



19
29
Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Z A R A G O Z A

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN
METODO ANALITICO, PARA DETERMINAR
NAPROXEN SODICO EN GRANULADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MA. CRISTINA HERNANDEZ EUGENIO



MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

1. INTRODUCCION -----	01
2. GENERALIDADES	
2.1. Titulaciones ácido- base en medio no acuoso.-----	02
2.1.1. Características generales de las titulaciones -----	02
2.1.2. Historia de las titulaciones ácido-base en medio acuoso -----	03
2.1.3. Clasificación de los disolventes -----	04
2.1.4. Efecto nivelador del disolvente -----	09
2.1.5. Propiedades específicas de algunos disolventes -----	10
2.1.6. Detección del punto de equivalencia en algunos disolventes -----	14
2.2. Espectrofotometría	
2.2.1. Ley de Beer-Lambert -----	19
2.2.2. Aplicaciones de la ley de Beer-Lambert -----	20
2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución	
2.3.1. Separaciones cromatográficas -----	21
2.3.2. Integración cromatográfica -----	25
2.4. Validación de métodos analíticos	
2.4.1. Clasificación de métodos analíticos -----	29
2.4.2. Parámetros de validación -----	31
2.5. Comparación estadística de dos métodos analíticos	
2.5.1. Parámetros de comparación -----	39

2.6. Monografía -----	43
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	46
4. OBJETIVOS -----	47
5. HIPOTESIS -----	48
6. PARTE EXPERIMENTAL	
6.1. Material y equipo -----	49
6.2. Desarrollo del método analítico -----	51
6.3. Elección del indicador -----	56
6.4 Validación del método analítico desarrollado -----	57
6.5. Validación de métodos analíticos alternativos -----	57
6.5.1. Método espectrofotométrico -----	58
6.5.2. Metodo de cromatografía de líquidos de alta resolución -----	59
6.6. Comparación estadística -----	60
7. RESULTADOS	
7.1. Diseno del método analítico -----	61
7.2. Validación del método desarrollado-----	70
7.3. Validación del método Espectrofotométrico -----	83
7.4. Validación del método de cromatografía de líquidos de alta resolución -----	89
7.5. Comparación estadística -----	95
8. DISCUSION DE RESULTADOS -----	100
9. CONCLUSIONES -----	102
10. BIBLIOGRAFIA -----	104

1. INTRODUCCION

El Naproxén Sódico es un fármaco antiinflamatorio no esterooidal que ha conquistado la aceptación médica por reducir tanto la inflamación como el dolor en la artritis reumatoide, así como por ser un potente inhibidor de las agregaciones plaquetarias y útil en la profilaxis de los ataques de migraña.

Los métodos analíticos que más se utilizan para cuantificar Naproxén Sódico son por espectrofotometría y por cromatografía de líquidos de alta resolución; Estos métodos son muy eficientes y confiables, pero en algunos casos requieren de tiempos de análisis largos, considerando que durante el proceso de fabricación es necesario analizar el contenido de Naproxén Sódico en el granulado para poder continuar con la elaboración de tabletas y de cápsulas. Se desarrolló un método analítico por volumetría, a través de una reacción ácido-base en medio no acuoso.

El desarrollo y validación de métodos analíticos en la actualidad es un requerimiento oficial que todos los fármacos deben cumplir, por lo que se validó el método analítico desarrollado evaluando los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y especificidad.

Los resultados demuestran que el método analítico además de ser confiable es rápido y muy sencillo de llevarse a cabo.

2. GENERALIDADES

2.1. TITULACIONES ACIDO BASE EN MEDIO NO ACUOSO

2.1.1. Características generales de las titulaciones

En la bibliografía oficial de fármacos (1,2,3) se ha encontrado que los métodos de titulación ácido-base se recomiendan frecuentemente para conocer la pureza o el contenido de algunos fármacos en una muestra determinada. Debido a las ventajas que presenta esta técnica: rapidez, exactitud, sensibilidad y análisis directo, es extensamente ocupada, de forma rutinaria.

La titulación es un proceso que consiste en determinar la cantidad de sustancia "A" mediante la adición de volúmenes de una sustancia "B" de concentración perfectamente conocida.

Dentro de toda titulación ácido-base se lleva a cabo una reacción química la cual debe cumplir ciertos requisitos, como ser de cinética rápida, tener estequiometría bien definida, reaccionar lo menos posible con las impurezas que acompañan a la sustancia por titular y otras (4,5,).

Algunas de las razones para usar un medio no acuoso en una titulación ácido-base son debidas a que muchos compuestos orgánicos son insolubles en agua y solubles en otro tipo de disolventes. Otra razón es que existen ácidos y bases que son extremadamente débiles en agua por lo que no pueden valorarse cuantitativamente en este disolvente. Por otra parte un disolvente puede ayudar a distinguir 2 o más ácidos que haya en una mezcla. (6)

2.1.2 Historia de las titulaciones ácido-base en medio no acuoso

Probablemente los primeros métodos analíticos de valoración fueron hechos por Folin y Wenstworth (7) en 1910 cuando disolvieron ácidos grasos superiores en disolventes tales como cloroformo, tetracloruro de carbono, benceno o tolueno y los titularon con etóxido de sodio, obteniendo un punto final definido. Dos años después Folin y flanders(8) extrajeron con cloroformo ácido hipúrico de orina y lo titularon con etóxido de sodio. Al mismo tiempo ellos trataron la teoría de la ionización en todos los disolventes.

En 1923 Bronsted (10) publicó el concepto preliminar de su teoría de ácidos y bases. Al año siguiente Lowry (11) publicó en esencia la misma teoría.

Otros trabajos significativos fueron hechos por Conant, Hall y Werner (12,13,14) los cuales aparecen de 1927 a 1930. En dichos estudios se mostró que la valoración de aminas orgánicas da excelentes resultados cuando se titulan en ácido acético glacial o con un ácido mineral fuerte tal como perclórico. Algunas aminas aromáticas (las cuales son también básicamente débiles) fueron tituladas en agua o en alcoholes simples, encontrándose puntos de equivalencia mejor definidos en ácido acético.

Dan Mer y Downs (15) en 1931 fueron probablemente los primeros en titular potenciométricamente ácidos y bases en un disolvente aprótico. Lovine y Toennies (16) en 1933 distinguieron ácidos fuertes y débiles en cloroformo usando el indicador azul de timol; el mismo año Vorlander, Fisher y Felicitas (17) estudiaron la titulación de aminas y alcaloides en cloroformo. En 1934 Koltoff y Willman (18,19) estudiaron la fuerza de diversos cationes y aniones en ácido acético glacial; al siguiente año Naudeau y Bronchen (20)

dieron a conocer un estudio de la titulación de ácidos en formamida.

Blumrich y Bandel (21) titularon varias bases orgánicas en ácido acético glacial usando ácido perclórico como titulante. En 1942 Michaelis y S. Granick (22) publicaron la teoría de extensión de la escala de pH, la cual es similar a la escala de acidez de Hammett. En 1948 Moss Elliot y Hall (23) por primera vez desarrollaron un método para titular con exactitud ácidos débiles (fenoles), en los cuales se uso etiléndiamina como disolvente y aminoetóxido de sodio como titulante. Al iniciar 1950 se publicaron una gran cantidad de métodos para titular ácidos y bases débiles en disolventes no acuosos.

2.1.3. Clasificación de los disolventes

El comportamiento ácido-base de un soluto disuelto en un disolvente dado dependerá, de las propiedades ácido-base del disolvente en relación con el soluto, de la constante de autodisociación que posea dicho disolvente y además de su constante dieléctrica.

2.1.3.a. Propiedades ácido-base de los disolventes

Los disolventes utilizados en las titulaciones en medio no acuoso se han clasificado de acuerdo a H.A. Laitiner en tres clases (24)

Disolventes anfipróticos. Los disolventes anfipróticos son capaces de actuar como ácidos o como bases de acuerdo al concepto de Bronsted-Lowry; algunos ejemplos lo constituyen el ácido acético glacial, los alcoholes, el agua, amoniaco líquido, etiléndiamina. Aunque todos son clasificados dentro del mismo grupo los dos primeros tienen propiedades más

ácidas que el agua y los dos últimos propiedades más básicas que el agua

Disolventes apróticos o inertes. Los disolventes apróticos no muestran propiedades de ácido o de base en medida apreciable, a este grupo pertenecen los hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, benceno, cloroformo y tetracloruro de carbono, son representativos pues no tienen protones ionizables y poca tendencia o ninguna a aceptar protones de otras sustancias.

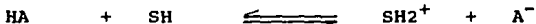
Disolventes con propiedades básicas bien definidas. Este tercer grupo lo constituyen los disolventes que tienen propiedades básicas bien definidas y que carecen de propiedades ácidas. Para estos disolventes al igual que para los apróticos no existe reacción de autodisociación. Un ejemplo típico de este tipo de disolventes es la piridina que puede aceptar un protón de un ácido de Bronsted-Lowry como el agua pero no presenta propiedades ácidas

2.1.3.b. Capacidad de Autodisociación

Otro factor que afecta la capacidad diferenciadora de un disolvente es su constante de autodisociación pues el intervalo útil de pH para que un disolvente pueda tener mejor capacidad diferenciadora aumenta a medida que esta disminuye. Existe una constante de autodisociación o de autoionización (K_i), para cada disolvente que caracteriza el equilibrio ácido-base. A continuación se ejemplifican algunas reacciones de autodisociación y en la tabla No 1 se indican valores de $pK_i = -\log k_i$, para diversos tipos de disolventes.

Reacciones de autodisociación

Caso general



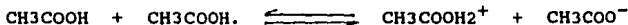
Agua



Metanol



Acido acético



Amoniaco líquido



También existen disolventes no disociables que poseen constantes de autodisociación muy pequeñas:

$\text{CH}_3\text{-O-CH}_3$
éter etílico

$\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$
acetona



piridina

En cada equilibrio ácido-base ejemplificado anteriormente H_2S^+ representa el protón solvatado y A^- la base aniónica conjugada con lo cual el producto iónico es;

$$K_i = (\text{H}_2\text{S}^+)(\text{A}^-)$$

La magnitud de la constante de autodisociación depende de dos factores; el comportamiento donador-receptor de protones y la constante dieléctrica del disolvente

Tabla 1

Constantes de autodisociación determinadas a (25°C)

Disolvente	constante de autodisociación (K _i)
Acido acético	10 ^{-14.5}
Metanol	10 ^{-16.7}
Etanol	10 ^{-19.1}
Agua	10 ⁻¹⁴
Etiléndiamina	10 ^{-15.3}
Acetonitrilo	10 ^{-26.5}
Amoniaco	10 ^{-27.7}
Dimetil formamida	10 ⁻²⁷
Dimetil sulfóxido	10 ^{-33.3}
1-propanol	10 ^{-19.4}
2-propanol	10 ^{-20.8}

La utilidad de conocer la K_i sirve para determinar la magnitud del intervalo de pH en la valoración de compuestos, ya que como en agua disponemos de 14 unidades al cambiar a Dimetil formamida tendremos 27 unidades.

2.1.3.c. Efecto de la constante dieléctrica

La constante dieléctrica de un disolvente es una medida de la facilidad de disociación de un par iónico, en dicho disolvente. En un disolvente de alta constante dieléctrica como el agua (78.5 a 25°C) la fuerza de atracción entre los iones de un par iónico es relativamente pequeña y se mantienen disociados. En disolventes de baja constante dieléctrica como son; etanol, ácido acético, metil isobutil cetona, etiléndiamina existe una tendencia de los iones a presentarse como par iónico (pares de catión-anión), sin disociarse (25). En general mientras mayor sea la constante dieléctrica del disolvente la disociación será mayor. En la tabla 2 se encuentran recopilados algunos disolventes con sus constantes dieléctricas

Tabla 2

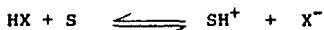
Constantes dieléctricas de varios disolventes determinadas algunas a 25°C y otras a 20°C .

Disolvente	Temperatura (°C)	Constante Dieléctrica
Acetonitrilo	25	36.2
Acido acético	20	6.15
Agua	25	78.54
Benceno	25	2.275
Ciclohexano	25	0.0016
Cloroformo	20	4.806
Etanol	25	24.30
Formamida	20	109.0
Glicerol	25	42.5
Propilen glycol	25	37
Metanol	25	32.63

2.1.4. Efecto nivelador del disolvente

Como se ha mencionado antes, el comportamiento ácido o básico de un disolvente es de suma importancia cuando éste se emplea para proporcionar un medio a un soluto que es ácido o básico. El efecto nivelador o diferenciador de un disolvente se manifiesta cuando el soluto reacciona con el disolvente dependiendo del grado de fuerza relativa de los dos (26).

