

117



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA DETERMINAR N-BUTILBROMURO DE HIOSCINA EN COMPRIMIDOS QUE ADEMAS CONTIENEN METRONIDAZOL"

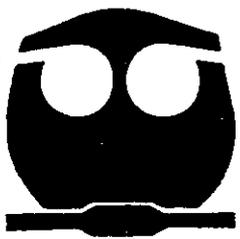
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VERENICE RIVAS ORTIZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

200/

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.

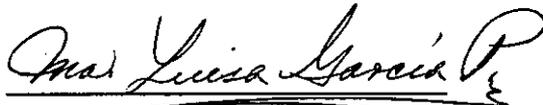
## JURADO ASIGNADO

- Presidente: Q.F.B. Maria Luisa García Padilla.
- Vocal: Q.F.B. Isaura Luisa Carrera García.
- Secretario: Q.F.B. Consuelo Ayala Mondragón.
- 1er. Suplente: Q.F.B. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez.
- 2do. Suplente: Q.F.B. Georgina Margarita Maya Ruiz.

El presente trabajo se desarrolló en:

Departamento de Control Analítico, ubicado en el sótano del edificio "B" de la Facultad de Química U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:



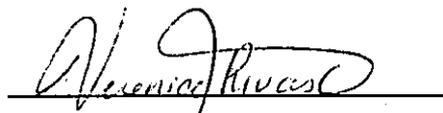
Q.F.B. Maria Luisa García Padilla

SUPERVISOR TÉCNICO:



Q.F.B. Rosa Lorenia Mora-Tovar y  
Chávez

SUSTENTANTE:



Verenice Rivas Ortiz

Quiero agradecer a los LABORATORIOS CARNOT PRODUCTOS CIENTIFICOS, S.A., por las facilidades que me dieron en la realización de este trabajo.

Asimismo a todo el equipo del Departamento de Control Analítico por todo su apoyo que me brindaron y sus buenos consejos.

## EL VALOR DE TU LUCHA

“Todos estamos expuestos a las situaciones difíciles: los ricos y los pobres, las personas cultas y las que no han recibido educación formal, hombres y mujeres, grandes y pequeños, jóvenes y viejos.

En ese aspecto de la vida nadie es diferente y nadie se escapa. Sin embargo en algunas ocasiones, cuando el dolor es muy grande, o cuando se nos juntan varias penas, sentimos que no vale la pena el esfuerzo, nos sentimos mas solos que nunca.

Nos inunda un sentimiento de impotencia, de enojo; la frustración de no poder hacer nada nos llena de rabia y de tristeza. Sentimos se nos acaba la fuerza y que ya no queremos seguir adelante.

Si alguna vez sientes que eres poco valioso o té falta confianza en ti mismo recuerda que:

A pesar del dolor, de las situaciones difíciles, de las pérdidas, de las desilusiones, de que algunas cosas salen mal y de que no siempre obtienes lo que quieres, sigues aquí; eso te hace valioso y admirable.

iiiESTAMOS AQUÍ Y SEGUIMOS ADELANTE!!! "

A mi madre le quiero dar las gracias por la oportunidad que me dio de estudiar y por todo su apoyo y paciencia.

A mi padre que aunque físicamente ya no se encuentra con nosotros, estoy segura que él esta muy orgulloso de todas nosotras.<sup>(†)</sup>

A mis hermanas EriKa, Selene, Pilar e Ivonne, les agradezco la paciencia que me tuvieron y por ser tan unidas y compartidas.

A mis sobrinos Eduardo, David y Andrea que los quiero mucho y espero que cuando lean este trabajo se acuerden de su tía.

A mis tíos y amigos, especialmente a mi tía Sofía que ella siempre ha sido muy importante en nuestras vidas.

# INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINAS</b>
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN</b>	
I. Introducción	1
I.1 Objetivos	2
<b>CAPITULO II. GENERALIDADES</b>	
II. Generalidades	3
II.1 Fuentes de Obtención	3
II.2 Química	3
II.3 Relación Estructura-Actividad	4
II.4 Mecanismo de Acción	4
II.5 Monografía	5
II.5.1 Nombres Químicos	5
II.5.2 Nombres Genéricos	5
II.5.3 Nombres Comerciales	5
II.5.4 Fórmula Condensada	5
II.5.5 Fórmula Desarrollada	6
II.5.6 Masa Molecular	6
II.5.7. Descripción	6
II.5.8. Solubilidad	6
II.5.9 Punto de fusión	6
II.5.10 Pruebas de identificación	7
II.5.11 Métodos de valoración	8
II.5.12 Condiciones de Almacenamiento	8
II.6 Información Médica del N-Butil-Bomuro de Hioscina	9
II.6.1 Indicaciones Terapéuticas	9
II.6.2 Farmacocinética y Farmacodinamia	9
II.6.3 Contraindicaciones	9

II.6.4 Precauciones o restricciones de su uso durante el embarazo y la lactancia	10
II.6.5 Reacciones secundarias y adversas	10
II.6.6 Interacciones medicamentosas	11
II.6.7 Vía de administración y dosis	11
II.7 Validación de Métodos Analíticos	12
II.7.1 Parámetros utilizados en la validación	12
II.7.2 Definiciones	12
<b>CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
III. Parte Experimental	18
III.1 Desarrollo del Método Analítico	18
III.2 Validación del Método de Ensayo Propuesto	20
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS</b>	
IV. Resultados	23
IV.1 Especificidad	23
IV.2 Linealidad del Sistema	27
IV.3 Repetibilidad del Sistema	30
IV.4 Linealidad del Método	31
IV.5 Exactitud y Repetibilidad del método al 100%	35
IV.6 Reproducibilidad del método	36
IV.7 Estabilidad de las soluciones obtenidas en el proceso de análisis	38
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES</b>	39
<b>APENDICE</b>	41
Cálculos de los parámetros de Validación:	
- Linealidad del Sistema	41
- Repetibilidad del Sistema	42
- Linealidad del Método	43

- Repetibilidad del Método	46
- Exactitud del Método al 100%	47
- Reproducibilidad del Método	48
- Estabilidad del Método	49
- Tabla de valores de $t$	52
- Tabla de valores de $F$	53
<b>CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>54</b>

# CAPITULO I

## I. INTRODUCCION

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al incremento de nuevos productos de uso terapéutico que requieren de métodos de análisis confiables, para evaluar su calidad.

En este trabajo se presenta el desarrollo y la validación de un método de análisis indicador de control de calidad para cuantificar *N-butilbromuro de hioscina* en comprimidos que también contienen metronidazol. Este alcaloide posee una actividad antimuscarínica ya que inhibe las acciones muscarínicas de la acetilcolina en efectores autónomos inervados por neuronas colinérgicas posganglionares y es por ello que se utiliza como un agente antiespasmódico.

Debido a que el N- butilbromuro de hioscina es una sal cuaternaria de amonio se utilizó el método del **Colorante ácido**, el cual se basa en la reacción de un colorante aniónico (Azul de bromotimol), con un compuesto catiónico (N-butilbromuro de hioscina), en una solución amortiguadora de pH específico ( $7.3 \pm 0,1$ ), para producir un compuesto de adición o par iónico colorido; el cual es soluble en un disolvente orgánico (Cloroformo) con el que se extrae. La fase clorofórmica se trató con una solución diluida de hidróxido de sodio para formar la sal del colorante, la cual es soluble en la fase acuosa impartándole una coloración azul. Esta intensidad de color de la sal se determina en la región visible a una longitud de onda de aproximadamente  $617 \text{ nm}$  obteniéndose en forma indirecta la concentración de N-butilbromuro de hioscina.

Para comprobar la confiabilidad del método, se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos: Linealidad y Repetibilidad del sistema, Especificidad, Exactitud, Linealidad, Precisión ( evaluada como Repetibilidad y Reproducibilidad ) del método y Estabilidad de las soluciones obtenidas durante el análisis.

Para comprobar la confiabilidad de los resultados, los datos obtenidos en cada determinación se trataron estadísticamente realizándose pruebas de  $t$  para establecer los límites de confianza para la pendiente y la ordenada al origen. También se realizó análisis de varianza en la evaluación de la reproducibilidad

del método , para comprobar que no existén diferencias significativas entre los 2 diferentes analistas que efectuaron las pruebas en distintos días.

### **I.1 OBJETIVOS**

- Desarrollar un método indicativo de control de calidad para determinar ***N-butilbromuro de hioscina*** en comprimidos que también contienen metronidazol.
- Validar el método analítico desarrollado, evaluando los siguientes parámetros:

#### **Sistema:**

Linealidad  
Repetibilidad

#### **Método:**

Especificidad  
Linealidad  
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)  
Exactitud  
Estabilidad de la muestra analítica.

# CAPITULO II

## II. GENERALIDADES<sup>(1)</sup>

El N- butilbromuro de hioscina o Escopolamina es un fármaco que inhibe las acciones de la acetilcolina (Ac) sobre los efectores autónomos inervados por fibras colinérgicas posganglionares. También inhibe las acciones de la Ac sobre los receptores muscarínicos neuronales y ganglionares y sobre las células del músculo liso que carecen de inervación colinérgica. Dado que este tipo de fármacos antagonizan las acciones muscarínicas de la Ac, se conocen como *agentes antimuscarínicos o agentes bloqueantes colinérgicos muscarínicos*. Como los principales efectos de la mayoría de los miembros de esta clase de fármacos son cualitativamente similares a los de su miembro más conocido, la atropina, se utiliza también el término *atropínico*.

