

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**DISEÑO EXPERIMENTAL PARA
DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR ESPECTROFOTOMETRIA VISIBLE
PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN JARABES QUE
CONTIENEN SALBUTAMOL EN FORMA DE SULFATO**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

**MIGUEL TOMAS CAÑENGUEZ ORTIZ
IVETTE REYES CHAVEZ**

PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA



JUNIO DE 1991



T
615.42
C235_d

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

DR. BENJAMIN LOPEZ GUILLEN

SECRETARIA

DRA. GLORIA GOMEZ DE PEREZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

DRA. MARIA GLADYS DE MENA GUERRERO

ASESORAS

LIC. CONSUELO ISABEL MOLINA RECINOS

LIC. CONCEPCION MARINA VIDAURRE FLORES

JURADOS

DRA. GLORIA LUZ CASTRO DE POCASANGRE

LIC. MAURICIO MENJIVAR GONZALEZ

LIC. MARIA EMILIA PLATERO

DEDICATORIA

- A DIOS OMNIPOTENTE POR TODO LO CONCEDIDO.
- A MIS PADRES COMO UN AGRADECIMIENTO POR TODOS SUS SACRIFICIOS.
- A MI FAMILIA POR SU INCONDICIONAL APOYO.

MIGUEL.

DEDICATORIA .

- 1) A DIOS TODO PODEROSO:
POR ILUMINARME EN CADA INSTANTE DE MI VIDA Y PODER AS
CONTINUAR CON LA META QUE ME IMPUSE.

- 2) A MIS PADRES:
POR EL APOYO QUE ME BRINDARON, ACOMPAÑÁNDOME EN TODAS LAS
CIRCUNSTANCIAS PARA EL LOGRO DE LA CARRERA.

- 3) A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS:
QUE DE UNA U OTRA FORMA CONTRIBUYERON CON SU APOYO MORAL
Y ESPIRITUAL EN LA FINALIZACION DE UNA ETAPA DE MI VIDA.

IVETTE .

AGRADECIMIENTOS

- NUESTROS MAS SINCEROS AGRADECIMIENTOS A LAS LICENCIADA CONSUELO ISABEL MOLINA Y CONCEPCION MARINA VIDAURRE, POR SU INCONDICIONAL ORIENTACION PARA EL DESARROLLO DE PRESENTE TRABAJO.
- A CORPORACION BONIMA, S.A. DE C.V., POR LA OPORTUNIDAD D REALIZAR EL DESARROLLO ANALITICO DEL PRESENTE ESTUDIO EN ESPECIAL AL PERSONAL POR SU COLABORACION ESPONTANEA.
- AL JURADO CALIFICADOR POR SU DECIDIDO ESFUERZO, PARA L CULMINACION DE ESTE TRABAJO.
- A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORM COMPARTIERON NUESTROS ANHELOS, Y NOS BRINDARON SU AYUD OPORTUNA.

RESUMEN

Cañenguez. M. T. y reyes, I., Diseño experimental para desarrollo y validación de un método analítico por espectrofotometría visible para el control de calidad en jarabes que contienen Salbutamol en forma de sulfato.

El método analítico para la cuantificación del Salbutamol está basado en una reacción de desarrollo de color y su proceso de extracción, efectuando luego la lectura de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción. La validación del método comprende el someter dichas lecturas, bajo ciertos elementos establecidos en un diseño experimental estadístico, el cual comprende verificar: linealidad y rango, estabilidad de la solución de prueba, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud del método.

El esquema o modelo de diseño experimental, permite en forma general, la aplicabilidad a trabajos que involucren la validación de métodos analíticos; considerados como métodos alternos a los reportados en libros oficiales.

Los resultados indican una buena posibilidad de utilizar estos elementos y su tratamiento estadístico, en diversos métodos analíticos para el control de calidad de diferentes principios activos en diversas formas farmacéuticas; garantizando la validez, integridad, calidad, exactitud y confiabilidad de los resultados.

INDICE

	No. Pag.
I- INTRODUCCION	1
A) ANTECEDENTES	3
B) FUNDAMENTO TEORICO	3
1. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA VISIBLE	3
2. DEFINICIONES Y PARAMETROS ESTADISTICOS	7
C) GENERALIDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO	12
II- PARTE EXPERIMENTAL	14
A) DISEÑO EXPERIMENTAL	14
B) EQUIPO, REACTIVOS Y MATERIALES	39
C) METODO ANALITICO	40
D) METODOLOGIA DE VALIDACION	42
III- RESULTADOS Y DISCUSION	44
1- LINEARIDAD Y RANGO	45
2- ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE PRUEBA	48
3- REPETIBILIDAD	51
4- REPRODUCIBILIDAD	58
5- EXACTITUD	64
IV- CONCLUSIONES	67
V- RECOMENDACIONES	68
VI- ANEXOS	70
VII- BIBLIOGRAFIA	79
VIII- APENDICE	82

LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS

TABLAS	No. Pag.
Tabla 1. Valores de absorbancia del método espectrofotométrico para la determinación de salbutamol (en forma de sulfato) en jarabes.	45
Tabla 2. Resultados de linealidad y rango para el método analítico.	47
Tabla 3. Evaluación de la estabilidad de la solución de prueba, mediante la determinación del coeficiente de variación.	49
Tabla 4. Valores generales obtenidos en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método analítico.	52
Tabla 5. Valores obtenidos en la evaluación de la repetibilidad del método.	53
Tabla 6. Procesamiento de datos para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 4 $\mu\text{g./ml}$ de salbutamol base.	54

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$, de salbutamol base.	55
Tabla 8. Procesamiento de los datos para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$, de salbutamol base.	56
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$, de salbutamol base.	57
Tabla 10. Valores obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad del método analítico, entre analistas.	59
Tabla 11. Procesamiento de datos para evaluar la reproducibilidad del método entre analistas, de una concentración de 4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$, de salbutamol base.	60
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación de la reproducibilidad del método entre analistas, para la concentración de 4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$, de salbutamol base.	61

Tabla 13. Procesamiento de datos para evaluar la reproducibilidad del método analítico entre analistas, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, de salbutamol base. 62

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la reproducibilidad del método entre analistas, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, de salbutamol base. 63

Tabla 15. Valores obtenidos en la determinación del grado de exactitud del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, de salbutamol base. 65

Tabla 16. Procesamiento de datos para evaluar la exactitud del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, de salbutamol base. 66

Tabla 17. Procesamiento de datos para análisis de regresión y correlación. 70

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación. 72

GRAFICAS

Gráfica 1. Diagrama de dispersión del método analítico, para la evaluación de la linealidad y rango del método 46

Gráfica 2. Comportamiento de la estabilidad de la solución de prueba del método analítico, durante un mes a 4 °C. 50

I — INTRODUCCION

Existen dentro del campo del análisis químico determinaciones analíticas denominadas métodos oficiales y no oficiales. El hacer uso de los métodos no oficiales brinda la oportunidad de sustituir un método algunas veces complicado por otro menos complicado; se hace necesario que este método sea comprobado y verificado lo cual constituye un proceso denominado validación. Es decir el poner a prueba el método con el objeto de determinar sus parámetros óptimos de operación y su metodología de control, para así reproducir eficazmente los análisis, y asegurar la calidad, integridad y confiabilidad de los resultados.

Un aspecto muy importante de todo estudio experimental, lo constituye la elaboración del diseño bajo el cual se llevará a cabo dicho estudio; es decir el lograr el máximo provecho de todos los recursos que se encuentren disponibles; claro, sin perder de vista la calidad y confiabilidad necesarias para cada trabajo en particular. Además al trazar un modelo de diseño experimental no se debe de olvidar el aspecto económico y por otra parte la funcionabilidad del mismo; así como la facilidad de ser adaptable en trabajos de la misma índole.

El desarrollo analítico comprende la realización de experimentos que giran en torno a lograr un método que resulte funcional, la validación del mismo se hace necesaria para verificar la utilidad analítica; es decir comprobar que reúna todas las características para ser considerado un " Método Analítico ". USP XXII⁽¹⁷⁾ define el término " Como un proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de realización de un método reúnen los requerimientos necesarios para aplicación analítica ".

El presente trabajo involucra la creación de un esquema de Diseño Experimental para el Desarrollo y Validación de un Método Analítico por espectrofotometría visible para el control de calidad en jarabes que contienen salbutamol bajo la forma de Sulfato.

El proceso de validación implica la utilización de otras disciplinas científicas, no solo la disciplina analítica. Por lo tanto es necesario el considerar una metodología para el análisis de los datos. Downie⁽⁷⁾ " Con la finalidad de organizar y dar significado a la información, dicha metodología esta enmarcada dentro de la disciplina científica denominada Estadística ".

A) ANTECEDENTES

Actualmente en el país no se cuenta con un estudio que comprenda el validar un método analítico. Por otra parte tampoco se han realizado trabajos que involucren el principio activo del presente estudio, constituido por el Salbutamol en forma de sulfato.

B) FUNDAMENTO TEORICO

1. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA VISIBLE

En el campo del análisis químico existen diversos métodos analíticos para la determinación de compuestos o principios activos en productos farmacéuticos; que abarcan desde procedimientos sumamente complejos hasta otros de mayor sencillez analítica; no obstante ser tan confiables como los anteriores. La oportunidad de poder utilizar este tipo de métodos implica: menor costo, ahorro de tiempo, facilidad de operación, etc.

Uno de los tipos de metodología analítica que posee ventajas debido a su facilidad de realización, rapidez, economía, lo constituye la espectrofotometría. Los métodos analíticos instrumentales han tenido un gran desarrollo; su utilidad reside en el hecho de que se necesitan cantidades pequeñas para la determinación de estructuras orgánicas. El

tipo de información proporcionada incluye la naturaleza de los grupos funcionales, la estructura del esqueleto carbonado y el peso molecular. Cada tipo de aparato esta adaptado a ciertos hechos estructurales. La espectrofotometría visible ultravioleta se emplea en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos e inorgánicos, pues un buen número de sustancias tienen bandas de absorción en esta zona del espectro electromagnético.

La espectrofotometría visible se basa en la absorción y emisión de radiación, la cual es debida a una reestructuración de los electrones dentro de átomos o moléculas. En el proceso de absorción, la radiación incidente lleva al átomo o molécula de un estado electrónico fundamental a un estado de excitación de mayor energía. En el proceso de emisión de energía se produce el efecto contrario.

Remington's⁽¹²⁾ " Las bandas de absorción en el ultravioleta y el visible se deben a transiciones electrónicas en la región de los 200 a 780 nm. En caso de moléculas orgánicas, las transiciones electrónicas involucran paso de electrones de orbitales σ , π ó n (estado basal) a orbitales σ^* ó π^* (estado excitado) ". El intervalo de absorción electrónica va de 400 - 800 nm en el visible, todos los compuestos coloreados absorben en éste intervalo. Por lo general, son compuestos con enlaces múltiples.

Existen cuatro tipos de transiciones electrónicas de una molécula :

$n \rightarrow \pi^*$ en compuestos con C = O o grupos NO_2

$\pi \rightarrow \pi^*$ en sistemas conjugados

Bandas bencenoides : debido a sistemas aromáticos y heteroaromáticos.

Bandas etilénicas : en sistemas aromáticos.

Ley de Beer

Remington's⁽¹²⁾ " Si la luz incidente con la longitud de onda λ e intensidad I_0 llega a una solución con concentración C , y con un trayecto, L de 1 cm., la energía radiante de la luz se disminuye en forma exponencial. De este modo si una concentración dada de una sustancia absorbe el 50% de la radiación incidente, al duplicar la concentración no absorberá el 100% sino el 75% de la luz. El espesor de la muestra o el trayecto posee un efecto similar en la absorción ". Matemáticamente la ecuación más utilizada en espectrofotometría es :

$$\text{Log}(I_0/I) = \epsilon CL$$

Donde "I₀" es la intensidad de la energía incidente, "I" es la intensidad de la energía emergente, "C" la concentración, "L" es el espesor del absorbente (en cm.), y "ε" es la absorptividad molar (expresada como coeficiente de extinción molar) para la concentración en moles/lt.

