

29
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR NAPROXEN EN
GRANULADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ECTOR* LUIS RASGADO



MEXICO, D.F.

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I. INTRODUCCION.....	01
II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.....	03
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	08
IV. OBJETIVOS.....	08
V. HIPOTESIS.....	09
VI. METODOLOGIA.....	10
A. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	10
B. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.....	10
C. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	11
VII. GENERALIDADES.....	11
A. CROMATOGRAFIA.....	11
1. Definición.....	11
2. Historia.....	12
3. Clasificación de Cromatografía.	13
4. Tipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.....	14

5. Conceptos Básicos de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.....	15
6. Ventajas y Desventajas.....	20
7. Componentes Básicos de un Cromatógrafo.....	21
B. ESPECTROFOTOMETRIA.....	30
1. Definición.....	30
2. Espectrofotómetros.....	30
3. Ley de Beer.....	31
C. ACIDO-BASE.....	34
1. Definición.....	34
2. Requisitos Fundamentales para llevar a Cabo este Tipo de Reacción.....	35
3. Disolución Patrón.....	36
4. Patrones Primarios.....	37
5. Detección del Punto Final: Indicadores.....	38
6. Valoraciones Acido-Base en Medio no Acuoso.....	44
7. Principios Generales.....	54
VIII. VALIDACION.....	56
A. DEFINICION.....	56
IX. MONOGRAFIA.....	62
A. NAPROXEN TABLETAS.....	62
X. FARMACOLOGIA.....	66
A. FARMACOCINETICA.....	66
B. APLICACIONES CLINICAS.....	72

XI. PARTE EXPERIMENTAL.....	73
XII. RESULTADOS.....	78
A. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.....	78
1. Determinación de Naproxén por Titulación no Acuosa.....	78
B. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.....	80
1. Especificidad ante Excipientes.....	80
2. Exactitud.....	81
3. Linealidad.....	82
4. Precisión.....	85
C. COMPARACION DEL METODOS ANALITICOS	88
1. Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.....	88
2. Espectrofotometría.....	95
XIII. COMPARACION ESTADISTICA DE METODOS ANALITICOS.....	103
A. COMPARACION DE LOS METODOS 1 Y 2.....	103
B. COMPARACION DE LOS METODOS 1 Y 3.....	107
XIV. ANALISIS DE RESULTADOS.....	110
XV. CONCLUSIONES.....	112
XVI. BIBLIOGRAFIA.....	113

XVII. ANEXO A. FORMULAS PARA EVALUAR LA PRECISION REPETIBILIDAD DE UN METODO ANALITICO.....	117
XVIII. ANEXO B. FORMULAS PARA EVALUAR LA LINEALIDAD DE UN METODO ANALITICO.....	118
XIX. ANEXO C. FORMULAS PARA EVALUAR LA EXACTITUD DE UN METODO ANALITICO.....	120
XX. ANEXO D. FORMULAS PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD DE UN METODO ANALITICO....	121
XXI. ANEXO E. FORMULAS PARA EVALUAR LA COMPARACION DE METODOS ANALITICOS.....	124

I. INTRODUCCION.^{4,5}

Durante los últimos años, los fármacos antiinflamatorios no esteroides más recientes han conquistado en grado dominante, la aceptación médica para la reducción de la inflamación y el dolor en la artritis reumatoide y otros padecimientos reumáticos. Algunos han ganado preferencia al grado de haber desplazado el ácido acetilsalicílico de su posición tradicional como el fármaco de elección en una diversidad de indicaciones.⁴

En el intento de buscar fármacos que alivien la inflamación y el dolor; se ha tenido especial éxito en los compuestos derivados del ácido propiónico; tales como el naproxén, esto es debido a que su mecanismo de acción, es básicamente a nivel de músculos; mediante estudios se ha comprobado que estos compuestos poseen propiedades clínicamente importantes como inhibidores de la síntesis de la prostaglandina-sintetasa.

Estos compuestos han demostrado tener un orden elevado de eficacia en aliviar la inflamación y el dolor en un amplio espectro de padecimientos reumáticos y no reumáticos. Más recientemente se ha encontrado que el naproxén es un potente inhibidor de las agregaciones plaquetarias; y por lo tanto útil en la profilaxis de los ataques de migraña.⁴

Actualmente los métodos que normalmente se utilizan para analizar el naproxén en forma farmacéutica; son un método espectrofotométrico, y por cromatografía de líquidos de

alta presión, dichos métodos son muy eficaces; sin embargo, requieren un tiempo de análisis considerable.

Tomando en cuenta esta problemática se ha creado la necesidad de buscar un método preciso, exacto y rápido, que permita analizar de manera más rápida el naproxén en granulado durante el proceso de fabricación. Una de las alternativas más viables, para resolver este tipo de problemas, es por medio de una titulación; ya que el naproxén en su estructura presenta grupos funcionales (grupo metoxi y ácido carboxílico) que pueden ser utilizados para determinar dicho compuesto en una forma farmacéutica.

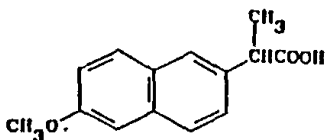
Respecto a la validación, la industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo; es decir; el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación general incluye un evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y además proporciona una medida de comportamiento del método.

El proceso de validación²² de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA. 4, 8, 12

El naproxén es el isómero dextrógiro del ácido 6-metoxi-alfa-metil-2-naftaleno acético; es un derivado del ácido propiónico, cuya estructura molecular es:



Actualmente el naproxén se determina por cromatografía de líquidos de alta presión y por espectrofotometría, pero también existe la posibilidad de ser cuantificado por métodos de titulación, ya que en su estructura presenta grupos funcionales (grupo metoxi y ácido carboxílico) que pueden ser determinados por dichos procedimientos.

La cromatografía¹⁶ es un método que permite separar, identificar y aislar los componentes de una mezcla de compuesto químicos mediante la distribución de una muestra entre dos fases una estacionaria y otra móvil, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido, la fase móvil puede ser un líquido o un gas.

Las técnicas cromatográficas incluyen todo proceso en el que la separación de una mezcla es realizada por la adsorción diferencial o solución de los componentes individuales entre dos fases inmiscibles. La forma común de la separación cromatográfica es la retención selectiva de cada una de los componentes de una muestra en la fase estacionaria; esta retención es debida a diferencias en adsorción; partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga iónica entre el soluto y la fase estacionaria involucrandose también un sistema de transporte o fase móvil. Las diferentes velocidades de elución de cada compuesto dependen de la distribución relativa o partición de dicho soluto entre las dos fases.¹⁶

La espectrofotometría^{13,21} es un método fisicoquímico que consiste en la absorción o emisión de la energía radiante. La energía radiante se define como la energía transmitida en forma de radiación electromagnética. Puede ser emitida por sustancias bajo condiciones de gran excitación, tales como las producidas por altas temperaturas o por descargas eléctricas; esta energía puede ser absorbida, transmitida, reflejada y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación (sólido, líquido, disolución y gas) si la radiación incidente tiene una longitud de onda apropiada. La energía que incide sobre la muestra es una radiación monocromática de un solo haz, o por razones prácticas una banda muy estrecha de longitudes de onda; esto es, cuando se ha elegido un intervalo de longitud de onda.

Beer, postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en trayectoria (Ley de Beer).

Otra alternativa para determinar el naproxén, pueden ser los métodos de titulación.

La titulación¹¹ consiste en la adición de un volumen medido de la solución de concentración conocida para que reaccione con el constituyente buscado. La solución de concentración conocida es una solución patrón, que puede prepararse en forma directa o por normalización mediante reacción con un patrón primario.

El punto final de la valoración se aprecia por un cambio brusco de alguna propiedad del sistema reaccionante, estimado con un indicador; este cambio debe presentarse idealmente en el momento en que se haya añadido una cantidad de reactivo equivalente a la sustancia buscada, es decir, en el punto de equivalencia de la reacción.

Es bien sabido que en ácido-base; que un ácido al disolverse en agua, emite iones H^+ , los cuales le otorgan al agua un determinado grado de acidez, que es valorable en su totalidad al ser titulada con una solución de concentración conocida de una base fuerte.

No obstante es conveniente hacer algunas aclaraciones al respecto.

De acuerdo con la teoría de Bronsted y Lowry, un ácido es una sustancia molecular o iónica, capaz de ceder un protón (H^+), en tanto que una base es una sustancia molecular o iónica capaz de aceptar un protón. El agua al disolver un ácido, como el ácido clorhídrico acepta por carácter básico un protón del ácido. En este caso que es un ácido fuerte, por ser alta su ionización en medio acuoso, la ionización del agua pasa desapercibida y todo el ácido es titulable con una

base fuerte sin que la disociación del agua de lugar a horror. Pero tratándose de ácidos débiles, es decir con una constante de disociación muy baja en medio acuoso, su titulación no puede ser exacta y a veces imposible, ya que se presenta la interferencia de los iones del agua, que no se encontraran en tan gran minoría como en el caso del ácido fuerte. El no poder titular un ácido débil en medio acuoso, hizo necesario buscar métodos en los cuales no intervengan el agua, sino sustituir a ésta por otros solventes capaces también de admitir y de aceptar protones.

Si en vez del agua, se empleara un disolvente menos ácido que ésta, el ácido tendría libertad para ionizarse totalmente, pudiendo así ser titulado. Entre los disolventes empleados con este razonamiento como base se encuentran algunas aminas orgánicas, que se usan no por ser bases más fuertes, sino por ser ácidos más débiles que el agua. También pueden emplearse disolventes no polares como el benceno y el cloroformo.

Los disolventes no acuosos empleados en las titulaciones en medio no acuoso, se han clasificado por H. A. Laitinen en tres clases:

1. Los que poseen en igual grado propiedades ácidas y básicas muy débiles (amfipróticos), como los alcoholes.

2. Los que no denotan propiedades ácidas ni básicas (apróticos o inertes), como el benceno o el cloroformo.

3. Los de carácter básico manifiesto, pero de inapreciable acidez, como el éter, piridina etilendiamina, dimetilformamida, etc. utilizando como agente titulante metóxido de sodio o de potasio.

A su vez Kolthoff y Bruckenstein, dividen los solventes que poseen características ácidas o básicas, o bien ambas y que pueden ser tituladas en medio no acuoso en tres clases:

1. Disolventes con propiedades ácido-básicas comparables a las del agua, como las del agua.

2. Disolventes que son ácidos más fuertes y bases más débiles que el agua ; como por ejemplo el ácido acético glacial.

3. Disolventes con más alta basicidad y más baja acidez que le agua, como el amoníaco líquido anhidro, etilendiamina, dimetilformamida, piridina, etc.

En las titulaciones de los ácidos débiles como los ácidos carboxílicos, sulfonamidas, alcoholes, etc. en medio no acuoso, se han empleado soluciones valoradas de metóxido y etóxido de sodio o de potasio, o un hidróxido de tetraalquilamonio.

Para valorar las bases débiles se ha usado el ácido perclórico; como medio de disolución se utiliza el ácido acético glacial.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Considerando la necesidad de la industria, de acelerar el proceso de fabricación del naproxén en tabletas; es necesario, desarrollar y validar un método analítico, que permita cuantificar el naproxén de una manera más rápida, sencilla y eficaz; y así mantener los límites de principio activo de dicho medicamento. Con este método se optimizará el proceso de fabricación del naproxén en tabletas.

Actualmente, durante la etapa de granulación del medicamento antes mencionado; el naproxén debe ser cuantificado por espectrofotometría o por cromatografía de líquidos de alta presión; métodos que requieren de un tiempo considerable de análisis, razón por la cual es necesario desarrollar y validar un método analítico igualmente confiable, pero que presente la atenuante de tiempo, además que presentará la ventaja de costo menor.

Por otra parte, el método a desarrollar deberá ser mucho más sencillo de aplicarse, que los métodos antes mencionados.

IV. OBJETIVOS.

1. Desarrollar y validar un método analítico por volumetría para determinar en forma rápida el naproxén en granulado.

2. Comparar el método analítico desarrollado, con los métodos de cromatografía de líquidos de alta presión y espectrofotometría existentes en el laboratorio.

V. HIPOTESIS.

Con base a las propiedades físicas y químicas del naproxén será posible desarrollar y validar un método analítico por volumetría, que permita cuantificar el naproxén en forma rápida, y así, mantener los límites de principio activo durante el proceso de fabricación de naproxén en tabletas.

VI. METODOLOGIA.

A. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.

Se llevaran a cabo pruebas de solubilidad del naproxén como materia prima y en granulado, en diferentes solventes orgánicos, con la finalidad de elegir el disolvente capaz de disolver tanto al principio activo como a los excipientes.

B. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

Una vez elegido el disolvente adecuado, se probaran diferentes agentes titulantes y así elegir el más viable.

Con el objeto de realizar el análisis lo más rápido posible, se tomaran diferentes cantidades de muestra (granulado) hasta obtener un volumen gastado de agente titulante menor a un mililitro.

C. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

Acontinuación se mencionan los parámetros a evaluar en este procedimiento:

1. Especificidad.
2. Exactitud.
3. Linealidad.
4. Precisión.
 - a. Repetibilidad.
 - b. Reproducibilidad.

VII. GENERALIDADES.

A. CROMATOGRAFIA. 6,7,16,24 .

1. DEFINICION.

La cromatografía es un método que permite separar, identificar y aislar los componentes de una mezcla de compuestos químicos mediante la distribución de una muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido, la fase móvil puede ser un líquido o un gas.

2. HISTORIA. 16,24

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente el botánico ruso Tswett empleó la cromatografía de elución en un experimento que tenía por objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales. En una columna de vidrio, rellena de carbonato de calcio, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; después, agregó más éter de petróleo y observó que a medida que el éter pasaba a través de la columna, se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantófilas. De aquí el origen de la palabra cromatografía que literalmente significa "color escrito", actualmente este método se llama cromatografía líquido-sólido.

