

15  
2ej

U N A M

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

" ZARAGOZA "

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
PARA VALORAR ABOB Y ACETAMINOFEN EN UNA SOLUCION  
ORAL POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A

LUCIA GARCIA MARTINEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

1.- INTRODUCCION .....	1
2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA .....	3
2.1 Cromatografía líquida moderna .....	4
2.2 Desarrollo y validación de métodos analíticos ...	13
2.3 Monografías .....	32
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	39
4.- OBJETIVOS .....	41
5.- HIPOTESIS .....	43
6.- MATERIAL Y METODO .....	45
7.- RESULTADOS .....	50
8.- DISCUSION DE RESULTADOS .....	75
9.- CONCLUSIONES .....	81
10.- BIBLIOGRAFIA .....	83
11.- APENDICE .....	87

1.- INTRODUCCION.

## INTRODUCCION

Actualmente en la industria farmacéutica se requiere de métodos analíticos que proporcionen: exactitud, precisión, reproducibilidad, linealidad y especificidad para la determinación cuantitativa de las sustancias activas, presentes en los productos farmacéuticos, con el fin de asegurar y garantizar la calidad de dichos productos durante las diferentes etapas de fabricación, pero sobre todo para verificar que el medicamento contenga la cantidad de sustancias activas que especifica la etiqueta y de esta forma pueda cumplir debidamente con las funciones terapéuticas para las cuales fue desarrollado.

Por tal motivo el propósito de este trabajo consiste en desarrollar un método analítico que permita determinar -- ABOB [Clorhidrato de 1-(morfolinoformimidoil)]guanidina y ACETAMINOFEN, presentes en una solución oral.

El método a utilizar para lograr esta finalidad es la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), porque a diferencia de otros métodos analíticos permite, -- entre otras ventajas realizar en forma confiable, específica, rápida, reproducible y exacta la separación, la cuantificación e identificación de los principios activos asimismo también permite detectar las impurezas, los posibles productos de degradación, etc. presentes en los productos farmacéuticos.

Posteriormente se llevó a cabo la validación estadística del método para control de calidad, mediante la determina-

ción de los siguientes parámetros: exactitud, precisión, reproducibilidad, linealidad y especificidad.

De los resultados obtenidos se concluye que el método es exacto, lineal, preciso, reproducible y específico para la cuantificación de ABOB y Acetaminofén en forma simultánea, por lo que puede emplearse en los análisis rutinarios de Control de Calidad con alta confiabilidad.

## 2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

## 2.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA. (2,10,12,19,23)

La cromatografía es un proceso que se basa en la separación de los componentes de una mezcla, debido a un equilibrio de distribución entre dos fases no miscibles entre sí, donde una es la fase estacionaria que puede ser líquida o sólida y la otra es la fase móvil que puede ser gaseosa o líquida. El proceso de separación es el resultado de las diferentes velocidades de migración de los componentes de la mezcla como consecuencia de sus equilibrios de distribución entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Dependiendo de la combinación de los diferentes tipos de fases estacionarias y móviles, se pueden obtener --- varios tipos de cromatografía como: cromatografía líquido-líquido, cromatografía líquido-sólido, cromatografía gas-líquido y cromatografía gas-sólido.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un proceso de separación, en el cual la fase estacionaria se encuentra empaquetada en una columna y la fase móvil es un líquido que fluye a través de la primera, en tanto que en la cromatografía de gases la fase móvil es un gas, por tal razón en base a la naturaleza de las fases estacionarias, de las fases móviles y de los diferentes mecanismos de separación de los componentes de una mezcla, existen --- cuatro formas o métodos de cromatografía líquida que son:

- a) Cromatografía Líquido-Líquido (partición).
- b) Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción).



- c) Cromatografía por Exclusión (permeación en gel o filtración).
- d) Cromatografía de Intercambio Iónico.

a) Cromatografía Líquido-Líquido (partición).- Este -- proceso se basa como su nombre lo indica, en la partición entre la fase estacionaria y la fase móvil, debido a la solubilidad que presentan las moléculas de la muestra en dichas fases. De ahí que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos en ella, en tanto que los menos solubles son fácilmente eluidos por la fase móvil.

b) Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción).- En este proceso se presenta un fenómeno de adsorción-desorción, en el cual la fase estacionaria es un adsorbente y se basa en la competencia entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar sitios activos en la superficie de un sólido o fase estacionaria.

En algunas ocasiones, debido a una fuerte adsorción o retención de los componentes de la muestra en el sólido -- activo, es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme, con lo cual se logra un incremento de la solubilidad en los componentes de la muestra en la fase móvil. A esta variante se le llama elución por gradiente o programación de la fase móvil.

c) Cromatografía por Exclusión (permeación en gel o filtración).- En este proceso la separación se efectúa de acuerdo al tamaño de las moléculas, con lo cual la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Aún en la actualidad la fase estacionaria no queda restringida a un gel, por lo que en ocasiones la columna se rellena con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites y de esta forma la muestra es retenida o filtrada.

Este método es principalmente aplicado en la separación de polímeros y compuestos de alto peso molecular que va desde 2000 hasta varios millones.

d) Cromatografía de Intercambio Iónico.- En este proceso como su nombre lo indica se efectúa un intercambio de iones, por lo que es principalmente utilizado para compuestos que presenten cargas en su estructura, es decir muestras iónicas o ionizables y se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones (fase estacionaria que tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra), por esta razón cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y a su vez tardará más tiempo en ser eluida.

La fase móvil es un tampón acuoso o solución amortiguadora, en la cual se puede variar la fuerza iónica y el pH para obtener la elución de los componentes de la mezcla en un tiempo razonable.

Prácticamente en base a la polaridad de las fases la cro  
matografía de líquidos de alta resolución se divide en:  
(3,10,19)

- A) Cromatografía en Fase Normal.
- B) Cromatografía en Fase Inversa o Fase Reversa.

A) Cromatografía en Fase Normal.- En este proceso la fase estacionaria es fuertemente polar y la fase móvil es no polar. Por lo que es posible separar compuestos polares y medianamente polares, debido a que los compuestos polares son selectivamente retenidos por la fase estacionaria y los compuestos menos polares son transportados más rápidamente por la fase móvil.

B) Cromatografía en Fase Inversa o Fase Reversa.- En este proceso la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es fuertemente polar. Como se puede observar este proceso es exactamente la inversa de la cromatografía en fase normal, de tal forma que los compuestos no polares son selectivamente retenidos por la fase estacionaria, en tanto que los compuestos polares son fácilmente eluidos por la fase móvil.

En algunas ocasiones se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad en los dos procesos anteriores.

En el de fase normal puede realizarse mediante la adición de una sustancia más polar, en tanto que en el de fase inver  
sa será adicionando una sustancia menos polar.

### 2.1.1 CONCEPTOS BASICOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

TIEMPO DE RETENCION ( $t_R$ ).- Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se determina desde el instante en que la muestra se introduce al sistema (punto de inyección), hasta el momento en que se obtiene el punto máximo del pico en el cromatograma. (2,3,10)

TIEMPO MUERTO ( $t_0$  ó  $t_m$ ).- Es el tiempo requerido -- para eluir un compuesto no retenido en la columna, es decir, durante el recorrido a lo largo de la columna el compuesto permanece siempre en la fase móvil y viaja a su misma velocidad, de tal forma que la determinación de este parámetro se realiza midiendo el tiempo comprendido entre el punto de inyección y el máximo del pico cromatográfico, correspondiente al compuesto no retenido. (2,3,10,19)

TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO ( $t'_R$ ).- Es la diferencia - entre  $t_R$  y  $t_0$ , es decir, durante el recorrido de un compuesto a lo largo de la columna las moléculas del compuesto invierten parte del tiempo en la fase móvil y parte en la fase estacionaria. Mientras estan en la fase móvil se desplazan a su misma velocidad, en tanto que mientras permanecen en la fase estacionaria estan estáticas, interaccionando con ésta y de esta forma las retrasa. Por esta razón  $t'_R$  representa el tiempo que el compuesto permanece en la fase estacionaria y se define de la siguiente forma: (3,10,19)

$$t'_R = t_R - t_0$$

FACTOR DE CAPACIDAD ( K ).- Este indica el tiempo durante el cual un compuesto puede ser retenido en la columna. y se define de la siguiente forma: (2,3,19)

$$K = \frac{t'_r}{t_0} = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

ANCHURA DE LA BASE DEL PICO CROMATOGRAFICO ( W ).- Este se obtiene trazando las tangentes en los puntos de inflexión y midiendo la longitud de la línea base que queda comprendida entre los puntos donde se presenta la intersección de las tangentes. (2,3)

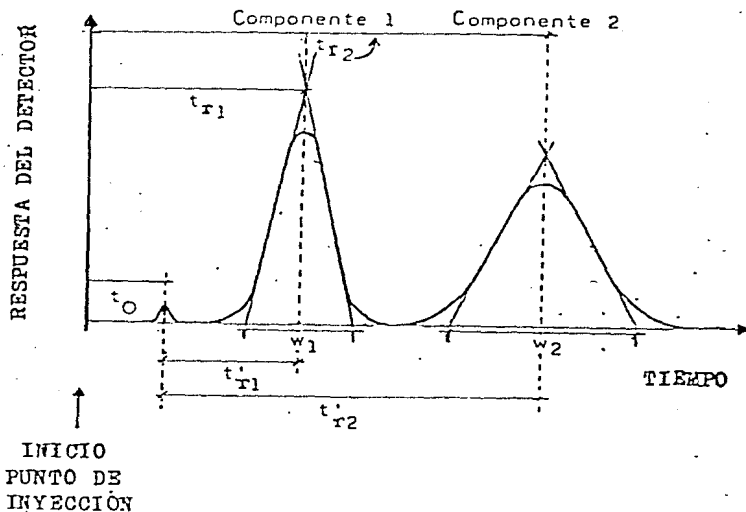


Fig. 1. Principales parámetros que caracterizan a un cromatograma típico.

Donde:

$t_0$  = tiempo muerto de una columna de separación.

$t_{r1}$ ,  $t_{r2}$  = tiempo de retención de los componentes 1 y 2

$t'_{r1}$ ,  $t'_{r2}$  = tiempo de retención corregido de los componentes 1 y 2.

$w_1$ ,  $w_2$  = anchura de la base de los picos de los componentes 1 y 2.

RESOLUCION (R).- Es una determinación cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos picos adyacentes y se determina con la siguiente expresión: (2,3,10,19).

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{\frac{w_1}{t_{r2}} + \frac{w_2}{t_{r1}}}$$

Si se obtiene un valor de "R" igual a 1.5 significa que los picos estan separados totalmente.