Si se expresa la concentración en gramos/lt., la

absortividad se designa por "a" en lugar de "ε". El término $\text{Log}(I_0/I)$ ó $\text{Log}(1/T)$ es denominado absorbancia. Por lo que, realizando los arreglos matemáticos correspondientes se obtiene la expresión siguiente :

$$\text{Log } I_0/I = \epsilon CL \quad \text{ó} \quad \text{Log } I_0/I = a b c$$

Donde A = absorbancia = $\text{Log } I_0/I$ ó $A = \text{Log } 1/T$

sustituyendo en ambas expresiones :

$$A = \epsilon C L \quad \text{ó} \quad A = a b c$$

Limitaciones de la ley de Beer.

Remington's⁽¹²⁾ " Una buena comprensión de la limitaciones de la ley de Beer debe ser tomada en consideración. Algunas de esas limitaciones poseen naturaleza tan fundamental que constituye una real limitación de la ley; se deben al hecho de que ésta no toma en cuenta ó consideración los efectos del pH, la temperatura, la longitud de onda, o las interacciones soluto-solvente y soluto-soluto. Por ejemplo asociación (enlaces de Hidrógeno intermoleculares), disociación, reacciones químicas, etc. Debido a estas limitaciones, la ley se aplica usualmente solo para soluciones diluidas, donde estas interacciones son insignificantes. Otra limitación se debe a la incapacidad de la mayoría de los instrumentos para proveer radiaciones monocromáticas ".

2. DEFINICIONES Y PARAMETROS ESTADISTICOS

Los métodos analíticos varían desde determinaciones que requieren gran exactitud hasta evaluaciones del tipo subjetivas de ciertos atributos. Si se considera esta variedad resulta lógico el hecho de que los diferentes métodos requieran diversos esquemas de validación. En el caso de un método cuya finalidad es la de cuantificar el principio activo en productos farmacéuticos, se deberá tomar en cuenta ciertos elementos o parámetros necesarios para efectuar un proceso de validación. A continuación se detallan dichos elementos; así como su correspondiente parámetro estadístico.

LINEARIDAD Y RANGO

Para conocer el vínculo existente entre variables se hace necesario el determinar la existencia de cierta linearidad en un rango dado entre las mismas. Una definición de ambos elementos es la siguiente:

USP XXII⁽¹⁷⁾ " La linearidad de un método analítico es la capacidad para proporcionar resultados que son directamente, o por una transformación matemática bien definida, proporcional a la concentración del analito en muestras de un rango determinado ".

USP XXII⁽¹⁷⁾ " El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito (incluyendo estos niveles) que demuestra la existencia de precisión,

exactitud y linealidad utilizando el método tal como esta escrito ".

La metodología Estadística presenta una ecuación de predicción o ecuación de regresión que permite conocer la magnitud de las relaciones entre dos variables; a su vez esta ecuación de regresión tiene aplicabilidad en las determinaciones o predicciones del tipo linealidad entre variables; denominándose regresión lineal. El término proviene de que existe una relación directa (en línea recta) entre las variables X y Y; de manera que conforme aumenta X también lo hace Y, ó viceversa denominándose una relación positiva. Si por el contrario, a medida se incrementa X disminuye Y la relación se considera negativa.

Downie⁽⁷⁾ " Dentro del análisis de regresión un parámetro muy utilizado es el coeficiente de correlación (r) el cual muestra la relación existente entre dos variables. En la práctica, un r de ± 0.8 o más próximo a ± 1 , se considera un coeficiente alto, un r de aproximadamente ± 0.5 es considerado moderado y un r de ± 0.3 o más cercano a 0.0 se considera bajo ".

Por lo que la ausencia de cualquier relación entre variables se denota por un coeficiente de 0.00 ; es decir casi nulo, lógico resulta el hecho de que cuanto mas cercano es el valor de r a ± 1 es considerada una relación ideal entre variables.

ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE PRUEBA

El hecho de poder establecer de la mejor forma el tiempo durante el cual las características propias de una solución de prueba se mantienen invariables, se hace necesario para poder determinar condiciones analíticas (tiempo de almacenamiento, utilidad de soluciones anteriores, etc.) con el objeto de evitar resultados lejanos a la realidad.

El establecer una relación matemática complicada no constituye un objetivo del presente estudio; bajo este precepto un cálculo de forma sencilla, confiable e ilustrativo es el indicado. Ante esta situación es preciso verificar la presencia o ausencia de variaciones en la solución de prueba, durante el tiempo de evaluación, lo anterior puede ser reflejado mediante el cálculo del coeficiente de variación.

REPETIBILIDAD

Otro elemento que se debe verificar es la determinación de la repetibilidad del método analítico; es decir que el método debe garantizar que al efectuar los análisis sucesivos los resultados no difieran significativamente; lo que de otra forma se denomina "precisión".

El tratamiento estadístico apropiado consiste en la realización de un Análisis de Varianza ó ANOVA (del inglés, Analysis of Variance), el cual es una de las técnicas mas utilizadas dentro

de la investigación moderna; fué desarrollada por Fischer (Meyer⁽¹¹⁾) quién además propuso la distribución denominada "distribución F", la cual se utiliza en dicho tratamiento. Por otra parte el ANOVA posee la ventaja de fácil adaptación de muchas maneras de acuerdo con el planteamiento del diseño experimental que se proponga.

REPRODUCIBILIDAD

Este elemento pretende verificar el supuesto de que bajo condiciones normales de operación, en las determinaciones realizadas por analistas distintos no se tienen resultados muy lejanos entre ellos; sino por el contrario sean los más cercanos unos a otros. Como es de esperar el hecho de que un análisis pueda ser realizado por diferente analista, también lo es de que puede ser llevado a cabo en días diferentes; o sea teniendo ambas posibilidades o fuentes de variación; implica pues, el verificar que el método propuesto es reproducible entre diferente analista y a su vez entre días de realización del análisis.

El parámetro estadístico adecuado consiste al igual que en el elemento anterior la realización de un análisis de varianza. En este caso se recurre al tipo de ANOVA denominado de doble criterio de clasificación ó de doble factor; es decir el que permite evaluar un determinado experimento con dos fuentes de variación, en forma simultánea.

EXACTITUD

Es importante en el campo analítico el conocer el grado de exactitud de las mediciones o determinaciones realizadas con un método específico. El término exactitud se refiere a la medida de la diferencia entre el valor medio de un grupo de mediciones y el valor verdadero. USP XXII⁽¹⁷⁾ define el término exactitud de un método analítico: " Como lo cercano de los resultados de las pruebas obtenidas por este método al valor verdadero. La exactitud puede ser a menudo expresada como porcentaje de recobro por el análisis de cantidades conocidas adicionadas del analito ".

El realizar un análisis con el fin de cuantificar una sustancia, implica el efectuar una medición. Gordus⁽⁹⁾ " En los procesos de medición pueden ocurrir dos tipos de errores:

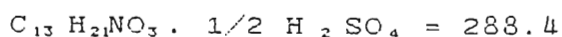
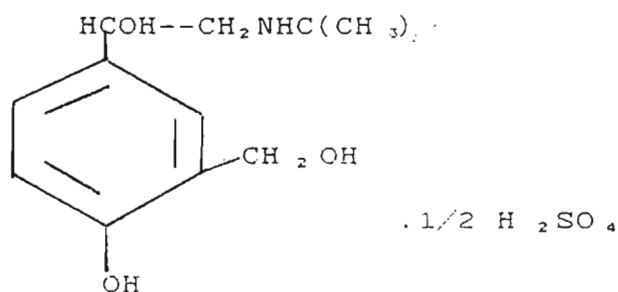
- a) Los errores sistemáticos que son errores unilaterales debido a que cada uno proviene de un factor específico positivo o negativo durante el proceso experimental total.
- b) Los errores al azar son responsables de la dispersión de los resultados de varias mediciones ".

Considerando que se han eliminado todos los errores sistemáticos y solo permanecen los errores al azar, es posible usar tratamientos estadísticos estándar para evaluar datos experimentales. Los errores al azar producen desviaciones positivas como negativas alrededor del valor verdadero, que es el promedio, del grupo de valores. Al tener un gran número de

mediciones se obtiene una distribución de frecuencia (campana de Gauss). En el caso de tener un número menor de mediciones dicha distribución es relativamente más abierta, debido a que la dispersión en muestras pequeñas (menor número de mediciones) deberá ser mas grande, que en el caso de muestras numerosas (mayor número de mediciones); lo cual conduce a la utilización de la " distribución t de Student ". Meyer⁽¹¹⁾ " Esta distribución se llama así en honor al estadístico Inglés W. S. Gosset, quién publicó su trabajo bajo el pseudónimo de Student, proponiendo su utilización en aquellos casos que se realicen ensayos con un número pequeño de datos ".

C) GENERALIDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO.

(fuente de información: THE MERCK, INDEX⁽¹⁵⁾ Y MARTINDALE ⁽¹⁶⁾)



SINONIMOS:

Sulfato de Salbutamol (Albuterol).

Sulfato de α' [(ter-butilamino)metil]-4-hidroxi-m-xileno- α - α' -diol.

CAS : 51022-70-9

DESCRIPCION:

Polvo blanco o casi blanco, inodoro o casi inodoro, sabor ligeramente amargo.

SOLUBILIDAD:

Un gramo se disuelve en cuatro ml. de agua; poco soluble en alcohol, cloroformo y éter.

USOS:

USP DI⁽¹⁶⁾ " Broncodilatador - utilizado en el tratamiento del broncoespasmo en enfermedades respiratorias ".

IDENTIFICACION:

FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS⁽⁸⁾ " En presencia de ferricianuro de potasio y bicarbonato de sodio (medio acuoso) reacciona con la N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro; formando un complejo coloreado azul intenso, soluble en cloroformo, el cual presenta absorción a una longitud de onda de aproximadamente 605 nm ". Esta prueba se utilizó como base para el desarrollo del método analítico.

II - PARTE EXPERIMENTAL.

A) DISEÑO EXPERIMENTAL.

Todo trabajo experimental pretende el lograr objetivos; lo cual es un razonamiento muy común, ya que el llegar a una meta constituye una satisfacción en todo sentido; pero el alcanzar un determinado fin, requiere la habilidad técnica en la ejecución experimental bajo un sistema planeado y organizado de la mejor manera posible, utilizando los medios necesarios de que se dispongan en forma económica y eficiente. Por otra parte los resultados deben reflejar claridad, brevedad de cálculo, confiabilidad y contener información sustancial. Lo anterior ilustra el concepto de un Diseño Experimental.

Chou⁽⁴⁾ " Deberá tenerse especial cuidado al planificar y diseñar un experimento; de otro modo, puede que no se llegue a alcanzar ninguna conclusión válida ".

La creación de un Diseño Experimental conlleva muchas actividades, desde el considerar la disponibilidad técnica de la experimentación hasta el proyectar una visión exhaustiva de todo lo realizado. Por lo que se hace necesario la formulación de ciertas interrogantes de suma importancia: se necesita la información ? si es así, que clase de información?, como

obtener los datos, ilustrarlos y procesarlos?, cuántos datos se necesitan para sustentar validez?, cómo relacionar dicha información con las decisiones que conduzcan a no aceptar premisas falsas ?.

A continuación se plasma un esquema que pretende solventar de la mejor manera todas las interrogantes anteriores, y pueda ser tomado como modelo para futuros trabajos cuyo propósito sea el validar un método analítico para la cuantificación de un principio activo, en un producto farmacéutico.

LINEARIDAD Y RANGO.

