundada por sistemas computarizados, debido a esto es necesario tener programas de validación para estos sistemas y crear regulaciones para los mismos.

En el presente trabajo, se establecieron los parámetros para la calibración y certificación del espectrofotómetro UV-Visible Beckman DU 640 localizado en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, basándose en las normas internacionales American Society of Testing and Materials (ASTM) y por las de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).

Los parámetros estudiados fueron: Precisión y Exactitud de la Longitud de Onda, Precisión, Exactitud y Linearidad Fotométrica; Desviación de la luz y Evaluación del estado de las celdas.

También se llevó a cabo la validación del software utilizado en el espectrofotómetro, debido a que es de capital importancia tener dentro de la industria el software adecuado a las necesidades de la misma y más aún, que lleve a cabo las funciones para las que fue diseñado y por las que fue adquirido.

1. FUNDAMENTACION DEL TEMA

1.1. ESPECTROFOTOMETRIA

La espectroscopia de absorción consiste en la medida de absorción por diferentes sustancias, de una radiación electromagnética (EM), de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática.(23)

La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro. La región ultravioleta del espectro electromagnético se encuentra entre 0.6 y 380 nm. Por razones prácticas se divide en ultravioleta "cercano" o de "cuarzo" de 200 a 380 nm y en ultravioleta "lejano" o de "vacío", de 0.6 a 200 nm. La región visible se localiza entre 380 y 780 nm.

La ley fundamental que rige la fotometría de absorción se llama Ley de Beer, la cual se representa con la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon bc$$

Donde:

ϵ = Coeficiente de absortividad molar

b= Espesor de la celda (cm)

c= Concentración de la muestra (mol/litro)

Cuando un haz de radiación monocromática que se transmite en planos paralelos, penetra a un medio absorbente a ángulos rectos con superficies planas y paralelas del medio, la disminución de su poder de radiación con respecto al trayecto lumínico (espesor de la celda) b (cm), o con la concentración del material absorbente c (en moles por litro) sigue una progresión exponencial.(18,37)

Solo se observa un estricto cumplimiento de la ley de Beer por un sistema cuando la radiación empleada es monocromática.

Cuando las condiciones no son iguales se presentan desviaciones a la ley de Beer; estas desviaciones pueden ser de orden químico o instrumental.

La radiación electromagnética puede considerarse como constituida por ondas de energía. En cada una de estas ondas, la distancia entre dos crestas (o valles) consecutivas es la longitud de onda. La radiación sólo se absorbe o emite en unidades definidas llamadas fotones. La energía de los fotones es proporcional a la frecuencia de la radiación.

La intensidad de un haz de radiación está caracterizada por su poder de radiación, que es proporcional al número de fotones por segundo que se propagan en el haz. Un haz que transporte radiación de una sola longitud de onda es monocromático; un haz policromático contiene radiación de diversas longitudes de onda.

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

Básicamente todos los espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática de una banda de radiación que contiene la radiación de máxima absorción (λ_{max}).

Los elementos básicos de un espectrofotómetro se ilustran en la figura 1.

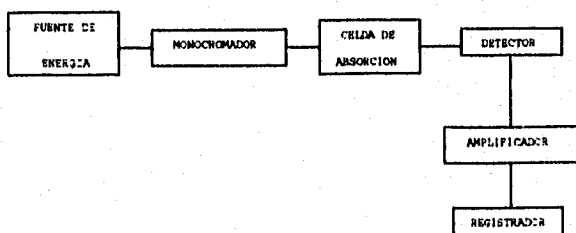


FIGURA 1. ELEMENTOS BASICOS DE UN ESPECTROFOTOMETRO

Un espectrofotómetro está compuesto básicamente por:

1. Fuente de energía radiante
2. Monocromador
3. Sistema de detección y medición

1. FUENTE DE ENERGIA RADIANTE

Debe proporcionar radiación continua, es decir, su espectro debe contener todas las longitudes de onda de la región en que se van a usar. Las más comunes son, para radiación ultravioleta, las lámparas de descarga de deuterio y de hidrógeno, mientras que para la región visible es la lámpara de tungsteno.

2. MONOCROMADOR

Un monocromador es un dispositivo para producir un haz de radiación de gran pureza espectral, cuya longitud de onda puede variarse a voluntad. Tienen como función aislar longitudes de onda específica de luz emitida por la fuente luminosa.(23.37)

3. SISTEMA DE DETECCION

Transforma la radiación en señal eléctrica; las más usadas son las celdas fotovoltaicas, fototubos y tubos fotomultiplicadores.

4. CELDAS

Recipiente transparente para contener la muestra; las más usadas son las cuadradas de 10 mm de cuarzo para la región UV-Visible y de vidrio para la región visible.

1.1.1. PRINCIPIO OPTICO DEL ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE BECKMAN DU 640

El espectrofotómetro Beckman DU 640, es un espectrofotómetro de un solo haz. La luz que se emite de ambas fuentes, entra al monocromador, donde es dispersada por una rejilla cóncava holográfica. La luz monocromática sale del monocromador e ilumina la muestra; la luz que pasa a través de la muestra se mide por un detector de fotones.

El punto focal del haz, está colocado del lado derecho del compartimento de la muestra; esta localización permite que la máxima cantidad de luz transmitida sea capturada por el detector y se disemine en la muestra. (29)

El diagrama óptico del espectrofotómetro Beckman DU 640 se muestra en la figura 2.

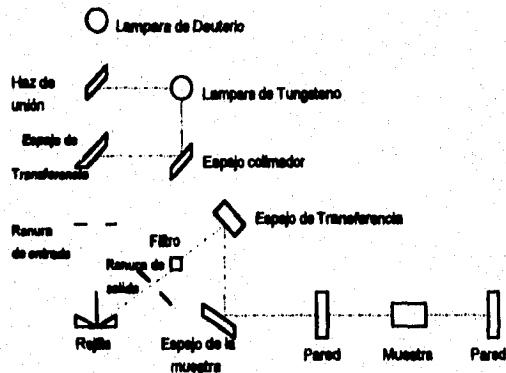


FIGURA 2. DIAGRAMA OPTICO DEL ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU 640

1.2. CALIBRACION Y CERTIFICACION

1.2.1. CONSIDERACIONES TEORICAS

Considerando el gran número de espectrofotómetros que se ofrecen hoy en día en el mercado, algunas veces no es fácil seleccionar el mejor instrumento para un área de aplicación específica; por lo que es necesario que de ser posible el espectrofotómetro cubra todas las necesidades y obtenga resultados exactos y precisos en un análisis rutinario. Además sería muy práctico que todo instrumento pudiese incluir el cálculo automático de curvas de calibración, compensación de fondo para un espectro, manipulación de espectros y datos espectrales. Por tal motivo en 1963 el comité American Society of Testing and Materials (ASTM), desarrollaron una serie de recomendaciones para ser probadas en cada espectrofotómetro, las cuales fueron adoptadas y han resultado ser uno de los estándares más importantes en la industria.

Con ello se logró establecer que el criterio más importante en fotometría es que los datos sean exactos y reproducibles, por ello el equipo debe ser verificado, certificado y calibrado. También se deben establecer las condiciones de operación adecuadas para establecer el buen funcionamiento del equipo.(1,6,13,40)

DEFINICIONES

A. CALIFICACION. Evaluación de las cualidades y características de los componentes en un proceso y que sean capaces de operar consistentemente en los límites establecidos.(13,25)

B.CALIBRACION. Determinación de la magnitud de los errores que comete el instrumento al realizar la medición, considerando las parámetros y pruebas que influyen en los resultados.(8)

C. CERTIFICACION. Es el método científico que empleando términos de ingeniería permite demostrar que un equipo cumple satisfactoriamente los requerimientos mínimos establecidos por el fabricante con el objeto de garantizar la reproducibilidad y efectividad de la operación del equipo o instalación física de referencia.(25)

D. VERIFICACION. Demostración del cumplimiento de los requisitos especificados, por medio del examen y aporte de evidencias objetivas.(25)

1.2.2. CALIFICACION

Los estudios de calificación establecen la confianza de que el equipo es capaz de operar consistentemente dentro de los límites y tolerancias establecidos. Después de que el equipo se diseña o selecciona, éste deberá probarse para verificar que es capaz de operar satisfactoriamente dentro de los límites de operación requeridos. Esta fase incluye el examen de diseño del equipo; determinación de la calibración, el mantenimiento y los requisitos de ajuste e identificación de las partes críticas del equipo que podrían afectar la determinación.

La calificación del equipo requiere de:

- * Desarrollo de Procedimientos Normalizados de Operación
- * Desarrollo de Programa de Mantenimiento Preventivo y Correctivo
- * Entrenamiento del personal para supervisión y manejo del equipo.(10,19)

Cuando el equipo cuenta con un sistema computarizado es necesario incluir en la fase de calificación, la validación del software.

1.2.3. SISTEMAS COMPUTARIZADOS

1.2.3.1. OPERACION DE UN COMPUTADOR

Para poder hablar de validación de sistemas computarizados además de saber como están compuestos es preciso tener una idea de cómo trabaja un computador, así será más sencillo comprender lo que se está validando. (12,34)

La operación de un computador se describe por los siguientes pasos:

- a. Acepta información a través de la unidad de entrada y la transfiere a la memoria.
- b. La información almacenada en la memoria es traída a la unidad aritmética y lógica para ser procesada.
- c. La información procesada deja el computador a través de la unidad de salida.
- d. Todas las actividades dentro de la máquina están bajo control de la unidad. (34)

1.2.3.2. HARDWARE

Es el aparato físico que forma una computadora. Este término se utiliza para describir las piezas del equipo en el sistema computarizado, incluyendo la Unidad de Procesamiento Central (UCP), impresora, modem etc. (34)

1.2.3.3. SOFTWARE

El software es el conjunto de programas usados en el computador para ayudar al usuario en el uso efectivo de los recursos de cómputo.

Aquí se puede citar el sistema operativo, los programas de utilería, los compiladores, el ensamblador, los programas de biblioteca, etc.

El software debe validarse tanto estructural como funcionalmente, pero sólo el tipo de aplicación debe validarse por el usuario final en ambas modalidades.

El usuario sólo validará la funcionalidad, debido a que la validación estructural se lleva a cabo por el fabricante.(20,38)

1.2.4.VALIDACION DEL SOFTWARE

La validación es un proceso mediante el cual se demuestra que un sistema computarizado, o cualquiera de sus partes, hace consistentemente lo que se supone que debe hacer y solamente eso; esta definición implica la consistencia, confiabilidad y reproducibilidad del sistema.(21)

El programa de validación del software puede dividirse en cuatro fases secuenciales

1. **Precalificación**
2. **Calificación**
3. **Validación**
4. **Evaluación**

1.2.4.1. PRECALIFICACION

Durante esta fase se desarrollan los detalles de las especificaciones para el software y se prepara toda la documentación requerida.

1.2.4.2. CALIFICACION

En esta etapa se prepara el software por equipo calificado de acuerdo a las especificaciones, el software deberá haber sido creado para la función que desempeñará, además deberá tener un mecanismo de comunicación como diagramas de flujo lógicos o gráficas de jerarquías o códigos que permitan la fácil comprensión del funcionamiento y operación del software.

2.4.3. VALIDACION

La validación del software es un proceso comparativo en el que una de las cosas más importantes es la documentación o la descripción funcional, esta descripción funcional es el

documento básico que detalla las funciones del sistema que el usuario final desea obtener del software; además define todos los parámetros y características bajo las cuales debe operar el sistema obteniendo los datos de salida necesarios para que el usuario tenga un proceso completo.(21)

La revisión debe hacerse a fin de encontrar errores; y se realiza dentro y fuera de los límites del software para considerar todos los errores posibles ya que la mayoría de estos ocurren alrededor de los límites de operación; así mismo deberán verificarse las respuestas del sistema a datos desconocidos o no lógicos.

Después de esta revisión el sistema es instalado y por tanto deberá verificarse nuevamente para observar la interacción hardware-software, y además se deben correr muestras para demostrar el buen funcionamiento y la repetibilidad del sistema.

El propósito principal del proceso de validación es llevar a cabo la evaluación y documentación de resultados para asegurar que el sistema opera de acuerdo con su descripción funcional.(1,9)

A. Documentación

Tanto la validación como las revalidaciones subsecuentes que se realicen a un sistema debería tenerse en cuenta a lo largo de la vida del sistema, para esto se requiere documentar todo lo referente a este sistema, ya que los documentos son la única evidencia de que el sistema esta bajo control, junto con la documentación de la validación deberá tenerse un manual del software que corresponda a la versión que se esté manejando; este manual debe tener todas las instrucciones necesarias para que el programa funcione eficazmente.

Estas instrucciones deben incluir datos de entrada, salida, opciones, así como la explicación de mensajes de error y la solución y corrección de los mismos.

También debe contar con una serie de métodos documentados referidos a lo que debe hacerse en caso de que el sistema falle y el operador pueda determinar en que etapa ocurrió la falla y que debe hacerse para corregirla.(20,28)

B. Especificación funcional

La especificación funcional es un documento que debe cumplir con las siguientes características:

- a. *Concreta.* Debe poseer lenguaje claro y conciso sin utilizar terminología técnica.
- b. *Capacidad de verificarse.* Esto es que todos los puntos de la especificación puedan verificarse de forma real.
- c. *Consistencia.* Los requerimientos, límites y lenguaje deberán ser consistentes, esto es que todos los datos concuerden a lo largo del documento.
- d. *Modificabilidad.* La mayoría de las especificaciones tarde o temprano sufren modificaciones, por lo que deberá hacer posible el seguimiento de los cambios que puedan hacerse a través de su evolución.
Los cambios en el software deben hacerse solamente por gente calificada siguiendo los estándares adecuados que deberán establecerse por cada proveedor basado en las necesidades básicas del usuario final.(16)

C. Protocolo de validación

Para la validación se requiere de un protocolo que es un conjunto de procedimientos que indican lo que debe hacerse para validar el sistema, entre algunos procedimientos más comunes se encuentran:

- a. *Prueba de aceptación.* En esta prueba se evalúan todas las funciones de operación del equipo y se revisa que todos los aspectos y patrones lógicos especificados en el

diseño sean correctos, para esto pueden utilizarse simuladores que den respuestas conocidas y se verifica la respuesta del sistema.

- b. *Criterio de reproducibilidad.* Este paso se lleva a cabo por dos propósitos principales, el primero es revalidar la instalación del sistema. El hardware y el Software se evalúan corriendo un placebo (alguna substancia de referencia cuya respuesta sea conocida), y el segundo es correr periódicamente un placebo para verificar que el sistema funciona adecuadamente y que no se le han hecho correcciones no autorizadas.
- c. *Evaluación del proceso.* Debe realizarse antes de inicializar el sistema, para poder hablar de calidad en el producto sin tener errores del sistema.
- d. *Control de verificación/corrección.* Para las pruebas de aceptación, reproducibilidad y evaluación de proceso debe crearse un procedimiento de corrección en el que se documente cualquier error y su fuente para asegurar que es un error verdadero y no una mala apreciación por parte del operador y para poder realizar la operación.

Para todos los procedimientos anteriores el protocolo debe contener los siguientes elementos:

- a. Número de veces que debe correrse el programa para demostrar la reproducibilidad del sistema en cada función con los resultados esperados.
- b. Criterio de aceptación para cada función.
- c. Definición de los límites de operación dentro de los que se espera el sistema opere y a los cuales se valida.
- d. Descripción y Documentación de cómo los cambios al sistema y/o módulos que ocurren durante los estudios de validación serán evaluados, incluyendo la evaluación del efecto de cada cambio.