Las uniones neuroefectoras parasimpáticas de los diferentes órganos no son sensibles por igual a los antagonistas de los receptores muscarínicos. Las dosis pequeñas deprimen la secreción salival, bronquial y la sudoración. A dosis mayores se dilata la pupila, se inhibe la acomodación ocular para la visión de cerca y se bloquean los efectos vagales sobre el corazón, de modo que la frecuencia cardíaca se incrementa. Dosis mayores inhiben el control parasimpático de la vejiga y el tracto gastrointestinal, inhibiendo así la micción y disminuyendo el tono y la motilidad del intestino. Se requieren aún dosis mayores para inhibir la secreción y motilidad gástrica.

### II.1 FUENTES DE OBTENCION<sup>(1)</sup>

Los agentes antimuscarínicos naturales son los alcaloides de las plantas de la familia de las solanáceas y los más importantes son: *la atropina y la escopolamina*.

Estas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. La *Atropa belladonna* contiene principalmente el alcaloide Atropina. El alcaloide Escopolamina se halla principalmente en el arbusto *Hyoscyamus niger* y en *Scopolia carniolica*.

### II.2 QUIMICA<sup>(1,17)</sup>

Estos alcaloides son ésteres orgánicos formados por la combinación de un ácido aromático, el ácido trópico y bases orgánicas complejas, tropina (tropanol) o escopina. La escopolamina sólo difiere de la tropina en que posee un puente de oxígeno entre los átomos de carbono designados con los números 6 y 7 en las fórmulas estructurales del cuadro siguiente:



## II.5 MONOGRAFIA

### II.5.1 NOMBRES QUIMICOS <sup>(3)</sup>

- Bromuro de N-butilescopolamonio.
- Bromuro de [ 7(S)-1( $\alpha$ ),2( $\beta$ ), 4 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,7 $\beta$ ] -9-butyl-7-(3-hidroxi-1-oxo-2-fenilpropoxi)-9-metil-3-oxa-9-azoniatriciclo [3.3.1.0<sup>2,4</sup>] nonano.

### II.5.2 NOMBRES GENERICOS<sup>(4,5)</sup>

Bromuro de butil escopolamina

N- butil bromuro de hioscina

N- butil bromuro de escopolamina

Bromobutilato de escopolamina

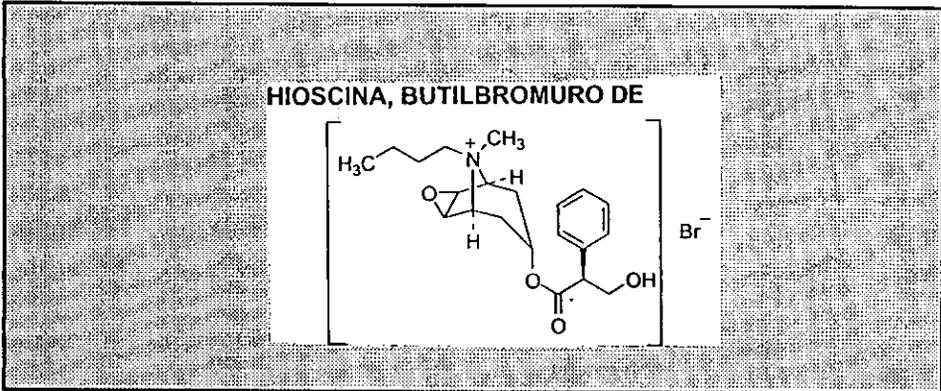
### II.5.3 NOMRES COMERCIALES<sup>(6)</sup>

Amisepan	Buscapina
Buscol	Buscalamin
Buscolysin	Scobro
Tirantil	Buscopna
Butylmina	Sparicon
Sporamin	

### II.5.4 FORMULA CONDENSADA<sup>(5,6,7)</sup>



## II.5.5 FORMULA DESARROLLADA<sup>(3,6)</sup>



## II.5.6 MASA MOLECULAR<sup>(3,4,5)</sup>

440.40

## II.5.7 DESCRIPCION<sup>(3,4,5,6,7)</sup>

Es un polvo cristalino, blanco o ligeramente blanco, inodoro y con sabor amargo.

## II.5.8 SOLUBILIDAD<sup>(3,5,7)</sup>

Disolvente	Solubilidad
Agua	Muy Soluble
Cloruro de metileno	Muy Soluble
Cloroformo	Soluble
Diclorometano	Soluble
Etanol	Poco soluble
Eter	Insoluble

## II.5.9 PUNTO DE FUSION<sup>(6,7)</sup>

140°C a 144°C

## II.5.10 PRUEBAS DE IDENTIFICACION

### II.5.10.1 Espectroscopía Infrarroja

El espectro infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, exhibe máximos y mínimos solamente a las mismas longitudes de onda, que las de una preparación similar a la sustancia de referencia de butilbromuro de hioscina.<sup>(3)</sup>

Los principales bandas de absorción de la escopolamina se presentan a las siguientes longitudes de onda:

1175, 1721, 1052, 874, 1072, 709  $\text{cm}^{-1}$  (nujol)<sup>(7)</sup>

### II.5.10.2 Espectroscopía Ultravioleta<sup>(4,7,8)</sup>

El espectro de absorción en la región ultravioleta ( 240 nm a 350 nm) de la muestra al 0.05 por ciento p/v en solución de ácido clorhídrico 0.01N, presenta máximos de absorción aproximadamente a 252 nm , 258nm y 264 nm y un máximo menos definido a 247 nm; los valores del

$E_{1\%}^{1\text{cm}}$  a estas longitudes de onda son:

	Longitud de onda (nm)	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$
N-Butilbromuro de hioscina	252	3.7
	258	4.6
	264	3.6

### II.5.10.3 Identificación de Bromuros<sup>(3)</sup>

Da positivas las reacciones características del ión bromuro.

### II.5.10.4 Reacciones específicas para alcaloides tropánicos<sup>(4)</sup>

Reacción de Vitali's Morin:

A un miligramo de la muestra, agregar 0.2 mL de ácido nítrico fumante y evaporar a sequedad en un Baño María . Disolver el residuo en 2 mL de acetona y agregar 0.1 mL de solución reactivo de hidróxido de potasio en metanol al 3 por ciento m/v. Se produce un color violeta.

### **II.5.10.5 Rotación específica<sup>(3)</sup>**

Entre  $-18^{\circ}$  a  $-20^{\circ}$  calculada con referencia a la sustancia seca. Determinar en una solución al 5.0 por ciento preparada con agua libre de dióxido de carbono.

## **II.5.11 METODOS DE VALORACION**

### **II.5.11.1 Método volumétrico<sup>(3,4)</sup>**

#### **a. Titulación no acuosa**

Se utiliza ácido acético glacial como disolvente, se agrega solución de acetato de mercurio y se titula con una solución valorada de ácido perclórico. El punto final se determina potenciométricamente o bien se utiliza 1- naftolbenceína como indicador.

#### **b. Titulación acuosa**

El N-butilbromuro de hioscina así como otras sales de amonio cuaternario de los alcaloides del tropano, pueden ser determinadas por titulación después de pasar sus soluciones acuosas a través de una resina adecuada de intercambio iónico, como a continuación se indica:

Una cantidad exactamente pesada de la muestra se disuelve en 10 mL de agua, se pasa a través de una columna de resina empacada con IR A 400, con flujo de 1 mL por minuto. La columna se lava finalmente con agua; se agregan al eluato 10 mL de solución valorada de HCl 0.1 N y 10 mL de agua y el exceso de ácido es retro-titulado con solución de NaOH 0.1 N.

### **II.5.11.2 Método colorimétrico<sup>(10,13,14)</sup>**

El método del Colorante Acido es un método de análisis aplicable para la evaluación de sales de amonio cuaternario y de bases nitrogenadas como las aminas primarias, secundarias y terciarias<sup>10</sup>. Este procedimiento también llamado Extracción de Par Iónico, está basado en la reacción de un colorante aniónico con un compuesto catiónico, en una solución amortiguadora de pH específico, para producir un compuesto de adición o par iónico colorido, el cual es soluble en un disolvente orgánico, con el que se extrae cuantitativamente, permitiendo su determinación espectrofotométrica.

## **II.5.12 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO<sup>(11,12)</sup>**

Protéjase de la luz

## II.6 INFORMACION MEDICA DEL N- BUTIL BRROMURO DE HIOSCINA

### II.6.1 Indicaciones terapéuticas<sup>(13,14)</sup>

El N-butilbromuro de hioscina está indicado para el tratamiento del colon irritable, úlcera gástrica y duodenal y trastornos de la motilidad del tracto gastrointestinal, pilorospasmo del lactante, vómitos postanestésicos, estreñimiento espástico. Espasmos y disquinesias de las vías biliares y urinarias. Espasmos de las partes blandas musculares durante el parto y trastornos dismenorreicos.

### II.6.2 Farmacodinamia y Farmacocinética<sup>(13,14)</sup>

#### *Farmacodinamia:*

Se caracteriza por su especial punto de acción en las células nerviosas de los plexos parasimpáticos de los órganos internos. Ejerce así una acción espasmolítica específica sobre la musculatura lisa del tracto gastrointestinal y de las vías biliares y urinarias.

El mecanismo de acción que sigue el N-butilbromuro de hioscina es inhibir las acciones muscarínicas de la acetilcolina sobre los efectos autónomos, produciendo disminución de secreciones y motilidad gastrointestinal.