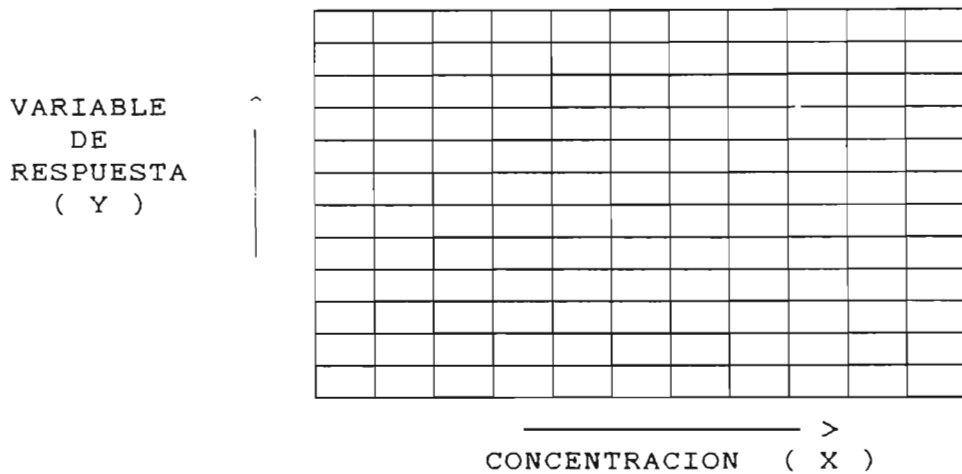
PRESENTACION DE DATOS:

La forma más adecuada es la creación de una tabla que contenga la información siguiente:

VARIABLE DE RESPUESTA (Y)	CONCENTRACION (X)
Y_1	X_1
Y_2	X_2
Y_3	X_3
.	.
.	.
.	.
Y_n	X_n

Es recomendable el utilizar un Diagrama de Dispersión, el cual muestre la tendencia de agrupación que presenten las variables.

Ejemplo:



REALIZACION DE LOS CALCULOS :

Se hace necesario la creación de una tabla que ilustre en forma ordenada el procesamiento de los datos, así como el ordenamiento de los mismos.

Ejemplo:

X	Y	X^2	XY	Y^2
X_1	Y_1	-	-	-
X_2	Y_2	-	-	-
.
.
X_n	Y_n	-	-	-
ΣX	ΣY	ΣX^2	ΣXY	ΣY^2

El número de datos mínimos para poder establecer con bases sólidas, la existencia de una linealidad en cierto rango y el grado de relación de dos variables es cinco.

(fuente de información Spiegel⁽¹⁴⁾)

Recordando la expresión matemática de la línea recta:

$$Y = a + bx \quad (1)$$

la cual corresponde también a una recta de mínimos cuadrados de aproximación a un conjunto de datos $(X_1, Y_1), \dots, (X_n, Y_n)$. Donde las constantes "a" y "b" se determinan solucionando simultáneamente las ecuaciones:

$$\Sigma Y = an + b\Sigma X \quad (2)$$

$$\Sigma XY = a\Sigma X + b\Sigma X^2 \quad (3)$$

que se conocen como las ecuaciones normales para una recta de mínimos cuadrados. Para efectos de brevedad se utiliza ΣY , ΣXY en cambio de $\sum_{j=1}^n Y_j$, $\sum_{j=1}^n X_j Y_j$.
 Obsérvese que (2) se obtiene sumando ambos lados de (1), mientras que (3) se obtiene primero multiplicando por X ambos lados de (1) y luego sumando. Lógicamente esta no es una derivación de las ecuaciones normales sino un medio para recordarlas.

Lo anterior conduce a la ecuación de regresión y a los valores corregidos.

Ejemplo:

$$Y_{Q_1} = a + b (X_1)$$

$$Y_{Q_2} = a + b (X_2)$$

$$\cdot = \cdot + \cdot \dots\dots\dots$$

$$\cdot = \cdot + \cdot \dots\dots\dots$$

$$Y_{Q_n} = a + b (X_n)$$

En el caso que se desee mostrar la tendencia de las variables, con datos corregidos se puede recurrir a una gráfica como la siguiente:

\hat{Y}
VALORES DE Y CORREGIDOS, OBTENIDOS CON LA ECUACION ANTERIOR.



. CALCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACION (r).

Para emitir un juicio acerca del grado de la correlación existente entre las variables, es necesario calcular el coeficiente de correlación; para lo cual se utiliza la ecuación (Spiegel⁽¹⁴⁾) .

$$r = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2][n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

n = el número de datos.

PRESENTACION DE LOS RESULTADOS:

Deberá incluir además de los datos iniciales, los valores de los resultados mediante el uso de la ecuación de regresión, así como también "a", "b", "r".

Ejemplo:

CONCENTRACION (X)	VARIABLE DE RESPUESTA (Y)	VARIABLE DE RESPUESTA CORREGIDA (Y _c)
X ₁	Y ₁	Y _{c1}
X ₂	Y ₂	Y _{c2}
.	.	.
.	.	.
X _n	Y _n	Y _{cn}
Intercepto = a		
Pendiente = b		
Coeficiente de correlación = r		

CÁLCULOS OPCIONALES

Para efectos de reforzar o deseos de ampliar, sobre este parámetro se puede recurrir a un Análisis de Varianza especial para coeficientes de correlación, el cual funciona bajo el tratamiento siguiente:

FUENTE DE VARIACION (FV)	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	SUMA DE CUADRADOS (SS)	MEDIA DE CUADRADOS $\frac{SS}{SS}$	F CALCULADO	F TABULADO	
					1%	5%
REGRESION	V - 1	$r^2 \Sigma Y^2$	$\frac{r^2 \Sigma Y^2}{V-1}$	*	con v-1 K-V grados de libertad.	
ERROR DE CORRELACION	K - V	$(1-r^2) \Sigma Y^2$	$\frac{(1-r^2) \Sigma Y^2}{K-V}$			
TOTAL	K - 1	ΣY^2	$\frac{\Sigma Y^2}{K-1}$			

$$* = \frac{\frac{r^2 \Sigma Y^2}{V-1}}{\frac{(1-r^2) \Sigma Y^2}{K-V}}$$

Donde :

K = Número de mediciones.

V = Número de variables.

CRITERIO :

- Si el valor de F calculado es mayor que el valor de F tabulado al 1% y 5% existe correlación lineal.
- Si el valor de F calculado es menor que el valor de F tabulado al 1% y 5% no existe correlación lineal.

Los valores de F tabulado se obtienen de las tablas de distribución F (apéndice, I-A y I-B) al 1% y 5% respectivamente, entrando con $V-1$ grados de libertad por la parte superior y $K - V$, por el lado izquierdo de las mismas.

ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE PRUEBA

Como una forma de obtener información que muestre la estabilidad de la solución de prueba, en un tipo de diseño bajo un plan reducido, basta con evaluar este parámetro en solo dos puntos (concentración) de los sometidos al parámetro de linealidad y rango; los cuales generalmente recaen en los valores centrales.

PRESENTACION DE DATOS:

En este caso los datos a presentar incluyen además el resultado de los cálculos concernientes. Lo anterior origina la tabla:

TIEMPO	VARIABLE DE RESPUESTA				\bar{X}	S	CV
	TIEMPO 0 (T0)	TIEMPO 1 (T1)	TIEMPO 2 (T2)	TIEMPO n ... (Tn)			
CONCENTRACION UNO	Y1	Y2	Y3	... Yn	-	-	--
CONCENTRACION DOS	Y1'	Y2'	Y3'	... Yn'	-	-	--

REALIZACION DE LOS CALCULOS.

.Cálculo de la media o valor medio (\bar{X}).

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

.Cálculo de la desviación estándar (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - n\bar{X}^2}{n-1}}$$

.Cálculo del Coeficiente de Variación (CV)

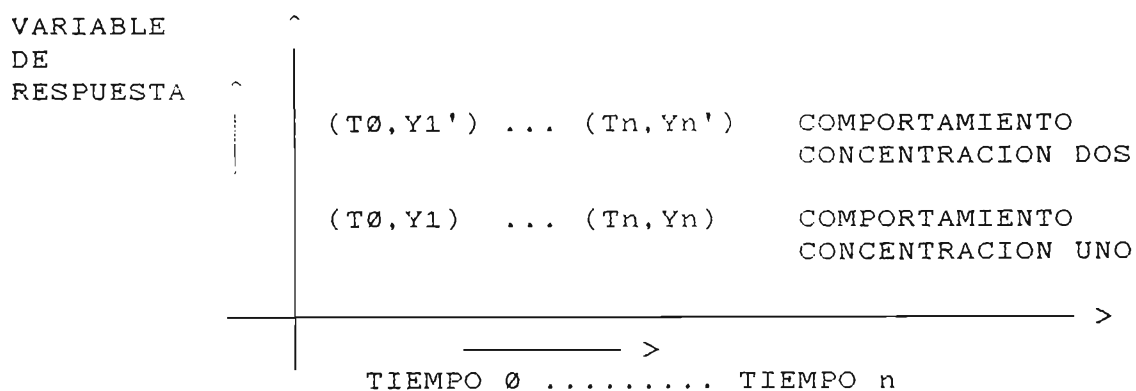
$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

n = el número de datos.

PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

Un tipo de gráfico que muestre el comportamiento de la solución de prueba, durante el transcurso del tiempo, es el siguiente:



COEFICIENTE DE VARIACION PARA CONCENTRACION DOS

COEFICIENTE DE VARIACION PARA CONCENTRACION UNO

REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Los parámetros Repetibilidad y Reproducibilidad están íntimamente relacionados por sus características, por lo tanto su evaluación recae en la misma técnica estadística (ANOVA) variando solo en el tipo de clasificación de dicha técnica.

Naturalmente los datos a utilizar sufren igual fenómeno; por lo que es conveniente el presentar un conjunto de datos generales que originan las evaluaciones, luego al verificar cada parámetro mostrar la parte que se utilizará. Esta forma de arreglo permite el doble aprovechamiento de los datos obteniéndose beneficios de tipo económico.

Un aspecto muy importante lo constituye el cálculo del error experimental, debido a que no es lejano el hecho de obtener resultados satisfactorios; no obstante el valor de dicho cálculo puede sobrepasar la magnitud del grado de confiabilidad, con el que generalmente se trabaja (error experimental mayor del 5%). En caso de suscitarse esta situación el análisis de varianza resulta sin validez alguna; ya que es totalmente imposible el aceptar una premisa sobre un experimento en particular, cuando el error en torno a la realización del experimento es superior al grado de confiabilidad bajo el cual se tomará la decisión.

Por otra parte el evaluar parámetros en solo dos puntos de los verificados con anterioridad (mismos puntos) posee suficiente validez aceptable. Así también es recomendable la elaboración de una simbología adaptable a los dos tipos de ANOVA.

Ejemplo:

TRATAMIENTOS	VARIABLE DE RESPUESTA			
	CONCENTRACION 1		CONCENTRACION 2	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2
TRATAMIENTO 1	REPETICION 1	REPETICION 1	REPETICION 1	REPETICION 1
	REPETICION 2	REPETICION 2	REPETICION 2	REPETICION 2
	REPETICION 3	REPETICION 3	REPETICION 3	REPETICION 3
TRATAMIENTO 2

TRATAMIENTO 3

TRATAMIENTO 4	
	
	

REPETIBILIDAD

PRESENTACION DE LOS DATOS:

Con el objeto de mantener el ordenamiento general, se recurrirá a una tabla de este tipo:

TRATAMIENTOS	VARIABLE DE RESPUESTA	
	ANALISTA 1	
	CONCENTRACION 1	CONCENTRACION 2
TRATAMIENTO 1	REPETICION 1 REPETICION 2 REPETICION 3	REPETICION 1 REPETICION 2 REPETICION 3
TRATAMIENTO 2
TRATAMIENTO 3
TRATAMIENTO 4

PROCESAMIENTO DE LOS DATOS:

El arreglo que se muestra a continuación permite la visualización de variaciones de gran notoriedad en los datos así como los valores de la desviación estándar relativa para cada serie de datos. Esta esquematización es aplicable a una concentración a la vez; por lo que en caso de evaluar más de una concentración, solamente se deberá repetir siguiendo los mismos lineamientos del procedimiento que se detalla.

Ejemplo:

TRATAMIENTOS	REPET. 1	REPET. 2	REPET. 3	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
TRATAMIENTO1	-	-	-	-	ΣX_{t1}	-	-	-
TRATAMIENTO2	-	-	-	-	ΣX_{t2}	-	-	-
TRATAMIENTO3	-	-	-	-	ΣX_{t3}	-	-	-
TRATAMIENTO4	-	-	-	-	ΣX_{t4}	-	-	-
\bar{X}	-	-	-	\bar{X} TOTAL				
ΣX	-	-	-		ΣX TOTAL			
ΣX^2	-	-	-			ΣX^2 TOTAL		
S	-	-	-					
RSD	-	-	-					

DONDE :

\bar{X} Total = promedio de las medias (\bar{X}) por columna o fila; realizándolo de las dos formas el resultado es el mismo.