SELECTIVIDAD O FACTOR DE SEPARACION ( $\alpha$ ).- Este expresa la posición relativa de dos picos adyacentes, pero no proporciona información alguna sobre la separación real de éstos, debido a que la separación de los picos depende del tiempo que permanecen las moléculas de los compuestos en la fase estacionaria y no al tiempo que emplean en recorrer la longitud de la columna a la velocidad de la fase móvil y se le determina con la siguiente expresión: (2,3,10,19)

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

PLATOS TEORICOS.- Son etapas de partición o distribución que sufren las moléculas de los compuestos durante su recorrido a lo largo de una columna cromatográfica. (2,10,19)

NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).- Sirve para determinar la eficiencia de una columna cromatográfica y se determina -- midiendo la anchura de la base de uno de los picos que se pueda obtener directamente sobre el cromatograma y se utiliza la siguiente expresión: (2,3,10,12,19,23)

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2$$

O bien cuando se determina la anchura del pico cromato-- gráfico a media altura de éste, se utiliza la siguiente -- expresión: (2,3,10,19)

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2$$

ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (H).- Es el grosor de un plato teórico y se determina mediante la siguiente - expresión: (2,3,10,12,19,23)

$$H = \frac{L}{n}$$

Donde: H = Altura equivalente a un plato teórico.

L = Longitud de la columna cromatográfica.

n = Número de platos teóricos de la columna cromatográfica.

### 2.1.2 EQUIPO PARA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

Actualmente el equipo requerido para CLAR, incluye una gran versatilidad y complejidad de instrumentos, ya que continúa en proceso de avance y modernización.

A continuación se muestra un diagrama esquemático de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. (2,3,10)

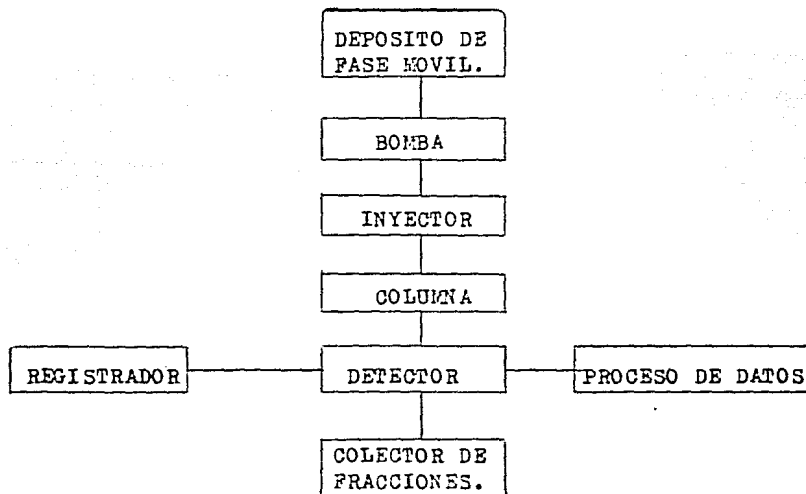


Fig. 2 Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.



## 2.2 DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

Actualmente el desarrollo analítico es una actividad de mayor importancia en la Industria Farmacéutica, debido -- entre otras cosas a que es muy frecuente encontrar dificultades para la determinación cuantitativa de los principios activos presentes en los diversos productos farmacéuticos.

Esto se debe principalmente a la complejidad y variabilidad de la composición de éstos.

Cuando se desarrollan nuevos métodos analíticos es necesario conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos

Por tal motivo ante la necesidad de contar con técnicas analíticas que proporcionen exactitud, precisión, reproducibilidad, linealidad y especificidad durante los análisis químicos, y con el fin de garantizar una alta seguridad analítica se estableció el proceso denominado validación de un método analítico, mediante el cual se llega a conocer la exactitud y se establece la variabilidad del método.

Existen muchas definiciones de validación, tales como - las siguientes:

- Validación es el grado de validez de un proceso de medición. (8)
- Validación es la comprobación y verificación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso. (11)

- Validación es el proceso para determinar que tan adecuada es una metodología para proporcionar resultados analíticos dentro de un margen establecido. (11)
  
- La FDA (Food and Drugs Administration), actualmente la define como sigue: La validación comprende la revisión sistemática de las instalaciones y de las etapas esenciales en el desarrollo y la producción incluyendo los controles de los productos farmacéuticos con el objetivo de asegurarse de que los productos fabricados pueden ser elaborados con seguridad y reproducidos con la calidad deseada si se observan los métodos establecidos de producción y control.

Como se puede observar las definiciones son amplias y sencillas, con el fin de establecer su objetivo.

Existen muchas formas de validar un método analítico -- debido a que la forma de validación de un método analítico dependerá de su futura aplicación, es decir si éste va a ser utilizado en control de calidad, en estudios de estabilidad, en estudios de biodisponibilidad, etc..

Sin embargo, en todos ellos es necesario determinar los parámetros de la validación, como se muestra en la tabla 2.2.1 .

TABLA 2.2.1 FORMA DE VALIDACION DE UN METODO ANALITICO.

PARAMETRO.	PARA CONTROL DE CALIDAD.	PARA ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	BIODISPO- NIBILIDAD
EXACTITUD.	X	X	X
PRECISION.	X	X	X
REPRODUCI- BILIDAD.	X	X	X
LINEALIDAD.	X	X	X
LIMITE DE DETECCION.	Conc. bajas	X	X
ESPECIFICIDAD- INTERFERENCIAS.	X	X	X
ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.	-	X	X
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.	-	X	X

A continuación se dará una breve descripción de lo que abarca cada parámetro de la validación de un método.

**EXACTITUD** .- Es la concordancia existente entre un valor obtenido experimentalmente y el valor real (referencia o estándar). (1,4,8)

Un método nunca será 100% exacto, debido a que todo proceso de medición está sujeto a error, por lo que el analista deberá reducir al máximo la magnitud del error a un nivel despreciable, ya que nunca conseguirá eliminarlo totalmente. Los errores son de dos tipos: Errores sistemáticos y errores aleatorios. (12,14,23)

**Errores sistemáticos o determinados**.- Son aquellos cuya fuente puede localizarse o definirse y de esta forma tratar de eliminarse lo más posible, ya que pueden introducirse fácilmente, mediante una operación inadecuada, por un juicio pobre. Por ejemplo: mal manejo de algún instrumento, impurezas de algún reactivo, equipo mal calibrado, etc.

**Errores aleatorios o indeterminados**.- Son aquellos que no pueden atribuirse a una causa conocida ni puede predecirse su magnitud o dirección, tanto de una serie de datos como para una sola medición.

Aún con el máximo de sensibilidad casi nunca da el mismo número de la medición, por lo que se ha encontrado que de un grupo de observaciones repetidas, estas se agrupan -- alrededor del valor más frecuentemente observado (valor medio).

En la práctica, la exactitud de un método se determina comparando el promedio de los resultados obtenidos experi--

mentalmente con un valor real, conocido. De esta manera es posible detectar el error sistemático (BIAS O SESGO).

Experimentalmente lo anterior se lleva a cabo, colocando la cantidad etiquetada en el marbete (estándar o referencia) más o menos exacta, de principio activo a un placebo de la forma farmacéutica y posteriormente se analiza como una muestra.

Una vez obtenidos los resultados de recobro experimental, se efectúa la comparación entre el promedio de los resultados obtenidos y el valor real conocido (cantidad añadida de principio activo), mediante las siguientes inferencias estadísticas:

a) PRUEBA DE HIPOTESIS.- Para verificar que los resultados obtenidos experimentalmente pertenezcan a una distribución teórica, cuyo parámetro es el valor real conocido, lo cual se realiza utilizando el estadígrafo " t de Student" (para muestras pequeñas) y esta definido por la siguiente expresión: (7,9)

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

Donde:

- X = Valor promedio de los resultados obtenidos experimentalmente
- $\mu$  = Media poblacional (valor real).
- S = Desviación estándar de la muestra.
- n = Número de muestras.

La desviación estándar ( S ).- Es un parámetro que determina la dispersión de un conjunto de datos en torno a su valor central o medio que se expresa, mediante la siguiente expresión: (7,9)

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

Se establece un contraste de hipótesis de la siguiente forma:

- Establecer la hipótesis nula (  $H_0$  ).

$$H_0 : \bar{X} = \mu$$

- Establecer la hipótesis alternativa (  $H_I$  )

$$H_I : \bar{X} \neq \mu$$

Con lo cual se determina si un método es o no exacto, para una región de aceptación o de rechazo del 95%, con un nivel de significancia de 0.05

b) INTERVALO DE CONFIANZA.- Permite evaluar dentro de que intervalo se localiza el valor verdadero del parámetro (valor real) y se determina, mediante la siguiente expresión

$$\text{Intervalo de Confianza (IC)} = \bar{X} \pm (t_{0.975}) (S/\sqrt{n})$$

Donde:

$t_{0.975}$  = Valor teórico del estadígrafo (tablas), con una confianza del 95% para dicho intervalo.

$\bar{X}$  = Valor promedio de los resultados obtenidos experimentalmente.

PRECISION .-Es grado de concordancia de las mediciones repetidas para una misma determinación alrededor de un valor central o medio.

A causa de los errores aleatorios, anteriormente mencionados, las observaciones repetidas, casi nunca serán idénticas, pero mostrarán mayor o menor variación en torno a su valor central o medio, razón por la cual la desviación estándar esta asociada con la precisión.

Debido a que la desviación estándar describe la reproducibilidad de una observación aislada, la precisión se expresa en términos de repetibilidad y reproducibilidad. (1,4,8)

REPETIBILIDAD .-Es la precisión de un método expresada como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas bajo condiciones iguales de trabajo, es decir llevadas a cabo por un sólo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

Para determinar la variabilidad de los resultados obtenidos, se utiliza el estadígrafo  $\chi^2$  (ji cuadrada), el cual esta definido por la siguiente expresión: (7,9)

$$\chi^2 = \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma^2}$$

Donde:  $n$  = número de determinaciones.

$s^2$  = varianza de la muestra.

$\sigma^2$  = varianza poblacional, esta representa la variabilidad del método.

La varianza muestral esta dada por:

$$S^2 = \frac{(\sum x_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

Generalmente por experiencia los métodos analíticos presentan una variabilidad de  $\sigma^2 = 5$ , por lo que para evaluar la repetibilidad del método se establece un contraste de -- hipótesis:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ).

$$H_0 : \sigma^2 = 5$$

- Hipótesis alternativa ( $H_I$ ).

$$H_I : \sigma^2 \neq 5$$

Para una región de aceptación o de rechazo del 95% con - un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$

La evaluación del intervalo de confianza (IC) para determinar entre que valores se encuentra el valor verdadero del parámetro se realiza mediante la siguiente expresión: (9)

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{1-\alpha/2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{\alpha/2}}}$$

Donde:  $n$  = número de muestras independientes.

$S^2$  = varianza muestral.

$\sigma$  = desviación estándar poblacional.

$\chi^2$  = valor teórico del estadigrafo (tablas), con una confianza del 95%.



REPRODUCIBILIDAD.- Es la precisión de un método expresada como la concordancia entre determinaciones realizadas - bajo diferentes condiciones de trabajo, es decir determinaciones llevadas a cabo por diferentes analistas en diferentes días o bien en diferentes laboratorios, utilizando - diferentes equipos.