#### *Farmacocinética:*

- *Absorción:* El N-butilbromuro de hioscina es rápidamente absorbido por vía oral y se acumula en el tejido gastrointestinal, hígado y riñón.
- *Distribución:* Se distribuye ampliamente en todos los tejidos del cuerpo. Cruza la placenta y probablemente la barrera hematoencefálica.
- *Metabolismo:* Probablemente se metaboliza por completo en el hígado; sin embargo, se desconoce su destino metabólico exacto.
- *Excreción:* Se excreta probablemente en la orina como metabolitos.

### II.6.3 Contraindicaciones<sup>(13,14)</sup>

Se desconocen hasta el momento las contraindicaciones por vía oral.

No debe administrarse por vía parenteral en las siguientes enfermedades: glaucoma, hipertrofia de la próstata con tendencia a retención de orina , estenosis mecánicas a nivel del tracto gastrointestinal, taquicardia y megacolon.

#### **II.6.4 Precauciones o restricciones de su uso durante el embarazo y la lactancia <sup>(15,16)</sup>**

*Embarazo:* No es aconsejable su uso durante el primer trimestre del embarazo.

*Lactancia:* Puede excretarse en la leche materna, produciendo posible toxicidad para el lactante. Las pacientes que están lactando evitarán este medicamento.

#### **II.6.5 Reacciones secundarias y adversas<sup>(15,16,17)</sup>**

##### *Sistema Nervioso Central (SNC):*

Cefalea, desorientación, inquietud, letargo, irritabilidad, mareo, alucinaciones, trastornos de la memoria, confusión, conducta violenta, amnesia, inconsciencia.

##### *Cardiovascular (CV):*

Palpitaciones, taquicardia, bradicardia.

##### *Oftálmico:*

Pupilas dilatadas, visión borrosa, fotofobia, sequedad, comezón o enrojecimiento ocular, glaucoma ocular.

##### *Gastrointestinal (GI):*

Estreñimiento, sequedad bucal, erupción, eritema, disfagia, náuseas, vómito, malestar epigástrico.

##### *Genitourinario (GU):*

Disuria.

##### *Piel:*

Rubor, sequedad

## II.6.6 Interacciones medicamentosas <sup>(15,16)</sup>

En el caso de administración parenteral, es posible que los antidepresivos tricíclicos, quinidina y amantadina, potencien la acción anticolinérgica del N-butilbromuro de hioscina.

## II.6.7 Vía de administración y dosis <sup>(15,16)</sup>

Adultos

DOSIS	VIA DE ADMINISTRACION	TIEMPO
0.5 mg a 1 mg	Oral	3 a 4 veces al día
0.3 mg a 0.6 mg	Intramuscular , venosa o subcutánea	3 a 4 veces al día
0.4 a 0.6 mg	Subcutánea	Para reducir secreciones en el preoperatorio

Niños

DOSIS	VIA DE ADMINISTRACION	TIEMPO
0.006 mg/kg	Oral o Subcutánea	3 a 4 veces/día

## II.7 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS<sup>(18,19,20,21)</sup>

En los últimos años la validación de métodos analíticos ha adquirido gran importancia en la industria farmacéutica, cuyo objetivo principal es fabricar productos que permitan recuperar la salud o prevenir padecimientos y que por lo tanto, tienen requisitos estrictos de calidad. Por esta razón, es necesario validar tanto el proceso de fabricación de dichos productos como el método analítico para evaluar su calidad.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos. Todo método debe de estar soportado con suficientes datos de laboratorio (lotes, estándares de referencia, espectrogramas, resultados, cálculos, etc.) que documenten su validez.

### II.7.1 Parámetros utilizados en la validación

La validación incluye :

a) SISTEMA: Se utiliza solamente la sustancia que se analiza. Se evalúa:

Linealidad  
Precisión (Repetibilidad)

b) METODO: Las determinaciones se realizan con muestras que contienen los componentes de la formulación. Se evalúa:

Especificidad  
Linealidad  
Exactitud  
Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)  
Estabilidad de la muestra analítica

### II.7.2 Definiciones

#### II.7.2.1 ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra, como excipientes, productos de degradación, sustancias relacionadas, disolventes

residuales, compuestos de síntesis, etc.; los cuales no deben interferir ni influenciar el resultado analítico

Este es un requisito importante para pruebas de identificación y para métodos cuantitativos indicadores de control de calidad e indicadores de estabilidad de principios activos y formulaciones.

Para evaluar este factor, se necesita reconocer las posibles interferencias procedentes no del proceso de manufactura sino también de los productos producidos durante el almacenaje.

## II.7.2.2 LINEALIDAD

Es la habilidad de un sistema o de un método analítico que permite asegurar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

### a. Linealidad del sistema

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de de una misma solución del analito y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. Deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%

El intervalo entre las concentraciones a analizar, dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica.

#### Criterio:

$CV \leq 1.5\%$	$r^2 \geq 0.98$
$r \geq 0.99$	

### b. Linealidad del método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado en cada caso.

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

La línea recta se obtiene a través de tratamiento estadístico y está definida por la siguiente ecuación:

$$Y = mx + b$$

En donde:

**Y**= Cantidad recobrada  
**x** = Cantidad adicionada  
**b** = Ordenada al origen  
**m**= Pendiente

**Criterio:**

$CV \leq 3.0\%$	$m = 1$	$r^2 \geq 0.98$
$r \geq 0.99$	$b = 0$	

Pruebas de t y F se encuentran en el Anexo 1

### II.7.2.3 PRECISION

La precisión se expresa como la concordancia entre los valores de los resultados de mediciones experimentales sucesivas, que se obtienen bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y/o bajo diferentes condiciones de trabajo (reproducibilidad).

#### a. Repetibilidad

- La repetibilidad del sistema se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución del analito correspondiente al 100%.

**Criterio:**

$CV \leq 1.5\%$
-----------------

- La repetibilidad del método se determina al realizar el análisis de un mínimo de seis muestras correspondientes a un placebo adicionado con el 100% del analito. Se calcula el coeficiente de variación con los resultados obtenidos.

**Criterio:**

$$CV \leq 3.0\%$$

### **b. Reproducibilidad**

La reproducibilidad del método se refiere a la concordancia de los valores de los resultados de mediciones experimentales sucesivas, que se obtienen bajo diferentes condiciones de trabajo.

La reproducibilidad del método se determina al analizar muestras de placebos cargados, por triplicado con dos analistas, en dos días diferentes. Se trabaja de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica.

**Criterio:**

El Coeficiente de variación total debe cumplir con el siguiente criterio:

METODOS	CV
Químicos y espectrofotométricos	$\leq 3.0 \%$

Los resultados de reproducibilidad se sujetan a un diseño factorial de dos factores o niveles y a un tratamiento estadístico de análisis de varianza para obtener el coeficiente de variación total; donde se generan las F correspondientes a las dos fuentes de variación analítica: días y analistas.

**Criterio:**

$F_a < F_{gla, gld; 0.05}$  = Método analítico es reproducible por los analistas

$F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$  = Método analítico no es reproducible por los analistas

$F_d < F_{gld, gld; 0.05}$  = Método analítico es reproducible en diferentes días

$F_d \geq F_{gld, gld; 0.05}$  = Método analítico no es reproducible en diferentes días

### **II.7.2.4 EXACTITUD DEL METODO**

Es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, se expresa como el porciento de recobro obtenido del

Es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina por sextuplicado, con placebos cargados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto.

**Criterio:**

Los porcentos de recobro deben encontrarse en el intervalo indicado en la tabla siguiente:

Los CV de cada nivel y los globales deben estar de acuerdo al siguiente criterio:

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Químico y espectrofotométrico	97.0 - 103.0%	≤3.0%

**Prueba de t**

1.- Si la  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}(n-1, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 100 %, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente del 100%.

**II.7.2.5 ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES OBTENIDAS EN EL PROCESO DE ANALISIS**

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Este parámetro es importante, pues permite la versatilidad del método.

Se analiza una muestra por triplicado en las condiciones normales, en seguida se almacenan las muestras bajo diferentes condiciones como por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc. Al cabo de un tiempo determinado, se reanalizan bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada condición.

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

La media del factor (I) para cada condición/tiempo se debe encontrar entre los valores de 97.0% y 103.0%.

**Nota: Los cálculos para cada uno de los parámetros de la validación se presentan en el Anexo**

# CAPITULO III

## III. PARTE EXPERIMENTAL

Aplicación del método analítico, para cuantificar N-butilbromuro de hioscina contenido en la forma farmacéutica (comprimidos) que presenta la siguiente formulación.

### Fórmula:

Cada comprimido contiene:

Metronidazol	500 mg
N-butilbromuro de hioscina	10 mg
Excipiente cbp	1 comprimido

## III.1 DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

### III.1.1 Reactivos, soluciones y sustancia de referencia

- *Cloroformo (Reactivo Analítico)*

- Solución amortiguadora de Azul de Bromotimol, pH 7.3 ( $\pm 0.1$ ).

En un matraz aforado de 500 mL, disolver 0.200 g de azul de bromotimol en 3.2 mL de NaOH 0.1 N, agregar aproximadamente 200 mL de agua destilada y 0.5775 g de ácido cítrico monohidratado, agitar y adicionar 6.317 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, agitar hasta disolución y llevar al aforo con agua destilada.

- Solución de Hidróxido de Sodio 0.05 N aproximadamente.

- N- butilbromuro de hioscina, sustancia de referencia.

- Preparación de la solución de la sustancia de referencia.

Transferir 0.025 g de de N-butilbromuro de hioscina sustancia de referencia a un matraz volumétrico de 500 mL, agregar aproximadamente 200 mL de agua destilada, agitar hasta disolución, llevar al volumen con agua destilada y mezclar.

- Preparación de la solución problema.