En 1930, el sueco Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución, que son el análisis frontal y el análisis por desplazamiento, en desuso.¹⁶

En 1941, Martin y Synge introdujeron la cromatografía de reparto, premio novel de química en 1952. Esta técnica evolucionó con rapidez, llegando a ser lo que ahora se conoce como cromatografía en papel y una versión limitada de cromatografía líquido-líquido en columna. Introdujeron el concepto de plato teórico el cual se adopta como medida en la eficiencia cromatográfica.¹⁶

En 1952, Martin y James introdujeron la cromatografía de gases, la cual se ha convertido en una de las técnicas

analíticas más útiles para análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles..

Fue hasta en 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica que tantos años había permanecido olvidada; este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y sistemas de detección continuas.

Entre los años de 1967-1969, Kicland, Huber y Horvath, Press y Lypsky son los primeros que describen un cromatograma de líquidos de alta presión.

La cromatografía líquida de alta presión es una modalidad de la cromatografía en la fase estacionaria se encuentra empacitado en una columna y la fase móvil, es un líquido que fluye a través de la primera.

3. CLASIFICACION DE CROMATOGRAFIA.

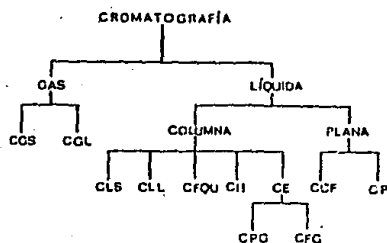


Fig. 1. Métodos cromatográficos. CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CGL: Cromatografía Gas-Líquido; CLS: Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía Líquido-Líquido; CFQU: Cromatografía de Fase Químicamente Unida; CII: Cromatografía de Intercambio Iónico; CCF: Cromatografía de Capa Fina; CP: Cromatografía de Papel; CE: Cromatografía de Exclusión; CPG: Cromatografía de Permeación en Gel; CFG: Cromatografía de Filtración en Gel.

4. TIPOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

a. Cromatografía de Exclusión. Esta técnica es conocida como cromatografía sobre geles; cromatografía de permeación o de filtración, efectua la separación de acuerdo con el tamaño de las moléculas. La columna se rellena de un gel, cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra. El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar por cromatografía de exclusión varia desde aproximadamente 500 g/mol o menos hasta varios millones.

El intervalo de pesos moleculares dentro del cual es útil un material está determinado por dos límites, uno inferior, llamado límite de permeación, por debajo del cual todas las moléculas de menor tamaño son igualmente difundidas dentro de los poros del material y otro límite superior, límite de exclusión, por encima del cual todas las moléculas de mayor tamaño no pueden penetrar en los poros.

b. Cromatografía de Adsorción. La separación se basa en un fenómeno de adsorción-desorción, en la que la fase estacionaria es un adsorbente.

c. Cromatografía de Intercambio Iónico. En ésta la fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente (aniónica o catiónica) empleada para compuestos que presentan cargas en su estructura. En este tipo de columnas la fase móvil que generalmente se emplea es una solución buffer en que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

La separación por intercambio iónico se basa principalmente en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.

5. CONCEPTOS BASICOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos y símbolos característicos de esta técnica instrumental a continuación se dan los más utilizados, indicando en los casos pertinentes su importancia operacional y la forma en que son evaluados (fig 2).

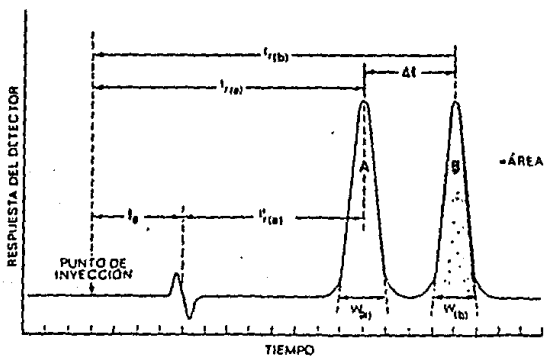


Fig. 2. Cromatograma típico.

a. TIEMPO DE RETENCION (Tr).

Es el tiempo en que la muestra permanece dentro de la columna, y se mide desde el momento en que la muestra se introduce al sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico (fig 2). El tiempo de retención es característico de la muestra, la columna, la fase móvil y la temperatura.

b. TIEMPO MUERTO (To o Tm).

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil o bien de una muestra similar.

c. TIEMPO DE RETENCION AJUSTADO (Tr').

Es la diferencia entre Tr y To , es decir la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna.

Dicho de otra manera, Tr es el tiempo total de permanencia en la columna, To el tiempo que la muestra permanece en la fase móvil y, por lo tanto Tr' es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.

$$Tr' = Tr - To$$

d. ANCHURA DE LA BASE DE LAS SEÑALES (Wb).

Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica; asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de σ , o sea la dispersión de una distribución gaussiana de valores.

Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

e. NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N).

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se determina como sigue:

$$N = 16(\text{Tr}/\text{Wb})^2$$

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y sistemas asociados, y es así que cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna.

f. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (AEPT).

Se representa de la siguiente manera:

$$AEPT = L/N$$

Donde, L = longitud de la columna (mm o cm).

Recordando la definición de plato teórico, se deduce que AEPT es la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y, por tanto la columna será más eficiente.

g. COEFICIENTE DE DISTRIBUCION O DE REPARTO (K).

$$K = CMMFE/CMMFM$$

Donde CMMFE = Cantidad de muestra por mililitro de fase estacionaria.

CMMFM = Cantidad de muestra por mililitro de fase móvil.

El coeficiente de distribución es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada muestra y del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y también es función de la temperatura.

h. RELACION DE FASES (B).

Se representa por la formula:

$$B = \text{MFM}/\text{MFE}$$

Donde MFM = ml de fase móvil.

MFE = ml de fase estacionaria.

i. FACTOR DE CAPACIDAD (K').

$$K' = \text{Tr}'/\text{To}$$

Donde, Tr' = tiempo en la fase estacionaria.

To = tiempo en la fase móvil.

Si se combinan las definiciones anteriores también se puede expresar por:

$$K = K'. B$$

j. RESOLUCION (R).

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenida entre dos compuestos.

$$R = \text{DT}/1/2\text{Wa} + \text{Wb} = 2(\text{Tr}_2 - \text{Tr}_1)/\text{Wa} + \text{Wb}$$

DT, Wa, Wb deben ser expresados en las mismas unidades.

Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa.

k. SELECTIVIDAD (S).

Valores elevados de S significan mejores separaciones.

$$S = Tr'_2 / Tr'_1$$

En forma práctica se puede decir que S es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria.

6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS.

Al igual que toda técnica analítica la cromatografía de líquidos de alta presión, tiene algunas limitaciones, las cuales, junto con sus ventajas, a continuación se enlistan.

Ventajas

1. Mayor velocidad de análisis.
2. Alta resolución.
3. Buena sensibilidad.
4. Automatización.
5. Amplio espectro de aplicaciones.
6. Exactitud.

Desventajas

1. Instrumentación costosa.
2. Elevado costo de operación.
3. Experiencia necesaria.

7. COMPONENTES BASICOS DE UN CROMATOGRACO DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

A continuación se describen brevemente los principales componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.

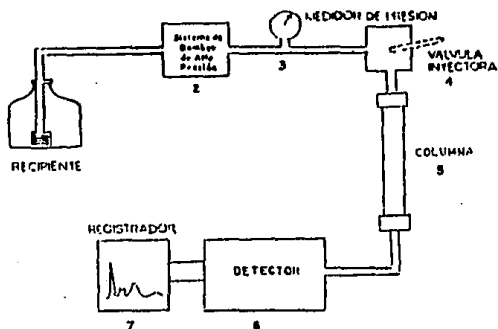


Fig. 3. Componentes de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión.

a. FASE MOVIL.

Aunque la fase móvil no es parte del instrumental propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición son muy importantes.

La fase móvil es el transporte de la muestra; por lo cual de reunir las siguientes características:

1. Debe disolver la muestra.
2. No debe degradar o disolver la fase estacionaria.
3. Debe tener baja viscosidad.
4. Debe tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna. Un valor de K' entre 2 y 10 es adecuado.
5. Debe ser de alta pureza.

La fase móvil puede ser un disolvente o una mezcla de disolventes. Los disolventes más comunmente usados en cromatografía de líquidos de alta presión son: acetonitrilo, metanol, etanol, agua, tetrahidrofurano, etc.

b. SISTEMA DE BOMBEO.

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos de alta presión, están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían muy lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

1. Presión máxima de operación (400 Atm.).
2. Intervalos de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 ml/min).
3. Reproducibilidad y constancia del flujo.
4. El flujo debe ser continuo.

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas:

- a. Bombas mecánicas.
- b. Bombas neumáticas.

a. Bombas Mecánicas. Hay dos tipos distintos.

1). Bombas recíprocas (pistón o diafragma). Son bombas que desplazan flujos de volumen constantes en forma no continua, sino más bien pulsante. En general la máxima presión que se puede obtener es de aproximadamente 600 atm.

Una de las desventajas de este tipo de bombas es que el flujo se obtiene en forma de pulso y no en forma continua y uniforme. Esto puede causar pérdida en la eficacia de la columna e inestabilidad en el detector.

Avances recientes en el diseño de este tipo de bombas lo constituye la bomba de doble pistón, accionada por un solo motor a través de un eje excéntrico, de forma tal que mientras un pistón succiona el disolvente el lo expulsa fuera de la bomba; el flujo de ambos pistones queda libre de pulsaciones.

2). Bombas de desplazamiento continuo. También se les llama bombas de émbolos o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen, el líquido fluye luego a través de una apertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad.

b. Bombas neumáticas. En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión.

La presión máxima obtenible está limitada por la presión del gas y por el material de fabricación del sistema. Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones y son de presión constante.

Las desventajas de estas bombas son la capacidad limitada en el volumen total que puede bombear, y la difusión que presenta el gas el líquido. Este último problema se puede resolver utilizando algúntipo de interfase entre el líquido y el gas, evitando el contacto directo entre ellos, o bien, desechando las últimas porciones de líquido que han sido saturadas por el gas.

c. SISTEMA DE INYECCION.

La introducción de la muestra se realiza con una jeringa de capacidad muy pequeña (10 a 250 mcl.). La muestra se deposita en una pequeña cámara donde posteriormente es disuelta y arrastrada por la fase móvil.

Actualmente se emplean inyectoros automáticos, es decir válvulas inyectoras, que realiza las funciones de un analista.

Los sistemas de inyección se fabrican de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable, y el diseño es tal que resisten presiones muy elevadas.

d. COLUMNA.

La columna junto con la fase móvil, son la parte vital de un sistema cromatográfico. En la columna es donde se va a llevar a cabo la separación de los compuestos de una mezcla.

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones, el que comunmente se utiliza es el acero inoxidable.

Los avances en la tecnología de columnas puede resumirse como sigue:

1. Elaboración de partículas de tamaño muy reducido (5 μ)
2. Uniformidad del tamaño de las partículas.
3. Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas.
4. Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

1). Fases Estacionarias. En cromatografía de líquidos de alta presión, las dimensiones de las partículas de los materiales empleados son muy pequeñas, y muchas veces estas partículas tienen forma regular. A algunos de estos materiales se les llama peliculares, y otros contienen fases líquidas químicamente unida a la superficie del material.

Partículas de relleno poroso, gel de sílice y alúmina principalmente son más o menos grande. Solo se utilizan materiales porosos cuyas partículas sean de tamaño menor a 50 μ m.

Otros tipos de materiales usados son los llamados absorbentes peliculares, también conocidos como absorbentes de capa porosa, de porosidad superficial o de centro sólido.

2). Materiales para Cromatografía de Intercambio Iónico. En primer lugar cabe citar las resinas porosas, que consisten en partículas rígidas del copolímero estireno-divinilbenceno en cuya superficie y poros se encuentran los grupos intercambiadores de iones. Otro tipo de material es el intercambiador de iones pelicular o resina pelicular, que

consiste en una partícula vítrea de forma esférica recubierta de una capa muy fina del copolímero estireno-divinilbenceno, la cual contiene los grupos activos. Un tercer tipo de material consiste en partículas de zipax, en cuya superficie se han incorporado grupos intercambiadores de iones; a este material se le conoce como resinas superficialmente porosas.

Los grupos presentes en todo tipo de resinas de intercambio iónico suelen ser: $-NR_4^+$ y NH_2 en el caso de resinas de intercambio aniónico, que se obtienen comercialmente en forma de cloruros, y $-SO_3H$ en el caso de resinas de intercambio catiónico, que se adquieren en forma de sales de sodio.

e. DETECTOR.

El detector más utilizado es el detector de luz ultravioleta. Como sabemos el detector es el que nos va a ayudar a determinar la separación que se este dando, y nos va a proporcionar la información que se requiere.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema, o al evaluar las cualidades de un cierto diseño deben tomarse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como: respuesta, sensibilidad, ruido, linealidad, y la estabilidad.

Los detectores más utilizados son: el detector de luz ultravioleta y el detector de fluorescencia.

a. Detector de Luz Ultravioleta. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta.

1). El de longitud de onda variable, que no solo es de aplicación más variada y sensible sino también más costoso.

2). El fotómetro de luz ultravioleta, que funciona a una sola longitud de onda, es muy sencillo, económico y también se obtienen resultados confiables.

Este fotómetro de luz ultravioleta, es relativamente insensible a los cambios de flujo y de temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro.

b. Detector de Fluorescencia. Actualmente es el detector más sensible. En condiciones buenas es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos (10^{-12} g), lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtro para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

e. REGISTRADORES.

Su función principal es representar en un registro gráfico de la señal dada por el detector. Características deseables de los registradores son, la velocidad variable del papel y la respuesta rápida de la pluma.

B. ESPECTROFOTOMETRIA. 13,21,23

1. DEFINICION.

Es un método fisicoquímico que consiste en la absorción o emisión de la energía radiante.

Las radiaciones electromagnéticas muestran una doble característica. En difracción y refracción, la radiación tiene propiedades de onda aunque no necesita de un medio físico para su propagación. En los fenómenos de emisión y absorción, la radiación electromagnética posee también las propiedades de las partículas llamadas fotones.