Para determinar la variabilidad de los resultados obtenidos, se utiliza un diseño estadístico llamado análisis de varianza (ANOVA), el cual consiste en desglosar las diversas fuentes de variación que contribuyen a la variabilidad del fenómeno, probando la significación de cada fuente o causa de variación contra el error experimental y valorar así su importancia relativa, cuyo criterio de prueba es el cociente del estadígrafo de prueba  $F$  de dos varianzas (entre y dentro de las muestras), donde el modelo lineal que se basa - en el diseño experimental es:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Porcentaje de recobro, cuantificado por el  $i$ -ésimo analista, en el  $j$ -ésimo día de la  $k$ -ésima repetición.

$\mu$  = Parámetro que representa el valor real del porcentaje de recobro, donde no hay efecto por analista o por día.

- $A_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo analista en el porcentaje -  
cuantificado.
- $D_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo día en el porcentaje cuanti-  
ficado.
- $AD_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el analista y  
el día.
- $E_{(ij)k}$  = Error experimental, el cual es una medida de  
la reproducibilidad.

En dicho modelo cada variable representa una de las posi-  
bles fuentes de variación que involucra el método analítico,  
tales como el analista ( $A_i$ ), el día de análisis ( $D_j$ ), la -  
interacción entre el analista y el día ( $AD_{ij}$ ) y el error  
( $E_{(ij)k}$ ) implícito en cada determinación.

La tabla de análisis de varianza (ANOVA), que representa el modelo lineal seleccionado, es la siguiente: (9)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	PRODUCTO SIMPLIFICADO.	SUMA DE CUADRADOS (SC)	MEDIA CUADRÁTICA (MC)	F <sub>Calc.</sub>
$A_i$	$a - 1$	$(i - 1)$	$\frac{\sum y_{i..}^2}{bc} - \frac{\sum y^2}{abc}$	$SC_A / a-1$	$MC_A / MC_E$
$D_j$	$b - 1$	$(j - 1)$	$\frac{\sum y_{.j.}^2}{ac} - \frac{\sum y^2}{abc}$	$SC_D / b-1$	$MC_D / MC_E$
$AD_{ij}$	$(a-1)(b-1)$	$(ij-i-j-1)$	$\frac{\sum y_{ij.}^2}{c} - \frac{\sum y_{i..}^2}{bc} - \frac{\sum y_{.j.}^2}{ac} + \frac{\sum y^2}{abc}$	$SC_{AD} / a-1(b-1)$	$MC_{AD} / MC_E$
$E_{(ij)k}$	$ab(c-1)$	$(ijk-ij)$	$\sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{ij.}^2}{c}$	$SC_E / ab(c-1)$	-

Donde la media cuadrática del error, es un estimador de la reproducibilidad.

**LINEALIDAD.**- Es el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función de tipo lineal, establecida por la siguiente ecuación: (1,7,8,9)

$$Y = mx + b$$

Donde: Y = Variable dependiente (respuesta).

x = Variable independiente.

m = Pendiente de la recta.

b = Ordenada al origen.

La linealidad se evalúa, mediante una regresión lineal, utilizando el método de mínimos cuadrados. Obteniendo así la recta que mejor se ajusta (recta de regresión), al conjunto de valores obtenidos experimentalmente.

La ecuación de la recta de regresión es la siguiente:

$$Y = B - \gamma X$$

Donde: Y = Cantidad recuperada.

X = Cantidad adicionada.

B = Ordenada al origen o intercepto (poblacional igual a cero).

$\gamma$  = Pendiente de la recta (poblacional igual a - uno).

Para determinar numéricamente el valor de los coeficientes de regresión (ordenada al origen y pendiente de la recta), se utilizan las siguientes expresiones (método de mínimos cuadrados).

$$B = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Para determinar con qué exactitud se ajusta una recta de regresión al conjunto de valores obtenidos experimentalmente nuevamente se recurre a establecer pruebas de hipótesis tanto para la ordenada al origen como para la pendiente, - estableciendo para éstos sus respectivos intervalos de confianza a un nivel de significancia dado.

### I) INFERENCIA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN.

Se utiliza el estadístico "t de student" definido por la siguiente expresión: (1,7,9,14)

$$t = \frac{b - B}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Se establece el contraste de hipótesis.

- Hipótesis nula ( $H_0$ ).

$$H_0 : b = B$$

- Hipótesis alternativa ( $H_1$ ).

$$H_1 : b \neq B$$

Donde  $B$  es igual a cero.

Para una región de aceptación o de rechazo del 95% con - un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

La evaluación del intervalo de confianza (IC), para determinar entre qué valores se encuentra el valor verdadero del parámetro se realiza mediante la siguiente expresión:

$$IC = b - t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} < B < b + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

La pendiente de la recta de regresión esta definida por:

$$Y' = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

El coeficiente de correlación (r).- Indica el grado de - variación en la relación de tipo lineal entre dos variables (X,Y). Cuando "r" adquiere un valor próximo a +1 ó -1, significa que el conjunto de valores obtenidos experimentalmente se aproximan a una recta. El coeficiente de correlación este definido por la siguiente expresión: (7,9)

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

El método de mínimos cuadrados requiere que la suma de - los cuadrados de los errores sea lo menor posible, es decir que las desviaciones de los puntos, del conjunto de valores experimentales a la recta de regresión sean mínimas. El - parámetro que se utiliza para determinar estas desviaciones es el error estándar de estimación ( $\hat{S}_{y/x}$ ) y esta definido por la siguiente expresión: (7)

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum Y^2 - b(\sum Y) - m(\sum XY)}{n - 2}}$$

Donde:  $\hat{S}_{y/x}$  = Error estándar de estimación.

b y m = Son estimaciones de mínimos cuadrados de B y Y'.

## II) INFERENCIA PARA LA PENDIENTE DE LA RECTA.

Se utiliza el estadístico "t" de Student, definido por -  
la siguiente expresión:

$$t = \frac{(m - \hat{\gamma}) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Se establece el contraste de hipótesis:

- Hipótesis nula ( $H_0$ ).

$$H_0 : m = \hat{\gamma}$$

Donde  $\hat{\gamma} = 1$

- Hipótesis alternativa ( $H_I$ ).

$$H_I : m \neq \hat{\gamma}$$

Para una región de aceptación o de rechazo del 95% con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05

La evaluación del intervalo de confianza (IC) para determinar entre que valores se encuentra el valor verdadero - del parámetro se realiza, mediante la siguiente expresión:

$$IC = b - t_{\alpha/2} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < \hat{\gamma} < b + t_{1-\alpha/2} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Donde:

b = Valor de la ordenada al origen obtenida experimentalmente.

$S_x$  = Desviación estándar de las cantidades adicionadas.

Donde:

$\hat{S}_{y/x}$  = Error estándar de estimación modificado.

$X_i$  = Cantidad adicionada.

$m$  = Valor de la pendiente de la recta obtenida experimentalmente.

$B$  = Valor teórico de la ordenada al origen (poblacional).

$\gamma$  = Valor teórico de la pendiente de la recta (poblacional).

$\bar{X}$  = Valor promedio de las cantidades adicionadas.

$n$  = Número de determinaciones independientes.



**ESPECIFICIDAD.**- Es el grado de la medición que corresponde sólo a la sustancia en estudio y no a otras sustancias - que pueden interferir o estar presentes en el material a analizar, tales como excipientes, impurezas, productos de degradación, etc.

En la práctica la especificidad se puede demostrar, -- mediante las siguientes metodologías: (4,3)

- 1) Especificidad - Interferencias.
- 2) Especificidad en Estabilidad.

1) **ESPECIFICIDAD - INTERFERENCIAS.**- Con éste es posible determinar si las otras sustancias interfieren o no con la sustancia en estudio; habiendo determinado ésto se podrán - realizar las modificaciones pertinentes al método. Generalmente este parámetro se determina cuando el método será utilizado para control de calidad, mediante la siguiente metodología:

a) Analizar la sustancia activa de interés, el placebo y la muestra de un lote piloto de la formulación, utilizando el método desarrollado.

b) De los resultados obtenidos verificar, que los excipientes, las impurezas, los posibles productos de degradación pueden ser separados de la sustancia activa de interés.

c) Confirmar que la respuesta obtenida corresponda sólo a la sustancia activa de interés.

d) Si el método desarrollado no es capaz de separar la - sustancia activa de interés de los excipientes, de las impurezas y de los posibles productos de degradación, se desarrollará otro método.

2) ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD.-- Es un tipo de especificidad en el cual las otras sustancias son las que pueden formarse durante el almacenamiento bajo condiciones específicas de humedad, luz, pH, temperatura, etc.. Este parámetro se determina cuando el método será utilizado para estudios de biodisponibilidad o bien para estudios de estabilidad, mediante la siguiente metodología: (4,8)

a) Analizar la sustancia activa de interés, el placebo y la muestra de un lote piloto de la formulación, utilizando el método desarrollado.

b) Almacenar las sustancias antes mencionadas bajo condiciones previamente definidas en términos de humedad, luz, pH, temperatura, etc., durante determinados períodos de tiempo para propiciar la descomposición y de esta forma obtener los productos de degradación.

c) Transcurrido el tiempo de almacenamiento analizar las muestras utilizando el método desarrollado.

d) De los resultados obtenidos verificar, que las impurezas, los productos de degradación, etc. pueden ser separados de la sustancia activa de interés.

e) Si la respuesta obtenida corresponde sólo a la sustancia activa de interés, el método se llamará "específico" y podrá ser utilizado como indicador de estabilidad.

En el caso contrario, se deberá estimar el efecto aparente de las otras sustancias sobre la señal analítica y se estimará en cuanto y cuando este efecto podría ser importante.

**LIMITE DE DETECCION.**- Es la minima concentración de sustancia activa que se puede detectar con exactitud y precisión, utilizando las mismas condiciones de trabajo ya establecidas en el método desarrollado. Generalmente este parámetro se determina en métodos cuyas concentraciones de sustancia activa son pequeñas, tales como en los fluidos biológicos de los estudios de biodisponibilidad o bien en los estudios de estabilidad para determinar los productos de degradación, no obstante se puede aplicar en los métodos para control de calidad de concentraciones pequeñas, y se determina de la siguiente forma: (3)

a) Adicionar cantidades exactas de la sustancia activa correspondiente a 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 25% de la concentración máxima esperada al fluido biológico en estudio o al placebo de la formulación.

b) Graficar: Concentración adicionada Vs Concentración recuperada.

c) Determinar: Límites de confianza al 95 % de la recta de regresión.

d) Trazar una recta paralela a la recta de regresión a una distancia de  $-1.96 S_{y/x}$  con respecto al valor  $Y$  obtenido.

La recta trazada es el límite inferior de confianza cuyo intercepto con la ordenada al origen dará el límite mínimo de detección.

