

00524  
46

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO  
PARA CUANTIFICAR NAPROXENO, NAPROXOL Y  
NAPROXENATO DE NAPROXENILO EN SOLUCION POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**MIRIAM ESPINO SALAZAR**



MEXICO D.F. **EXAMENES PROFESIONALES**  
FACULTAD DE QUIMICA

**1** 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## **Jurado asignado:**

Presidente: Inés Fuentes Noriega  
Vocal: Ricardo Rodríguez Saenz  
Secretario: Juan Manuel Rodríguez  
1er suplente: Liz Jannet Medina Reyes  
2do suplente: Maria de Lourdes Cervantes Ayala

**Laboratorio de Biofarmacia**  
**Departamento de Farmacia**  
**Facultad de Química**  
**UNAM**

Asesor del tema:

  
\_\_\_\_\_  
**M. En C. Juan Manuel Rodríguez**

Supervisor técnico:

  
\_\_\_\_\_  
**M. En C. José Manuel Morales Hernández**

Sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
**Miriam Espino Salazar**

---

*A mis padres,  
porque por ellos, soy*

*A mis hermanos  
Diego y Karina*

*Con mucho cariño...*



---

*Para Diego Velázquez:  
con todo mi amor, gracias por estar*

*A todos mis amigos  
que durante todo este tiempo me han dado un poco de SU tiempo.  
Mil gracias.*

**Agradecimientos:**  
A José Manuel Morales por su amistad y apoyo;  
al M en C Juan Manuel Rodríguez por toda su atención y por permitirme  
trabajar en este proyecto; a todos los profesores de la Facultad de Química  
que durante la carrera me motivaron con su ejemplo y, finalmente, a la  
Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado mucho más de  
lo que puedo pedir.



---

**EL ARTE DE LA VIDA CONSISTE EN OBTENER  
CONCLUSIONES ADECUADAS A PARTIR DE PREMISAS  
INSUFICIENTES...**



**INDICE GENERAL**

<b>Título</b>	<b>Pág</b>
Índice general	a
Índice de figuras	d
Índice de tablas	e
Índice de gráficas	g
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. GENERALIDADES</b>	<b>4</b>
2.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES)	5
2.2 MONOGRAFÍA DEL NAPROXENO	6
2.3 CROMATOGRAFÍA	10
2.4 EL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	14
2.5 DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS	15
2.6 VALIDACIÓN	17
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPROXENO	19
2.8 SELECCIÓN DE LOS FACTORES QUE MODIFICAN LA RESPUESTA ANALÍTICA EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	22
<b>III: PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	27
3.1.1 ESTÁNDARES	27
3.1.2 REACTIVOS	27
3.2 INSTRUMENTACIÓN	27
3.2.1 EQUIPO	27
3.2.2 COLUMNAS	28
3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	28
3.3.1 SOLUCIONES REACTIVO	28
3.3.2 SOLUCIONES DE REFERENCIA	29
3.3.2.1 Solución de referencia para todos los diseños experimentales	
3.3.2.2 Solución stock Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo	
3.4 PLANTEAMIENTO DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES	30
3.4.1 DISEÑO A	30
3.4.2 DISEÑO B	32
3.4.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE	33
3.4.4 DISEÑO C	35
3.5 VALIDACIÓN	37
3.5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA	37





3.5.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA	38
3.5.2.1 Reproducibilidad	
3.5.3 PUNTOS CONTROL	38
3.5.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	38
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1 RESULTADOS DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES	40
4.1.1 DISEÑO A	40
4.1.2 DISEÑO B	41
4.1.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE	42
4.1.4 DISEÑO C	43
4.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA	44
4.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD	44
4.2.1.1 Naproxeno	
4.2.1.2 Naproxol	
4.2.1.3 Naproxenato de naproxenilo	
4.2.2 EVALUACIÓN DE PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA	48
4.2.2.1 Naproxeno	
4.2.2.2 Naproxol	
4.2.2.3 Naproxenato de naproxenilo	
4.2.3 EVALUACIÓN DE LOS PUNTOS CONTROL	49
4.2.3.1 Naproxeno	
4.2.3.2 Naproxol	
4.2.3.3 Naproxenato de naproxenilo	
4.2.4 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	51
4.2.4.1 Naproxeno	
4.2.4.2 Naproxol	
4.2.4.3 Naproxenato de naproxenilo	
<b>V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>52</b>
5.1 DISEÑOS EXPERIMENTALES	53
5.1.1 DISEÑO A	53
5.1.1.1 Efectos estimados para tR N	
5.1.1.2 Efectos estimados para tr NOH	
5.1.1.3 Efectos estimados para tR NN	
5.1.1.4 Efectos estimados para Rs I	
5.1.2 DISEÑO B	60
5.1.2.1 Efectos estimados para tR N	
5.1.2.2 Efectos estimados para tr NOH	
5.1.2.3 Efectos estimados para tR NN	
5.1.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE	62
5.1.4 DISEÑO C	63



---

5.1.4.1 Efectos estimados para tr N	
5.1.4.2 Efectos estimados para tr NOH	
5.1.4.3 Efectos estimados para Rs	
5.1.4.4 Efectos estimados para sN	
5.1.4.5 Efectos estimados para sNOH	
5.1.5 CONDICIONES FINALES DE ANÁLISIS DE NAPROXENO, NAPROXOL Y NAPROXENATO DE NAPROXENILO EN SOLUCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	69
5.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA	70
5.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD	70
5.2.1.1 Naproxeno	
5.2.1.2 Naproxol	
5.2.1.3 Naproxenato de naproxenilo	
5.2.2 EVALUACION DE PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA	73
5.2.3 PUNTOS CONTROL	73
5.2.3.1 Naproxeno	
5.2.3.2 Naproxol	
5.2.3.3 Naproxenato de naproxenilo	
5.2.4 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	76
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>VII. APÉNDICES</b>	<b>80</b>
7.1 APÉNDICE I, CROMATOGRAMAS, DISEÑOS EXPERIMENTALES	81
7.2 APÉNDICE II, CROMATOGRAMAS DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO	83
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>



---

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Fórmula molecular del Naproxeno	6
2	Fórmula molecular del o-desmetilnaproxeno (naproxol)	8
3	Fórmula molecular del Naproxenato de naproxenilo	10
4	Tipos distintos de cromatografía.	11
5	Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.	13
6	Esquema de caja negra de un procedimiento analítico	15
7	Proceso analítico de identificación de la muestra	15
8	Esquema de caja negra del procedimiento cromatográfico	23



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Aplicaciones de la cromatografía de líquidos.	12
2	Ventajas de uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia	14
3	Relaciones entre factores en un experimento factorial.	17
4	Tiempo de retención de los analitos de interés a las condiciones reportadas en el laboratorio 113 de Biofarmacia.	22
5	Características de las columnas utilizadas.	28
6	Cantidad de sal de fosfatos necesaria para la preparación de las soluciones amortiguadoras.	29
7	Peso de los analitos para preparar las soluciones stock.	29
8	Factores y niveles del Diseño A.	30
9	Respuestas a medir en el Diseño A.	31
10	Factores y niveles del Diseño B.	32
11	Respuestas a medir en el Diseño B.	33
12	Condiciones de gradiente a medir con el DRY LAB Ø.	34
13	Factores y niveles del Diseño C.	35
14	Respuestas a medir en el Diseño C.	36
15	Cantidad de analito presente en la solución stock.	37
16	Concentración de cada analito en los puntos de la curva patrón.	37
17	Respuestas del Diseño A.	41
18	Respuestas del Diseño B.	41
19	Variación de la composición de la fase móvil durante el gradiente.	42
20	Resultados de los gradientes para DRY LAB.	43
21	Respuestas del Diseño C.	43
22	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxeno, Día 1.	44
23	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxeno, Día 2.	44
24	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxol, Día 1.	45
25	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxol, Día 2.	46
26	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxenato de naproxenilo, Día 1.	47
27	Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, área de la curva patrón correspondiente a naproxenato de naproxenilo, Día 2.	47
28	Relación área/concentración para naproxeno durante los dos días de análisis para cada curva patrón.	48
29	Relación área/concentración para naproxol durante los dos días de análisis para cada curva patrón.	48
30	Relación área/concentración para naproxenato de naproxenilo durante los dos días de análisis para cada curva patrón.	49
31	Relación concentración área para los puntos control de naproxeno.	50
32	Relación concentración área para los puntos control de naproxol.	50



33	Relación concentración área para los puntos control de naproxenato de naproxenilo.	50
34	Límites de detección y cuantificación para naproxeno	51
35	Límites de detección y cuantificación para naproxol.	51
36	Límites de detección y cuantificación para naproxenato de naproxenilo.	51
37	Tiempos de retención de los analitos a las condiciones de gradiente sugeridas por el software DRY LAB ®.	63
38	Tiempos de retención en las condiciones finales de análisis del naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo.	70
39	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxeno, primer día de análisis.	70
40	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxeno, segundo día de análisis.	70
41	Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxeno.	71
42	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxol, primer día de análisis.	71
43	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxol, segundo día de análisis.	71
44	Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxol.	71
45	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxenato de naproxenilo, primer día de análisis.	72
46	Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva área concentración de naproxenato de naproxenilo, segundo día de análisis.	72
47	Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxenato de naproxenilo.	72
48	Lincalidad probada para cada analito con el método de análisis final.	72
49	Evaluación de los puntos control para naproxeno, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.	73
50	Evaluación de los puntos control para naproxeno, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.	74
51	Evaluación de los puntos control para naproxol, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.	74
52	Evaluación de los puntos control para naproxol, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.	75
53	Evaluación de los puntos control para naproxenato de naproxenilo, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.	75
54	Evaluación de los puntos control para naproxenato de naproxenilo, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.	76



## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfico	Título	Pág
1	Linealidad del naproxeno, primer día de análisis, área contra concentración .	45
2	Linealidad del naproxol, primer día de análisis, área en función de la concentración .	46
3	Linealidad del naproxenato de naproxenilo, primer día de análisis, área en función de la concentración.	47
4	Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.	55
5	Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.	56
6	Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.	56
7	Superficie estimada de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.	57
8	Contornos estimados de respuesta de la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de 3.5 $\mu\text{m}$ , diseño A.	58
9	Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$ , diseño A.	58
10	Contornos estimados de respuesta para el tiempo de retención de naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de la columna constante (3.5 $\mu\text{m}$ ), diseño A.	59
11	Contornos estimados de respuesta para el tiempo de retención del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de columna constante (3.5 $\mu\text{m}$ ), diseño A.	59
12	Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de la columna constante (3.5 $\mu\text{m}$ ), diseño A.	60
13	Superficie estimada de respuesta del tiempo de retención del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	64
14	Superficie estimada de respuesta del tiempo de retención del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	64
15	Superficie estimada de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	65
16	Superficie estimada de respuesta para la simetría del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	66
17	Superficie estimada de respuesta para la simetría del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	66
18	Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	67
19	Contornos estimados de respuesta para la simetría del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	68
20	Contornos estimados de respuesta para la simetría del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.	68



# I INTRODUCCIÓN



Los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos son utilizados en medicina para determinar regímenes de dosificación basados en concentraciones de fármaco en algún fluido o tejido biológico. Estos modelos aplican la información disponible de fisiología, anatomía, farmacología y bioquímica para la determinación de la distribución y disposición de fármacos y nos ayudan a hacer un escalamiento experimental permitiendo el planteamiento de investigaciones en animales que no se pueden realizar en el hombre.

Actualmente, hacen falta reportes en la literatura en los cuales se aplique modelaje farmacocinético-farmacodinámico-fisiológico para explicar el comportamiento del fármaco en el cuerpo humano y del cuerpo ante el fármaco y poder obtener así regímenes de dosificación más seguros y efectivos en la clínica, además de predecir estos comportamientos bajo condiciones de enfermedad o fisiopatológicas.

Esta tesis forma parte de una investigación que nos permitirá encontrar un modelo farmacocinético-farmacodinámico-fisiológico. Se trabaja con dos antiinflamatorios no esteroideos: Naproxeno e Ibuprofeno y sus respectivos profármacos, Naproxenato de Naproxenilo e Ibuprofenato de Ibuprofenilo. Con la información resultante, se podrán hacer predicciones de distribución y disposición de estos fármacos y profármacos en humanos que derivará de manera directa en la obtención de regímenes de dosificación para su mejor utilización en la clínica.

El uso clínico de un profármaco, como el Naproxenato de naproxenilo, esta condicionado por su paso a través de las cuatro fases de producción de fármacos. Para su estudio farmacocinético y de toxicidad en animales de laboratorio es necesario un método analítico validado que nos permita cuantificarlo, junto con la molécula activa y metabolitos relacionados, primero en solución y después en plasma de animales de laboratorio. Así mismo, el desarrollo de una técnica con estas características permitirá generar la correspondiente para su futura aplicación en estudios en humanos.





Así los objetivos del presente trabajo son:

- **Desarrollar un sistema cromatográfico para la cuantificación de naproxeno, naproxenato de naproxenilo y naproxol en solución por cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando técnicas de diseño experimental.**
- **Caracterizar el desempeño del sistema desarrollado mediante la evaluación de los siguientes parámetros de validación de un método analítico: selectividad, linealidad, precisión.**



## **II GENERALIDADES**



## 2.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), al igual que los esteroideos, presentan actividad analgésica y antipirética; a excepción de que casi todos son ácidos orgánicos y tienen entre sí poca relación química, comparten las actividades terapéuticas y ciertos efectos colaterales. El compuesto prototipo es el ácido acetilsalicílico pero a diferencia de este (que modifica a la enzima ciclooxigenasa de forma equivalente) son inhibidores reversibles de la actividad de ciclooxigenasa la cual cataliza la conversión de ácido araquidónico (AA) a prostaglandinas (PGs). Se excretan por filtración glomerular o secreción tubular por lo que la duración de la acción depende de su cinética de eliminación; así, se dividen en dos grandes grupos: aquellos con vida media breve (menor a seis horas) y los que cuentan con vida media larga (más de 10 horas). El hecho de que sean ácidos orgánicos hace que se acumulen en los sitios de inflamación, es decir, lugares donde se requiere su acción farmacológica.<sup>1</sup>

La clasificación química de los analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos es la siguiente:

1. Derivados del ácido salicílico.

Aspirina, salicilato de sodio, trisalicilato de magnesio y colina, diflunisal, ácido salicilsalicílico, sulfasalazina, olsalazina.

2. Derivados del para-aminofenol.

Acetaminofén.

3. Indol y ácidos indenacéticos.

Indometacina, sulindac, etodolac.

4. Ácidos heteroarilacéticos.

Tolmetín, diclofenaco, ketorolaco.

5. Ácidos arilpropiónicos.

Ibuprofeno, **naproxeno**, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina.

6. Ácidos antranílicos (fenamatos).

Ácido mefenámico, ácido meclofenámico.



## 7. Ácidos enólicos.

Oxicam (piroxicam, tenoxicam), pirozalidindionas (fenilbutazona, oxifenbutazona)

## 8. Alcanonas.

Nabumetona.

2.2 MONOGRAFÍA DEL NAPROXENO<sup>1,2,3</sup>

El naproxeno es un derivado del ácido propiónico {ácido S-6-Metoxi-alfa-metil-2-naftalenacético [ácido d-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico,  $C_{14}H_{14}O_3$ ]} y tiene un peso molecular de 230.26 g/mol. Su fórmula molecular se muestra en la figura 1.

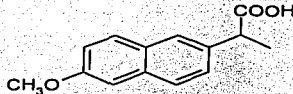


Fig 1. Fórmula molecular del Naproxeno.

Es insoluble en agua pero muy soluble en cloroformo, metanol, etanol y éter; tiene un pKa de 4.7 y la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en ratones es 1234 mg/kg administrada de forma oral y, por la misma vía, en ratas es de 534 mg/kg.

Sus datos farmacocinéticos son:<sup>3</sup>

- Disponibilidad oral = 99%
- Excreción urinaria <1%
- Unión a proteínas del 99.7%
- Depuración de 0.55 L/h/70 kg
- Volumen de distribución: 11.2 L / 70 kg
- Tiempo de vida media  $t_{1/2}$  = 14 h
- Las concentraciones efectivas son arriba de 50 mg/ L

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Su uso está indicado en artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, gota, artritis reumatoide juvenil, afecciones musculoesqueléticas y periféricas tales como



la tenosinovitis, bursitis, tendinitis y lumbago; es administrado en traumatología y cirugía después de distensiones, esguinces y manipulaciones ortopédicas, junto con el ibuprofeno es utilizado para inhibir la fiebre <sup>1,4</sup>.

Se desconoce el mecanismo exacto de acción del naproxeno pero es claro su efecto en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, se absorbe del tracto gastrointestinal después de administrarlo oralmente y los niveles plasmáticos máximos se alcanzan a las 2 ó 4 horas estabilizándose su concentración en sangre después de 4 ó 5 dosis. La absorción es mayor con alimentos y puede acelerarse con la administración concomitante de bicarbonato de sodio o reducirse con el consumo de óxido de magnesio o hidróxido de aluminio. También se absorbe desde el tracto rectal aunque por esta vía tarda más en llegar a concentraciones máximas <sup>1</sup>.