El efecto nivelador del disolvente se presenta cuando el soluto reacciona por completo con el disolvente. por ejemplo, se tiene un soluto ácido (HX) y un solvente (S) básico. Si la reacción es cuantitativa,



es decir prácticamente todo HX se transforma en SH^+ se dice que el disolvente es nivelador para este ácido, sin embargo resulta imposible comparar la fuerza de dos ácidos en un disolvente nivelador de ambos ácidos, ya que aparecerán como de idéntica fuerza. Este comportamiento se puede observar con los ácidos minerales tales como perclórico, clorhídrico, sulfúrico y nítrico en agua debido a que en ésta se disocian completamente apareciendo como de fuerza idéntica, aunque en realidad son de fuerzas bastante diferentes.

El efecto diferenciador del disolvente se presenta cuando el soluto no reacciona completamente con el disolvente. Esto resulta práctico, para comparar la fuerza de dos ácidos, como es el caso de los ácidos minerales. El grado de la reacción entre un disolvente y un soluto ácido se caracteriza por las constantes de disociación ácidas convencionales (K_a).

2.1.5. Propiedades específicas de algunos disolventes.

2.1.5.a. Para titular Ácidos o bases

1) Acetonitrilo (CH_3CN). Es un excelente disolvente para titular tanto ácidos como bases, pero es necesario purificarlo, para eliminar impurezas ácidas o básicas y debe ser secado para evitar una hidrólisis posterior

2) Acetona (CH_3COCH_3). El solvente grado reactivo se ha encontrado que posee una cantidad de impurezas mínima de tal forma que para una titulación puede ser usado con un blanco, sin necesidad de purificarlo; un gran número de fenoles, ácidos carboxílicos y otros compuestos han sido titulados con resultados satisfactorios en este disolvente

Las bases débiles como anilina ($\text{p}K_b$ en agua 9.4) pueden ser tituladas con exactitud en acetona, utilizando ácido perclórico en dioxano.

3) Alcoholes; Metanol (CH_3OH), Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 2-Propanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$) De estos tres alcoholes el 2-Propanol tiene el mayor rango de potencial, indicando que su constante de autodisociación es también la más pequeña; es el menos volátil y de excelente pureza (grado reactivo). El ácido perclórico y el hidróxido de amonio cuaternario son titulantes estables en este disolvente permitiendo la titulación de una gran variedad de ácidos y bases. En cuanto a los otros disolventes también cuentan con buenas propiedades de solvatación.

4) Mezclas de disolventes. Hay muchas evidencias que hacen pensar que las mezclas de disolventes son superiores en cuanto a un único disolvente en métodos visuales y potenciométricos.

Algunas veces es necesario titular ácidos débiles en una muestra que está en solución acuosa; por adición de un solvente orgánico miscible con agua, la agudeza del punto final puede ser mejorada.

mezclas de glicol-hidrocarburos. Las mezclas de solventes G-H consisten en volúmenes iguales de glycol (etilén o propilenglicol) y un hidrocarburo. Los glycoles tienen buen poder de solvatación para muchos productos y disuelven tanto sales de ácidos carboxílicos como ácidos dicarboxílicos. La adición de 2-propanol o cloroformo para compuestos de alto peso molecular reduce la viscosidad e incrementa la detección para dichas sales, las cuales pueden ser tituladas con ácido perclórico o con ácido clorhídrico en la misma mezcla de disolventes.

2.1.5.b. Para titular ácidos

1) Alcohol ter-butílico. $(\text{CH}_3)_3\text{COH}$. El alcohol ter-butílico es menos ácido que los alcoholes primarios y secundarios, probablemente por el efecto inductivo de los tres grupos metilo sobre el átomo de carbono al cual está unido un grupo hidroxilo. Ácidos tan débiles como el fenol pueden ser titulados en alcohol ter-butílico con buenos resultados.

Los ácidos disueltos en alcohol ter-butílico son generalmente titulados con hidróxido de amonio cuaternario disuelto en cualquier otro disolvente tal como 2-propanol.

2) Dimetilformamida $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$. La Dimetilformamida disuelve a la mayoría de solutos orgánicos usualmente bien, incluyendo muchas sales.

La dimetilformamida se hidroliza parcialmente a ácido fórmico, especialmente cuando el disolvente está en presencia de humedad. Las impurezas ácidas son removidas al pasarla por una columna de intercambio iónico, posteriormente la purificación es llevada a cabo por destilación a presión reducida, preferentemente en atmósfera de nitrógeno.

3) Etiléndiamina $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. La etiléndiamina anhidra es un poderoso disolvente para una gran variedad de ácidos. La titulación de ácidos muy débiles es posible llevarla a cabo en etiléndiamina usando aminoóxido de sodio como titulante; debido a las propiedades básicas tan pronunciadas de la etiléndiamina, que es un disolvente nivelador para la mayoría de ácidos, generalmente es usada para titulaciones diferenciales de mezclas de ácidos. También es altamente corrosiva y requiere de manejo cuidadoso para evitar la contaminación con dióxido de carbono.

2.1.5.c. Para titular bases

1) Acido acético $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$. Disuelve a la mayoría de las bases con facilidad; el punto final esta bien definido tanto visual como potenciométricamente. El disolvente grado reactivo es muy puro y el ácido perclórico preparado en ácido acético es estable por un gran periodo de tiempo. Dado que el ácido acético presenta un efecto nivelador considerable, es poco utilizado para titulaciones diferenciales de bases débiles, por lo cual es mejor utilizar disolventes menos próticos tales como acetonitrilo o acetona.

2) Anhídrido acético $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$. Se ha encontrado que la adición de anhídrido acético a ácido acético, nitrometano y acetonitrilo da mejores resultados en las curvas de titulación para cafeína y otras bases débiles.

Las titulaciones en anhídrido acético pueden ser seguidas potenciométricamente usando electrodos de vidrio y calomel o con indicador visual. El titulante debe ser disuelto en ácido acético porque el ácido perclórico no es estable en anhídrido acético. El anhídrido acético grado reactivo puede ser usado sin purificación posterior.

3) Dioxano, Cloroformo, Tetracloruro de Carbono y otros solventes apróticos, son similares al dioxano y su aplicabilidad para titular bases usando un indicador visual. Estos disolventes sin embargo no son solubles en ácido perclórico y otro disolvente debe ser usado

4) Acido fórmico HCO_2H . El ácido fórmico anhidro es muy inestable e higroscópico, es un disolvente poderoso para materiales que ordinariamente son difíciles de solubilizar. Los grupos ácidos y básicos en polímeros son disueltos por ácido fórmico anhidro, con la adición de 7 volúmenes más de ácido acético y titulados con ácido perclórico

2.1.6. Detección del punto de equivalencia en las titulaciones ácido-base en medio no acuoso.

Es necesario aclarar que el punto de equivalencia es el punto de la titulación en el cual la cantidad del titulante añadido es químicamente equivalente a la cantidad de sustancia titulada; este es un valor totalmente teórico y experimentalmente nunca se puede satisfacer esta condición, debido a la falta de exactitud que se tiene en la medición de las cantidades de los reactivos; lo único que sí se puede determinar experimentalmente es el punto final.

Los procedimientos más utilizados para detectar el final en las titulaciones ácido-base son;

- a. Detección visual por medio de un indicador
- b. Trazo de curvas de titulación

2.1.6. a. Detección visual por medio de un indicador

El uso de un indicador es la manera más rápida, fácil y económica para la detección del punto final en una titulación. Sin embargo no se puede comparar su comportamiento en un sistema acuoso con un sistema no acuoso ya que los intervalos de PH a los cuales cambian de color los indicadores en disolventes no acuosos son diferentes a los correspondientes en agua. Así mismo, como la mayoría de estos compuestos tienen bajas constantes dieléctricas, los indicadores ácido-base existen sólo como par iónico y los equilibrios entre pares iónicos son complicados a causa de las variaciones en las cargas y tipos de carga que exhiben los indicadores en sus diferentes formas. Además todo concepto en la escala se modifica para disolventes diferentes al agua.

La elección del indicador dependerá de la fuerza ácido-base del compuesto a valorar. Para la valoración de bases los indicadores más usados son cristal violeta, violeta de metilo, p-naftol beniceína y verde de malaquita. En la determinación de ácidos están azul de timol. Sin embargo la titulación de bases y ácidos extremadamente débiles no es muy adecuada hacerla por valoración visual, resulta mejor llevarla a cabo potenciométricamente. En la tabla No 3 se muestran algunos indicadores y su rango de pH en donde se observa el cambio de color.

Tabla No 3 Valores de Pka para algunos indicadores
Indicadores ácido-base en agua

Nombre usual	Pk ind	Intervalo de PH	Color	
			Acido	Básico
Rojo de cresol		0.2-1.8	Rojo	Amarillo
Azul de bromofenol	3.8	3.0-4.6	Amarillo	Púrpura
Anaranjado de metilo	3.5	3.1-4.4	Rojo	Amarillo
Fenolftaleína	9.3	8.0-9.8	Incoloro	Rojo violeta
Azul de timol	8.9	8.0-9.6	Amarillo	Azul
Rojo de fenol	7.8	6.4-8.0	Amarillo	Rojo
Rojo de metilo	5.0	4.2-6.2	Rojo	Amarillo
Azul de timol	1.6	1.2-2.8	Rojo	Amarillo
Rojo de cresol	8.1.	7.2-8.8	Amarillo	Rojo

2.1.6. b. Trazo de curvas de titulación

Las curvas de titulación se construyen midiendo la variación de alguna propiedad del sistema que contiene al compuesto por titular en función de la cantidad de titulante añadido .

En este punto solamente se tratarán las curvas de titulación potenciométricas .

Una valoración ácido-base potenciométrica consiste en; la medición del potencial o fem (fuerza electromotriz) desarrollada entre el electrodo de referencia y un electrodo indicador adecuado sensible a la actividad del ion hidrógeno de la solución en función del volumen del valorante agregado.

La forma de las curvas de titulación depende principalmente de la propiedad del sistema que se mide (potencial, absorbancia, etc). El medio en el cual se efectúa la titulación (acuoso o no acuoso) y la naturaleza del compuesto a titular (ácido, base fuerte o débil). Así como de la naturaleza del titulante y sus concentraciones respectivas.

La localización del punto final en este tipo de curvas puede realizarse gráfica o analíticamente por el uso de el método de la tangente, primera y segunda derivada.

En una curva resultante de graficar potencial (pH) en función del volumen de valorante gastado, se encontrará tanto teórica como experimentalmente que un cambio más o menos brusco de pendiente coincide con el punto de equivalencia de la valoración; si la reacción es reversible y equimolar la curva de valoración potenciométrica será simétrica y tendrá la característica forma sigmoidal.

Otro método menos subjetivo para determinar el punto de equivalencia es a través de la primera derivada dPH/dv o dE/dv algunas veces para localizar este máximo se evalúa $\Delta E/\Delta v$ o $\Delta PH/\Delta v$ y se representa en función del volumen. Si en la curva de valoración el punto final coincide con el de inflexión, también debe coincidir con el máximo de la primera derivada.

Otro método parte del hecho de que la segunda derivada que puede ser aproximada por $\Delta^2 PH/\Delta v^2$ o $\Delta^2 E/\Delta v^2$ es igual a cero en el volumen correspondiente al punto de inflexión de la curva.

La evaluación de estas cantidades se realiza fácilmente si se añaden incrementos iguales de valorante en la proximidad del punto final. El punto en donde la función se hace cero y esta se encuentra por interpolación lineal entre dos puntos a ambos lados del cero

2.2. ESPECTROFOTOMETRIA

La espectrofotometría es un método fisicoquímico que consiste en la absorción o emisión de energía radiante

La energía radiante se define como la energía transmitida en forma de radiación electromagnética. Puede ser emitida por sustancias con gran excitación, la cual puede ser producidas por altas temperaturas o descargas eléctricas; esta energía puede ser absorbida, transmitida, reflejada y refractada por muchas sustancias en diferentes estados de agregación (sólido, líquido y gas); si la radiación incidente tiene una longitud de onda apropiada se le considera radiación monocromática de un sólo haz.

2.2.1. Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer-Lambert establece que la concentración de una sustancia en solución es directamente proporcional a la absorbancia A de la solución

La expresión matemática está relacionada con el porcentaje de transmitancia por la siguiente ecuación:

$$A = \log I_0/I = \log 100/T$$

En donde

- I_0 radiación incidente
- I radiación transmitida
- T transmitancia

Las desviaciones con respecto a la ley de Beer se clasifican en tres categorías; reales, instrumentales y químicas

a. Las desviaciones reales

Las desviaciones reales se originan en cambios del índice de refracción del sistema analítico. Se ha encontrado que la ley de Beer es aplicable en forma precisa a concentraciones bajas 10^{-3} M o menos, ya que en estas concentraciones el índice de refracción se considera esencialmente constante y lo mismo sucede con la absorbancia específica.

b. Desviaciones de naturaleza instrumentales.

El monocromador selecciona un haz de radiación de longitud de onda dada por medio de un elemento dispersante (prisma o red de difracción) y una rendija. Sin embargo la banda de radiación puede no ser monocromática por lo que no sería evaluable su intensidad y en consecuencia se debe considerar que sobre la muestra incide un intervalo espectral de anchura finita.