## 2.3 MONOGRAFIAS.

## 2.3.1 ABOB.

NOMBRES QUÍMICOS. (15,16,17,18)

Clorhidrato de N', N'-anhidrobis( $\beta$ -hidroxietil) biguanida.

Clorhidrato de 4-Morfolincarboximidoilguanidina.

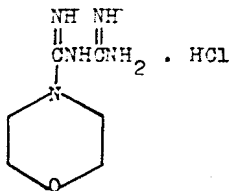
Clorhidrato de 1-(morfolinoformimidoil) guanidina.

Clorhidrato de 4-(guanidino-formimidoil) morfolina.

SINONIMOS. (17,18)

Clorhidrato de bioxina: Clorhidrato de moroxidina.

FORMULA DESARROLLADA. (17,18)



FORMULA CONDENSADA:  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{O}$

PESO MOLECULAR: 207.7

DESCRIPCION: Polvo cristalino blanco, inodoro.

SOLUBILIDAD.

Fácilmente soluble en agua y ácidos diluidos; Soluble en metanol; Poco soluble en álcalis diluidos; Ligeramente soluble en etanol y cloroformo; Insoluble en acetona, éter etílico y hexano.

PUNTO DE FUSION: 203 - 207°C

pH en solución acuosa al 2% : 5.5 - 6.5

ABSORCION AL ULTRAVIOLETA.

En agua destilada presenta un máximo a 237 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 80$ )

PERDIDA POR SECADO: Máximo 0.1%

RESIDUO DE IGNICION: Máximo 0.1%

ESTABILIDAD.

Es muy estable en estado seco y puro a la luz y a temperaturas altas hasta 45°C .

TOXICOLOGIA. (16)

Fuertes dosis terapéuticas interfieren con el color de la visión.

DOSIS TERAPEUTICA. (15) .

0.6 - 1.6 g al día.

USO TERAPEUTICO.

En la profilaxis y en el tratamiento de infecciones virales.

CONSERVACION.

En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

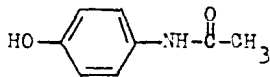
## 2.3.2 ACETAMINOFEN.

NOMBRES QUIMICOS. (5,13,16,18)

4'-hidroxiacetanilida; p-hidroxiacetanilida; p-acetamidofenol; p-acetaminofenol; p-acetilaminofenol; N-acetil-p-aminofenol; N-(4-hidroxifenil)acetamida.

SINONIMOS: Paracetamol.

FORMULA DESARROLLADA.



FORMULA CONDENSADA:  $C_8H_9NO_2$

PESO MOLECULAR: 151.2

DESCRIPCION.

Polvo cristalino blanco, inodoro, con sabor amargo.

SOLUBILIDAD. (5,13,16,20)

Soluble, a 20°C una parte en 70 partes de agua destilada; una parte en 20 partes de agua caliente; una en siete partes de etanol; una en 13 partes de acetona; una en 40 partes de glicerina; una en nueve partes de propilenglicol; - muy ligeramente soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en éter etílico; soluble en solución de hidróxido de sodio 1N.

pH en solución acuosa saturada: 5.1 - 6.5 (15,16,21,22)

PUNTO DE FUSION: 168 - 172°C

ABSORCION AL INFRARROJO. (13,20)

En pastilla KBr los principales máximos se observan a: 1263, 1387, 1441, 1506, 1565, 1657, 3162 y 3326  $\text{cm}^{-1}$ .

ABSORCION AL ULTRAVIOLETA.

SOLVENTE	LONGITUD DE ONDA (nm).	COEFICIENTE DE - ABSORCION MOLAR. ( $\epsilon$ )
Agua destilada.	242.5	10,037
Etanol.	249.0	13,090 a 14,000
Metanol.	249.0	13,600
Sol. de hidróxido de sodio 0.01N	258.0	10,830

CONTENIDO DE AGUA: Máximo 0.5% (5,21,22)

CLORUROS: Máximo 0.014%

METALES PESADOS: Máximo 0.001%

SULFATOS: Máximo 0.02%

RESIDUO DE IGNICION: Máximo 0.1%

CONSERVACION.

En recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz.



## ESTABILIDAD. (13)

En estado seco y puro es muy estable a la luz y a temperaturas altas hasta 45°C. En solución es sensible a la luz y se degrada fácilmente a pH = 2, sin embargo en soluciones alcalinas (pH = 9) la degradación se torna lenta. Obteniéndose en ambos casos como producto de degradación el p-aminofenol y ácido acético. Por lo que para las preparaciones líquidas el pH deberá ser ajustado aproximadamente a seis ya que en este valor se ha encontrado el máximo de estabilidad.

## FARMACODINAMIA. (15,16,20)

Se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, por lo que se distribuye en todos los tejidos del organismo, se metaboliza en el hígado y es excretado en la orina principalmente como glucurónido y sulfatos conjugados. Así mismo también en menor proporción como ácido mercaptúrico y cisteína conjugados.

## TOXICOLOGIA. (13,15,16)

Los síntomas que se presentan en las primeras 24 horas, cuando se administra en dosis muy por arriba de la dosis terapéutica son: anorexia, dolor abdominal, náuseas y vómito. Sin embargo cuando las dosis son mayores a 15 g produce necrosis hepática, cuyos síntomas se presentan de cuatro a seis días más tarde, debido a la gran acumulación de los metabolitos altamente tóxicos.

**DOSIS TERAPÉUTICA. (5,15,16)**

0.5 - 1.0g / 4 horas: máximo 4g/24 horas.

niños de uno a seis años: 250 mg/tres veces al día.

niños de siete a 12 años: 500 mg/tres veces al día.

**USO TERAPÉUTICO. (5,15,16)**

Analgésico y antipirético.

### 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que actualmente no se cuenta con un método adecuado para la determinación de ABOB y Acetaminofén, presentes en una solución oral, se procederá a desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Porque a diferencia de otros métodos analíticos CLAR permite entre otras ventajas determinar en forma confiable, rápida, específica, reproducible y exacta la separación, la cuantificación e identificación de las sustancias activas, las impurezas, los posibles productos de degradación, etc., presentes en los diferentes productos farmacéuticos.

Por otra parte CLAR, tiene un amplio espectro de aplicación con las siguientes ventajas:

- Permite la separación, la identificación y la cuantificación de diversos componentes en forma simultánea.
- El tiempo de análisis es corto.
- Se requieren pequeñas concentraciones de muestra.
- Es posible analizar compuestos termolábiles y no volátiles, tales como esteroides, pesticidas, plastificantes vitaminas, etc.

Una vez desarrollado el método analítico se procederá a validarlo para control de calidad, con el fin de verificar que dicho método proporcione exactitud, precisión, reproducibilidad y linealidad durante los análisis rutinarios y de esta forma garantizar que la solución oral esté libre de impurezas, que sea física y químicamente estable y que contenga la cantidad de principios activos que especifica la etiqueta.

#### 4.- OBJETIVOS.

**O B J E T I V O S .**

- Desarrollar un método analítico para valorar ABOB y Acetaminofén por cromatografía de líquidos de alta resolución, en una solución oral.
- Validar el método analítico para control de calidad.
- Determinar la exactitud, la precisión, la linealidad, la reproducibilidad y la especificidad del método.

**5.- HIPOTESIS.**

## H I P O T E S I S

Se desarrollará un método analítico para valorar ABOB y Acetaminofén presentes en una solución oral, por cromatografía de líquidos de alta resolución, el cual será válido para control de calidad y será exacto, preciso, reproducible, lineal y específico.



## 6.- MATERIAL Y METODO.

## A) MATERIAL.

- Filtros Millipore ó Pyrex 0.2 y 0.45  $\mu$ m.
- Embudos de separación de vidrio de 125 ml.
- Matraces Kitasato de vidrio de 500 ml.
- Matraces Erlenmeyer de vidrio de 250, 500 ml.
- Matraces volumétricos de vidrio de 25, 50 y 100 ml.
- Pipetas volumétricas de vidrio de 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas graduadas de vidrio de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probetas graduadas de vidrio de 25 y 50 ml.
- Vasos de precipitados de vidrio de 50, 100 y 250 ml.

## B) REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTANDAR.

- Agua destilada.
- Acido acético glacial RA.
- Cloroformo RA.
- Metanol RA.
- Metanol grado HPLC ó UVASOL.

## C) EQUIPO.

- Baño de ultrasonido.
- Columna  $\mu$ Bondapak CN de acero inoxidable de 30 cm de longitud x 3.9 mm de diámetro (Waters).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Waters Associates, Inc.), equipado con lo siguiente:
  - Detector UV, modelo 440, de longitud de onda fija.
  - Inyector automático WISP 710 B.
  - Registrador Data Module, modelo 730.
  - Bombas de presión MKG (A) y MKG (B), modelo 6000A.
  - Programador automático de solventes, modelo 600 E.

## M E T O D O

## DETERMINACION SIMULTANEA DE ABOB y ACETAMINOFEN.

ABOB : 1.0 g/100 ml.

Acetaminofén : 2.5 g/100 ml.

## PARAMETROS INSTRUMENTALES.

- Cromatógrafo de líquidos de alta presión (Waters o equivalente).
- Columna:  $\sphericalangle$  Bondapak CN de acero inoxidable de 30 cm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno - (Waters o equivalente).
- Detector: U.V. 254 nm .
- Flujo: 1.5 ml/min.
- Presión: la necesaria para mantener el flujo indicado - (Aprox. 2500 psi).
- Sensibilidad: 0.1 AUFS.
- Velocidad de la carta: 0.020 cm/min.
- Volumen de inyección: 10 ml.

## REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTANDAR.

- Metanol grado HPLC o UVASOL.
- Solución de ácido acético glacial 2% ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  2%).
- Fase móvil: Metanol -  $\text{CH}_3\text{COOH}$  2% (50 - 50), degasificada y filtrada a través de una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  ó 0.45  $\mu\text{m}$ .

## SOLUCION DE COMPARACION O SOLUCION ESTANDAR.

a) Se pesó con exactitud alrededor 100 mg de ABOB, -- 250 mg de Acetaminofén (sustancias de referencia) y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 ml.

b) Se disolvió y se llevó a volumen con metanol RA .

c) Se transfirió con pipeta volumétrica 5 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 ml, se llevó a volumen con metanol RA y se mezcló (concentración final 0.10 mg/ml de ABOB y 0.25 mg/ml de Acetaminofén).

## SOLUCION DE PRUEBA O SOLUCION PROBLEMA.

a) Se transfirió con pipeta volumétrica 5 ml de la muestra (concentración aproximada 50 mg/5ml ABOB, 125mg/5ml Acetaminofén) a un embudo de separación de 125 ml.

b) Se adicionaron 15 ml de agua destilada y se mezcló.

c) Se adicionaron 20 ml de cloroformo RA y se mezcló durante un minuto, transcurrido este tiempo se dejó reposar.

d) Se descartó la fase orgánica.

e) Se transfirió con pipeta volumétrica 2 ml de la fase acuosa a un matraz volumétrico de 50 ml, se llevó a volumen con metanol RA y se mezcló (concentración final --- 0.10 mg/ml ABOB y 0.25 mg/ml Acetaminofén).