La United States Pharmacopeial Convention <sup>4</sup> registra en el 2001 dos formas farmacéuticas con naproxeno en forma de suspensión, diez presentaciones con naproxeno en tableta para liberación retardada y cuarenta y cinco en forma de tableta común a diferentes dosis, hay que añadir la existencia de dos geles de administración oral. Para el naproxeno sódico hay registradas veintiséis presentaciones a diversas dosis y tres presentaciones de tabletas con liberación controlada. Para México, el Diccionario de Especialidades Farmacéuticas <sup>5</sup> reporta quince marcas a diversas dosis y formas farmacéuticas con naproxeno solo o combinado y tres para naproxeno sódico.

Los programas de administración adecuados para el naproxeno son <sup>5</sup>:

**Artritis.**

Adultos: Tomar 250, 375 o 500 mg dos veces al día, la dosis puede aumentar según el caso hasta los 1500 mg por día.

Niños: La dosis se debe basar en el peso corporal con 5 mg por kilogramo dos veces al día.

**Bursitis, tendinitis, dolores menstruales y otro tipo de dolor.**

Adultos: 500 mg la primera dosis y luego 250 mg cada seis u ocho horas.

Niños: a consideración del médico.



Gota.

Adultos: 750 mg para la primera dosis y luego 250 mg cada seis u ocho horas.

Niños: el uso y dosis debe ser determinado por el médico.

Para las tabletas de liberación prolongada:

Artritis y dolor.

Adultos: 750 a 1000 mg al día

Niños: estas tabletas son demasiado fuertes para un niño.

Para supositorios rectales:

Artritis.

Adultos: Se debe usar en la noche un supositorio de 500 mg, en combinación con formas farmacéuticas orales.

Niños: No usar supositorios.

Sus metabolitos se encuentran casi por completo en la orina. 30% del fármaco muestra 6-desmetilación, el producto de esta reacción (naproxol, figura 2) y el naproxeno son eliminados en gran proporción como glucurónidos y otros conjugados<sup>4</sup>.

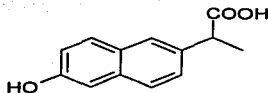


Fig 2. Fórmula molecular del o-desmetilnaproxeno (naproxol).

Como integrante de los antiinflamatorios no esteroideos, causa efectos secundarios cuando se toma por periodos largos o en dosis altas. Los AINES pueden tener reacciones indeseables en el flujo sanguíneo del feto o recién nacido y en animales se ha visto que aumentan el tiempo de duración de la gestación o el tiempo de trabajo de parto; por estas razones, incluso los fármacos de no prescripción como el ibuprofeno y el naproxeno no deben administrarse durante el embarazo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La administración de naproxeno en niños aumenta la incidencia de rash en piel. No debe tomarse si hay úlcera péptica activa o hipersensibilidad; puede haber reacciones cruzadas de sensibilidad con otros antiinflamatorios no esteroides; se ha encontrado en leche humana y, además, cruza la placenta, hecho importante ya que para naproxeno específicamente, sí se han realizado estudios en animales que demuestran los efectos que causa en el feto sobre el flujo sanguíneo.<sup>5</sup>

Las reacciones adversas más comunes son malestar abdominal, dolor epigástrico, cefalea, náuseas, anemia aplásica y hemolítica, meningitis aséptica, incapacidad de concentración, somnolencia, colitis, neumonitis eosinofílica, eritema multiforme, hepatitis fatal, falla renal, reacciones de fotosensibilidad, vasculitis, trastornos visuales, etc. Debe evitarse si hay úlcera péptica activa o malestar abdominal.<sup>5</sup>

Esté fármaco también puede encontrarse en formulación como la sal de sodio. La fórmula molecular del naproxenato de sodio es  $C_{14}H_{13}NaO_3$  con un peso de 252.25, es un polvo blanco, prácticamente inoloro; su patente actual (con el nombre de NAPRELAN) vence el 10 de junio del 2014 y debe administrarse en una dosis 10 % mayor al naproxeno.

El uso de un profármaco que produzca en menor grado los ya citados efectos colaterales causados por el naproxeno ayudaría a un mayor uso de éste como molécula activa. Un profármaco es un compuesto biológicamente inactivo modificado que regresa a la estructura activa una vez que se encuentra cerca del sitio de acción; o bien, cuando se hace la reconstitución (en el caso de polvos secos). Los profármacos son diseñados para modificar las propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas o de toxicidad de la sustancia original.<sup>6,7</sup> El Naproxenato de Naproxenilo<sup>8</sup> (ver figura 3) es evaluado como profármaco del naproxeno, esta constituido por dos moléculas de este y es sujeto a hidrólisis por esterazas para liberar la forma activa. El futuro uso del Naproxenato de naproxenilo en clínica esta condicionado por su paso satisfactorio a través de las fases preclínica y clínica de desarrollo e investigación de un nuevo fármaco<sup>9</sup>. Para su estudio farmacocinético o de toxicidad en animales de laboratorio es necesario un método analítico validado que nos permita saber su concentración en solución, la cantidad de Naproxeno como sustancia



activa y de Naproxol (figura 2) como principal metabolito puesto que así se encontrarán en plasma. Finalmente, el desarrollo de un método con estas características permitirá generar el correspondiente destinado a su aplicación en estudios en humanos.

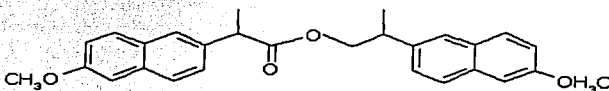


Fig 3. Fórmula molecular del Naproxenato de naproxeno.

### 2.3 CROMATOGRAFÍA.

Ciencia analítica de las separaciones químicas (*chroma* es color y *graphein* escritura), la cromatografía fue documentada por primera vez por el científico ruso Mikhail Tswett en 1903; Tswett trabajó con extractos de plantas que hizo pasar por una columna de vidrio empacada de partículas sólidas de carbonato de calcio logrando una separación del extracto en bandas de colores. Actualmente, la cromatografía es una de las herramientas más poderosas para el químico analista con aplicación en diversos campos científicos lo que ha incentivado el desarrollo e investigación de nuevas tecnologías y métodos de trabajo para hacer más eficiente la separación de sustancias de una mezcla.<sup>10</sup>

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos<sup>11</sup> se define a la cromatografía como un proceso de migración diferencial en el que los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, ya sea gas o líquido, y son retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser líquida o sólida. La división de la cromatografía según la naturaleza de las fases involucradas y los mecanismos de separación se puede ver en la figura 4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



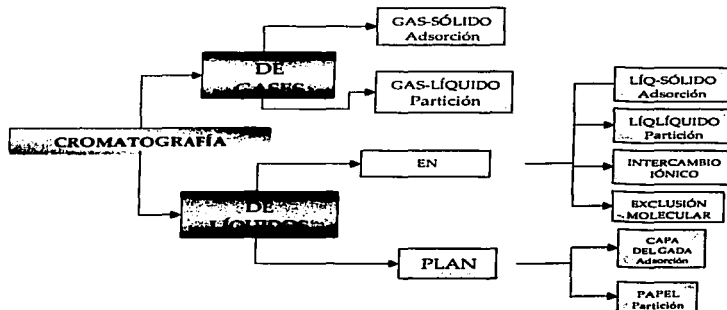


Fig 4. Tipos distintos de cromatografía.

Los distintos mecanismos de separación que se llevan a cabo en la cromatografía de líquidos dan lugar a una clasificación de este método analítico en particular: cromatografía líquida de partición, de adsorción, de intercambio iónico y de exclusión molecular. En la primera (que es tipo líquido-líquido), las dos fases líquidas pueden llevar a cabo la separación pues presentan composiciones diferentes y son inmiscibles entre sí, la fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido y el soluto se equilibra entre este líquido estacionario y la fase móvil; en la cromatografía líquido-sólido o de adsorción el equilibrio entre el estado adsorbido del soluto en la fase estacionaria sólida y el soluto en la solución es la causa de la separación de las moléculas de soluto; en la cromatografía de intercambio iónico hay una interacción entre especies iónicas y de la fuerza de esta depende el tiempo de retención de la molécula a analizar; finalmente, en la cromatografía de exclusión molecular, el empaque es de un material poroso que solo permite la retención de partículas con un tamaño específico, permitiendo así, su separación. Actualmente, existen algunas modificaciones de los tipos arriba descritos, como la cromatografía de fases enlazadas que se realiza en fase normal (fase móvil no polar, fase



estacionaria polar) y en fase inversa (fase móvil polar y estacionaria no polar), la de par-iónico, de afinidad, etc.<sup>10</sup>

Las técnicas comúnmente usadas en cromatografía de líquidos son las de fase normal y de fase reversa. La fase normal es la modalidad original utilizada por Tswett; opuesta a esta, la fase reversa utiliza una fase estacionaria de características no polares y los disolventes de carácter polar (en cuyo caso, la fuerza eluotrópica aumenta por la adición de algún disolvente menos polar). Esta última técnica descrita es, de las dos, la más utilizada dentro de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) pues el uso de disolventes polares, como el agua, ofrece ventajas en el manejo instrumental y analítico al aumentar el rango de pH posible a manipular y el grado de polaridad de la fase móvil. Además, el uso de columnas de partículas de silano con moléculas orgánicas ligadas hace posible contar con una fase estacionaria no polar cuyas características químicas se pueden modificar adecuándonos así, a las necesidades de separación de nuestra muestra analítica en una amplia variedad de compuestos que se deseen separar. Para seleccionar de inicio el tipo de fase unida al soporte podemos guiarnos en el siguiente cuadro (Tabla 1) donde se muestran los diferentes compuestos químicos que se pueden separar haciendo uso de la CLAE en sus diversas modalidades.

Tipo de compuesto	Modo	Fase estacionaria	Fase móvil
Neutros Ácidos débiles Bases débiles	Fase inversa	C18, C8, C4, ciano, amino	Agua / orgánicos Modificadores
Iónicos, bases, ácidos	Par iónico	C18, C8	Agua / orgánicos Reactivo para par iónico
Compuestos no solubles en agua	Fase normal	Silica, amino, ciano, diol	Orgánicos
Compuestos iónicos, iones inorgánicos	Intercambio iónico	Resina de intercambio aniónico o catiónica	Buffer acuoso Counter ión
Compuestos de alto peso molecular. Polímeros	Exclusión molecular	Poliestireno Silica	Acuosa - orgánico Para permeación en gel

Tabla 1. Aplicaciones de la Cromatografía de líquidos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia se ha tomado ventaja del desarrollo tecnológico para agilizar y hacer más eficiente el proceso cromatográfico para líquidos en columna; se aplica una sobrepresión que permite acelerar la separación con una disminución del tiempo de análisis, incluso en mezclas muy complejas (como podría serlo un producto biológico), además se permite el análisis de sustancias termolábiles que no podrían ser manejadas por vaporización en un cromatógrafo de gases (se descomponen al vaporizarse). Actualmente es una de las técnicas de mayor aplicación en el área clínica y farmacéutica para el análisis rutinario de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos: aporta sensibilidad, especificidad y es de fácil manejo instrumental. El siguiente es un esquema (Fig 5) de las partes con que cuenta un equipo para cromatografía de líquidos.

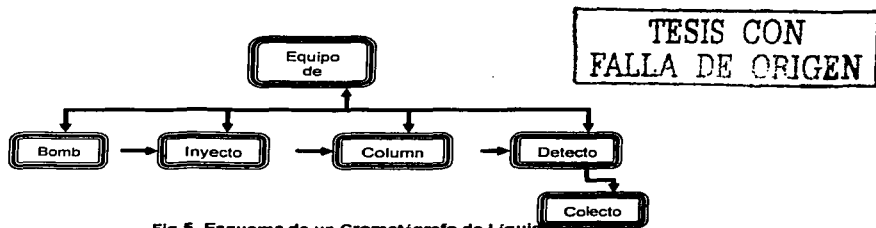


Fig 5. Esquema de un Cromatógrafo de Líquidos.

En la tabla 2 se enlistan las ventajas de uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia con las que podemos justificar su alto grado de aceptación y amplio uso en la actualidad.

**Ventajas del uso de la CLAE.**

- Gran mercado en el mundo instrumental analítico
- Amplio espectro de aplicaciones
- Excelente capacidad para el análisis de trazas (ppb)
- Rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo
- Variedad de mecanismos de operación
- Temperaturas de análisis próximas a la ambiental
- Información de separaciones históricamente desarrolladas
- Alta sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión de los resultados
- Tecnología en instrumentación
- Amplio potencial en investigación y desarrollo



- Simplicidad en metodologías
- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados por la misma columna y la misma fase móvil
- La fuerza de atracción superficie no polar-analito es débil
- La adsorción irreversible, frecuente en sílica gel, rara vez ocurre
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
- El modificador orgánico predominante es metanol accesible en precio con calidad adecuada
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio en la fase móvil

Tabla 2. Ventajas de uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

## 2.4 EL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Un procedimiento analítico puede ser explicado con un esquema de “caja negra” representando una situación en la que nada se conoce sobre el proceso y/o componentes físicos, químicos, mecánicos o eléctricos involucrados y con el que sea posible, transformar la muestra, de composición desconocida, en una de características conocidas.

En la figura 6, las variables de entrada  $X_1, X_2, X_i, \dots, X_n$  representan la concentración, las cantidades, e identidades presentes en la muestra y las variables  $Y_1, Y_2, Y_j, \dots, Y_m$  representan las mediciones (voltaje, lecturas diferentes) o variables salida. La relación que se da entre estos dos tipos de variable es muy importante pues de esta depende la generación de los resultados analíticos a partir de las mediciones. Las letras U con los diferentes subíndices corresponden a las variables controlables, éstas tienen gran influencia en la medición y por lo tanto, en la relación de las variables de entrada y salida  $X - Y$ . Las variables que no pueden ser controladas se indican como Z y generalmente se desconocen aunque se este consciente de su presencia y posible efecto, como por ejemplo, cambios en el voltaje de luz, temperatura del ambiente, etc.



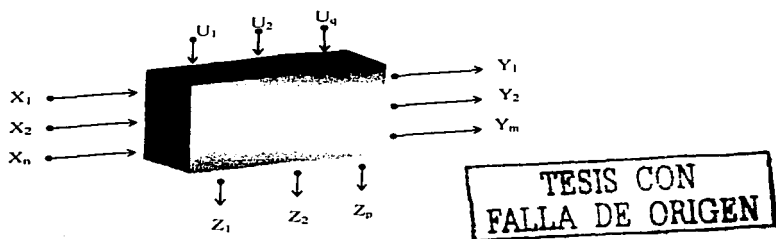


Fig 6. Esquema de caja negra de un procedimiento analítico.

La información que se obtiene de la muestra a partir del procedimiento analítico puede verse como la diferencia entre la composición de esta antes y después del análisis; diferencia en la que influyen los cuatro tipos de variables arriba citadas. El procedimiento analítico por el que esta muestra es procesada se esquematiza en la figura 7.



Fig 7. Proceso analítico de identificación de la muestra.

La composición, como una propiedad de la muestra, debe ser medida adicionando cierto nivel de ruido. La identificación es posible cuando la relación entre  $X$  y  $Y$  es conocida y cuando la señal no se oculta con el ruido.

## 2.5 DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS <sup>12</sup>

Un diseño de experimentos involucra una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema para poder observar e identificar las causas de los cambios en las respuestas de salida.



Los métodos de diseño experimental tienen aplicación en un gran número de disciplinas optimizando el trabajo de experimentación; se emplea en el desarrollo de nuevos procesos y para mejorar el rendimiento de los ya implementados; por ejemplo, algunas aplicaciones en el diseño técnico son al utilizar los resultados para evaluar materiales alternos, para seleccionar parámetros o condiciones de trabajo máximas y mínimas (datos de robustez), etc. Así, obtenemos productos con mayor confiabilidad y mejor funcionamiento en el campo de trabajo, menores costos y menor tiempo de diseño y desarrollo del producto.

Para que un experimento se realice de forma eficiente se deben emplear métodos científicos en su planeación y, con el objeto de producir conclusiones válidas y objetivas, se requiere de un enfoque estadístico, el cual es otro aspecto dentro del planteamiento experimental, que debe estar estrechamente vinculado dentro de todo el proceso. Esto es evidente al enunciar los tres principios básicos en el diseño de experimentos:

1.-Obtención de réplicas, lo que permite estimar el error experimental y ser más precisos al prever los efectos.

2.-Aleatorización, proceso que elimina los factores externos que pudieran afectar a las variables independientes.

3.-Análisis por bloques, paso que incrementa la precisión del experimento al manejar "paquetes" o porciones de material experimental más homogéneas en comparación con el total.

Un procedimiento lógico y común para enfrentar un problema usando diseño de experimentos puede enumerarse como sigue:

1. Comprender y plantear dicho problema.
2. Elegir factores, niveles y variables con principal influencia una vez analizado el problema.
3. Seleccionar la variable respuesta más adecuada que ofrezca la información deseada y sea capaz de medirse.



4. Elegir el diseño experimental considerando el tamaño de muestra y el orden de los ensayos tratando de eliminar los factores que pudieran intervenir y que no son controlables.
5. Realizar el experimento acatando cuidadosamente las condiciones establecidas.
6. Analizar los datos con métodos estadísticos obteniendo el error de los resultados.
7. Concluir con base en los resultados y hacer recomendaciones prácticas y útiles para trabajos a futuro.