- e. Descripción de las medidas que se utilizarán para aprobar anexos y/o cambios al protocolo si se requieren.
- f. Listado de los reportes que deben escribirse como parte de la validación.
- g. Identificación de las personas responsables de escribir y aprobar el protocolo de validación.

Al efectuar la validación cada paso se lleva a cabo de acuerdo a métodos predeterminados; los datos obtenidos se analizan y los resultados se evalúan, documentan y archivan; el informe es revisado por las autoridades apropiadas y se procede a aceptar o rechazar.

Como ya se mencionó la validación del software del espectrofotómetro solamente es funcional por lo tanto se explicará únicamente la evaluación funcional.(16,21,28)

D. Evaluación Funcional

Es la evaluación que se lleva a cabo sin tomar en cuenta el código lógico y se deriva de la especificación de diseño o funcional; es decir, es conducida por los datos omitiendo la estructura del programa, esto es, observando si la lectura o respuesta a una entrada conocida es la esperada sin investigar como hizo la computadora para dar la respuesta. En general toda evaluación funcional debe consistir en una descripción de los datos introducidos al sistema y una descripción precisa de la respuesta correcta esperada del sistema para esos datos en particular.

La evaluación funcional consiste básicamente en dos tipos de evaluación. La primera (casos naturales) determina la operación normal adecuada y la segunda (casos anormales) demuestra que los mensajes de alerta y error aparezcan adecuadamente. Así mismo debe tenerse en cuenta el propósito de la evaluación funcional, es decir, si se realiza para encontrar todos los errores en el sistema, probando todos los datos posibles que puedan ser

introducidos al sistema; o si su propósito es demostrar que el sistema opera de acuerdo a la especificación funcional, haciendo la evaluación mucho más sencilla.

1.2.4.4. EVALUACION CONTINUA

Es el conjunto de evaluaciones o pruebas que se llevan a cabo durante toda la vida útil del sistema, como es la revisión periódica.

a. Revisión periódica. Se recomienda la revisión del sistema ya validado para descubrir si existe alguna tendencia hacia respuestas diferentes o erradas; si hay algún cambio deberá evaluarse el sistema nuevamente y tomar las medidas correctivas apropiadas a esos cambios en el funcionamiento del sistema. Los resultados de estas revisiones periódicas deberán documentarse y aprobarse por el personal autorizado.(38)

2.5. DEFINICION DE LOS PARAMETROS ESPECTROFOTOMETRICOS

A. EXACTITUD DE LA LONGITUD DE ONDA. Indica que tanto se desvía el promedio de las lecturas que se hacen a una longitud de onda de la banda de máxima absorción o la línea de emisión de un estándar conocido.(3-6)

B. PRECISION DE LA LONGITUD DE ONDA. Es la habilidad del espectrofotómetro de reproducir la lectura de una banda de absorción o emisión de una longitud de onda conocida cuando el instrumento es estabilizado nuevamente.(2-4,13)

C. EXACTITUD FOTOMETRICA. Es la habilidad de un espectrofotómetro para indicar correctamente el nivel de energía presentado por el detector.(2)

D. PRECISION FOTOMETRICA Representa la capacidad del sistema fotométrico para reproducir el mismo valor en determinaciones sucesivas. Todas las mediciones deben realizarse continuamente con el mismo instrumento y el mismo material.(2-4,13)

E. LINEARIDAD FOTOMETRICA. Permite comprobar el funcionamiento del equipo por medio de una solución conocida que conforme a la ley de Beer dará una línea recta que parta del origen al graficar absorción contra concentración.(2-4,13)

F. DESVIACION DE LA LUZ O LUZ ESPURIA. Es la dificultad para definir y medir. También se define como la porción de energía transmitida fuera del paso terminal de la banda del monocromador, para la energía total transmitida.(2,17,19,40)

G. NIVEL DE RUIDO. Se conoce como la variación que sufren las lecturas fotométricas por causa de interferencia por ruido puede variar al cruzar el espectro y se detecta a niveles bajos de energía.(4,29)

H. ESTABILIDAD DE LINEA BASE. Es la desviación que sufre la lectura después de ser ajustada en el espectrofotómetro, dentro de un periodo de tiempo especificado. La estabilidad de la base lineal afecta al usuario cuando el 100 % T y el cero de absorción continúa desviándose durante una serie de lecturas, afectando el valor de la lectura de cada muestra causando inconvenientes por tener que reajustar constantemente el 100 % T/O de absorción.(4,29)

I. ENERGIA APROVECHABLE. Es la cantidad de luz monocromática alcanzada por el detector a través de la muestra de referencia a una longitud de onda específica.(4,13,29)

2.6. CALIBRACION

La calibración de un espectrofotómetro consiste en determinar la magnitud de los errores que comete el instrumento al realizar mediciones. Habitualmente se calibran las escalas de longitud de onda y fotométrica del instrumento, sin embargo una caracterización completa incluye la caracterización de la luz extraviada, ruido fotométrico, linealidad y estabilidad.

De la verificación se desprende la incertidumbre del instrumento, de ésta y de la tolerancia se decide si el instrumento se encuentra fuera de especificaciones o requiere ser reparado. Diversos factores como la humedad o simplemente el paso del tiempo puede ocasionar variaciones en la escala de longitud de onda, por ello se recomienda calibrar el instrumento como mínimo dos veces al año.(8)

2.6.1. CARACTERIZACION DE LA ESCALA DE LONGITUD DE ONDA

Muchos métodos espectrofotométricos emplean compuestos puros o mezclas conocidas con el propósito de calibrar sus instrumentos fotométricos a longitudes de onda específicas. La longitud de onda es obtenida por la lectura del monocromador registrada en una gráfica espectral.(5,7)

Para la verificación de la escala de longitud de onda se emplean patrones de referencia apropiados que presentan bandas de absorción estrechas en el intervalo de calibración, como son los filtros de óxido de Holmio, óxido de Didimio (Figuras 3 y 4) y patrones físicos absolutos (lámparas de descarga de gases nobles).(8)

Existe otro método para caracterizar la longitud de onda, este consiste en una solución de óxido de Holmio al 4 % en ácido perclórico 1.4 M (40 g/l).

También se han empleado soluciones de sulfato de cobre , sulfato de amonio, y perclorato crómico; tratando de cubrir la región visible. Estas soluciones no han sido del todo satisfactorias y otros estándares líquidos están bajo desarrollo y evaluación.(4,5,6,24)

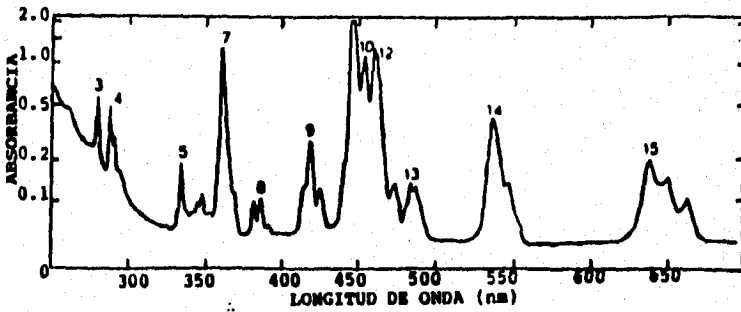


FIGURA 3. ESPECTRO DE LA CELDA DE OXIDO DE HOLMIO (4)

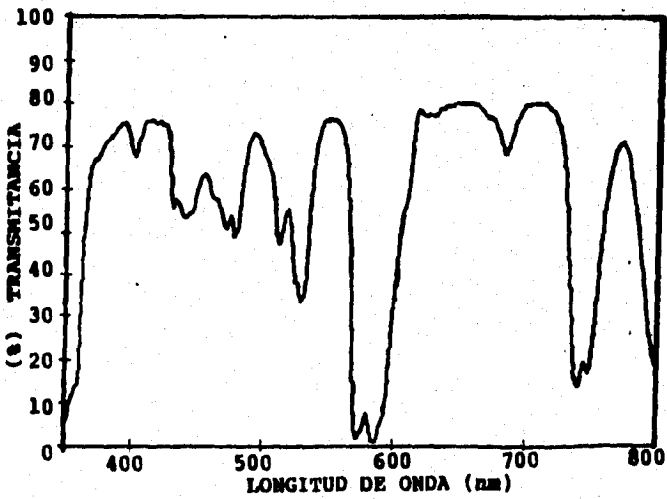


FIGURA 4. ESPECTRO DEL FILTRO DE DIDIMIO (7)

2.6.2. EXACTITUD FOTOMETRICA

La exactitud fotométrica en la región visible puede determinarse usando material estándar de referencia National Bureau Standards (NBS) 930. Este estándar consiste en un grupo de 3 filtros de vidrio certificados individualmente con valores cerca del 10, 20 y 30 % de transmitancia. También se emplea el material de referencia 1930, que es complementario del 930 a diferencia de que provee niveles de absorbancia y transmitancia que no cubre el 930. Consiste en tres filtros certificados de transmitancia de 1, 3 y 50 %.(8)

En la región ultravioleta se determina usando soluciones de Dicromato de potasio en ácido perclórico a diferentes concentraciones, leídas a 235, 257, 313, 345 y 350 nm.(4-6,33)

2.6.3. PRECISION FOTOMETRICA

La precisión fotométrica es medida, montando una placa metálica o un filtro de vidrio en el espectrofotómetro y obteniendo 10 lecturas sucesivas de absorbancia o transmitancia aparente. También se determina, tomando la lectura de las soluciones preparadas para la linealidad fotométrica; preferentemente las de las concentraciones de 60 y 100 mcg/ml de Dicromato de Potasio en ácido Sulfúrico 0.01 N.(4,6)

2.6.4. LINEARIDAD FOTOMETRICA

Una función propia de un espectrofotómetro es que debe proporcionar una relación lineal entre la energía radiante absorbida y la lectura del instrumento. La linealidad instrumental es un prerequisite para la exactitud analítica. Varios métodos se han propuesto para certificar que la respuesta del detector de un espectrofotómetro es lineal sobre el rango de longitudes de onda usado. La linealidad fotométrica verifica la funcionalidad del instrumento al confirmar que una respuesta conocida cumple con la ley de Lambert-Beer. Al graficar absorbancia contra concentración se obtiene una línea recta que parte de cero.

El significado de este parámetro es relevante ya que determina la respuesta del detector o la presencia de luz parásita.(3,13)

2.6.5. DESVIACION DE LA LUZ

Un criterio importante es la ausencia de luz espuria. La luz espuria es la porción de luz que llega al detector y que es indeseable. Una alta cantidad de luz espuria puede guiar a severas limitaciones en la linealidad. En estos casos, donde la luz espuria está presente y no es absorbida por la muestra, las lecturas de absorbancia podrían ser muy bajas. El filtro ideal para medir la luz espuria debe tener una absorción intensa sobre una región espectral.

El sistema óptico del espectrofotómetro debe estar completamente libre de la influencia de luz espuria, la fuente al lado del monocromador puede reducir la luz espuria, por tal razón; la fuente al lado del monocromador es pequeña en comparación con la imagen trazada.(36,40)

La luz espuria es afectada por el fotodetector y puede medirse usando las soluciones que se muestran en la tabla I.

Los materiales usados deben ser grado reactivo. Ellos son opacos a las longitudes de onda indicadas. Sin embargo, estas soluciones absorben más luz espuria 40 nm dentro de las longitudes de onda indicadas. El nivel aceptable de luz espuria va a depender del carácter espectral y el nivel de absorbancia para la muestra investigada.(6,13,19)

SOLUCION	CONCENTRACION	LONGITUD DE ONDA
Yoduro de potasio	0.10 %	220 nm
Yoduro de sodio	1.00 %	220 nm
Cloruro de Potasio	1.20 %	200 nm
Dicromato de potasio	0.25 g/l	370 nm

TABLA I. SOLUCIONES USADAS PARA EVALUAR LA DESVIACION DE LA LUZ(4,5,6)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el trabajo cotidiano del Laboratorio Nacional de Salud Pública, se realizan mediciones por espectroscopia UV/Visible que son ampliamente usadas para determinar propiedades espectrales de innumerables moléculas, así como la determinación de pureza y concentración en una gran variedad de productos farmacéuticos, con el fin de proporcionar servicios de apoyo y asistencia técnica a dependencias de la Secretaría de Salud en materia de control analítico, investigación y diagnóstico de riesgos a la salud atribuibles al uso y consumo de medicamentos y cosméticos; por lo que la necesidad de obtener resultados exactos y precisos considera imprescindible contar con instrumentos perfectamente calibrados y certificados.

Dentro de la literatura existen normas internacionales como las emitidas por American Society of Testing and Materials (ASTM) y nacionales como las de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI), en cada una de ellas se establecen los parámetros que deben evaluarse y en algunos casos la forma de realizarlos; pero estas metodologías deben adaptarse a las condiciones de los equipos, por tal razón es necesario desarrollar técnicas para evaluarlos.

Dicho desarrollo abarca desde la elección de las sustancias a trabajar hasta la forma de realizar los cálculos adecuados y la forma de reportarlos, abarcando así mismo la metodología.

Además con la introducción de equipo automatizado ha surgido la necesidad de no sólo verificar la funcionalidad fotométrica, si no también validar el software que incluye el equipo; ya que sin éste sería completamente inútil.

Por esta razón se determinará la exactitud y precisión de la longitud de onda; exactitud, precisión y linealidad fotométrica, considerando las limitaciones y requisitos para generar un programa de manejo, uso, calibración y mantenimiento para el equipo; logrando mantenerlo en óptimas condiciones o bien detectar posibles fallas en el mismo.

Al mismo tiempo será necesario validar el software que se encuentra instalado en el equipo con la finalidad de certificar si cumple con las funciones para las que fue diseñado y por las cuales se adquirió.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de prueba para la instalación, calificación, calibración, manejo y mantenimiento del espectrofotómetro UV-Visible Beckman DU 640, determinando y documentando cada una de las variables que influyen en el funcionamiento del mismo, con el fin de establecer una metodología de uso.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar el Procedimiento Normalizado de Operación (P.N.O) para el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Beckman DU 640 siguiendo las prácticas adecuadas de laboratorio.
- Elaborar un programa de mantenimiento preventivo y correctivo.
- Diseñar un programa de calibración para el equipo.
- Verificar las condiciones necesarias para llevar a cabo la calibración con los materiales y reactivos a utilizar durante el proceso.
- Validar el software utilizado en el espectrofotómetro Beckman DU 640, realizando realizando una evaluación funcional con dicromato de potasio.

4. HIPOTESIS

Al establecer las condiciones para la validación del software y al evaluar los parámetros de: exactitud de la longitud de onda, exactitud fotométrica, precisión fotométrica y linealidad fotométrica, de acuerdo con las normas establecidas por ASTM y SECOFI, será posible generar procedimientos para que el espectrofotómetro Beckman DU 640 , localizado en el Laboratorio Nacional de Salud Pública sea verificado, calibrado y se encuentre en óptimas condiciones de uso.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. MATERIAL

- a. Celdas de cuarzo para espectrofotómetro Beckman.
- b. Celda de Oxido de Holmio. Marca PERKIN ELMER, serie: 1119, modelo B050-7805.
- c. Filtro de Didimio.
- d. Matraces volumétricos de 25, 50, 100, 500 y 1000 ml, marca PYREX.
- e. Pipetas volumétricas de 1, 4, 5, 6 y 7 ml; marca PYREX.
- f. Bureta de 50 ml.
- g. Probeta de 50 ml.
- h. Pesafiltros.
- i. Desecador
- j. Libreta u hojas de registro.
- k. Papel seda
- l. Bitácora de uso.