Puesto que la dispersión de un prisma no es lineal con la longitud de onda (la separación de longitudes de onda adyacentes es más eficaz a determinadas longitudes de onda; la anchura de la banda real producida por el monóromador varía con la longitud de onda. Esta variación es diferente para cada instrumento.

c. Las desviaciones químicas

Son causadas por desplazamiento de un equilibrio químico o físico en el que participa la especie absorbente.

Como ejemplo clásico está el dicromato IV el cual absorbe en la región visible a 450 nm. Al diluir una solución de dicromato, el equilibrio se desplaza hacia la izquierda.



El equilibrio puede controlarse convirtiendo toda la especie de cromo (IV) a $\text{Cr}_2\text{O}^{-2}_7$ haciendo que la solución final sea de una concentración 0.1 M en ácido sulfúrico o convirtiendo toda la especie de CrO^{-2}_4 a $\text{Cr}_2\text{O}^{-2}_7$ haciendo que la solución resulte de una concentración final 0.05M en hidróxido de potasio. En este caso se obedece la ley de Beer, si una especie absorbente participa en un equilibrio ácido-base la ley de Beer fallará, a menos que el pH y la fuerza iónica se mantengan constantes. En este caso el pH deberá ajustarse cuando menos 3 unidades más o 3 unidades menos que el valor del Pka del ácido monoprótico

2.2.2. Aplicaciones de la ley de Beer

La absorción de la energía radiante en las regiones espectrales visible y ultravioleta, depende principalmente del número de arreglos de los electrones presentes en las moléculas o iones absorbentes.

La absorción selectiva entre las moléculas orgánicas está relacionada con la localización de los electrones en la molécula. Los compuestos completamente saturados no muestran una absorción selectiva en las regiones de visible y en las accesibles del ultravioleta lejano (195 nm para el etileno)

2.3. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

La cromatografía es una técnica de separación que permite aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos.

Existen tres tipos de cromatografía los cuales se basan en los mismos principios fundamentales y se conocen como: cromatografía en columna, en papel y en capa fina

En este trabajo sólo se considerará la cromatografía en columna

2.3.1. Separación cromatográfica

La separación cromatográfica se lleva a cabo por diferencias en el equilibrio de distribución (K) de los componentes entre dos fases; una estacionaria y la otra móvil. Si C_s y C_m son la concentración en la fase estacionaria y en la fase móvil respectivamente entonces;

$$K = C_s/C_m$$

La migración de las moléculas de los componentes ocurre sólo cuando las moléculas están en la fase móvil. La velocidad de migración de un compuesto es entonces inversamente proporcional al coeficiente de distribución, así los componentes con una alta distribución en la fase estacionaria pueden moverse más lentamente a través de la columna y por lo tanto ser separados de los demás componentes con una menor distribución en la fase

estacionaria. Como se observa entonces la migración diferencial depende de variables experimentales como son; composición de la fase móvil, de la fase estacionaria y la temperatura

En cuanto a las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en la cromatografía líquida cabe citar las siguientes:

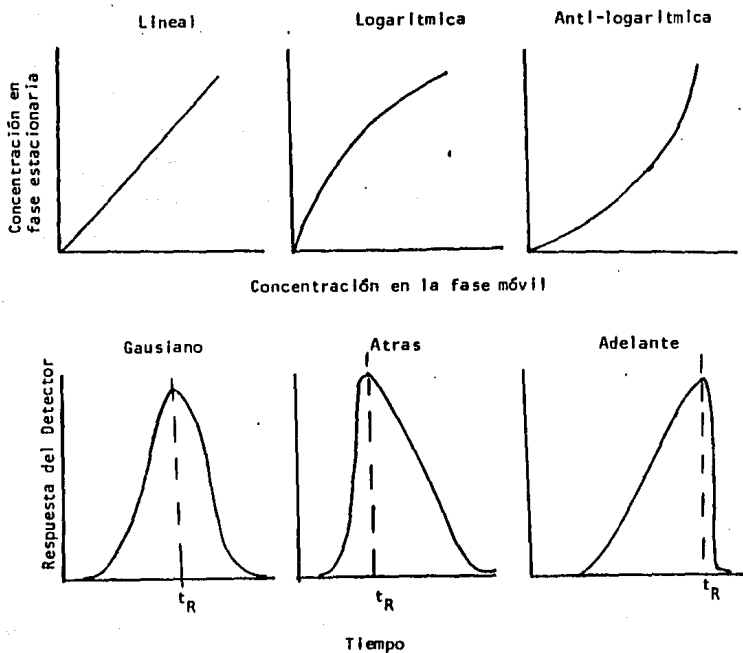
- Disolver la muestra
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado
- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

En la fase estacionaria es necesario considerar lo siguiente;

- Tipo de empaque a utilizar
- Tamaño de partícula
- Uniformidad de tamaños de partícula
- Refinamiento en los procesos de relleno de las columnas

En teoría la elución de un pico con distribución gaussiana en el cromatograma es tomado como una relación lineal entre la concentración de las moléculas de la muestra en la fase estacionaria y la fase móvil (el coeficiente de distribución K es una constante y la isoterma es lineal, bajo estas condiciones el tiempo de retención es independiente del tamaño de muestra. Picos asimétricos son el resultado de isotermas con distribución no lineal como se muestra en la figura 1

Figura 1 muestra el comportamiento gaussiano de una muestra con picos simétricos



Si la muestra es pequeña esta deberá presentar comportamiento gaussiano. De igual manera pueden ser obtenidos en algunos componentes, isotermas no lineales y los tiempos de retención pueden ser invariables

En las condiciones de operación la aparición de un pico simétrico dentro de un cromatograma se considera que, su isoterma de absorción es lineal y la anchura de la base de las señales (W_b) es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de la señal cromatográfica, asumiendo que la forma de la señal es gaussiana esta anchura es aproximadamente igual a cuatro veces el valor de sigma, la distribución gaussiana de valores.

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

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna y se define como el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria y se evalúa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = 16(tr/W_b)^2$$

Donde tr y W_b se expresan en las mismas unidades (tiempo, volumen o distancia) Cuanto mayor sea el número de platos teóricos más eficiente será una columna.

La altura de un plato teórico se representa por;

$$H = L/N$$

Donde L es la longitud de la columna, expresada habitualmente en milímetros, se deduce que H es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si H es pequeño esto se traduce a un mayor número de platos por unidad de longitud.

La resolución de una columna es la medida cuantitativa del grado de separación obtenida entre dos compuestos:

$$R = 2(tr_2 - tr_1) / (W_b2 + W_b1)$$

Un valor de R igual a 1.5 significa separación completa entre dos picos; "tr" es el tiempo de retención y "Wb" es la anchura de la base del pico

La selectividad de un sistema cromatográfico es la relación que existe entre el tiempo de retención de un componente con respecto a otro.

$$\alpha = tr_2 / tr_1$$

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

Aunque la cromatografía de líquidos es en esencia una técnica de separación, también es posible utilizarla para la identificación y cuantificación de compuestos.

La manera de llevar a cabo una identificación es comparando los tiempos de retención de sustancias patrones con los de la sustancia por identificar.

2.3.2. Integración cromatográfica

En el análisis cuantitativo. Al graficar la señal que sale del detector en función del tiempo se obtiene un pico cuya área es proporcional a la concentración de la sustancia que produce ese pico. El área de estos picos se puede integrar de varias maneras los datos resultantes nos ayudan a determinar la concentración exacta de cada componente .

Algunas de las técnicas de integración que se conocen son:

Altura multiplicada por la anchura a la mitad del pico.

Altura de los picos

Planimetría

Triangulación

Integrador electrónico digital

Integrador computarizado

Altura multiplicada por la anchura a la mitad del pico.

Este método consiste en multiplicar la altura real de los picos por la anchura a la mitad de la altura. La manera que se lleva a cabo es la siguiente; Se traza la línea base del pico, se mide la altura desde la línea base, se coloca la escala de medición paralela a la línea base a la mitad de la altura y se mide la anchura del pico en esta posición. No se usa la línea base normal (señal cero) debido a que las colas pueden causar desviaciones grandes.

Altura de los picos.

La medición de la altura de los picos es relativamente simple. Las únicas operaciones que se llevan a cabo en este tipo de medición consisten en medir la línea base y medir la altura. La altura de la muestra no siempre permanece directamente proporcional al tamaño de la muestra, existe un punto en el cual el pico comienza a ensancharse y no incrementa su altura en la misma proporción.

Planimetría.

El pico se traza manualmente con un planímetro, que es un dispositivo mecánico que mide el área al recorrer el perímetro del pico. La planimetría es menos precisa que la integración altura por anchura a la mitad de los picos, pero es bastante adecuada para picos de área pequeña y para áreas grandes e irregulares

Triangulación.

Es una variante de la técnica de integración altura anchura en la cual se trazan tangentes a los lados del pico en los puntos de inflexión y se determina el área del triángulo formado por las tangentes.

Integración electrónica digital.

En este método la señal cromatográfica se alimenta a un convertidor de voltaje-frecuencia que genera una velocidad de impulsos de salida proporcional al área del pico, se acumulan y se encuentran las pulsaciones del convertidor de voltaje-frecuencia. Los requisitos típicos para un integrador digital son; Un intervalo lineal ancho, alta capacidad de velocidad de conteo y circuitos lógicos de detección de picos de sensibilidad versátil.

Integración computarizada.

Desde 1967, los sistemas de datos con computadoras en línea han permitido una automatización completa, adquisición y reducción automática de datos, almacenamiento de métodos de cálculo e impresión de resultados analíticos. Inicialmente la señal cromatográfica se digitaliza por medio de los elementos físicos de un convertidor analógico digital.

Los tres métodos principales para evaluar la composición de la muestra en base a la integración resultante son los siguientes:

- Normalización de áreas
- Calibración externa
- Uso de un patrón interno

Normalización de áreas. Este método se lleva a cabo cuando se tiene un cromatograma en donde todos los componentes han sido separados y todos los picos han sido completamente resueltos se mide el área individual de cada

uno y se divide entre el factor de respuesta para obtener el área calculada del pico. La suma de cada componente individual se obtiene multiplicando el área individual calculada por 100 y se divide entre las áreas calculadas. Este método es útil para el análisis de mezclas complejas.

Calibración externa. Consiste en comparar el área de cantidades conocidas de la sustancia problema con el área obtenida para la misma sustancia en una mezcla, cuya concentración se desea conocer. El procedimiento que se sigue es inyectando cantidades exactas del compuesto problema y se obtienen las áreas de los picos de las cantidades inyectadas. A partir de estos datos se hace una curva de calibración gráficamente concentrando contra el área del pico, la concentración de la sustancia problema en una mezcla se determina con la curva de calibración.

Uso del patrón interno. Consiste en comparar la relación de áreas obtenidas del compuesto problema entre el patrón interno a diversas concentraciones del compuesto problema. Este método es menos susceptible a errores técnicos

2.4. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

Una vez que se ha desarrollado un método analítico es necesario, que a través de estudios experimentales se lleve a cabo su validación para comprobar que el método es confiable en su aplicación analítica .

2.4.1. Clasificación de métodos analíticos

De acuerdo a los requerimientos oficiales (2) de validación los métodos analíticos se han clasificado básicamente en tres categorías;

I Métodos analíticos para cuantificar ingredientes activos (incluyendo conservadores) y otros excipientes en proceso y en productos farmacéuticos terminados

II. Métodos analíticos para determinar compuestos de degradación en productos farmacéuticos, sustancias contaminantes o productos de degradación de un fármaco y se subdivide en a) análisis cuantitativos y b) pruebas límite

III. Métodos analíticos para determinar características físicas (Disolución, liberación del fármaco)

En la tabla 4 se resumen los requisitos esenciales para la validación de cada método.

Tabla 4

parámetros para la validación de cada tipo de método.

Parámetro analítico	Categoría	Categoría		Categoría
	I	II		III
		a)cuantivo	b)límite	
Precisión	si	si	no	si
Exactitud	si	si	*	*
Linealidad	si	si	no	*
Límite de detección	no	no	si	*
Límite de cuantificación	no	si	no	*
Especificidad	si	si	si	*
Rango	si	si	*	*
Tolerancia	si	si	si	si

* Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Antes de iniciar la validación del método analítico se valida el sistema analítico evaluando; linealidad y precisión.

2.4.2. Parámetros de validación

2.4.2.a. Linealidad del sistema

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado.

El intervalo entre las concentraciones a analizar puede ser el mismo que se emplea para la linealidad del método. Para el método volumétrico en lugar de hacer diluciones se pesa la cantidad correspondiente a la concentración indicada en cada nivel y con los datos experimentales a través de un análisis de regresión lineal, se determina la pendiente(a), la ordenada al origen(b) y el coeficiente de correlación(r)

2.4.2.b. Precisión del sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% de la cantidad establecida en linealidad. Para un método volumétrico es imposible titular más de una vez la misma muestra por lo que se debe pesar la cantidad correspondiente a cada nivel de concentración. Se determina el porcentaje de recobro de cada punto y se evalúa mediante el coeficiente de variación(C.V.), el cual deberá ser menor de 1.5%

2.4.2.c. Linealidad del método

Mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal (del tipo $y = bx + a$) en donde $a=0$ y $b=1$

En la práctica Se preparan 6 placebos cargados correspondientes al 70,80,90,100,110 y 120% de la cantidad de fármaco establecida por el método para obtener un total de 12 datos.