El diseño experimental factorial es una técnica general muy poderosa que permite descubrir las interacciones directas entre variables pues en estos se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores en cada ensayo o réplica completa. El tipo más sencillo de experimento factorial es aquel donde intervienen solo dos factores a diferentes niveles (diferentes valores experimentales, los más sencillos implican un valor alto y uno bajo).

Factor	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
A <sub>1</sub>	Respuesta 1,1	Respuesta 2,1
A <sub>2</sub>	Respuesta 1,2	Respuesta 2,2

Tabla 3. Relaciones entre factores en un experimento factorial.

## 2.6 VALIDACIÓN<sup>13,14,15</sup>

Un método analítico empleado para la determinación cuantitativa de un fármaco y / o sus metabolitos tiene un papel muy importante en la evaluación e interpretación de datos en un estudio de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética. El método analítico debe ser validado para garantizar la veracidad y confiabilidad de los resultados derivados de estos estudios.

La validación de un método analítico esta definida como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que las características de



comportamiento del método cumplen con el propósito para el que fue diseñado, estas características se expresan en términos de parámetros de validación.<sup>13</sup>

Los parámetros analíticos que se incluyen como mínimos de validación son: linealidad, precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación absoluta, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra analítica, selectividad y tolerancia. Las definiciones, según la NOM 177-SSA1-1998<sup>13</sup> que establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos y los requisitos que deben cumplir los establecimientos que llevan a cabo dichas pruebas, son las siguientes:

La exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimental y el valor de referencia.

La linealidad es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

El límite de detección es la concentración mínima de un compuesto en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

El límite de cuantificación es la concentración más baja que puede cuantificarse cumpliendo con la exactitud y precisión establecidas en el método.

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones; en cambio, la reproducibilidad





---

intralaboratorio expresa la variación obtenida a diferentes condiciones de análisis, tales como días, columnas, equipo, etc.

El rango es el intervalo definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

La selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

La tolerancia es la capacidad del método para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

La revalidación es necesaria cuando hay cambios en el proceso de síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto terminado, en el procedimiento analítico y cualquier otro que lo pueda afectar.

Los parámetros de validación del sistema solo incluyen linealidad y precisión<sup>13</sup>.

## **2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPROXENO**

El naproxeno, al ser un fármaco tan ampliamente utilizado, es objeto de investigación constante tanto en el área farmacéutica como en la clínica y la variedad de información con la que se cuenta cubre necesariamente el área de análisis y cuantificación en muestras biológicas. Diversas publicaciones hay referidas a la determinación de naproxeno y sus metabolitos por cromatografía. Uno de los primeros trabajos, en el que encontramos en solución al naproxeno en plasma obtenido a partir de sangre humana, es el publicado en 1976 realizado por J. P. Desager<sup>22</sup>, donde se reporta un recobro del 95% cuantificando por cromatografía de gases. A partir de este año, se realizan una amplia variedad de



investigaciones que buscan realizar una cuantificación precisa y exacta de naproxeno por medio de técnicas sencillas involucrando al material e instrumental presentes en los diversos laboratorios de trabajo y que además, se puedan aplicar en muchos tipos de muestras: desde plasma y suero hasta orina, fluido sinovial e hígado, no solo de humano sino también de muestras de interés en veterinaria<sup>23,24,25,26,27</sup>. Del mismo modo, hay publicaciones con desarrollos de técnicas analíticas para la cuantificación del fármaco de interés en muestras donde no es la única molécula a medir, incluso se reportan trabajos determinando al mismo tiempo la cantidad de otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos muy parecidos estructuralmente<sup>28,29,30,31,32,33,34</sup>. Por otro lado, son de especial interés las técnicas en que se cuantifican los derivados metabólicos -resaltando el método de análisis desarrollado, gracias al cual fue solucionado en el laboratorio el problema de similitud estructural- lo cual implica, la mayor parte de las veces, un comportamiento cromatográfico similar<sup>23,25,26,27,35,36</sup>.

Dentro de todas las técnicas reportadas hay algunas condiciones que se repiten y que son de gran ayuda para establecer el punto de partida y el camino a seguir para desarrollar un método propio, cuya característica será la de cuantificar además al 6-desmetilnaproxeno y al naproxenato de naproxenilo. Es común utilizar cromatografía en fase reversa, particularmente una fase estacionaria con fase ligada C18 a diferentes longitudes, 4, 7.5, 10, 12.5, 15, 18, y 30 cm<sup>24,27,28,29,30,32,33,34,36</sup> generalmente de 4.6 mm de diámetro y con 5 micrómetros de tamaño de partícula en distintas marcas. La fase móvil es ácida comúnmente, utilizando ácido fosfórico o una solución amortiguadora de una sal de fosfatos para establecer el pH junto con metanol o acetonitrilo como la parte orgánica; hay que notar que las proporciones de cada uno de los componentes de la fase móvil dependerá de las características de la columna para así, obtener la respuesta deseada; como ejemplo tenemos el trabajo reportado por Upton et. al<sup>28</sup> donde usa un 8% de acetonitrilo y un 92% de fosfatos 0.05 M de pH de 7 para una columna C18 de 4 cm; otro más es el publicado por Ovcen<sup>29</sup> donde se utiliza un 45% de acetonitrilo y 55 % de fosfatos 0.03% pH 2.5 para una columna C18 de 30 cm en la determinación de varios antiinflamatorios no esteroideos al mismo tiempo. Esto nos deja abierto el campo experimental en un amplio rango de trabajo para llegar a establecer las condiciones finales para la fase móvil.

En cuanto a la detección de la respuesta cromatográfica, Owen<sup>29</sup> reporta buenos resultados a 254 nanómetros en detector ultravioleta para diversos antiinflamatorios no esteroidales. Otros trabajos<sup>32,38</sup> dan un valor de 260 nm como valor de longitud de onda.

Los tiempos de retención para naproxeno se prefieren mayores a 3 minutos, esto debido a que el proceso de extracción y concentración de la muestra deja impurezas que se pueden ver en los cromatogramas a un tiempo de 1 a 2 minutos después de inyectada la solución de extracción. Este hecho origina que el tratamiento de la muestra biológica para su introducción al cromatógrafo sea un paso clave para obtener datos confiables de concentración. Dentro de los trabajos más antiguos consultados, se utiliza la extracción por partición líquido-líquido para después pasar al uso de cartuchos Sep Pak, sin embargo, algunas publicaciones más recientes han retomado la extracción líquido-líquido debido a que es un método rápido y relativamente sencillo de realizar.

Respecto a los métodos de cuantificación más relacionados con el desarrollado en este trabajo, encontramos la determinación simultánea de naproxeno y naproxol que realiza Shimek<sup>26</sup> en 1982 con una columna C18 de 25 cm y 45% de buffer de acetatos y metanol. La detección es fluorométrica; T. B. Vrec<sup>36</sup> con una columna similar, determina además los glucurónidos del naproxeno (por lo que debe usar un gradiente) durante la cromatografía; A. J. Vangaar<sup>35</sup> utiliza una columna quiral AGO de 10 cm con fase móvil de fosfatos y propanolol para detectar por fosforescencia. Los tres métodos descritos utilizan material diferente al que existía para iniciar el presente trabajo (Lab 113, Fac. de Química, Edificio E). La cuantificación de naproxenato de naproxenilo no cuenta con reportes.

Para iniciar la optimización del proceso de separación y cuantificación de naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo se contaba ya con unas condiciones de análisis probadas anteriormente en el laboratorio de Biofarmacia y de las cuales se partió para lograr los objetivos de éste trabajo:



Cromatógrafo de líquidos	Modulo de análisis para Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia Agilent Serie 1100
Inyector	Automático
Detector	Agilent UV-Visible
Bomba	126 o equivalente
Columna	Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 5 µm de tamaño de partícula
Flujo	0.7 mL /min
Fase móvil	60 % Acetonitrilo 40% Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M y pH de 2.5
Vol. Inyección	20 µL
Muestra a inyectar:	Solución en metanol RA de las siguientes sustancias: 20 µg/mL de Naproxeno SR 80 µg/mL de Naproxol SR 20 µg/ mL de Naproxenato de naproxenilo
Tiempo de análisis	15 minutos para obtener la señal de las tres sustancias.

Con estas características particulares, se obtiene primero la señal de la fase móvil, después la del naproxeno, casi inmediatamente la de naproxol y finalmente, la de naproxenato de naproxenilo.

Sustancia, señal.	Tiempo de retención, min.
Naproxeno	2.17
Naproxol	2.36
Naproxenato de naproxenilo	13.74

**Tabla 4. Tiempos de retención de los analitos de interés a las condiciones reportadas en el laboratorio 113 de Biofarmacia.**

## 2.8 SELECCIÓN DE LOS FACTORES QUE MODIFICAN LA RESPUESTA ANALÍTICA EN CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

Con base en la información bibliográfica y en los antecedentes de desarrollo del método (datos obtenidos en el lab 113, Biofarmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM) se decidió establecer los siguientes factores como variables dentro de los diseños experimentales a utilizar en este trabajo: polaridad de la fase móvil, pH de la solución amortiguadora y tamaño de partícula. De inicio, son factores esenciales a modificar por la



gran influencia que tienen sobre las respuestas cromatográficas: la polaridad de la fase influye directamente en los tiempos de retención y en la forma del pico cromatográfico así como en la resolución; el pH tiene influencia en la resolución y formas de la señal, al igual que el tamaño de partícula, agregando que estos factores son de fácil modificación experimental. Determinar la resolución es muy importante y nos da una idea general de cómo funciona el sistema cromatográfico pues su valor depende principalmente de dos factores: ancho del pico y la distancia entre ellos. La eficiencia de la columna y la selectividad afectan la resolución. La primera de la columna esta en función del flujo de la fase móvil, tamaño de partícula del empaque de la columna y la viscosidad del disolvente. La selectividad de la columna es resultado de la interacción del soluto con el disolvente y el empaque de la columna.

En el esquema de la figura 8 podemos observar el proceso cromatográfico y las variables principales dentro de éste, haciendo la analogía con el diagrama de "caja negra".

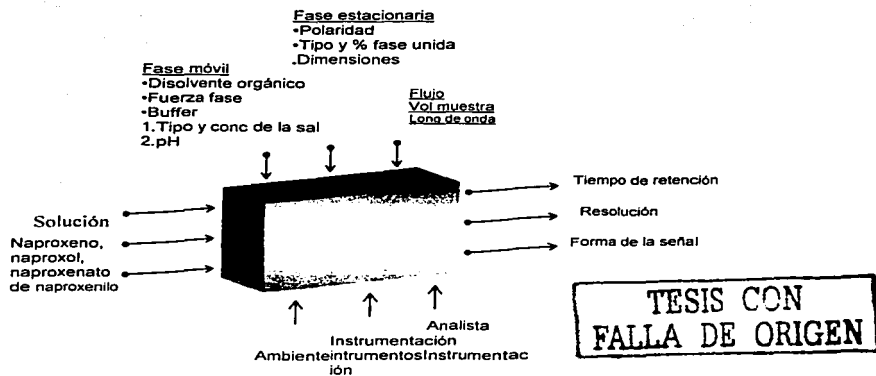


Fig 8. Esquema de caja negra de un procedimiento cromatográfico.

**III**  
**PARTE EXPERIMENTAL**



Previo al comienzo de la parte experimental, se estableció un diagrama de flujo con los pasos a seguir:

**I.** Recopilar información bibliográfica de la propiedades de los analitos y de métodos de análisis reportados de naproxeno y sustancias relacionadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (Ver generalidades, página 19).

**II.** Evaluar los materiales que se pudieran utilizar y cuáles de estos se pueden conseguir para tenerlos disponibles durante el desarrollo.

**III.** Establecer las condiciones iniciales de análisis (sistema preliminar) en las que se obtengan señales de todos los analitos de interés. (Ver generalidades, página 22, puesto que ya se contaba con referencia experimental dentro del mismo laboratorio de trabajo, Biofarmacia, lab 112-113).

**IV.** Plantear el primer diseño experimental en base a las modificaciones en las respuestas que buscamos y con el fin de conocer como se comporta el sistema dentro de una superficie amplia de trabajo. Modificar características de polaridad y pH de la fase móvil.

**V.** Plantear el segundo diseño experimental que permita obtener las señales con resolución de 3 o más y con simetría menor a 2 (con un ideal de 1).

**VI.** Definir si son necesarios más ajustes al sistema de análisis para proponer un tercer diseño con el que podamos optimizar el análisis y disminuir el tiempo para realizarlo.

**VII.** En base a la información de los diseños experimentales realizados, establecer las características finales de análisis.



**VIII.** Validar el sistema de análisis comenzando por la linealidad y la precisión; evaluar reproducibilidad intralaboratorio durante dos días de análisis. Trabajar con puntos control que nos permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de la validación.

**IX.** Determinación estadística de los puntos control con los resultados de linealidad que nos permita hacer un estimado de los límites de detección y cuantificación.

En este capítulo del trabajo, se dan los materiales, reactivos y características del instrumental utilizado; además de las soluciones y la forma en que se prepararon, antes de pasar al planteamiento de los diseños experimentales.





### 3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

#### 3.1.1 ESTÁNDARES

- Naproxeno estándar de trabajo, lote H.
- Naproxol estándar de trabajo.
- Naproxenato de naproxenilo estándar de trabajo.

Todos los estándares pertenecen al laboratorio de Biofarmacia 112-113, Edificio e, Facultad de Química.

#### 3.1.2 REACTIVOS

- Ácido fosfórico al 85 %  $H_3PO_4$ , Baker Reactivo (0260-62), peso molecular 98 g/mol.
- Fosfato de sodio monobásico cristal  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , J.T.Baker (3318-01), pureza 100.8%, peso molecular 137.99 g/mol.
- Hidroxido de sodio perlas NaOH, J.T.Baker (3722-01), pureza 98.4 %, peso molecular 40.00 g/mol.
- Metanol RA MeOH, J.T. Baker (9070-03) y Metanol HPLC, Mallinckrodt (3041), pureza 99.9%, peso molecular 32.04 g/mol.
- Acetonitrilo RA-HPLC  $CH_3CN$ , J.T.Baker (9017-03), pureza 99.8%, peso molecular 41.05 g/mol.
- Agua desionizada y desgasificada para trabajo en cromatografía.

### 3.2 INSTRUMENTACIÓN

#### 3.2.1 EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1100 con desionizador, bomba, inyector automático y detector UV conectados y manejados por el software ChemStation.
- Balanza Analítica Sartorius Tipo A 210P
- Phmetro modelo 301 Orion Research.



## 3.2.2 COLUMNAS

	<b>Novapack C18</b>	<b>Agilent C18</b>
<b>Marca</b>	Waters	Agilent
<b>Dimensiones</b>	150 X 3.9 mm	150 X 3.9 mm
<b>Tamaño de partícula</b>	5 $\mu$ m, esférica	3.5 $\mu$ m, esférica
<b>% de carbono</b>	7.3%	10%

Tabla 5. Características de las columnas utilizadas.

## 3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

## 3.3.1 SOLUCIONES REACTIVO

## 1. Ácido Fosfórico 1:10

En un vaso de precipitados de 200 mL agregar 45 mL de agua desionizada y agregar lentamente 5 mL de ácido fosfórico al 85%.

## 2. Hidróxido de sodio 2 N

Pesar en un matraz aforado de 50 mL aproximadamente 0.400 g de hidróxido de sodio (perlas) y agregar lentamente 5 mL de agua para disolver, llevar al aforo con agua destilada.

3. Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.02 M, la cantidad a pesar para cada valor de pH se muestra en la tabla 6.

## a. pH 2

A 50 mL de agua desionizada se le agregan 1.35 mL de ácido fosfórico concentrado para después pasar a un matraz volumétrico de 1 L y llenar con agua desionizada casi hasta el nivel del recipiente. Medir el pH final con el pHmetro y ajustar con solución de hidróxido de sodio 2 N, finalmente, aforar a volumen y desgasificar por sonicación para poder utilizarla en el cromatógrafo de líquidos.



b. pH 3, 4 y 5

Pesar en un vaso de precipitados de 50 mL la cantidad necesaria de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y disolver en agua desionizada, pasar esta solución a un matraz aforado y llenar con agua casi hasta el nivel del aforo. Medir pH y en caso necesario ajustar con una solución de hidróxido de sodio 2N o con una solución preparada a partir de la dilución 1:10 de ácido fosfórico concentrado; finalmente, llevar al aforo con agua desionizada y desgasificar para su uso en cromatografía.

pH	Cantidad de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g).
3	2.28
4	2.71
5	2.75

Tabla 6. Cantidad de sal de fosfatos necesaria para la preparación de las soluciones amortiguadoras.

### 3.3.2 SOLUCIONES DE REFERENCIA DE NAPROXENOS, NAPROXOL Y NAPROXENATO DE NAPROXENILO

#### 3.3.2.1 Solución de referencia para todos los diseños experimentales

Pesar con exactitud 0.0100 g de cada sustancia (naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo) en diferentes matraces volumétricos de 50 mL, disolver con agitación mecánica y llevar al aforo con metanol RA para después tomar 1 mL de cada solución y llevar a un cuarto matraz de 50 mL que se afora con el mismo disolvente. La concentración final de cada analito es de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 3.3.2.2 Solución stock de Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo

Disolver con metanol RA en un mismo matraz volumétrico de 50 mL:

Sustancia	Cantidad (g)	Concentración final ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Naproxen	0.0050	100
Naproxol	0.0050	100
Naproxenato de naproxenilo	0.0030	60

Tabla 7. Peso de los analitos para preparar las soluciones stock.