5.2. REACTIVOS

- a. Dicromato de Potasio (estándar primario). Mallinckrodt, lote CAS7778-5078.
- b. Yoduro de Potasio (G.R). Merck, lote 1082.
- c. Yoduro de Sodio (G.R). JT. Baker, lote M-31434.
- d. Cloruro de Potasio (G.R). Merck, lote 111712.
- e. Etanol absoluto, Merck.

5.3. SOLUCIONES

- a. Hidróxido de Potasio 0.05 N.
- b. Acido Sulfúrico 0.01 N.
- c. Extran MA 01 Alcalino, Merck, lote: 3062TO7555.
- d. Acido Perclórico 0.01 N.

5.4. EQUIPO

- a. Espectrofotómetro Beckman DU 640.
- b. Balanza analítica Mettler, modelo H31AR.
- c. Estufa a 105 °C, marca THELCO, modelo 16.

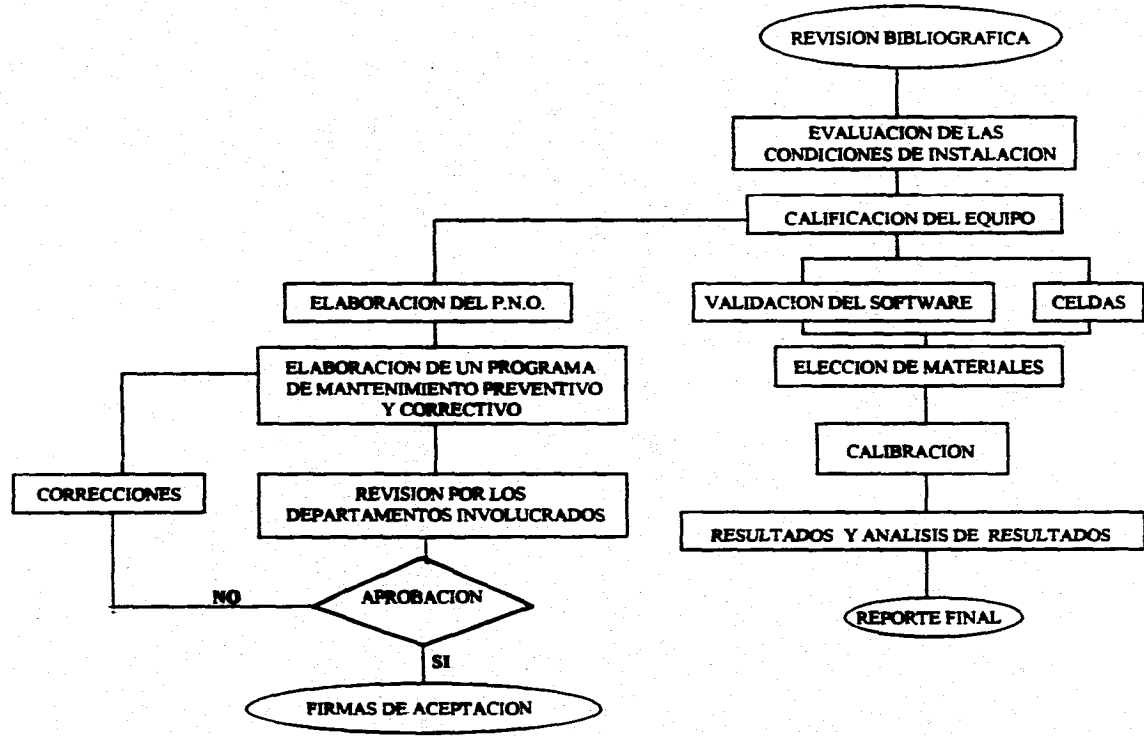


FIGURA 5. DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS ACTIVIDADES

5.5. METODOLOGIA

5.5.1. EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INSTALACION

Es necesario verificar que las condiciones de instalación sean adecuadas, para ello evaluar:

a. Temperatura ambiente.

Determinar la temperatura ambiente usando un termómetro y registrando datos de temperatura cada 30 minutos durante una jornada de trabajo de 8 horas.

b. Humedad ambiental

Determinar la Humedad ambiental con silica gel

c. Línea de voltaje para el espectrofotómetro.

Verificar que la línea de voltaje para el espectrofotómetro sea la correspondiente (100.120 V).

d. Entradas para el monitor y mouse.

El cable del monitor debe estar conectado en la entrada que corresponde a DISPLAY, y el cable del mouse en la entrada que corresponde al MOUSE, localizadas en la parte posterior del equipo.(29)

5.5.2. CALIFICACION DEL EQUIPO

5.5.2.1. CALIFICACION FISICA

Verificar las siguientes características:

- * **Físicas:** Alto, ancho y espesor del espectrofotómetro.
- * **Modelo:** el que corresponda al manual del operario.
- * **Componentes:** Monitor, Mouse e Impresora.(29)

5.5.2.2. CALIFICACION OPERACIONAL

Verificar cada una de las siguientes especificaciones de funcionamiento:

- a. **Velocidad de Barrido.** Marca la velocidad en la que se graficará y se leerá una muestra, se proporciona en nanómetros por minuto.
- b. **Tiempo de respuesta.** Elegir diferentes tiempos y con un cronómetro verificar que es el predeterminado.
- c. **Rango de longitud de onda.**
- d. **Relación señal-ruído.** Se determina promediando 10 desviaciones estándar de 10 lecturas a una longitud de onda de 500 nm y con un tiempo de respuesta de 0.05 segundos.
- e. **Estabilidad.** Se determina realizando lecturas por una hora a 340 nm.
- f. **Corrección de Línea Base.** Programar el equipo para realizar un barrido de 200 a 900 nm.(29)

5.5.2.3. ELABORACION DEL PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION (P.N.O)

En la elaboración del P.N.O., deben ser incluidos los siguientes puntos:

- a. Objetivo
- b. Alcance
- c. Documentos Aplicables
- d. Definiciones
- e. Responsabilidades
- f. Descripción de la actividad
- g. Anexos

Cada uno de ellos debe expresarse de la siguiente manera:

a. Objetivo

Expresar en forma clara y concisa la finalidad del procedimiento que se pretende elaborar.

b. Alcance

Describir claramente el campo de aplicación del procedimiento.

c. Documentos Aplicables

Señalar las referencias y los títulos de los documentos que fueron utilizados para la elaboración del procedimiento.

d. Definiciones

Indicar el significado de los principales términos de importancia utilizados en el procedimiento, para evitar confusiones en su interpretación.

e. Responsabilidades

Delimitar en forma clara y concisa las responsabilidades de cada uno de los puestos involucrados. Las referencias deben ser hacia los puestos y nunca en forma personal.

f. Descripción de la actividad

Se establece en forma clara, sencilla y secuencial todos los pasos a seguir en la realización de la actividad que está siendo regulada por el procedimiento; pueden emplearse diagramas de flujo para complementar su descripción, empleando un lenguaje comprensible para el personal en general y en particular a quienes lo aplican directamente. Debe evitarse el uso de anglicismos obtenidos al realizar la traducción de los manuales originales. Emplear números para dividir cada tema o subtema contenido en el procedimiento de la forma siguiente:

X. Tema general

X.X. Subtema de un tema general

X.X.X. Para establecer inicios del subtema.

g. Anexos

En los anexos se incluyen las copias de todos los formatos que se empleen en el procedimiento.

Nota: Todas las hojas que incluyen el Procedimiento Normalizado de operación (P.N.O), se sellan con la leyenda "original".(27)

5.5.2.4. ELABORACION DEL PROGRAMA DE MANTENIMIENTO PREVENTIVO Y CORRECTIVO (P.M.P.C)

El programa se sujetará a las sugerencias realizadas por el fabricante y a las políticas de la empresa. Debe contener:

- a. Descripción detallada de los pasos a seguir, así como de los utensilios y materiales necesarios.
- b. Instructivo de reparaciones de urgencia que pueden ser efectuadas por personal no especializado.
- c. Frecuencia con la que debe ser efectuada.
- d. Lista de partes de mayor desgaste.

Además de todo lo anterior, deberá existir una bitácora de mantenimiento, en la cual se debe especificar:

- * Fecha
- * Registro completo del mantenimiento efectuado ya sea correctivo o preventivo.
- * Nombre de la Persona o compañía que efectuó el mantenimiento.
- * Nombre de la persona que autorizó el mantenimiento.
- * Observaciones.(2,25,26)

5.5.3. VALIDACION DEL SOFTWARE

5.5.3.1. CALIFICACION DEL SOFTWARE

Verificar los métodos que se encuentran establecidos en el software, así como los parámetros que pueden ser modificados por el operador.(9,12)

5.5.3.2. SENSIBILIDAD

- a. Preparar soluciones de Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico 0.01 N a las concentraciones de 30, 40 y 50 mcg/ml, tres días diferentes.
- b. Leer a una longitud de onda de 257 nm, usando ácido sulfúrico 0.01 N como blanco.
- c. Comparar los resultados con los reportados en la bibliografía.(16,20)

5.5.3.3. REPETIBILIDAD

- a. Preparar una solución de 60 mcg/ml de Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico 0.01 N, tres días diferentes.
- b. Tomar 6 alícuotas y leerlas por separado a una longitud de onda de 257 nm.
- c. Evaluar los resultados para determinar que la respuesta sea repetible y no se observe variación.

5.5.3.4. RESPUESTA ADECUADA

- a. Preparar soluciones de Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico 0.01 N a las concentraciones de 50, 60 y 70 mcg/ml.
- b. Realizar los barridos de longitud de onda para las soluciones de Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico 0.01 N, en un rango de 200 a 300 nm.(16,20)

5.5.4. CELDAS

5.5.4.1. LIMPIEZA DE RUTINA

- a. Lavar las celdas con Extran alcalino al 10 %.
- b. Enjuagar con agua destilada.
- c. Secar la parte interna de las celdas con etanol absoluto.
- d. Secar las caras externas con papel seda.(4,6)

5.5.4.2. LIMPIEZA BIMESTRAL

- a. Sumergir la celda en ácido nítrico concentrado.
- b. Calentar por 15 minutos
- c. Lavar repetidamente con agua destilada.
- d. Secar con etanol absoluto.(14)

5.5.4.3. PRUEBA DE LIMPIEZA

- a. Llenar la celda con agua destilada.
- b. Leer a una longitud de onda de 240 nm, usando aire como blanco.
Nota: La absorbancia aparente no debe ser mayor de 0.093.
- c. Rotar la celda 180° y medir la absorbancia. La diferencia entre lecturas no debe ser mayor de 0.05.(4,6)
- d. Realizar 10 determinaciones.

5.5.5. ELECCION DE MATERIALES

1. Los reactivos: Dicromato de Potasio, Yoduro de Potasio, Yoduro de Sodio y Cloruro de Potasio se analizarán de acuerdo a las monografías especificadas en Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 6ª edición y Farmacopea U.S.P. XXII.(18,23,39)
2. Una vez aprobadas se podrán usar.

5.5.6. CALIBRACION

5.5.6.1. EXACTITUD Y PRECISION DE LA LONGITUD DE ONDA

- a. Obtener 10 veces el espectro completo de una celda de Oxido de Holmio.
- b. Evaluar en cada uno de ellos las señales de máxima absorción (Tabla II).
- c. Evaluar los resultados mediante desviación estándar y Coeficiente de Variación.(4,6)

NUMERO DE BANDA	LONGITUD DE ONDA nm
1.0	279.40
2.0	287.50
3.0	333.70
4.0	360.90
5.0	418.00
6.0	453.20
7.0	459.90
8.0	536.00
9.0	637.00
10.0	648.00

TABLA II. SEÑALES DE MAXIMA ABSORCION PARA LA CELDA DE OXIDO DE HOLMIO (4)

5.5.6.2. EXACTITUD Y PRECISION DE LA LONGITUD DE ONDA EN LA REGION VISIBLE

- Obtener 10 veces el espectro completo de un filtro de Didimio.
- Evaluar en cada uno de ellos las señales de máxima absorción (Tabla III).
- Evaluar los resultados mediante desviación estándar y coeficiente de variación.(4,6)

NUMERO DE BANDA	LONGITUD DE ONDA nm
1.0	572.0
2.0	585.0
3.0	685.0
4.0	741.0
5.0	807.0

TABLA III. SEÑALES DE MAXIMA ABSORCION PARA EL FILTRO DE DIDIMIO (4)

5.5.6.3. EXACTITUD FOTOMETRICA

- Preparar una solución estándar de Dicromato de Potasio (50 ± 0.3 mg/ 100 ml de ácido perclórico 0.01 M), y realizar las diluciones indicadas en la tabla IV, por triplicado, dos días diferentes.

MATRAE 50 ml	VOLUMEN SOL. K ₂ Cr ₂ O ₇	VOLUMEN DE H ₂ O: 60 ml	CONCENTRACION (mg/100)
A	4.0	46.0	40.0
B	5.0	45.0	50.0
C	6.0	44.0	60.0
D	7.0	43.0	70.0

TABLA IV. DILUCIONES PARA LA EVALUACION DE LA EXACTITUD FOTOMETRICA

- Dejar reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Leer a las longitudes de onda de 235, 257, 313, 345 y 350 nm.(4,6)

5.5.6.4. PRECISION FOTOMETRICA

- a. Preparar soluciones de Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico 0.01 N a las concentraciones de 60 y 100 mcg/ml.
- b. Leer a una longitud de onda de 257 nm.
- c. Realizar 10 lecturas para cada concentración dos días diferentes.
- d. Calcular la precisión fotométrica, usando desviación estándar y coeficiente de variación.(4,6)

5.5.6.5. LINEARIDAD FOTOMETRICA

- a. Preparar una solución stock de dicromato de potasio (50 ± 0.3 mg/250 ml de ácido sulfúrico 0.01 N)
- b. Realizar las diluciones mostradas en la tabla V por triplicados en dos días diferentes.

BIATRAZ ml	VOL. DE SOL. FUENTE	VOL. DE SOL. DE F.	CONCENTRACION (mcg/ml)
1.0	2.50	22.50	20.0
2.0	5.00	20.00	40.0
3.0	7.50	17.50	60.0
4.0	10.00	15.00	80.0
5.0	12.50	12.50	100.0
6.0	15.00	10.00	120.0
7.0	17.50	7.50	140.0
8.0	20.00	5.00	160.0
9.0	22.50	2.50	180.0
10.0	25.00	0.00	200.0

TABLA V. DILUCIONES PARA LA EVALUACION DE LA LINEARIDAD FOTOMETRICA

- c. Leer a una longitud de onda de 257 nm, usando ácido sulfúrico como blanco.
- d. Graficar absorbancia contra concentración y obtener una línea recta que parta de cero.

- e. Evaluar estadísticamente, obteniendo la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación (r^2). Realizar el análisis de varianza.