Los datos experimentales se grafican de tal forma que la cantidad recuperada está en función de la cantidad adicionada. La forma para determinar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal es a través de una regresión lineal, se calcula r , a , b , así como los límites de confianza al 95 % a cerca de la pendiente y el intercepto.

Empleando la regresión tenemos;

$$Y_{ij} = a + bx_i + \epsilon_j(i)$$

$$j(i) = (Y_i - Y)$$

En donde:

Y_i = cada una de las cantidades recuperadas

Y = cantidad calculada a partir de la ordenada al origen y de la pendiente.

a = es la ordenada al origen

b = es la pendiente

$$a = (\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY) / n(\sum X^2) - (\sum X)^2$$

$$b = n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y) / n(\sum X^2) - (\sum X)^2$$

Se determina la dispersión alrededor de la recta de regresión con el error típico de estimación modificado ($S_{y/x}$) con la siguiente ecuación matemática

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - a(\sum Y) - b(\sum XY)}{n-2}}$$

Basandose en que $S_{y/x}$ es constante para todas las x la regresión es lineal y la distribución de y para cualquier valor de x dado es una distribución normal. La evaluación de a se lleva a cabo con un contraste de hipótesis

$$H_0 = a = 0$$

$$H_a = a \neq 0$$

H_0 = hipótesis nula

H_a = hipótesis alternativa

Inferencia de a (ordenada al origen)

$$t = \frac{a - A}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

Donde:

a = ordenada a partir de datos experimentales

A = valor teórico esperado.

Estimando a con un 95% de confianza, tenemos

$$a + t_{\frac{\alpha}{2}} * S_{y/x} \sqrt{\frac{x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} < a < a + t_{1 - \frac{\alpha}{2}} * S_{y/x} \sqrt{\frac{x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

La evaluación de b se lleva a cabo de la misma manera que A.

$$H_0 = b = 1$$

$$H_a = b \neq 1$$

Inferencia de b (pendiente)

$$t = \frac{b - B \quad S_x \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

Estimando b con un 95% de confianza

$$b - t_{\alpha/2}^* \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < b < b + t_{\alpha/2}^* \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

2.4.2.d. Precisión del método

Se refiere a una medida de la concordancia, de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central. La precisión se divide en reproducibilidad y repetibilidad, la primera es la concordancia respecto a un valor real en un método pero bajo condiciones diferentes y la segunda es la concordancia respecto al valor central entre resultados sucesivos, obtenidos en un método bajo iguales condiciones de trabajo.

* repetibilidad del método analítico

La repetibilidad del método analítico se lleva a cabo con 10 placebos cargados bajo la misma concentración central.

Para inferir la variabilidad a partir de los datos muestrales también se establece un contraste de hipótesis y se emplea el estadígrafo de contraste χ^2 (ji cuadrada)

$$\chi^2_{\text{ calculo}} = \frac{(n-1)S^2}{\sigma^2}$$

Donde :

- n: número de datos
- S: varianza muestral
- σ : varianza poblacional

Se determina el intervalo de confianza del 95% para la estimación de σ con el objeto de evaluar dentro de que límites se localiza el verdadero valor del parámetro mediante la expresión:

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

Esta prueba se lleva a cabo siguiendo para cada una de las muestras las mismas condiciones (mismo analista, calidad de reactivos y equipo) lo que se evalúa es la representatividad del método.

**** reproducibilidad del método analítico.**

Mide o indica la variación de los datos en diferentes condiciones de manejo: analista, equipo, días, efecto de pH

Se maneja a través de una tabla de análisis de varianza empleando un modelo de factores fijos con lo cual se hace

inferencia si la fuente de error es el analista, el día o la interacción. Se prueba la significación de cada fuente contra el error experimental y se valora su importancia relativa cuyo criterio de prueba "F" es el cociente de dos varianzas, la tabla de análisis de varianza se presenta en la tabla No 5

Tabla No 5 ANALISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS		MEDIA DE CUADRADOS		F cal.
D1	1-1	$\sum x_i^2$	$\sum y^2$	$\frac{SC}{d.f.a}$	$\frac{MC}{d.f.a}$	$\frac{MC}{ana-d.f.a}$
		$\sum jk$	$\sum jk$	$\frac{SC}{1-1}$		
Aj	j-1	$\sum x_j^2$	$\sum y^2$	$\frac{SC}{ana}$	$\frac{MC}{ana}$	$\frac{MC}{ana-d.f.a}$
		$\sum ik$	$\sum jk$	$\frac{SC}{j-1}$		
ABij	(i-1)(j-1)	$\sum x_i^2 j$	$\sum x_j^2 i$	$\frac{SC}{ana-d.f.a}$	$\frac{MC}{ana-d.f.a}$	$\frac{MC}{error}$
		$\sum k$	$\sum ik$ $\sum jk$	$\frac{SC}{(i-1)(j-1)}$		
error exp.	$\sum j(k-1)$	$\sum x_i^2 jk$	$\sum y^2 j$	$\frac{SC}{error}$		
		$\sum k$		$\frac{SC}{j(k-1)}$		

2.4.2.e. Exactitud del método analítico

Se entiende por exactitud la concordancia existente entre un valor determinado experimentalmente y su valor real

En la práctica se adicionan cantidades conocidas del compuesto de interés a placebos de la forma farmacéutica y se cuantifican de 6 a 10 muestras con la misma concentración central del 100%.

Para evaluar la exactitud en función de datos experimentales, se hacen inferencias estadísticas empleando pruebas de hipótesis. El procedimiento se basa en verificar si los datos experimentales pertenecen a una distribución teórica cuyo parámetro es el valor real.

Se establece un contraste de hipótesis para determinar que esta técnica sea exacta o no considerando que; el valor real del porcentaje de recobro es 100%

Un estadígrafo de prueba, "t" de student permite determinar lo anterior a partir de los datos muestrales. Dado que contempla en datos experimentales el uso de porcentajes de recobro, la prueba de "t" se expresa como sigue:

$$t_{\text{ calculo}} = \frac{\bar{X} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

En donde:

\bar{X} = Valor promedio de los datos
experimentales

μ = Valor promedio teórico

El criterio para determinar la exactitud del método, con un nivel de significancia de 0.05 y un 95% de confianza, es el siguiente:

Intervalo de confianza

$$\bar{x} \pm t_{0.975} \cdot S/\sqrt{n}$$

2.4.2.f. Especificidad del método analítico

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, si se presentará alguna interferencia por parte de excipientes o productos de degradación esta debe ser menor al 2%.

2.4.2.g. Limite de detección del método analítico.

La menor concentración de muestra analítica la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo condiciones experimentales dadas

2.4.2.h. Rango

Intervalo en el cual los valores del nivel superior al nivel inferior (incluyendo estos dos) han demostrado ser determinantes con la linealidad exactitud y precisión.

2.4.2.i. Tolerancia al sistema

La tolerancia de alguna manera nos da el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el ensayo de la misma muestra, bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, diferentes lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución tipos de empaque (soporte, fase estacionaria), condiciones ambientales etc.

2.5. COMPARACION ESTADISTICA DE DOS METODOS ANALITICOS.

La comparación estadística de dos métodos analíticos alternativos tiene como finalidad demostrar la equivalencia entre esos dos métodos analíticos.

Los procedimientos de comparación incluyen los siguientes criterios como mínimo:

1. Exactitud
2. Linealidad
3. Precisión

2.5.1. Comparación del parámetro exactitud

La comparación de la exactitud de dos métodos se lleva a cabo con respecto a la desviación estándar

Se establece un contraste de hipótesis donde en la hipótesis nula se considera que el valor promedio de un método es igual al valor promedio del otro y una hipótesis alternativa la cual propone que el valor promedio de un método no es igual al valor promedio del otro.

Para comprobar lo anteriormente dicho se emplea el estadígrafo de contraste "t" de student

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_{Z1} - \bar{x}_{Z2}}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad S_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Donde:

\bar{x}_{x1} : Valor del porciento de recobro del método de referencia

\bar{x}_{x2} : Valor promedio del método contra el que se compara

S_1 : Desviación estándar muestral del método de referencia

S_2 : Desviación estándar del método contra el que se compara

n_1 : Número de muestras del método de referencia

n_2 : Número de muestras del método contra el que se compara

El criterio de aceptación para considerar que los métodos poseen exactitud equiparable con un 95% de confianza y, $\alpha = 0.05$ es:

$$t \text{ cal} < t_{1-\alpha/2}$$

$$t \text{ cal} > t_{\alpha/2}$$

con los siguientes grados de libertad

$$gl = \frac{s_1^2 / n_1 + s_2^2 / n_2}{s_1^2 / n_1 + 1 + s_2^2 / n_2 + 1}$$

Si pasa el criterio de aceptación entonces se establecen los límites al 95% de confianza;

$$(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}$$

2.5.2. Comparación del parámetro linealidad

Se lleva a cabo contrastando la pendiente de cada método, con una prueba de hipótesis, se establece a través de la hipótesis nula que la pendiente del método de referencia sea igual a la del método contra el que se compara y en la hipótesis alternativa se dice que la pendiente de ambos métodos es diferente

$$H_0 \quad b_1 = b_2$$

$$H_a \quad b_1 \neq b_2$$

El estadígrafo de prueba que permite determinar lo anterior es la "t" de student

$$t_{cal} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{S_{y/x} + S_{y/x} \left[\frac{1}{EX_1^2 - \frac{(EX_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{EX_2^2 - \frac{(EX_2)^2}{n_2}} \right]}}$$

El criterio de aceptación es el siguiente;

$$t_{tab}(1-\frac{\alpha}{2}) \leq t_{cal} \leq t_{tab} \frac{\alpha}{2}$$

2.5.3. Comparación del parametro precisión.

La comparación de dos métodos diferentes para precisión se hace comparando su repetibilidad (enfrentando sus varianzas) a través de una prueba de hipótesis.

$$\begin{aligned} H_0 & \sigma_1 = \sigma_2 \\ H_a & \sigma_1 \neq \sigma_2 \end{aligned}$$

Se emplea el estadístico "F" con n-2 grados de libertad y un 95% de confianza

$$F = \frac{S^2_1}{S^2_2}$$

En donde;

S_1 : Varianza del método de referencia

S_2 : Varianza del método contra el que se compara

El criterio de aceptación es el siguiente;

$$F \text{ cal} < F_{1-\alpha/2}$$

con n_1-1/n_2-1 grados de libertad .

Area de aceptación:

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

Si esto se cumple se dice que los métodos poseen una repetibilidad semejante.

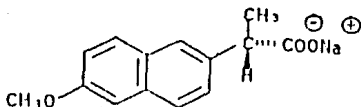
2.6 MONOGRAFIA

2.6.1 Descripción

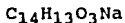
4.6.1.a. Nombre Químico

- 1). Sal de sodio del ácido d-2-(6-metoxi-2-naftil) propionico
- 2). Sal de sodio del ácido (2s) -2-(6-metoxi-2-naftil) propionico
- 3). Sal de sodio del ácido (+)-6-metoxi- α -metil-2-naftalen acético
- 4). - Sodio 2-(6-metoxi-2-naftil) propionato
- 5). Naproxén Sódico

4.6.1.b. Estructura molecular



2.6.1.c. Fórmula molecular



2.6.1.d. Peso molecular

252.25 g/mol

2.6.1.e. Apariencia

Polvo cristalino, o cristales de color blanco, untuoso al tacto

2.6.2. Propiedades físicas

2.6.2.a. Solubilidad

Muy soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en etanol, poco soluble en acetona, y prácticamente insoluble en cloroformo, tolueno y benceno

2.6.2.b. Rango de fusión

Naproxén Sódico funde a aproximadamente de 245.5 a 250°C

2.6.2.c. Espectro Infrarrojo

El espectro de absorción infrarrojo de Naproxén Sódico en una dispersión de bromuro de potasio exhibe los siguientes datos espectrales

Longitud de onda cm ⁻¹	Asignación
1260	Eter metílico aromático
1600,1625	Dobles enlaces aromáticos
1725	Carbonilo, Carboxilato

2.6.2.d. Espectro Ultra Violeta

El espectro ultravioleta de un estándar de referencia, de una solución 1 en 50,000 de hidróxido de sodio 0.1N en metanol presenta un máximo de absorción a 272 nm (E1% 215.7) y otros a 262, 316 y 340 nm los cuales son debidos al anillo sustituido de naftaleno

2.6.2.e. Rotación Especifica

La rotación específica de Naproxén a 25°C en una solución al 1% en cloroformo es de +63.0 y +68.5° y la rotación de la sal de sodio (Naproxén Sódico) en agua es de + 140

2.6.3. Farmacología y farmacocinética

En general los agentes antiinflamatorios no esteroideos actúan inhibiendo la biosíntesis de prostaglandinas, las cuales aparte de ser mediadores de la inflamación, pueden causar fiebre, hiperalgesia vaso dilatación, incremento en la permeabilidad vascular.