2. ESPECTROFOTOMETROS.

Los espectrofotómetros se dividen en dos tipos: simples (de un solo haz), y los de doble haz.

a. Espectrofotómetros de un Solo Haz. estos requieren el intercambio de la muestra y de las soluciones de referencia para cada longitud de onda, por lo que están mejor capacitados para la operación manual que para la automática.

El detector es un fototubo lleno de gas, cuya señal pasa por un amplificador especial compensado para reducir la no linealidad y la desviación. Las desviaciones falsas causadas por la lámpara se eliminan eficientemente con un regulador de voltaje magnético o electrónico.

b. Espectrofotómetros de Doble Haz. Una posible fuente de error en cualquier tipo de absorciómetro es la provocada por las fluctuaciones que aparecen en la intensidad de la fuente de radiación.

La manera más efectiva de eliminar los efectos derivados de las variaciones de la fuente es el empleo de un diseño de doble haz, solución que además tiene otras ventajas.

3. LEY DE BEER.

Beer postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria.²¹

Consideraremos las relaciones de la potencia radiante de un par de celdas idénticas. En este caso Po' representa la potencia del haz que viene de la fuente. Ps y Pr las potencias transmitidas a través de la muestra y de la referencia; ambas son necesariamente más pequeñas que Po' . las absorbancias respectivas según la Ley de Beer son:

$$As = \text{Log} Po' / Ps \quad y$$

$$Ar = \text{Log} Po' / Pr$$

Combinando obtenemos:

$$\begin{aligned} A_s - A_r &= \text{Log} P_o' / P_s - \text{Log} P_o' / P_r \\ &= \text{Log} P_r / P_s \end{aligned}$$

Si la solución de referencia es idéntica a la de la muestra, con excepción del soluto absorbente que se está analizando, se permite reemplazar P_r y P_s por P_o y P , respectivamente en la Ley de Beer:

$$abc = A = \text{Log} P_o / P$$

Donde: A = Absorbancia.

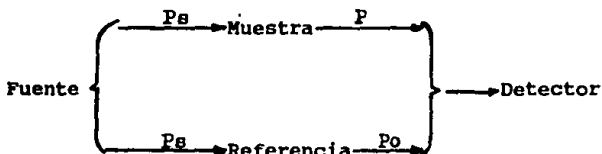
P_o = potencia del rayo incidente en la referencia.

P = Potencia del rayo incidente en la muestra.

a = Absortividad molar.

b = Longitud de la celda.

c = Concentración.



Este esquema muestra las relaciones de potencia de un espectrofotómetro de doble haz. P_s es la potencia de la fuente, que se supone es igual en las dos celdas; P_o pasa por la referencia P por la solución de la muestra.

4. DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER.

Por lo general, la representación de la Ley de Beer (absorbancia en función de la concentración) es lineal y la recta pasa por el origen. Pero en algunas ocasiones se observa curvatura en dicha representación, entonces se dice que hay una desviación de la Ley de Beer. Esta desviación es más aparente que real cuando la motiva el proceder del equilibrio químico.

Los equilibrios de asociación y disociación son las causas químicas más comunes de las desviaciones de la Ley de Beer.

Otra desviación puede ser provocada por las fluctuaciones que aparecen en la intensidad de la fuente de radiación. Otras variaciones pueden deberse al deterioro de la lámpara o de otros componentes.

C. ACIDO-BASE.^{9,11,13,14,21}

1. DEFINICION.^{11,13}

En el análisis volumétrico la cantidad de sustancia que se desea, se determina de forma indirecta midiendo el volumen de una disolución de concentración conocida, que se necesita para que reaccione con el constituyente que se analiza o con otra sustancia químicamente equivalente. El proceso de adición de un volumen medido de la disolución de concentración conocida para que reaccione con el constituyente buscado; se denomina valoración. La disolución de concentración conocida es una solución patrón que puede prepararse de forma directa o por estandarización mediante reacción de un patrón primario. El punto final de la valoración se aprecia por un cambio brusco de alguna propiedad del sistema reaccionante, estimado mediante un indicador; este cambio debería presentarse idealmente en el momento en que se haya añadido una cantidad de reactivo equivalente a la sustancia, es decir, en el punto estequiométrico de la reacción.

2. REQUISITOS FUNDAMENTALES PARA LLEVAR A CABO ESTE
TIPO DE REACCION.¹³

Para que un proceso sea susceptible de ser aplicado en un método volumétrico debe cumplir con ciertos requisitos.

a. La reacción entre el constituyente buscado y el reactivo debe ser sencilla; la reacción sirve de base a los cálculos.

b. La reacción debe ser estequiométrica; los cálculos a efectuar con los datos exigen una reacción definida.

c. La reacción debe ser rápida, con objeto de que la valoración pueda realizarse en poco tiempo la mayor parte de las reacciones iónicas son tan rápidas, que pueden considerarse instantáneas.

d. La reacción debe ser completa en el momento que se han añadido cantidades equivalentes (estequiométricas) de las sustancias reaccionantes, lo cual, permite que puedan realizarse cálculos.

e. Deben utilizarse aparatos de medida exacta.

3. DISOLUCION PATRON.¹³

Cualquier disolución cuya concentración sea exactamente conocida es una disolución patrón. Pueden prepararse por dos métodos distintos.

a. Método Directo. Se disuelve una cantidad exactamente pesada de soluto de composición definida y conocida en un matraz volumétrico; la concentración se calcula a partir del peso y volumen conocidos. Para que pueda aplicarse éste método el soluto debe ser una sustancia patrón primario. Este método es adecuado para la preparación de disoluciones patrón de concentración predeterminada; o , disoluciones que tienen una equivalencia exacta expresada en términos de un

constituyente determinado y especificado que se va a determinar.

b. Método Indirecto. Gran parte de los compuestos que se utilizan como reactivos valorantes no pueden considerarse como patrones primarios, por lo que sus disoluciones no pueden prepararse por el método directo. Por eso estas disoluciones se preparan con medidas aproximadas del peso y del volumen y después se normalizan determinando el volumen exacto de disolución necesario para valorar una cantidad exactamente pesada de un patrón primario. La concentración exacta se determina a partir del volumen de disolución gastado, del peso del patrón primario y del peso equivalente que corresponde a la reacción de la valoración.

4. PATRONES PRIMARIOS. 13

Para que una sustancia pueda considerarse como patrón primario debe cumplir ciertas condiciones.

a. Debe tener una pureza absoluta (100 %) o conocida (por ejemplo; 98.55 %) en componente activo.

b. Cuando la sustancia no es absolutamente pura, todas sus impurezas deben ser inertes respecto a la sustancias que se ponen en juego en la reacción. Por ejemplo, un carbonato sódico del 98.25 % en carbonato sódico y con el 1.75 % en cloruro de sodio es perfectamente adecuado para la normalización de un ácido, que reacciona exclusivamente con el carbonato.

c. Las sustancias interferentes que acompañan como impurezas a un patrón primario deben ser susceptibles de identificar mediante ensayos sencillos de sensibilidad conocida.

d. Las sustancias patrón primario deben ser estables a las temperaturas necesarias para desecarse en la estufa. Por ésta razón rara vez se utilizan como patrones primarios sustancias hidratadas, pues es difícil eliminar la humedad adsorbida sin dar lugar a una descomposición parcial del hidrato, que conduciría a un material de composición desconocida.

e. Debe reaccionar con la disolución que se normaliza cumpliendo con todos los requisitos expuestos para los métodos volumétricos, es decir; la reacción debe ser

cuantitativa, lo cual quiere decir que la reacción debe ser sencilla, rápida, completa y estequiométrica.

f. Un patrón primario debe ser fácil de adquirir, y preferiblemente barato.

5. DETECCION DEL PUNTO FINAL: INDICADORES.¹³

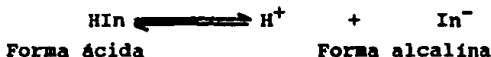
El punto final de una valoración se detecta mediante un cambio brusco de alguna propiedad de la mezcla reaccionante o de alguna sustancia que se añade a dicha mezcla. A continuación se mencionan algunas formas de detección del punto final.

a. METODOS VISUALES.

1). El Reactivo es Autoindicador. El permanganato de potasio se reduce al ión maganeso (II), casi incoloro cuando se utiliza como reactivo volumétrico en medio ácido. Cuando de completa la reacción REDOX, la primera gota o fracción de gota de la disolución de permanganato que se añade cambia la disolución a color rosado.

2). Indicadores Acido-Base. Los indicadores ácido-base son ácidos o bases débiles, cuyos aniones o cationes, respectivamente, tienen color diferente que las formas sin disociar. Los indicadores son ácidos o bases más débiles que los que se valoran o utilizan como valorantes, por tanto, dichos indicadores no reaccionan de forma permanente con el reactivo valorante hasta que la reacción principal no es completa.

Su equilibrios en disolución pueden tratarse matemáticamente lo mismo que los de cualquier otro ionógeno bébil. Para un indicador ácido representado por:



$$K_a = [\text{H}^+][\text{In}^-]/[\text{HIn}] \quad \text{y} \quad [\text{In}^-]/[\text{HIn}] = K_a/[\text{H}^+]$$

El color observado, es decir, la relación $[\text{In}^-]/[\text{HIn}]$ depende de $[\text{H}^+]$, esta relación es pequeña y el indicador presenta su color ácido; a baja $[\text{H}^+]$, la relación es grande y el indicador manifiesta su color alcalino.

Para un indicador ácido-base, representado por InOH:



$$K_b = [\text{In}^+][\text{OH}^-]/[\text{InOH}] \quad \text{y} \quad [\text{In}^+]/[\text{InOH}] = K_b/[\text{OH}^-]$$

Para valores bajos de $[\text{OH}^-]$, la relación $[\text{In}^+]/[\text{InOH}]$ es grande y se aprecia el color ácido; para valores altos de $[\text{OH}^-]$, en que la relación anterior es pequeña, se aprecia el color alcalino.

Como los colores se basan en su percepción subjetiva por el observador y el ojo presenta distinta sensibilidad para los diferentes colores, los valores límites del intervalo de viraje son solo aproximados.

En la tabla No. 1 encuentran los valores de p^{ka} de los indicadores más comunes¹³.

Tabla No. 1. Valores de p^{ka} . Indicadores Acido-Base.

Nombre Usual	p^{ka} ind	Intervalo pH	Color
Rojo de Cresol		0.2-1.8	Rojo Amarillo
Azul de Timol	8.9	8.8-9.6	Amarillo Azul
Tropelina 00		1.3-3.0	Rojo Amarillo
Amarillo de Metilo	3.3	2.8-4.0	Rojo Amarillo
Azul Bromofenol	3.8	3.0-4.6	Amarillo Purpúreo
Anaranjado Metilo	3.5	3.1-4.4	Rojo Amarillo
Verde Bromocresol	4.7	3.8-5.4	Amarillo Azul
Rojo de Metilo	5.0	4.2-6.2	Rojo Amarillo
Rojo de Clorofenol	6.0	4.8-6.4	Amarillo Rojo
Púrpura Bromocresol	6.1	5.2-6.8	Amarillo Purpúreo
Azul de Bromotimol	7.1	6.0-7.6	Amarillo Azul
Rojo de Fenol	7.8	6.4-8.0	Amarillo Rojo

Nota. En el color, la primera columna es para la forma ácida, la segunda columna es para la forma alcalina.

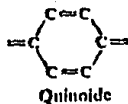
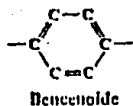
En la utilización de los indicadores ácido-base son importantes algunas condiciones.

1.1. El indicador utilizado debe tener un intervalo de vire que coincida con o comprenda al p^H del punto estequiométrico de la valoración. Si el indicador elegido se aparta mucho de ésta condición, el punto final observado no coincidirá con el punto estequiométrico y se obtendrá un error importante.

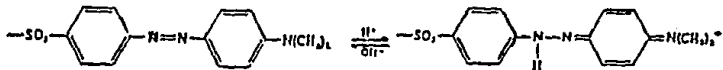
1.2. Debe utilizarse una cantidad pequeña de indicador. Los colores de los indicadores son tan intensos, que para 100 ml de disolución bastan dos gotas de una disolución muy diluida (0.1 %, por ejemplo) de indicador. La cantidad de reactivo necesaria para reaccionar con el indicador debe ser despreciable frente al volumen total de reactivo necesario para alcanzar el punto final.

1.3. El primer cambio de color detectable del indicador debe ser tomado como punto final. Una vez que la pequeña cantidad puesta de indicador haya pasado en un 90% a su segunda forma coloreada, el color que se observa no se modifica de forma apreciable por adición de más reactivo.

1.3.1. Modificaciones Estructurales en la Acción Indicadora ácido-base. La mayor parte de los indicadores ácido-base son compuestos orgánicos aromáticos que contienen dos o más anillos bencénicos unidos mediante uno o más átomos de carbono o de nitrógeno. En la reacción con el ácido o la base, una estructura de tipo bencenoide pasa a otra de tipo quinoideo.¹³



La estructura quinoide es normalmente coloreada. Las modificaciones estructurales que sufre el anaranjado de metilo son.



3). Indicadores Redox. Son sustancias intensamente coloridas capaces de sufrir oxidación o reducción a potenciales característicos, y deben elegirse de manera que estos potenciales sean muy cercanos a los valores de la fem del sistema principal, que reacciona en el punto estequiométrico, de forma que un débil exceso de reactivo reaccione con el indicador.

b. METODOS ELECTRICOS.

Los métodos eléctricos son: los métodos potenciométricos, los métodos columbimétricos, conductimétricos y amperométricos. Únicamente los mencionaremos, pues no son temas a tratar en el presente trabajo.

6. VALORACIONES ACIDO-BASE EN MEDIO NO ACUOSO.^{14,21}

a. HISTORIA.