## PROCEDIMIENTO.

Se inyectaron en el cromatógrafo 10  $\mu$ l de las soluciones de comparación y de prueba.

## TIEMPOS DE RETENCION APROXIMADOS.

- ABOB : 4.50 min.

- Acetaminofén: 2.40 min.

## CALCULOS.

$$\text{mg ABOB}/100 \text{ ml} = \frac{A_p}{A_c} \times \frac{W_c}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{20}{5} \times \frac{50}{2} \times 100 \times K$$

$$\text{mg ABOB}/100 \text{ ml} = \frac{A_p}{A_c} \times W_c \times 10 \times K$$

$$\text{mg Acetaminofén}/100 \text{ ml} = \frac{A_p}{A_c} \times \frac{W_c}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{20}{5} \times \frac{50}{2} \times 100 \times K$$

$$\text{mg Acetaminofén}/100 \text{ ml} = \frac{A_p}{A_c} \times W_c \times 10 \times K$$

Donde:

$A_c$  = Área del pico de la sustancia de referencia.

$A_p$  = Área del pico de la sustancia de prueba.

$W_c$  = Peso de la sustancia de referencia (mg).

10 = Factor de dilución.

K = Contenido porcentual de la sustancia de comparación  
(Sustancia de referencia).

## 7.- RESULTADOS.

## RESULTADOS

### SEPARACION OBTENIDA

Las figuras 5.1 y 5.2, muestran los cromatogramas de la solución de comparación (estándar de referencia) y de la solución de prueba (problema), en los cuales se puede observar la separación obtenida entre el ABOB y el Acetaminofén, con sus respectivos tiempos de retención.

INJECT

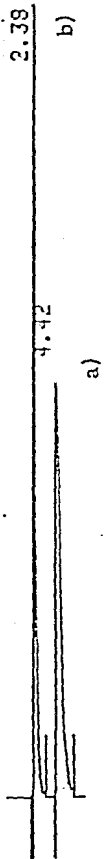


Fig. 5.1 Estándar de referencia.

- a) ABOB.
- b) ACETAMINOFEN.

INJECT



Fig. 5.2 Solución de prueba.

- a) ABOB.
- b) ACETAMINOFEN.



## ABOB

Concentración Agregada mg/ml	Concentración Recuperada mg/ml	% Recuperado.
5.0	5.01	100.20
5.0	4.98	99.60
5.0	5.05	101.00
5.0	4.93	98.60
7.5	7.57	100.93
7.5	7.48	99.73
7.5	7.60	101.33
7.5	7.42	98.93
10.0	10.05	100.50
10.0	9.99	99.90
10.0	9.88	98.80
10.0	10.11	101.10
12.5	12.61	100.88
12.5	12.44	99.52
12.5	12.54	100.32
12.5	12.68	101.44
15.0	15.18	101.20
15.0	15.11	100.73
15.0	14.97	99.80
15.0	15.02	100.13

TABLA I. Resultados obtenidos al cuantificar el ABOB, para determinar la exactitud, la linealidad y la repetibilidad del método.

La tabla I, muestra los resultados obtenidos al cuantificar el ABOB de la solución oral (placebo), realizando re cobros del 50, 75, 100, 125 y 150% aproximadamente de la cantidad etiquetada, con cuatro determinaciones para cada uno. Posteriormente se llevó a cabo la evaluación estadística para dichos resultados al determinar la exactitud, la linealidad y la repetibilidad.

Cálculos para determinar la exactitud del método, utilizando los resultados de porcentaje recuperado de la tabla I

$$\bar{X} = 100.232$$

$$S = 0.8601015$$

$$C.V. = 0.35811$$

$$n = 20$$

$$n-1 = 19 \text{ grados de libertad (g.l.)}$$

$$t_{0.975} = 2.093$$

PRUEBA DE HIPOTESIS.

$$H_0 : \bar{X} = \mu$$

Donde  $\mu = 100 \%$

$$H_1 : \bar{X} \neq \mu$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $t_{\text{Calc.}}$ ), con  $n-1$  grados de libertad.

$$t_{\text{Calc.}} = \frac{\bar{X} - \mu}{S / \sqrt{n}}$$

Región crítica bilateral a un nivel de significancia de 0.05

Región crítica bilateral a un nivel de significancia ( $\alpha$ )  
de 0.05

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{Calc.}} < t_{1-\alpha/2}$$

Si:  $t_{0.025} = -2.1009$

$$t_{0.975} = 2.0930$$

$$t_{\text{Calc.}} = 1.2052946$$

Entonces:  $t_{0.025} < t_{\text{Calc.}} < t_{0.975}$

Siendo:  $-2.0930 < 1.2062 < 2.0930$ , con lo cual  
se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $\bar{X}$ .

$$IC = \bar{X} \pm t_{0.975} (S/\sqrt{n})$$

$$IC = 100.232 \pm 0.4025351$$

Límite inferior: 99.82%

Límite superior: 100.63%

LINEALIDAD.

Cálculos para determinar la linealidad del método, ----  
evaluando la relación entre la variable independiente (con-  
centración agregada) y la variable dependiente (concentra-  
ción recuperada), utilizando los valores de la tabla I.

Ordenada al origen de la recta estimada.

$$b = - 0.051$$

Pendiente de la recta estimada.

$$m = 1.0082$$

Coefficiente de regresión.

$$r = 0.9997675$$

Coefficiente de determinación.

$$r^2 = 0.9995351$$

Ecuación de la recta estimada.

$$Y = - 0.051 + 1.0082 X$$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN.

$$H_0 : b = B$$

Donde  $B = 0$

$$H_1 : b \neq B$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $t_B$ ), con  $n-2$  grados de liber-  
tad.

$$t_B = \frac{b - B}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_1^2}{n \sum (x_1 - \bar{x})^2}}}$$

Región crítica bilateral a un nivel de significancia de 0.05

$$t_{\alpha/2} < t_B < t_{1-\alpha/2}$$

Si:  $\hat{S}_{y/x} = 0.0810075$

$$t_{0.025} = -2.1009$$

$$t_{0.975} = 2.1009$$

$$t_B = -0.9385$$

Entonces:  $t_{0.025} < t_B < t_{0.975}$

Siendo:  $-2.1009 < -0.9385 < 2.1009$ , con lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $B$ .  
con  $n-2$  grados de libertad.

$$IC = b - t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} < B < b + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$IC = b - 2.1009 (0.0543414) < B < b + 2.1009 (0.0543414)$$

$$IC = b \pm 0.1141658$$

$$IC = -0.051 \pm 0.1141658$$

Límite inferior:  $-0.1651658$

Límite superior:  $0.0631658$

## PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA PENDIENTE.

$$H_0 : m = \gamma$$

$$\text{Donde } \gamma = 1$$

$$H_1 : m \neq \gamma$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $t_\gamma$ ), con  $n-2$  grados de libertad.

$$t_\gamma = \frac{(m - \gamma) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

Región crítica bilateral a un nivel de significancia de 0.05

$$t_{\alpha/2} < t_\gamma < t_{1-\alpha/2}$$

$$\text{Si: } t_{0.025} = -2.1009$$

$$t_{0.975} = 2.1009$$

$$t_\gamma = 1.6035$$

$$\text{Entonces: } t_{0.025} < t_\gamma < t_{0.975}$$

Siendo:  $-2.1009 < 1.6035 < 2.1009$ , con lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $\mu$ .

$$IC = m - t_{\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < \mu < m + t_{1-\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

$$IC = m - 2.1009 (0.0051233) < \mu < m + 2.1009 (0.0051233)$$

$$IC = m \pm 0.0107636$$

$$IC = 1.0082 \pm 0.0107636$$

Límite inferior: 0.997436

Límite superior: 1.018963

ECUACION DE LA RECTA AJUSTADA.

$$\hat{Y} = -0.051 + 1.0082 X$$

Para los siguientes valores de X (concentración agregada mg/ml),  $\hat{Y}$  toma los siguientes valores:

( X )	( $\hat{Y}$ )
5.0	4.990
7.5	7.510
10.0	10.031
12.5	12.551
15.0	15.072

Coefficiente de correlación (r) = 0.9997675

Coefficiente de determinación ( r<sup>2</sup> ) = 0.9995351

## PRECISION (Repetibilidad).

Cálculos para determinar la repetibilidad del método, -  
utilizando para ello los resultados de porcentaje recupera-  
do de la tabla I.

$$n = 20$$

$$n-1 = 19 \text{ g.l.}$$

$$S = 0.8601015$$

$$S^2 = 0.7397745$$

$$\chi_{0.025}^2 = 8.91$$

$$\chi_{0.975}^2 = 32.90$$

## PRUEBA DE HIPOTESIS.

$$H_0 : S^2 = \sigma^2$$

$$H_1 : S^2 \neq \sigma^2$$

Donde  $\sigma^2 = 5$

Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $\chi_{\text{Calc.}}^2$ ), con  $n-1$  grados de -  
libertad.

$$\chi_{\text{Calc.}}^2 = \frac{(n-1)(S^2)}{\sigma^2}$$

Región crítica unilateral a un nivel de significancia de 0.05

$$\chi_{\text{Calc.}}^2 < \chi_{\alpha}^2$$



Si:  $\chi^2_{0.95} = 30.10$

$\chi^2_{\text{Calc.}} = 2.811$

Entonces:  $\chi^2_{\text{Calc.}} < \chi^2_{0.95}$

Siendo:  $2.811 < 30.10$  , con lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95 % PARA  $\sigma$ .  
con  $n-1$  grados de libertad.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{1-\alpha/2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{\alpha/2}}}$$

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.975}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(S^2)}{\chi^2_{0.025}}}$$

$$IC = 0.6536 < \sigma < 1.256$$

	Analista 1.	Analista 2.
	99.78%	102.24%
Día 1.	100.96%	99.72%
	102.23%	100.58%
	102.68%	100.82%
Día 2.	100.13%	102.19%
	101.79%	99.63%

TABLA II. Resultados obtenidos al cuantificar el ABOB, para determinar la reproducibilidad del método analítico.

La tabla II, muestra los resultados obtenidos al realizar recobros de la cantidad de ABOB etiquetada, bajo diferentes condiciones de trabajo, es decir, en dos días diferentes y con dos analistas diferentes.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F <sub>Calc.</sub>	P <sub>0.95</sub>
A <sub>i</sub>	1	0.47	0.47	0.29115	161.4
D <sub>j</sub>	1	0.55	0.55	0.34071	161.4
AD <sub>ij</sub>	1	0.45	0.45	0.27876	5.32
E <sub>(ij)k</sub>	8	12.9141	1.61426		

TABLA III. Resultados obtenidos al evaluar el efecto de analista y día, mediante el análisis de varianza (ANOVA).