Naproxén Sódico puede también presentar efectos antiinflamatorios por otros mecanismos que no sean la inhibición en la producción de prostaglandinas

Naproxén Sódico es rápida y completamente absorbido al tracto gastrointestinal, se enlaza a proteínas plasmáticas y presenta una gran afinidad por las albúminas. El fármaco es uniformemente distribuido por todo el tejido pues no tiene sitio selectivo. Es excretado principalmente en orina bajo las siguientes proporciones; 10% intacto, 60% conjugado, 27% en metabolitos biológicamente inertes

2.6.4. Almacenaje

Datos de estabilidad indican que Naproxén Sódico es térmicamente estable, ligeramente sensible a la luz e higroscópico. Este debe ser almacenado a temperatura ambiente protegido de la luz y con un agente desecante activado.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la necesidad de la industria, de acelerar el proceso de fabricación de Naproxén Sódico en cápsulas; es necesario desarrollar y validar un método analítico, que permita cuantificar el Naproxén Sódico de una manera más rápida, y así mantener los límites de principio activo durante el proceso de fabricación de dicho medicamento.

Actualmente durante la etapa de granulación del medicamento antes mencionado; El Naproxén Sódico debe ser cuantificado por espectrofotometría o por cromatografía de líquidos de alta resolución; métodos que requieren de un tiempo considerable de análisis y un costo elevado, dadas las propiedades fisicoquímicas del Naproxén Sódico es posible cuantificarlo mediante una valoración ácido-base como método de rutina durante el proceso del mencionado producto.

4. OBJETIVOS

- A. Desarrollar un método analítico por volumetría que permita cuantificar de una manera rápida y confiable Naproxén Sódico en granulado**
- B. Validar el método desarrollado**
- C. Comparar estadísticamente el método analítico desarrollado contra los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotométrico existentes en el laboratorio**

5. HIPOTESIS

En base a la estructura química del Naproxén Sódico es posible detectar uno o varios grupos funcionales que a través de una reacción química del tipo ácido-base puedan ser cuantificados de manera rápida por volumetría.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. MATERIAL Y EQUIPO EMPLEADO

6.1.1. Material

La lista de material que a continuación se presenta corresponde tanto al material ocupado para el desarrollo del método como para su validación y comparación con los otros métodos alternativos.

- 2 Dispensadores de vidrio con capacidad de 1 litro graduado en mililitros marca Cole-Parmer o equivalente.
- 1 Dispensador de vidrio con capacidad de 1lt, graduado en decimas de mililitro marca Coleparme o equivalente.
- 15 Embudos de filtración rápida
- 1 Frasco gotero con capacidad de 30 ml
- 1 Gradilla para tubos de ensayo
- 18 Matraces volumétricos de 50 ml
- 18 Matraces volumétricos de 10 ml
- 1 Matraz volumétrico de 1000 ml
- 18 pipetas pasteur
- 1 pipeta graduada de 10 ml
- 1 pipeta graduada de 2 ml
- 30 tubos de ensayo de 200 mm x 16 mm con tapón de rosca
- 15 tubos de ensayo de 120 mm X 12 mm
- 1 vaso de precipitado de 100 ml
- papel filtro Wathman No 42

6.1.2. Equipo

Cronómetro marca Heuer o equivalente

Baño de ultrasonido marca Branson modelo B-52 o equivalente

Espectrofotómetro Hewlett packard con arreglo de diodos modelo 8451-A o equivalente

Celdas de cuarzo de 0.1cm

Cromatógrafo de líquidos marca Waters equipado con Bomba Waters modelo 6000 A y Detector ultravioleta modelo 440, Inyector automático modelo 712D e integrador modelo 3390 A.

6.1.3. Reactivos

Metanol reactivo analítico marca Merck o equivalente.

Acido clorhídrico reactivo analítico marca J.T.Baker o equivalente

Anaranjado de metilo reactivo analítico marca Merck o equivalente

Naproxén sódico estándar secundario de referencia interna

Benzocaina estándar primario de referencia interna

6.2. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

En el desarrollo del método analítico se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. pruebas de solubilidad
2. Elección del agente titulante
3. Elección del indicador
4. Determinación cuantitativa de muestras de Naproxén Sódico

6.2.1. Pruebas de solubilidad

Para las pruebas de solubilidad se empleó la cantidad de 1000 mg de Naproxén Sódico estándar secundario de referencia. También se utilizó 110.45 mg de placebo los dos se enfrentaron a los mismos disolventes, con la finalidad de establecer en que disolvente se solubiliza la materia prima y si los excipientes o placebo permanecen insolubles en este disolvente

Los disolventes empleados son agua, metanol, etilén-glicol, isopropanol, ácido acético, acetonitrilo, dioxano cloroformo y metil etil cetona

El criterio para determinar la solubilidad se tomó de la USP XXI pag 7. Estableciendo para cada término los símbolos que se presentan en la tabla No 6

Tabla 6

Terminología empleada para denominar la solubilidad de las muestras.

Termino	Simbolo
Muy soluble_____	++++
Fácilmente soluble_____	+++
Soluble_____	++
Poco soluble_____	+
Ligeramente soluble_____	-
muy ligeramente soluble_____	--
Casi insoluble_____	---

6.2.2. Elección del agente titulante

Se probó como posible agente titulante; ácido clorhídrico a diferentes concentraciones 0.5N, 0.2N y 0.1N en diferentes solventes tal como se indica en la tabla 7

Tabla No 7

Disolventes y concentraciones (normalidad) elegidas para la preparación de ácido clorhídrico como agente titulante

Ac clorhídrico

Concentración/ Disolvente	0.5N	0.2N	0.1N
Agua	X	X	
Metanol		X	X
Etilenglicol- Metanol	X		X

6.2.2.a. Preparación de ácido clorhídrico 0.5N
en agua

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar un volumen aproximado de 200 ml de agua destilada y adicionar cuidadosamente 43 ml de ácido clorhídrico, agitar suavemente y aforar la solución al volumen. Estandarizar la solución de la siguiente manera.

Pesar aproximadamente 800 mg de carbonato de sodio anhidro el cual ha sido previamente secado a 270°C por una hora. Disolver este en 100 ml de agua y adicionar 2 gotas de rojo de metilo (solución indicadora) adicionar el ácido contenido en una bureta lentamente y agitar constantemente

hasta que la solución tome un color rosa pálido. Calentar la solución a ebullición y dejar enfriar a temperatura ambiente, si el color de la solución desaparece continuar titulando hasta que por efecto de aplicación de calor no desaparezca el color

6.2.2.b. Preparación de ácido clorhídrico 0.2 N en agua

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar un volumen aproximado de 200 ml de agua destilada y adicionar cuidadosamente 17.2 ml de ácido clorhídrico, agitar suavemente la solución y aforar al volumen con agua destilada Estandarizar la solución como sigue:

Pesar aproximadamente 320 mg de carbonato de sodio anhidro el cual ha sido previamente secado a 270°C por una hora disolverlo en 100 ml de agua destilada, adicionar 2 gotas de rojo de metilo y titular el ácido contenido en una bureta con agitación constante hasta que la solución tome un color rosa pálido calentar la solución a ebullición y dejar enfriar a temperatura ambiente, si el color desaparece continuar titulando y calentando hasta que por efecto de aplicación de calor no desaparezca el color

6.2.2.c. Preparación de ácido clorhídrico 0.2N en metanol

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar 16 de agua destilada y cuidadosamente adicionar 17 ml de ácido clorhídrico, agitar suavemente y adicionar metanol al volumen. Estandarizar la solución como se indica en 5.2.2.b

La preparación de este mismo ácido bajo la concentración de 0.1 N se hace de la misma forma descrita para la preparación y estandarización de ácido clorhídrico 0.5N, solamente se cambia la cantidad adicionada de ácido clorhídrico por 8.6 ml.

6.2.2.d. Preparación de ácido clorhídrico 0.5N
en metanol/etilenglicol.

1) Mezcla etilenglicol-metanol

En un matraz de 2000 ml mezclar 1000 ml de etilenglicol con 1000 metanol, homogenizar perfectamente la mezcla, agitar antes de usarse

Procedimiento

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar un volumen aproximado de 200 ml de la mezcla etilenglicol-metanol adicionar 43 ml de ácido clorhídrico, mezclar suavemente y aforar al volumen, estandarizar la solución como sigue:

Pesar aproximadamente 800 mg de carbonato de sodio anhidro el cual ha sido previamente secado a 270°C por una hora. Disolverlo en 100 ml de agua destilada, adicionar 2 gotas de rojo de metilo y titular el ácido clorhídrico con agitación constante hasta que la solución tome un color rosa pálido. Caliente a ebullición y deje enfriar a temperatura ambiente, si el color de la solución desaparece continuar titulando y calentando hasta que el color no desaparezca por efecto de ebullición

La preparación de ácido clorhídrico 0.1N se lleva a cabo de la misma forma solamente se modifica la cantidad de ácido clorhídrico por 8.6 ml

6.3. ELECCION DEL INDICADOR

Se probaron tres indicadores; Rojo de metilo, Anaranjado de metilo y Azul de timol. La titulación se llevo a cabo potenciométricamente en presencia del indicador para de esta manera elegir el mejor indicador para la titulación

6.3.1. Preparación de los indicadores

6.3.1.a. Rojo de metilo

Disolver 100 mg de rojo de metilo R.A. en 100 ml de alcohol etílico y filtrar si es necesario.

6.3.1.b. Anaranjado de metilo

Disolver 100 mg de anaranjado de metilo R.A. en 100 ml de alcohol etílico y filtrar si es necesario

6.3.1.c. Azul de timol

Disolver 100 mg de azul de timol R.A. en 100 ml de alcohol etílico y filtrar si es necesario

Una vez diseñado el método analítico se procedió a validar el sistema de titulación y el método analítico.

6.4. VALIDACION

En la validación del método analítico se validaron los siguientes puntos

1. Linealidad del sistema
2. Precisión del sistema
3. Linealidad del método
4. Precisión del método
 - a) repetibilidad
 - b) reproducibilidad
5. Exactitud del método
6. Especificidad del método
7. Límite de detección
8. Rango

6.5. VALIDACION DE METODOS ALTERNATIVOS

La validación de los métodos analíticos alternativos solamente se realizó sobre los siguientes parámetros ;

1. Linealidad
2. Precisión
3. Exactitud

6.5.1. Método espectrofotométrico

El método espectrofotométrico consiste en prepara una solución estándar de concentración conocida y una solución problema de concentración semejante a la solución estándar, ambas muestras se tratan igual y se determina la absorbancia de las dos a 332 nm.

Procedimiento.

Metanol acidulado: Mezclar 99 ml de metanol R.A. y 1 ml de ácido clorhídrico concentrado R.A.

Solución estándar:

Pesar 10 mg de Naproxén Sódico en un matraz volumétrico de 50 ml, diluir y aforar con metanol acidulado (concentración 0.2 mg/ml).

Solución problema

Pesar 11.1 mg de granulado (equivalente a 10 mg de Naproxén Sódico) transferirlo a un matraz volumétrico de 50 ml disolver con 25 ml de metanol acidulado y llevar a ultrasonido por 10 minutos, dejar que alcance la temperatura ambiente y aforar con metanol acidulado.

La solución estándar y la solución problema se leen en un espectrofotómetro a 332 nm utilizando una celda de cuarzo de 1 cm .

6.5.2. Metodo de Cromatografía de líquidos

Este método consiste en preparar una solución estándar y una solución muestra con la adición de un mismo estándar interno y bajo las mismas concentraciones

Procedimiento

Solución de estándar interno

Pesar 750 mg de benzocaina estándar de referencia interno y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml disolver y aforar con metanol R.A.

Estándar externo de calibración

Pesar 10 mg de Naproxén Sódico estándar primario de referencia, disolver con 5 ml de metanol, adicionar 2 ml de solución de estándar interno y llevar a un baño de ultrasonido por 5 minutos, dejar a temperatura ambiente y aforar con metanol R.A.

Solución problema

Pesar 11.1 mg de granulado, disolver con 5 ml de metanol R.A., adicionar 2 ml de solución de estándar interno y llevar a un baño de ultrasonido por 5 minutos, dejar a temperatura ambiente y aforar con metanol R.A., filtrar en papel Whatman del No 42.

De la solución filtrada y del estándar de referencia externo inyectar 5 microlitros bajo las siguientes condiciones:

Fase móvil:	acetonitrilo-agua pH 2.75 (40:60)
Sensibilidad:	0.1 AUF
Vel de flujo:	1.4 ml/min
Vel de carta:	0.2 cm/min

6.6 . COMPARACION ESTADISTICA

Para efectuar la comparación estadística entre el método volumétrico y el de cromatografía de líquidos y espectrofotométrico, se procedió a validar de los métodos alternativos los siguientes parámetros

1. Linealidad
2. Precisión
3. Exactitud

7. RESULTADOS

7.1. DISEÑO DEL METODO ANALITICO

ETAPA I

Evaluación de la solubilidad para Naproxén Sódico estándar secundario de referencia y placebo

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8

Tabla No 8 .