5.5.6.6. DESVIACION DE LA LUZ

5.5.6.6.1. REGION VISIBLE

- a. Preparar una solución de Dicromato de Potasio 25 mg/100 ml de Hidróxido de Potasio 0.05 N.
- b. Realizar 10 lecturas a una longitud de onda de 370 nm.
- c. La absorbancia debe ser mayor a 2.

5.5.6.6.2. REGION UV

A. Con Yoduro de Potasio

- a. Preparar una solución de Yoduro de Potasio al 0.10 %.
- b. Realizar 10 lecturas a una longitud de onda de 220 nm.
- c. La absorbancia debe ser mayor de 2.

B. Con Yoduro de Sodio

- a. Preparar una solución de Yoduro de Sodio al 1.0 %.
- b. Realizar 10 lecturas a una longitud de onda de 220 nm.
- c. La absorbancia debe ser mayor de 2.

C. Con Cloruro de Potasio

- a. Preparar una solución de Cloruro de potasio 1.20 %.
- b. Realizar 10 lecturas a una longitud de onda de 200 nm.
- c. La absorbancia debe ser mayor a 2.(5,36)

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INSTALACION

En la tabla VI, se muestran los resultados que se obtuvieron en la evaluación de las condiciones de instalación, en cada una de ellas se encontraron resultados favorables; de acuerdo a las especificaciones del proveedor, por lo que se puede decir que el equipo se encuentra en buenas condiciones de instalación.

ITEM	LÍMITE	RESULTADO
TEMPERATURA	15-40 °C	21-30 °C
HUMEDAD	MENOR DEL 85 %	67 %
LINEA DE VOLTAJE	100/120 ± 10 %	100/120 V
ENTRADA PARA EL MONITOR	El cable del monitor debe estar conectado en la entrada que corresponde a DISPLAY, en la parte posterior del equipo	CONFORME
ENTRADA PARA EL MOUSE	El cable del mouse debe estar conectado en la entrada que corresponde a MOUSE, en la parte posterior del equipo	CONFORME

TABLA VI. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE INSTALACION

6.2. CALIFICACION DEL EQUIPO

6.2.1. CALIFICACION FISICA

El espectrofotómetro UV-Visible Beckman DU modelo 640, mide 27 pulgadas de ancho, 23 pulgadas de alto y 21 pulgadas de espesor.

Cuenta con los siguientes componentes:

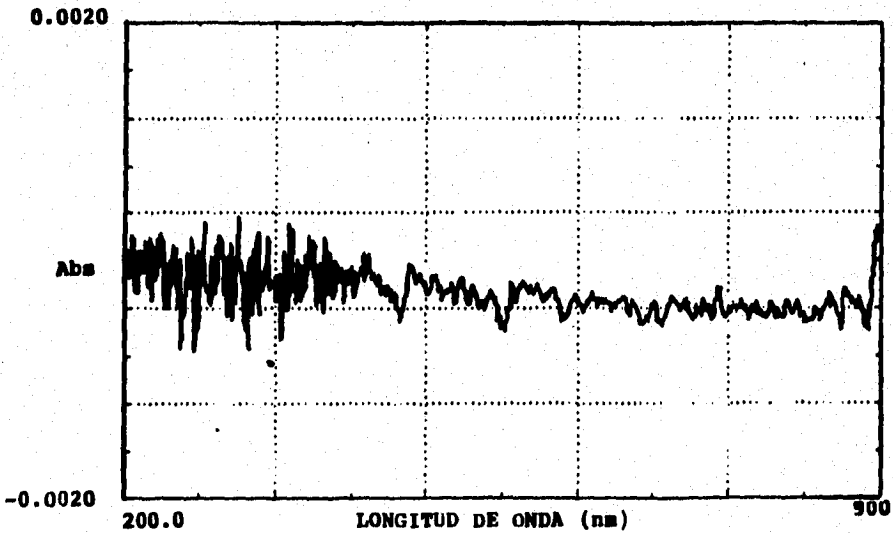
- a. Monitor: monocromático, sin marca y sin modelo.
- b. Mouse: sin marca y sin modelo, es usado como control operativo.
- c. Impresora: Marca EPSON, modelo T-1000.

6.2.2. CALIFICACION OPERACIONAL

En la tabla VII se muestran los resultados obtenidos en la calificación operacional del equipo

PRUEBA	LÍMITE	RESULTADO
VELOCIDAD DE BARRIDO	120,240,600,1200 y 2400 nm/min	CONFORME
TIEMPO DE RESPUESTA	0.05 Segundos	CONFORME
RANGO DE LONGITUD DE ONDA	190-1100 nm	CONFORME
RELACION SEÑAL-RUIDO	< 0.0001 A	0.000056 A
ESTABILIDAD	< 0.003 A	0.0001 A
CORRECCION DE LINEA BASE	± 0.003 A	0.000183 A

TABLA VII RESULTADOS OBTENIDOS EN LA CALIFICACION OPERACIONAL



Corrección de 200 a 900 nm: 0.000183

FIGURA 6. ESPECTRO OBTENIDO EN LA CORRECCION DE LINEA BASE

En la calificación operacional, se evaluó la velocidad de barrido, Tiempo de respuesta, rango de longitud de onda, relación señal-ruido, estabilidad a cero de absorbancia durante una hora y corrección de línea base (Figura 6); encontrando en cada una de ellas buenos resultados (tabla VII), al compararlos con las especificaciones realizadas por el fabricante.

Por lo tanto se puede decir que en las lecturas obtenidas por el espectro, no existe variación a causa de interferencia de ruido o desviación debida a un desajuste en el cero de absorbancia dentro de un periodo de tiempo especificado.

6.2.3. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION (PNO)

1. OBJETIVO

- 1.1. Describir con claridad las etapas requeridas, así como los ajustes necesarios para que el equipo funcione en condiciones óptimas.

2. ALCANCE

- 2.1. El procedimiento es aplicable al personal analista del departamento de Evaluación Sanitaria de Medicamentos y Cosméticos en el Laboratorio Nacional de Salud Pública.

3. DOCUMENTOS APLICABLES

Bibliografía 1-10, 30.

4. DEFINICIONES

- 4.1. **ABSORBANCIA.** Logaritmo base diez del inverso de la transmitancia ($A = \log_{10} (1/T)$). El término densidad de transmisión interna, puede emplearse como sinónimo de absorbancia.(3,10)
- 4.2. **CONCENTRACION.** Cantidad de sustancia contenida en una cantidad de muestra. Para una solución, se refiere a la cantidad de soluto contenido en un solvente, expresado en gramos por litro.(3,8)
- 4.3. **ESPECTROFOTOMETRO.** Proporciona la relación del poder de la radiación de dos haces electromagnéticos con respecto a la longitud de onda espectral.(3,13)
- 4.4. **EXTINCIÓN ESPECÍFICA (E 1%/1 cm).** Se aplica al cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresado en g/100 ml y el espesor atravesado (b), por la energía luminosa expresada en centímetros.(3,10)
- 4.5. **LONGITUD DE ONDA.** Distancia comprendida a través de la línea de propagación entre dos puntos que están en fase de ondas adyacentes.(3,10)
- 4.6. **TRANSMITANCIA.** Proceso físico que relaciona la energía radiante que atraviesa una muestra y la energía radiante que incide sobre ella.(3,30)

5. RESPONSABILIDADES

5.1. ANALISTA

- 5.1.1. Consultar el procedimiento Normalizado de Operación (P.N.O), antes de manejar, ajustar o calibrar el equipo.
- 5.1.2. Registrarse en la bitácora de uso cada vez que utiliza el equipo.
- 5.1.3. Comunicar de inmediato cualquier duda o falla al supervisor.
- 5.1.4. Cuando utiliza el equipo es responsable del mismo.
- 5.1.5. Apegarse al Procedimiento Normalizado de Operación.

5.2. JEFE DE LABORATORIO

- 5.2.1. Verificar que el equipo se maneja y calibra de acuerdo al Procedimiento Normalizado de Operación.
- 5.2.2. Revisar que la calibración y mantenimiento del equipo cumpla de acuerdo al cronograma establecido.
- 5.2.3. Verificar que los usuarios se registren en la bitácora de uso.
- 5.2.4. Comunicar cualquier duda o problema que se presente con relación al equipo.
- 5.2.5. En caso de que el equipo no cumpla con las especificaciones, colocar un letrero de "FUERA DE SERVICIO, y llamar al técnico.

6. DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD

6.1. CONDICIONES PREVIAS

- 6.1.1. Verificar que todos los cables del equipo, estén conectados sobre la línea de corriente eléctrica.
- 6.1.2. Para encender el regulador, subir la palanca del interruptor.
- 6.1.3. Antes de encender el espectrofotómetro revisar el compartimento de la celda, no debe encontrarse ningún objeto que pueda obstruir el paso de la luz.
- 6.1.4. Antes y después de usar las celdas, lavarlas con Extran alcalino al 10 %, enjuagar con agua destilada, secar la parte interna con etanol absoluto y las caras externas secarlas con un papel seda.
- 6.1.5. Verificar que la impresora tenga un buen suministro de papel y que el alto de la primera página este alineado correctamente.
- 6.1.6. Manejar las celdas con cuidado; se deben tomar con los dedos índice y pulgar del lado opaco; antes de introducirlas con la solución.

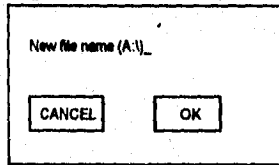
6.2. MANEJO

- 6.2.1. Encender la pantalla presionando el botón de encendido, localizado en la parte inferior derecha del monitor.
- 6.2.2. Encender el espectrofotómetro, presionando el botón de encendido, localizado en la parte posterior derecha del espectrofotómetro.
- 6.2.3. Encender la impresora, presionando el interruptor de encendido, localizado del lado izquierdo.
- 6.2.4. Esperar 20 minutos para ajuste interno.
- 6.2.5. En la pantalla aparece una ventana de diagnóstico. Quitar la ventana POWER UP DIAGNOSTICS, presionando el botón izquierdo del mouse en la llave "QUIT", para desplazar la ventana principal.
- 6.2.6. Para encender las lamparas UV y Visible localizadas en la barra de menú permanente, oprimir el botón izquierdo del mouse en las llaves "VIS OFF" y "UV OFF".

6.3. CREANDO Y USANDO UN METODO DE BARRIDO DE LONGITUD DE ONDA (WAVELENGTH SCAN)

- 6.3.1. De la ventana principal elegir WAVELENGTH SCAN, colocando la flecha en el menú WAVELENGTH SCAN y oprimiendo el botón izquierdo del mouse.
- 6.3.2. La ventana Wavelength Scan es desplazada, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "METHOD", para desplazar la ventana METHOD. Los métodos almacenados se listan en la parte superior de la ventana y los parámetros de análisis son listados en la parte inferior de la ventana.

6.3.3. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "CREATE", para desplazar la siguiente ventana:



Introducir el nombre del método en esta ventana.

a. Para introducir el nuevo nombre del archivo, oprimir el botón izquierdo del mouse en el nombre desplazado después de "New File Name", para desplazar el teclado alfanumérico. Escribir el nombre del método y oprimir el botón izquierdo del mouse en "OK", para quitar el teclado.

b. Oprimir el botón izquierdo del mouse en "OK", para quitar la ventana CREATE y aceptar el nombre del archivo.

c. El nombre del archivo es desplazado seguido de "Method in use"

6.3.4. Para introducir un comentario acerca del método, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "NOTE" y usar el teclado alfanumérico para escribir un mensaje con un máximo de 40 caracteres.

6.3.5. Para introducir un comentario acerca del método, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "Note" y usar el teclado alfanumérico, para escribir un mensaje con un máximo de 40 caracteres.

6.3.6. Para introducir parámetros de análisis, oprimir el botón izquierdo del mouse en el valor desplazado e introducir el valor deseado.

6.3.7. Al terminar de crear el método, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "SAVE", para guardar el método.

6.3.8. Para usar el método, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "EXIT".

El método es almacenado automáticamente y la ventana de análisis es desplazada con los parámetros para el método.

6.3.9. Colocar la celda con la solución blanco en el portaceldas posterior y presionar el botón izquierdo del mouse en la llave "BLANK", localizada en la barra de menú permanente.

6.3.10. Después de haber realizado el registro del blanco, retirar la celda con la solución blanco y colocar en el mismo lugar la celda con la muestra.

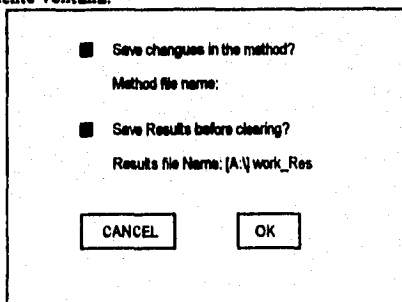
6.3.11. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "READ SAMPLES" para empezar la lectura de las muestras.

6.3.12. Para anotar datos en la gráfica, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "ANOTATE" y con el mouse elegir un punto en la gráfica donde se desea hacer la anotación e introducir la información con el teclado alfanumérico.

6.3.13. Imprimir los resultados, oprimiendo el botón izquierdo del mouse en la llave "PRINT", localizada en el menú de la ventana.

6.3.14. Repetir del paso 6.3.9 al 6.3.13 para todas las muestras.

6.3.15. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "QUIT", para desplazar la siguiente ventana:



A dialog box with a black border. It contains two checked options, each with a small square icon to its left. The first option is "Save changes in the method?" followed by the text "Method file name:". The second option is "Save Results before clearing?" followed by the text "Results file Name: [A:\]work_Res". At the bottom of the dialog box, there are two buttons: "CANCEL" on the left and "OK" on the right.

6.3.16. Oprimir el botón izquierdo del mouse en "OK", para desplazar la ventana principal y terminar el análisis.

6.4. LECTURAS A MAS DE UNA LONGITUD DE ONDA (FIXED WAVELENGTH)

6.4.1. De la ventana principal oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "FIXED WAVELENGTH" para desplazar la ventana Fixed wavelength.

6.4.2. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "METHOD", para desplazar la ventana de Método. Los métodos almacenados se enlistan en la parte superior de la ventana y los parámetros de análisis en la parte inferior.

6.4.3. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "CREATE", para desplazar la ventana Create.

6.4.4. Introducir los siguientes parámetros:

a. *Method in use*: Introducir el nombre del método usando el teclado alfanumérico.

b. *Note*: Introducir un mensaje de 40 caracteres que es usado para describir el método.

c. *Read mode*: Elegir entre (ABS) y (% T).

d. *Wavelength, factors and units*. Oprimir el botón izquierdo del mouse en VIEW, para desplazar la ventana de parámetros.

La ventana de parámetros se usa para introducir las longitudes de onda para el análisis, factor de concentración para cada longitud de onda y unidades para cada longitud de onda.