ΣX Total = Sumatoria de los valores ΣX por columna o fila; realizándolo en las dos formas el resultado es el mismo.

ΣX^2 Total = Sumatoria de los valores de ΣX^2 por columna o fila; realizándolo en las dos formas el resultado es el mismo.

$$\text{Factor de corrección (C)} = \frac{(\Sigma X \text{ total})^2}{n}$$

n = número de datos.

Luego se formulan las Hipótesis que originan el ANOVA:

HIPOTESIS NULA : hace referencia a que no existe diferencia alguna entre las variables de respuesta obtenidas en tratamientos diferentes.

HIPOTESIS ALTERNA: hace referencia a la existencia de una diferencia entre las variables de respuesta obtenidas en tratamientos diferentes.

REALIZACION DE LOS CALCULOS:

A continuación se procede a la ejecución del análisis de varianza.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADO	F TABULADO		DECISION
					1 %	5 %	
TRATAMIENTO	I	IV	VII	IX	XI	XII	XIII
ERROR	II	V	VIII	ERROR EXPERIMENTAL X			
TOTAL	III	VI					

De acuerdo a la siguiente notación:

a = número de tratamientos.

b = número de pruebas o repeticiones por tratamiento.

$$I = a - 1$$

$$II = a (b - 1)$$

$$III = a b - 1$$

$$\text{Nota : } [a - 1] + [a(b - 1)] = III$$

$$IV = \frac{(\sum X_{t1})^2 + (\sum X_{t2})^2 + (\sum X_{t3})^2 + (\sum X_{t4})^2}{b} - C$$

$$V = VI - IV$$

$$VI = \sum X^2 \text{ TOTAL} - C$$

$$VII = \frac{IV}{I}$$

$$VIII = \frac{V}{II}$$

$$IX = \frac{VII}{VIII}$$

$$X = \frac{\sqrt{VIII}}{\bar{X} \text{ total}} \times 100$$

XI = Valor se toma de la tabla de distribución F al 1% (apéndice. I - A), entrando con I por la parte superior y II por el lado izquierdo.

XII = Valor se toma de la tabla de distribución F al 5% (apéndice. I - B), entrando con I por la parte superior y II por el lado izquierdo.

XIII = Para la interpretación o toma de decisión acerca del resultado, se utilizan los criterios siguientes:

- Si IX es mayor que XI y XII, existe diferencia estadística significativa.
- Si IX es menor que XI y XII no existe diferencia estadística significativa.
- Si IX es menor que XI; pero mayor que XII, entonces existe diferencia estadística.

PRESENTACION DE LOS RESULTADOS:

En concordancia con los planteamientos de ANOVA convencionales los resultados a presentar lo constituyen los esquemas propuestos en el procesamiento de los datos y la realización de los cálculos; así como las hipótesis formuladas.

REPRODUCIBILIDAD

PRESENTACION DE LOS DATOS

ATAMIENTOS	VARIABLE DE RESPUESTA			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	CONCENTRACION 1	CONCENTRACION 2	CONCENTRACION 1	CONCENTRACION 2
ATAMIENTO 1	REPETICION 1	REPETICION 1	REPETICION 1	REPETICION
	REPETICION 2	REPETICION 2	REPETICION 2	REPETICION
	REPETICION 3	REPETICION 3	REPETICION 3	REPETICION
ATAMIENTO 2

ATAMIENTO 3

PROCESAMIENTO DE LOS DATOS:

El arreglo es similar al que se utiliza en el parámetro de repetibilidad, al igual que las consideraciones generales.

TRATAMIENTOS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
TRATAMIENTO1	PROMEDIO	PROMEDIO	-	ΣX_{t1}	-	-	-
TRATAMIENTO2	PROMEDIO	PROMEDIO	-	ΣX_{t2}	-	-	-
TRATAMIENTO3	PROMEDIO	PROMEDIO	-	ΣX_{t3}	-	-	-
\bar{X}	ΣX_{a1}	ΣX_{a2}	\bar{X} TOTAL				
ΣX	-	-		ΣX TOTAL			
ΣX^2	-	-			ΣX^2 TOTAL		
S	-	-					
RSD	-	-					

La formulación de las Hipótesis que originan el ANOVA de doble clasificación es la siguiente:

HIPOTESIS NULA: hace referencia a que no existe diferencia alguna en las variables de respuesta obtenidas por tratamiento entre diferente analista.

HIPOTESIS ALTERNA # 1 : hace referencia a la existencia de una diferencia entre las variables de respuesta obtenidas por tratamiento.

HIPOTESIS ALTERNA # 2 : hace referencia a la existencia de una diferencia entre las variables de respuesta obtenidas por diferente analista.

REALIZACION DE LOS CALCULOS:

Conduce a la creación del esquema siguiente (consideraciones generales similares al ANOVA anterior).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADO	F TABULADO		DECISION
					1%	5%	
TRATAMIENTO	I	V	IX	XII	XV	XVII	XIX
ANALISTA	II	VI	X	XIII	XVI	XVIII	
ERROR	III	VII	XI				
TOTAL	IV	VIII		ERROR EXPERIM. XIV			

De acuerdo a la siguiente notación:

a = número de tratamientos

b = número de analistas

C = factor de corrección

I = a - 1

II = b - 1

III = (a - 1)(b - 1)

IV = a b - 1

Nota : IV = [(a - 1)+(b - 1)] + (a - 1)(b - 1)

$$V = \frac{(\sum X_{t1})^2 + (\sum X_{t2})^2 + (\sum X_{t3})^2}{b} - C$$

$$VI = \frac{(\sum X_{a1})^2 + (\sum X_{a2})^2}{a} - C$$

VII = VIII - V - VI

VIII = $\sum X^2$ total - C

$$IX = \frac{V}{I}$$

$$X = \frac{VI}{II}$$

$$XI = \frac{VII}{III}$$

$$XII = \frac{IX}{XI}$$

$$XIII = \frac{X}{XI}$$

$$XIV = \frac{\sqrt{XI}}{\bar{X}_{total}} \times 100$$

XV = valor de la tabla de distribución F al 1% (apéndice, I-A) entrando con I por la parte superior y III por el lado izquierdo.

XVI = valor de la tabla de distribución F al 1% (apéndice, I-A) entrando con II por la parte superior y III por el lado izquierdo.

XVII= valor de la tabla de distribución F al 5% (apéndice, I-B) entrando con I por la parte superior y III por el lado izquierdo.

XVIII= valor de la tabla de distribución F al 5% (apéndice, I-B) entrando con II por la parte superior y III por el lado izquierdo.

XIX = representa la decisión de acuerdo al resultado, bajo los siguientes criterios:

- Si XII es mayor que XV y XVII ó XIII es mayor que XVI y XVIII existe diferencia estadística significativa.
- Si XII es menor que XV y XVII, y XIII es menor que XVI

- y XVIII no existe diferencia estadística significativa.
- Si XII ó XIII son mayores que XVII ó XVIII; pero menores que XV ó XVI, respectivamente, existe diferencia estadística.

PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

Los lineamientos a seguir son los propuestos en el parámetro anterior (repetibilidad).

EXACTITUD

Para la determinación del grado de exactitud, lo más conveniente es la utilización de un ensayo de significación, mediante una prueba t de Student; para lo cual como número aceptable para sustentar validez se considera un mínimo de cinco pruebas.

PRESENTACION DE LOS DATOS

VARIABLE DE RESPUESTA DE MUESTRA CON ADICION DE ESTANDAR DE REFERENCIA	VARIABLE DE RESPUESTA ESTANDAR DE REFERENCIA
.	.
.	.
.	.
n	n

PROCESAMIENTO DE DATOS

VARIABLE DE RESPUESTA DE MUESTRA CON ADICION DE ESTANDAR DE REFERENCIA	VARIABLE DE RESPUESTA ESTANDAR DE REFERENCIA	CANTIDAD ENCONTRADA EN MUESTRA CON ADICION	CANTIDAD RECUPERADA	% DE RECOBRO	
.	
.	
.	
n	n	n	n	n	
				\bar{X}	-
				S	-

REALIZACION DE LOS CALCULOS

Al igual que en el caso de la distribución F, se trata de verificar la ausencia o presencia de diferencia significativa entre los experimentos. Con esta finalidad se recurre a la expresión:

$$t = \frac{|\bar{X} - \mu|}{S} \sqrt{N}$$

Donde :

\bar{X} = promedio de los porcentajes de recobro.

S = desviación entre los porcentajes de recobro.

μ = valoración del estándar de referencia.

N = número de experimentos efectuados.

Luego el valor de t calculado se compara con el valor de la distribución t de Student al 95%, con N - 1 grados de libertad; obtenido de la tabla correspondiente (apéndice, I - C).

CRITERIO:

- Si t calculado es menor que el valor de t tabulado, no existe diferencia significativa.
- Si t calculado es mayor que el valor de t tabulado, existe diferencia significativa.

En caso de que el valor de t calculado sobrepase al valor de t tabulado al nivel de 95 %, se deberá buscar el nivel adecuado; no con la finalidad de hacer pasar la prueba al experimento simplemente; sino con el fin de presentar una alternativa con suficiente información, para poder ser seleccionada bajo criterios amplios, con todos sus cuestionamientos.

Otro aspecto de suma importancia lo constituye el hecho de la determinación de los límites de confiabilidad ó confianza, para lo cual se emplea la expresión:

$$\begin{array}{l} \text{limite de} \\ \text{confianza} \end{array} = \bar{X} \pm (t') \frac{S}{\sqrt{N}}$$

donde :

t' = valor de t tomado de tablas (apéndice, I-C) correspondiente al nivel de confianza en el cual, el experimento pasa la prueba.

PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

Comprende el presentar: grado de exactitud (\bar{X}), el grado de confianza o confiabilidad, y los limites de confianza.

B) EQUIPO, REACTIVOS Y MATERIALES

EQUIPO

- Espectrofotómetro
PERKIN - ELMER LAMBDA 2 UV/VIS.
VERSION 3.7

REACTIVOS

- Cloroformo.
- Salbutamol estándar de referencia, en forma de sulfato.
- Solución de bicarbonato de sodio al 5 %.
- Solución de ferricianuro de potasio al 8 %.
- Solución de N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro.
- Sulfato de sodio anhidro.

MATERIALES

- Algodón.
- Ampollas de separación color ambar 250 ml.
- Balones volumétricos color ambar 50 ml.
- Balones volumétricos 100 ml.
- Beakers 50. 100. 250 ml.
- Embudos.

- Papel Whatman No. 1.
- Pipetas volumétricas 1,2,3,4,5 ml.
- Vidrio de reloj.

C) METODO ANALITICO

(Método modificado FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS⁽⁹⁾)

REFERENCIA ESTANDAR:

Sulfato de Salbutamol, desecarlo como indica la etiqueta.

Solución Estandar.

Pesar una cantidad de Sulfato de Salbutamol estándar de referencia equivalente a 10 mg. de salbutamol, transferirlo a un frasco volumétrico de 100 ml, adicionar 50 ml de agua destilada y agitar durante 15 minutos para disolver. Aforar con el mismo solvente.

Preparación de la muestra.

Tomar una alícuota del jarabe y transferirla a un frasco volumétrico adecuado. Efectuar las diluciones necesarias hasta obtener una concentración de 100 µg/ml (salbutamol), utilizando agua destilada como solvente. (Agitar vigorosamente para homogenizar).

PROCEDIMIENTO

A dos embudos de separación que contenga 25 ml de agua, transferir una alícuota de 3.0 ml de la solución muestra y de la solución estándar respectivamente. Añadir a cada uno 1 ml de

la solución al 5% de bicarbonato de sodio y 4 ml de la solución de N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro y 4 ml de la solución al 8% de ferricianuro de potasio. Mezclar y dejar reposar 15 minutos protegido de la luz.

Extraer con dos porciones de 20 ml cada uno de cloroformo, filtrar los extractos clorofórmicos a través de un embudo que contenga una torunda de algodón y sulfato de sodio anhidro, recolectando los extractos en balones volumétricos de 50 ml. Aforar con el mismo solvente.