Solubilidad obtenida para Naproxén Sódico y placebo

Disolvente	Sustancia	
	Naproxén Sódico	Placebo
Agua	+++	---
Etanol	-	---
Etilénglicol	++	---
Isopropanol	---	---
Metanol	+++	---
Ac acético	++	---
Acetonitrilo	---	---
Dioxano	---	---
Cloroformo	---	---

Nota: La simbología utilizada se encuentra reportada en la tabla No 6.

ETAPA 2**Elección del agente titulante**

Se titularon tres muestras de estándar con una pureza de 100.2% y tres muestras de granulado, potenciométricamente, bajo cada tratamiento establecido en la tabla 7. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 9 a la 13 y de la figura 2 a la 5.

a. Acido clorhídrico en agua

Tabla 9

Porcentaje de recobro de muestras tituladas con ácido clorhídrico empleando agua como disolvente.

	0.5N	0.2N
Naproxén	99.94	98.37
Sódico	98.97	98.14
	98.35	99.12
Granulado	99.50	99.19
	98.43	98.98
	95.46	98.56

b. Acido clorhidrico en metanol/etilenglicol

Tabla 10

Porcentaje de recobro para muestras tituladas con ácido clorhidrico en metanol/etilenglicol 50:50 como disolvente.

	0.5	0.1
Naproxén	102.20	101.13
Sódico	102.27	101.93
	101.97	101.89
Granulado	102.77	101.63
	101.12	102.25
	101.92	102.22

c. Acido clorhidrico en metanol

Tabla 11

Porcentaje de recobro para muestras tituladas con ácido clorhidrico empleando metanol como disolvente

	0.2 N	0.1N
Naproxén	100.60	100.98
Sódico	99.99	101.082
	101.89	100.30
Granulado	101.86	100.18
	100.27	100.29
	99.12	99.24

d. Curvas de titulación potenciométrica

Curvas de titulación potenciométrica para muestras de granulado tituladas con ácido clorhídrico 0.2N y 0.1N

Tabla 12

Titulación potenciométrica para cuantificar muestras de granulado con ácido clorhídrico 0.2N en metanol.

Δv	V	P.H	mv	Δmv	$\Delta mv / \Delta v$
	0	9.52	-93		
0.2	0.2	8.19	-62	31	155
0.2	0.4	7.98	-50	12	60
0.2	0.6	7.77	-38	12	60
0.2	0.8	7.58	-28	10	50
0.2	1	7.37	-16	12	60
0.2	1.2	7.29	-12	4	20
0.2	1.4	7.16	-4	8	40
0.2	1.6	7.11	-1	3	15
0.2	1.8	7.03	2	1	5
0.2	2.0	6.96	6	4	20
0.2	2.2	6.88	11	5	25
0.2	2.4	6.82	14	3	15
0.2	2.6	6.76	17	3	15
0.2	2.8	6.68	22	5	25
0.2	3	6.62	26	4	20
0.2	3.2	6.55	29	3	15
0.2	3.4	6.47	34	5	25
0.2	3.6	6.40	38	4	20
0.3	3.9	6.30	43	5	16.6
0.1	4.0	6.25	46	3	30
0.2	4.2	6.16	51	5	25
0.2	4.4	6.06	57	6	30
0.2	4.6	5.95	63	6	30
0.2	4.8	5.85	68	5	25
0.2	5.0	5.69	78	10	50
0.1	5.1	5.58	84	6	60
0.1	5.2	5.46	90	6	60
0.1	5.3	5.28	100	10	100
0.1	5.4	4.13	165	65	654
0.1	5.5	1.57	309	144	1440
0.1	5.6	0.82	351	42	420
0.1	5.7	0.62	359	3	80

Tabla 13
 Titulación potenciométrica para una muestra de granulado
 con ácido clorhídrico 0.1N en metanol.

Δv	v	PH	mv	mv	$\Delta mv/\Delta v$
	0	9.05	- 120		
1	1	7.83	- 47	73	73
1	2	7.47	- 25	22	22
1	3	7.24	- 12	13	13
1	4	7.05	0	12	12
1	5	6.87	10	10	10
1	6	6.71	19	9	9
1	7	6.55	29	10	10
1	8	6.48	33	4	4
1	9	6.13	54	21	21
1	10	5.75	77	23	23
0.1	10.1	5.72	79	2	20
0.1	10.2	5.76	82	3	30
0.1	10.3	5.60	86	4	40
0.1	10.4	5.57	87	1	10
0.1	10.5	5.49	92	5	50
0.1	10.6	5.38	99	7	70
0.1	10.7	5.18	111	12	120
0.1	10.8	5.02	120	9	90
0.1	10.9	4.77	135	15	150
0.1	11	2.41	275	140	1440
0.1	11.1	2.09	295	20	200
0.2	11.3	1.85	310	15	75
0.2	11.5	1.54	328	18	90
0.5	12	1.23	346	18	36
0.5	12.5	1.07	356	10	20
0.5	13	0.96	362	6	12
1.1	14.1	0.91	367	5	4.54
1.2	15.3	0.73	376	9	7.5
0.7	16	0.70	379	3	4.28
1	17	0.67	380	1	1
1	18	0.64	381	1	1

ETAPA 3

Selección del indicador adecuado.

Se titularon muestras de materia prima y granulado potenciométricamente en presencia del indicador. Se encontró que el indicador más adecuado fué anaranjado de metilo.

Figura 2 Curva de titulación potenciométrica del tipo PH
 contra volumen para Naproxén Sódico, titulado con
 ácido clorhídrico 0.1N en metanol..

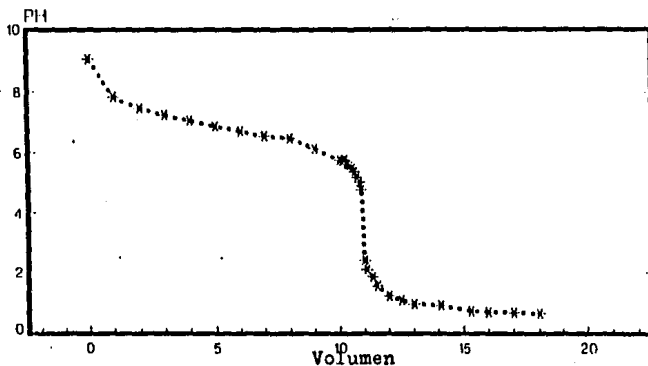


Figura 3 Curva de titulación potenciométrica del tipo
 mv contra Volumen para Naproxén Sódico, titulado
 con ácido clorhídrico 0.1N en metanol.

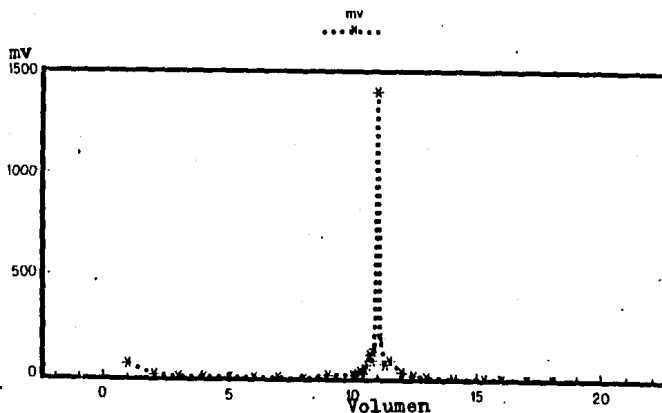


Figura 4 Curva de titulación potenciométrica del tipo PH contra Volumen para Naproxén Sódico, titulado con ácido clorhídrico 0.2N en metanol.

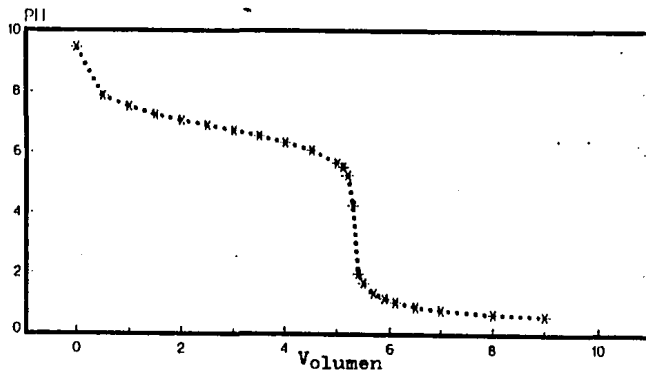
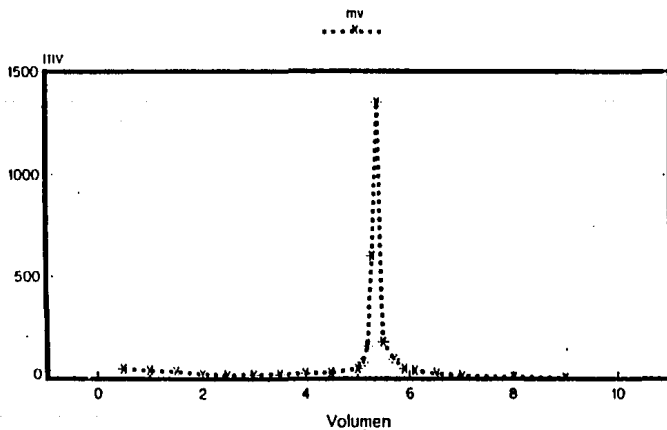


Figura 5 Curva de titulación potenciométrica del tipo mv contra Volumen para Naproxén Sódico, titulado con ácido clorhídrico 0.2N en metanol.



7.1.1. METODO ANALITICO

Después de obtener el mejor disolvente, agente titulante, indicador y condiciones óptimas para la titulación el método quedo establecido de la siguiente manera:

Procedimiento

El granulado se disuelve en metanol, se le agrega anaranjado de metilo como indicador y se titula con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N en metanol.

Solución indicadora de anaranjado de metilo.

Pesar 100 mg de anaranjado de metilo, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y aforar con metanol R.A., filtrar si es necesario.

Solución Problema

Pesar alrededor de 306.5 mg (equivalente a 275 mg de (Naproxén Sódico) y transferirlo cuantitativamente a un tubo de ensayo. Adicionar 8 ml de metanol R.A. Tapar y agitar vigorosamente durante 1 minuto. Adicionar 2 ml más de metanol R.A. lavando las paredes del tubo de ensayo. Adicionar 20 gotas de anaranjado de metilo y agitar. Adicionar 10 ml de ácido clorhídrico 0.1N y agitar. Adicionar lentamente volúmenes de 0.1 ml de ácido clorhídrico agitando después de cada adición, hasta obtener un color anaranjado, el cual se debe mantener constante por lo menos 30 segundos.

Para obtener el porcentaje de Naproxén Sódico en la muestra realizar el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Naproxén Sódico} = \frac{N \times V \times We}{W \times F} \times 100$$

con las siguientes unidades

$$\% \text{ Naproxén Sódico} = \frac{\text{meq/ml} \times \text{ml} \times \text{mg/meq}}{\text{mg} \times \text{mg/mg}}$$

Donde:

N = Normalidad del ácido clorhídrico

V = Volumen gastado de ácido clorhídrico

We = Peso equivalente de Naproxén Sódico
(252.25 g/eq)

W = Peso de la muestra

F = Gramos de Naproxén Sódico en un gramo de
granulado. (0.89723)

7.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

7.2.1. Linealidad del sistema

Se determinó la respuesta del sistema con una curva estándar de calibración de 70 a 120 % de la concentración establecida en el método. Los resultados se encuentran en la tabla 14 y figura 6

Tabla 14

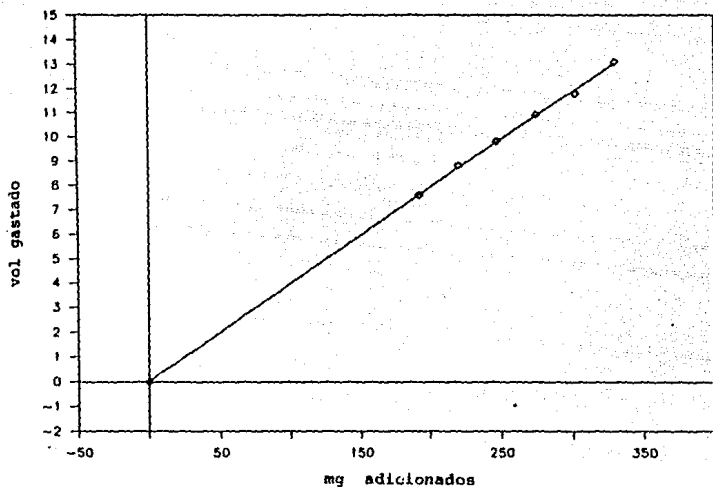
Linealidad del sistema

mg adicionados	volumen gastado
192.16	7.6
192.44	7.6
220.52	8.8
221.23	8.8
247.54	9.8
247.10	9.8
275.42	10.9
275.18	10.9
302.20	11.8
302.66	11.8
330.50	13.1
330.52	13.1

Pendiente (b) = 0.0390

Intercepto (a) = 0.1285

Coefficiente de regresión (r) = 0.9993

figura 6**Linealidad del sistema**

Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida por el sistema de titulación.