## ACETAMINOFEN

Concentración Agregada mg/ml	Concentración Recuperada mg/ml	% Recuperado.
12.50	12.52	100.16
12.50	12.38	99.04
12.50	12.31	98.43
12.50	12.43	99.84
18.75	18.96	101.12
18.75	18.66	99.52
18.75	18.81	100.32
18.75	18.48	98.56
25.00	25.10	100.40
25.00	24.92	99.28
25.00	25.30	101.20
25.00	24.93	99.72
31.25	31.65	101.28
31.25	31.41	100.51
31.25	31.35	100.32
31.25	31.15	99.63
37.50	37.32	99.52
37.50	37.83	100.88
37.50	37.63	100.48
37.50	37.55	100.13

TABLA IV. Resultados obtenidos al cuantificar el Acetaminofén, para determinar la exactitud, la linealidad y la repetibilidad del método.

La tabla IV, muestra los resultados obtenidos al cuantificar el acetaminofén de la solución oral (placebo), realizando recobros del 50, 75, 100, 125 y 150% aproximadamente de la cantidad etiquetada, con cuatro determinaciones para cada uno. Posteriormente se llevó a cabo la evaluación estadística para dichos resultados al determinar la exactitud, la linealidad y la repetibilidad.

Cálculos para determinar la exactitud del método, utilizando los resultados de porcentaje recuperado de la tabla IV.

$$\bar{X} = 100.022$$

$$S = 0.8106696$$

$$C.V. = 0.81049$$

$$n = 20$$

$$n-1 = 19 \text{ grados de libertad (g.l.)}$$

$$t_{0.975} = 2.093$$

PRUEBA DE HIPOTESIS.

$$H_0: \bar{X} = \mu$$

Donde  $\mu = 100 \%$

$$H_1: \bar{X} \neq \mu$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ ).

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $t_{\text{Calc.}}$ ), con  $n-1$  grados de libertad.

$$t_{\text{Calc.}} = \frac{\bar{X} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$

Región crítica bilateral a un nivel de significancia ( $\alpha$ )

de 0.05

Región crítica bilateral a un nivel de significancia ( $\alpha$ )  
de 0.05

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{Calc.}} < t_{1-\alpha/2}$$

Si:  $t_{0.025} = -2.093$

$t_{0.975} = 2.093$

$t_{\text{Calc.}} = 0.1213651$

Entonces:  $t_{0.025} < t_{\text{Calc.}} < t_{0.975}$

Siendo:  $-2.093 < 0.12136 < 2.0930$ , con lo cual  
se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $\bar{X}$ .

$$\text{IC} = \bar{X} \pm t_{0.975} (S/n)$$

$$\text{IC} = 100.022 \pm 0.3794$$

Límite inferior: 99.64

Límite superior: 100.40

## LINEALIDAD.

Cálculos para determinar la linealidad del método, -- evaluando la relación entre la variable independiente (concentración agregada) y la variable dependiente (concentración recuperada), utilizando los valores de la tabla IV.

Ordenada al origen de la recta estimada.

$$b = - 0.16850$$

Pendiente de la recta estimada.

$$m = 1.00312$$

Coefficiente de regresión.

$$r = 0.99932$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = 0.99964$$

Ecuación de la recta estimada.

$$Y = - 0.1685 + 1.00312 X$$

## PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA ORDENADA AL ORIGEN.

$$H_0 : b = B \quad \text{Donde } B = 0$$

$$H_1 : b \neq B$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $t_B$ ), con  $n-2$  grados de libertad.

$$t_B = \frac{b - B}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Región crítica bilateral a un nivel de significancia de 0.05

$$t_{\alpha/2} < t_B < t_{1-\alpha/2}$$

Si:  $\hat{S}_{y/x} = 0.1782119$

$$t_{0.025} = -2.1009$$

$$t_{0.975} = 2.1009$$

$$t_B = -1.4095$$

Entonces:  $t_{0.025} < t_B < t_{0.975}$

Siendo:  $-2.1009 < -1.4095 < 2.1009$ , con lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $B$ .  
con  $n-2$  grados de libertad.

$$IC = b - t_{\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_1^2}{n \sum (X_1 - \bar{X})^2}} < B < b + t_{1-\alpha/2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_1^2}{n \sum (X_1 - \bar{X})^2}}$$

$$IC = b - 2.1009 (0.1195481) < B < b + 2.1009 (0.1195481)$$

$$IC = b \pm 0.2511586$$

$$IC = -0.1695 \pm 0.2511586$$

Límite inferior:  $-0.41956$

Límite superior:  $0.08264$

PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA PENDIENTE.

H<sub>0</sub> : m = γ

Donde γ = 1

H<sub>I</sub> : m ≠ γ

Nivel de significancia (α)

α = 0.05

Estadístico de prueba ( t<sub>γ</sub> ), con n-2 grados de libertad.

t<sub>γ</sub> = (m - γ) S<sub>x</sub> √(n-1) / S<sub>y/x</sub>

Región crítica bilateral a un nivel de significancia de 0.05

t<sub>α/2</sub> < t<sub>γ</sub> < t<sub>1-α/2</sub>

Si: t<sub>0.025</sub> = - 2.1009

t<sub>0.975</sub> = 2.1009

t<sub>γ</sub> = 1.8011

Entonces: t<sub>0.025</sub> < t<sub>γ</sub> < t<sub>0.975</sub>

Siendo: - 2.1009 < 1.801 < 2.1009, con lo cual se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>).



INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $\gamma$ .

$$IC = m - t_{\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < \gamma < m + t_{1-\alpha/2} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

$$IC = m - 2.1009 (0.0045034) < \gamma < m + 2.1009 (0.0045034)$$

$$IC = m \pm 0.0094718$$

$$IC = 1.00312 \pm 0.0094718$$

Límite inferior: 0.9986

Límite superior: 1.0175

ECUACION DE LA RECTA AJUSTADA.

$$\hat{Y} = -0.1685 + 1.00312 X$$

Para los siguientes valores de X (concentración agregada - en mg/ml ),  $\hat{Y}$  toma los siguientes valores:

( X )	( $\hat{Y}$ )
12.50	12.433
18.75	18.733
25.00	25.034
31.25	31.335
37.50	37.636

Coefficiente de correlación ( r ) = 0.9995405

Coefficiente de determinación ( r<sup>2</sup> ) = 0.9992311

## PRECISION (Repetibilidad).

Cálculos para determinar la repetibilidad del método, --  
utilizando para ello los resultados de porcentaje recuperado  
de la tabla IV.

$$n = 20$$

$$n-1 = 19 \text{ g.l.}$$

$$S = 0.8106696$$

$$S^2 = 0.6571852$$

$$\chi_{0.025}^2 = 8.91$$

$$\chi_{0.975}^2 = 32.90$$

## PRUEBA DE HIPOTESIS.

$$H_0: S^2 = \sigma^2$$

$$\text{Donde } \sigma^2 = 5$$

$$H_1: S^2 \neq \sigma^2$$

Nivel de significancia ( $\alpha$ )

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de prueba ( $\chi_{\text{Calc.}}^2$ ), con  $n-1$  grados de libertad.

$$\chi_{\text{Calc.}}^2 = \frac{(n-1)(S^2)}{\sigma^2}$$

Región crítica unilateral a un nivel de significancia de 0.05

$$\chi_{\text{Calc.}}^2 < \chi_{\alpha}^2$$

Si:  $\chi_{0.95}^2 = 30.10$

$$\chi_{\text{Calc.}}^2 = 2.4973$$

Entonces:  $\chi_{\text{Calc.}}^2 < \chi_{0.95}^2$

Siendo:  $2.4973 < 30.10$ , con lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

INTERVALO DE CONFIANZA (IC) DEL 95% PARA  $\sigma$ .  
con  $n-1$  grados de libertad.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi_{1-\alpha/2}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi_{\alpha/2}^2}}$$

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi_{0.975}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1)(s^2)}{\chi_{0.025}^2}}$$

$$IC = 0.3795 < \sigma < 1.4014$$

	Analista 1.	Analista 2.
	100.18%	101.90%
Día 1.	99.76%	102.22%
	101.14%	100.30%
	100.82%	101.32%
Día 2.	102.10%	99.95%
	100.14%	102.00%

TABLA V. Resultados obtenidos al cuantificar el Acetaminofén, para determinar la reproducibilidad.

La tabla V, muestra los resultados obtenidos al realizar recobros de la cantidad de Acetaminofén etiquetada, bajo diferentes condiciones de trabajo, es decir en dos días diferentes y con dos analistas diferentes.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	F <sup>Calc.</sup>	F <sup>0.95</sup>
A <sub>i</sub>	1	1.05	1.05	1.15466	161.4
D <sub>j</sub>	1	0.06	0.06	0.06598	161.4
AD <sub>ij</sub>	1	0.32	0.32	0.90173	5.32
E <sub>(ij)k</sub>	8	7.2749	0.90936		

TABLA VI. Resultados obtenidos al evaluar el efecto de analista y día, mediante el análisis de varianza (ANOVA).

### ESPECIFICIDAD DEL METODO

Debido a que el método será utilizado para control de calidad, se determinó la especificidad, con el fin de verificar si otras sustancias, tales como otros activos, excipientes, impurezas, posibles productos de degradación, etc. presentes en el material a analizarse pudieran o no interferir con el ABCB y el Acetaminofén.

De los resultados obtenidos, se verificó que la respuesta obtenida sólo corresponde a las sustancias activas de interés, es decir al ABCB y el Acetaminofén, tal como se muestra en las figuras 7.1 y 7.2



Fig. 7.1 Estándar de referencia.

a) ABOB.

b) ACETAMINOFEN.

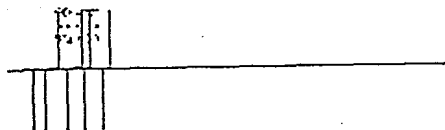


Fig. 7.2 PLACEBO.

## 8.- DISCUSION DE RESULTADOS.

DISCUSION DE RESULTADOS.

EXACTITUD.

Para determinar la exactitud del método, se realizaron recobros entre el 50 y el 150 %, aproximadamente de las cantidades de ABOB y de Acetaminofén etiquetadas en el -- marbete y de acuerdo a los resultados se obtuvo una des-- viación estándar (S) aceptable, siendo los valores S=0.860 para el ABOB y para el Acetaminofén S= 0.810, ya que el criterio para dicho parámetro es el valor de aproximadamen te uno.

Posteriormente al efectuar la prueba de hipótesis para la media ( $\bar{X}$ ) de ambos activos, se observa que a una confianza del 95%, el valor de  $t_{Calc.}$  se encuentra dentro - de una región de aceptación, cuyos puntos críticos son -- valores teóricos ( $\pm 2.0930$ ), obtenidos de tablas estadísti cas para la distribución "t" de Student, de tal forma que se obtuvieron las siguientes regiones de aceptación:

ABOB	- 2.0930	<	1.206	<	+ 2.0930
Acetaminofén	- 2.0930	<	0.121	<	+ 2.0930

Con lo cual en ambos activos se acepta la hipótesis -- nula ( $H_0$ ) y de esta forma se demuestra que el método es exacto.