- d.1. Introducir los valores de longitud de onda, factores y unidades, oprimiendo el botón izquierdo del mouse en la localización respectiva e introducir los valores correspondientes.
 - d.2. Capacitar o inhabilitar cada longitud de onda oprimiendo el botón izquierdo del mouse en (Yes)/(No) en la columna "Use".
 - d.3. Cuando se hayan introducido los valores correspondientes, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "Exit", para aceptar los valores y quitar la ventana de la pantalla.
- e. *Read average time*: Es el tiempo en segundos, en el cual los datos son colectados y el tiempo promedio de lectura.
- 6.4.5. Oprimir el botón izquierdo en la llave "SAVE", para almacenar el método.
 - 6.4.6. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "Exit", para desplazar la ventana Fixed Wavelength con los parámetros del método.
 - 6.4.7. Colocar la celda con la solución blanco en el portacelda posterior y oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "BLANK", localizada en la barra de menú permanente.
 - 6.4.8. Después de haber realizado el registro del blanco, retirar la celda con la solución blanco y en el mismo lugar colocar la celda con la muestra.
 - 6.4.9. Oprimir el botón izquierdo del mouse en "Read Samples".
 - 6.4.10. Repetir los pasos 6.4.8 y 6.4.9 para todas las muestras.
 - 6.4.11. Imprimir los resultados oprimiendo el botón izquierdo del mouse en la llave "PRINT", localizada en el menú de la ventana.
 - 6.4.12. Realizar los pasos 6.3.15 y 6.3.16 para terminar el análisis.

6.5. BARRIDO A UNA LONGITUD DE ONDA VARIABLE (REDI SCAN)

- 6.5.1. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "REDI SCAN", localizada en la barra de menú permanente.
- 6.5.2. Verificar que la ordenada se desplace en absorbancia (ABS), en caso contrario oprimir el botón izquierdo del mouse colocando la flecha en el valor desplazado.
- 6.5.3. Introducir los parámetros:
 - a. *Longitud de onda inicial.* Colocar la flecha con el mouse en el valor de longitud de onda inicial desplazada, oprimir el botón izquierdo del mouse e introducir el valor correspondiente usando el teclado alfanumérico.
 - b. *Longitud de onda final.* Colocar la flecha con el mouse en el valor de longitud de onda final desplazado, oprimir el botón izquierdo del mouse e introducir el valor correspondiente, usando el teclado alfanumérico.
- 6.5.4. Colocar la solución blanco en el compartimento de la celda y oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "SCAN BLANK".
- 6.5.5. Después de realizar el registro del blanco, retirar la celda con la solución blanco.
- 6.5.6. Colocar en el mismo lugar la celda con la muestra, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "SCAN SAMPLE", para empezar la lectura de las muestras.
- 6.5.7. Para anotar datos en la gráfica, oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "ANOTATE", con el mouse elegir un punto en la gráfica donde se desea hacer la anotación e introducir la información usando el teclado alfanumérico.
- 6.5.8. Imprimir los resultados oprimiendo el botón izquierdo del mouse en la llave "PRINT".
- 6.5.9. Repetir del paso 6.5.6 al 6.5.8 para todas las muestras.

6.5.10. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "EXIT", para regresar a la ventana principal y terminar el análisis.

6.6. LECTURAS A LONGITUD DE ONDA FIJA

6.6.1. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "REDI READ", localizada en la barra de menú permanente.

6.6.2. Introducir los parámetros:

a. *Longitud de onda.* Oprimir el botón izquierdo del mouse en la longitud de onda desplazada e introducir el valor correspondiente usando el teclado alfanumérico.

b. *Tiempo promedio de lectura.* Oprimir el botón izquierdo del mouse en "READ AVG TIME", e introducir el valor correspondiente; se recomienda 0.5 segundos

6.6.3. Colocar la celda con la solución blanco en el portacelda posterior y oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "READ BLANK". Al terminar el registro del blanco, retirar la celda.

6.6.4. En el mismo lugar introducir la celda con la muestra. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "READ SAMPLES".

6.6.5. Repetir el paso anterior para todas las muestras.

6.6.6. Imprimir los resultados oprimiendo el botón izquierdo del mouse en la llave "PRINT".

6.6.7. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "EXIT", para regresar a la ventana principal y terminar el análisis.

6.7. AL FINALIZAR LA MEDICION

- 6.7.1. Retirar la celda del portacelda y lavarla como se describe en el inciso 6.1.4.
- 6.7.2. Apagar las lámparas UV y Visible, localizadas en la barra de menú permanente.
- 6.7.3. Apagar la impresora, presionando el interruptor de encendido, localizado en el lado izquierdo de la misma.
- 6.7.4. Apagar el espectrofotómetro, presionando el botón de encendido, localizado en la parte posterior derecha del espectrofotómetro.
- 6.7.5. Apagar el monitor presionando el botón de encendido localizado en la parte inferior derecha del mismo.
- 6.7.6. Apagar el regulador, bajando la palanca del interruptor.
- 6.7.7. Colocar la cubierta y registrarse en la bitácora de uso.

El procedimiento Normalizado de operación (PNO), se elaboró de acuerdo a la bibliografía 12. Posteriormente fue revisado por un analista del departamento de Evaluación Sanitaria de Medicamentos y Cosméticos, el cual siguió al pie de la letra todas las instrucciones mencionadas en el mismo; y certificó que el PNO cumple con los requisitos para los cuales fue creado.

6.2.4. PROGRAMA DE MANTENIMIENTO PREVENTIVO Y CORRECTIVO.

6.2.4.1. MANTENIMIENTO PREVENTIVO

- A. Mantener el instrumento con una ventilación adecuada para evitar un sobre calentamiento.
- B. El equipo debe operar en un ambiente libre de polvo y de solventes volátiles, para no causar un desajuste en el equipo.
- C. Es necesario que el equipo tenga un tiempo de calentamiento de 20 minutos, de no ser así puede falsear resultados.
- D. No usar celdas sucias y rayadas para no causar un mal funcionamiento del instrumento y dar resultados erróneos.
- E. Cambiar el desecante, por lo menos cada 2 meses. Debido a que un alto porcentaje de Humedad causa condensación de agua en la superficie óptica, ocasionando un desajuste en el instrumento.
- F. Limpiar las superficies del equipo periódicamente, con un limpiador antiestático.

6.2.4.2. MANTENIMIENTO CORRECTIVO

A. CAMBIO DE LA LAMPARA UV

* Partes requeridas: Lámpara UV, P/N 514366.

PROCEDIMIENTO

- a. Desconectar el espectrofotómetro y dejarlo enfriar por 15 minutos.

PRECAUCION: Durante la operación, se deben usar lentes de seguridad y guantes para protegerse de la luz UV.

- b. Quitar el monitor, de la parte superior del espectrofotómetro. Retirar el tornillo que asegura la caja de la fuente. Abrir la caja donde se localiza la lámpara y quitarla (Figura 7).

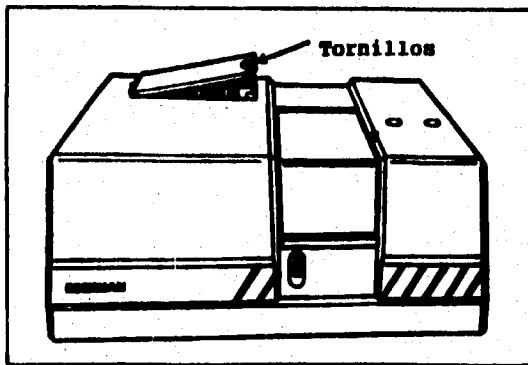


FIGURA 7. ESPECTROFOTOMETRO

- c. Para desconectar el conector de la lámpara UV, oprimir ambos lados del conector, entonces jalarlo para retirarlo, (Figura 8).
- d. Retirar los tornillos y Tuercas que sujetan la lámpara UV, (Figura 9).
- e. Quitar la lámpara levantándola directamente, (Figura 10).

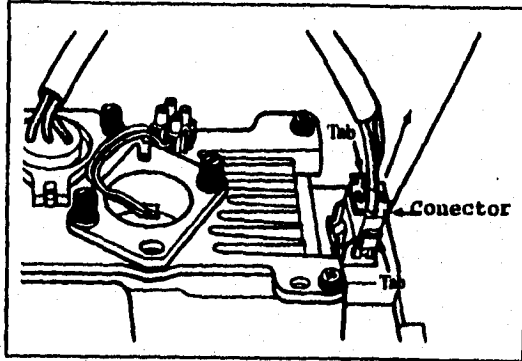


FIGURA 8. CONECTOR DE LAMPARA U.V.

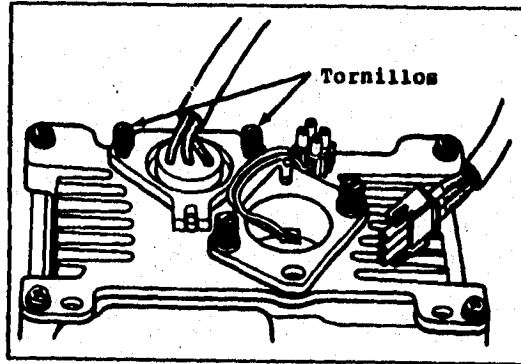


FIGURA 9. TORNILLOS DE LAMPARA U.V.

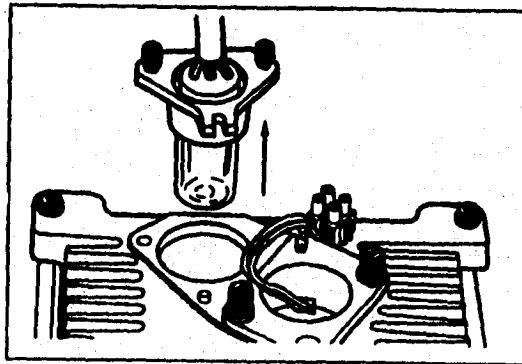


FIGURA 10. LAMPARA U.V.

f. Desempaquetar la lámpara nueva cuidadosamente para no romperla. Colocarla con cuidado, sujetándola con los dos tornillos como se muestra en la figura 9.

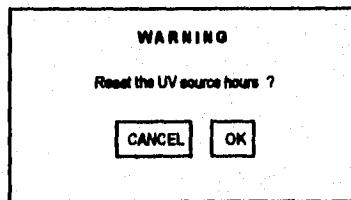
Colocar el conector como se muestra en la figura 8.

Nota: Asir la lámpara con un paño o guantes para evitar fundirla.

g. Colocar la caja de la fuente y sujetarla con los tornillos. Reponer el monitor en la parte posterior del equipo.

h. Conectar el espectrofotómetro y encenderlo. Cuando la verificación del equipo haya terminado, se desplaza la ventana "POWER UP DIAGNOSTICS". Quitar la ventana de Diagnóstico, presionando el botón izquierdo del mouse en la llave "QUIT", para desplazar la ventana principal.

i. Oprimir el botón izquierdo del mouse en "DIAGNOSTICS", para desplazar la ventana de diagnóstico. Oprimir el botón izquierdo del mouse en la llave "RESET Hrs", entonces se desplaza la siguiente ventana:



j. Oprimir el botón izquierdo del mouse en OK, para colocar la lámpara UV con 0.0 horas. Oprimir el botón izquierdo del mouse en "QUIT", para regresar a la ventana principal.

B. CAMBIO DE LA LAMPARA VISIBLE

* Partes requeridas: Lámpara visible, P/N 945672.

PROCEDIMIENTO

- a. Desconectar el espectrofotómetro y dejarlo enfriar por 15 minutos.
- b. Quitar el monitor de la parte superior del espectrofotómetro retirar el tornillo que asegura la caja de la lámpara. Abrir la caja y quitar la tapa, como se muestra en la figura 7.
- c. Quitar los 2 tornillos que sujetan la lámpara, (figura 11).

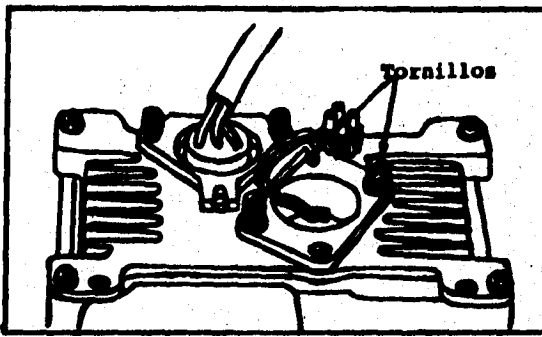


FIGURA 11. TORNILLOS DE LAMPARA VISIBLE

- d. Quitar la lámpara, levantándola directamente. Rotarla manteniéndola en posición de freno, (Figura 12).
- e. Quitar la lámpara vieja con cuidado y desempacar la lámpara nueva, (Figura 13)
- f. Reemplazar la lámpara manteniéndola en posición de freno y colocar los dos tornillos.
- g. Colocar la tapa de la caja de la lámpara y asegurarla con los tornillos.
- h. Colocar la pantalla en la parte superior del equipo.

Nota: La lámpara visible debe tomarse con un paño.

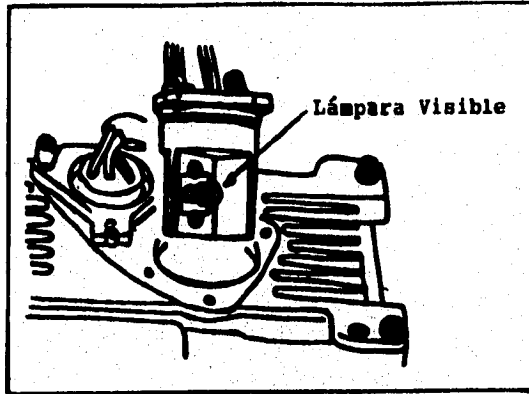


FIGURA 12. LAMPARA VISIBLE

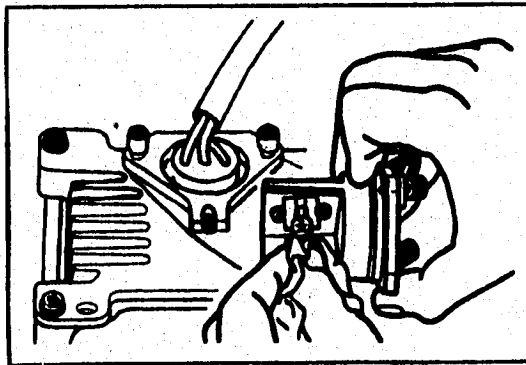


FIGURA 13. COLOCACION DE LAMPARA VISIBLE

Debido a que no existía un programa de mantenimiento Preventivo y Correctivo, se implementó para tener un mejor cuidado del equipo y una funcionalidad activa del mismo.

6.3. VALIDACION DEL SOFTWARE

6.3.1. CALIFICACION DEL SOFTWARE

El software del espectrofotómetro cuenta con los siguientes archivos:

6.3.1.1. MEDICIONES DE RUTINA (ROUTINE MEASURE)

Este archivo cuenta con diferentes métodos de rutina y los parámetros establecidos en estos pueden modificarse al gusto del operador:

Los métodos que se incluyen son los siguientes:

- A. Lecturas a longitud de onda fija (REDI READ)**
- B. Barrido a longitud de onda variable (REDI SCAN)**
- C. Lecturas a más de una longitud de onda (FIXED WAVELENGTH)**
- D. Barrido de longitud de onda (WAVELENGTH SCAN)**

Y consisten en:

A. LECTURAS A LONGITUD DE ONDA FIJA (REDI READ)

Se usa para tomar lecturas en absorbancia o transmitancia a una longitud de onda predeterminada, los parámetros que se manejan son:

- a. Modo de Lectura (Read Mode).** Con el cual se elige la variable de respuesta, esta variable puede ser: Absorbancia (Abs) y Transmitancia (% T).
- b. Longitud de Onda (Wavelength).** Se usa para elegir la longitud de onda a la cual se va a leer la muestra.
- c. Tiempo Promedio de Lectura (Read avg Time).** Establece el tiempo en el que se proporciona la lectura para cada muestra introducida.
- d. Corrección de Blanco (Read Blank).** Se usa para establecer la absorbancia del blanco en cero y evitar interferencia en las lecturas.
- e. Impresión (Print)** En esta opción el operador decide si se imprimen los datos obtenidos o no.