Pulverizar finamente 20 comprimidos, pesar el equivalente a 0.0005 g de N-butilbromuro de hioscina (aproximadamente 38 mg de la mezcla) y transferirlo a un embudo de separación de 250 mL; agregar 10 mL de agua destilada y agitar durante un minuto.

### III.1.2 Procedimiento.

Transferir 10.0 mL de la solución de la sustancia de referencia a un embudo de separación de 125 mL. Con dicha solución y con la solución problema proceder como a continuación se indica:

- a. Agregar 10 mL de solución amortiguadora de pH 7.3 azul de bromotimol, mezclar durante 30 segundos y extraer con 3 porciones de 25 mL de cloroformo, cada una.
- b. Filtrar la fase orgánica por papel filtro whatman No. 1, recibiendo los extractos cloroformicos filtrados en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con cloroformo.
- c. Transferir 15.0 mL de la solución a otro embudo de separación, adicionar 15.0 mL de la solución de NaOH 0.05 N y agitar durante 30 segundos.
- d. Dejar separar las fases y filtrar la fase acuosa por papel filtro Whatman No. 1, recibéndola en un vaso de precipitados de 50 mL.
- e. Determinar las absorbancias de la solución de la sustancia de referencia y de la solución problema, en un espectrofotómetro adecuado, a aproximadamente 617 nm, utilizando solución de NaOH 0.05 N como blanco de referencia para ajustar.

### III.1.3 CALCULOS

Calcular la cantidad de N-butilbromuro de hioscina expresada en miligramos por comprimido, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de N- butilbromuro de hioscina/comprimido} = \frac{(A_p / A_{st}) \times C \times FD \times PM}{M}$$

En donde:

- Ap = Absorbancia de la solución de la muestra problema
- Ast = Absorbancia de la solución de la sustancia de referencia
- C = Concentración de la sustancia de referencia en la solución final, expresada en mg
- FD = Factor de dilución de la muestra
- PM = Peso promedio del comprimido, expresado en mg
- M = Muestra utilizada en el análisis expresada en mg

### **III.2 VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS PROPUESTO**

Para validar el método analítico, se evaluaron los siguientes parámetros:

#### **III.2.1 Especificidad**

Se efectuó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda entre 560 nm y 650 nm, de las siguientes soluciones obtenidas después de aplicar el procedimiento en las siguientes muestras:

1. Placebo preparado con todos los componentes de la formulación, excepto el N-butilbromuro de hioscina.
2. Sustancia de Referencia
3. Muestra Problema

#### **III.2.2 Linealidad del sistema**

Se construyó una curva de calibración (Cantidad adicionada vs Absorbancia) con los datos obtenido al analizar soluciones de N-butilbromuro de hioscina, sustancia de referencia, en concentraciones correspondientes al 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, partiendo de una solución inicial.

Cada una de las concentraciones se analizó por duplicado.

#### **III.2.3 Repetibilidad del sistema**

Se determinó por el análisis sextuplicado de una misma solución correspondiente al 100% de N-butilbromuro de hioscina.

### **III.2.4 Linealidad del método**

Este parámetro se evaluó con muestras de placebos adicionados con la sustancia de interés ( N-Butilbromuro de hioscina ), con diferentes concentraciones ( 80%, 90%, 100% y 110%) de la cantidad expresada en el marbete de los comprimidos que se analizan. El análisis de cada placebo se efectuó por triplicado.

### **III.2.5 Exactitud del método**

Se efectuó analizando 6 muestras diferentes de placebos cargados con N-butilbromuro de hioscina, sustancia de referencia, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete del producto. Se compararon los porcentajes de la cantidad encontrada, con los porcentajes adicionados de la sustancia de referencia.

### **III.2.6 Repetibilidad del método**

Se determinó analizando 6 muestras diferentes de un placebo adicionado con N-butilbromuro de hioscina con una concentración que corresponde al 100% de la cantidad expresada en el marbete y realizando el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

### **III.2.7 Reproducibilidad del método**

Se determinó analizando por triplicado una muestra de un placebo al que se le adicionó N-butilbromuro de hioscina, en una concentración que corresponde al 100% de la cantidad expresada en el marbete de la muestra problema. Los análisis se efectuaron por 2 analistas en días diferentes.

### **III.2.8 Estabilidad de la muestra analítica**

Para evaluar este parámetro, se analizaron tres muestras analíticas de un placebo al que se le adicionó N-butil bromuro de hioscina, sustancia de referencia, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete. Dichas soluciones se prepararon como se indica en "preparación de la muestra problema" y se mantuvieron bajo las siguientes condiciones:

- \* Luz blanca
- \* Refrigeración
- \* Oscuridad

Se desarrolló el procedimiento analítico para cuantificar el N-butilbromuro de hioscina, en las soluciones recién preparadas y después de 3 y 6 horas de mantener las muestras en las condiciones anteriormente mencionadas.

# CAPITULO IV

## IV. RESULTADOS

### IV.1 ESPECIFICIDAD

Los resultados obtenidos para evaluar este parámetro se muestran en la Tabla No. 1. Asimismo, se presentan los espectros de absorción correspondientes:

- Solución del Placebo (sin analito), Espectrograma No. 1
- Solución de la Sustancia de Referencia, Espectrograma No.2
- Solución de la Muestra Problema, Espectrograma No. 3

TABLA No. 1

Tipo de muestra	Absorbancia $\lambda = 617 \text{ nm}$
Placebo(sin analito)	Despreciable
Sustancia de Referencia	0.343
Muestra Problema	0.342

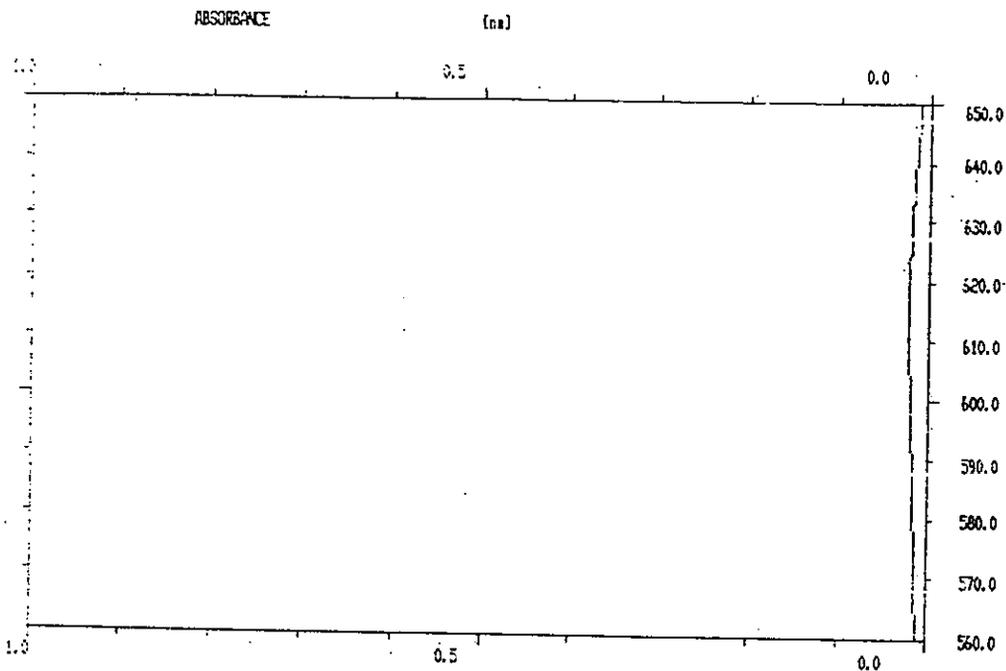
#### Análisis de los resultados

Analizando los datos espectrofotométricos obtenidos se plantea lo siguiente:

- En cuanto al placebo (sin analito), se observa que éste no desarrolla la reacción característica del N-butilbromuro de hioscina, ya que la absorbancia a la longitud de onda de aproximadamente 617 nm fue despreciable, por lo anterior, ni los excipientes ni los otros componentes de la formulación causan interferencia en la cuantificación de este alcaloide.
- Los espectros de absorción obtenidos al efectuar el procedimiento propuesto para la valoración de N-butilbromuro de hioscina, en la sustancia de referencia y en la muestra problema, son semejantes. Ambos presentan el máximo de absorbancia a la misma longitud de onda.



# ESPECTROGRAMA No. 1



THRESHOLD : 0.100

BATCH: 008

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	18:04	No Peaks detected !	