Durante muchos años se ha sabido que se pueden observar en medios no acuosos fenómenos análogos a las reacciones ácido-base en agua, tales como los cambios de color de los indicadores y reacciones estequiométricas de compuestos claramente considerados como ácidos y bases. Por ejemplo, en 1912, Folin y Flanders valoraron ácidos en benceno, cloroformo y mezclas cloroformo-etanol. Quizá debido a los grandes éxitos teóricos y prácticos de la teoría de la química ácido-base en medio acuoso, lo cierto es que se habían realizado muy pocos progresos en el estudio de los sistemas no acuosos. En 1927, Conant y Hall dieron a conocer sus importantes investigaciones sobre el comportamiento de las bases en ácido acético glacial. Aunque estos investigadores efectuaron valoraciones precisas con este disolvente, hasta los años comprendidos entre 1940 y 1950 no se iniciaron extensos estudios, prácticos y teóricos, sobre el comportamiento ácido-base en medio no acuoso.²¹

a. QUIMICA DE LAS REACCIONES ACIDO-BASE
EN MEDIO NO ACUOSO.²¹

Obviamente, el agua se recomienda por si misma como un disolvente digno de estudio a causa de su amplia participación en sistemas biológicos, geológicos y artificiales. El agua es el disolvente más conveniente, porque puede actuar como el segundo par ácido-base tanto para ácidos (en cuyo caso se comporta como una base) como para bases (cuando lo hace como un ácido). Sin embargo, la mayor limitación del agua como medio de valoración reside precisamente en este comportamiento anfótero; recuerdese que el equilibrio ácido-base es una competición entre dos base por un protón. En solución acuosa, una de estas bases es el agua. Si la otra base es relativamente débil, no competirá de manera efectiva con el solvente por el protón. En términos prácticos no será valorable. En una solución acuosa de un ácido débil, la situación de valoración cabe describirla como una competencia entre el soluto ácido y el disolvente ácido por la base valorante. Por lo tanto, ni las sustancias débilmente ácidas, ni las débilmente básicas resultan fáciles de valorar en solución acuosa a causa del efecto preponderante del disolvente, que actúa como un ácido o base débil en competencia.

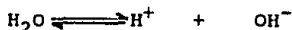
La solución a este problema consiste en sustituir este disolvente. Si el soluto es un compuesto débilmente básico, no se puede efectuar la valoración por el bloqueo que ejerce el carácter básico del agua. Si se reemplaza el agua por un disolvente relativamente básico, se elimina completamente, o

al menos se reduce esta competencia indeseable y entonces es posible valorar el soluto básico. Algo similar ocurre con los solutos débilmente ácidos; en este caso la naturaleza ácida del agua la convierte en un disolvente indeseable y podría sustituirse por un disolvente que no mostrara claras propiedades ácidas.

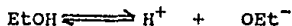
C. DISOLVENTES DISOCIABLES Y NO DISOCIABLES²¹

Las propiedades físicas y químicas de los disolventes son muy importantes de considerarse, para las reacciones químicas ácido-base en medios no acuosos. A menudo razones prácticas determinan el empleo de un disolvente; así, para que tenga amplia utilidad en análisis, debería ser líquido a temperatura ambiente y no presentar alto grado de toxicidad. De todas las propiedades de un disolvente que pueden afectar su uso, tres de ellas merecen especial atención: capacidad de autodisociación, carácter ácido-base y constante dieléctrica.

1. Los disolventes se clasifican en disociables y no disociables, por ejemplo se observe que el agua se disocia de la siguiente manera:



Otros disolventes puros se disocian de manera similar. El etanol reacciona para originar el ión etóxido.



El ácido acético glacial produce acetato (OAc^-)



Como se vio en el caso del agua, es posible definir un producto iónico para un disolvente disociable. Si se establece que el disolvente queda representado por AB, y el proceso de disociación por $AB \rightleftharpoons A^+ + B^-$ entonces el producto iónico K_s viene dado por:

$$K_s = [A^+][B^-]$$

2. Caracter Acido-Base. Acontinuación se mencionan algunos términos que explican el caracter ácido-base de los disolventes.

2.1. Disolventes Protogénicos. Son aquellos que originan un protón solvatado en la disociación; son ejemplo de ellos el ácido acético y el ácido sulfúrico.

2.2. Disolventes Protofilicos. son capaces de aceptar un protón, ejemplos; anhídrido acético, éter y piridina.

2.3. Disolventes Anfipróticos. Pueden aceptar o dar un protón. Ejemplos; el agua y los alcoholes.

2.4. Disolventes Apróticos. No tienen de manera esencial, tendencia a dar o aceptar un protón, por ejemplo, cloroformo y los hidrocarburos.

3. Constante Dieléctrica. Si se considera que un disolvente es un medio homogéneo y que los iones son cargas puntuales con signos opuestos; entonces, al aumentar el valor de la constante dieléctrica del disolvente, la disociación de lo iones se facilitará.

d. IONIZACION Y DISOCIACION.²¹

La ionización es el proceso de producción de iones, y la disociación es la separación de especies.



La especie A^+B^- se denomina par iónico.

Las propiedades dieléctricas del medio controlan en gran medida la extensión de la disociación iónica. Por esta razón no es necesario distinguir entre ionización y disociación de los iones en agua, cuya constante dieléctrica es muy grande. Los pares iónicos formados en agua se separan tan pronto como se forman. En disolventes de constantes dieléctrica baja o intermedia, sin embargo, la amplitud de la disociación puede ser muy pequeña y es posible pares iónicos.

e. DETERMINACION DE BASES.

Disolventes, Valorantes e Indicadores. El ácido acético glacial es el disolvente más usado en la valoración de base. El anhídrido acético sirve para el análisis de bases muy débiles, tales como las amidas, que son fácilmente acetiladas. El dioxano se usa a menudo como disolvente, a veces mezclado con ácido acético.

El benceno, cloroformo y disolventes similares son adecuados en grado lo suficientemente puro para utilizarlos tal cual. Esto también es factible con los alcoholes y glicoles, que se emplean en mezclas denominadas disolventes G-H (glicol-hidrocarburo); dichas mezclas pueden estar formadas por soluciones 1:1 de propilenglicol y cloroformo; etilenglicol y n-butanol, etc. Estos disolventes están indicados para la valoración de sustancias difícilmente solubles, ya que, por lo general, el componente hidroxilado es un buen disolvente. La incorporación de un disolvente aprótico destaca el punto final del indicador. Se ha recomendado asimismo una mezcla disolvente fenol-cloroformo-acetonitrilo.

En volumetría en medio no acuoso, la selección de uno de los ácidos minerales como ácido valorante acostumbra ser indiferente, ya que el agua los nivela hasta una misma fuerza ácida. No obstante, el ácido acético es un disolvente diferenciador para estos ácidos. Por consiguiente, es aconsejable seleccionar los ácidos más fuertes como valorantes y el perclórico es el más fuerte de los ácidos minerales comunes. Este ácido disuelto en ácido acético es el valorante más usual para determinar bases débiles.

Otros valorantes ácidos utilizados son el ácido p-toluensulfónico y el ácido fluorosulfónico.

La selección del indicador suele ser empírica, el indicador más adecuado para la valoración de bases es el cristal violeta (violeta de genciana). El violeta de metilo, se comporta de manera similar al anterior. El cambio de color es complejo, pasando del violeta (color básico), al azul, verde-azulado, verde, verde-amarillento y amarillo (color ácido). La variación de color correspondiente al punto final dependerá de la base en particular y del disolvente, y podría determinarse por valoración simultánea potenciométrica y con un indicador visual. Para muchas bases el cambio de color violeta hasta azul marca el punto final.

f. DETERMINACION DE ACIDOS. ^{18,19,20,21,23}

Disolventes, Valorantes e Indicadores. Los disolventes muy básicos hacen aumentar el carácter ácido de los ácidos muy débiles, y los disolventes neutros son adecuados para la valoración diferenciadora de mezclas.

La etilendiamina, n-butilamina y piridina son disolventes básicos que se emplean en estas determinaciones. puesto que absorben facilmente el CO_2 atmosférico, dan valores altos en la valoración en blanco. La N,N-dimetilformamida (DMF) se usa ampliamente. Si hay trazas de agua en la DMF se puede originar la hidrólisis hasta ácido fórmico, que seria valorado. Otros disolventes ampliamente usados son el benceno, metanol, etanol, acetona, metil-etil-cetona y alcohol t-butílico.

Los metóxidos^{18,21} de potasio, sodio o litio, en solución metanol-benceno, son valorantes adecuados para determinar ácidos débiles. Se preparan disolviendo el metal en metanol. Los metóxidos de sodio y potasio forman precipitados gelatinosos durante el curso de muchas valoraciones y tales geles pueden dificultar la visión del punto final. El metóxido de litio no forma estos geles.

También se evita la formación de geles introduciendo los hidróxidos de tetra-alkilamonio es el que se usa con más frecuencia; se prepara por reacción entre el yoduro de tetrabutilamonio con oxido de plata.

El ácido benzóico es la sustancia patrón primaria usual. Las valoraciones suelen efectuarse en corriente de nitrógeno para minimizar la absorción de CO_2 .

El indicador visual más importante para las determinaciones de ácidos es el azul de timol (timolsulftaleína). El cambio de color es del amarillo, en la forma ácida, al azul, en la forma básica. Se utiliza en valoraciones de ácidos carboxílicos, imidas, sulfonamidas, etc. El violeta azo (p-nitrobencenazoresorcínol) es un indicador ácido más débil, por lo que resulta adecuado para valorar ácidos bastante débiles, tales como fenoles sustituidos con sustituyentes que aceptan electrónes. El color cambia del rojo al azul. Para ácidos todavía más débiles se usa o-nitroanilina, aunque sea preferible la valoración potenciométrica. La fenolftaleína y la timoftaleína son excelentes indicadores para las valoraciones en alcoholes y en piridina.

Los ácidos cuyo valores de pK_a , en agua, no rebasan aproximadamente 7 se valoran con detección del punto final, mediante azul de timol, en DMF. Los ácidos en el margen acuoso de pK_a entre 7-11, requieren detección potenciométrica del punto final o, con algo menos de precisión, detección visual con violeta azo u o-nitroanilina.

7. PRINCIPIOS GENERALES.¹³

En todo análisis volumétrico, sea para la normalización de disoluciones o para el análisis de problemas desconocidos, deben considerarse los siguientes puntos.

a. La muestra no debe ser demasiado pequeña, para que los errores de pesada, por ejemplo, 0.2 mg, den lugar a

errores relativos pequeños (<1 %). Cuando la sustancia que se pesa tiene un peso equivalente pequeño, como el periodato de potasio en métodos redox, debe pesarse una cantidad relativamente grande de muestra, disolverse en un volumen conocido y tomar de esta disolución alícuotas para efectuar la valoración.

b. El volumen consumido de reactivo no debe ser demasiado pequeño. Suponiendo errores de lectura de la bureta del orden de 0.02 ml y de drenaje de 0.02 ml, se obtiene en la medida del volumen un error total de 0.04 ml, que requiere utilizar 40 ml de disolución para que el error volumétrico relativo quede dentro del 1 %.

c. La muestra no debe ser tan grande que de lugar a que haya que volver a llenar la bureta para completar la valoración; esto implica errores adicionales de lectura y de drenaje.

d. La concentración del reactivo debe elegirse en concordancia con las condiciones, de que la reacción entre el constituyente buscado y el reactivo debe ser sencilla, la

reacción debe ser rápida, y la reacción debe ser estequiométrica. Es evidente que el tamaño de la muestra, la concentración del reactivo y su volumen están también relacionados con el porcentaje del componente activo presente en la muestra a valorar.

e. Cuando sea posible, deben efectuarse determinaciones en blanco con el indicador y restarse las cantidades de reactivo que en ellos se consume de la cantidad gastada en la valoración.

f. La normalización o el análisis deben fundamentarse en los resultados de al menos tres valoraciones en estrecha concordancia, preferiblemente con cantidades algo diferentes de muestra para evitar cualquier prejuicio personal en la detección del punto final. Para trabajos de la más elevada exactitud, o para la evaluación estadística de la veracidad de un método, deben valorarse muchas muestras repetidas.

VIII. VALIDACION. 2,22

A. DEFINICION.

La validación de un método puede definirse como el proceso por el cual, queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación de métodos analíticos implica:

1. Identificación de los parámetros de validación apropiados.

2. Diseño del experimento para evaluar cada parámetro.

3. Determinación de los criterios estadísticos de aceptación para cada parámetro.

4. Documentación de los resultados del método analítico.

1. Los parámetros analíticos mas comunes de validación son:

a. Especificidad.

Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Dicho de otra manera, decimos que es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

La especificidad se puede dividir de la siguiente manera:

1). Especificidad ante Excipientes (placebo).

Aquí decimos que es la capacidad que tiene el método analítico para obtener respuesta, únicamente de nuestro principio activo, y no a otro componente de la formulación.

2). Especificidad ante productos de degradación.

Es la capacidad que tiene el método analítico de obtener respuesta, únicamente del principio activo y no a cualquier otro producto de degradación del mismo principio activo o de cualquier excipiente de la formulación.

b. Exactitud.

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

Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

c. Linealidad.

La linealidad de un método analítico es la capacidad que tiene para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

El método debe seguir una línea recta.

$$y = mx + b$$

Donde: x = Variable independiente (mg adicionados).

y = Variable dependiente (mg recuperados).

d. Precisión.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Normalmente se expresa en términos de desviación estandar o del coeficiente de variación.

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

1). Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista.

2). Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

2. Diseño del Experimento para Evaluar cada Parámetro.

Son los paso a seguir durante el proceso de validación del método.

**3. Determinación de los Criterios Estadísticos de
Aceptación para cada Parámetro.**

a. Especificidad.

Tabla No. 2.

Producto	interferencia de placebos	interferencia de productos de degradación
soluciones, cápsulas y tabletas.	no interferencia	≤ 2%
Suspensiones y semisólidos	≤ 2%	≤ 2%
Métodos CLAR	Ninguna medible	Ninguna medible

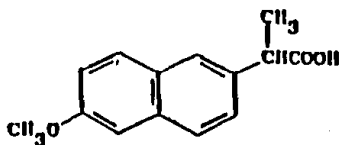
b. Precisión y Exactitud.