7.2.2. Precisión del sistema

Se determinó titulando 6 estándares al 100%. De los cuales se calculó, el porcentaje de recobro. Los resultados se muestran en la tabla 15

Tabla 15

Precisión del sistema de titulación

----- % de recobro -----
101.074
100.37
100.18
100.30
101.08
100.13

Promedio (X) = 100.52%

Desviación estándar (S) = 0.4379

Coefficiente de variación (C.V.) = 0.4356

C.V. = X/S

Como el C.V. < 1.5 % se considera que el sistema es repetible.

7.2.3. Linealidad del método

Se determinó con 12 placebos cargados, empleando las concentraciones 70 a 120% de la concentración establecida en el método. Los resultados se encuentran en la tabla 16 y figura 7

Tabla 16

Linealidad del método volumétrico

mg adicionados	mg recuperados
192.61	192.50
192.15	192.50
220.24	220.36
220.43	220.36
247.50	248.22
247.37	248.22
275.40	276.09
275.50	276.09
302.30	303.95
302.34	298.95
330.32	329.28
330.50	329.28

$$a = 2.3886$$

$$b = 0.9905$$

$$r = 0.9997$$

$$S_{y/x} = 1.2880$$

Inferencia de a

$$H_0 a = 0$$

$$H_a a \neq 0$$

$$T_{cal} = 1.138$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

1.1338 < 2.22., por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen considerada como cero.

Intervalo de confianza al 95%

Límite inferior (L.I.) -2.2882

Límite superior (L.S.) 7.06553

Inferencia de b

$$H_0 b = 1$$

$$H_a b \neq 1$$

$$T_{cal} = -1.191$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

-1.191 < 2.22, por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a 1

Intervalo de confianza al 95%

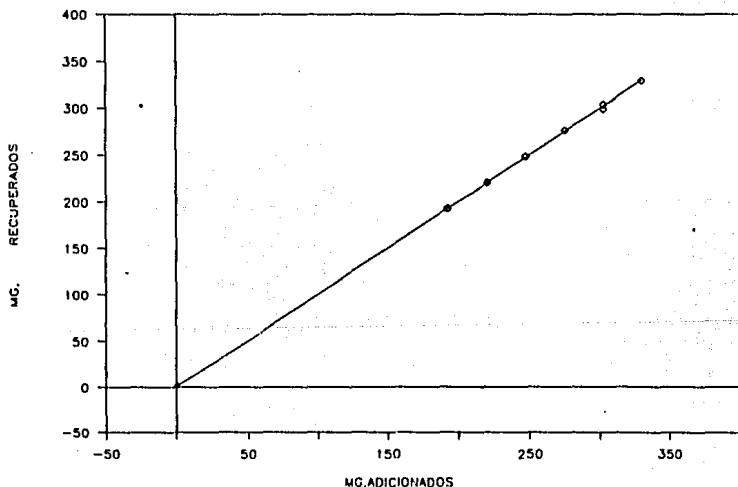
L.I. 0.98261

L.S. 0.99856

La figura 7 muestra la gráfica de regresión lineal obtenida para el método volumétrico.

Figura 7

Linealidad del método volumétrico



Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida por el método de titulación.

7.2.4. Exactitud del método

Se cuantificaron 10 muestras bajo la misma concentración central del 100%. Se determinó el porcentaje de recobro para cada muestra. Los resultados se encuentran en la tabla 17

Tabla 17

Resultados en porcentaje de recobro para la exactitud del método volumétrico.

% recobro
99.34
101.27
100.32
100.22
100.38
99.39
99.44
100.27
100.37
100.33

$$\bar{X}_3 = 100.13$$

$$S_3 = 0.5935963$$

$$T \text{ cal} = \frac{X_3 - 100}{S_3 / \sqrt{n}} = 0.708533$$

$$T \text{ tab} = 2.26$$

Criterio de aceptación

Tcal < Ttab
0.7085 < 2.26,

Intervalo de confianza al 95 %

L.I. = 99.98
L.S. = 100.26740

7.2.5. Precisión del método

Para la precisión se llevo a cabo la repetibilidad y reproducibilidad del método. Los resultados se encuentran en las tablas 18, 19 y 20.

Repetibilidad

Se llevó a cabo con 10 placebos cargados empleando la misma concentración para todos. Se tomó el porciento de recobro de cada dato experimental para cálculos.

Tabla 18

Resultados en por ciento de recobro para determinar la repetibilidad del método de titulación.

 % de recobro

100.34

100.27

100.32

100.22

100.38

99.39

99.44

100.27

100.37

100.33
 -----Ho $\sigma = 1.5$ Ha $\sigma \neq 1.5$ $\bar{X}\% = 100.13$ $S\% = 0.5935963$

$$X_i \text{ cal} = \frac{(n-1)(S\%)^2}{(\sigma)^2}$$

 $X_i \text{ cal} = 1.4094267$ $X_i \text{ tab}_{(n-1 \text{ gl})} = 19.023$

Criterio de aceptación

Xi cal < Xi tab
1.4094 < 19.023

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7.2.6. Reproducibilidad del método

Se realizó por medio de una tabla de análisis de varianza y empleando modelo de factores fijos se determina si existe efecto por analista, día, o por la interacción analista-día. Los resultados se encuentran reportados en la tabla 19 y 20

Tabla 19

Resultados en por ciento de recobro para determinar la especificidad del método por titulación

	D 1	D 2
A.1	100.366	99.397
	100.356	100.311
	100.366	100.324
A.2	100.442	100.389
	100.294	99.458
	100.347	99.364

Donde:

A = Analista

D = Día

Tabla 20

Análisis de varianza para determinar la precisión del método por titulación

Fuente de error	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de Cuadrados	Fcal	Ftab
Analista	1	0.0568	0.0586	1.02158	161.4
Día	1	0.7143	0.7143	12.847	161.4
Analista-Día	1	0.0556	0.0556	0.3690	5.32
Error	8	1.21833	0.15229		

Criterio de aceptación.

	F cal	F tab
Analista	1.02158	< 161.45
Día	12.847	< 161.45
Analista-Día	0.36090	< 5.32

7.2.7. Especificidad del método analítico

Se enfrento a los excipientes de la formulación contra el método analítico. Los resultados se muestran en la tabla 21

Tabla 21

Resultados en porciento de respuesta para determinar la especificidad del método

Placebo (mg)	% de respuesta
31.35	0.37%
31.52	0.46%
32.03	0.52%

7.2.8. Rango del método analítico

El rango empleado para evaluar linealidad, precisión y exactitud fue de 70 a 120%

7.3. VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO

7.3.1. Linealidad

Se determinó con 12 placebos cargados, empleando las concentraciones de 70 a 120% de la establecida en el método. Los resultados se encuentran en la tabla 22 y figura 8

Tabla 22

Linealidad del método espectrofotométrico

mg adicionados	mg recuperados
7.26	7.25
7.06	6.99
8.67	8.63
8.08	8.07
9.22	9.14
9.68	9.72
10.13	10.10
10.23	10.18
11.12	11.11
11.53	11.52
12.13	12.10
12.06	12.14

$$a = - 0.1220$$

$$b = 1.01062$$

$$r = 0.99974$$

$$S_{y/x} = 0.04209$$

Inferencia de a

$$H_0 a = 0$$

$$H_a a \neq 0$$

$$T_{cal} = -1.7098$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

-1.7098 < 2.2281, se considera que el método posee una ordenada al origen considerada como cero.

Intervalo de confianza

$$L.I. = -0.281$$

$$L.S. = 0.036$$

Inferencia de b

$$H_0 b = 1$$

$$H_a b \neq 1$$

$$T_{cal} = 1.4742$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

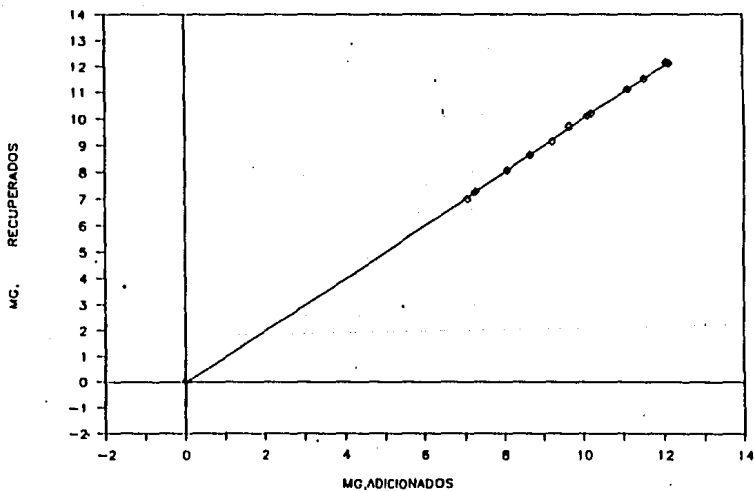
1.4742 < 2.22, la pendiente se considera igual a 1

Intervalo de confianza

L.I. = - 1.0057

L.S. = 1.015469

En la figura 8 se muestra la gráfica de regresión para la linealidad del método espectrofotométrico

Figura 8**Linealidad del método espectrofotométrico**

Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida por el método espectrofotométrico.

7.3.2. Exactitud

Se cuantificaron 10 muestras bajo la misma concentración central del 100%. Se determinó el porcentaje de recobro para cada muestra. Los resultados se encuentran en la tabla 23

Tabla 23

Resultados en porcentaje de recobro para determinar exactitud del método espectrofotométrico

% de recobro
99.10
101.03
99.80
101.01
99.38
98.40
100.90
101.60
100.30
99.70

$$\bar{X}\% = 100.122$$

$$S\% = 1.0152$$

$$T \text{ cal} = \frac{\bar{X}\% - 100}{S\% / \sqrt{n}}$$

$$T \text{ cal} = 0.3800$$

$$T \text{ tab } (9 \text{ gl}) = 2.26$$

Criterio de aceptación

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

$$0.3800 < 2.26$$

7.3.3. Precisión (repetibilidad)

Se llevó a cabo con 10 placebos cargados empleando la misma concentración para todos. Se tomó el porcentaje de recobro de cada dato experimental. Los resultados se encuentran en la tabla 24.

Tabla 24

Resultados en porcentaje de recobro para determinar la precisión del método espectrofotométrico

% de recobro

99.10
101.03
99.80
101.01
99.38
98.40
100.90
101.60
100.30
99.70

$$H_0 \sigma = 1.5$$

$$H_a \sigma \neq 1.5$$

$$\bar{X} = 100.122$$

$$S = 1.05248$$

$$X_{i2} \text{ cal} = \frac{(n-1) (S)^2}{(\sigma)^2}$$

$$X_{i2} \text{ cal} = 4.06$$

$$X_{i2} \text{ tab } (N-1)g1 = 19.023$$

Criterio de aceptación

$$X_{i2} \text{ cal} < X_{i2} \text{ tab}$$

$$4.06099 < 19.023$$

El método se considera preciso

7.4 METODO DE CRONATOGRAFIA DE LIQUIDOS

7.4.1. Linealidad

Se determinó con 12 placebos cargados, empleando la concentración de 70 a 120% de la concentración establecida en el método. Los resultados se encuentran en la tabla 26 y figura 9

Tabla 26

Linealidad del método cromatográfico

mg recuperados	mg adicionados
7.25	7.24
7.60	7.61
8.29	8.22
8.15	8.11
9.14	9.04
9.12	9.21
10.18	10.10
10.41	10.29
11.21	11.16
11.46	11.37
12.66	12.91
12.00	11.80

$$a = -0.06918$$

$$b = 1.0036$$

$$r = 0.99799$$

$$S_{y/x} = 0.1313$$

Inferencia de a

$$H_0 a = 0$$

$$H_a a \neq 0$$

$$T_{cal} = -0.315848$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

-0.3158 < 2.22, el método posee un ordenada al origen considerada como cero.

Intervalo al 95% de confianza

$$L.I. = 0.6037$$

$$L.S. = 0.46037$$

Inferencia de b

$$H_0 b = 1$$

$$H_a b \neq 1$$

$$T_{cal} = 0.163$$

$$T_{tab} = 2.22$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

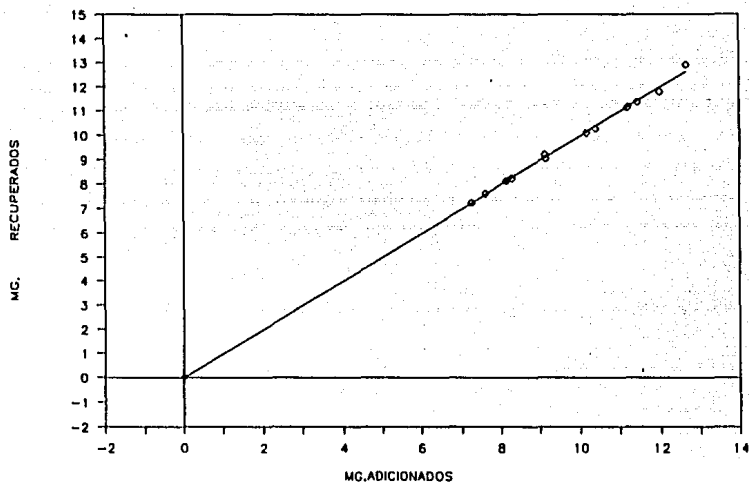
0.163 < 2.22, se considera que el método posee una pendiente igual a 1

Intervalo de confianza

$$L.I. = 0.71198$$

$$L.S. = 1.2952$$

figura 8
Linealidad del método cromatográfico



Representación gráfica de la respuesta lineal obtenida por el método cromatográfico.