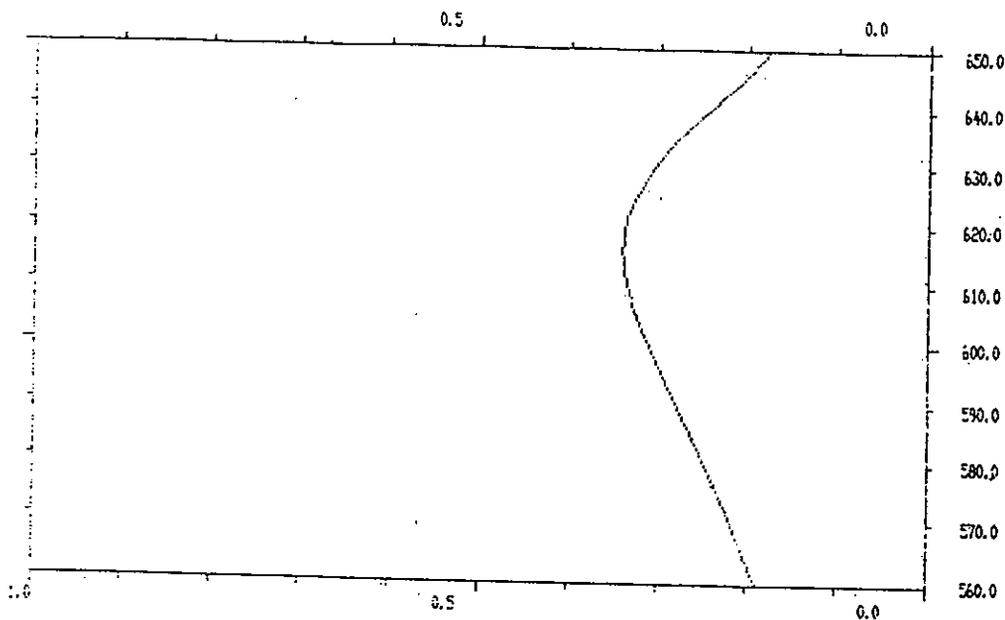
**SOLUCION DEL PLACEBO (SIN ANALITO)**



ABSORBANCE

### ESPECTROGRAMA No. 2

(nm)



THRESHOLD : 0.100

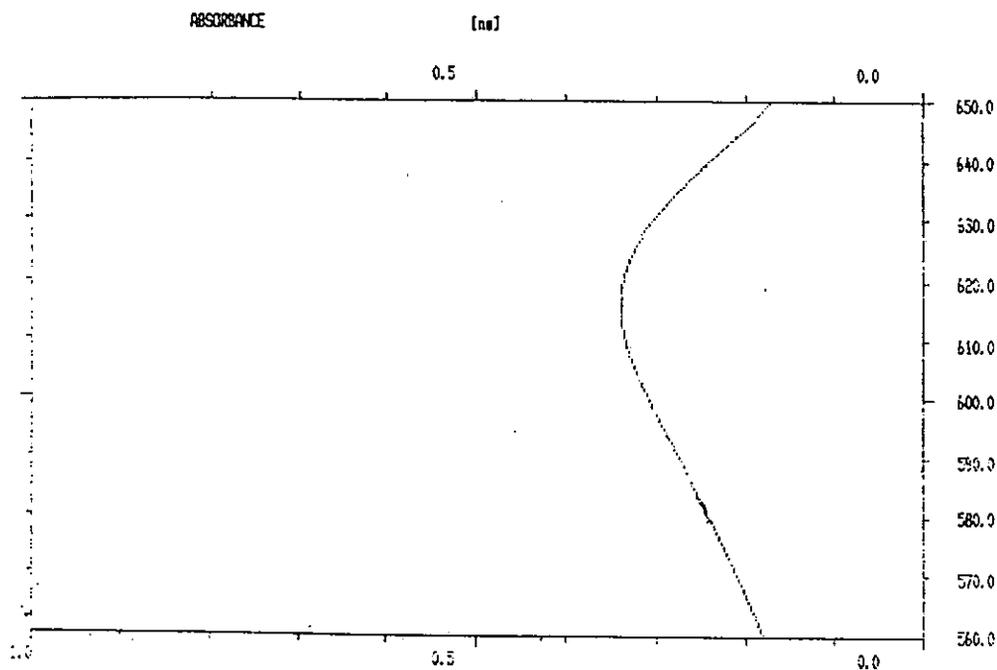
BATCH: 007

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	18:01	615.9 nm (MAX)	0.343 ABS

**SOLUCION DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA**



### ESPECTROGRAMA No. 3



THRESHOLD : 0.100

BATCH: 006

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	17:58	616.2 nm (MAX)	0.342 ABS

SOLUCION DE LA SUSTANCIA PROBLEMA

#### IV.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla No. 2 y en la gráfica No. 1 en donde se observa la tendencia lineal de los datos.

**TABLA No. 2**

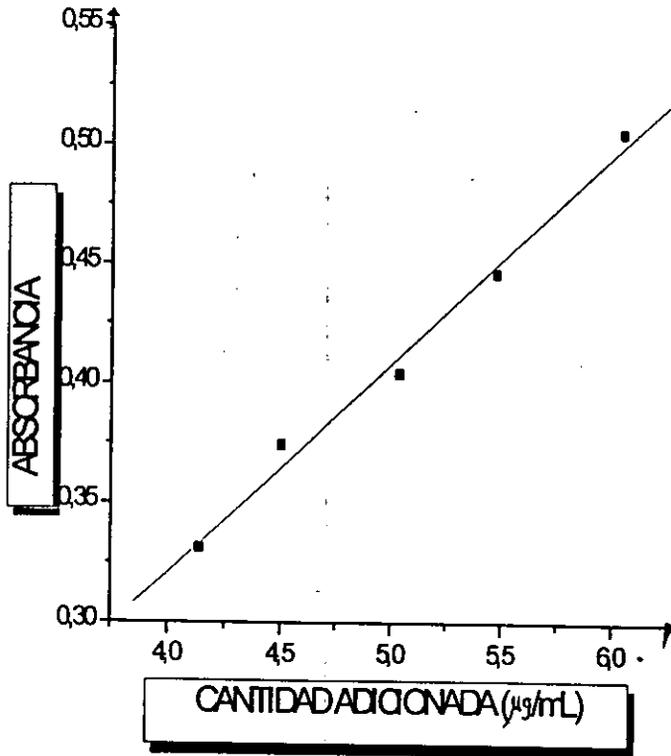
ANALISIS	CANTIDAD ADICIONADA ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABSORBANCIA 617 nm
1	4.14	0.331
2	4.14	0.331
1	4.50	0.369
2	4.50	0.379
1	5.04	0.405
2	5.04	0.404
1	5.48	0.441
2	5.48	0.452
1	6.05	0.503
2	6.05	0.507

PROMEDIO CANTIDAD ADICIONADA ( $\mu\text{g/mL}$ )	PROMEDIO DE ABSORBANCIA	REGRESION LINEAL
4.14	0.331	$r = 0.9945$ $r^2 = 0.9890$ $CV = 1.5\%$
4.50	0.374	
5.04	0.404	
5.48	0.446	
6.05	0.505	

GRAFICA No.1

SOLUCION DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA DE N-BUTILBROMURO DE HIOSCINA

LINEALIDAD DEL SISTEMA



**Criterio de aceptación:**

$CV \leq 1.5\%$ $r \geq 0.99$	$r^2 \geq 0.98$
----------------------------------	-----------------

### **Análisis de Resultados**

Analizando los resultados obtenidos se concluye que:

#### **a) COEFICIENTE DE CORRELACION LINEAL Y DE DETERMINACION**

Estos valores se encuentran dentro de los criterios establecidos para la linealidad del sistema, ya que  $r^2$  es mayor a 0.98 y  $r$  es mayor a 0.99, por lo tanto existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la absorbancia.

#### **b) COEFICIENTE DE VARIACION**

El valor del coeficiente de variación fue del 1.5 %, el cual se encuentra dentro del criterio establecido.

### IV.3 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA AL 100%

En la tabla No. 3 se muestran los resultados obtenidos al evaluar este parámetro:

**TABLA No. 3**

ANALISIS	CANTIDAD ADICIONADA ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABSORBANCIA (617 nm)
1	5.04	0.404
2	5.04	0.393
3	5.04	0.405
4	5.04	0.407
5	5.04	0.400
6	5.04	0.406
Parámetros calculados:		$\bar{X} = 0.4025$ $S = 0.00524$ $n = 6$ $CV = 1.30\%$

**Criterio de aceptación:**

$CV \leq 1.5\%$

#### Análisis de Resultados

Ya que el valor del coeficiente de variación es menor del 1.5%, se establece que el sistema es repetible y por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

#### IV.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Este parámetro se evaluó con muestras de placebos adicionados con la sustancia de interés con diferentes concentraciones ( 80%, 90%, 100%, 110% y 120%) de la cantidad expresada en el marbete de los comprimidos que se analizan. El análisis de cada placebo se efectua por triplicado.

En la tabla No. 4 se muestran los resultados de los análisis y en la gráfica No. 2 la tendencia lineal de los datos obtenidos.

**TABLA No. 4**

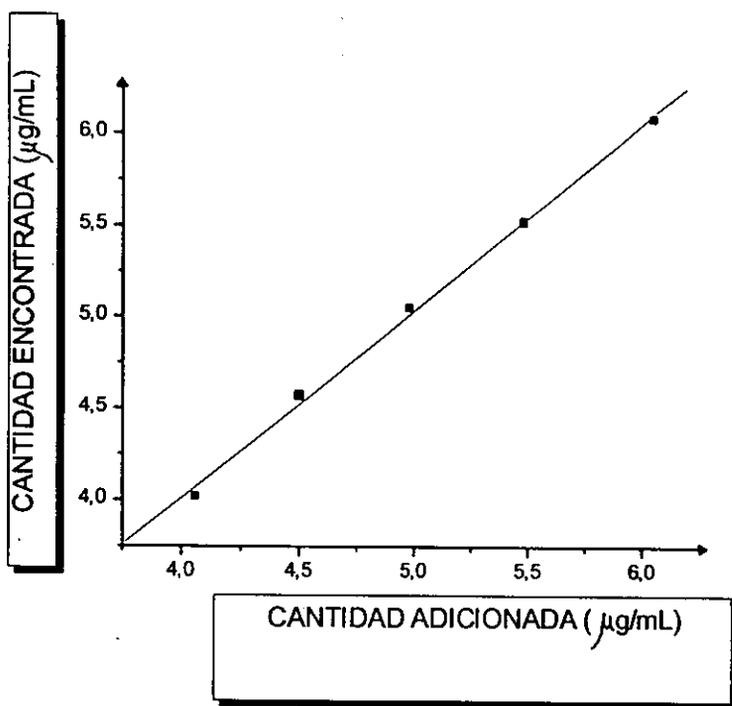
ANÁLISIS	CANTIDAD ADICIONADA (µg)	CANTIDAD ENCONTRADA (µg)	%ENCONTRADO
1	4.06	3.99	98.3
2	4.06	4.05	99.8
3	4.06	4.01	101.2
1	4.50	4.57	101.6
2	4.50	4.58	100.2
3	4.50	4.56	101.3
1	4.98	5.10	102.4
2	4.98	5.05	101.4
3	4.98	4.99	99.8
1	5.48	5.48	100.0
2	5.48	5.60	102.2
3	5.48	5.49	100.2
1	6.05	6.09	100.7
2	6.05	6.07	100.3
3	6.05	6.08	100.5