Tabla No. 3.

Producto o método	% recobro	CV
Soluciones, tabletas y cápsulas	98-102	≤ 2%
Suspensiones y semi- sólidos	97-103	≤ 3%
Métodos CLAR	98-102	≤ 2%
Titulaciones	99-101	≤ 1%

4. Documentación.

- a. Procedimientos detallados del método analítico.
- b. Protocolo de validación.
- c. Datos de precisión, exactitud, linealidad, etc. y sus parámetros estadísticos que lo califican.
- d. Cromatogramas representativos que demuestren la especificidad del método.

IX. MONOGRAFIA. 1,2 $C_{14}H_{14}O$

PM = 230.27

A. NAPROXEN TABLETS.

Contienen no menos del 90.0 por ciento y no más del 110.0 por ciento de la cantidad de naproxén ($C_{14}H_{14}O_3$) indicada en el marbete.

1. Sustancia de Referencia. Naproxén, secar a 105°C durante tres horas.

2. Ensayos de Identidad.

a. Pulverizar no menos de 10 tabletas, pesar una cantidad del polvo equivalente a 20 mg de naproxén, adicionar 100 ml de metanol, agitar, filtrar y evaporar aplicando corriente de aire seco y secar a 105°C. Efectuar una preparación de naproxén SRef de la misma forma que la muestra. Elaborar las pastillas correspondientes efectuando una dispersión de la preparación de la muestra y de referencia en bromuro de potasio. El espectro de absorción infrarroja de la preparación de la muestra, debe exhibir máximos a las mismas longitudes de onda que la preparación de referencia.¹

b. El espectro de absorción ultravioleta obtenido con la solución de la muestra, preparada como se indica en la valoración debe corresponder al obtenido con la solución de referencia, preparada como se indica en la valoración.

c. Capa Delgada.

Soporte: gel de sílice GF254

Fase móvil: mezcla de tolueno, tetrahidrofurano, solución 6 M de ácido acético glacial (180:18:6).

Solución de la Muestra. Triturar hasta polvo fino no menos de diez tabletas, pesar una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de naproxén, pasar a un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 25 ml de metanol, agitar mecánicamente llevar al aforo con metanol, mezclar y filtrar.

Solución de Referencia. Preparar soluciones de naproxén SRef en metanol que contengan 2 mg/ml y 10 Ug/ml de naproxén (soluciones 1 y 2 respectivamente).

Procedimiento. Aplicar a la cromatoplaca en carriles separados 100 Ul de las soluciones 1 y 2 de referencia y 100 Ul de la solución de la muestra. Desarrollar el cromatograma, dejar correr la fase móvil hasta 15 cm arriba de la línea de aplicación, retirar la cromatoplaca de la cámara, marcar el frente de la fase móvil, secar con corriente aire y observar bajo luz ultravioleta.

La mancha principal obtenida en el cromatograma con la solución de la muestra, debe corresponder en tamaño, color y Rf a la mancha obtenida con la solución de referencia.

3. Disolución. Emplear el aparato número dos (de paletas).

Solución reguladora. Disolver 2.62 g de fosfato monobásico de sodio y 11.50g de fosfato dibásico de sodio anhidro en 1000 ml de agua y mezclar. Ajustar el p^H de la solución a 7.4, empleando solución 1 N de hidróxido de sodio o ácido fosfórico. Preparar una solución de naproxén SRef en solución reguladora que contenga 50 Ug/ml de naproxén. Colocar cada tableta en el aparato con 900 ml de la solución reguladora como medio de disolución y accinarlo a 75 rpm durante 75 minutos. Filtrar una porción del medio de disolución a través de un filtro inerte y pasar una alícuota del filtrado equivalente a 2.5 mg de naproxén a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar con la solución reguladora y mezclar. Medir la absorbancia en el rango ultravioleta de la solución de referencia y de la solución de la muestra, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de máxima absorbancia, a 332 nm aproximadamente, usando solución reguladora como blanco de ajuste. Q = 70 por ciento.

4. Sustancias Relacionadas. Cualquier mancha obtenida en el cromatograma con la solución de la muestra, diferente de la mancha principal, no debe ser más grande ni más intensa que la mancha obtenida con la solución 2 de referencia.

5. Valoración. Preparar una solución de SRef de naproxén en metanol, que contenga 50 Ug/ml de naproxén. Pesar no menos de 20 tabletas, calcular su peso promedio, triturar hasta polvo fino, pesar una cantidad de polvo equivalente a 250 mg de naproxén, pasar a un matraz volumétrico de 250 ml, agregar 180 ml de metanol, agitar mecánicamente durante una hora, aforar con metanol, mezclar y filtrar. Pasar una alícuota de 5 ml del filtrado a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con metanol y mezclar. Medir la absorbancia en el rango ultravioleta de la solución de referencia y de la solución de la muestra, a la longitud de onda de máxima absorbancia de 332 nm aproximadamente, en celdas de 1 cm y usando metanol como blanco de ajuste.

Calcular la cantidad de $C_{14}H_{14}O_3$ en la porción de muestra tomada, por medio de la fórmula siguiente: $DC(Am/Aref)$; en donde C es la concentración en Ug/ml de naproxén en la solución de referencia, D es el factor de dilución de la muestra, Am y Aref son las absorbancias obtenidas con la solución de la muestra y de referencia respectivamente. Relacionar el valor obtenido con el peso promedio por tableta calculado al principio de la valoración.

X. FARMACOLOGIA.^{4,5}

A. FARMACOCINETICA.

1. Mecanismo de Acción.

El naproxén es un agente no esteroideo, que presenta notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, igual que como otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, su mecanismo preciso de acción todavía no ha sido establecido. Se cree que su eficacia terapéutica está basada en su potente inhibición de la síntesis de prostaglandinas. No es un corticosteroide, como se indica, ni tampoco ejerce su efecto farmacológico por estimulación del sistema hipotalámico-hipofisiario-suprarrenal (HHS). Inhibe la prostaglandina sintetasa. Además reduce la hiperagregabilidad plaquetaria, que se ha observado durante la etapa prodrómica de la migraña. El tiempo de vida media del naproxén es de aproximadamente 13 horas.⁴

Las prostaglandinas evocan respuestas antiinflamatorias y piréticas in vivo, y se sabe que el naproxén bloquea la síntesis de prostaglandinas a partir de su precursor, el ácido araquidónico.

En asociación con la respuesta inmune del cuerpo a la lesión tisular, se produce migración tisular y liberación de varias sustancias químicas. Este proceso se llama

quimiotaxis. Específicamente, se acumulan leucocitos polimorfonucleares (PMNs) en el sitio de la lesión tisular y liberan ciertas sustancias químicas, llamadas enzimas lisosómicas, que contribuyen al daño celular. Se ha sugerido que los beneficiosos efectos antiinflamatorios y antirreumáticos de naproxén podrían ser atribuibles, en parte, a su capacidad para suprimir la quimiotaxis al inhibir la migración de PMNs y la liberación subsecuente de enzimas lisosómicas.

2. Absorción, Metabolismo y Excreción.

El naproxén es un fármaco ácido, con un alto grado de fijación a las albúminas. Es absorbido con rapidez y en forma prácticamente completa.

La absorción de naproxén no es alterada significativamente por los alimentos.

Las concentraciones séricas de naproxén aumentan en proporción directa a la dosis administrada hasta 500 mg siendo la respuesta casi lineal.

Además, conforme aumentan las concentraciones séricas, también lo hacen las tasas de eliminación y excreción; esto ha sido explicado por la saturación aparente por los puntos de fijación a la albúmina sérica, lo cual produce más fármaco libre, no fijado, que es eliminado rápidamente través de los riñones. Este fenómeno sugiere que las concentraciones séricas alcanzables de naproxén podrían ser limitadas, lo cual, cuando menos en teoría, podría limitar, a su vez, los efectos tóxicos en caso de una sobredosis. Esto contrasta con el metabolismo de los salicilatos, donde una sobredosis satura las enzimas metabolizantes y promueve una acumulación creciente.

El naproxén atraviesa la barrera placentaria de 20 a 30 minutos después de su administración por vía oral, aparece en la leche de las mujeres lactantes en una concentración de aproximadamente del 1 % del nivel en el suero materno.

Es biotransformado en el hígado y excretado por orina, básicamente como metabolitos inactivos. El único metabolito de naproxén detectado en el hombre es el 6-desmetilnaproxén. Tanto naproxén como este metabolito son excretados en la orina.

3. EFECTOS SECUNDARIOS.

Los síntomas gastrointestinales asociados con naproxén han sido indigestión, náuseas, pirosis y malestar o dolor abdominal. Los efectos secundarios con el sistema nervioso central son cefalea, vértigo o aturdimiento, incapacidad para concentrarse, y somnolencia, con reportes ocasionales de sudoración, depresión, tinnitus y otros trastornos auditivos.

Puesto que las acciones farmacológicas del naproxén no son medidas a través del eje hipofisario-suprarrenal, no debe esperarse ninguno de los efectos adversos de supresión corticosuprarrenal.

El naproxén no debe ser administrado a pacientes con úlcera péptica activa.

El naproxén debe ser empleado con mucha precaución en pacientes con deterioro significativo de la función renal; en estos pacientes se recomienda monitorear la creatinina sérica y/o la depuración de creatinina. En algunos pacientes de edad avanzada en quienes pueda esperarse deterioro de la función renal, debe considerarse una reducción de la dosis diaria. También se recomienda proceder con precaución cuando se requieran altas dosis en pacientes ancianos y en pacientes con deterioro de la función hepática.

4. INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS.

Como naproxén tiene un alto grado de fijación a la albúmina sérica, posee potencial teórico de interacción con otros fármacos que se fijan a la albúmina, tales como ácido acetilsalicílico (ASA), warfarina, sulfonilureas, e hidantoinas. Esta interacción puede presentarse pero en la mayoría de los casos no parece tener importancia clínica. La administración concomitante de ASA y naproxén resulta en concentraciones séricas más bajas de cada fármaco y aumenta el aclaramiento renal de naproxén. Pero es posible que este efecto no altere significativamente la eficacia del naproxén pues el tratamiento combinado ha demostrado ser más eficaz que con ASA solo.⁴

En pacientes que reciben dicumarol o warfarina, la adición de naproxén al tratamiento podría prolongar el tiempo de protrombina, por consiguiente, los pacientes que reciban esta terapéutica anticoagulante deben ser vigilados estrechamente durante la administración de naproxén.

B. APLICACIONES CLINICAS.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroides se utilizan primariamente para el tratamiento de la artritis reumatoide, en pacientes que no toleran o no responden al ácido acetilsalicílico.

1. Reacciones Adversas e Indeseables.

En modelos experimentales se ha demostrado que todos estos fármacos pueden causar irritación gástrica y erosiones hemorrágicas. En los humanos, la reacción indeseable más localizada es de tipo gastrointestinal. Comparados con el ácido acetilsalicílico, la hemorragia gastrointestinal oculta es menos frecuente y severa, aunque en pocas ocasiones se observa hemorragia gastrointestinal o desarrollo de úlcera péptica.

Entre los efectos sobre el SNC se incluyen episodios transitorios de mareo, cefalea, vértigo y tinnitus. Rara vez se presenta visión borrosa, disminución de la agudeza visual y dificultad para discriminar colores, de manera transitoria; estos síntomas remiten cuando se suspende la medicación.

XI. PARTE EXPERIMENTAL.

Los métodos sometidos a estudios fueron los siguientes:

A. TITULACION NO ACUOSA.

1. Resumen.

El granulado de naproxén (18.0 mg) se disuelve en 7 ml de Dimetilformamida, y se le agrega 0.1 % de azul de timol como indicador, se valora con metóxido de sodio 0.1 N previamente estandarizado.

El punto de equivalencia es marcado por un color verde esmeralda o verde-azulado.

B. ESPECTROFOTOMETRIA (U.V.).

1. Resumen.

El granulado de naproxén (20.5 mg) se transfiere a un matraz volumétrico de 50 ml, se disuelve con metanol RA y se afora hasta la marca. Similarmente se prepara un estandar y se lee a 332 nm.

C. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDO DE ALTA PRESION.

1. Resumen.

a. Preparacion del Estandar Interno (Benzocaina).

Pesar exactamente 235 mg de benzocaina en matraz volumétrico de 25 ml disolver y llevar a la marca con metanol.

b. Preparación de la Solución Estandar de Trabajo de Naproxén-Benzocaína.

Pesar exactamente 12.5 mg de naproxén estandar de referencia en un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 4 ml de la solución stock de benzocaína, disolver y llevar a la marca con la fase móvil.

c. Preparación de la Muestra.

Pesar el granulado equivalente a 12.5 mg de naproxén, en un matraz volumétrico de 25 ml, adicionar 4 ml de la solución stock de benzocaína. Mezclar y llevar a la marca con la fase móvil.

Fase Móvil: Acetonitrilo : Agua a $\text{pH} = 6.0$

Columna : Nucleocil C_{18} de 10 micras.

D. APARATOS Y REACTIVOS.

a. Dispensador de 10 ml graduado en décimas, Oxford Laboratories Pipettor.

b. Dispensador de 1 ml graduado en centésimas Cole-Parmer Champette.

c. Tubos de ensayo de 16 x 200 mm.

d. Gradilla para tubos de ensayo.

e. Balanza analítica con precisión en milésimas de gramo, marca Sartorius Handy, modelo H 120.

f. Bureta de vidrio graduada en décimas	50 ml
g. Probeta de vidrio graduada en décimas	25 ml
h. Vasos de precipitados	100 ml
i. Matraces erlenmeyer	125 ml
j. Matraces volumétricos	50 ml
k. Frascos goteros de vidrio	30 ml
l. Parrilla de agitación.	
m. Pinzas de tres dedos con nuez.	
n. Soporte universal.	
ñ. Barras magnéticas.	
o. Gradilla de acero inoxidable.	
p. Espectrofotómetro Hewlett Packard 8451A.	
q. Cromatógrafo de líquidos de alta presión watter's 440.	
r. Integrador Hewlett Packard 3390A.	