7.4.2. Exactitud

Se cuantificaron 10 muestras bajo la misma concentración central del 100%. Se determinó el porcentaje de recobro para cada muestra. Los resultados se encuentran en la tabla 27

Tabla 27

Resultados en porcentaje de recobro para determinar la exactitud del método cromatográfico

% de recobro
100.23
99.81
98.07
101.02
99.22
101.01
100.49
100.89
101.37
99.72

$$\bar{X}\% = 100.183$$

$$S\% = 1.0074$$

$$T \text{ cal} = \frac{\bar{X}\% - 100}{S\% / \sqrt{n}}$$

$$T \text{ cal} = 0.5744$$

$$T \text{ tab} = 2.26$$

Criterio de aceptación

$$T_{cal} < T_{tab}$$

$$0.5744 < 2.262$$

6.4.3. Precisión (repetibilidad)

Se llevó a cabo con 10 placebos cargados empleando la misma concentración para todos. Se tomó el porciento de recobro de cada dato experimental. Los resultados se encuentran en la tabla 29.

Tabla 29

Resultados en porciento de recobro para determinar la precisión del método cromatográfico

 % de recobro

100.32

99.81

98.07

101.02

99.22

101.01

100.49

100.89

101.37

99.72

$$H_0 \quad \sigma = 1.5$$

$$H_a \quad \sigma \neq 1.5$$

$$\bar{X} = 100.183$$

$$S = 1.0074$$

$$X_{12}^2 \text{ cal} = \frac{(n-1) (S)^2}{(\sigma)^2}$$

$$X_{12}^2 \text{ cal} = 4.060$$

$$X_{12}^2 \text{ tab} = 19.023$$

Criterio de aceptación

$$X_{12} \text{ cal} < X_{12} \text{ tab}$$

$$4.060. < 19.023$$

7.5 COMPARACION ESTADISTICA

La comparación estadística se lleva a cabo entre el método volumétrico y los dos métodos alternativos.

Método 1 Volumétrico

Método 2 Espectrofotométrico

Método 3 Cromatografía de líquidos

6.5.1. Comparación Método 1 y 2

A. Linealidad

Método 1	Método 2
$n = 12$	$n = 12$
$\bar{x} = 3136.28$	$\bar{x} = 1178.1629$
$\sum x^2 = 846445.172$	$\sum x^2 = 1178.1629$
$\bar{y} = 261.38$	$\bar{y} = 13728.8089$
$S_x = 49.1369$	$S_x = 1.6856120$
$a = 2.3886$	$a = - 0.1220$
$b = 0.9905874$	$b = 1.01062$
$S_{y/x} = 1.288$	$S_{y/x} = 0.04209$

Comparación en cuanto a su pendiente

H_0 $b_1 = b_2$

H_a $b_1 \neq b_2$

$$T_{cal} = 0.0918525$$

$$T_{tab\ gl} = (n_1-2)(n_2-2)$$

$$T(0.975)(20) = 2.0860$$

B. precisión (repetibilidad)

Método	Método
1	2
n=12	n = 12
$X_{\bar{}} = 100.133$	$X_{\bar{}} = 100.122$
$S_{\bar{}} = 0.59359$	$S_{\bar{}} = 1.015248$
$S^2_{\bar{}} = 0.3523$	$S^2_{\bar{}} = 1.03072$

Comparación de varianzas

$$H_0 \sigma_1 = \sigma_2$$

$$H_a \sigma_1 \neq \sigma_2$$

$$F_{cal} = S_1^2/S_2^2 = 0.3523566/ 1.03072502$$

$$F_{cal} = 0.341854$$

$$F_{tab} = F_{0.075\ gl} (11/11) = 3.48$$

$$F_{tab} = F_{0.025\ gl} (11/11) = 0.287$$

Area de aceptación

De 0.287 a 3.48

C. Exactitud

Método 1

n = 10

X = 100.133

S₁ = 0.5935

Método 2

n = 10

X = 100.122

S₂ = 1.0152482

$$t_{cal} = \frac{X_{\#1} - X_{\#2}}{Sp \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

$$t_{cal} = 0.296346$$

$$g_1 = 1.099$$

7.5.2. Comparación Método 1 y3A. linealidad

Método

1

n = 12

Ex = 3136.28

Ex² = 846445.172

x = 261.38

Sx = 49.1369

a = 2.3886

b = 0.9905874

Sy/x = 1.288

Método

3

n = 12

Ex = 117.47

Ex² = 1185.4549

x = 9.7891667

Sx = 1.797004874

a = - 0.06918

b = 1,0036

Sy/x = 0.1313

Comparación en cuanto a su pendiente

$$H_0 \quad b_1 = b_3$$

$$H_a \quad b_1 \neq b_3$$

$$T \text{ cal} = - 0.3993$$

$$T \text{ tab} = (1 - /2)$$

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

$$T \text{ tab} (0.975)(20) = 2.0860$$

Area de aceptación

$$De - 2.0860 \text{ a } 2.0860$$

$$T \text{ tab} - 0.0130126$$

B. Precisión

Método 1	Método 3
n = 12	n = 12
$\bar{X}_1 = 100.133$	$\bar{X}_3 = 100.183$
$S_1^2 = 0.593596$	$S_3^2 = 1.0074$
$S_{1\%}^2 = 0.352356$	$S_{3\%}^2 = 1.0148$

Comparación de Varianzas

$$H_0 \quad \sigma_1 = \sigma_3$$

$$H_a \quad \sigma_1 \neq \sigma_3$$

$$F_{cal} = S_1^2 / S_3^2$$

$$F_{cal} = 0.3472178$$

$$F_{tab} \text{ 0.075 gl}(11/11) = 3.48$$

$$F_{tab} \text{ 0.025 gl}(11/11) = 0.287$$

C. Exactitud

Método 1	Método 3
n = 10	n = 10
$\bar{X}_1 = 100.133$	$\bar{X}_3 = 100.192$
$S_1 = 0.59359$	$S_3 = 1.0074$

$$t_{cal} = 0.3697174$$

$$gl = 1.10$$

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Tomando en cuenta que el pka de Naproxén Sódico en agua es de 4.2 y por lo tanto su pkb de 9.8, se considera como una base débil la cual podría ser titulada en medio acuoso, empleando un ácido fuerte como titulante, sin embargo la cuantitatividad de esta reacción depende en gran medida de la fuerza del ácido empleado. En la tabla No 9 se puede observar que el porcentaje de recobro de Naproxén Sódico es de 98.6, el cual comparado con el valor de referencia que se tiene (100.2%) resulta menor probablemente debido a que al realizarse la titulación se observo un precipitado blanco gelatinoso ocasionado por la baja hidrosolubilidad del Naproxén.

Al titular Naproxén Sódico con ácido clorhídrico en metanol el rendimiento es del 100% como se puede observar en la tabla No 11, por lo que se considera que el metanol es un buen solvente para esta titulación.

Se probaron los indicadores rojo demetilo, anaranjado de metilo y azul de timol, los tres bajo las mismas concentraciones (1%). Se llevo a cabo la titulación potenciométrica en presencia de cada indicador y se determinó el punto de equivalencia usando el método de la primera derivada con el cual se encontró que el cambio de color del indicador anaranjado de metilo coincidía con el punto de equivalencia determinado potenciométricamente como se puede ver en la tabla 13 y figuras 2 y 3 .

En la validación del método analítico se observa que existe una respuesta lineal por parte de los resultados experimentales de la tabla 16 en donde la pendiente y el coeficiente de correlación son muy cercanos a 1 y la ordenada al origen se considera cero, indicando de esta

manera buena correlación entre las cantidades adicionadas y las recuperadas y por lo tanto poca dispersión en los datos.

Al evaluar la precisión (repetibilidad) del método se encontro que la variación de los resultados obtenidos por dos analistas en dos días difentes no es muy significativa pues aún cuando la F de cálculo para la fuente de error día es grande en relación con los otros, no es mayor a la F de tablas De esta manera se puede decir que no existe interferencia por el día, analista o interacción analista-día de acuerdo a la tabla No 20.

La especificidad del método se realizó unicamente frente a excipientes, encontrandose una interferencia menor al 2% como se observa en la tabla 21.

En cuanto a la comparación estadística del método volumétrico contra los otros dos métodos se encontro que tanto para el parámetro de precisión como para la exactitud el valor promedio es muy semejante para los tres metodos, pero la desviación muestral es mayor tanto para el método de líquidos como para el método por espectrofotometría.

En la comparación estadística del parámetro linealidad se encontro que para los metodos de cromatografía de líquidos y espectrofotometrico tanto la pendiente como el coeficiente de correlación es de 1 mientras que para el método volumetrico es menor de 1. y en cuanto al error típico de estimación modificada es menor tanto para el método espectrofotometrico como para el de cromatografía de líquidos lo cual indica que hay mayor correlación de los resultados entre los métodos alternativos que en el volumetrico.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
5a Edición, 1988 secretaria de salud, pag 781
2. USP XXII, Seventeenth Edition, United States
Pharmacoepial Convention, Inc., U.S.A. 1990
pags 918,1710-1712
3. British Pharmacopeia, Published on the recomendation
of medicines Commission. London 1988 pag 384
4. Vogel's., "Textbook of Quantitative Inorganic Analy-
sis " 4th Edition 1978. pags 223-224
5. Peters D G., Hayes J.M. "Theory and Practice of
Analytical Chemistry" Sounders Golden Series. 1974
pags 13-14
6. Koltoff, I.M., Sandell, E.B. et all "Quantitative
Chemical Analysis 4th Edition. The Macmillan Co. 1969
pags 681-690
7. O.Folin., and A.H.Wentworth., J.Biol.Chem. 7 (1910)
421
8. O.Folin., and F.Flanders ., J. Am. Chem Soc. 34,
(1912) 774
9. O.Folin., and F.Flanders., J. Biol. Chem. 11
(1912) 257
10. J.Bronsted., Trav. Chim. 42 (1923) 718

11. T.M.Lowry., Trans Faraday Soc 20 (1924) 13
12. J.B.Conant., and N.F.Hall., J. Am. Chem. Soc. 49 (1927) 3047
13. N.F.Hall and T.H.Werner., J. Am. Chem. Soc. 20 (1948) 2367
14. J.B.Conant., and T.H.Werner., J. Am. Chem. Soc. 20 (1948) 784
15. H.G.Dan, and T.H. Mer., J. Am. Chem. Soc. 20 (1948) 792
16. T.F.Lovine., and G.Toenies., Am. J. Med. Sci. 185 (1933) 302
17. D.Vorlander., J.Fisher., and W.Felicitas., J. Am. Chem. Soc. 66 (1934)
18. I.M.Koltoff and A.William ., J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 1007
19. I.M.Koltoff and A.William ., J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 1014
20. G.F.Nauveau., and L.E.Bronchen J. Am. Chem. Soc. 57 (1935) 1336
21. K.Blumrich, and G.Bandel., J. Am. Chem. Soc. 64 374
22. L.Michaelis and S.Granick., J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 1861

23. M.L.Moss, J.H.Eliot and R.T.Hall., Anal.Chem 20 (1948) 784
24. Fernando Orozco D., "Análisis Químico Cuantitativo" 2a Edición, Editorial Harla S.A. de C.V. México 1980 pags 581-589
25. J.G.Dick., "Analytical Chemistry " Mc Graw- Hill Inc N:Y: 1973 pags 420-423
26. James S.Fristz., "Acid-Bases Tritationes in Nonaqueos solvents" The Frederick Smith Co. Columbus, Ohio 1952 cap 1 pags 30-40
27. Kent A.Conors ., "Curso de análisis farmacéutico" 2a edición, Editorial Reverté, México 1980 pags 52-72
28. Gilbert H. Ayres , "Análisis Químico Cuantitativo" 2a edición. Editorial Harla México 1951 , S.A. pags 573-688
29. R.J.Hamilton , "Introduction to High performance Liquid Cromatography" 1a edition. Ed Chapman & Hall N.Y 1977, pags 14-32
30. Willard Merritt D., "Métodos instrumentales de análisis 5ta ed pag 457-470
31. Monografía de Naproxén Sódico, Syntex División Farmacéutica, México 1984
32. Sidney Siggia, "Quantitative Organic Analisis via Grups Funtional", 3a edition, John Wiley and Sons, Inc N.Y. and London, 1963 pags 130-133