Con una confianza del 95 %, se determinó para ambos acti vos el intervalo de confianza para la media, obteniéndose lo siguiente:

ABOB	99.82 %	<	$\bar{X}$	<	100.63 %
Acetaminofén	99.64 %	<	$\bar{X}$	<	100.40 %



## LINEALIDAD.

Al evaluar la relación de los datos, entre la concentración agregada y la concentración recuperada, para el ABOB y Acetaminofén, mediante el análisis de regresión lineal - se observa que ambos activos presentan una dispersión --- pequeña alrededor de la recta, es decir que la suma de las desviaciones de las concentraciones agregadas a la recta - es pequeña, la cual fue determinada por el parámetro del error estándar de la estimación ( $\hat{S}_{y/x}$ ), de tal forma - que se obtuvo para el ABOB  $\hat{S}_{y/x} = 0.091$  y para el Acetaminofén se obtuvo  $\hat{S}_{y/x} = 0.176$

Posteriormente al efectuar las pruebas de hipótesis - para los coeficientes de regresión ( $B, \gamma$ ), en ambos activos se observa que a una confianza del 95%, éstos se encuentran dentro de una región de aceptación, cuyos puntos críticos son valores teóricos ( $\pm 2.1009$ ), obtenidos de tablas estadísticas para la distribución "t" de Student y - se obtuvo lo siguiente:

## ABOB

$$B = -0.938 \quad \text{Ordenada al origen} \quad -2.1009 < -0.938 < 2.1009$$

$$\gamma = 1.60 \quad \text{Pendiente.} \quad -2.1009 < 1.60 < +2.1009$$

## Acetaminofén

$$B = -1.409 \quad \text{Ordenada al origen} \quad -2.1009 < -1.409 < 2.1009$$

$$\gamma = 1.80 \quad \text{Pendiente} \quad -2.1009 < 1.80 < +2.1009$$

Con lo cual en dichos coeficientes, para ambos activos se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ).

Con una confianza del 95 %, se determinó el intervalo de confianza para los coeficientes de regresión en ambos activos, obteniéndose lo siguiente:

ABOB	Ordenada al origen	- 0.165	$< B < 0.063$
	Pendiente.	0.9974	$< \beta < 1.0189$
Acetaminofén	Ordenada al origen	- 0.4195	$< B < 0.0326$
	pendiente.	0.9986	$< \beta < 1.0175$

#### COEFICIENTE DE CORRELACION (r).

Los valores de los coeficientes de correlación para el ABOB  $r = 0.999767$  y para el acetaminofén  $r = 0.999640$ , -- próximos a uno, significa, que proporción de la variación de las concentraciones recuperadas se debe a la relación con las concentraciones agregadas, es decir que la mayoría de los puntos se encuentran sobre una línea recta. Asimismo ambos tienen signo positivo, lo cual indica que dicha recta tiene una pendiente ascendente.

En cuanto al coeficiente de determinación ( $r^2$ ), significa que el  $1-r^2 = 0.000465$  % y  $1-r^2 = 0.000719$  % de la variabilidad de la recta de regresión del ABOB y Acetaminofén respectivamente, no puede ser explicada por el modelo.

### REPETIBILIDAD.

Al evaluar la concoriencia entre las determinaciones experimentales alrededor del valor verdadero, tanto para el ABOB como para el Acetaminofén, realizadas bajo condiciones iguales de trabajo, se observa en el contraste de hipótesis que a una confianza del 95 % el valor de  $\chi^2_{\text{calc.}}$  para ambos activos, se encuentra dentro de una región de aceptación unilateral, cuyo punto crítico es un valor teórico ( $\chi^2_{0.95} = 30.10$ ), obtenido de tablas estadísticas para la distribución de  $\chi^2$  (ji cuadrada), obteniéndose lo siguiente:

Para el ABOB :

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 2.811 \quad \text{por lo que} \quad 2.811 < 30.10$$

Para el Acetaminofén:

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 2.497 \quad \text{por lo que} \quad 2.497 < 30.10$$

Con lo cual en ambos activos se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) y de esta forma se demuestra que el método es repetible.

Posteriormente con una confianza del 95 %, se determinó en ambos activos el intervalo de confianza.

$$\text{ABOB} \quad \text{IC} = 0.654 < \sigma < 1.256$$

$$\text{Acetaminofén} \quad \text{IC} = 0.379 < \sigma < 1.401$$

## REPRODUCIBILIDAD.

Al evaluar el efecto de analista, día e interacción analista-día en los resultados de las tablas III y VI para ABOB y Acetaminofén respectivamente, mediante el análisis de varianza (ANOVA), se observa que a una confianza del 95% los valores de  $F_{Calc.}$  se encuentran dentro de regiones de aceptación unilateral, cuyo punto crítico es localizado en tablas estadísticas para la distribución  $F$ , obteniéndose lo siguiente:

	A B O B	ACETAMINOPEN	TABLAS
	$F_{Calc.}$	$F_{Calc.}$	$F_{0.95}$
Efecto por Analista.	0.29115	1.15466	161.4
Efecto por Día.	0.34071	0.06598	161.4
Efecto por Interacción Analista-Día.	0.27876	0.90173	5.32

Como se puede observar los valores de  $F_{Calc.}$  son menores que los valores de  $F_{0.95}$  (tablas) en ambos activos, con lo cual se deduce que no existen efectos por analista, por día ni por la interacción analista-día y de esta forma se demuestra que el método es reproducible para ambos activos.

## 9.- CONCLUSIONES.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos al desarrollar y validar este método para control de calidad, se concluye - lo siguiente:

a) Se demostró que el método es exacto, lineal, preciso, reproducible y específico para la cuantificación del ABOE y del Acetaminofén en forma simultánea.

b) El método puede emplearse en los análisis rutinarios de Control de Calidad con alta confiabilidad, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación, se demostró que a una confianza del 95%, éste es repetible y reproducible para ambos activos, asimismo en el análisis de regresión lineal, los valores de los coeficientes de correlación obtenidos  $r = 0.999767$ ,  $r = 0.99964$  para el ABOE y Acetaminofén respectivamente, son aceptables.

c) El método desarrollado reduce tiempo de análisis, ya que permite la cuantificación de ambos activos en forma si multánea y la obtención del cromatograma se lleva a cabo - en siete minutos, por consiguiente disminuye el costo de - operación y a su vez el de análisis. Sin embargo, en este - caso se tuvo la disponibilidad de los recursos económicos y técnicos necesarios, para la realización de este proyecto

d) Por lo anterior y de acuerdo a los objetivos que se plantearon, éstos se cumplieron.

**10.- BIBLIOGRAFIA.**

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADRIANUS, J. Vandervilelen and Edward A. Hardwidge. "Guidelines for assay validation", Pharmaceutical -- Technology, march 1982; pp. 66-76.
- 2.- A. Fryde and M.T. Gilbert. "Applications of high - performance liquid chromatography", ed. 1a., Ed. Chapman and Hall ltd., Great Britain; 1979.
- 3.- BOEHRINGER, Ingelheim KG. "Cromatografía líquida de alta presión", 1988.
- 4.- BOEHRINGER, Ingelheim KG. "Validación de los métodos analíticos para el control de medicamentos", 1988.
- 5.- CLARKE, E.G.C.. "Isolation and identification of drugs" Vol. I, ed. 1a., Ed. The Pharmaceutical Press, London, U.K.; 1959.
- 6.- EILEEN, Debasis and Judy P. Boehlert. "Submitting - HPLC methods to the compendia and regulatory agencies" Pharmaceutical Technology, september 1982; pp. 120-137.
- 7.- E. Freund John - Richard Manning Smith. "Estadística" ed. 4a., Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., -- México; 1989.
- 8.- G.D. Searle International Co. "Guidelines for method - validation", april 1983.



- 9.- GARCIA, Pérez Ma. Araceli. "Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de hidrocortisona en una formulación de hidrocortisona al 1% + cloroformo al 3% ". Tesis Profesional Para Obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP ZARAGOZA, 1983.
- 10.- HAROLD, M. Mc. Nair - Benjamín Esquivel H. "Cromatografía Líquida de Alta Presión", ed. 2a., Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos., Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C., 1980.
- 11.- JUAREZ, Rubí Raúl. "Validación de un método analítico para concentrado de cobre". Tesis Profesional Para Obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP ZARAGOZA, 1983.
- 12.- KENNETH, A. Connors. "Curso de Análisis Farmacéutico", ed. 2a., Ed. Reverte, Barcelona España; 1980.
- 13.- KLAUS, Florey. "Analytical Profiles of Drug Substances" Vol. 3, Ed. Academic Press Inc., New York; 1974.
- 14.- M. Fry Edmund. "General Principles of Process Validation" Pharmaceutical Engineering, Vol. 4, Núm. 3, may-june; 1984 pp. 33 - 36.
- 15.- MARINDALE, William. "The Extra Pharmacopeia", twenty seventh ed., Ed. The Pharmaceutical Press. Great Britain; 1979.

- 16.- MARTINDALE, William. "The Extra Pharmacopeia", --  
ed. twenty eighth, Ed. The Pharmaceutical Press, --  
Great Britain; 1982.
- 17.- The Merck Index, ed. ninth, Ed. Merck & Co., Inc.,  
Rahway, N.Y., U.S.A.; 1976.
- 18.- The Merck Index, tenth ed., Ed. Merck & Co., Inc.,  
Rahway, N.Y., U.S.A.; 1983.
- 19.- The Perkin - Elmer Corp., Chromatography Division,  
"Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica",  
U.S.A.; 1981.
- 20.- The Pharmaceutical Codex, ed. eleventh, Ed. The --  
Pharmaceutical Press, Great Britain; 1979.
- 21.- The United States Pharmacopeia XXI, ed. fifteenth,  
Ed. United States Pharmacopeial Convention Inc., --  
U.S.A.; 1980.
- 22.- The United States Pharmacopeia XXI, ed. 10th, Ed.-  
United States Pharmacopeial Convention Inc., U.S.A.  
1985.
- 23.- WILLARD, H. "Instrumental Methods of analysis", --  
ed. 4a., Van Nostrand N.Y.; 1965.