- s. N,N-Dimetilformamida (reactivo A), J. T. Baker.
- t. Metanol R. A. Merck.
- u. Metóxido de sodio al 25 % Aldrich.
- v. Solución al 0.1 % de azul de timol (reactivo B).
- w. Solución 0.1 N de metóxido de sodio de trabajo (reactivo C).

Pipetear de la solución al 25 % de metóxido de sodio 5.7 ml y colocarlos en matraz volumétrico de 250 ml. Agregar metanol absoluto hasta la marca.

- x. Naproxén estandar de referencia.

XII. RESULTADOS.

A. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO.

1. DETERMINACION DE NAPROXEN POR TITULACION NO ACUOSA.

a. Resumen.

El granulado de naproxén se disuelve en dimetilformamida se le agrega un indicador (azul de timol) y se titula con metóxido de sodio.

b. Puntos de Enfasis.

1). Se recomienda homogenizar perfectamente el granulado.

2). El granulado debe disolverse completamente en el medio de disolución (reactivo A).

3). Durante la valoración, poco antes del vire del indicador, aparece un color verde esmeralda que desaparece después de agitar, el cual no debe considerarse.

4). Valorar la solución de metóxido de sodio de trabajo (reactivo C), cada dos semanas.

5). Los recipientes que contengan los reactivos deben estar perfectamente cerrados.

c. Procedimiento.

Pesar exactamente alrededor de 18.0 mg de granulado y transferir a un tubo de ensayo. Con el dispensador de 10 ml (1) agregar 7ml del reactivo "A" (6) y disolver perfectamente mediante agitación. Agregar dos gotas del reactivo "B" (9). Adicionar 0.72 ml del reactivo "C" con el dispensador de 1 ml, enseguida agregar volúmenes de 0.01 ml hasta obtener un color azul, el cual debe permanecer por lo menos 30 segundos. Aplicar el mismo procedimiento para el estandar de referencia.

Preparar simultáneamente un blanco que está compuesto por 7 ml del reactivo "A" + 2 gotas del reactivo "B" y agregar volúmenes de 0.01 ml del reactivo "C" hasta obtener el color azul característico del vire del indicador.

d. Cálculos.

Para obtener el porcentaje de naproxén en la muestra, realizar el siguiente cálculo:

$$\% \text{Naproxén} = 24.59603 \times N \times V/W$$

Donde: N = normalidad del metóxido de sodio.

V = volumen de metóxido de sodio usado en la titulación (ml).

W = Peso de la muestra (gr).

B. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

1. Especificidad Ante Excipientes.

Tabla No. 4. Datos para especificidad.

muestra	mg adicionados	vol(ml)	mg recup.	% recobro
1	18.7	0.04	0.048	0.263
2	18.4	0.03	0.024	0.134
3	18.3	0.03	0.024	0.134
4	18.6	0.03	0.024	0.132

También se realizaron 4 determinaciones con placebo cargado, los resultados fueron los siguientes.

muestra	mg adicionados	vol(ml)	mg recup.	% recobro
1	17.185	0.72	17.229	100.257
2	16.899	0.71	16.983	100.497
3	16.947	0.71	16.983	100.213
4	17.491	0.73	17.475	99.911
STD	17.654	0.74	17.721	100.379

El blanco consume 0.02 ml, este volumen se resta al volumen consumido por las muestras.

Como puede observarse en los resultados, la interferencia que existe no es significativa; por lo tanto, el método puede considerarse específico.

2. Exactitud.

Se pesaron dos muestras por cada nivel, los cálculos se realizaron con los promedios.

Tabla No. 5. Datos para exactitud.

mta(%)	mg adicionados	mg recuperados	% recobro
70	12.085	12.1306	100.377
80	13.695	13.748	100.387
90	15.555	15.827	101.752
100	17.280	17.560	101.620
110	19.000	18.715	98.504
120	20.700	20.564	99.342

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \mu = 100 \%$$

$$H_a: \mu \neq 100 \%$$

$$\bar{X} = 100.324 \%$$

$$S = 1.2651$$

Estadígrafo de contraste t de student.

$$gl = 5$$

$$t_{tab} = 2.5706$$

$$t_{cal} = 0.6279$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$99.998 < 100.324 < 101.65$$

3. Linealidad.

Se pesaron dos muestra por cada nivel, los cálculos se realizaron con los promedios.

Tabla No. 6. Tabla para linealidad.

muestra(%)	mg adicionados	mg recuperados	% recobro
70	12.10	11.860	98.020
80	13.70	13.650	99.635
90	15.40	15.650	101.642
100	17.40	17.450	100.316
110	18.90	18.570	98.269
120	20.70	20.810	100.536

Evaluación de la ordenada al origen (a).

Contraste de hipótesis.

$$H_0: a = 0$$

$$H_a: a \neq 0$$

$$a = -0.00593$$

Estadígrafo de contraste.

Nivel de confianza del 95 %. ($t_{0.975}$ gl = n-2)

$$t_{tab} = 2.7764$$

$$t_{cal} = 0.01636$$

$$t_{cal} < t_{tab}.$$

Intervalo de confianza.

$$-0.9959 < 0.01636 < 1.0227$$

Por lo tanto se dice que el método tiene ordenada al origen igual a cero ($a = 0$).

Evaluación de la pendiente (b).

Contraste de hipótesis.

$$H_0: b = 1$$

$$H_a: b \neq 1$$

$$b = 0.99860 \quad S_{y/x} = 0.1480$$

$$r = 0.99994$$

Estadígrafo de contraste t de student

Nivel de confianza del 95 % ($t_{0.975}$).

$$g_l = 4$$

$$t_{tab} = 2.7764$$

$$t_{cal} = 0.006855$$

$$t_{cal} < t_{tab}.$$

Intervalo de confianza.

$$0.941895 < 0.9986 < 1.0553$$

Por lo tanto se dice que el método tiene pendiente igual a uno, ($b = 1$).

De acuerdo con los resultados de ordenada al origen y pendiente, se dice, que el método es lineal.

NAPROXEN-GRANULADO
LINEALIDAD-VOLUMETRICO

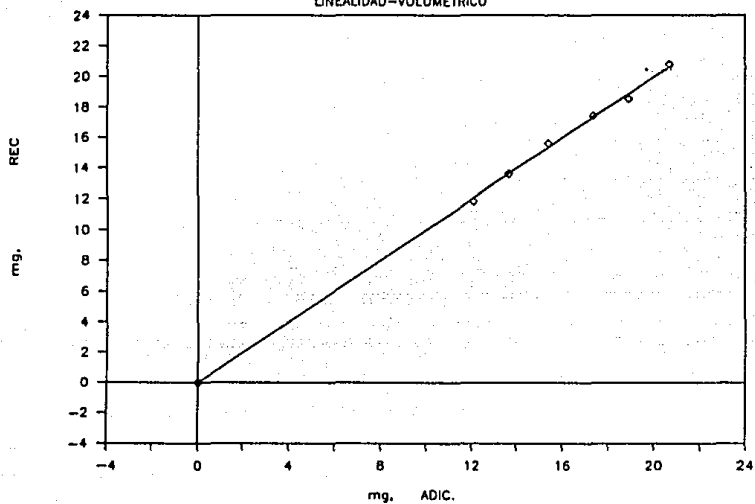


Figura No. 4. Curva de la Linealidad. Titulación.

4. Precisión.

a. Repetibilidad.

Tabla No. 7. Datos para repetibilidad.

muestra	mg adicionados	mg recuperados	% recobro
1	17.200	17.062	99.200
2	17.340	17.531	101.104
3	17.200	17.062	99.200
4	17.480	17.531	100.295
5	16.919	16.923	100.857
6	17.293	17.297	100.027
7	17.420	17.531	100.640
STD	17.000	17.063	100.376

$$\bar{X} = 100.180 \%$$

$$S = 0.7616$$

$$CV = 0.7602$$

$$\sqrt{C} = 0.70514$$

Contrate de hipótesis.

$$H_0: \sqrt{C} = 1.5 \%$$

$$H_a: \sqrt{C} \neq 1.5 \%$$

$$CV < 1.5 \%$$

Estadígrafo de contraste χ^2 cuadrada ($\chi^2_{0.975, gl=n-1}$)

$$\chi^2_{cal} = 1.9888 \quad \chi^2_{tab} = 14.449$$

$$\chi^2_{cal} < \chi^2_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$0.2408 < 1.988 < 2.8134$$

b. Reproducibilidad.

tabla No. 8. Datos para reproducibilidad.

	Dia I	Dia II
	99.700	100.307
ANALISTA I	99.536	99.536
	99.263	99.642
	100.236	99.367
ANALISTA II	99.691	99.265
	99.200	99.858

$$\bar{X} = 99.633$$

$$S = 0.360$$

$$CV = 0.361$$

Se utilizó una tabla de distribución F, con un nivel de confianza del 95.0 %. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Tabla No. 9. Tabla de análisis de varianza.

fte. error	gl	SC	MC	Fcal.	Ftab.	Aceptación
Analista	1	0.01	0.01	0.0454	161.4	Fcal<Ftab
Dia	1	0.01	0.01	0.0454	161.4	Fcal<Ftab
Anal-Dia	1	0.22	0.22	1.4787	5.320	Fcal<Ftab
Error	8	1.19	0.149			

Como puede observarse en la tabla de análisis de varianza.

No existe efecto por analista.

No existe efecto por día.

No existe efecto por la interacción Analista-Día.

Por lo tanto, se dice que el método es reproducible.

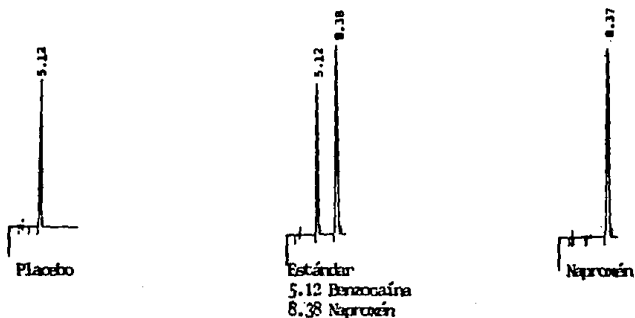
**II. COMPARACION DEL METODO ANALITICO CON CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION Y ESPECTROFOTOMETRIA.**

Para realizar la comparación fue necesario aplicar el mismo procedimiento (validación) que se hizo con la titulación.

I. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION.

B. Especificidad Ante Excipientes. .

Figura No. 5. Cromatogramas de Especificidad.



Como puede observarse en los cromatogramas no existe interferencia de los excipientes.

Por lo tanto se dice que el método es específico.

b. Exactitud.

Cada nivel se peso por duplicado, los cálculos se realizaron con los promedios.

Tabla No. 10. Datos para exactitud.

muestra(%)	mg adicionados	mg recuperados	%recobro
70.0	9.070	9.186	101.278
80.0	10.050	10.278	102.272
90.0	11.215	11.218	100.032
100.0	12.525	12.659	101.070
110.0	13.730	13.746	100.120
120.0	15.200	15.161	99.745

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \mu = 100 \%$$

$$H_a: \mu \neq 100 \%$$

$$\bar{X} = 100.752 \%$$

$$S = 0.96123 \%$$

Estadigrafo de contraste t de student.

Nivel de confianza del 95 % ($t_{0.975}$).

$$gl = 5$$

$$t_{tab} = 2.5706$$

$$t_{cal} = 1.9189$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$99.7443 < 100.753 < 101.7617$$

C. Linealidad.

Cada nivel se peso por duplicado; los cálculos se realizaron con los promedios.

Tabla No. 11. Datos para linealidad.

muestra(%)	mg adicionados	mg recuperados	%recobro
70.0	9.450	9.380	99.219
80.0	10.1250	10.000	98.824
90.0	11.310	11.170	98.802
100.0	12.490	12.350	98.913
110.0	13.780	13.650	99.027
120.0	15.110	14.410	98.715

Evaluación de la ordenada al origen (a).

$$H_0: a = 0$$

$$H_a: a \neq 0$$

$$a = 0.016890$$

Estadígrafo de contraste t de student.

Nivel de confianza del 95 % ($t_{0.975}$).

$$gl = 4$$

$$t_{tab} = 2.7764$$

$$t_{cal} = 0.04943.$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$-19.984 < 0.01689 < 20.0178$$

El método tiene ordenada al origen igual a cero.

Evaluación de la pendiente (b).

Contraste de hipótesis.

$$H_0: b = 1$$

$$H_a: b \neq 1$$

$$b = 0.98427 \quad S_{y/x} = 0.14070$$

$$r = 0.999962$$

Estadígrafo de contraste t de student.

Nivel de confianza del 95 % ($t_{0.975}$).

$$g_1 = 4$$

$$t_{tab} = 2.7764$$

$$t_{cal} = 1.6105$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$0.95715 < 0.984287 < 1.0114$$

El método puede considerarse con pendiente igual a uno.

NAPROXEN-GRANULADO

LINEALIDAD-CLAR

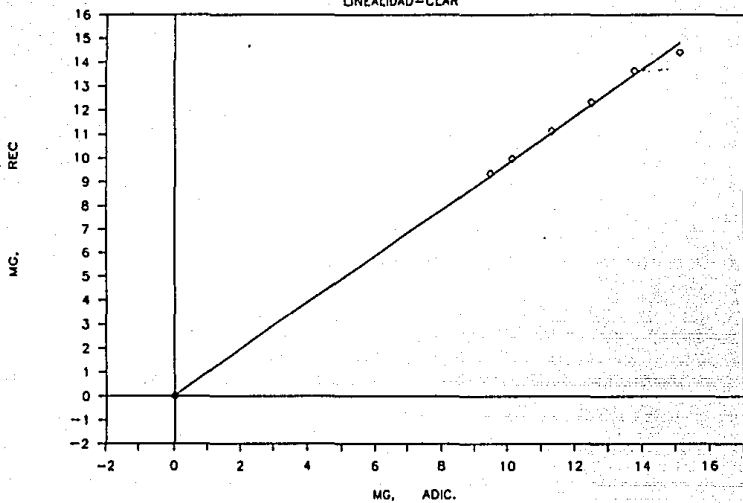


Figura No. 6. Curva de la Linealidad. HPLC.

d. Precisión.