Finalmente, llevar al aforo con metanol RA.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.4 PLANTEAMIENTO DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 3.4.1 DISEÑO A

Con el primer diseño experimental se determinarían las condiciones de polaridad de la fase móvil a la que obtendríamos bajo tiempo de retención y, en combinación con los otros dos factores, buena resolución (mayor a 3) y simetría (menor a 2) de las señales para el análisis de las moléculas. Las hipótesis de prueba fueron las siguientes: a mayor fuerza de fase móvil, se esperaba que el tiempo de retención de las señales bajaray disminuiría la anchura de pico; el pH también influiría en la forma de la señal, esperando tener picos más simétricos a menor pH ,como lo han mostrado los métodos analíticos ya desarrollados, y el tamaño de partícula afectaría el tiempo de retención (aumenta el tiempo de retención cuando disminuye el tamaño de partícula). El diseño experimental se muestra en la tabla 8.

	A	B	C
	Polaridad o fuerza de la fase móvil.	pH de la solución amortiguadora de fosfatos usada en la fase móvil.	Tamaño de partícula de la fase estacionaria.
-1	60% ACN	2	3.5 µm
+1	40% ACN	5	5.0 µm

Tabla 8. Factores y niveles del Diseño A.

Se trabajó con dos niveles para cada factor, y se utilizaron los valores numéricos para cada nivel evaluado.

Los factores que permanecen constantes se muestran a continuación:

Cromatógrafo de líquidos	Modulo de análisis para Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
Inyector	Agilent Serie 1100
Detector	Automático
Bomba	Agilent UV-Visible
Columna	126 o equivalente
Flujo	C18, 150 X 3.9 mm
Fase móvil	0.7 mL /min
Vol. Inyección	Acetonitrilo
Muestra a inyectar:	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M
	20 µL
	Solución en metanol RA de las siguientes sustancias:
	20 µg/mL de Naproxeno SR
	80 µg/mL de Naproxol SR
	20 µg/ mL de Naproxenato de naproxenilo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Es necesario realizar varias repeticiones para así poder evaluar los tiempos de retención, las resoluciones correspondientes entre cada par de señales y las simetrías. En el caso del diseño experimental A los experimentos se realizaron por 6 y se dividieron por bloques.

Las variables de respuesta a analizar:

- Tiempo de retención del naproxeno
- Tiempo de retención del naproxol
- Tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo
- Resolución entre señales (de naproxol y naproxilo)
- Simetrías para cada analito (las medibles).

La tabla 9 muestra el diseño factorial  $2^3$  completo indicándose todos los factores evaluados en cada bloque.

FzaFM %ACN	pH	Tam part $\mu\text{m}$	trN min	trNOH min	tr NN min	Rs1	s N	s NOH
40	2.4	5.0						
60	2.4	3.5						
60	2.4	5.0						
60	4.8	3.5						
40	4.8	5.0						
40	2.4	3.5						
40	4.8	3.5						
60	4.8	5.0						

Donde:

**FzaFM:** Fuerza o polaridad en % de acetonitrilo de la fase móvil.

**pH:** pH de la solución amortiguadora de fosfatos en la fase móvil.

**Tam part:** tamaño de partícula de la fase estacionaria o columna en  $\mu\text{m}$ .

**TrN:** tiempo de retención del naproxeno.

**tr NOH:** tiempo de retención del naproxol.

**tr NN:** tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo.

**Rs1:** Resolución entre las señales respuesta del naproxeno y naproxol.

**s N:** simetría de la señal correspondiente a naproxeno.

**s NOH:** simetría del pico correspondiente a naproxol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Respuestas a medir en el Diseño A.



**3.4.2 DISEÑO B**

Con la realización del Diseño B, se trato de disminuir el tiempo de análisis en general variando para tal efecto solo dos factores: polaridad, la cual influye mucho en el tiempo de retención y pH de la solución amortiguadora, y así obtener la señal del naproxenato de naproxenilo más pronto de lo logrado con el diseño anterior optimizando al mismo tiempo la forma de los picos cromatográficos. Las condiciones:

Cromatógrafo de líquidos	Modulo de análisis para Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia Agilent Serie 1100
Inyector	Automático
Detector	Agilent UV-Visible
Columna	Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 3.5 µm tamaño de partícula.
Flujo	0.7 mL /min
Fase móvil	Acetonitrilo
Vol. Inyección	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M 20 µL
Muestra a inyectar:	Solución en metanol RA de las siguientes sustancias a las concentraciones citadas: 20 µg/mL de Naproxeno SR 20 µg/mL de Naproxol SR 20 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

De nuevo, trabajamos con nivel alto y bajo en cada factor tabulando los valores reales numéricos que codificados corresponden a nivel alto como +1 y nivel bajo como -1.

	A	B
Polaridad o fuerza de la fase móvil.	pH solución amortiguadora de fosfatos en la fase móvil.	
-1	90% ACN	3
+1	80% ACN	5

**Tabla 10. Factores y niveles del Diseño B.**

Es necesario realizar varias repeticiones (seis) en cada condición y establecer las variables respuesta a analizar que en principio, serían como en el Diseño A:

- Tiempo de retención del naproxeno
- Tiempo de retención del naproxol

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo
- Resolución entre señales
- Simetrías para cada analito.

La tabla 11 muestra el diseño factorial completo indicándose todos los factores evaluados en cada bloque y la secuencia de realización.

FzaFM %ACN	pH	trN min	trNOH min	tr NN min	Rs1	s N	s NOH
90	3.0						
80	3.0						
90	5.0						
80	5.0						

Donde:

**FzaFM:** Fuerza o polaridad en % de acetonitrilo de la fase móvil.

**pH:** pH de la solución amortiguadora de fosfatos en la fase móvil.

**trN:** tiempo de retención del naproxeno.

**tr NOH:** tiempo de retención del naproxol.

**tr NN:** tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo.

**Rs1:** Resolución entre las señales respuesta del naproxeno y naproxol.

**s N:** simetría de la señal del naproxeno.

**s NOH:** simetría del pico correspondiente a naproxol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 11. Respuestas a medir en el Diseño B.**

### 3.4.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE

Con el análisis de los datos del Diseño B se pudo utilizar el DRY-LAB ® para obtener las condiciones de gradiente de polaridad de la fase móvil, en caso de que este sea viable. Este programa nos dió, con la entrada de los datos de un número corto de corridas en el cromatógrafo, del valor de volumen muerto de este y la temperatura de trabajo, las características cromatográficas en que se podrían obtener respuestas o señales con resolución mayor a 3 y tiempos de retención menores a 12 minutos con el gradual cambio de polaridad de la mezcla de disolventes.



Los datos que se introdujeron en el paquete DRY-LAB ® fueron:

- Nombre de los disolventes utilizados, características de la fase acuosa (solución amortiguadora).
- Concentración en porcentaje de cada disolvente al inicio de las corridas.
- Concentración deseada de cada disolvente al final de cada corrida.
- Dos diferentes tiempos de gradiente, entre los cuales deseamos que se encuentre nuestra corrida analítica.
- Flujo en mL/min.
- Volúmen muerto del equipo cromatográfico.
- Tiempos de retención obtenidos finalmente para cada corrida o para cada tiempo de gradiente.

Se realizaron por triplicado inyecciones de la solución en metanol de los tres analitos a dos condiciones diferentes de gradiente, condiciones que previamente se establecieron con los diseños A y B, y así poder obtener el promedio y proporcionárselos al DRY-LAB ®.

Permanecieron iguales en ambas condiciones de gradiente:

Cromatógrafo	Modulo de análisis para Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Agilent Serie 1100
Inyector	Automático
Detectores	Agilent UV-Visible
Columna	Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 3.5 µm tamaño de partícula.
Flujo	0.7 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo
Vol. Inyección	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M 20 µL
Muestra a inyectar:	Solución en metanol RA de las siguientes sustancias a las concentraciones citadas: 20 µg/mL de Naproxeno SR 20 µg/mL de Naproxol SR 20 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Se modificó el gradiente de la siguiente manera:

Primeras condiciones:		Segundas condiciones:	
Tiempo en min	Composición fase móvil	Tiempo en min	Composición fase móvil
0	60% ACN 40% Solución buffer	0	60% ACN 40% Solución buffer
10	95% ACN 5% Solución buffer	20	95% ACN 5% Solución buffer

**Tabla 12. Condiciones de gradiente a medir con el DRY LAB ®.**





Una vez que DRY-LAB ® nos sugirió el tiempo de gradiente adecuado se comprobó experimentalmente dicho tiempo y se corroboraron los datos en laboratorio con los teóricos.

### 3.4.4 DISEÑO C

Debido a cambios en el equipo de trabajo (cromatógrafo de líquidos), se tuvieron que realizar modificaciones al método, y con esto, el planteamiento de un nuevo diseño que nos permitiera optimizar la respuesta. Con los cambios en el cromatógrafo, se encontraron respuestas cromatográficas distintas en cuanto a la forma y tiempos a que se había llegado con los anteriores diseños (A, B) y el DRY-LAB ®.

Cromatógrafo de líquidos	Modulo de análisis para Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia Agilent Serie 1100
Inyector	Automático
Detector	Agilent UV-Visible
Columna	Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 3.5 µm tamaño de partícula.
Flujo	0.7 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo
Vol. Inyección	Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M 20 µL
Muestra a inyectar:	Solución en metanol RA de las siguientes sustancias a las concentraciones citadas: 20 µg/mL de Naproxeno SR 20 µg/mL de Naproxol SR 20 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

El diseño de tipo factorial con dos niveles, bajo y alto, es el siguiente. Esquemáticamente, presenta una forma de cuadrado 2 x 2.

	A	B
	Polaridad o fuerza de la fase móvil.	pH solución amortiguadora de fosfatos fase móvil.
-1	60% ACN	3
+1	45% ACN	5

Tabla 13. Factores y niveles del Diseño C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se realizaron tres repeticiones en cada condición y no seis ya que el presente diseño solo se usó para precisar los efectos de pH y constitución de fase móvil sobre el sistema. La respuesta a analizar de inicio fueron las siguientes:

- Tiempo de retención del naproxeno
- Tiempo de retención del naproxol
- Tiempo de retención del naproxenato de naproxenilo
- Resolución entre señales
- Simetrías para cada analito.

La tabla 14 muestra el diseño factorial completo indicándose todos los factores evaluados en cada bloque.

Fza FM % ACN	pH	trN min	trNOH min	s N	s NOH	Rsl
45	3					
60	3					
45	5					
60	5					

Donde:

**Fza FM:** Fuerza o polaridad en % de acetonitrilo de la fase móvil.

**pH:** pH de la solución amortiguadora de fosfatos en la fase móvil.

**trN:** tiempo de retención del naproxeno.

**tr NOH:** tiempo de retención del naproxol.

**Rsl:** Resolución entre las señales respuesta del naproxeno y naproxol.

**s N:** simetría de la señal correspondiente a naproxeno.

**s NOH:** simetría del pico correspondiente a naproxol.

Tabla 14. Respuestas a medir en el Diseño C.

Cuando se ha hecho el estudio del efecto de los factores sobre las variables respuesta, simplemente se establecen las condiciones de análisis y se prueban experimentalmente realizando pequeñas modificaciones finales para mejorar las respuestas, -que en este caso serán las pruebas de las condiciones de gradiente que ya se habían establecido antes de los cambios en el cromatógrafo- a este nuevo sistema de análisis cromatográfico.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.5 VALIDACIÓN

Se realizó la validación del sistema probando los parámetros de linealidad y precisión. Además, se probó la reproducibilidad analizando el efecto de los días para un mismo analista. Se introdujeron al análisis puntos control a tres concentraciones: alta, media y baja, como una forma de seguimiento del método analítico; estos puntos control se distribuyeron y midieron a lo largo de cada corrida analítica bajo el mismo procedimiento y al mismo tiempo que las muestras problema. Su análisis debe mostrar que cumplen con los criterios de precisión y exactitud establecidos durante la validación del método. Las muestras control sirven como criterio de aceptación o rechazo de una corrida analítica.<sup>11</sup>

#### 3.5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Probando la linealidad durante dos días diferentes, se hicieron tres curvas de calibración partiendo de la misma solución stock en metanol y realizando las diluciones correspondientes en tres ocasiones (para cada curva):

Sustancia Solución stock	Cantidad (g)	Concentración final (µg/mL)
Naproxen	0.0050	100
Naproxol	0.0050	100
Naproxenato de naproxenilo	0.0030	60

Tabla 15. Cantidad de analito presente en la solución stock.

La concentración final de las soluciones a inyectar esta en la tabla 16:

Naproxeno	Naproxol	Naproxenato de naproxenilo	Volumen sin stock	Volumen final
µg/mL	µg/mL	µg/mL	µL	ML
0.25	0.25	0.15	25	10
0.5	0.5	0.3	50	10
0.75	0.75	0.45	75	10
1	1	0.6	100	10
2.5	2.5	1.5	250	10
4	4	2.4	400	10
6	6	3.6	600	10
8	8	4.8	800	10
10	10	6	1000	10
15	15	9	1500	10

Tabla 16. Concentración de cada analito en los puntos de la curva patrón.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 3.5.2 PRECISION DEL SISTEMA

Con los datos de linealidad, se realiza la división del área obtenida para cada concentración entre dicha concentración, se obtiene el coeficiente de variación para las tres rectas y este debe ser menor al 2%.

#### 3.5.2.1 Reproducibilidad

La precisión y la linealidad deben ser comparables y presentar un coeficiente de variación menor al 2% en dos días distintos realizadas las mediciones por el mismo analista.

### 3.5.3 PUNTOS CONTROL

Se establecieron las concentraciones de los puntos control con base en el rango lineal de los analitos, es decir, un punto a una concentración baja, uno a una concentración media y uno más a concentración alta situándonos dentro del intervalo de concentraciones luego de la obtención de los resultados de linealidad del sistema. Para naproxeno y naproxol, las concentraciones fueron: 0.75, 4.0 y 10.0  $\mu\text{g/mL}$  y para naproxenato de naproxenilo fueron: 0.45, 2.4 y 6.0  $\mu\text{g/mL}$ . Cada punto fue evaluado por quintuplicado.

### 3.5.4 LIMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y de cuantificación se pueden estimar estadísticamente a través de las curvas de calibración realizadas para la linealidad del sistema con las siguientes fórmulas:

- Límite de detección LD =  $3 * (\text{desviación estándar de las ordenadas al origen} / \text{promedio de las pendientes obtenidas})$ .
- Límite de cuantificación LC =  $10 * (\text{desviación estándar de las ordenadas al origen} / \text{promedio de las pendientes obtenidas})$ .



## IV

## RESULTADOS



## 4.1 RESULTADOS DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

## 4.1.1 DISEÑO A

La hoja de resultados del Diseño A se muestra a continuación (tabla 17), los espacios en blanco o con guiones, se deben a que las señales no contaban con buena resolución (resolución de cero) por lo que fue imposible determinar la simetría de la señal.

Bloque	Fza FM % ACN	pH	Tam part µm	trN min	trNOH min	tr NN min	RsI	s N	s NOH
1	40	2.4	5.0	4.859	5.18	50	1.142	1.673	0.904
	60	2.4	3.5	4.235	4.576	45	2.745	0.963	0.87
	60	2.4	5.0	2.118	2.392	13.416	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.848	4.541	50	5.378	1.84	1.038
	40	4.8	5.0	4.007	5.106	45	3.665	1.075	0.783
	40	2.4	3.5	13.68	13.68	50	0	0.939	0.939
	40	4.8	3.5	9.776	13.842	50	12.432	2.862	1.475
	60	4.8	5.0	2.003	2.393	12.994	0	-	-
2	40	2.4	5.0	4.815	5.154	50	1.255	1.652	0.89
	60	2.4	3.5	4.301	4.655	45	2.803	1.067	1.015
	60	2.4	5.0	2.115	2.395	13.42	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.825	4.546	50	5.692	1.777	1.032
	40	4.8	5.0	3.998	5.147	45	4.339	1.077	0.76
	40	2.4	3.5	13.647	13.647	50	0	0.918	0.918
	40	4.8	3.5	9.534	13.689	50	13.041	2.836	1.476
	60	4.8	5.0	2.002	2.4	13.312	0	-	-
3	40	2.4	5.0	4.782	5.127	50	1.273	1.678	0.929
	60	2.4	3.5	4.311	4.666	45	2.914	0.988	0.956
	60	2.4	5.0	2.111	2.261	13.379	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.644	4.320	50	5.252	1.754	1.078
	40	4.8	5.0	3.671	4.747	45	3.163	1.572	0.816
	40	2.4	3.5	13.621	13.647	50	0	0.906	0.906
	40	4.8	3.5	9.482	13.588	50	12.893	2.928	1.47
	60	4.8	5.0	1.952	2.282	12.963	0	-	-
4	40	2.4	5.0	4.815	5.158	50	1.271	1.603	0.919
	60	2.4	3.5	4.311	4.665	45	2.806	1.063	1.015
	60	2.4	5.0	2.13	2.393	13.382	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.691	4.379	50	5.354	1.81	1.075
	40	4.8	5.0	3.516	4.602	45	2.909	1.631	0.842
	40	2.4	3.5	13.635	13.635	50	0	0.898	0.898
	40	4.8	3.5	9.276	13.559	50	13.227	3.075	1.46
	60	4.8	5.0	1.878	2.237	12.703	0	-	-
5	40	2.4	5.0	4.801	5.144	50	1.272	1.718	0.931
	60	2.4	3.5	4.309	4.665	45	2.829	1.065	1.012
	60	2.4	5.0	2.124	2.393	13.385	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.708	4.395	50	5.354	1.752	1.068
	40	4.8	5.0	3.696	4.780	45	3.246	1.563	0.831
	40	2.4	3.5	13.621	13.621	50	0	0.891	0.891
	40	4.8	3.5	9.119	13.542	50	13.972	3.198	1.491
	60	4.8	5.0	1.901	2.249	12.724	0	-	-
40	2.4	5.0	4.806	5.151	50	1.275	1.601	0.917	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

6	60	2.4	3.5	4.312	4.668	45	2.782	1.074	1.025
	60	2.4	5.0	2.114	2.391	13.369	0	-	-
	60	4.8	3.5	3.734	4.412	50	5.37	1.742	1.056
	40	4.8	5.0	3.578	4.651	45	2.942	1.74	0.851
	40	2.4	3.5	13.639	13.639	50	0	0.891	0.891
	40	4.8	3.5	8.951	13.529	50	14.373	3.285	1.521
60	4.8	5.0	1.902	2.270	12.732	0	-	-	

Tabla 17. Respuestas del Diseño A.