Concentración %	Promedio de Cantidad adicionada (µg)	Promedio de cantidad encontrada (µg)
80	4.06	4.02
90	4.50	4.57
100	4.98	5.05
110	5.48	5.52
120	6.05	6.08
Parámetros calculados:		b= -0,0666 m= 1,0200 r= 0.9972 r <sup>2</sup> = 0.9944

GRAFICA No.2

PLACEBO CARGADO CON N-BUTILBROMURO DE HIOSCINA

LINEALIDAD DEL METODO



**Criterio de aceptación:**

$m=1$	$r^2 \geq 0.98$	
$b=0$	$r \geq 0.99$	$CV < 3.0\%$

**Prueba de "t de student", aplicada para la pendiente y la ordenada al origen.**

Pendiente	Ordenada al origen
$t_{cal} = 1.0 \text{ E-}4$	$t_{cal} = 0.6998$
$t_{tab} = 3.182$	$t_{tab} = 3.182$
L.C. = $1.0200 \pm 0.0987$	L.C. = $-0.0666 \pm 0.4999$
L.S. = 1.1187	L.S. = 0.4300
L.I. = 0.9213	L.I. = -0.5665

**Análisis de Resultados:**

**a) COEFICIENTE DE CORRELACION LINEAL Y DE DETERMINACION**

Estos valores se encuentran en los criterios establecidos para la linealidad del sistema, ya que  $r^2$  es mayor a 0.98 y  $r$  es mayor a 0.99, por lo tanto existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

**b) PENDIENTE (m)**

Como  $t_{cal} < t_{tab} (3,0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 1, se acepta  $H_0$  y se establece que el valor de la pendiente obtenida de forma experimental no es significativamente diferente de 1.

**c) ORDENADA AL ORIGEN (b)**

Como  $t_{cal} < t_{tab} (3,0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 0, se acepta  $H_0$  y se establece que el valor de la ordenada al origen obtenida en forma experimental no es significativamente diferente de 0.

#### **d) COEFICIENTE DE VARIACION**

El coeficiente de variación obtenido fue del 1.1%, dicho valor es menor de 3.0%, por lo tanto el método es lineal.

#### IV.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO AL 100%

En la tabla No. 5 se presentan los datos obtenidos para evaluar estos parámetros.

TABLA No. 5

ANÁLISIS	CANTIDAD ADICIONADA (µg)	CANTIDAD ENCONTRADA (µg)	%DE RECOBRO
1	4.98	5.10	102.3
2	4.98	4.90	97.0
3	4.98	5.09	101.2
4	4.98	4.90	97.0
5	4.98	5.05	101.0
6	4.98	4.99	100.3
Parámetros calculados:			N = 6 X = 99.8% SD = 2.3 C.V = 2.3% t cal = -0.2167 t tab = 2.571 L.C = 99.8 ± 2.37 L.S. = 102.17 L.I. = 97.42

Criterio de aceptación:

METODO	PROMEDIO DE RECOBRO	CV
Químico y espectrofotométrico	97.0 - 103.0%	≤3.0%

#### Análisis de Resultados

El coeficiente de variación obtenido fue del 2.3%, dicho valor es menor de 3.0%, por lo tanto, se puede decir que el método es repetible.

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(5,0.975)}$  y los límites de confianza incluyen al 100% por lo tanto se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor medio obtenido en forma experimental no es

significativamente diferente al 100% , por lo anterior se puede decir que el método es exacto.

#### 1V.6 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

En la tabla No. 6 se presentan los resultados de los análisis realizados por 2 analistas en diferentes días, para evaluar este parámetro:

**TABLA No. 6**

DIA (j)	ANALISTA (i) % DE RECOBRO	
	1	2
1	99.7	102.3
	102.3	97.0
	101.7	101.2
2	97.0	102.4
	102.0	101.4
	99.7	99.7

$\bar{X}$  = 100.54%  
 $S_x$  = 1.94  
 $CV$  = 1.92%  
 $N$  = 12

En la tabla No.7 se muestra el Análisis de Varianza:

**TABLA No. 7**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F tab
A (i)	1	0.238	0.238	Fa = - 0.0173	18.51
Dj (l)	1	-54.95	-13.73	Fd = -9.67	4.46
E (ij)k	8	91.06	1.42	-	-

**Criterio de aceptación:**

$F_a < F_{gla, gld; 0.05}$  = Método analítico es reproducible por los analistas

$F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$  = Método analítico no es reproducible por los analistas

$F_d < F_{gld, gld; 0.05}$  = Método analítico es reproducible en diferentes días

$F_d \geq F_{gla, gld; 0.05}$  = Método analítico no es reproducible en diferentes días

**Análisis de Resultados**

Debido a que en la tabla de análisis de varianza se muestra:

- a. Efecto del analista  $-0.0173 < 18.51$
- b. Efecto por día  $-9.67 < 4.46$

Se concluye que el método es reproducible , debido a que no existen efectos por diferentes analistas en distintos días .

#### IV.7 ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES OBTENIDAS EN EL PROCESO DE ANÁLISIS

En la tabla No. 8 se muestran los resultados obtenidos durante la determinación de N-Butilbromuro de hioscina, después de mantener las soluciones en diferentes condiciones .

TABLA No. 8

Tiempo (h)	Condición %Encontrado		
	LUZ BLANCA	OSCURIDAD	REFRIGERACION
0	100.5	100.5	100.5
3	102.7	102.4	97.5
6	106.1	105.4	96.0

Una vez calculado el factor I se obtiene:

TABLA No. 8.a

Tiempo (h)	Condición %Encontrado		
	LUZ BLANCA	OSCURIDAD	REFRIGERACION
3	102.2	101.9	97.0
6	105.6	104.9	95.5

Criterio de aceptación:

La media del factor (I) para cada condición/tiempo se debe encontrar entre los valores de 97.0% y 103.0%.

#### Análisis de Resultados

En la tabla No. 8.a, se observa que la muestra es estable en las diferentes condiciones, durante las primeras 3 horas después de haber realizado el tratamiento. Después de 6 horas, no es estable la muestra en ninguna de las condiciones anteriormente expuestas.

# CAPITULO V

## V. CONCLUSIONES

Basándose en los resultados que se obtuvieron al efectuar el procedimiento del método propuesto, para validar N-butilbromuro de hioscina, en comprimidos que también contienen Metronidazol, se concluye lo siguiente:

### V.1. Especificidad

El método propuesto para cuantificar N-butilbromuro de hioscina en las tabletas que se analizan es específico, ya que el placebo (sin analito) no causa interferencia en la cuantificación del alcaloide, pues presenta una absorbancia prácticamente despreciable a la longitud de onda de máxima absorbancia de aproximadamente 617 nm. Además los espectrogramas de absorción de las soluciones que se obtuvieron a partir de la sustancia de referencia y de la muestra problema son semejantes, lo cual corrobora que la absorbancia obtenida en la muestra problema, corresponde únicamente al N-butilbromuro de hioscina.

### V.2. Linealidad del sistema

En la gráfica No. 1 se puede observar que existe una tendencia lineal al ser analizado el alcaloide en un intervalo de concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%.

Lo anterior se comprueba porque el coeficiente de correlación obtenido, es mayor de 0.99 y el coeficiente de determinación obtenido fue mayor de 0.98.

### V.3. Repetibilidad del sistema

Se concluye que el sistema es repetible, ya que el valor del coeficiente de variación fue menor del 1.5% y por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

### V.4. Linealidad del método

En la gráfica No.2 se muestra que el método es lineal, en un intervalo de concentraciones de 80%,90%,100%,110% y 120% .

Lo anterior se comprobó con el análisis de la "t de student" en donde los resultados obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente, no son significativamente diferentes de 0 y 1 respectivamente. Asimismo, el coeficiente de correlación fue mayor de 0.99 y el coeficiente de determinación obtenido fue mayor de 0.98, por lo que se concluye que existe una relación significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

#### **V.5 Exactitud del método**

El método propuesto es exacto, ya que se demostró con la prueba de "t de student" que el valor de la media experimental no es significativamente diferente de 100% y el coeficiente de variación obtenido fue menor del 3.0%.

#### **V.6. Repetibilidad del método**

En las determinaciones que se realizaron para evaluar este parámetro (placebo cargado al 100%), se demostró que el coeficiente de variación obtenido fue menor del 3.0%, por lo tanto el método es repetible.

#### **V.7 Reproducibilidad del método**

El método propuesto es reproducible, ya que los resultados obtenidos para evaluar este parámetro, bajo diferentes factores de variación, cumplen con los criterios de aceptación especificados para el coeficiente de variación, siendo éste menor del 3.0%, además de que en el análisis de varianza efectuado, no se presenta efecto alguno debido al factor analista ni al factor día.