1). Repetibilidad.

Tabla No. 12. Datos para repetibilidad.

muestra	mg adicionados	mg recuperados	%recobro
1	12.549	12.480	99.451
2	12.549	12.574	100.206
3	12.500	12.462	99.696
4	12.455	12.439	99.875
5	12.361	12.289	99.417
6	12.361	12.474	100.922
7	12.408	13.350	99.535

Contraste de hipótesis.

$$H_0 \quad \bar{V} = 1.5$$

$$H_a \quad \bar{V} \neq 1.5$$

$$\bar{X} = 99.780 \quad S = 0.2778$$

$$\bar{V} = 0.2536 \quad CV = 0.2784$$

Estadígrafo de contraste χ^2 cuadrada de 0.975.

$$g_1 = 6$$

$$\chi^2_{cal} = 0.2572$$

$$\chi^2_{tab} = 14.449$$

$$\chi^2_{cal} = \chi^2_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$0.179015 < 0.2536 < 0.6126$$

2). Reproducibilidad.

Tabla No. 13. Datos para reproducibilidad.

	Día I	Día II
	99.762	99.174
ANALISTA I	100.108	100.835
	100.210	99.744
	99.024	100.608
ANALISTA II	100.811	98.505
	100.229	98.404

Tabla No. 14. Tabla de Análisis de Varianza.

	fte error	gl	SC	MC	Fcal.	Ftablas	Aceptación
Analista	1	0.22	0.22	0.0128	161.4	Fcal < Ftablas	
Día	1	0.42	0.42	0.0245	161.4	Fcal < Ftablas	
Anal-Día	1	0.68	0.68	0.0397	5.32	Fcal < Ftablas	
Error	8	136.83	17.12				

Como puede observarse en la tabla de análisis de varianza:

No existe efecto por analista.

No existe efecto por día.

No existe efecto por la interacción Analista-Día.

Por lo tanto, se dice que el método es reproducible.

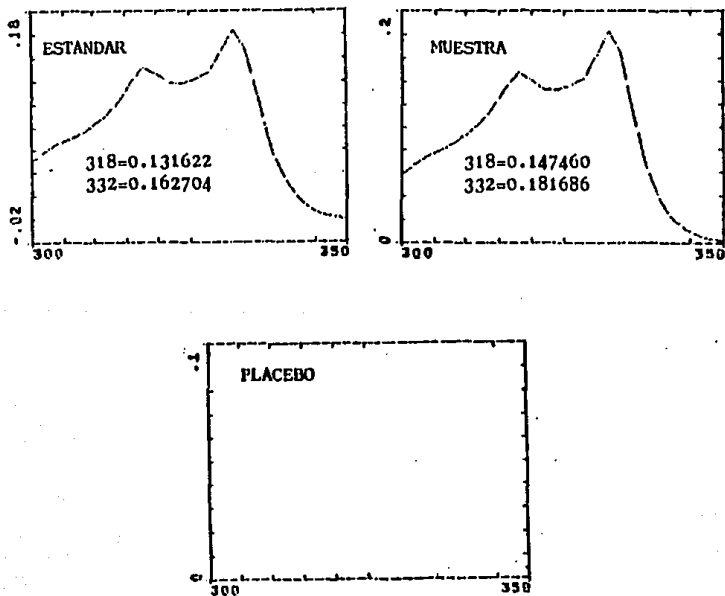
Con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad dentro de los límites, se dice, que el método es preciso.

2. ESPECTROFOTOMETRIA.

a. Especificidad Ante Excipientes.

El método se enfrentó a los excipientes, se observó que no hay interferencia por parte de estos.

Figura No. 7 Espectrogramas de Especificidad.



b. Exactitud.

Se trabajó con 6 niveles diferentes, por cada nivel se pesaron dos muestras. Los cálculos se realizaron con el promedio de cada nivel.

Tabla No. 15. Datos para determinar exactitud.

muestra(%)	mg adicionados	mg recuperados	%recobro
70.0	14.30	14.229	99.508
80.0	16.77	16.772	100.012
90.0	18.50	18.379	99.349
100.0	20.47	20.381	99.552
110.0	22.60	22.407	99.148
120.0	24.53	24.777	101.005

Contraste de hipótesis

$$\begin{aligned} H_0: \mu &= 100 \% & \bar{X} &= 99.835 \\ H_a: \mu &\neq 100 \% & S &= 0.8393 \\ & & CV &= 0.8406 \end{aligned}$$

Estadígrafo de contraste t de student.

Nivel de confianza del 95 % (t de 0.975)

$$\begin{aligned} t_{\text{tab}} &= 2.5706 & \text{gl} &= 5 \\ t_{\text{cal}} &= -0.48155 \\ t_{\text{cal}} &< t_{\text{tab}} \end{aligned}$$

Intervalo de confianza.

$$98.9542 < 99.835 < 100.7158$$

c. Linealidad.

Se pesaron 6 muestras a 6 niveles diferente. Se pesaron dos muestras por cada nivel; los cálculos se hacen con el promedio de cada nivel.

Tabla No. 16. Datos para determinar linealidad.

muestra(%)	mg adicionados	mg recuperados	recobro
70.0	14.40	14.830	102.971
80.0	16.95	17.580	103.728
90.0	18.40	18.780	102.075
100.0	20.60	21.240	103.144
110.0	22.60	23.320	102.017
120.0	24.55	25.050	102.853

Evaluación de la ordenada al origen (a).

$$H_0: A = 0$$

$$H_a: A \neq 0$$

$$a = 0.006045$$

Estadigrafo de contraste t de student, con $gl = 4$.

$$t_{tab} = 2.7764$$

$$t_{cal} = 0.01242$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$-1.3466 < 0.00605 < 1.3587$$

Entonces se considera que el método tiene ordenada al origen igual a cero ($a = 0$).

Evaluación de la pendiente (b).

Contraste de hipótesis.

$$H_0: b = 1$$

$$H_a: b \neq 1$$

$$b = 1.0136$$

$$r = 0.99997$$

$$S_{y/x} = 0.0863$$

Estadígrafo de contraste t de student.

Nivel de confianza del 95 % (t de 0 975)

$$t_{\text{tab}} = 2.7764 \quad \text{gl} = 4$$

$$t_{\text{cal}} = 0.00291$$

$$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$$

Intervalo de confianza

$$0.97133 < 0.99997 < 1.02861$$

El método tiene pendiente igual a uno ($b = 1$).

De acuerdo con los resultados de la ordenada al origen, y la pendiente, se dice, que el método es lineal.

NAPROXEN-GRANULADO

LINEALIDAD-U.V.

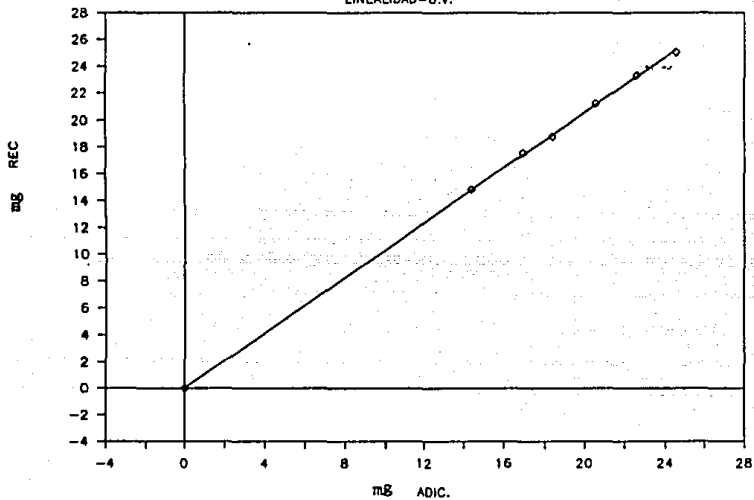


Figura No. 8. Curva de la Linealidad. U. V.

d. Precisión.

1). Repetibilidad.

Tabla No. 17. Datos para calcular repetibilidad.

muestra	mg adicionados	mg recuperados	% recobro
1	20.601	20.889	101.396
2	20.585	20.524	99.703
3	20 750	21.787	100.172
4	20.905	20 930	100.121
5	20.200	20.515	101.561
6	19.959	20.108	100.748
7	20.051	20.147	100.476

Contraste de hipótesis.

$$H_0 \quad \sigma = 1.5 \%$$

$$H_a \quad \sigma = 1.5 \%$$

$$\bar{x} = 100.596 \quad S = 0.6845$$

$$\sigma = 0.6337 \quad CV = 0.6805$$

Estadígrafo de contraste χ^2 cuadrada.

Nivel de confianza del 95.0 %.

$$gl = 6$$

$$\chi^2_{cal} = 1.6066$$

$$\chi^2_{tab} = 14.449$$

$$\chi^2_{cal} < \chi^2_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$0.1668 < 1.6066 < 1.9478$$

2). Reproducibilidad.

Tabla No 18. Datos para calcular reproducibilidad.

	Día I	Día II
	102.664	101.152
ANALISTA I	101.915	101.039
	101.424	100.963
	101.831	101.649
ANALISTA II	101.390	101.127
	100.573	100.775

Se utilizó una tabla de distribución F, con un nivel de confianza del 95.0 %. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Tabla No. 19. Tabla de análisis de varianza.

fte. error	gl	SC	MC	$F_{cal.}$	$F_{tab.}$	Aceptación
Analista	1	0.28	0.28	0.50	161.4	$F_{cal} < F_{tab}$
Día	1	0.80	0.80	1.428	161.4	$F_{cal} < F_{tab}$
Anal.-Día	1	0.56	0.56	2.240	5.32	$F_{cal} < F_{tab}$
Error	8	2.0	0.25			

Como puede observarse en tabla de análisis de varianza.

No existe efecto por el analista.

No existe efecto por el día.

No existe efecto por la interacción analista-día.

Por lo tanto, el método se considera reproducible.

XIII. COMPARACION ESTADISTICA DE METODOS ANALITICOS.

1. Titulación en Medio no Acuoso. Método 1.
2. Cromatografía de Líquidos de Alta Presión. Método 2
3. Espectrofotometría (U.V.). Método 3.

A. COMPARACION DE LOS METODOS 1 Y 2.

1. Comparación de precisión a través de repetibilidad.

Método 1

$$\bar{U}_1 = 0.70514$$

$$S_1 = 0.7616$$

$$n = 7$$

Método 2

$$\bar{U}_2 = 0.25316$$

$$S_2 = 0.2778$$

$$n = 7$$

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \bar{U}_1 = \bar{U}_2$$

$$H_a: \bar{U}_1 \neq \bar{U}_2$$

Estadígrafo de contraste F con un nivel de confianza del 95.0 %, y $g_1 = 6/6$.

$$F_{cal} = 2.7415.$$

$$F_{tab} = 4.28.$$

$$F_{cal} < F_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$-0.6405 < 2.7806 < 0.6405$$

**Por lo tanto; se dice, que los métodos tienen
repetibilidad equiparable.**

2. Comparación a través de la exactitud.

Método 1
 $\bar{X}_1 = 100.324$
 $S_1 = 1.2651$
 $n = 6$

Método 2.
 $\bar{X}_2 = 100.752$
 $S_2 = 0.96123$
 $n = 6$

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

Estadígrafo de contraste t de student, con un nivel de confianza del 95.0 % y $gl = 10$.

$$t_{cal} = 0.1393$$

$$t_{tab} = 12.706$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$-1.8731 < -0.428 < 1.44514$$

Los métodos poseen exactitud equiparables.

3. Comparación de Linealidad a través de la Pendiente.

Método 1	Método 2
$b_1 = 0.9986$	$b_2 = 0.98427$
$\sum X_1^2 = 1659.72$	$\sum X_2^2 = 893.8336$
$\sum (X_1)^2 = 9643.24$	$\sum (X_2)^2 = 5221.5076$
$S_{y/x1} = 0.148$	$S_{y/x2} = 0.04743$

Contraste de hipótesis.

$$H_0: b_1 = b_2$$

$$H_a: b_1 \neq b_2$$

Estadígrafo de contraste t de student, nivel de confianza del 95.0 % y gl = 8.

$$t_{cal} = 1.7094$$

$$t_{tab} = 2.306$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Los métodos tienen pendientes equiparables.

B. COMPARACION DE LOS METODOS 1 Y 3.

3. Comparación de la precisión a través de la repetibilidad.

$$\begin{aligned} \text{Método 1} \\ \sigma_1 &= 0.70514 \\ s_1 &= 0.7616 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Método 3} \\ \sigma_3 &= 0.6337 \\ s_3 &= 0.6845 \end{aligned}$$

Contraste de hipótesis.

$$\begin{aligned} H_0: \sigma_1 &= \sigma_3 \\ H_a: \sigma_1 &\neq \sigma_3 \end{aligned}$$

Estadígrafo de contraste F con un nivel de confianza del 95.0 %, y $g_l = 6/6$.

$$\begin{aligned} F_{\text{cal}} &= 1.018 \\ F_{\text{tab}} &= 4.28 \\ F_{\text{cal}} &< F_{\text{tab}} \end{aligned}$$

Intervalo de confianza.

$$-0.2590 < 1.113 < 0.2590$$

Los métodos son equiparables en cuanto a repetibilidad.

2. Comparación de los Métodos a través de la Exactitud.

Método 1
 $\bar{X}_1 = 100.324$
 $S_1 = 1.2651$

Método 3
 $\bar{X}_3 = 99.835$
 $S_3 = 0.8393$

Contraste de hipótesis.

$$H_0: \mu_1 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_3$$

Estadígrafo de contraste t de student con un nivel de confianza del 95.0 %, y $gl = 1.0$.

$$t_{cal} = 0.789$$

$$t_{tab} = 12.706$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Intervalo de confianza.

$$-0.892 < 0.489 < 1.870$$

Los métodos son equiparables en cuanto a exactitud.