Nota: Los valores de pH tabulados no corresponden exactamente a los que la tabla 8 tiene pues en la tabla 17 son los medidos con el pHmetro.

#### 4.1.2 DISEÑO B

La tabla de resultados es la que se muestra a continuación (tabla 18), los porcentajes altos de acetnitrilo se probaron con el fin de conseguir condiciones isocráticas de análisis. En todos los casos, la resolución y simetrías de naproxeno y naproxol no se pudieron obtener, ambas señales siempre salen juntas por lo que como resolución se dan valores de cero y para las simetrías los espacios permanecen en blanco por esta razón (guiones).

Bloque o repetición	FzaFM %ACN	pH	TrN Min	tr NOH min	tr NN min	s NN
1	90	3.0	2.547	2.677	2.590	0.835
	80	3.0	2.665	3.018	11.437	0.883
	90	5.0	2.494	2.725	5.952	0.845
	80	5.0	2.682	3.021	11.582	0.877
2	90	3.0	2.522	2.676	5.561	0.836
	80	3.0	2.652	3.014	11.490	0.880
	90	5.0	2.492	2.725	5.957	0.848
	80	5.0	2.712	3.037	11.699	0.875
3	90	3.0	2.536	2.678	5.580	0.839
	80	3.0	2.677	3.039	11.615	0.883
	90	5.0	2.577	2.726	5.960	0.849
	80	5.0	2.702	3.034	11.722	0.873
4	90	3.0	2.552	2.685	5.591	0.839
	80	3.0	2.692	3.034	11.626	0.881
	90	5.0	2.500	2.727	5.961	0.846
	80	5.0	2.424	3.038	11.739	0.874
5	90	3.0	2.553	2.687	5.591	0.838
	80	3.0	2.697	3.033	11.653	0.882
	90	5.0	2.491	2.731	5.972	0.847
	80	5.0	2.454	3.034	11.733	0.873
6	90	3.0	2.561	2.687	5.646	0.838
	80	3.0	2.706	3.036	11.687	0.880
	90	5.0	2.500	2.729	5.970	0.848
	80	5.0	2.401	3.039	11.738	0.875

Tabla 18. Respuestas del Diseño B.

Nota.- Los valores de pH son los reales medidos experimentalmente con pHmetro Orion.



En el apéndice I se pueden ver los cromatogramas correspondientes al diseño B, un ejemplo por cada condición analítica.

#### 4.1.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE

Los datos fueron introducidos al software DRY-LAB:

##### Disolventes utilizados:

- Acetonitrilo HPLC.
- Solución de fosfato dibásico de sodio 0.02 M a pH de 3.

Con el gradiente, se tuvieron de inicio condiciones muy parecidas a las manejadas en el Diseño A, el valor de pH se decidió con base en la buena resolución que se obtiene (aproximadamente 3.5, ver gráfica de contornos de resolución en función del pH y fuerza de fase móvil para Diseño A ó Gráfico 12) a 60% de acetonitrilo.

##### Concentración de cada disolvente al inicio de las corridas.

- Acetonitrilo 60%
- Solución de fosfatos: 40%.

Un gradiente en cromatografía puede aportar diversas dificultades al método, por ejemplo, puede dar una señal base poco estable, mientras el gradiente sea lo menos drástico posible esperamos tener una línea base lo más estable y mantendremos igualmente condiciones de presión constantes para mantener las condiciones de empaque de la columna.

##### Concentración de cada disolvente al inicio y al final de las corridas.

	Acetonitrilo %	Solución de fosfatos %
Concentraciones de inicio	60	40
Concentraciones finales	95	5

Tabla 19. Variación de la composición de la fase móvil durante el gradiente.

##### Dos diferentes tiempos de gradiente.

Condiciones 1: 10 min de gradiente



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Condiciones 2: 20 min de gradiente.

Flujo en mL/min.

0.7 mL/min

Volumen muerto del equipo cromatográfico.

- 0.0123 cm<sup>3</sup>.

Tiempos de retención obtenidos finalmente.

Condiciones 1. (10 min)	a	b	c	Promedio	deav est	% CV
Naproxeno	4.126	4.13	4.128	4.128	0.0020	0.05
Naproxol	4.451	4.455	4.454	4.453	0.0021	0.05
Naproxenato de naproxilo	12.913	12.918	12.913	12.915	0.0029	0.02

Condiciones 2. (20 min)	a	b	c	Promedio	deav est	% CV
Naproxeno	4.196	4.179	4.178	4.184	0.0101	0.24
Naproxol	4.538	4.523	4.523	4.528	0.0087	0.19
Naproxenato de naproxilo	18.224	18.217	18.199	18.213	0.0129	0.07

Tabla 20. Resultados de los gradientes para DRY LAB

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.1.4 DISEÑO C

Los resultados del diseño experimental son:

Bloque o repetición	FzaFM %ACN	pH	trN min	trNOH min	s N	s NOH	Rs1
1	45	3	9.514	10.02	0.70	0.70	1.10
1	60	3	4.279	4.654	0.84	0.77	1.48
1	45	5	5.329	10.147	2.2	0.64	10.23
1	60	5	3.458	4.785	1.96	0.78	4.85
2	45	3	9.474	10.017	0.70	0.70	1.09
2	60	3	4.434	4.819	0.88	0.83	1.43
2	45	5	5.290	10.153	2.16	0.64	10.39
2	60	5	3.443	4.777	2.02	0.77	4.92
3	45	3	9.472	10.022	0.70	0.70	1.11
3	60	3	4.434	4.822	0.89	0.84	1.42
3	45	5	5.300	10.150	2.10	0.70	10.30
3	60	5	3.439	4.776	2.00	0.77	4.94

Tabla 21. Respuestas del Diseño C.



## 4.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### 4.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD

En las tablas 22 a 27 se muestran los resultados de las curvas de calibración para evaluar linealidad (concentración y áreas) por día y para cada analito y las gráficas 1 a 3 son las correspondientes para dicha prueba para el primer día de análisis, siendo similares las del día 2 de trabajo de laboratorio.

#### 4.2.1.1 Naproxeno

Día 1 NAPROXENO

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.25	5.3168	6.7570	5.9110	5.9949	0.72374	12.07
0.5	14.1574	14.0300	13.9661	14.0511	0.09738	0.69
0.75	21.2265	21.3211	20.9321	21.1599	0.20288	0.96
1	28.1511	28.9658	28.8859	28.6676	0.44912	1.57
2.5	73.3388	73.8500	72.5980	73.2622	0.62951	0.86
4	115.1115	115.0746	116.6072	115.5978	0.87435	0.76
6	174.8532	174.8859	175.1028	174.9473	0.13563	0.08
8	234.1397	233.7074	236.6663	234.8378	1.59824	0.68
10	290.2040	299.6451	299.8796	296.5763	5.51978	1.86
15	439.5937	442.3522	441.5134	441.1531	1.41412	0.32

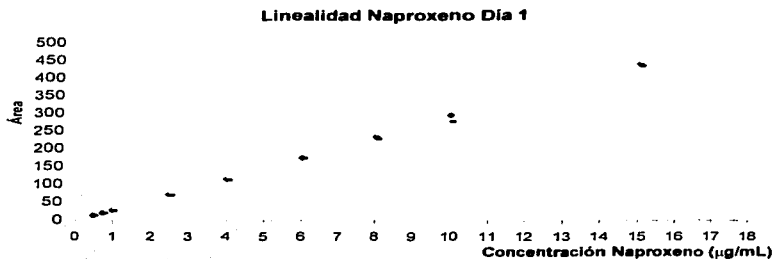
Día 2 NAPROXENO

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.25	6.9355	6.4901	7.4477	6.9578	0.47919	6.89
0.5	14.1659	14.0120	14.0276	14.0685	0.08474	0.60
0.75	21.1637	20.8421	20.8224	20.9427	0.19158	0.91
1	29.0054	28.9420	29.0935	29.0136	0.07611	0.26
2.5	73.3912	72.4915	71.9490	72.6106	0.72842	1.00
4	115.2070	114.8907	114.8164	114.9714	0.20744	0.18
6	172.0715	171.9271	174.6473	172.8820	1.53052	0.89
8	231.5846	234.4083	234.5121	233.5016	1.66102	0.71
10	288.2670	288.3245	287.9565	288.1827	0.19797	0.07
15	437.4315	444.8312	439.0853	440.4493	3.88389	0.88

Tablas 22 y 23. Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, áreas de las curvas patrón correspondientes a naproxeno, Día 1 y Día 2.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Gráfico 1. Linealidad del naproxeno, primer día de análisis,  
Área contra concentración.**

#### 4.2.1.2 Naproxol

##### Día 1 NAPROXOL

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.25	7.6745	5.3840	7.4440	6.8342	1.26116	18.45
0.5	11.4492	11.4565	11.5200	11.4752	0.03893	0.34
0.75	17.1546	17.2412	17.1518	17.1825	0.05086	0.30
1	23.0000	23.0087	23.2522	23.0870	0.14319	0.62
2.5	57.4496	58.1933	58.2344	57.9591	0.44175	0.76
4	91.0573	91.1739	92.1141	91.4484	0.57945	0.63
6	135.0128	135.1092	134.8227	134.9816	0.14580	0.11
8	179.0252	179.3218	179.0658	179.1376	0.16081	0.09
10	222.7965	222.8826	223.3299	223.0030	0.28637	0.13
15	336.6504	338.6003	335.4440	336.8982	1.59269	0.47

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## Día 2 NAPROXOL

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.25	5.6637	5.1911	5.8584	5.5711	0.3432	6.16
0.5	11.4491	11.5674	11.7099	11.5755	0.1305	1.13
0.75	17.3803	16.8425	17.1371	17.1200	0.2693	1.57
1	22.8965	22.6468	22.6417	22.7283	0.1457	0.64
2.5	55.5847	55.7730	56.4965	55.9514	0.4814	0.86
4	88.5689	88.7262	88.6595	88.6515	0.0789	0.09
6	131.9812	131.8842	133.1662	132.3439	0.7138	0.54
8	176.9358	177.7091	178.0366	177.5605	0.5653	0.32
10	219.4671	219.3493	219.5194	219.4453	0.0871	0.04
15	332.5204	337.4474	332.9253	334.2977	2.7352	0.82

Tablas 24 y 25. Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, áreas de las curvas patrón correspondientes a naproxol, Día 1 y Día 2.

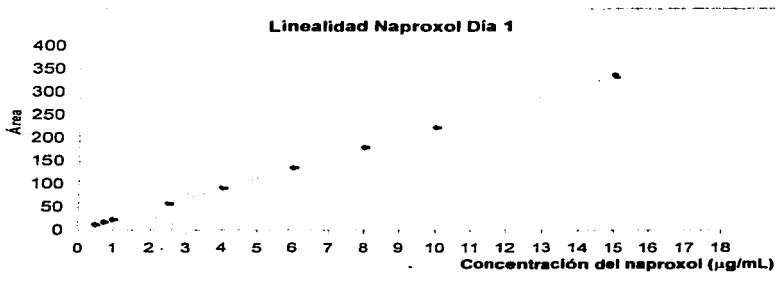


Gráfico 1. Linealidad del naproxol, primer día de análisis, Área en función de la concentración.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## 4.2.1.3 Naproxenato de naproxilo

Día 1 NAPROXENATO DE NAPROXILO

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.15	1.6528	4.0292	3.1062	2.9294	1.19804	40.90
0.3	7.2530	7.3366	7.3364	7.3187	0.03085	0.42
0.45	10.6228	10.6143	10.7717	10.6696	0.08848	0.83
0.6	14.5161	14.4921	14.6741	14.5607	0.09886	0.68
1.5	36.6264	36.3537	36.6732	36.5511	0.17253	0.47
2.4	57.9900	58.0473	57.9959	58.0111	0.03150	0.05
3.6	85.0930	85.0613	85.6143	85.2562	0.31052	0.36
4.8	112.1181	112.1637	113.4827	112.5882	0.77506	0.69
6	138.9793	139.2253	139.4495	139.2180	0.23523	0.17
9	209.3087	209.8702	209.9250	209.7013	0.34109	0.16

Día 2 NAPROXENATO DE NAPROXILO

Conc µg/mL	Áreas			Promedio	DE	% CV
	1	2	3			
0.15	3.1062	4.8160	7.3209	5.0810	2.11983	41.72
0.3	7.3366	7.3512	7.3554	7.3477	0.00986	0.13
0.45	10.6228	10.6143	10.7717	10.6696	0.08848	0.83
0.6	14.5161	14.4921	14.6564	14.5549	0.08874	0.61
1.5	36.6414	36.4136	36.3537	36.4696	0.15180	0.42
2.4	58.0341	58.6517	58.1978	58.2946	0.31997	0.55
3.6	85.0930	85.0613	85.6143	85.2562	0.31052	0.36
4.8	112.1637	113.4827	113.8954	113.1806	0.90453	0.80
6	138.9793	139.2253	139.6026	139.3691	0.47818	0.34
9	209.3087	209.8702	210.3175	209.8322	0.50547	0.24

Tablas 26 y 27. Resultados de la evaluación de la linealidad del sistema, áreas de las curvas patrón correspondientes a naproxenato de naproxilo, Día 1 y Día 2.

## Linealidad Naproxenato de naproxenilo Día 1

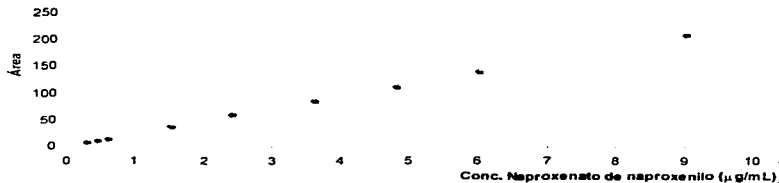


Gráfico 1. Linealidad del naproxenato de naproxenilo, primer día de análisis, Área contra concentración.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**4.2.2 EVALUACIÓN DE PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA**

Para demostrar la precisión y reproducibilidad del sistema, se realizó la división AREA/Concentración de la muestra para cada analito durante dos días consecutivos (datos de linealidad) y se obtuvo el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 2%, los resultados se encuentran tabulados (tablas 28 a 30) a continuación por molécula y al final de cada tabla están los coeficientes de variación con y sin la primera concentración.

**4.2.2.1 Naproxeno**

Conc µg/mL	Día 1			Día 2			Promedio	desv est	% CV	
	1	2	3	1	2	3				
0.25	21.2672	27.0278	23.6440	27.7420	25.9605	29.7909	25.9054	3.0450	0.82	
0.5	28.3147	28.0600	27.9321	28.3319	28.0240	28.0552	28.1196	0.1644	0.58	
0.75	28.3020	28.4282	27.9095	28.2182	27.7895	27.7632	28.0684	0.2838	1.01	
1	28.1511	28.9658	28.8859	29.0054	28.9420	29.0935	28.8406	0.3448	1.20	
2.5	29.3355	29.5400	29.0392	29.3565	28.9966	28.7796	29.1746	0.2823	0.97	
4	28.7779	28.7687	29.1518	28.8018	28.7227	28.7041	28.8211	0.1660	0.58	
6	29.1422	29.1477	29.1838	28.6786	28.6545	29.1079	28.9858	0.2486	0.86	
8	29.2675	29.2134	29.5833	28.9481	29.3010	29.3140	29.2712	0.2039	0.70	
10	29.0204	29.9645	29.9880	28.8267	28.8324	28.7956	29.2379	0.5774	1.97	
15	29.3082	29.4901	29.4342	29.1621	29.6554	29.2724	29.3867	0.1762	0.60	
Prom D EST % CV	Todos datos		Sin primera concentración							
	28.5811		28.5778							
	1.3615		1.3336							
4.7636		4.7636								

Tabla 28. Relación área/concentración para naproxeno durante los dos días de análisis para cada curva patrón.