#### **V.8 Estabilidad de las soluciones obtenidas en el proceso de análisis**

Basándose en los valores obtenidos para evaluar este parámetro, se concluye que la muestra se conserva estable durante las tres primeras horas en presencia de luz blanca, refrigeración y / o oscuridad y que después de 6 horas, no es estable la muestra en ninguna de las condiciones anteriores.

#### **CONCLUSION GENERAL:**

Los resultados obtenidos muestran que los parámetros evaluados en el método propuesto para cuantificar N-butilbromuro de hioscina, en las tabletas estudiadas, cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos, con lo que se demuestra que el método de análisis es confiable y aplicable para el control de calidad del producto farmacéutico.

# APENDICE

## 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA

### 1.1 Tabular los resultados

Concentración de la dilución patrón (X)	Respuesta de medición de la sustancia (Absorbancia) (Y)
X <sub>1</sub>	Y <sub>11</sub> , Y <sub>12</sub> ... Y <sub>1n</sub>
X <sub>2</sub>	Y <sub>21</sub> , Y <sub>22</sub> ... Y <sub>2n</sub>
.	.
.	.
.	.
X <sub>t</sub>	Y <sub>t1</sub> , Y <sub>t2</sub> ... Y <sub>tn</sub>

t = número de diluciones

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

### 1.2 Cálculos para el coeficiente de correlación ( r ) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) :

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

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

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

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

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

$$r = [nt (\Sigma_{xy}) - (\Sigma_x) (\Sigma_y)]^2 / [nt (\Sigma_x^2) - (\Sigma_x)^2] [nt (\Sigma_y^2) - (\Sigma_y)^2]^{1/2}$$

$$r^2 = [nt (\Sigma_{xy}) - (\Sigma_x) (\Sigma_y)]^2 / [nt (\Sigma_x^2) - (\Sigma_x)^2] [nt (\Sigma_y^2) - (\Sigma_y)^2]$$

### 1.3 Cálculos para el coeficiente de variación (CV)

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

$$F_{11} = Y_{11} / X_1$$

$$F_{12} = Y_{12} / X_1$$

$$F_{1n} = Y_{1n} / X_1$$

$$F_{21} = Y_{21} / X_1$$

$$F_{22} = Y_{22} / X_1$$

$$F_{2n} = Y_{2n} / X_1$$

Se calcula la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{21} + F_{22} + F_{2n}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{21}^2 + F_{22}^2 + F_{2n}^2$$

$$\bar{F} = \Sigma F / N$$

N = número de puntos de la linealidad del sistema

Se calcula la desviación estándar (DE) de los resultados:

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

Se calcula el coeficiente de variación (CV):

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

## 2. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

$$\Sigma Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\Sigma Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

$$\bar{Y} = \Sigma Y / N$$

$$DE = ((N(\Sigma Y^2) + (\Sigma Y)^2) / (N(N-1)))^{1/2}$$

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

### 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

3.1 Se tabulan los resultados como a continuación se indica:

Cantidad adicionada (x)	Cantidad encontrada (y)
X <sub>11</sub> , X <sub>12</sub> , ..., X <sub>1n</sub>	Y <sub>11</sub> , Y <sub>12</sub> , ..., Y <sub>1n</sub>
X <sub>21</sub> , X <sub>22</sub> , ..., X <sub>2n</sub>	Y <sub>21</sub> , Y <sub>22</sub> , ..., Y <sub>2n</sub>
· · · · ·	· · · · ·
· · · · ·	· · · · ·
· · · · ·	· · · · ·
X <sub>n1</sub> , X <sub>n2</sub> , ..., X <sub>nn</sub>	Y <sub>n1</sub> , Y <sub>n2</sub> , ..., Y <sub>nn</sub>

3.2 Calcular la pendiente (m) de la línea de regresión:

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

3.3 Calcular la ordenada al origen (b) de la línea de regresión:

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

Para saber si los valores obtenidos experimentalmente, son estadísticamente diferentes a los considerados como teóricos, se aplican pruebas de t y se establecen límites de confianza para m y para b.

3.4 Prueba de "t de student" para la pendiente:

$$H_0: m = \alpha$$

$$H_1: m \neq \alpha$$

$$\alpha = 1$$

$$t_{cal} = \frac{[(m-\alpha)] [Sx] [(n-1)^{1/2}]}{S_{y/x}}$$

3.5 Prueba de "t de student" para la ordenada al origen:

$$H_0: b = \beta \quad \beta = 0$$

$$H_1: b \neq \beta$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{b - \beta}{S_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}}$$

Desviación estándar en la dirección y ( $S_{y/x}$ )

$$S_{y/x} = \left[ \frac{n \sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

3.6 Intervalos de confianza

\* Desviación estándar para la ordenada al origen ( $S_b$ )

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

3.6.1 Límites de confianza para la ordenada al origen:

$$LCb = b \pm [t_{\alpha/2} (n-2, 0.975)] [S_b]$$

\* Desviación estándar para la pendiente ( $S_m$ ):

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{[\sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2}}$$

3.6.2 Límites de confianza para la pendiente:

$$Lcm = m \pm [t_{\alpha/2} (n-2, 0.975)] [S_m]$$

En donde:

m = valor experimental de la pendiente

$\alpha$  = valor teórico de la pendiente = 1

- b = valor experimental de la ordenada al origen
- $\beta$  = valor teórico de la ordenada al origen = 0
- $X_i$  = cantidad adicionada al fármaco
- $Y_i$  = cantidad encontrada del fármaco
- $\bar{X}$  = media de las cantidades adicionadas
- $S_x$  = desviación estándar de las cantidades adicionadas
- N = número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución
- t = número de diluciones
- n = número de determinaciones

$\hat{y}_i$  = Los valores de  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la línea de regresión calculada y corresponden a los valores individuales de  $x_i$ . Los valores de  $\hat{y}_i$  para un valor dado de  $x_i$ , son fácilmente calculados de la ecuación de regresión.

### 3.7 Cálculo del coeficiente de determinación ( $r^2$ )

$$r^2 = \frac{[N t (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)]^2}{[N t (\sum x^2) - (\sum x)^2] [N t (\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

### 3.8 Cálculo de coeficiente de correlación

$$r = (r^2)^{1/2}$$

Los datos de la curva de calibración se sujetan a un análisis de varianza en donde los parámetros de evaluación son las F resultantes de la distribución y tratamiento de datos. Por lo tanto se tienen F de regresión y F de falta de ajuste a la relación lineal simple.

### 3.9 Construcción de la tabla de Análisis de Varianza

- a)  $SC_r$  = Suma de cuadrados de regresión  
 $SC_r = (m) (\sum xy) + (b) (\sum y) - (\sum y)^2/n$
- b)  $SC_{er}$  = Suma de cuadrados del error de regresión  
 $SC_{er} = \sum y^2 - (m) (\sum xy) - (b) (\sum y)$
- c)  $SC_{ep}$  = Suma de cuadrados del error puro  
 $SC_{ep} = \sum y^2 - (\sum y)^2 / r$

- d) SCfa= Suma de cuadrados de la falta de ajuste  
 SCfa= SCer - SCep

**TABLA I**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	Fexp
Regresión	1	SCr	SCr	Fr = MCr/MCer
Error de Regresión	n-2	SCer	SCer/g.l.e.r.	
Falta de ajuste	(n-2) - t(r-1)	SCfa	SCfa/g.l.f.a.	Ffa= MCfa/MCep
Error puro	T (r-1)	SCep	SCep/g.l.e.p.	

t = Número de concentraciones

r = Número de replicaciones por concentración

n= rt = Número de pares ordenados

#### 4. REPETIBILIDAD DEL METODO

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la repetibilidad:

4.1 Determinar la media ( $\bar{y}$ ) de los resultados

$$\bar{y} = \sum y_i / N$$

4.2 Determinar la Desviación Estándar de los resultados

$$S = \frac{N(\sum y^2) - (\sum y)^2}{N(N-1)}^{1/2}$$

4.3 Determinar el Coeficiente de Variación:

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

## 5. EXACTITUD DEL MÉTODO AL 100%

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la exactitud del método:

5.1 Calcular el porcentaje de recobro (R) en cada una de las muestras.

5.2 Calcular la media aritmética del porcentaje de recobro ( $\bar{R}$ )

$$\bar{R} = (\sum Ri) / N$$

5.3 Calcular la desviación estándar del porcentaje de recobro

$$S = \left[ \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

5.4 Calcular el coeficiente de variación

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

5.5 Prueba de "t de Student" para la media

$$H_0 : R = \mu$$

$$H_1 : R \neq \mu$$

$$\text{donde: } \mu = 100\%$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{R - \mu}{\sigma y}$$

$$\text{donde: } \sigma y = S/(N)^{1/2}$$

\* Intervalo de confianza del porcentaje encontrado (I.C.)

$$I.C. = R \pm t_{(n-1, 0.975)} (\sigma y)$$

## 6. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Los resultados obtenidos se tabulan de acuerdo con la tabla II, para evaluar la reproducibilidad mediante el análisis de varianza representado en la tabla III. Este análisis permite conocer las interacciones entre analista-día.