Determinar las lecturas de las absorbancias de las soluciones estándar y muestra a una máxima de 605 nm, utilizando celdas de 1 cm y cloroformo como blanco, en un espectrofotómetro adecuado.

Efectuar los cálculos correspondientes.

PREPARACION DE REACTIVOS

- 1) Solución de bicarbonato de sodio al 5 %.

Pesar 5 g. de bicarbonato de sodio y llevar a volumen de 100 ml con agua destilada.

- 2) Solución de ferricianuro de potasio al 8 %.

Pesar 5 g. de ferricianuro de potasio y llevar a volumen de 100 ml con agua destilada. (preparación reciente).

- 3) Solución de N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro.

Pesar 50 mg. de N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro y llevar a volumen de 50 ml con agua destilada (preparar el día de uso).

D) METODOLOGIA DE VALIDACION

Esta etapa de trabajo comprende la validación del método analítico propuesto; la cual requiere el cumplimiento de ciertos elementos o parámetros analíticos, constituidos por: linealidad y rango, estabilidad, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud; previa determinación de la longitud de onda de máxima absorción.

- 1) Para conocer la linealidad del método analítico propuesto en un rango determinado, preparar cinco soluciones de sulfato de salbutamol estándar de referencia, en un rango de concentraciones comprendidas entre 2 - 10 $\mu\text{g./ml}$ de salbutamol base, y hacer lectura de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción.
- 2) Para determinar la estabilidad de la solución de prueba (complejo coloreado formado). someter soluciones de dos concentraciones (4 y 6 $\mu\text{g./ml}$) de salbutamol base = sulfato de salbutamol estándar de referencia, a una temperatura de 4°C y evaluar a intervalos de siete días durante un mes.
- 3) Para verificar la repetibilidad del método efectuar determinaciones en soluciones preparadas con sulfato de salbutamol estándar de referencia a dos concentraciones de salbutamol base (4 y 6 $\mu\text{g./ml}$), realizar tres repeticiones diarias de cada concentración durante cuatro días. Someter a un análisis de varianza las absorbancias obtenidas.

- 4) Para verificar la reproducibilidad del método realizar determinaciones en soluciones preparadas con sulfato de salbutamol estándar de referencia equivalente a dos concentraciones (4 y 6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$ de salbutamol base), efectuar tres repeticiones diarias de cada concentración durante tres días, preparadas por diferente analista. Someter a un análisis de varianza las absorbancias obtenidas.
- 5) Para determinar el grado de exactitud del método, analizar siete muestras (jarabe) con cantidades adicionadas de sulfato de salbutamol estándar de referencia, determinar luego el porcentaje de recuperación o recobro; a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas. Realizar una prueba t de Student utilizando los porcentajes de recobro resultantes.

III - RESULTADOS Y DISCUSION

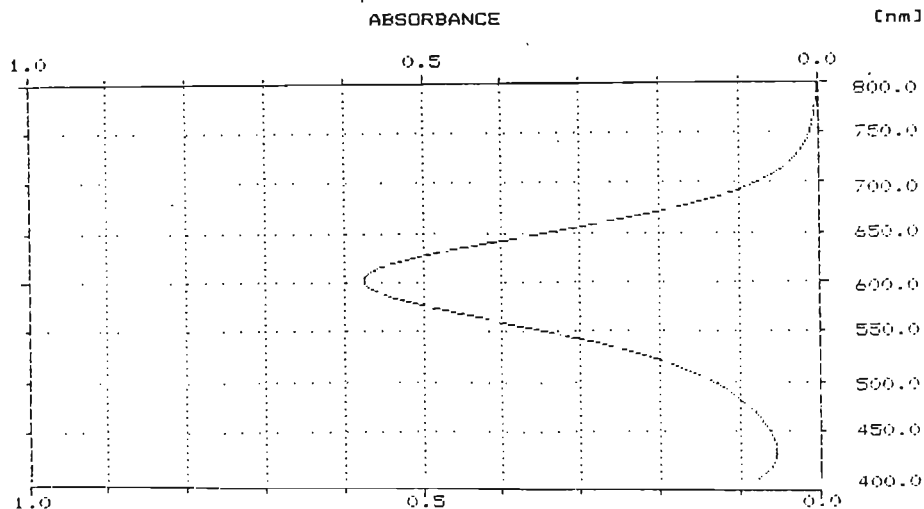
Espectro de absorción de Salbutamol en forma de sulfato de Salbutamol (complejo coloreado formado por reacción con N,N-dimetil-p-fenilendiamonio dicloruro) a una concentración de 6 µg./ml. en cloroformo.

```

WAV. MAX      800NM  : ORD.MAX      1.0 ABS
WAV. MIN      400NM  : ORD.MIN      0.0 ABS
SPEED & 120 NM/MIN : SCALE      50.0 NM/CM
SMOOTH        2 NM   : GRID        YES
LAMP          UV+VIS : OVERLAY     NO
BACK CORR     &YES  : PRINT DATA YES
SAMPLES/BATCH 2     : THRESHOLD   .005ABS
START SAMPLE  1     : AUTO METHOD  YES
CYCLES        1     : OPER. ID    11118
CYCLE-TIME    1MIN  : SAMPLE ID   190291
  
```

PERKIN-ELMER LAMBDA 2 UV/VIS SPECTROMETER

METHOD NO.: 20 SCAN/MAN



THRESHOLD : 0.005

BATCH: 001

SAMPLE	CYCLE	WAVELENGTH	DATA
001	00:38	602.9 nm (MAX)	0.576 ABS
		432.2 nm (MIN)	0.056 ABS

1- LINEARIDAD Y RANGO

Tabla 1. Valores de absorbancia del método espectrofotométrico para la determinación de salbutamol (en forma de sulfato) en jarabes.

ABSORBANCIA	CONCENTRACION
0.16662	2 $\mu\text{g.}/\text{ml}$
0.33128	4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$
0.48029	6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$
0.63104	8 $\mu\text{g.}/\text{ml}$
0.71804	10 $\mu\text{g.}/\text{ml}$

Gráfica 1. Diagrama de dispersión del método analítico, para la evaluación de la linealidad y rango del método.

ABSORBANCIA

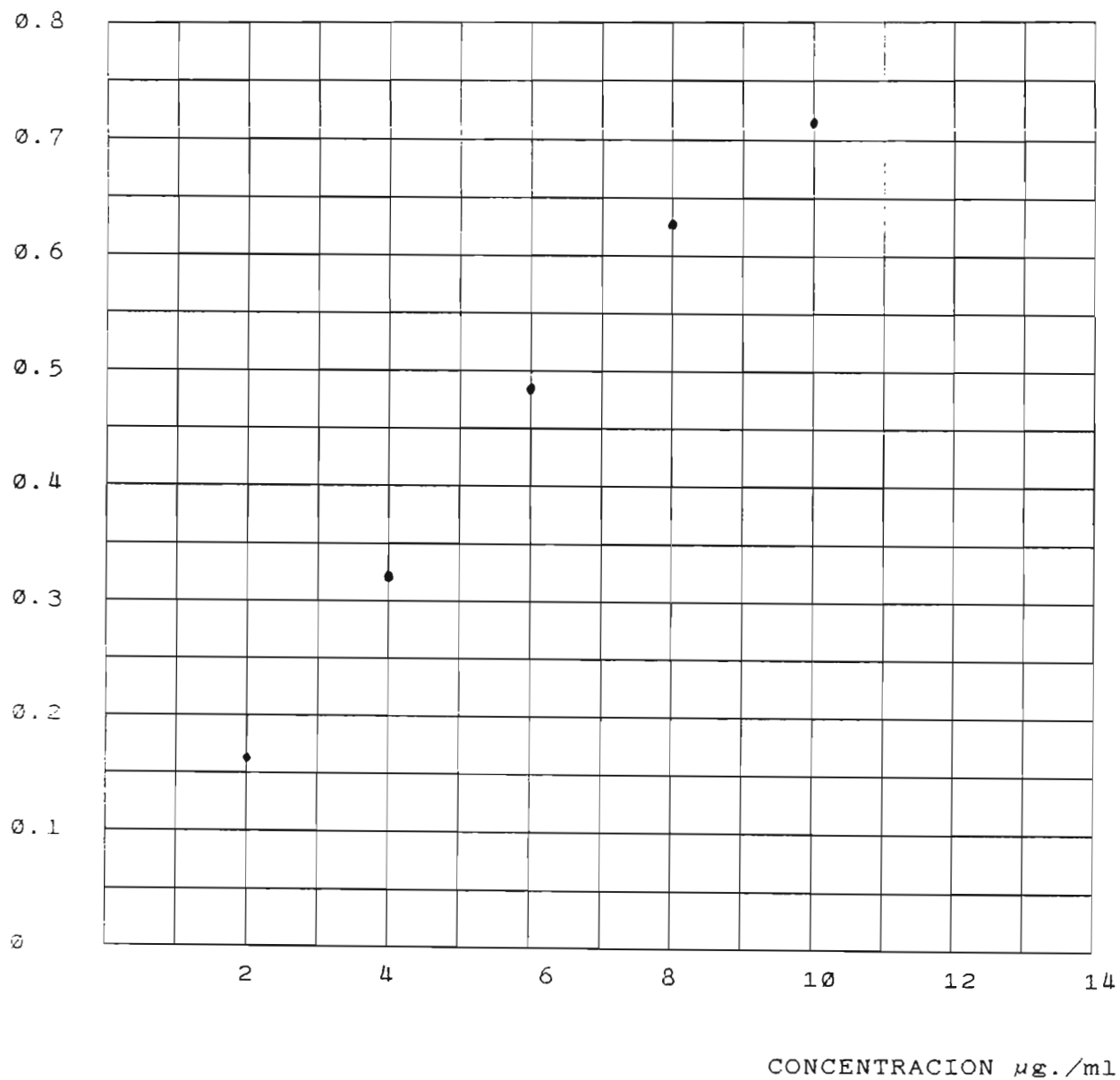


Tabla 2. Resultados de linealidad y rango para el método analítico.

CONCENTRACION	ABSORBANCIA	ABSORBANCIA CORREGIDA
2 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.16662	0.184934
4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.33128	0.325194
6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.48029	0.465454
8 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.63104	0.605714
10 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.71804	0.745974
<p>Intercepto = 0.044674</p> <p>Pendiente = 0.07013</p> <p>Coefficiente de correlación = 0.994889</p>		

La gráfica 1, muestra el diagrama de dispersión en el cual se aprecia que los puntos en dicho diagrama, tienden a estar agrupados en una recta, lo cual demuestra la existencia de una regresión del tipo lineal. Luego en el anexo 1 se presenta el tratamiento matemático correspondiente, aplicado a los datos: coeficiente de correlación y el análisis de varianza aplicado al mismo.

La tabla 2, ilustra los resultados generales, los cuales demuestran claramente la existencia de una relación del tipo lineal entre las variables "absorbancia" y "concentración", en el rango comprendido de 2 - 10 $\mu\text{g./ml}$. A partir de estos resultados es posible efectuar determinaciones analíticas y su posterior tratamiento matemático; para la verificación de otros parámetros o elementos necesarios para la validación del método. Se tomaron únicamente los valores de 4 y 6 $\mu\text{g./ml}$ los cuales pueden considerarse como representativos.