**4.2.2.2 Naproxol**

Conc µg/mL	Día 1			Día 2			Promedio	desv est	% CV	
	1	2	3	1	2	3				
0.25	30.6980	21.5360	29.7759	22.6549	20.7644	23.4336	24.8105	4.3117	0.82	
0.5	22.8984	22.9129	23.0399	22.8983	23.1348	23.4197	23.0507	0.2043	0.89	
0.75	22.8727	22.9883	22.8690	23.1738	22.4567	22.8495	22.8683	0.2356	1.03	
1	23.0000	23.0087	23.2522	22.8965	22.6468	22.6417	22.9077	0.2351	1.03	
2.5	22.9798	23.2773	23.2938	22.2339	22.3092	22.5986	22.7821	0.4699	2.06	
4	22.7643	22.7935	23.0285	22.1422	22.1816	22.1649	22.5125	0.3940	1.75	
6	22.5021	22.5182	22.4704	21.9969	21.9807	22.1944	22.2771	0.2527	1.13	
8	22.3781	22.4152	22.3832	22.1170	22.2136	22.2546	22.2936	0.1175	0.53	
10	22.2797	22.2883	22.3330	21.9467	21.9349	21.9519	22.1224	0.1958	0.88	
15	22.4434	22.5734	22.3629	22.1680	22.4965	22.1950	22.3732	0.1638	0.73	
Prom D EST % CV	Todos datos		Sin primera concentración							
	22.7998		22.5784							
	1.4761		1.4041							
6.4744		1.7801								

Tabla 29. Relación área/concentración para naproxol durante los dos días de análisis para cada curva patrón.



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 4.2.2.3 Naproxenato de naproxilo

Conc µg/mL	Día 1			Día 2			Promedio	desv est	% CV
	1	2	3	1	2	3			
0.15	11.0185	26.8613	20.7081	20.7081	32.1065	48.8063	26.7015	12.9279	0.48
0.3	24.2768	24.4564	24.4545	24.4554	24.5039	24.5180	24.4440	0.0865	0.35
0.45	23.6063	23.5873	23.9370	23.6063	23.5873	23.9370	23.7102	0.1759	0.74
0.6	24.1935	24.1535	24.4568	24.1935	24.1535	24.4273	24.2630	0.1401	0.58
1.5	24.4176	24.2358	24.4488	24.4276	24.2757	24.2358	24.3402	0.1014	0.42
2.4	24.1625	24.1864	24.1650	24.1809	24.4382	24.2491	24.2303	0.1066	0.44
3.6	23.6369	23.6281	23.7817	23.6369	23.6281	23.7817	23.6823	0.0771	0.33
4.8	23.3579	23.3674	23.6422	23.3674	23.6422	23.7282	23.5176	0.1709	0.73
6	23.1632	23.2042	23.2416	23.1632	23.2042	23.3171	23.2156	0.0578	0.25
9	23.2565	23.3189	23.3250	23.2565	23.3189	23.3666	23.3074	0.0436	0.19
Prom	Sin primera concentración								
D EST	Todos datos								
% CV	24.1412	23.6257	23.6257						
	3.8851	0.4603	0.4603						
	16.0931	1.9281	1.9281						

Tabla 30. Relación área/concentración para naproxenato de naproxilo durante los dos días de análisis para cada curva patrón.

## 4.2.3 EVALUACIÓN DE LOS PUNTOS CONTROL

Además de estas mediciones, se añadieron puntos control: en cada día 5 mediciones individuales en una concentración baja, una media y una alta dentro del intervalo lineal. Estos datos debieron estar dentro del intervalo de predicción de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados después de realizar el análisis.

## 4.2.3.1 Naproxeno

Primer día de análisis.		Segundo día de análisis.	
C (µg/mL)	Área	C (µg/mL)	Área
0.75	19.9992	0.75	21.2149
0.75	21.7482	0.75	21.2636
0.75	19.9686	0.75	21.6841
0.75	22.4725	0.75	21.9191
0.75	21.9936	0.75	21.8496
4	115.2468	4	114.5630
4	114.7352	4	115.1729
4	118.6184	4	117.8755
4	118.0264	4	117.8755
4	118.3144	4	118.2285
10	295.7490	10	289.0183
10	292.9490	10	292.3276
10	295.0070	10	291.2854

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

10	293.5480	10	290.4491
10	294.2110	10	290.1797

Tabla 31. Relación concentración área para los puntos control de naproxeno.

## 4.2.3.2 Naproxol

Primer día de análisis.		Segundo día de análisis.	
C (µg/mL)	Área	C (µg/mL)	Área
0.75	17.2718	0.75	16.9758
0.75	17.4247	0.75	17.1017
0.75	17.3620	0.75	16.8837
0.75	18.1699	0.75	16.8992
0.75	18.3876	0.75	17.1645
4	90.9459	4	88.3498
4	90.9713	4	88.9189
4	91.1172	4	89.5255
4	91.5112	4	89.5259
4	91.8886	4	89.6871
10	223.1130	10	219.7593
10	223.2418	10	222.0438
10	226.1092	10	222.3733
10	226.0602	10	222.4215
10	224.9752	10	222.4188

Tabla 32. Relación concentración área para los puntos control de naproxol.

## 4.2.3.3 Naproxenato de naproxilo

Primer día de análisis.		Segundo día de análisis.	
C (µg/mL)	Área	C (µg/mL)	Área
0.45	9.9730	0.45	10.6781
0.45	10.6781	0.45	11.2451
0.45	11.2451	0.45	13.0076
0.45	11.3923	0.45	11.7383
0.45	12.9981	0.45	11.0744
2.4	58.0341	2.4	57.0300
2.4	58.1978	2.4	57.5673
2.4	55.6655	2.4	57.0359
2.4	55.1446	2.4	55.6655
2.4	57.8909	2.4	55.1446
6	139.2232	6	139.4495
6	139.9026	6	142.0622
6	141.7801	6	141.7801
6	141.7595	6	141.7595
6	141.3738	6	141.3738

Tabla 33. Relación concentración área para los puntos control de naproxenato de naproxilo.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### 4.2.4 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se utilizaron los datos de pendiente y ordenada de cada una de las tres curvas (en los dos días) realizadas en la evaluación de la linealidad. Los resultados se encuentran en las tablas 34 a 36.

##### 4.2.4.1 Naproxeno

	Ordenada	Pendiente
Promedio:	-1.17323	29.40307
Desv est:	0.47547	0.23302
Límite de detección para naproxeno:		LD = 0.048 µg/mL
Límite de cuantificación para naproxeno:		LC = 0.162 µg/mL

Tabla 34. Límites de detección y cuantificación para naproxeno.

##### 4.2.4.2 Naproxol

	Ordenada	Pendiente
Promedio:	0.52685	22.25515
Desv est:	0.56359	0.14762
Límite de detección para naproxol:		LD = 0.076 µg/mL
Límite de cuantificación para naproxol:		LC = 0.253 µg/mL

Tabla 35. Límites de detección y cuantificación para naproxol.

##### 4.2.4.3 Naproxenato de naproxilo

	Ordenada	Pendiente
Promedio:	1.04175	23.21287
Desv est:	0.07219	0.05938
Límite de detección para naproxenato de naproxilo:		LD = 0.010 µg/mL
Límite de cuantificación para naproxenato de naproxilo:		LC = 0.031 µg/mL

Tabla 36. Límites de detección y cuantificación para naproxenato de naproxilo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**V**  
**DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



## 5.1 DISEÑOS EXPERIMENTALES

## 5.1.1 DISEÑO A

Los resultados obtenidos como respuesta a los diseños experimentales se analizaron con el software STATGRAPHICS ®. Para el Diseño A, no se registran la resolución por naproxol y naproxenato de naproxilo (Rs2) ni la simetría del naproxenato de naproxilo (s NN), este último análisis no se detecta a menos de 30 minutos de análisis en muchos de los casos. STATGRAPHICS ® nos muestra páginas de análisis del diseño como la siguiente que se refiere al tiempo de retención del naproxeno.

Diseño: Factorial		2 <sup>3</sup>		Numero de repeticiones: 6		Numero de	
Numero de factores experimentales: 3							
respuestas: 6							
Numero de corridas: 48		Grados de libertad del error: 36		Experimento aleatorizado:			
S1							
Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continua			
-----	-----	-----	-----	-----			
FSA FM	40.0	60.0	% ACN	S1			
PH	2.4	4.8	um	S1			
t Part	3.5	5.0		S1			
-----	-----	-----	-----	-----			
Propuestas	Unidades						
-----	-----						
t r N	min						
t r NOH	min						
t r NN	min						
ps. 1							
S S							
S NOH							

Este primer diseño experimental nos muestra datos muy interesantes sobre el comportamiento del sistema, que también podemos observar a través de las diferentes gráficas o bien, con una ecuación que se ajuste a la señal cromatográfica. El paquete estadístico nos da los efectos estimados para cada variable y el ajuste al modelo matemático o  $R^2$  con lo que se puede construir dicha ecuación; sin embargo, hay que considerar igualmente el análisis de varianza proporcionado también por el paquete; entre otros datos, podemos observar los valores de F de Snedecor y el valor de P, F debe ser menor a la proporcionada en tablas para poder considerar que una variable no es significativa o bien, P debe ser mayor a 0.05.



Para tiempo de retención del naproxeno tr N tenemos:

```

Analysis Summary
-----
File name: C:\Mis documentos\Miriam\nueva\mezcla 1 con 6 k 2.sfx

Estimated effects for tr N
-----
Average = 5.45613 +/- 0.0346106
A:Fza FM = -4.86483 +/- 0.0346106
B:pH = -1.52208 +/- 0.0346106
C:t part = -4.60442 +/- 0.0346106
AB = 1.15433 +/- 0.0346106
AC = 2.61533 +/- 0.0346106
BC = 0.89825 +/- 0.0346106
ABC = -0.7095 +/- 0.0346106
-----
Standard errors are based on total error with 35 d.f.

Analysis of Variance for tr N
-----
Source          Sum of Squares  Df  Mean Square  F-Ratio  P-Value
-----
A:Fza FM        283.999         1    283.999     19756.89  0.0000
B:pH            27.8009         1     27.8009    1934.01   0.0000
C:t part       254.408         1    254.408    17698.31  0.0000
AB             15.9898         1     15.9898    112.36   0.0000
AC             82.0796         1     82.0796    5710.01  0.0000
BC             9.68224         1     9.68224    673.56   0.0000
ABC             6.04668         1     6.04668    420.23   0.0000
Blocks         0.225392        5     0.0450784  3.14     0.0192
Total error    0.503114       35     0.0143747
-----
Total (corr.)  680.729        47
-----
R-squared = 99.9261 percent
P-squared (adjusted for d.f.) = 99.9132 percent
Standard Error of Est. = 0.119895
Mean absolute error = 0.0738247
    
```

En todos los casos F experimental es mayor a F de tablas que es igual a 4.08 (con 1 grado de libertad en el numerador y 35 grados de libertad en el denominador a un  $\alpha = 0.05$ ) y el valor de P es menor a 0.05, por lo que en la construcción de la ecuación del modelo para la respuesta tiempo de retención debemos considerar la influencia de todas las variables. Hay que notar que el efecto se debe dividir entre dos, puesto que éste puede ser un valor hacia arriba o hacia abajo del promedio.

5.1.1.1 Efectos estimados para tr N:

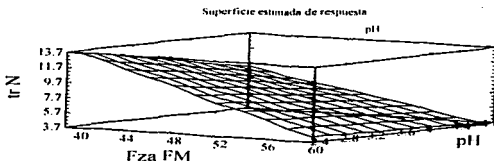
$$*R N = 5.456 - 2.432 * FzaFM - 0.761 * pH - 2.302 * tpart + 0.581 * FzaFM * pH + 1.307 * FzaFM * tpart + 0.449 * pH * tpart - 0.354 * FzaFM * pH * tpart$$

Con una correlación:

$$R^2 = 99.9261$$

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN





**Gráfico 4. Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.**

Cuando aumentamos el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil o bien, el pH o el tamaño de partícula, baja el tiempo de retención del naproxeno; el efecto del pH es poco, sin embargo, y como más adelante veremos también en las gráficas 5 y 6, este efecto aumenta con el porcentaje de solución amortiguadora.

Haciendo lo mismo para el tiempo de retención de naproxol, tenemos:

5.1.1.2. Efectos estimados para tr NOH:

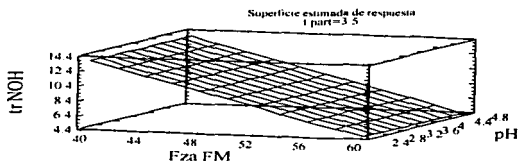
$$\text{tr NOH} = 6.377 - 2.938 * \text{Fza FM} - 0.077 * \text{pH} - 2.710 * \text{tpart} + 1.609 * \text{Fza FM} * \text{tpart} + 0.055 * \text{Fza FM} * \text{pH} * \text{tpart}$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.9694$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Gráfico 5. Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.**

La combinación de factores Fza FM-pH y pH-tpart para el tiempo de retención de naproxol no son significativas. Para cualquier juego numérico de factores, dentro de esta área de trabajo, el tiempo de retención del naproxol es menor que el mostrado por el naproxeno y su comportamiento es similar a este; es decir, aumentando el valor de los factores, disminuye el tiempo de retención.

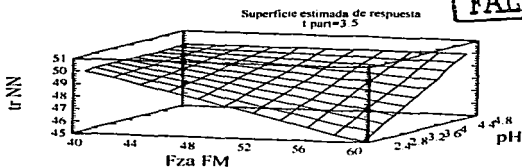
**5.1.1.3 Efectos estimados para tr NN:**

$$tr\ NN = 39.537 - 9.213 * FzaFM - 0.061 * pH - 9.213 * tpart + 1.189 * FzaFM * pH - 7.962 * fzaFM * tpart - 1.311 * pH * tpart - 0.061 * FzaFM * pH * tpart$$

Con una correlación:

$$R^2 = 99.9979$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfico 6. Superficie estimada de respuesta para el tiempo de retención del**



**naproxeno de naproxilo en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.**

El naproxeno de naproxilo se ve mucho más afectado por la fuerza de la fase móvil y a un porcentaje de 40 de solución amortiguadora el efecto del pH es muy pronunciado.

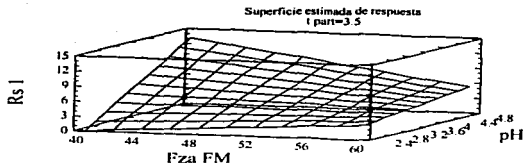
**5.1.1.4 Efectos estimados para Rs I:**

$$Rs\ I = 3.2701 - 1.216 * FzaFM + 2.254 * pH - 4.113 * tpart - 1.608 * FzaFM * pH - 1.722 * pH * tpart + 1.078 * FzaFM * pH * tpart$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.5513$$

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



**Gráfico 7. Superficie estimada de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño A.**

Sólo la combinación de factores Fza FM-tpart no es significativa para la resolución entre naproxeno y naproxol.

Para las simetrías no se puede obtener un modelo de ajuste al comportamiento experimental puesto que hacen falta valores para completarlo; sin embargo, podemos llegar a observaciones interesantes analizando los valores numéricos (tabla 18). En la tabla 18 observamos que manteniendo los factores constantes y variando únicamente el tamaño de partícula tenemos las mejores simetrías (más cercanas a 1) pero con un tamaño de partícula de 3.5 µm y no de 5 µm, hecho que fue útil al decidir entre estas dos fases estacionarias; además, con las gráficas de contornos para resolución entre naproxeno y naproxol (Gráfico



8 y 9), en donde se mantiene fijo el diámetro de partícula, podemos notar que con 5  $\mu\text{m}$  jamas se obtiene una resolución mayor a 3 por lo que nos decidimos definitivamente por el uso de la fase estacionaria C18 de 3.5 micrometros como tamaño de partícula.

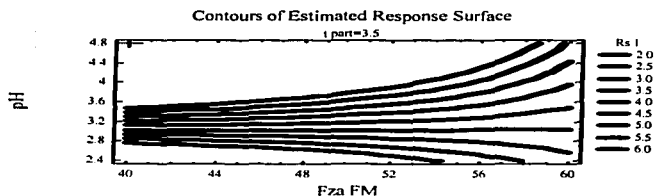


Gráfico 8. Contornos estimados de respuesta de la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$ , diseño A.

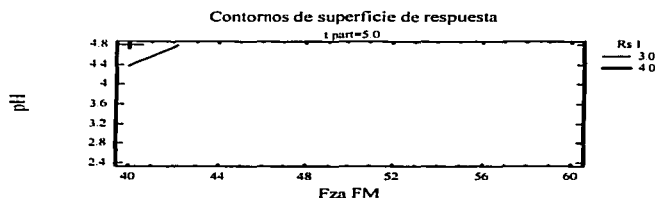
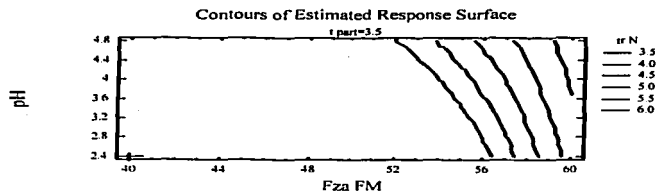


Gráfico 9. Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , diseño A.