11.- APENDICE

Tabla V Valores de  $F_{0.05}$

Grados de libertad del numerador

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	161	200	216	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	19.4	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	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.81	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.93	3.54	3.31	3.15	3.04	2.96	2.89	2.84	2.79	2.73	2.66	2.59	2.55	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34
13	4.67	3.85	3.46	3.23	3.07	2.96	2.88	2.81	2.76	2.71	2.65	2.58	2.51	2.47	2.43	2.39	2.35	2.30	2.25
14	4.60	3.78	3.39	3.16	2.99	2.88	2.80	2.73	2.68	2.63	2.57	2.50	2.43	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
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	2.04	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
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
$\infty$	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

Reproducida de M. Merrington y C. M. Thompson, "Tablas de puntos de pertenencia de la distribución beta (F) invertida", *Biometrika*, vol. 33 (1943), con autorización de los fiduciarios de *Biometrika*

TABLA 4. Valores críticos para la distribución  $t$  de Student\*

$t$	0.75	0.91	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.0000	0.6772	0.6316	1.2742	1.6370	1.9608
2	0.8163	0.5555	0.5208	1.1057	1.3858	1.6973
3	0.7649	0.5177	0.4854	1.0548	1.3147	1.6347
4	0.7400	0.5112	0.4801	1.0347	1.2909	1.6191
5	0.7276	0.5089	0.4789	1.0256	1.2794	1.6141
6	0.7176	0.5076	0.4782	1.0192	1.2731	1.6103
7	0.7101	0.5070	0.4778	1.0146	1.2693	1.6080
8	0.7044	0.5067	0.4776	1.0113	1.2668	1.6064
9	0.7002	0.5065	0.4775	1.0088	1.2649	1.6053
10	0.6969	0.5064	0.4774	1.0069	1.2635	1.6046
11	0.6943	0.5063	0.4774	1.0055	1.2625	1.6041
12	0.6923	0.5063	0.4773	1.0044	1.2618	1.6037
13	0.6907	0.5062	0.4773	1.0036	1.2613	1.6034
14	0.6894	0.5062	0.4773	1.0030	1.2609	1.6032
15	0.6882	0.5062	0.4773	1.0025	1.2606	1.6031
16	0.6871	0.5062	0.4773	1.0021	1.2603	1.6030
17	0.6862	0.5062	0.4773	1.0018	1.2601	1.6029
18	0.6854	0.5062	0.4773	1.0015	1.2600	1.6028
19	0.6847	0.5062	0.4773	1.0013	1.2599	1.6028
20	0.6840	0.5062	0.4773	1.0011	1.2598	1.6027
21	0.6834	0.5062	0.4773	1.0010	1.2597	1.6027
22	0.6829	0.5062	0.4773	1.0009	1.2597	1.6027
23	0.6825	0.5062	0.4773	1.0008	1.2596	1.6027
24	0.6821	0.5062	0.4773	1.0007	1.2596	1.6027
25	0.6818	0.5062	0.4773	1.0006	1.2596	1.6027
26	0.6815	0.5062	0.4773	1.0005	1.2596	1.6027
27	0.6813	0.5062	0.4773	1.0004	1.2596	1.6027
28	0.6811	0.5062	0.4773	1.0003	1.2596	1.6027
29	0.6810	0.5062	0.4773	1.0002	1.2596	1.6027
30	0.6809	0.5062	0.4773	1.0001	1.2596	1.6027
31	0.6808	0.5062	0.4773	1.0001	1.2596	1.6027
32	0.6807	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
33	0.6806	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
34	0.6805	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
35	0.6804	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
36	0.6803	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
37	0.6802	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
38	0.6801	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
39	0.6800	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027
40	0.6800	0.5062	0.4773	1.0000	1.2596	1.6027

TABLA 4 (Continuación)

$t$	0.75	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
40	0.6799	1.3002	1.6273	2.0129	2.4102	2.6370
41	0.6797	1.2998	1.6272	2.0117	2.4093	2.6366
42	0.6796	1.2994	1.6272	2.0106	2.4086	2.6362
43	0.6795	1.2991	1.6272	2.0099	2.4080	2.6359
44	0.6794	1.2987	1.6272	2.0093	2.4075	2.6357
45	0.6793	1.2984	1.6272	2.0087	2.4071	2.6355
46	0.6792	1.2981	1.6272	2.0082	2.4067	2.6353
47	0.6791	1.2977	1.6272	2.0077	2.4063	2.6352
48	0.6790	1.2974	1.6272	2.0073	2.4060	2.6351
49	0.6789	1.2971	1.6272	2.0069	2.4057	2.6350
50	0.6788	1.2967	1.6272	2.0065	2.4054	2.6349
51	0.6787	1.2964	1.6272	2.0061	2.4051	2.6348
52	0.6786	1.2961	1.6272	2.0057	2.4048	2.6347
53	0.6785	1.2957	1.6272	2.0053	2.4045	2.6346
54	0.6784	1.2954	1.6272	2.0049	2.4042	2.6345
55	0.6783	1.2951	1.6272	2.0045	2.4039	2.6344
56	0.6782	1.2947	1.6272	2.0041	2.4036	2.6343
57	0.6781	1.2944	1.6272	2.0037	2.4033	2.6342
58	0.6780	1.2941	1.6272	2.0033	2.4030	2.6341
59	0.6779	1.2937	1.6272	2.0029	2.4027	2.6340
60	0.6778	1.2934	1.6272	2.0025	2.4024	2.6339
61	0.6777	1.2931	1.6272	2.0021	2.4021	2.6338
62	0.6776	1.2927	1.6272	2.0017	2.4018	2.6337
63	0.6775	1.2924	1.6272	2.0013	2.4015	2.6336
64	0.6774	1.2921	1.6272	2.0009	2.4012	2.6335
65	0.6773	1.2917	1.6272	2.0005	2.4009	2.6334
66	0.6772	1.2914	1.6272	1.9999	2.4006	2.6333
67	0.6771	1.2911	1.6272	1.9995	2.4003	2.6332
68	0.6770	1.2907	1.6272	1.9991	2.4000	2.6331
69	0.6769	1.2904	1.6272	1.9987	2.3997	2.6330
70	0.6768	1.2901	1.6272	1.9983	2.3994	2.6329
71	0.6767	1.2897	1.6272	1.9979	2.3991	2.6328
72	0.6766	1.2894	1.6272	1.9975	2.3988	2.6327
73	0.6765	1.2891	1.6272	1.9971	2.3985	2.6326
74	0.6764	1.2887	1.6272	1.9967	2.3982	2.6325
75	0.6763	1.2884	1.6272	1.9963	2.3979	2.6324
76	0.6762	1.2881	1.6272	1.9959	2.3976	2.6323
77	0.6761	1.2877	1.6272	1.9955	2.3973	2.6322
78	0.6760	1.2874	1.6272	1.9951	2.3970	2.6321
79	0.6759	1.2871	1.6272	1.9947	2.3967	2.6320
80	0.6758	1.2867	1.6272	1.9943	2.3964	2.6319
81	0.6757	1.2864	1.6272	1.9939	2.3961	2.6318
82	0.6756	1.2861	1.6272	1.9935	2.3958	2.6317
83	0.6755	1.2857	1.6272	1.9931	2.3955	2.6316
84	0.6754	1.2854	1.6272	1.9927	2.3952	2.6315
85	0.6753	1.2851	1.6272	1.9923	2.3949	2.6314
86	0.6752	1.2847	1.6272	1.9919	2.3946	2.6313
87	0.6751	1.2844	1.6272	1.9915	2.3943	2.6312
88	0.6750	1.2841	1.6272	1.9911	2.3940	2.6311
89	0.6749	1.2837	1.6272	1.9907	2.3937	2.6310
90	0.6748	1.2834	1.6272	1.9903	2.3934	2.6309

\* D. B. Owen, *Handbook of Statistical Tables*, Reading, Mass.: Addison-Wesley, Inc., 1962 (Contract of the Atomic Energy Commission, Washington, D.C.).

TABLA VII.—VALORES CRITICOS EN LA DISTRIBUCION DE  $\chi^2$   
Para varios Niveles de Significancia

df.	0.995	0.990	0.975	0.950	0.900	0.750	0.500	0.250	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005
1	0.004353	0.004457	0.004592	0.004755	0.004938	0.102	0.355	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	0.0100	0.0102	0.0105	0.105	0.211	0.575	1.37	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21	10.6
3	0.0717	0.115	0.216	0.352	0.504	1.21	1.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.3	12.8
4	0.707	0.752	0.851	0.711	1.06	1.92	3.36	5.38	7.78	9.49	11.1	13.3	14.9
5	0.412	0.554	0.531	1.15	1.61	2.07	4.35	6.55	9.24	11.1	12.8	15.1	16.7
6	0.676	0.872	1.24	1.64	2.20	3.45	5.35	7.84	10.6	12.6	14.4	16.8	18.5
7	0.989	1.24	1.69	2.17	2.83	4.25	6.35	8.94	12.0	14.1	16.0	18.5	20.3
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.40	5.07	7.34	10.2	13.4	15.5	17.5	20.1	22.0
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	5.90	8.14	11.4	14.7	16.9	19.0	21.7	23.6
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	6.74	9.34	12.5	16.0	18.3	20.5	23.2	25.2
11	2.60	3.05	3.82	4.57	5.58	7.88	10.5	13.7	17.3	19.7	21.9	24.7	26.8
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	9.24	11.8	14.8	18.5	21.0	23.3	25.2	28.3
13	3.57	4.11	5.01	5.90	7.01	9.30	12.3	16.0	19.8	22.4	24.7	27.2	29.8
14	4.07	4.65	5.68	6.57	7.76	10.2	13.8	17.1	21.1	23.7	26.1	29.1	31.3
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	11.0	14.5	18.2	22.3	25.0	27.5	30.6	32.8
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	11.9	15.5	19.4	23.5	26.3	28.9	32.0	34.3
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.1	12.8	16.5	20.5	24.8	27.6	30.2	34.4	35.7
18	6.26	7.01	8.25	9.39	10.9	13.7	17.5	21.6	26.0	28.9	31.5	34.8	37.2
19	6.84	7.62	8.91	10.1	11.7	14.6	18.3	22.7	27.2	30.1	32.9	36.2	38.6
20	7.43	8.26	9.59	10.9	12.4	15.5	19.2	23.8	28.4	31.4	34.2	37.6	40.0
21	8.03	8.90	10.5	11.6	13.2	16.5	20.5	24.9	29.6	32.7	35.5	38.9	41.4
22	8.64	9.54	11.0	12.3	14.0	17.2	21.3	26.0	30.8	33.9	36.8	40.3	42.8
23	9.26	10.2	11.7	13.1	14.8	18.1	22.3	27.1	32.0	35.2	38.1	41.6	44.2
24	9.89	10.9	12.4	13.8	15.7	19.0	23.3	28.2	33.2	36.4	39.4	43.0	45.6
25	10.5	11.5	13.1	14.6	16.5	19.9	24.3	29.3	34.4	37.7	40.6	44.3	46.9
26	11.2	12.2	13.8	15.4	17.3	20.8	25.3	30.4	35.6	38.9	41.9	45.0	48.3
27	11.8	12.9	14.6	16.2	18.1	21.7	26.3	31.5	36.7	40.1	43.2	47.0	49.6
28	12.5	13.6	15.3	16.9	18.9	22.7	27.3	32.6	37.9	41.3	44.5	48.3	51.0
29	13.1	14.3	16.0	17.7	19.6	23.6	28.3	33.7	39.1	42.6	45.7	49.6	52.3
30	13.8	15.0	16.8	18.5	20.6	24.5	29.3	34.8	40.3	43.8	47.0	50.9	53.7