3. Comparación de la Linealidad a través de la Pendiente.

Método 1	Método 3
$b_1 = 0.9986$	$b_2 = 1.0136$
$S_{y/x1} = 0.148$	$S_{y/x3} = 0.0863$
$\sum X_1^2 = 98.2$	$\sum X_3^2 = 117.5$
$\sum (X_1)^2 = 9643.24$	$\sum (X_3)^2 = 13806.25$
$S_{x1} = 3.2407$	$S_{x3} = 3.7317$

Contraste de hipótesis.

$$H_0: b_1 = b_3$$

$$H_a: b_1 \neq b_3$$

Estadígrafo de contraste t de student, nivel de confianza del 95.0% y $gl = 8$.

$$t_{cal} = 0.351$$

$$t_{tab} = 2.306$$

$$t_{cal} < t_{tab}$$

Los métodos tienen pendientes equiparables.

XIV. ANALISIS DE RESULTADOS.

Existen en el laboratorio métodos de análisis, tales , como el de cromatografía de líquidos de alta presión, y el espectrofotométrico, los cuales son métodos muy eficaces y poseedores de una tecnología moderna; aunque con un tiempo relativamente grande y de un costo elevado; considerando estas características, y los objetivos que se plantearon inicialmente, estos métodos no son los necesariamente prácticos, para efectuar un análisis en un rango de tiempo y costo menor. Por tal motivo se vio la necesidad de desarrollar un método de igual validez en cuanto a eficacia, sin tener que utilizar instrumentos de alta tecnología; y con la atenuante de tiempo y costo menor. El método fue diseñado en el campo de la volumetría.

Aunque el método desarrollado presenta las ventajas de costo menor, rapidez de análisis y facilidad para ser aplicado sin necesidad de tener experiencia; su principal desventaja respecto a los métodos arriba mencionados, es que no es posible aplicarlo en estabilidad; es decir, solo puede ser utilizado como método de rutina.

Como todo método analítico la valoración presenta algunas desventajas, como la falta de especificidad ante sustancias relacionadas. Por otra parte, en el método desarrollado el error se visualiza de la siguiente manera: puede notarse con mayor claridad, si se utiliza una

microbureta (graduada en centésimas) y además utilizando volúmenes de agente titulante menor a 1 ml, que con una bureta graduada en décimas, donde se utilizan volúmenes hasta de 15 o 20 ml de agente titulante. Esto se debe a que el más mínimo volumen agregado con una microbureta y donde se gastan volúmenes menor a 1 ml, afectará grandemente el punto de equivalencia lo cual se reflejará al momento de realizar los cálculos. Sin embargo; ambos instrumentos proporcionan resultados confiables.

Respecto a la validación, en los resultados puede observarse que los tres métodos (volumétrico, espectrofotometría y cromatografía de líquidos de alta presión) Pueden aplicarse satisfactoriamente en control de calidad, ya los excipientes no interfieren en la cuantificación del principio activo. Aunque desde el punto de vista de la comparación de métodos analíticos, la técnica por cromatografía de líquidos de alta presión, puede considerarse el mejor ya que puede aplicarse satisfactoriamente en estabilidad.

XV. CONCLUSIONES.

Aunque en el transcurso de todo el desarrollo experimental, se tuvieron algunos problemas; los objetivos planteados se lograron satisfactoriamente.

Aun cuando en el método analítico desarrollado, no se determino especificidad ante productos de degradación; la especificidad determinada ante excipientes, demuestra que el método puede aplicarse satisfactoriamente como método de rutina, ya que los excipientes no interfieren en la cuantificación del principio activo.

En cuanto a la validación del método analítico; los resultados demuestran que el método es confiable, es decir; es específico (ante excipientes), exacto, lineal, preciso, y además, rápido y muy sencillo de llevarse a cabo.

Respecto a la comparación estadística de los métodos, se puede ver que para la cuantificación del principio, se puede utilizar indistintamente cualquiera de los tres métodos (volumétrico, cromatografía de líquidos de alta presión y espectrofotometría), pues, los resultados demuestran que son equiparables en cuanto a precisión, exactitud y linealidad.

XVI. BIBLIOGRAFIA.

1. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 5a Edición, Secretaria de Salud, pags. 1339-1341.
2. USP-XXII, Siventeenth edition, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Unites States, 1990, pag. 918, 1710-1712.
3. Remington's Pharmaceutical Sciences, "Metoxy Determination", 14a Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1970, pag. 589.
4. Monografía del Naxén, "Naxén 500 el Antiinflamatorio", Syntex División Farmacéutica, México, 1984.
5. Naprosyn, "Clinical and Technical Review", Medical Services Department Syntex Laboratories, Inc., Palo Alto California, pags. 51-56.
6. Tesis, Maria Elena Renteria Santoyo, "Comparación Estadística de dos Métodos Analíticos para la Separación de Iodoclorohidroxiquinoleina en un polifármaco de uso tópico", , México, D. F., 1985, pags. 9-30.
7. Tesis, Verónica C. Gallardo Arellano, "Determinación Cuantitativa de Piridoxal 5-fosfato y Ciproheptadina en Dihexazen por Medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión", México, D. F., 1988, pags. 11-30.

8. The Merck Index; and Encyclopedia of Chemical; Drugs, And Biological; Tenth Edition; Martha Windholz; Published by Merck Co.; Inc. Rahway, N. J. U.S.A.; 1983.; pags. 238.

9. Alexander I. Popov, Ronald T. Pflaum; "Introductory Analytical Chemistry"; 1a edición; Editor, D. C. Heath And Company; Lexington, Massachusetts; Pags. 67-108.

10. E. A. Brande and F. C. Nachod; "Determination of Organic Structures by Physical Methods"; Academic Press, New York, pp. 573-688; 1955.

11. Fernando Orozco D., "Análisis Químico Cuantitativo", 2a Edición, Editorial HARLA S. A. de C. V., México, 1951, páginas 589-581.

12. Gessner G Hawley, "Diccionario de Química y de Productos Químicos", 3a edición. Editorial LIMUSA, México 1979, pags. 185-207, 234-246.

13. Gilbert H. Ayres, "Análisis Químico Cuantitativo", 2a Edición, Editorial HARLA, Madrid, 1970, pag 279-286, 299-327.

14. G. Charlot; "Química Analítica General; Soluciones Acuosas y no Acuosas"; Tomo I; pags. 27-64.

15. George H. Schenk, Richard B. Hahn, Arleigh V. Hartkopf; "Química Analítica Cuantitativa"; 1a Edición; Editorial Continental; México; 1984; pags. 193-229.

16. Harold M. Mcnair y Benjamin Esquivel H., "Cromatografía Líquida de Alta Presión", 2a Edición, Blacksburg Virginia, U.S.A., 1980, pags. 01-46.

17. Ion T. Harrison, Brian Lewis, Peter Nelson, "Nonsteroidal Antiinflammatory Agents I. 6-Substituted-2-Naphthylacetic acid", Journal of Medicinal Chemistry, 13, pag. 203-205.
18. James S. Fritz, George A. Schenk, "Química Analítica Cuantitativa", 3a Edición, Editorial LIMUSA, México, 1979, pags. 185-207, 234-246.
19. J. S. Fritz, "Acid-Base Titrations in Nonaqueous Solvents", The G. Frederick Smith C., Columbus, Ohio, 1952, pps. 28-29; 1970.
20. J. S. Fritz and N. M. Lisicki, "Anal. Chem.", 23, pp. 589-591; 1951
21. Kennet A. Connor; "Curso de Análisis Farmacéutico, Ensayo del Medicamento"; 2a Edición; Editorial Reverté; México; 1980; Pags. 52-72.
22. Massart D. L., Dijkstra A. and Koufman L. "Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures", Elsevier Scientific Publishing Co., Amserdam, 1978.
23. Sidney Siggia, "Quantitative Organic Analysis via Groups Funtional", 3a Edición, John Wiley and Sons, Inc.; New York and London, 1963, pp. 130-133.

24. Snyder, L. R. and Kirklan, J. J., Introduction Modern Liquid Chromatography, 2a Edición, John Wiley & Sons. Inc., New York, 1978, pags. 542-550.

25. Z. T. Chowhay, " p^H -Solubility of Organic Carboxylic acids and Their Sales", Journal Pharmaceutical Sciences, 67, (9), 1978, pags. 1257-1260.

26. Galen W. Ewing, "Métodos Instrumentales de Análisis Químicos", 1a Edición, Editorial McGraw-Hill, México D.F., 1978, pags. 48-96.

27. Robert C. Duncan, Rebecca G. Knapp; "Bioestadística"; 3a Edición; Editorial Interamericana; México, D. F.; 1978; pags. 149-154.

28. W. D. Wayne; "Biestadística, Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud"; 1a Edición; Editorial Limusa; México, D. F.; 1982.

INFERENCIAS RESPECTO A LA PENDIENTE:

- Hipótesis a contrastar: $H_0 \quad b = B$
 $H_a \quad b \neq B$

donde $B = 1$

- Estadígrafo de contraste:

$$t \text{ cal.} = \frac{(b-B) (S_{y/x}) \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

- Decisión estadística:

Si $t \text{ cal.} < t (0.975, n-2 \text{ gl})$

y $t \text{ cal.} > t (0.025, n-2 \text{ gl})$

Puede considerarse que estadísticamente $b = 1$

- Intervalo de confianza al 95%:

$$b \pm t \alpha/2 \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

Si ambas hipótesis, tanto para a como para b son aceptadas, el método es lineal.

XX. ANEXO D.FORMULAS PARA EVALUAR LA REPRODUCIBILIDAD DE UN
METODO ANALITICO.

Modelo matemático (2 factores aleatorios).

$$Y_{ij} = D_i + A_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

donde:

$Y_{ij}k$ = porcentaje cuantificado por el i-nesimo analista en el j-nesimo día en la k-nesima repetición.

D_i = efecto de i-nesimo día sobre el porcentaje cuantificado.

A_j = efecto de j-nesimo analista sobre el porcentaje cuantificado.

AD_{ij} = efecto a la interacción analista-día.

$E_{(ij)k}$ = error experimental.

INFERENCIAS:

a. Efecto por el día (D).

Si $F_{cal D} < F(0.95)$ con $gl D/gl AD$

No existe efecto por el día.

b. Efecto por analista (A).

Si $F_{\text{cal A}} < F(0.95)$ con gl A/glAD

No existe efecto por analista.

c. Efecto por la interacción analista-día (AD).

Si $F_{\text{cal AD}} < F(0.95)$ con gl AD/gl error

No existe efecto por la interacción analista-día.

Los tres criterios anteriores deben cumplirse para poder asegurar que un método analítico es reproducible.

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS		MEDIA DE CUADRADOS	F cal.		
DI	i-1	$\sum y_i^2$	y^2	SC dfa	NC dfa		
		jk	ijk	i-1	NC ana-dfa		
AJ	j-1	$\sum y_j^2$	y^2	SC ana	NC ana		
		ik	ijk	j-1	NC ana-dfa		
ADij	(i-1)(j-1)	$\sum y^2_{ij}$	$\sum y_i^2$	SC ana-dfa	NC ana-dfa		
		k	ik	jk	ijk	(i-1)(j-1)	NC error
error exp.	ij(k-1)	$\sum y^2_{ijk}$	$\sum y^2_{ij}$	SC error			
			k	ij(k-1)			

XXI. ANEXO E.FORMULAS PARA EVALUAR LA COMPARACION DE METODOS ANALITICOS.

A. Comparación de la Precisión (Repetibilidad).

- Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: \sigma_1 = \sigma_2$$

$$H_a: \sigma_1 \neq \sigma_2$$

- Estadígrafo de Contraste.

$$F_{\text{cal}} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$gl = \frac{n_1 - 1}{n_2 - 1}$$

- Decisión Estadística.

$$F_{\text{cal}} > F_{0.975}$$

$$F_{\text{cal}} < F_{0.025}$$

- Intervalo de Confianza.

$$\frac{\frac{S_1^2}{S_2^2}}{F_{1-\frac{\alpha}{2}}} < \frac{\sigma_1}{\sigma_2} < \frac{\frac{S_1^2}{S_2^2}}{F_{\frac{\alpha}{2}}}$$

Si esto se cumple los métodos pueden considerarse equiparables en cuanto a repetibilidad.

B. COMPARACION A TRAVES DE LA EXACTITUD.

- Hipótesis a Contrastar:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

- Estadígrafo de contraste

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{Sp \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$Sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S^2 + (n_2 - 2)S^2}{(n_1 + n_2) - 2}}$$

$$g1 = \frac{\frac{S^2}{\bar{n}_1} + \frac{S^2}{\bar{n}_2}}{\frac{S^2}{n_1+1} + \frac{S^2}{n_2+1}}$$

- Decisión Estadística,

$$t_{0.975} \geq t_{\text{cal}} \geq t_{0.025}$$

- Intervalo de Confianza,

$$(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \pm t_1 \frac{S^2}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

Si lo anterior se cumple, se dice que los métodos son equiparables en cuanto a exactitud.

C. COMPARACION DE LA LINEALIDAD A TRAVES
DE LA PENDIENTE.

Hipótesis a Contrastar.

$$H_0: B_1 = B_2$$

$$H_a: B_1 \neq B_2$$

- Estadígrafo de Contraste.

$$t_{\text{cal}} = \frac{B_1 - B_2}{S_{1y/x} + S_{2y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum X_1^2 - \frac{(\sum X_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{\sum X_2^2 - \frac{(\sum X_2)^2}{n_2}}}}$$

$$gl = (n_1 - 2) + (n_2 - 2)$$

- Decisión Estadística.

$$t_{\text{cal}} \leq t_{0.975}$$

$$t_{\text{cal}} \geq t_{0.025}$$

Si esto se cumple, se dice que los métodos tienen pendientes equiparables.