B. BARRIDO A LONGITUD DE ONDA VARIABLE (REDI SCAN)

Se usa para realizar barridos a una velocidad de barrido de 1200 nm/min.

Los parámetros para este método son los siguientes:

- a. *Longitud de onda Máxima*. Selecciona la longitud de onda máxima a la cual se hará el barrido.
- b. *Longitud de onda Mínima*. Determina el límite inferior del rango de barrido.
- c. *Ordenada máxima*. Establece el límite superior de respuesta en la variable de la ordenada.
- d. *Ordenada mínima*. Determina el límite inferior de respuesta en la variable de ordenada.
- e. *Autoescala*. Ajusta los ejes de ordenadas.
- f. *Trazo (Trace)*. Se usa para desplazar lecturas eligiendo puntos en las gráficas.
- g. *Anotación (Annotate)*. Se usa para introducir información en la gráfica.

C. LECTURAS A MÁS DE UNA LONGITUD DE ONDA (FIXED WAVELENGTH)

Este modo de análisis se usa para coleccionar datos en absorbancia o transmitancia, a más de 12 longitudes de onda. Además, se usa un factor para calcular la concentración en la muestra. Los parámetros que se manejan son los siguientes:

- a. *Tiempo promedio de Lectura*.
- b. *Modo de lectura*.
- c. *Longitud de onda (Wavelength)*. Se eligen las longitudes de onda a las cuales se desea realizar las lecturas.
- d. *Factor*. Se introduce el factor que se desea que se multiplique la absorbancia, para proporcionar la concentración de la muestra.
- e. *Unidades (Units)*. Establece el tipo de análisis para el resultado final.

f. *Save Clear*. Para salvar los resultados, si así se desea.

D. BARRIDO DE LONGITUD DE ONDA (WAVELENGTH SCAN)

Realiza barrido de longitud de onda en absorbancia o transmitancia. Los datos se almacenan automáticamente para realizar manipulaciones en las cuales se incluye: Ampliación, sobreposición y Tabulaciones. Los cálculos incluyen: Número de máximos, de 1a. a 4a. derivada, logaritmo de absorbancia, adición, sustracción y multiplicación espectral.

En este tipo de análisis, se trabaja creando métodos en los cuales se incluyen los siguientes parámetros:

- a. *Modo de Lectura (Read Mode)*. Con el cual se elige la variable de respuesta, absorbancia o transmitancia.
- b. *Longitud de onda inicial (Wavelength Start)*. Determina el límite inferior del rango de barrido.
- c. *Longitud de onda final (Wavelength End)*. Selecciona el límite superior del rango de barrido.
- d. *Registros por muestra (Scan per Sample)*. Elige el número de barridos que se harán por muestra.
- e. *Intervalo de tiempo (Interval Time)*. Selecciona el tiempo en el cual se hará el barrido.
- f. *Autoescalamiento (Autoscaling)*. Ajusta los ejes de ordenada para mostrar el máximo de absorción.
- g. *Límite inferior (Lower Limit)*. Determina el límite inferior de respuesta en la variable de ordenada.
- h. *Límite superior (Upper Limit)*. Establece el límite superior de respuesta en la variable de ordenada.

- i. *Sobreposición de registros (Overlay Scans)*. Con este parámetro se decide si los espectros de las diferentes muestras se graficarán en la misma gráfica, obteniendo espectros superpuestos.
- j. *Velocidad de barrido*. Marca la velocidad a la cual se leerá y graficará, se proporciona en nanómetros/minuto. Se puede elegir entre 2400, 1200, 600, 240 y 120 nm/minuto.

6.3.1.2. DIAGNOSTICO

Este archivo se usa para calibrar la longitud de onda, encontrando el máximo de absorción de la lámpara de Deuterio, elige la ganancia de registros posterior a la calibración y realiza la corrección de línea Base.

6.3.1.3. CONFIGURACION

Se usa para seleccionar los parámetros instalados en el instrumento, equipos de salida y accesorios de muestreo.

También es usado para asignar claves y proteger métodos.

NOTA. Los parámetros para la configuración se seleccionan al instalar el equipo y no pueden cambiarse durante la operación del mismo.

6.3.2. EVALUACION FUNCIONAL

Durante la evaluación funcional, se verificaron los siguientes parámetros:

6.3.2.1. SENSIBILIDAD

Para evaluar la sensibilidad, se usaron los métodos REDI READ y FIXED WAVELENGTH, los resultados de sensibilidad se reportan en las tablas VIII y IX.

CONCENTRACION (mg/ml)	ABSORBANCIA TEORICA	PRIMERA DETERMINACION	SEGUNDA DETERMINACION	TERCERA DETERMINACION
30.0	0.4404	0.4404	0.4403	0.4400
40.0	0.5847	0.5845	0.5846	0.5848
50.0	0.7290	0.7288	0.7288	0.7287

TABLA VIII. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR EL METODO REDI READ

CONCENTRACION (mg/ml)	ABSORBANCIA TEORICA	PRIMERA DETERMINACION	SEGUNDA DETERMINACION	TERCERA DETERMINACION
30.0	0.4404	0.4406	0.4405	0.4402
40.0	0.5847	0.5846	0.5844	0.5843
50.0	0.7290	0.7287	0.7290	0.7289

TABLA IX. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR EL METODO FIXED WAVELENGTH

En lo que se refiere a sensibilidad pudo demostrarse que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos experimentalmente por los dos métodos y los valores teóricos. Cabe mencionar que los valores teóricos se obtuvieron a partir de los resultados de linealidad fotométrica.

6.3.2.2. REPETIBILIDAD

En la evaluación de la repetibilidad, se usaron los mismos métodos que para sensibilidad. Al evaluar la repetibilidad por los dos métodos (REDI READ y FIXED WAVELENGTH), se observa que el coeficiente de variación (C.V) es menor del 2 % según se muestra en las tablas X y XI por lo que se puede decir que las respuestas del espectrofotómetro son repetibles y no existe variación significativa.

ABSORBIANCIA TECNICA	PRIMERA DETERMINACION	SEGUNDA DETERMINACION	TERCERA DETERMINACION
0.8732	0.8731	0.8732	0.8731
	0.8731	0.8732	0.8731
	0.8730	0.8732	0.8734
	0.8730	0.8730	0.8734
	0.8731	0.8730	0.8731
	0.8732	0.8731	0.8731
Xp	0.873083	0.873117	0.8732
DESV. STD	0.000075	0.000098	0.000155
C.V	0.008622	0.011261	0.017742

TABLA X. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD POR EL METODO REDI READ

ABSORBIANCIA TECNICA	PRIMERA DETERMINACION	SEGUNDA DETERMINACION	TERCERA DETERMINACION
0.8732	0.8731	0.8731	0.8730
	0.8732	0.8732	0.8730
	0.8731	0.8734	0.8730
	0.8732	0.8731	0.8730
	0.8731	0.8732	0.8731
	0.8731	0.8732	0.8734
Xp	0.873133	0.8732	0.873083
DESV. STD	0.000052	0.000110	0.000160
C.V	0.005914	0.012545	0.018350

TABLA XI. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE REPETIBILIDAD POR EL METODO FIXED WAVELENGTH

6.3.2.3. RESPUESTA ADECUADA

Para evaluar la respuesta adecuada, se usaron los métodos REDISCAN y WAVELENGTH SCAN.

En la respuesta adecuada, se puede observar que la respuesta es congruente y cercana a la teórica para los dos métodos (Tablas XII y XIII), más aún, no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos y los valores teóricos como se puede apreciar en las figuras 14 y 15.

CONCENTRACION PPM	λ TEORICA	λ EXPERIMENTAL	ABSORBENCIA PPM	VALOR EXPERIMENTAL
50.0	256.80	234.70	0.7290	0.7287
60.0	256.80	234.70	1.0177	1.0176
70.0	256.80	234.70	1.1621	1.1618

TABLA XII. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE RESPUESTA ADECUADA POR EL METODO REDISCAN.

CONCENTRACION PPM	λ TEORICA	λ EXPERIMENTAL	ABSORBENCIA PPM	VALOR EXPERIMENTAL
50.0	257.0	235.0	0.7290	0.7292
60.0	257.0	235.0	1.0177	1.0141
70.0	257.0	235.0	1.1621	1.1594

TABLA XIII. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EVALUACION DE RESPUESTA ADECUADA POR EL METODO WAVELENGTHSCAN

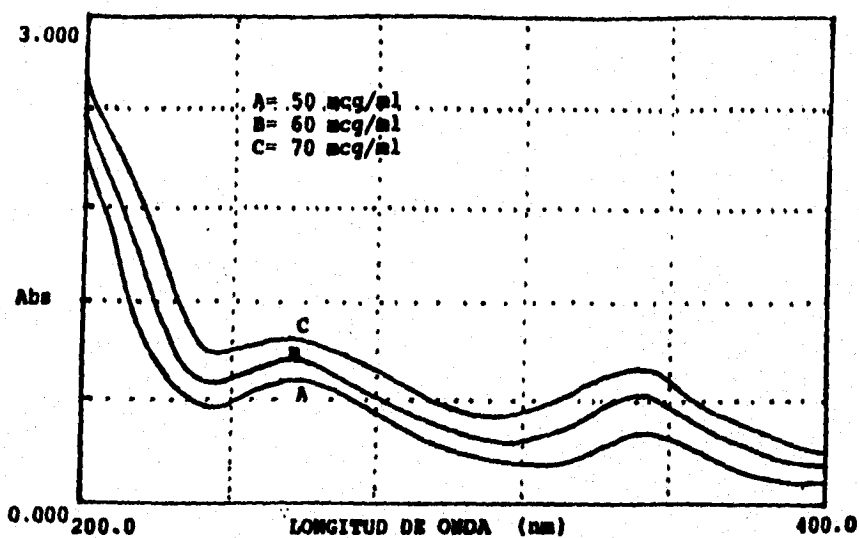


FIGURA 14. GRAFICA OBTENIDA EN LA EVALUACION DE RESPUESTA ADECUADA POR EL METODO WAVELENGTH SCAN

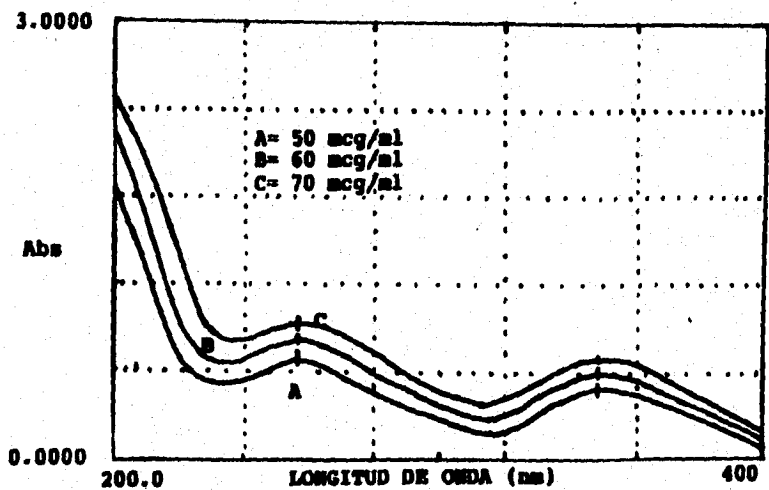


FIGURA 15. GRAFICA OBTENIDA EN LA EVALUACION DE RESPUESTA ADECUADA POR EL METODO

WAVELENGTH SCAN

6.4. CELDAS

Las celdas fueron lavadas de acuerdo a los procedimientos de limpieza de rutinaria y limpieza bimestral.

Posteriormente las celdas, se sometieron la prueba de limpieza, realizando 10 lecturas con agua destilada, usando aire como blanco a una longitud de onda de 240 nm.

Los resultados se muestran en la tablas XIV y XV.

NUMERO DE LECTURAS	LECTURA EN LA CELDA (A)	LECTURA EN LA CELDA LAVADA (B)	ABSORBANCIA % (C)
1.0	0.0500	0.0490	0.0010
2.0	0.0498	0.0489	0.0009
3.0	0.0497	0.0489	0.0008
4.0	0.0499	0.0484	0.0015
5.0	0.0490	0.0487	0.0003
6.0	0.0497	0.0492	0.0005
7.0	0.0496	0.0494	0.0002
8.0	0.0509	0.0499	0.0010
9.0	0.0495	0.0493	0.0002
10.0	0.0508	0.0497	0.0011

TABLA XIV. LECTURAS OBTENIDAS EN LA PRUEBA DE LIMPIEZA DE RUTINA

NUMERO DE LECTURAS	LECTURA EN LA CELDA (A)	LECTURA EN LA CELDA LAVADA (B)	ABSORBANCIA % (C)
1.0	0.0492	0.0491	0.00010
2.0	0.0496	0.0491	0.00050
3.0	0.0495	0.0490	0.00050
4.0	0.0493	0.0489	0.00040
5.0	0.0495	0.0492	0.00030
6.0	0.0501	0.0492	0.00090
7.0	0.0498	0.0491	0.00070
8.0	0.0504	0.0489	0.00150
9.0	0.0504	0.0489	0.00150
10.0	0.0503	0.0490	0.00130

TABLA XV. LECTURAS OBTENIDAS EN LA PRUEBA DE LIMPIEZA BIMESTRAL

En las tablas XIV y XV se puede observar, que la absorbancia aparente fue menor de 0.093; lo que demuestra que ambos procedimientos de limpieza son óptimos.

La diferencia entre lecturas (A-B); en ambos procedimientos de limpieza fue menor de 0.005 (ver tablas XIV y XV), por lo que se puede decir que la celda puede colocarse de cualquiera de las dos formas, sin existir interferencia en los resultados.

6.6. CALIBRACION

6.6.1. EXACTITUD Y PRECISION DE LA LONGITUD DE ONDA

Se obtuvieron 10 espectros del patrón de referencia (celda de Oxido de Holmio), con los cuales se evaluó la exactitud y precisión de la longitud de onda.

En la figura 16, se muestra el espectro obtenido para la celda de Oxido de Holmio.

Las longitudes de onda de referencia y las longitudes de onda promedio se reportan en la tabla XVI.

La exactitud de la longitud de onda se evaluó, comparando el valor de la diferencia entre la longitud de onda reportada (X), menos la longitud de onda promedio obtenida (Xp); con los límites de tolerancia establecidos por el fabricante (± 1.0 nm).

En los cuales se observa que se cumple con tales límites por lo que el equipo presenta exactitud en la longitud de onda, tomando como referencia los valores de longitud de onda reportados para cada banda de máxima absorción, de la celda de Oxido de Holmio.