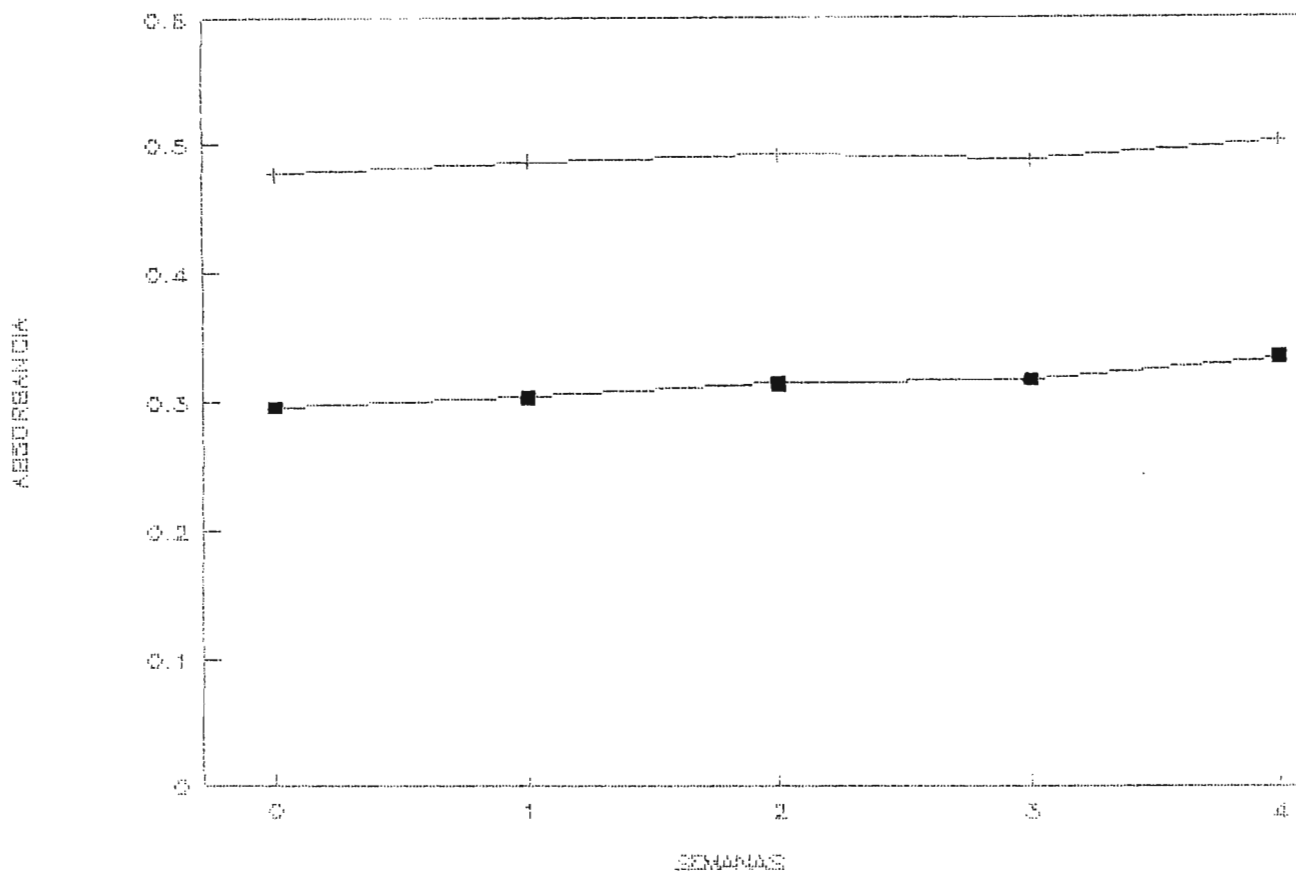
2- ESTABILIDAD DE LA SOLUCION DE PRUEBA

La tabla 3, muestra los valores de las lecturas de absorbancia obtenidas durante el tiempo de duración de la prueba, la gráfica 2, ilustra el comportamiento de las mismas.

Tabla 3. Evaluación de la estabilidad de la solución de prueba, mediante la determinación del coeficiente de variación.

TIEMPO	ABSORBANCIA					\bar{X}	S	CV
	0 SEMANA	1 SEMANA	2 SEMANA	3 SEMANA	4 SEMANA			
4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.296	0.304	0.314	0.317	0.334	0.313	0.014	4.47
6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	0.477	0.487	0.492	0.488	0.503	0.489	0.009	1.84

Gráfica 2. Comportamiento de la estabilidad de la solución de prueba del método analítico, durante un mes a 4 °C.



+ 6 µg./ml (CV = 1.84)

■ 4 µg./ml (CV = 4.47)

De acuerdo al comportamiento queda claro la existencia de una variación hasta cierto punto alta, para el tiempo de evaluación y las condiciones óptimas de almacenamiento. Si se considera el hecho de que este elemento constituye el indicativo de utilización, en cierto período de tiempo de la solución de estándar de referencia, es sumamente delicado el tomar una decisión acerca de este hecho; ya que la magnitud del estándar de referencia constituye el parámetro de apoyo para obtener el resultado de un análisis.

3- REPETIBILIDAD

En la tabla 4, se muestran los valores generales (los cuales son utilizados para la evaluación de otro parámetro: reproducibilidad); la tabla 5, muestra el ordenamiento de los datos que fueron utilizados para esta etapa. La tabla 6 contiene el procesamiento de los datos y la tabla 7, el análisis de varianza para la concentración de 4 $\mu\text{g./ml}$. La tabla 8, contiene el procesamiento de los datos y la tabla 9, el análisis de varianza para la concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$. Por otra parte en el anexo 2, se muestra: una simbología adaptable utilizada en todos los ANOVA (excepto el aplicado al coeficiente de correlación, el cual representa un caso especial) y los cálculos concernientes.

Tabla 4. Valores generales obtenidos en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad del método analítico.

DIAS	LECTURA DE ABSORBANCIA			
	CONCENTRACION 4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$		CONCENTRACION 6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	0.31913 0.31000 0.29600	0.34500 0.37000 0.36300	0.48790 0.48700 0.47700	0.52720 0.53300 0.47400
DIA 2	0.30895 0.31600 0.32700	0.32355 0.32000 0.34200	0.49102 0.45700 0.45800	0.48519 0.46000 0.49300
DIA 3	0.30875 0.34258 0.33128	0.36271 0.35900 0.35000	0.47972 0.43371 0.48029	0.52466 0.52500 0.48700
DIA 4	0.34577 0.34300 0.32300	-	0.51516 0.50800 0.48300	-

Tabla 5. Valores obtenidos en la evaluación de la repetibilidad del método.

DIAS	LECTURA DE ABSORBANCIA	
	ANALISTA 1	
	CONCENTRACION 4 μ g/ml	CONCENTRACION 6 μ g/ml
DIA 1	0.31913 0.31000 0.29600	0.48790 0.48700 0.47700
DIA 2	0.30895 0.31600 0.32700	0.49102 0.45700 0.45800
DIA 3	0.30875 0.34258 0.33128	0.47972 0.43371 0.48029
DIA 4	0.34577 0.34300 0.32300	0.51516 0.50800 0.48300

Tabla 6. Procesamiento de datos para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 4 $\mu\text{g.}/\text{ml}$ de salbutamol base.

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
1	0.31913	0.31500	0.29600	0.3084	0.9251	0.2856	0.0116	3.76
2	0.30895	0.31500	0.32700	0.3173	0.9519	0.3022	0.0091	2.87
3	0.30875	0.34258	0.33128	0.3275	0.9826	0.3224	0.0172	5.25
4	0.34577	0.34300	0.32300	0.3373	1.0118	0.3415	0.0174	3.68
	0.3206	0.3279	0.3193	0.3226				
	1.2826	1.3116	1.2773		3.8714			
	0.4122	0.4310	0.4086			1.2518		
	0.0174	0.0174	0.0159					
	5.43	5.31	4.98					

HIPOTESIS NULA = No existe diferencia entre las lecturas obtenidas en días diferentes.

HIPOTESIS ALTERNA = Existe diferencia entre las lecturas obtenidas en días diferentes.

Tabla 7. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 4 $\mu\text{g./ml.}$ de salbutamol base.

FUENTE DE VARIACION	G. L.	SS	\overline{SS}	FC	FT		DCS
					1 %	5 %	
DIAS	3	1.4×10^{-3}	4.67×10^{-4}	2.67	7.59	4.07	(0)
ERROR	8	1.4×10^{-3}	1.75×10^{-4}				
TOTAL	11	2.8×10^{-3}		E. E. 4.1			

Tabla 8. Procesamiento de los datos para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 6 µg./ml de salbutamol base.

DÍAS	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
DIA 1	0.48790	0.48700	0.47700	0.4840	1.4519	0.7027	0.0060	1
DIA 2	0.49102	0.45700	0.45800	0.4686	1.4060	0.6597	0.0193	4
DIA 3	0.47972	0.43371	0.48029	0.4646	1.3937	0.6489	0.0267	5
DIA 4	0.51516	0.50800	0.48300	0.5020	1.5062	0.7567	0.0169	3
\bar{X}	0.4934	0.4714	0.4745	0.4798				
ΣX	1.9738	1.8857	1.8983		5.7578			
ΣX^2	0.9747	0.8922	0.9013			2.7682		
S	0.0152	0.0327	0.0113					
RSD	3.08	6.94	2.38					

HIPOTESIS NULA = No existe diferencia entre las lecturas obtenidas en días diferentes.

HIPOTESIS ALTERNA = Existe diferencia entre las lecturas obtenidas en días diferentes.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la repetibilidad del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$ de salbutamol base.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SS	$\overline{\text{SS}}$	FC	FT		DCS
					1 %	5 %	
DIAS	3	2.6×10^{-3}	8.67×10^{-4}	2.39	7.59	4.07	(0)
ERROR	8	2.9×10^{-3}	3.62×10^{-4}				
TOTAL	11	5.5×10^{-3}		E.E. 4.0			

Los resultados obtenidos para ambas concentraciones (valor de F calculado es menor que el valor de F tabulado, tanto al 1 % como al 5 %), demuestra que el método propuesto es repetible entre días; ya que no existe diferencia estadística significativa (95 % de confianza) entre las lecturas de absorbancia obtenidas en días diferentes.

4- REPRODUCIBILIDAD

La tabla 10 ilustra el ordenamiento de los datos procedentes de la tabla 4, utilizados en este elemento. Las tablas 11 y 12 muestran el procesamiento de los datos y el análisis de varianza de los mismos, para una concentración de 4 $\mu\text{g./ml}$. La tabla 13 y 14 ilustran el procesamiento de los datos y el análisis de varianza de los mismos, para una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, respectivamente.

En el anexo 3 se presentan cálculos concernientes a los ANOVA.

Tabla 10. Valores obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad del método analítico, entre analistas.

DIAS	LECTURA DE ABSORBANCIA			
	ANALISTA 1		ANALISTA 2	
	CONCENT. 4 μ g	CONCENT. 6 μ g	CONCENT. 4 μ g	CONCENT. 6 μ g
DIA 1	0.31913 0.31000 0.29600	0.48790 0.48700 0.47700	0.34500 0.37000 0.36300	0.52720 0.53300 0.47400
DIA 2	0.30895 0.31600 0.32700	0.49102 0.45700 0.45800	0.32355 0.32000 0.34200	0.48519 0.46000 0.49300
DIA 3	0.30875 0.34258 0.33128	0.47972 0.43371 0.48029	0.36271 0.35900 0.35000	0.52466 0.52500 0.48700

Tabla 11. Procesamiento de datos para evaluar la reproducibilidad del método entre analistas, de una concentración de $4\mu\text{g./ml}$ de salbutamol base.

DIAS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
DIA 1	0.3084	0.3593	0.3338	0.6677	0.2242	0.0360	10.80
DIA 2	0.3173	0.3285	0.3229	0.6458	0.2086	0.0079	2.45
DIA 3	0.3275	0.3275	0.3423	0.6847	0.2348	0.0210	6.13
\bar{X}	0.3177	0.3483	0.3330				
ΣX	0.9532	1.0450		1.9982			
ΣX^2	0.3030	0.3646			0.6676		
S	0.0096	0.0172					
RSD	3.02	4.94					

HIPOTESIS NULA = No existe diferencia entre las lecturas obtenidas por día, entre diferente analista.

HIPOTESIS ALTERNA # 1 = Existe diferencia entre la lecturas obtenidas por día.

HIPOTESIS ALTERNA # 2 = Existe diferencia entre las lecturas obtenidas por diferente analista.

Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación de la reproducibilidad del método entre analistas, para la concentración de 4 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ de salbutamol base.

FUENTE DE VARIACION	G. L.	SS	$\overline{\text{SS}}$	FC	FT		DCS
					1 %	5 %	
DIAS	2	0.0003	1.5×10^{-4}	0.75	99	19	(0)
ANALISTA	1	0.0014	0.0014	7	98.5	18.5	
ERROR	2	0.0004	0.0002				E. E. 4.23
TOTAL	5	0.0021					

Tabla 13. Procesamiento de datos para evaluar la reproducibilidad del método analítico entre analistas, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$, de salbutamol base.