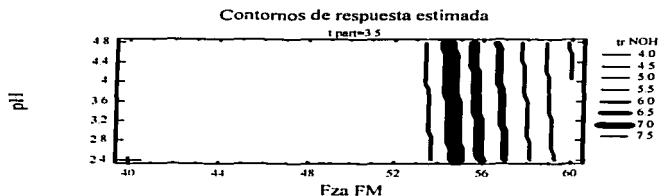
Las ecuaciones arriba escritas (5.1.1.1 a 5.1.1.4) son muy útiles cuando queremos saber que valor numérico tomará cierta variable a condiciones dadas de fuerza de la fase móvil, pH o temperatura: sin embargo, para observar el efecto conjunto de los factores y las condiciones a que obtenemos respuestas óptimas, es más útil ver las diversas gráficas de superficie mostradas para cada analito (Gráficos 5, 6 y 7).



En las siguientes gráficas de contornos del tiempo de retención para naproxeno y naproxol (Gráficos 10 y 11) se mantiene fijo el tamaño de partícula de la fase estacionaria, es decir,  $3.5\mu\text{m}$ . De esta manera podemos predecir que valor tomará la variable que es graficada experimentalmente.



**Gráfico 10. Contornos estimados de respuesta para el tiempo de retención de naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de la columna constante ( $3.5\mu\text{m}$ ), diseño A.**

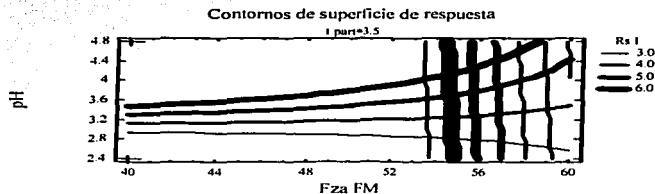


**Gráfico 11. Contornos estimados de respuesta para el tiempo de retención del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de columna constante ( $3.5\mu\text{m}$ ), diseño A.**

En la gráfica 12 se muestra el comportamiento de la resolución entre naproxeno y naproxol (líneas horizontales) y del tiempo de retención del naproxol (en líneas verticales, cuyos valores en minutos corresponden a los del gráfico 11) el cual es el segundo en salir y por lo



tanto es del que hay que establecer un tiempo requerido (menor a 6 minutos o cuarta línea vertical) y así controlar la duración del análisis. A un pH mayor de 2.8 se obtiene buena resolución entre 40 y 60% de acetonitrilo, este último factor es el que se debe modificar si queremos tiempos de retención pequeños.



**Gráfico 12. Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil a tamaño de partícula de la columna constante (3.5  $\mu\text{m}$ ), diseño A.**

### 5.1.2 DISEÑO B

En este diseño experimental, se trató de obtener condiciones isocráticas con una fuerza de fase móvil grande pues el naproxenato de naproxilo presenta, como se ve en el Diseño A, un tiempo de retención muy grande. El pH se dejó entre 3 y 5 por lo visto en los resultados del diseño anterior y se modificó solo para observar su efecto en la forma del pico respuesta, característica que no se pudo ver en el Diseño A.

Para el Diseño B, obtenemos nula separación entre naproxeno y naproxol en todas las condiciones por lo que la resolución es de cero y para las simetrías de naproxeno y naproxol no se sacó el valor numérico. Únicamente fue posible detectar el naproxenato de naproxilo en un promedio de 8.3 min pero no es suficiente tener una técnica que lo cuantifique a él solamente. Los cromatogramas correspondientes se pueden ver en el apéndice I. Las ecuaciones de respuesta del modelo se muestran a continuación y en todos los casos las gráficas de superficie son muy similares a las del Diseño A por lo que si se desea ver el efecto de un factor sobre la respuesta se puede referir a sus resultados (gráficos 4, 5 y 6):

5.1.2.1 Efectos estimados para tR N:

$$tR N = 2.580 - 0.053 * FzaFM - 0.033 * pH + 0.019 * FzaFM * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 61.2891$$

5.1.2.2 Efectos estimados para tr NOH:

$$tr NOH = 2.867 - 0.163 * Fza FM + 0.012 * pH + 0.010 * Fza FM * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.9377$$

Los efectos de los factores para naproxeno y para naproxol por separado, en este diseño, son similares entre sí (como en el diseño A), si aumentamos la cantidad de acetonitrilo en la fase móvil disminuimos el tiempo de retención. El efecto en conjunto de pH y fuerza de fase móvil es igual; sin embargo, vemos diferencias en el efecto del pH esto se debe a que el porcentaje de correlación del modelo obtenido para naproxeno realmente es muy bajo (61%), la resolución entre ambos analitos prácticamente no existe y los tiempos de retención de naproxeno que se introdujeron no pueden distinguirse completamente de los del naproxol.

5.1.2.3 Efectos estimados para tR NN:

$$tR NN = 8.2947 - 2.515 * FzaFM - 0.296 * pH + 0.478 * FzaFM * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 74.3076$$

Con estos valores de fuerza de la fase móvil (90 a 80 % de acetonitrilo), obtenemos un tiempo de retención promedio de 8.3 minutos, esto es una gran diferencia en relación con los 39.5 minutos que se obtienen cuando nos movemos en un rango de 40 a 60% de acetonitrilo como en el diseño A, con esto podemos confirmar la gran influencia que ejerce este factor sobre el tiempo de detección para naproxenato de naproxilo. El efecto del segundo factor, el pH, es pequeño a altos porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil.



### 5.1.3 USO DE DRYLAB PARA LA OBTENCIÓN DE GRADIENTE

Para poder cuantificar al mismo tiempo el naproxeno, el naproxol y el naproxenato de naproxilo dentro de estas condiciones de fase móvil, fase estacionaria, equipo, etc., se debe realizar un gradiente puesto que los Diseños A y B nos muestran que isocráticamente no puede haber cuantificación con buena resolución a un tiempo menor a 15 minutos. Las condiciones de gradiente pueden ser establecidas con el uso del DRY-LAB ®. Nuestros datos de tiempo de retención que se introdujeron a este programa para que realizara el análisis, reafirman el hecho de que el naproxenato de naproxilo esta muy influenciado por la cantidad de fase orgánica en la fase móvil. Estos tiempos de retención también sugieren que podemos aumentar el flujo de los disolventes para disminuir el tiempo de la corrida cromatográfica. DRY-LAB predice que a un tiempo de gradiente de 5 minutos, podemos obtener la señal de este compuesto a 10 minutos. Lo que siguió fue probar estas condiciones de gradiente y efectivamente, obtenemos un tiempo de 9.7 minutos para el naproxenato de naproxilo. Las condiciones de análisis son:

Cromatógrafo      Modulo de análisis para Cromatografía de líquidos de Alta  
 Eficiencia Agilent Serie 1100  
 Inyector            Automático  
 Detector            Agilent UV-Visible  
 Columna            Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 3.5 µm tamaño de partícula.  
 Flujo                0.7 mL /min  
 Fase móvil        Acetonitrilo  
 Vol. Inyección    Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M, pH 3  
                           20 µL  
 Muestra a inyectar: Solución en metanol RA de las siguientes sustancias a las  
 concentraciones citadas:  
                           Naproxeno SR  
                           Naproxol SR  
                           Naproxenato de naproxilo

Gradiente:

Tiempo en min	Composición fase móvil
0	60% ACN 40 % Solución buffer
5	95 % ACN 5 % Solución buffer

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Los tiempos de retención obtenidos con estas condiciones para cada analito se encuentran en la tabla 37,

Sustancia, señal.	Tiempo de retención, min.
Naproxeno	3.3
Naproxol	4.34
Naproxenato de naproxilo	9.7

Tabla 37. Tiempos de retención de los analitos a las condiciones de gradiente sugeridas por el software DRY LAB ®.

Después de realizar cinco inyecciones de los analitos a 20 µg/ml las áreas y los tiempos de retención mostraron un coeficiente de variación menor al dos por ciento lo que nos habla de la repetibilidad del método.

#### 5.1.4 DISEÑO C

Este diseño fue planeado con el objeto de determinar la respuesta a cambios en el pH y la fuerza de la fase móvil después de que el cromatógrafo de líquidos con el que se trabajó fue modificado en los empaques y los conductos de la fase móvil. Al realizar una corrida cromatográfica con las condiciones a las que se había llegado con el uso del DRY-LAB antes de los cambios, simplemente los tiempos no coincidían y la resolución entre los dos primeros analitos se vió disminuida hasta cero.

Para el análisis estadístico de los resultados de este diseño D, debemos tomar en cuenta una F de tablas es de 5.99 (con 1 grado de libertad en el numerador, 6 en el denominador y a un nivel de confianza del 95%). Las ecuaciones aportadas por el STATGRAPHICS ® se presentan en los puntos 5.1.4.1 a 5.1.4.5 (después de corroborar con el análisis de varianza que la F calculada sea mayor que la de tablas para considerar a un factor influyente en la respuesta).

##### 5.1.4.1 Efectos estimados para tR N:

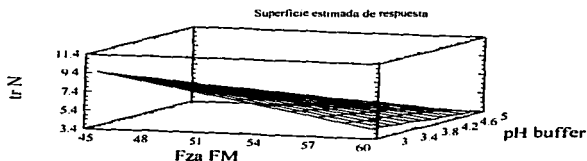
$$tR N = 5.655 - 1.741 * FzaFM - 1.279 * pH + 0.811 * FzaFM * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.9726$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Gráfico 13. Superficie estimada de respuesta del tiempo de retención del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**

Todos los factores son significativos y el comportamiento es el esperado: a mayor fuerza de la fase móvil y mayor pH, baja el tiempo de retención del naproxeno y como ya se había determinado en el anterior diseño experimental, ese efecto es mayor si aumenta la cantidad de solución amortiguadora.

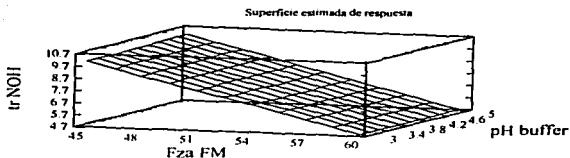
5.1.4.2 Efectos estimados para tr NOH:

$$tr\ NOH = 7.428 - 2.656 * Fza\ FM + 0.036 * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.9833$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfico 14. Superficie estimada de respuesta del tiempo de retención del naproxol**



**en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**

Aquí, la combinación de factores no es estadísticamente significativa por lo que se puede eliminar de la ecuación, en la gráfica de cubo (gráfico 14) se observa una pendiente similar en todos los valores de pH. Por las constantes negativas de la ecuación, vemos que a mayor cantidad de acetoniitrilo tenemos menor tiempo de retención, la forma de la gráfica es muy similar a la obtenida en el Diseño A (gráfico 5), sin embargo, los tiempos de retención para naproxol son mayores a los obtenidos con dicho diseño experimental por lo que se espera, en comparación, obtener mayor resolución dentro de la misma superficie de trabajo.

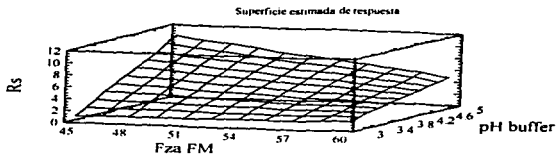
**5.1.4.3 Efectos estimados para Rs:**

$$Rs = 4.438 - 1.265 * FzaFM + 3.166 * pH - 1.436 * FzaFM * pH$$

Con una correlación:

$$R^2 = 99.9903$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gráfico 15. Superficie estimada de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**

La resolución es mucho más influenciada por el pH, a mayor pH mayor resolución y el efecto es contrario con la fuerza de la fase móvil, para valores específicos de resolución se puede resolver la ecuación correspondiente o ver la gráfica de contornos (gráfico 18).

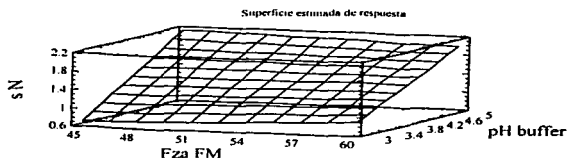
**5.1.4.4 Efectos estimados para sN:**

$$sN = 1.4291 + 0.644 * pH - 0.082 * FzaFM * pH$$



Con una R cuadrada:

$$R^2 = 99.8498$$



**Gráfico 16. Superficie estimada de respuesta para la simetría del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**

El efecto de la fase móvil en cuanto a polaridad no es muy importante en este caso, pero sí lo es el pH y la polaridad en conjunción con el pH; se obtiene mejor simetría con valores bajos de pH, de 3 a 3.3.

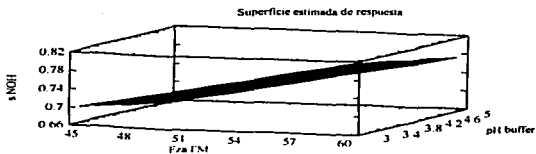
5.1.4.5 Efectos estimados para sNOH:

$$sNOH = 0.736 + 0.056 * FzaFM - 0.020 * pH$$

Con una R cuadrada:

$$R^2 = 92.774$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



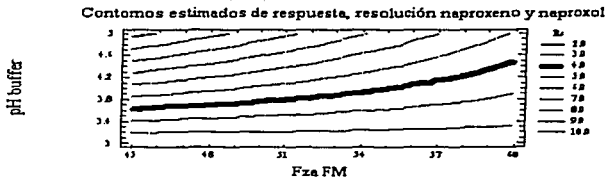
**Gráfico 17. Superficie estimada de respuesta para la simetría del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**





El efecto de los dos factores en conjunto no es importante (valor de  $p$  de 0) pero sí el de cada uno por separado. La mejor simetría es a pH de 3 y un porcentaje alto de ACN, aún así, en esta superficie de respuesta no tenemos simetrías de uno, que sería lo ideal, para naproxol.

En la gráfica de contornos para resolución (gráfico 18) observamos como, a diferencia de los diseños A y B, necesitamos un valor de pH mayor para tener una resolución de 3 (pH más grande que 3.4 en cualquier valor de porcentaje de acetonitrilo), por lo que para definir las condiciones de análisis se fija un valor de pH de 4 (o línea más gruesa) y asegurar así la resolución, esperando que esta se mantenga similar aunque se modifique el flujo 0.5 mL/min.

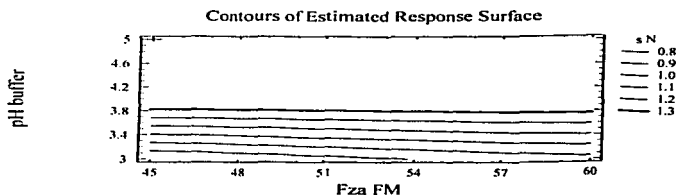


**Gráfico 18. Contornos estimados de respuesta para la resolución entre naproxeno y naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil.**

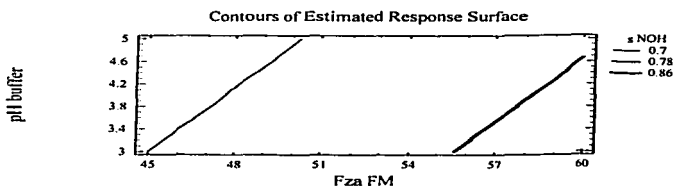
Cuando vemos el efecto del pH sobre la simetría de naproxol, está no se ve significativamente afectada si subimos el pH de trabajo (gráfico 20), a diferencia de lo que ocurre con el naproxeno (gráfico 19). La simetría de naproxeno se midió después a valores de flujo mayores (ver abajo, condiciones finales de análisis) viéndose mejorada al aumentar el flujo y quedando finalmente el pH de trabajo en 4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Gráfico 19. Contornos estimados de respuesta para la simetría del naproxeno en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**



**Gráfico 20. Contornos estimados de respuesta para la simetría del naproxol en función del pH y de la fuerza de la fase móvil, diseño C.**

Finalmente, se realizó una optimización del método partiendo de las condiciones obtenidas para naproxeno y naproxol en el Diseño D (pH de 4) pero ahora con gradiente de polaridad de la fase móvil, gradiente del cual ya se había establecido su utilidad gracias al uso del DRY-LAB. La polaridad inicial de la fase móvil es de 50 % de acetonitrilo y según la ecuación del diseño C para resolución, el valor de esta sería:

$$R_s = 4.589$$

Para los tiempos de retención y simetrías de naproxeno y naproxol:

$$tR_N = 6.235 \text{ min}$$



s N = 1.215

tr NOH = 8.312 min

sNOH = 0.717

Con estos valores a obtener, se pudo entonces modificar el flujo, dichos valores solo dan un indicativo puesto que el diseño final tendría un gradiente de inicio y esto modificaría las respuestas cromatográficas y además se modificaría el flujo en caso necesario, para agilizar el tiempo de análisis total.