TABLA II

DIA (j)	ANALISTA (i) % ENCONTRADO	
	1	2
1	Y <sub>111</sub> Y <sub>112</sub> Y <sub>113</sub>	Y <sub>211</sub> Y <sub>212</sub> Y <sub>213</sub>
2	Y <sub>121</sub> Y <sub>122</sub> Y <sub>123</sub>	Y <sub>221</sub> Y <sub>222</sub> Y <sub>223</sub>

Donde "Y" es el resultado de cada analista (primer subíndice) en cada día (segundo subíndice) para cada repetición (tercer subíndice)

Calcular las siguientes sumatorias

$$6.1) \Sigma Y_{ijk} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{223})$$

$$6.2) \Sigma Y_i^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$6.3) \Sigma Y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$6.4) \Sigma Y_{ij}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$6.5) \sum Y_{ijk}^2 = [ (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{223})^2 ]$$

Proceder conforme la siguiente tabla III de análisis de varianza.

**TABLA III**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Medias de cuadrados (MC)	F calculada	F <sub>tab</sub> (0.05, GL num/GLden)
Analista (a)	gla= i-1	$\frac{\sum Y_i^2 - (\sum Y_{ijk})^2}{jk}$	$\frac{SC_a}{gla}$	$\frac{MC_a}{MC_d}$	F gla/ gld
Día (D) D <sub>j</sub>	gld= (j-1)i	$\frac{\sum Y_{ij}^2 - \sum y_i^2}{k}$	$\frac{SC_d}{gld}$	$\frac{MC_d}{MC_e}$	F gld/ gle
Error Experimental (E) E <sub>ijk</sub>	gle= (k-1)ij	$\frac{\sum Y_{ijk}^2 - \sum y_{ij}^2}{k}$	$\frac{SC_e}{gle}$		

Donde i = número de analistas; j = Número de días; k = número de repeticiones

## 7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato de la tabla IV, para calcular el coeficiente de variación

**TABLA IV**

Tiempo	Condición % Encontrado		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	Y <sub>A</sub> Y <sub>B</sub> Y <sub>C</sub>	Y <sub>D</sub> Y <sub>E</sub> Y <sub>F</sub>	Y <sub>G</sub> Y <sub>H</sub> Y <sub>I</sub>
3	Y <sub>1</sub> Y <sub>2</sub> Y <sub>3</sub>	Y <sub>10</sub> Y <sub>11</sub> Y <sub>12</sub>	Y <sub>19</sub> Y <sub>20</sub> Y <sub>21</sub>
6	Y <sub>4</sub> Y <sub>5</sub> Y <sub>6</sub>	Y <sub>13</sub> Y <sub>14</sub> Y <sub>15</sub>	Y <sub>22</sub> Y <sub>23</sub> Y <sub>24</sub>
24	Y <sub>7</sub> Y <sub>8</sub> Y <sub>9</sub>	Y <sub>16</sub> Y <sub>17</sub> Y <sub>18</sub>	Y <sub>25</sub> Y <sub>26</sub> Y <sub>27</sub>

Cálculos preliminares para determinar el coeficiente de variación:

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

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/ condición/ tiempo})_i * 100}{(\text{análisis inicial } i)}$$

$$I_1 = \frac{Y_1 * 100}{Y_A}$$

$$I_{10} = \frac{Y_{10} * 100}{Y_D}$$

$$I_{19} = \frac{Y_{19} * 100}{Y_G}$$

$$I_2 = \frac{Y_2 * 100}{Y_B}$$

$$I_{11} = \frac{Y_{11} * 100}{Y_E}$$

$$I_{20} = \frac{Y_{20} * 100}{Y_H}$$

$$I_3 = \frac{Y_3 * 100}{Y_C}$$

$$I_{12} = \frac{Y_{12} * 100}{Y_F}$$

$$I_{21} = \frac{Y_{21} * 100}{Y_I}$$

⋮

⋮

⋮

$$I_9 = \frac{Y_9 * 100}{Y_C}$$

$$I_{18} = \frac{Y_{18} * 100}{Y_F}$$

$$I_{27} = \frac{Y_{28} * 100}{Y_I}$$

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

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

donde N = Número de muestras para condición/tiempo.

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

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

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

$$I_4 = \frac{I_{10} + I_{11} + I_{12}}{3}$$

$$I_5 = \frac{I_{13} + I_{14} + I_{15}}{3}$$

$$I_6 = \frac{I_{16} + I_{17} + I_{18}}{3}$$

$$I_7 = \frac{I_{19} + I_{20} + I_{21}}{3}$$

$$I_8 = \frac{I_{22} + I_{23} + I_{24}}{3}$$

$$I_9 = \frac{I_{25} + I_{27} + I_{27}}{3}$$

TABLA I

Valores de $t$ a los niveles de confianza de 0,05 y 0,01	gl	.05	.01
	1	12.706	63.657
2	4.303	9.925	
3	3.182	5.841	
4	2.776	4.604	
5	2.571	4.032	
6	2.447	3.707	
7	2.365	3.499	
8	2.306	3.355	
9	2.262	3.250	
10	2.228	3.169	
11	2.201	3.106	
12	2.179	3.055	
13	2.160	3.012	
14	2.145	2.977	
15	2.131	2.947	
16	2.120	2.921	
17	2.110	2.898	
18	2.101	2.878	
19	2.093	2.861	
20	2.086	2.845	
21	2.080	2.831	
22	2.074	2.819	
23	2.069	2.807	
24	2.064	2.797	
25	2.060	2.787	
26	2.056	2.779	
27	2.052	2.771	
28	2.048	2.763	
29	2.045	2.756	
30	2.042	2.750	
40	2.021	2.704	
60	2.000	2.660	
120	1.980	2.617	
$\infty$	1.960	2.576	

TABLA 2

Valores de  $F$  al.  
Nivel de Confianza de  
0,05 y 0,01

(gl para el numerador)  $P = .05$

gl	1	2	3	4	5	6	8	12
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	238.9	243.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.37	19.41
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.84	8.74
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.04	5.91
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.82	4.68
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.15	4.00
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.73	3.57
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.44	3.28
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.23	3.07
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.07	2.91
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	2.95	2.79
12	4.75	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.85	2.69
13	4.67	3.80	3.41	3.18	3.02	2.92	2.77	2.60
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.70	2.53
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.64	2.48
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.59	2.42
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.55	2.38
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.51	2.34
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.48	2.31
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.45	2.28
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.42	2.25
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.40	2.23
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.38	2.20
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.36	2.18
25	4.24	3.38	2.99	2.76	2.60	2.49	2.34	2.16
26	4.22	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.32	2.15
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.30	2.13
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.44	2.29	2.12
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.54	2.43	2.28	2.10
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.27	2.09
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.18	2.00
60	4.00	3.15	2.76	2.52	2.37	2.25	2.10	1.92
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.02	1.83
$\infty$	3.84	2.99	2.60	2.37	2.21	2.09	1.94	1.75

# CAPITULO VI

## BIBLIOGRAFIA

1.- Goddman & Gilman A. y cols. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ª edición. volumen 1. Ed. McGraw Hill Interamericana. México (1996) pp 158-159.

2.- Guía Profesional de Medicamentos 3ª edición. Ed. El Manual Moderno. México (1989). pp 255-267

3.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (*FEUM*). Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª edición. Tomo 2. México (2000) pp. 1126 –1127.

4.- Florey, K. *Analytical Profiles Drug Substances*. Vol 19. Ed. Academic Press, INC. USA (1990). pp 480 –527

5.- Martindale. *The Extra pharmacopoeia*. 32ª edición. Ed. The Pharmaceutical Press. London (1999). pp 462

6.- The Merck Index: *An Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Susan Budavari 12ª edición. Merck & Co. Inc. U.S.A. (1996). pp 1444-1445.

7.- Clarke's *Isolation and Identification of Drugs*. 2ª edición. Volumen 1 Ed. The Pharmaceutical Press. London (1986). pp 675.

8.- British Pharmacopoeia (*BP*). Vol I. y Vol II. London (1993). pp 343-344 y 954-955.

9.- Trease Edwar W. Cap. 31. *Tratado de Farmacognosia*. Ed. Interamericana. México (1988). pp 559-563.

10.\_ Chatten, L.G. and Okamura, K. O. *Assay of Quaternary Ammonium Compounds in Various Dosage Forms by Acid-Dye Method*. J. Pharm. Scxi.(1973) pp 62,1328

11. The United States Pharmacopeia (*USP 24/NF 19*). United States Pharmacopeia Convention, Inc. (2000), pp 1507.

12.- European Pharmacopoeia, 3ª edición, Council of Europe. Strasbourg (2001), pp 973.

13.- William Hortwitz. *Methods of Analysis*, 10ª edición. Edit. Committee on Editing Methods of analysis. U.S.A. (1965). pp 593-594.

14.- Connor's. *A textbook of pharmaceutical analysis*. Library of Congress U.S.A. (1967). pp 514.

15.- MCVAN . *Manual de Consulta para los Profesionales de la Salud*. Ed. El Manual Moderno. México (1995). pp 704-706.

16.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (*PLM*). 46ª edición. México (2000). pp 282-283.

17.- Remington's Pharmaceutical Sciences. Tomo 1y 2.19 th edition. Ed. Médica Panamericana. U.S.A.. (1990). pp 580-581, 1349 .

18.- Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. **Requisitos Mínimos para la Validación de un Método Analítico**. Colegio Nacional de QFB. México (1989). pp 1-73.

19.- García Martha. **Validación de un Método Analítico para determinar Metilbromuro de Mepenzolato en una suspensión oral que también contiene Furazolidona**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química., U.N.A.M. México (1992).

20.- Walpole, R.É. **Probabilidad y Estadística para Ingenieros**. 2ª edición. Ed. Mac. Graw – Hill. México (1989).

21.- Levin J. **Fundamentos de Estadística en la Investigación Social**. 2ª edición .Editorial Harper & Row Latinoamericana. México (1987) pp 291-295