DIAS	ANALISTA 1	ANALISTA 2	\bar{X}	ΣX	ΣX^2	S	RSD
DIA 1	0.4840	0.5114	0.4977	0.9954	0.4959	0.0194	3.90
DIA 2	0.4687	0.4794	0.4740	0.9481	0.4495	0.0080	1.69
DIA 3	0.4646	0.5122	0.4884	0.9768	0.4782	0.0336	6.88
\bar{X}	0.4724	0.5010	0.4867				
ΣX	1.4173	1.5030		2.9203			
ΣX^2	0.6698	0.7537			1.4236		
S	0.0102	0.0187					
RSD	2.16	3.73					

HIPOTESIS NULA = No existe diferencia entre las lecturas obtenidas por día, entre diferente analista.

HIPOTESIS ALTERNA # 1 = Existe diferencia entre la lecturas obtenidas por día.

HIPOTESIS ALTERNA # 2 = Existe diferencia entre las lecturas obtenidas por diferente analista.

Tabla 14. Análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la reproducibilidad del método entre analistas, a una concentración de 6 $\mu\text{g.}/\text{ml.}$ de salbutamol base.

FUENTE DE VARIACION	G. L.	SS	$\overline{\text{SS}}$	FC	FT		DCS
					1 %	5 %	
DIAS	2	5.0×10^{-4}	2.5×10^{-4}	1	99	19	(0)
ANALISTA	1	1.2×10^{-3}	1.2×10^{-3}	4.8	98.5	18.5	
ERROR	2	5.0×10^{-4}	2.5×10^{-4}	E. E.			
TOTAL	5	2.2×10^{-3}		3.25			

De acuerdo a los resultados (F calculado menor que F tabulado al 1 % y 5 %), para ambas concentraciones; se deduce que el método analítico muestra ser reproducible entre analistas y días diferentes, ya que no se encontró la existencia de diferencia estadística significativa, con un grado de confiabilidad del 95 %.

5- EXACTITUD

La tabla 15, ilustra los valores obtenidos en la evaluación de la exactitud, la tabla 16 muestra el procesamiento de los mismos, así como los resultados; evaluado a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$. El anexo 4 presenta los cálculos correspondientes.

Tabla 15. Valores obtenidos en la determinación del grado de exactitud del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g./ml}$ de salbutamol base.

LECTURA DE ABSORBANCIAS DE MUESTRA CON ADICION DE ESTANDAR DE REFERENCIA	LECTURAS DE ABSORBANCIAS ESTANDAR DE REFERENCIA
0.540	0.566
0.546	0.566
0.546	0.566
0.524	0.547
0.524	0.547
0.523	0.547
0.521	0.547

Tabla 16. Procesamiento de datos para evaluar la exactitud del método, a una concentración de 6 $\mu\text{g.}/\text{ml}$ de salbutamol base.

LECTURAS DE ABSORBANCIAS MUESTRAS CON ADICION DE ESTANDAR DE REFERENCIA	LECTURAS DE ABSORBANCIAS ESTANDAR DE REFERENCIA	$\mu\text{g.}$ ENCONTRADOS EN MUESTRA CON ADICION	$\mu\text{g.}$ RECUPERADOS	% DE RECOBRO
0.540	0.566	5.724	1.917	95.85
0.546	0.566	5.788	1.981	99.05
0.546	0.566	5.788	1.981	99.05
0.524	0.547	5.748	1.941	97.05
0.524	0.547	5.748	1.941	97.05
0.523	0.547	5.737	1.930	96.50
0.521	0.547	5.715	1.908	95.40
			\bar{X}	97.14
			S	1.438

Grado de exactitud = 97.14 %

Limites de confianza = 3.24 %

Grado de confiabilidad = 99.90 %

IV- CONCLUSIONES

- 1- De los resultados obtenidos se deduce que el método analítico propuesto es lineal en un rango de concentración de 2 - 10 $\mu\text{g./ml}$, repetible entre días, reproducible entre analistas y días (confiabilidad del 95 %); con un grado de exactitud del $97.14 \% \pm 3.24 \%$ (confiabilidad al 99.9 %).
- 2- El método analítico puede ser utilizado para el control de calidad en las muestras; tomando en cuenta el hecho de la dificultad analítica de todo proceso de extracción y de las características del solvente utilizado.
- 3- El valor del error experimental, en todos los casos (menor del 5 %); siempre permaneció comprendido dentro de la confiabilidad utilizada (95 % de confiabilidad), lo cual avala el proceso de validación.
- 4- El modelo de Diseño Experimental utilizado posee las características adecuadas (económico, sencillo, confiable, etc) para ser utilizado en futuros trabajos de esta índole.

V- RECOMENDACIONES

- De acuerdo al resultado obtenido en la evaluación de la estabilidad de la solución de prueba y por no contar con mayor información disponible; se hace necesario que tanto la preparación de los reactivos y la determinación del principio activo sean efectuados, el día del análisis. Ya que no es posible asegurar con certeza la estabilidad de la solución de prueba.

- El número de experimentos efectuados en el proceso de validación representan un plan de análisis tipo reducido; no obstante ser altamente confiable. Si se desea tomar el presente trabajo como modelo en futuros ensayos de validación, el número de experimentos no constituye una limitante para la aplicación de estos, cuando se desee ampliarlo y las condiciones lo permitan (método de bajo costo económico); pero si constituye una limitante para la reducción de los mismos.

- El proceso de planificación de un modelo de diseño experimental debe de poseer especial cuidado; fijando metas objetivas, útiles, realizables; ya que de lo contrario es posible que se llegue a no alcanzar ninguna conclusión válida.

- En base a la experiencia obtenida, es posible la utilización del presente estudio en la validación de diversos métodos analíticos. Por otra parte debido a la importancia que este tipo de procedimiento posee; puede ser incluido como parte del programa de estudio en la cátedra correspondiente, y en general a la industria farmacéutica.

VI — ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 17. Procesamiento de datos para análisis de regresión y correlación.

X	Y	X ²	XY	Y ²
2	0.16662	4	0.33324	2.776 x 10 ⁻²
4	0.33128	16	0.32512	1.0975 x 10 ⁻¹
6	0.48029	36	2.88174	0.23068
8	0.63104	64	5.04832	0.3982
10	0.71804	100	7.1804	0.5156
ΣX = 30	ΣY=2.32727	ΣX ² =220	ΣXY=16.76882	ΣY ² =1.281992

A partir de los datos mostrados en la tabla 17, se obtienen los valores siguientes :

$$16.76882 = 30 a + b 220$$

$$2.32727 = 5 a + b 30$$

Simultaneando ambas expresiones:

$$a = 0.044674$$

$$b = 0.07013$$

Lo cual conduce a la ecuación de regresión:

$$Y_{\text{corregido}} = 0.044674 + 0.07013 (X)$$

Substituyendo por cada valor

$$Y_{\text{corregido}} \quad 1 = 0.044674 + 0.07013 (2) = 0.184934$$

$$Y_{\text{corregido}} \quad 2 = 0.044674 + 0.07013 (4) = 0.325194$$

$$Y_{\text{corregido}} \quad 3 = 0.044674 + 0.07013 (6) = 0.465454$$

$$Y_{\text{corregido}} \quad 4 = 0.044674 + 0.07013 (8) = 0.605714$$

$$Y_{\text{corregido}} \quad 5 = 0.044674 + 0.07013 (10) = 0.745974$$

Calculo de el coeficiente de correlación

$$r = \frac{5 \times 16.76882 - 30 \times 2.32727}{\sqrt{[5 \times 220 - (30)^2] [5 \times 1.281992 - (2.32727)^2]}}$$

$$r = 0.994889$$

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) para el coeficiente de correlación.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADO	F TABULADO	
					1 %	5 %
REGRESION	1	1.26892	1.26892	288.39	34.1	10.1
ERROR DE CORRELACION	3	0.01307	0.0044			
TOTAL	4	1.281992	0.320498			

ANEXO 2

SIMBOLOGIA UTILIZADA EN EL ANALISIS DE VARIANZA

- E.E. = Error experimental.
- FC = Valor de F calculado.
- FT = Valor de F tabulado, obtenido de las tablas correspondientes.
- G.L. = Grados de libertad.
- DCS = Decisión a tomar de acuerdo al resultado.
- SS = Suma de cuadrados.
- \overline{SS} = Media de cuadrados.
- (1) = Indica que existe diferencia estadística significativa. ($FC > FT$ al 1 % y $FC > FT$ al 5 %).
- (0) = Indica que no existe diferencia estadística significativa. ($FC < FT$ al 1 % y $FC < FT$ al 5 %).
- (2) = Indica que existe diferencia estadística.
($FC < FT$ al 1 % y $FC > FT$ al 5 %).

CÁLCULOS:

continuación se presentan únicamente los cálculos realizados para a concentración de 4 $\mu\text{g./ml}$; los correspondientes a 6 $\mu\text{g./ml}$ se realizaron bajo el mismo procedimiento.

$$: 1.2490 = \frac{(3.8714)^2}{12}$$

$$\text{.L. días: } 3 = 4 - 1$$

$$\text{.L. error: } 8 = 4(3 - 1)$$

$$\text{.L. total: } 11 = 4 \times 3 - 1$$

$$\text{SS días: } 1.4 \times 10^{-3} = \frac{(\emptyset.9251)^2 + (\emptyset.9519)^2 + (\emptyset.9826)^2 + (1.0118)^2}{3} - 1.2490$$

$$\text{SS total: } 2.8 \times 10^{-3} = 1.2518 - 1.2490$$

$$\text{SS error: } 1.4 \times 10^{-3} = 2.8 \times 10^{-3} - 1.4 \times 10^{-3}$$

$$\text{SS días: } 4.67 \times 10^{-4} = \frac{1.4 \times 10^{-3}}{3}$$

$$\text{SS error: } 1.75 \times 10^{-4} = \frac{1.4 \times 10^{-3}}{8}$$

$$\text{FC: } 2.67 = \frac{4.67 \times 10^{-4}}{1.75 \times 10^{-4}}$$

$$\text{E.E.: } 4.1 = \frac{\sqrt{1.75 \times 10^{-4}}}{0.3226} \times 100$$

$$\text{F.T. 1 \% : } 7.59$$

$$\text{F.T. 5 \% : } 4.07$$

$$\text{DCS: } (\emptyset) = \text{FC} < \text{FT al 1 \% y FC} < \text{FT 5 \%}$$

ANEXO 3

A continuación se presentan unicamente los cálculos realizados para la concentración de 4 µg./ml los correspondientes a 6µg./ml se realizaron bajo el mismo procedimiento.

$$C : 0.6655 = \frac{(1.9982)^2}{6}$$

$$G.L. \text{ días: } 2 = 3 - 1$$

$$G.L. \text{ analista: } 1 = 2 - 1$$

$$G.L. \text{ error: } 2 = (3 - 1) (2 - 1)$$

$$G.L. \text{ total: } 5 = 3 \times 2 - 1$$

$$SS \text{ días: } 0.0003 = \frac{(\emptyset.6677)^2 + (\emptyset.6458)^2 + (\emptyset.6847)^2}{2} - 0.6655$$

$$SS \text{ analista: } 0.0014 = \frac{(\emptyset.9532)^2 + (1.0450)^2}{3} - 0.6655$$

$$SS \text{ total: } 0.0021 = 0.6676 - 0.6655$$

$$SS \text{ error: } 0.0004 = 0.0021 - 0.0003 - 0.0014$$

$$\text{---} \\ SS \text{ días: } 1.5 \times 10^{-4} = \frac{0.0003}{2}$$

$$\text{---} \\ SS \text{ analista: } 0.0014 = \frac{0.0014}{1}$$

$$\text{---} \\ SS \text{ error: } 0.0002 = \frac{0.0004}{2}$$

$$\text{FC días/error: } 0.75 = \frac{1.5 \times 10^{-4}}{0.0002}$$

$$\text{FC analista/error: } 7 = \frac{0.0014}{0.0002}$$

$$\text{E.E.: } 4.23 = \frac{\sqrt{0.0002}}{0.3330} \times 100$$

FT días/error 1 % : 99

FT analista/error 1 % : 98.5

FT días/error 5 % : 19

FT analista/error 5 % : 18.5

DCS: (0) = días/error --> FC < FT 1 % y FC < FT 5 %
analista/error --> FC < FT 1 % y FC < FT 5 %

ANEXO 4

.Determinación del porcentaje de recobro o recuperación. A continuación se presenta un cálculo a manera de ejemplo:

Utilizando la expresión:

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\frac{A_m \times \mu\text{g. st}}{A_{st}} - \mu\text{g. e}}{\mu\text{g. a}} \times 100$$

donde:

A_m = Absorbancia de muestra con adición de estándar de referencia.