LONGITUD DE ONDA DE REFERENCIA X (nm)	LONGITUD DE ONDA PROMEDIO OBTENIDA Xp (nm)	DIFERENCIA (X-Xp)	VERIFICACION ESTADISTICA Y CV
279.40	279.00	0.40	PARA TODAS LAS BANDAS DE MAXIMA ABSORCION CERO
287.50	287.50	0.00	
333.70	333.50	0.20	
360.90	360.50	0.40	
418.00	418.00	0.00	
453.20	453.00	0.20	
459.90	459.50	0.40	
536.00	536.00	0.00	
637.00	637.50	0.50	
648.00	648.50	0.50	

TABLA XVI. PARAMETROS ESTADISTICOS PARA LAS LONGITUDES DE ONDA OBTENIDAS

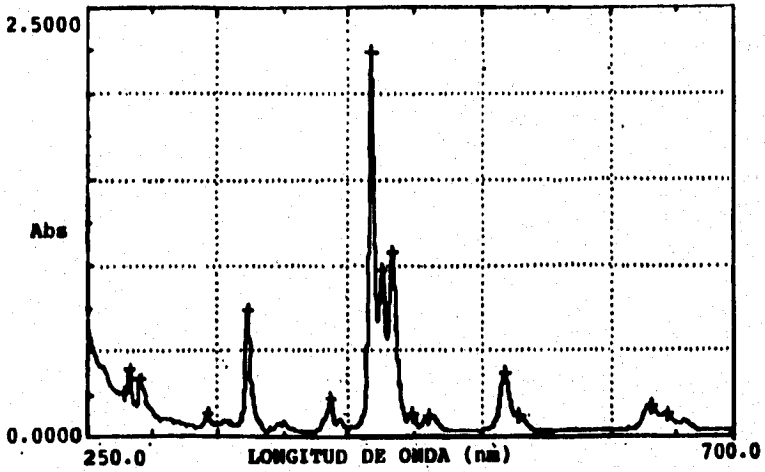


FIGURA 16. ESPECTRO OBTENIDO PARA LA CELDA DE OXIDO DE HOLMIO

La precisión de la longitud de onda se evaluó por medio del coeficiente de variación (C.V), el cual establece que debe ser menor del 2.0 %, para demostrar que el equipo es preciso. Dado que los valores fueron menores del 2.0 %, se pudo establecer que el equipo presenta precisión en la longitud de onda.

6.6.2. EXACTITUD Y PRECISION DE LA LONGITUD DE ONDA EN LA REGION VISIBLE

Para determinar la exactitud y precisión de la longitud de onda en la región visible, se obtuvieron 10 espectros del filtro de Didimio (Figura 17).

Después de obtener las longitudes de onda para cada máximo de absorción característico, estas se sometieron a un análisis estadístico, calculando la longitud de onda promedio obtenida (X_p), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (C.V); los cuales se muestran en la tabla XVII.

Al comparar los valores de la diferencia ($X-X_p$), se observa que cumple con los límites de tolerancia establecidos por el fabricante (± 1.0 nm), por lo que se puede decir que existe exactitud en la longitud de onda en la región visible, tomando como referencia los valores de longitud de onda reportados para cada banda de máxima absorción del filtro de Didimio.

Longitud de onda de referencia λ nm	Longitud de onda promedio obtenida λ nm	Diferencia λ - λ_p	Desviación estándar y C.V
572.0	572.0	0.0	PARA TODAS LAS BANDAS DE MAXIMA ABSORCION CERO
585.0	585.0	0.0	
685.0	684.0	1.0	
741.0	741.0	0.0	
807.0	807.0	0.0	

TABLA XVII. PARAMETROS ESTADISTICOS PARA LAS LONGITUDES DE ONDA OBTENIDAS

La precisión de la longitud de onda en la región visible, se determinó calculando el coeficiente de variación (C.V), obteniendo valores menores del 2 % , con lo que se puede decir que el equipo presenta precisión en la longitud de onda.

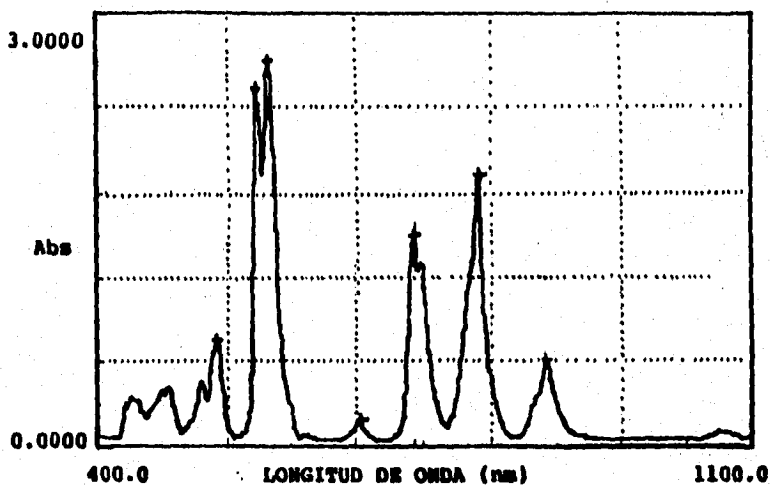


FIGURA 17. ESPECTRO OBTENIDO PARA EL FILTRO DE DIDIMIO

6.6.3. EXACTITUD FOTOMETRICA

Para evaluar la exactitud fotométrica se utilizó un estándar primario de Dicromato de Potasio, del cual existen los rangos de absorbancia certificados.(6)

El análisis se realizó dos días diferentes preparando soluciones de 40, 50, 60 y 70 mcg/ml, para leerlas posteriormente a las longitudes de onda de 235, 257, 313, 345 y 350 nm; en cada día se obtuvieron 10 repeticiones por cada nivel de concentración.

En la tabla XVIII, se observan los intervalos promedio de absorbancia obtenidos por cada día.

Posteriormente los valores promedio de absorbancia por cada día fueron analizados para obtener un promedio general. La desviación estándar se realizó con base en los promedios obtenidos en los dos días de análisis, (ver Tabla XIX).

LONGITUD DE ONDA (nm)	CONCENTRACION (mcg/ml)	RANGO DE ABSORBANCIA CERTIFICADO	ABSORBANCIA DETERMINACION	ABSORBANCIA DETERMINACION
235	40.0	0.485-0.499	0.4898-0.4950	0.4904-0.4942
	50.0	0.607-0.625	0.6138-0.6231	0.6139-0.61810
	60.0	0.730-0.752	0.7338-0.7509	0.7379-0.7439
	70.0	0.853-0.879	0.8637-0.8726	0.8637-0.8690
257	40.0	0.564-0.582	0.5686-0.5766	0.5707-0.5777
	50.0	0.706-0.728	0.7133-0.7244	0.7120-0.7181
	60.0	0.840-0.875	0.8563-0.8674	0.8549-0.8654
	70.0	0.993-1.023	1.0027-1.0156	1.0039-1.0154
313	40.0	0.189-0.195	0.1922-0.1939	0.1920-0.1938
	50.0	0.237-0.245	0.2402-0.2432	0.2396-0.2427
	60.0	0.285-0.293	0.2886-0.2912	0.2877-0.2904
	70.0	0.332-0.342	0.3360-0.3390	0.3356-0.3396
345	40.0	0.419-0.431	0.4198-0.4240	0.4215-0.4239
	50.0	0.523-0.539	0.5266-0.5316	0.5275-0.5311
	60.0	0.627-0.647	0.6288-0.6369	0.6294-0.6346
	70.0	0.733-0.765	0.7346-0.7511	0.7373-0.7422
350	40.0	0.431-0.434	0.4282-0.4306	0.4293-0.4314
	50.0	0.528-0.543	0.5302-0.5371	0.5321-0.5347
	60.0	0.633-0.653	0.6342-0.6462	0.6355-0.6462
	70.0	0.740-0.768	0.7414-0.7554	0.7432-0.7547

TABLA XVIII. DATOS DE ABSORBANCIA OBTENIDOS PARA LA PRUEBA DE EXACTITUD FOTOMETRICA.

Los datos se compararon con los certificados, para cada concentración y longitud de onda, encontrando que el equipo presenta exactitud fotométrica en todas las longitudes de onda y concentraciones, excepto para la concentración de 40 mcg/ml a la longitud de onda de 350 nm; esto se pudo deber a un corrimiento en la longitud de onda causando por la estabilidad de la sustancia y al pH de la misma.

La desviación estándar obtenida, muestra que no existe interferencia en los resultados al trabajar en días diferentes.

También cabe mencionar que la exactitud de la longitud de onda se determinó únicamente en la región ultravioleta, debido a que fue difícil conseguir el estándar NBS 930 con el proveedor y con otras instituciones que se encargan de proporcionar mantenimiento y servicio a este tipo de instrumentos.

LONGITUD DE ONDA (nm)	CONCENTRACION (mcg/ml)	RANGO DE ABSORBANCIA CERTIFICADO	PRECISIÓN GENERAL	DEVI. ESTÁNDAR LÍMITE SUPERIOR	DEVI. ESTÁNDAR LÍMITE INFERIOR
235	40.0	0.485-0.499	0.49010-0.49460	0.000424	0.000566
	50.0	0.607-0.623	0.61385-0.62060	0.000071	0.003536
	60.0	0.730-0.752	0.73585-0.74740	0.002899	0.004950
	70.0	0.853-0.879	0.86370-0.87080	0.000000	0.002546
257	40.0	0.564-0.582	0.56965-0.57715	0.001485	0.000778
	50.0	0.706-0.728	0.71265-0.72125	0.000919	0.004435
	60.0	0.840-0.875	0.85560-0.86640	0.000990	0.001414
	70.0	0.993-1.023	1.00333-1.01553	0.000891	0.000127
313	40.0	0.189-0.195	0.19210-0.19385	0.000141	0.000071
	50.0	0.237-0.245	0.23990-0.24245	0.000424	0.001061
	60.0	0.285-0.293	0.28815-0.29008	0.000636	0.000566
	70.0	0.332-0.342	0.33580-0.33930	0.000283	0.000424
345	40.0	0.419-0.431	0.42060-0.42395	0.001202	0.000071
	50.0	0.523-0.539	0.52705-0.53135	0.000636	0.000354
	60.0	0.627-0.647	0.62910-0.63570	0.000424	0.001626
	70.0	0.733-0.765	0.73595-0.74665	0.001909	0.006293
350	40.0	0.431-0.434	0.42875-0.43100	0.000778	0.000566
	50.0	0.528-0.543	0.53115-0.53590	0.001344	0.001697
	60.0	0.633-0.653	0.63485-0.64670	0.000919	0.000707
	70.0	0.740-0.768	0.74230-0.75505	0.001273	0.000495

TABLA XIX. PARAMETROS ESTADÍSTICOS PARA LA PRUEBA DE EXACTITUD FOTOMÉTRICA

6.4. PRECISION FOTOMETRICA

Para evaluar la precisión fotométrica se utilizaron soluciones de Dicromato de Potasio a las concentraciones de 60 y 100 mcg/ml. El análisis se realizó dos días diferentes, tomando 10 lecturas de cada solución a una longitud de onda de 257 nm.

Los valores de absorbancia fueron analizados, para obtener la desviación estándar y el coeficiente de variación por cada día.

Como se puede observar en la tabla XX, el coeficiente de variación fue menor del 2%, para las dos concentraciones en los dos días, por lo que se establece que el espectrofotómetro cumple con el criterio de precisión fotométrica.

CONCENTRACION DE 60 mcg/ml		CONCENTRACION DE 100 mcg/ml		
ABSORBANCIA 1a DETERMINACION	ABSORBANCIA 2a DETERMINACION	ABSORBANCIA 1a DETERMINACION	ABSORBANCIA 2a DETERMINACION	
0.8643	0.8781	1.4629	1.4817	
0.8642	0.8781	1.4636	1.4824	
0.8640	0.8776	1.4649	1.4817	
0.8650	0.8778	1.4669	1.4810	
0.8675	0.8776	1.4682	1.4817	
0.8678	0.8776	1.4656	1.4804	
0.8680	0.8773	1.4642	1.4817	
0.8668	0.8773	1.4662	1.4824	
0.8668	0.8775	1.4662	1.4817	
0.8663	0.8776	1.4649	1.4810	
X ^P	0.866070	0.87765	1.46536	1.48157
S	0.001561	0.00028	0.001592	0.000622
C.V.	0.180283	0.03189	0.108675	0.041977

TABLA XX. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE PRECISION FOTOMETRICA.

Los valores reportados en los dos días diferentes fueron analizados para obtener un promedio general y desviación estándar general para las lecturas.

De esta forma, la precisión fotométrica se reporta:

Para la concentración de 60 mcg/ml: I.C. de ABS= 0.871860 ± 0.000921

Para la concentración de 100 mcg/ml: I.C. de ABS= 1.4723 ± 0.001107

6.5. LINEARIDAD FOTOMETRICA

En la tabla XXI, se reportan las concentraciones de las muestras y las absorbancias obtenidas de las mismas.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico que consistió en:

- a. Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$Y = mx + b$$

Para obtener m, b y r², (Tabla XXII).

- b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada a la media de asociación entre las variables dado el modelo (s_{y.x}), (Tabla XXII).

CONCENTRACION (mg/l)	1ª PRUEBA	2ª PRUEBA
0.02	0.2942	0.2971
	0.2970	0.2930
	0.2966	0.2966
0.04	0.5894	0.5834
	0.5833	0.5823
	0.5791	0.5871
0.06	0.8717	0.8752
	0.8785	0.8747
	0.8743	0.8710
0.08	1.1550	1.1541
	1.1693	1.1656
	1.1577	1.1579
0.10	1.4414	1.4407
	1.4466	1.4454
	1.4433	1.4447
0.12	1.7496	1.7494
	1.7540	1.7468
	1.7489	1.7553
0.14	2.0493	2.0357
	2.0328	2.0382
	2.0392	2.0434
0.16	2.3329	2.3154
	2.3136	2.2973
	2.3080	2.3343
0.18	2.5978	2.5936
	2.5955	2.5821
	2.5831	2.5982
0.20	2.9036	2.8906
	2.8959	2.8970
	2.8949	2.9083

TABLA XXI. DATOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE LINEARIDAD FOTOMETRICA

DETERMINACION	PRIMERA M	SEGUNDA M	S.E.M. S.E.M.	CORR. LINEAL r ²
PRIMERA	14.431081	0.008698	0.029496	0.999880
SEGUNDA	14.434424	0.007360	0.009899	0.999867

TABLA XXII. PARAMETROS ESTADISTICOS PARA AMBAS DETERMINACIONES.

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables por medio de un análisis de varianza (Tablas XXIII y XXIV)

d. Prueba de hipótesis

H₀: Y no depende de X

H₁: Y depende de X

H₀: No existe falta de ajuste a la relación lineal

H₁: Existe falta de ajuste a la relación lineal

Dado que F_r (regresión) fue mayor que F de tablas (4,20), con una confianza del 95 %, se observa que Y depende de X, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza en ambas determinaciones.

Con respecto al ajuste, dado que F_{fa} (falta de ajuste) fue menor que F de tablas (2,45), con una confianza del 95 %, se observa que no existe falta de ajuste a la relación lineal simple ; por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

e. Construcción del Intervalo de confianza para la ordenada al origen y la pendiente con una confianza del 95 % (Tabla XXV).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	gl _r = 1	SC _r =20.617365	MC _r =20.617365	F _{tab} = 4.20 F _r =236981.20689
ERROR DE REGRESION	gl _{er} = 28	SC _{er} =0.002442	MC _{er} =0.000087	
FALTA DE AJUSTE	gl _{fa} =8	SC _{fa} =-64.695865	MC _{fa} =-8.086983	F _{tab} = 2.45 F _{fa} =-2.499906
ERROR PURO	gl _{ep} =20	SC _{ep} =64698307	MC _{ep} =3.234915	

TABLA XXIII. TABLA DE ANADVA PARA LA PRIMERA DETERMINACION

En la figura 18, se representa la relación lineal existente para ambas determinaciones.