$\mu\text{g. st}$ = $\mu\text{g.}$ de estándar de referencia utilizado para efectuar la lectura de absorbancia y la adición a las muestras correspondientes.

A_{st} = Absorbancia del estándar de referencia.

$\mu\text{g. e}$ = $\mu\text{g.}$ presentes en la muestra sin adición.

$\mu\text{g. a}$ = $\mu\text{g.}$ de estándar de referencia adicionados a la muestra.

Sustituyendo:

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\frac{0.540 \times 6 \mu\text{g}}{0.566} - 3.8072 \mu\text{g}}{2 \mu\text{g}} \times 100$$

$$\% \text{ de recobro} = 95.85 \%$$

.Determinación del grado de exactitud del método analítico: Se utiliza la expresión: propuesta en el diseño experimental correspondiente a este elemento.

- cálculo del valor de t

$$t = \frac{|\bar{X} - \mu|}{S} \sqrt{N}$$

$$t = \frac{|97.14 - 100|}{1.438} \sqrt{7}$$

$$t = 5.27$$

.Determinación de los límites de confianza o confiabilidad: Se utiliza la expresión, propuesta en el diseño experimental así como las consideraciones hechas al respecto.

$$\begin{array}{l} \text{Limite de} \\ \text{confianza} \end{array} = \bar{X} \pm (t') \frac{S}{\sqrt{N}}$$

$$\begin{array}{l} \text{Limite de} \\ \text{confianza} \end{array} = 97.14 \pm (5.959) \frac{1.438}{\sqrt{7}}$$

$$\begin{array}{l} \text{Limite de} \\ \text{confianza} \end{array} = 97.14 \pm 3.24 \%$$

VII — BIBLIOGRAFIA

1. Brieger, Gottfried. 1970. Química Organica Moderna. Edición Española. Ediciones del Castillo S.A., Madrid, España. pp. 78 - 79.
2. BRITISH PHARMACOPOEIA 1980. OFFICE OF THE BRITISH PHARMACOPOEIA COMISSION. Printed in the United Kingdom for Her Majesty's Stationery Office. pp. 394 - 395.
3. BRITISH PHARMACOPOEIA 1988. OFFICE OF THE BRITISH PHARMACOPOEIA COMISSION. Printed in the United Kingdom for Her Majesty's Stationery Office. pp. 496 - 497 (S 112).
4. Chou, Ya-Lun. 1977. Análisis Estadístico. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., México. pp. 1-9, 330 - 334.
5. Clarke, E. G. C. 1986. Isolation and Identification of Drugs. Volume 2. Printed in Great Britain by Willian Clowes and Sons Limited, London. pp. 1095.
6. Connors, Keneth A. 1975. A textbook of Pharmaceutical Analysis. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., United States of America. pp. 216 - 220.

7. Downie, Norville M., and Heath, Robert W. 1986. Métodos Estadísticos Aplicados. Quinta Edición. Editorial Harla; México D.F. pp. 85 - 106. 202 - 228.
8. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 1988. Quinta Edición. Talleres Continental. Texcoco, México. pp. 867 - 868, 1443 - 1447.
9. Gordus, Adon A. P. 1987. Teoría y Problemas de Química Analítica. Serie de Compendios Schaum. Editorial McGrawhill. Ediciones Lerner Ltda., Bogotá, Colombia. pp. 23 - 48.
10. MARTINDALE. 1989. The Extra Pharmacopoeia. Twenty-ninth Edition. Edited by James E. F. Reynolds. Published by the Pharmaceutical Press, London, England. pp. 1480 - 1482.
11. Meyer, Paul L. 1973. Probabilidad y Aplicaciones Estadísticas. Segunda Edición, Versión Española. Fondo Interamericano Educativo S.A., E.U.A. pp. 1 - 18, 290 - 319.
12. Remington's Farmacia. 1987. 17a. Edición. Tomo 1. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina. pp. 846 - 853.

13. Santich, Ileana R. 1989. Fautas sobre buenas prácticas de Laboratorio. Organización Panamericana de la Salud. Edición Scorpio. Bogotá, Colombia. pp 33 - 34.
14. Spiegel, Murray R. PH. D. 1988. Teoría y Problemas de probabilidad Estadística. Serie de Compendios Schaum. Editorial McGraw-Hill. Impresora Rodelo S.A., México. D.F., México.
15. THE MERCK INDEX OF CHEMICALS AND DRUGS. 1989. Eleventh Edition. Published by MERCK & C.O. Inc., N. J., U.S.A. pp. 1710 - 1712.
16. USP DI. 1989. Drug information for the Health Care Professional. Ninth Edition. The United States Pharmacopeial Convention Inc. Printed by Banta Company / George Banta Company, Inc. Harrisonburg, U.S.A. pp. 601 - 602.
17. USP XXII, NF XVII. 1990. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. THE NATIONAL FORMULARY. THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC. Printed by Mack Printing Company, Easton, PA U.S.A. pp. 1710 - 1712.

VIII - APENDICE

I - A

DISTRIBUCION F AL 1 %

v_1 grados de libertad en el numerador

v_2 grados de libertad en el denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	1062	5000	5403	5625	5764	5869	5928	5981	6023	6056	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339	6365
2	98.5	99.0	99.2	99.2	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5
3	31.1	30.8	29.5	28.7	28.2	27.9	27.7	27.5	27.3	27.2	27.1	26.9	26.7	26.6	26.5	26.4	26.3	26.2	26.1
4	21.2	18.0	16.7	16.0	15.5	15.2	15.0	14.8	14.7	14.5	14.4	14.2	14.0	13.9	13.8	13.7	13.7	13.6	13.5
5	16.3	13.3	12.1	11.4	11.0	10.7	10.5	10.3	10.2	10.1	9.89	9.72	9.55	9.47	9.38	9.29	9.20	9.11	9.02
6	13.7	10.9	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40	7.31	7.23	7.14	7.06	6.97	6.88
7	12.2	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16	6.07	5.99	5.91	5.82	5.74	5.65
8	11.3	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36	5.28	5.20	5.12	5.03	4.95	4.86
9	10.6	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81	4.73	4.65	4.57	4.48	4.40	4.31
10	10.0	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41	4.33	4.25	4.17	4.08	4.00	3.91
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10	4.02	3.94	3.86	3.78	3.69	3.60
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86	3.78	3.70	3.62	3.54	3.45	3.36
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66	3.59	3.51	3.43	3.34	3.25	3.17
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.70	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51	3.43	3.35	3.27	3.18	3.09	3.00
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37	3.29	3.21	3.13	3.05	2.96	2.87
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26	3.18	3.10	3.02	2.93	2.84	2.75
17	8.40	6.11	5.19	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16	3.08	3.00	2.92	2.83	2.75	2.65
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08	3.00	2.92	2.84	2.76	2.66	2.57
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00	2.92	2.84	2.76	2.67	2.58	2.49
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94	2.86	2.78	2.69	2.61	2.52	2.42
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.17	3.03	2.88	2.80	2.72	2.64	2.55	2.46	2.36
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83	2.75	2.67	2.58	2.50	2.40	2.31
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.07	2.93	2.78	2.70	2.62	2.54	2.45	2.36	2.26
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.03	2.89	2.74	2.66	2.58	2.49	2.40	2.31	2.21
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.86	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70	2.62	2.54	2.45	2.36	2.27	2.17
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	2.96	2.82	2.66	2.58	2.50	2.42	2.33	2.23	2.13
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.93	2.78	2.63	2.55	2.47	2.38	2.29	2.20	2.10
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.90	2.75	2.60	2.52	2.44	2.35	2.26	2.17	2.06
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.87	2.73	2.57	2.49	2.41	2.33	2.23	2.14	2.03
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55	2.47	2.39	2.30	2.21	2.11	2.01
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.66	2.52	2.37	2.29	2.20	2.11	2.02	1.92	1.80
60	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.50	2.35	2.20	2.12	2.03	1.94	1.84	1.73	1.60
120	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56	2.47	2.34	2.19	2.03	1.95	1.86	1.76	1.66	1.53	1.38
∞	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.18	2.04	1.88	1.79	1.70	1.59	1.47	1.32	1.00

DISTRIBUCION F AL 5 %

ν_1 grados de libertad en el numerador

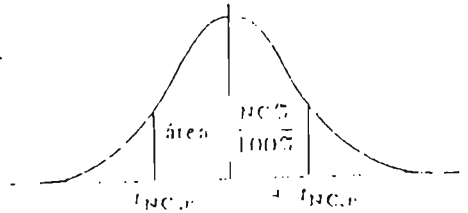
ν_2 grados de libertad en el denominador

$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161	200	210	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	5.99	5.14	4.70	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.76	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

Fuente: E. S. Pearson y H. O. Hartley, *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol. 2 (1972), Tabla 5, página 178, con permiso de los autores y editores.

DISTRIBUCION t DE STUDENT

Coefficientes de confiabilidad de dos colas $t_{NC, n}$
para la distribución t de student con n
grados de libertad



n \ NC %	NC %												
	50.0	68.3	80.0	90.0	95.0	95.5	99.0	99.7	99.9	99.99	99.999	99.9999	
1	1.000	1.837	3.078	6.314	12.706	13.998	63.657	244.894	636.619	636.619	636.619	636.619	636.619
2	0.816	1.321	1.886	2.920	4.303	4.532	9.925	19.573	31.598	39.999	50.000	59.999	69.999
3	0.766	1.197	1.638	2.353	3.182	3.309	5.841	9.338	12.924	18.000	24.000	30.000	36.000
4	0.741	1.141	1.533	2.132	2.776	2.872	4.604	6.691	8.610	11.333	15.000	20.000	25.000
5	0.727	1.110	1.476	2.015	2.571	2.650	4.032	5.555	6.869	11.176	15.000	20.000	25.000
6	0.718	1.090	1.440	1.943	2.447	2.518	3.707	4.947	5.959	9.085	13.555	18.000	23.000
7	0.711	1.077	1.415	1.895	2.365	2.430	3.499	4.562	5.408	7.885	11.215	15.000	20.000
8	0.706	1.066	1.397	1.860	2.306	2.368	3.355	4.305	5.141	7.120	9.282	13.253	17.000
9	0.703	1.058	1.383	1.833	2.262	2.321	3.250	4.120	4.981	6.591	8.827	11.632	15.000
10	0.700	1.052	1.372	1.812	2.228	2.285	3.169	3.980	4.857	6.211	8.150	10.516	14.000
12	0.694	1.043	1.356	1.782	2.179	2.233	3.055	3.785	4.618	5.604	7.261	9.086	13.000
16	0.690	1.032	1.337	1.746	2.120	2.170	2.921	3.562	4.015	5.134	6.330	7.642	12.000
20	0.687	1.025	1.325	1.725	2.086	2.134	2.845	3.430	3.850	4.837	5.851	6.927	11.000
24	0.683	1.017	1.310	1.697	2.042	2.088	2.750	3.285	3.636	4.352	5.291	6.119	10.000
30	0.679	1.008	1.296	1.671	2.000	2.044	2.660	3.143	3.460	4.169	4.825	5.449	9.000
40	0.677	1.004	1.289	1.658	1.980	2.022	2.617	3.076	3.373	3.997	4.573	5.102	8.000
50	0.674	1.000	1.282	1.645	1.960	2.000	2.576	3.000	3.291	3.901	4.417	4.892	7.000