Por todo lo anterior, se verificó la funcionalidad del instrumento, al confirmar que una muestra conocida (Dicromato de Potasio), cumple con la ley de LAMBERT-BEER, demostrando que la respuesta del detector es buena y no existe presencia de luz parásita.

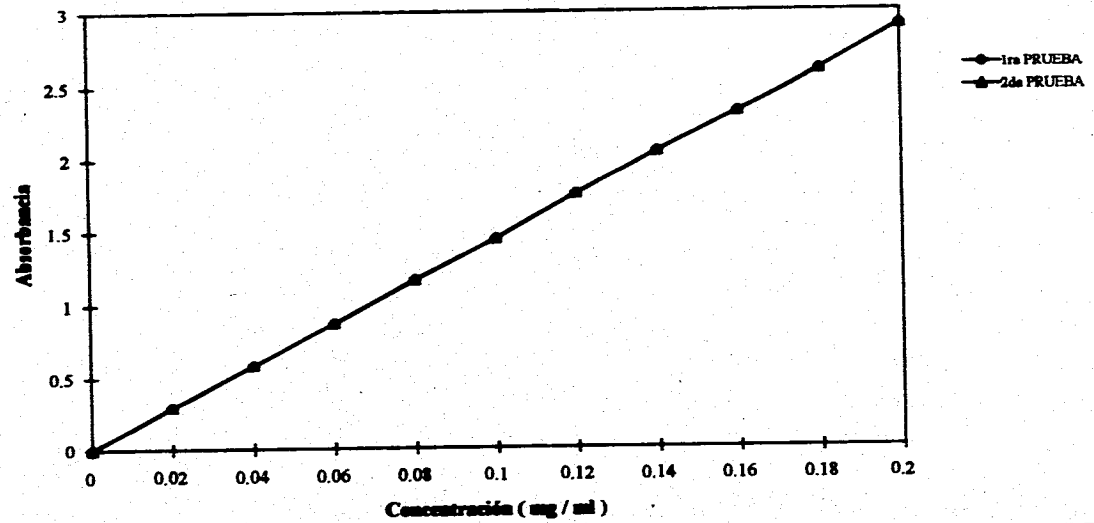
TIPO DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	$g_{ir} = 1$	$SCr = 20.626906$	$MCr = 20.626906$	$F_{tab} = 4.20$
ERROR DE LA REGRESION	$g_{lor} = 28$	$SCer = 0.002743$	$MCor = 0.000098$	$F_r = 210478.6326$
FALTA DE AJUSTE	$g_{fa} = 8$	$SCfa = -4.640214$	$Mfa = -8.080027$	$F_{tab} = 2.45$
ERROR PURO	$g_{lep} = 20$	$SCep = 4.642957$	$Mcep = 3.232148$	$F_{fa} = -2.499894$

TABLA XXIV. TABLA DE ANADVA PARA LA SEGUNDA DETERMINACION

DETERMINACION	INTERVALO DE CONFIANZA	INTERVALO DE CONFIANZA
	ORDENADA (b)	PENDIENTE (m)
PRIMERA	$-0.020332 < b < 0.037728$	$14.239055 < m < 14.623107$
SEGUNDA	$-0.001360 < b < 0.016080$	$14.377968 < m < 14.490880$

TABLA XXV. INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN (b) Y PENDIENTE (m)

FIGURA 18. GRAFICA OBTENIDA PARA LA PRUEBA DE LINEARIDAD FOTOMETRICA EN DOS DIAS DE ANALISIS



6.6.6. DESVIACION DE LA LUZ

SUSTANCIA	PRIMERA MEDICIÓN	SEGUNDA MEDICIÓN	PROMEDIO GENERAL	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	C.V
K ₂ Cr ₂ O ₇ 25 mg/100 ml	3.952136	4.060480	4.006308	0.047312	1.18593
KI 0.10 %	3.572245	3.592670	3.582458	0.037613	1.04992
NaI 1.00 %	3.320950	3.322545	3.321748	0.032804	1.58963
KCl 1.20 %	2.133891	2.253895	2.193893	0.006805	0.76599

TABLA XXVI. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE DESVIACION DE LA LUZ

La desviación de la luz o luz espuria, se evaluó usando soluciones de Dicromato de Potasio (25 mg/100 ml de KOH 0.05 N), Yoduro de Potasio (0.10 %), Yoduro de Sodio (1.0 %) y KCl (1.20 %). El análisis se realizó dos días diferentes obteniendo 10 repeticiones por día.

Los valores de absorbancia para cada sustancia, fueron analizados para obtener un promedio por cada día de estos dos, se obtuvo un promedio general. La desviación estándar y el coeficiente de variación (C.V), se calculó con base en los promedios obtenidos en los dos días de análisis, tal y como se observa en la tabla XXVI.

En esta tabla puede observarse que en todas las sustancias existe una absorbancia mayor de 2, por lo que se considera que existe ausencia de luz espuria

7. CONCLUSIONES

Los aspectos más relevantes conseguidos al realizar la calificación y calibración del espectrofotómetro Beckman DU 640 fueron:

- * La creación del Procedimiento Normalizado de Operación (P.N.O), que permite al usuario ejecutar los programas establecidos en el software del equipo; al realizar un análisis particular, siguiendo la prácticas adecuadas de laboratorio y al mismo tiempo permitiendo que el equipo funcione adecuadamente.
- * La elaboración de un programa de mantenimiento Preventivo y correctivo para tener un mejor cuidado y control del equipo; y al mismo tiempo una funcionalidad activa del mismo.
- * El programa de calibración fue diseñado para asegurar y confirmar la validez y confiabilidad de los resultados en mediciones espectrofotométricas realizadas por el laboratorio.
- * La verificación del equipo y la elección de los materiales y reactivos usados, fue de gran importancia y satisfactorios, debido a que las técnicas proporcionadas en las normas ASTM y SECOFI, se tuvieron que adaptar a las condiciones en las que se encontraba el equipo y a los materiales con que contaba el laboratorio.
- * En cuanto a la validación del software, el espectrofotómetro Beckman DU 640; respondió muy bien a la evaluación funcional con Dicromato de Potasio, por lo que se puede decir que los métodos de rutina establecidos en el software están validados, con lo cual se logró certificar que el software cumple con las funciones para las que fue diseñado.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Alvarado, J., "Validación de Procesos Farmacéuticos", Asociación Farmacéutica Mexicana; México 1982.
2. American Society of Testing and Materials, *Annual Book of ASTM Standards* section 14, volume 14.01, Designation E 131-88, "Standards Definitions of Terms and Symbols Relating to Molecular Spectroscopy", 1989.
3. American Society of Testing and Materials, *Annual Book of ASTM Standards*, section 14, volume 14.01, Designation E 189-87, "Standards Practices for General Techniques of Ultraviolet, Visible Quantitative Analysis", 1989.
4. American Society of Testing and Materials, *Annual Book of ASTM Standards*, section 14, volume 14.01, Designation E 275-83, "Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible and Near Infrared Spectrophotometers", 1989.
5. American Society of Testing and Materials, *Annual Book of ASTM Standards*, section 14, volume 14.01, Designation E 387-84, "Test Method for Stimulating Stray Radiant Power Ratio of Spectrophotometers by the Opaque Filter Method", 1989.
6. American Society of Testing and Materials, *Annual Book of ASTM Standards*, section 14, volume 14.01, Designation E 925-83, "Standard Practice for the Periodic Calibration of Narrow Band-Pass Spectrophotometers", 1989.
7. Aplicaciones en Espectroscopia Ultravioleta-Visible, Seminario, Perkin Elmer, México D.F., 1995.
8. Apuntes de Espectrofotometría, Centro Nacional de Metrología, México 1996.
9. Balagurusamy, E., "Expert System for Management and Engineering", Ellis Horwood, 1990; p.p. 11-21.
10. Berger, R. W., "Statistical Process Control", Ed. Marcel Dekker Inc, NY., 1989. p.p. 7-24.
11. Bozenhardt, H., "The Validation Life Cycle Applied to Software Development", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14,18 (1988), 2717-23.

12. Bluhm, A., "A Practical Guide to Software Validation", *Pharmaceutical Technology* 13, 10 (1989), 33-40.
13. Burke, R. W., "Liquid Absorbance Standards", *J. Res. Nat Burg Stand Sect A*, 76,(1972), 469.
14. Care and Clearing of Coleman Spectrophotometers Cells, Perkin Elmer, U.S.A. 1994.
15. Castaño, F. A., "Espectroscopía Ultravioleta-Visible", Ed. Alhambra, Madrid, 1970. p.p. 1-18.
16. Chapman, K., "A History of Validation in the United States- Part II. Validation of Computer-Related Systems", *Pharmaceutical Technology*, 15,11, (1991), 54-68.
17. Charles, M. K., "Instrumental Analysis", Ed. Harper, N.Y., 1974. p.p.314-16.
18. Connors, K. A., "Curso de Análisis farmacéutico", Ed. Reverté, España 1981.
19. Couriel C., "Validación de Procesos Farmacéuticos", AFM, México D.F., 1982. p.p. 13-39,68-71,74-78.
20. CSVS, "Validation Concepts for Computer System Used in the Manufacture of Drug Products", *Pharmaceutical Technology*, 10,5, (1986),24-34.
21. Deltz D., "Reconciling a Software Development Methodology with the PMA Validation Life Cycle", *Pharmaceutical Technology*, 16,6, (1992), 76-84.
22. Espectroscopía de Ultravioleta y Visible, Curso Básico, Perkin Elmer, México D.F., 1995.
23. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª ed.,México D.F., 1994.
24. Frings, C. S., "Calibration and Monitoring of Spectrophotometers, *Clin Chem.*, 25, (1979), 1013-17.
25. Guía de Prácticas Adecuadas de manufactura farmacéutica, 3ª. ed., Avalada por la Comisión Permanente de la FEUM, México, 1989. p.p. 1-3,8,26-28.
26. Guía de Procedimientos Adecuados de Laboratorio Analítico, CIPAM, México, 1989. p.p. 19-23.

27. Instructivo Para la Elaboración de Procedimientos Normalizados de Operación, Clave I-GA-01. Laboratorio Nacional de Salud Pública, 1989.
28. Lee, J., "Validating an Automated Filter Integrity Test Instrument, *Pharmaceutical Technology*, 13,10, (1989), 48-56.
29. Manual del Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Beckman DU Modelo 640, Fullerton C.A., U.S.A. 1993.
30. Morcillo, R. J., "Espectroscopía", Ed. Alhambra, Madrid, 1985. p.p. 1-18.
31. Neimey, J. M., "A Wavelength Standard for Ultraviolet, Visible-Near Infrared Spectrophotometry". *Applied Optics*, 1,3,(1962), 365-67.
32. Norma Oficial Mexicana de Metrología NOM-Z-55, "Metrología vocabulario de Términos Fundamentales y Generales", SECOFI, DGN, México D.F., 1986.
33. Nowicka-Jankowska, "Análisis Visible and Ultraviolet Spectrometry", Vol. 19, Amsterdam, 1986.
34. Robledo, C., "Introducción a las computadoras", Tlamatini Editores, México, 1990.
35. Skoog, D. A., "Análisis Instrumental", 2ª ed, Ed. Mc Graw-Hill, México D.F., 1989. p.p. 121-214.
36. Slavin, W., "Stray Light in Ultraviolet, Visible and Near Infrared Spectrophotometry", *Analytical Chemistry*, 35, 4,(1963), 561-66.
37. Strobel, H. A., "Instrumentación Química". Ed. Limusa, México D.F., 1989. p.p. 121-214.
38. Teagarden, C., "A Stepwise Approach to Software Validation", *Pharmaceutical Technology*, 13,9, (1989), 98-112.
39. Farmacopea U.S.P. XXII.
40. Wernimont, G., "Evaluating Laboratory Performance of Spectrophotometers", *Analytical Chemistry*, 39,6, (1967), 554-62.
41. Willar, M. D., "Métodos Instrumentales de Análisis", Ed. Continental, México D.F., 1986.

9. ANEXOS "FORMULARIO"

9.1. PRECISION

La precisión, se evalúa mediante el coeficiente de variación (C.V), el cual debe tener un valor menor del 2 %, para establecer que el equipo es preciso.

$$C.V = (s / X_p) * 100$$

Donde:

s = Desviación estándar de las lecturas

X_p = Promedio de las lecturas

9.2. LINEARIDAD

La linealidad se puede definir como la relación entre las cantidades de principio activo, es decir, la concentración y la respuesta obtenida. Esta función tiene una expresión del tipo:

$$Y = mx + b$$

Donde:

Y = Respuesta Obtenida

x = Cantidad de principio activo

m = Pendiente

b = Ordenada al origen

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9.3. ANALISIS DE VARIANZA

1. Establecer las siguientes hipótesis:

Ho: Y no depende de X

Ha: Y depende de X

Ho: No existe falta de ajuste a la relación lineal

Ha: Existe falta de ajuste a la relación lineal

2. Construcción de la tabla de Análisis de Varianza

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA				
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	$g = 1$	$SCr = (m^2 \sum xy) + (m^2 \sum y^2) - ((\sum y)^2 / h)$	$MCr = SCr$	$Fr = SCr / MCcr$
ERROR DE LA REGRESION	$gcr = (n-2)$	$SCcr = (\sum y^2) - (m^2 \sum xy) - (b^2 \sum y^2)$	$MCcr = SCcr / gcr$	
FALTA DE AJUSTE	$gfa = (n-2) - t(r-1)$	$SCfa = SCcr - SCcp$	$MCfa = SCfa / gfa$	$Ffa = MCfa / MCcp$
ERROR PURO	$gcp = (r-1)$	$SCcp = \sum y^2 - (\sum y)^2 / h$	$MCcp = SCcp / gcp$	

3. Determinar en la tabla de distribución "F", los valores para:

$F(1, n-2; 0.05)$

$F((n-2)-t(r-1), t(r-1); 0.05)$

3. Establecer la decisión conforme al siguiente criterio de aceptación:

Si $F_r \geq F(glr, gler; 0,05) = Y$ depende de X .

Si $F_r < F(glr, gler; 0,05) = Y$ no depende de X

Si $F_{fa} \geq F(glr, gler, 0,05) =$ Existe falta de ajuste a la relación lineal simple.

Si $F_{fa} < F(glr, gler, 0,05) =$ No existe falta de ajuste a la relación lineal simple.

9.4. CONSTRUCCION DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN (b)

A. Calcular la desviación estándar de la regresión ($sy.x$)

$$sy.x = (S_{cer}/gler)^{1/2}$$

B. Calcular la Desviación estándar de la ordenada al origen

$$S_b = sy.x \left(\frac{1}{n} + \frac{X_p^2}{(\sum x^2) - ((\sum x)^2/n)} \right)^{1/2}$$

C. Determinar en la tabla de distribución "t" de student, el valor para $t(n-2, 0,975)$

D. Calcular el intervalo de Confianza para b

$$I.C (B) = b \pm t_{(n-2, 0,975)} * (S_b)$$

9.5. CONSTRUCCION DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

A. Calcular la Desviación estándar de la pendiente

$$S_m = sy.x / (\sum x^2 - ((\sum x)^2/n))^{1/2}$$

B. Calcular el intervalo de confianza para la pendiente

$$I.C (M) = m \pm t_{(n-2, 0,975)} * (S_m)$$