**5.1.5 MÉTODO DE ANÁLISIS DE NAPROXENO, NAPROXOL Y NAPROXENATO DE NAPROXILO EN SOLUCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

Cromatógrafo Modulo de análisis para Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia Agilent Serie 1100  
 Inyector Automático  
 Detector Agilent UV-Visible  
 Columna Novapack C18, 150 X 3.9 mm, 3.5 µm tamaño de partícula.  
 Flujo 1.0 mL /min  
 Fase móvil Acetonitrilo  
 Vol. Inyección Solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M, Ph=4  
 20 µL  
 Muestra a inyectar: Solución en metanol RA de las siguientes sustancias:  
 Naproxeno SR  
 Naproxol SR  
 Naproxenato de naproxilo

Gradiente:

0	50% ACN
5	50 % Solución buffer
5	95 % ACN
12	5 % Solución buffer
12	95 % ACN
	5 % Solución buffer

El gradiente ayuda a la cuantificación del naproxenato de naproxilo, las condiciones isocráticas iniciales permiten mantener de inicio una línea base horizontal y la velocidad de flujo subió del planteamiento inicial que era 0.7 mL/min a 1 mL/min con el fin de acelerar el tiempo de análisis, los tiempos de retención finales son:

Sustancia, señal.	Tiempo de retención, min.
Naproxeno	4.60
Naproxol	5.34
Naproxenato de naproxilo	10.70

Tabla 38. Tiempos de retención en las condiciones finales de análisis del naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxilo.

En el apéndice II se pueden ver los cromatogramas correspondientes del método de análisis.

## 5.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### 5.2.1 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD

En las siguientes tablas se muestran los resultados de regresión lineal por día y para cada analito, el análisis por mínimos cuadrados fue realizado con un  $\alpha = 5\%$  y en el caso de que el coeficiente de variación de los datos fuera mayor del 2% (cómo ocurre para todos los analitos en la primer concentración medida) entonces no se tomarán para hacer dicho análisis.

#### 5.2.1.1 Naproxeno

Día 1 NAPROXENO	
Total de datos	9
Ordenada b:	-1.0827 +/- 1.4295
Pendiente m:	29.5288 +/- 0.2024
Coef correlación:	0.99997
R <sup>2</sup>	0.99994

Tabla 39. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxeno, primer día de análisis.

Día 2 NAPROXENO	
Total de datos	9
Ordenada b:	-1.26367 +/- 2.1623
Pendiente m:	29.27739 +/- 0.3061
Coef correlación:	0.99993157
R <sup>2</sup>	0.99986315

Tabla 40. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxeno, segundo día de análisis.

Realizando una prueba de hipótesis entre las pendientes de las dos curvas para ver si son comparables, obtenemos:

Valor de la pendiente, segundo día. $b = 29.27739$ , riesgo $\alpha=0.05$			
$H_0: b = 29.5288$ (pendiente primer día)			
Hipótesis alterna:	t Student	t de tablas	Resultado:
$H1: b \neq 29.5288$	-1.942	2.364	igual      Aceptar $H_0$ Las pendientes son iguales

Tabla 41. Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxeno.

### 5.2.1.2 Naproxol

Día 1 NAPROXOL	
Total de datos	9
Ordenada b:	0.88129 +/- 1.1203
Pendiente m:	22.35059 +/- 0.1586
Coef correlación:	0.99997
$R^2$	0.99994

Tabla 42. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxol, primer día de análisis.

Día 2 NAPROXOL	
Total de datos	9
Ordenada b:	0.17201 +/- 1.3955
Pendiente m:	22.15970 +/- 0.1975
Coef correlación:	0.99995
$R^2$	0.99990

Tabla 43. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxol, segundo día de análisis.

Realizando una prueba de hipótesis entre las pendientes de las dos curvas, para ver si son comparables, obtenemos:

Valor de la pendiente, segundo día. $b = 22.15970$ , riesgo $\alpha=0.05$			
$H_0: b = 22.3506$ (pendiente primer día)			
Hipótesis alterna:	t Student	t de tablas	Resultado:
$H1: b \neq 22.3506$	-2.284	2.364	igual      Aceptar $H_0$ Las pendientes son iguales

Tabla 44. Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxol.

### 5.2.1.3 Naproxenato de naproxilo



Día 1 NAPROXENATO DE NAPROXILO	
Total de datos	9
Ordenada b:	1.02564 +/- 1.0124
Pendiente m:	23.19874 +/- 0.2388
Coef correlación:	0.99993
R <sup>2</sup>	0.99985

Tabla 45. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxenato de naproxilo, primer día de análisis.

Día 2 NAPROXENATO DE NAPROXILO	
Total de datos	9
Ordenada b:	1.05786 +/- 1.0892
Pendiente m:	23.22700 +/- 0.2570
Coef correlación:	0.99992
R <sup>2</sup>	0.99985

Tabla 46. Resultados del análisis por mínimos cuadrados para la curva area concentración de naproxenato de naproxilo, segundo día de análisis.

Realizando una prueba de hipótesis entre las pendientes de las dos curvas, para ver si son comparables, obtenemos:

Valor de la pendiente, segundo día. b =	23.22700 , riesgo $\alpha=0.05$		
Ho: b = 23.1987 (pendiente primer día)			
Hipótesis alterna:	t Student	t de tablas	Resultado:
H1: b $\neq$ 23.1987	0.260	2.364	igual <b>Aceptar Ho</b> Las pendientes son iguales

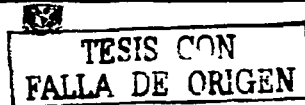
Tabla 47. Prueba de hipótesis de igualdad de pendientes entre las dos curvas control del naproxenato de naproxilo.

El coeficiente de correlación en todos los casos cumple con las especificaciones, la ordenada al origen incluye, dentro del intervalo de predicción al cero y además, las pendientes para los dos días son comparables por lo que el método es lineal en el intervalo de concentraciones que se muestran en la tabla 48:

Analito	Concentración mínima ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración máxima ( $\mu\text{g/ml}$ )
Naproxeno	0.5	15.0
Naproxol	0.5	15.0
Naproxenato de naproxilo	0.3	9.0

Tabla 48. Linealidad probada para cada analito con el método de análisis final.

## 5.2.2 EVALUACION DE PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA



Para todos los análisis, se obtuvo un coeficiente de variación menor a 2% lo cual es suficiente para garantizar la precisión del sistema,; cómo el cálculo de este coeficiente se realizó con los datos de áreas obtenidas durante dos días, podemos asegurar también la reproducibilidad, bajo las mismas condiciones, variación intradía.

### 5.2.3 PUNTOS CONTROL

Los puntos control que se añadieron fueron analizados estadísticamente, la concentración obtenida a partir del área medida con las ecuaciones de regresión caía dentro del intervalo de predicción y en todos los casos ocurre de esta manera por lo que se acepta que la concentración calculada es igual a la nominal o concentración teórica, según la cantidad pesada de analito. El análisis se muestra en las tablas 49 a 54.

#### 5.2.3.1 Naproxeno

##### Primer día de análisis.

$X_{nom}$	$Y_{obs}$	$X_{calc}$	+/-	Intervalo	$H_0: X_{calculada} = X_{aceptable}$
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	C ( $\mu\text{g/mL}$ )		predicción	¿aceptar hipótesis nula?
0.75	19.9992	0.714	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.7482	0.773	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	19.9686	0.713	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	22.4725	0.798	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.9936	0.781	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	115.2488	3.940	+/-	0.101	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	114.7352	3.922	+/-	0.102	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	118.6184	4.054	+/-	0.101	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	118.0264	4.034	+/-	0.101	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	118.3144	4.043	+/-	0.101	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	295.7490	10.052	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	292.9490	9.957	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	295.0070	10.027	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	293.5480	9.978	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	294.2110	10.000	+/-	0.106	Aceptar, muestra dentro del intervalo

Tabla 49. Evaluación de los puntos control para naproxeno, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.

##### Segundo día de análisis.

$X_{nom}$	$Y_{obs}$	$X_{calc}$	+/-	Intervalo	$H_0: X_{calculada} = X_{aceptable}$
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	predicción		$\chi^2$ aceptar hipótesis nula?
0.75	21.2149	0.768	+/-	0.161	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.2636	0.769	+/-	0.161	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.6841	0.784	+/-	0.161	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.9191	0.792	+/-	0.161	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	21.8496	0.789	+/-	0.161	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	114.5630	3.956	+/-	0.155	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	115.1729	3.977	+/-	0.155	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	117.8755	4.069	+/-	0.155	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	117.8755	4.069	+/-	0.155	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	118.2286	4.081	+/-	0.155	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	289.0183	9.915	+/-	0.162	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	292.3276	10.028	+/-	0.162	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	291.2854	9.992	+/-	0.162	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	290.4491	9.964	+/-	0.162	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	290.1797	9.955	+/-	0.162	Aceptar, muestra dentro del intervalo

Tabla 50. Evaluación de los puntos control para naproxeno, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.

5.2.3.2 Naproxol

Primer día de análisis.

$X_{nom}$	$Y_{obs}$	$X_{calc}$	+/-	Intervalo	$H_0: X_{calculada} = X_{aceptable}$
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	predicción		$\chi^2$ aceptar hipótesis nula?
0.75	17.2718	0.733	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	17.4247	0.740	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	17.3620	0.737	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	18.1699	0.774	+/-	0.109	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	18.3876	0.783	+/-	0.109	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	90.9459	4.030	+/-	0.105	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	90.9713	4.031	+/-	0.105	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	91.1172	4.037	+/-	0.105	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	91.5112	4.055	+/-	0.105	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	91.8886	4.072	+/-	0.105	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	223.1130	9.943	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	223.2418	9.949	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	226.1092	10.077	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	226.0602	10.075	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	224.9752	10.026	+/-	0.110	Aceptar, muestra dentro del intervalo

Tabla 51. Evaluación de los puntos control para naproxol, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.

Segundo día de análisis.





$X_{nom}$	$Y_{obs}$	$X_{calc}$	$\pm$	intervalo	$H_0: X_{calculada} = X_{aceptable}$
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	predicción		¿aceptar hipótesis nula?
0.75	16.9758	0.758	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	17.1017	0.764	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	16.8837	0.754	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	16.8992	0.755	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.75	17.1645	0.767	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	88.3498	3.979	+/-	0.132	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	88.9189	4.005	+/-	0.132	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	89.5255	4.032	+/-	0.132	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	89.5259	4.032	+/-	0.132	Aceptar, muestra dentro del intervalo
4	89.6871	4.040	+/-	0.132	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	219.7593	9.909	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	222.0438	10.012	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	222.3733	10.027	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	222.4215	10.029	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo
10	222.4188	10.029	+/-	0.138	Aceptar, muestra dentro del intervalo

Tabla 52. Evaluación de los puntos control para naproxol, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.

### 5.2.3.3 Naproxenato de naproxilo

#### Primer día de análisis.

$X_{nom}$	$Y_{obs}$	$X_{calc}$	$\pm$	intervalo	$H_0: X_{calculada} = X_{aceptable}$
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	predicción		¿aceptar hipótesis nula?
0.45	9.9730	0.386	+/-	0.096	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	10.6781	0.416	+/-	0.095	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	11.2451	0.441	+/-	0.095	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	11.3923	0.447	+/-	0.095	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	12.9981	0.516	+/-	0.095	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	58.0341	2.457	+/-	0.091	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	58.1978	2.464	+/-	0.091	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	55.6655	2.355	+/-	0.092	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	55.1446	2.333	+/-	0.092	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	57.8909	2.451	+/-	0.091	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	139.2232	5.957	+/-	0.095	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	139.9026	5.986	+/-	0.096	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.7801	6.067	+/-	0.096	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.7595	6.066	+/-	0.096	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.3738	6.050	+/-	0.096	Aceptar, muestra dentro del intervalo

Tabla 53. Evaluación de los puntos control para naproxenato de naproxilo, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, primer día de análisis.

Segundo día de análisis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Ejecución de resultados

Xnom	Yobs	Xcalc	+/-	Intervalo	No: Xcalculada = Xaceptado
C (µg/mL)	Area	C (µg/mL)	predicción		¿aceptar hipótesis nula?
0.45	10.6781	0.414	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	11.2451	0.439	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	13.0076	0.514	+/-	0.102	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	11.7383	0.460	+/-	0.102	Aceptar, muestra dentro del intervalo
0.45	11.0744	0.431	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	57.0300	2.410	+/-	0.098	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	57.5673	2.433	+/-	0.098	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	57.0359	2.410	+/-	0.098	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	55.6655	2.351	+/-	0.098	Aceptar, muestra dentro del intervalo
2.4	55.1446	2.329	+/-	0.098	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	139.4495	5.958	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	142.0622	6.071	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.7801	6.059	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.7595	6.058	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo
6	141.3738	6.041	+/-	0.103	Aceptar, muestra dentro del intervalo

**Tabla 54. Evaluación de los puntos control para naproxenato de naproxilo, concentración obtenida a partir de la recta ajustada, segundo día de análisis.**

Con la prueba de que los puntos control entran dentro del intervalo de predicción de las rectas obtenidas por mínimos cuadrados para linealidad verificamos la confiabilidad de los resultados.

## 5.2.4 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los valores de pendiente y ordenada para cada curva de calibración en los dos días nos dieron las herramientas para obtener los límites de detección y cuantificación (tablas 34 a 36). Como se mencionó anteriormente, estos límites son obtenidos por estimación estadística y hay que sumarles además, el nivel del ruido, el cual no nos permitiría, sobre todo en el caso del naproxenato de naproxilo (que presenta un LD estimado muy bajo), observar la señal buscada: para este último, observamos que la linealidad del sistema nos hace estimar un límite de cuantificación muy bajo también, sin embargo, hay que hacer notar que a concentraciones de 0.15 µg/ml la variación en cuanto a áreas ya era de 40% por



lo que con  $0.031 \mu\text{g/mL}$ , una concentración cinco veces menor que  $0.15 \mu\text{g/mL}$ , realmente no se espera el poder cuantificar al naproxenato de naproxilo. Para naproxeno y naproxol, los valores obtenidos son un buen estimado para el valor experimental que se podría obtener y son congruentes con la linealidad obtenida en el presente trabajo para el sistema.



# VI CONCLUSIONES



## 6 CONCLUSIONES

Se desarrollaron y optimizaron las condiciones analíticas para la cuantificación de naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxilo en una corrida analítica empleando diseño de experimentos.

El rango lineal evaluado es para naproxeno y naproxol de 0.5 a 15.0  $\mu\text{g/ml}$  y para naproxenato de naproxilo de 0.75 a 9.0  $\mu\text{g/ml}$  y el sistema es preciso y reproducible para las condiciones de evaluación.

La cuantificación de los tres analitos se logra en 15 minutos mediante el presente método. Se pueden cuantificar al mismo tiempo naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxilo cuando estos se encuentran al mismo tiempo en una solución en metanol con el método de análisis cromatográfico desarrollado en el presente trabajo.



## VII

## APÉNDICES

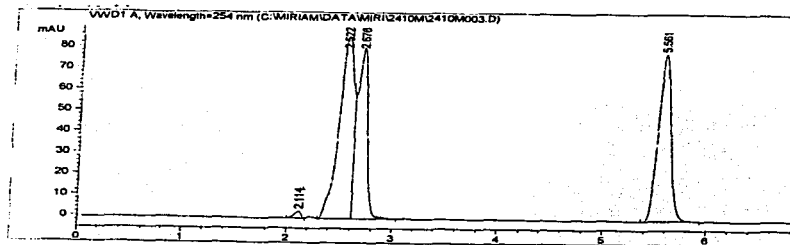


**7.1. APÉNDICE I. CROMATOGRAMAS DEL DISEÑO B**

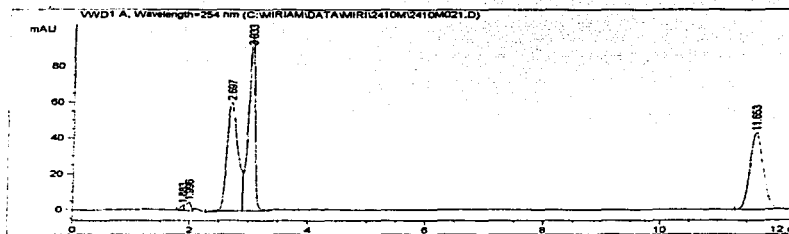
Ver los resultados en la página 41.

**Cromatograma a.**

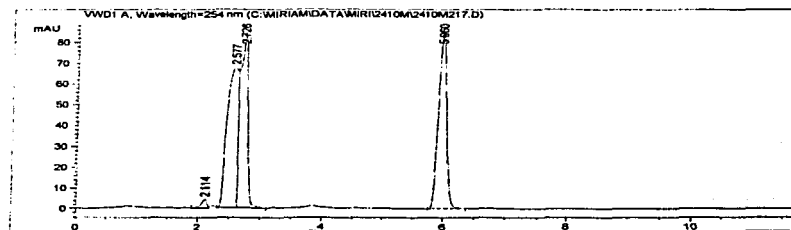
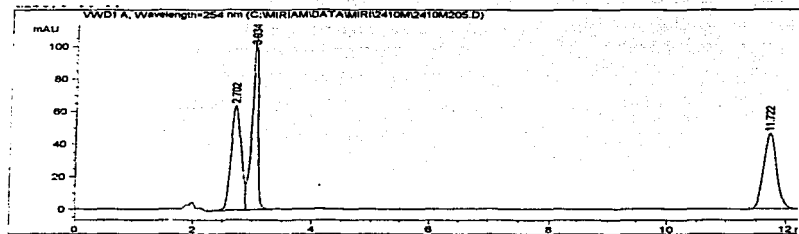
90% de acetonitrilo en la fase móvil y pH de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  de 3 (-1,-1)

**Cromatograma b.**

80% de acetonitrilo en la fase móvil y pH de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  de 3 (+1,-1)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cromatograma c.**90% de acetonitrilo en la fase móvil y pH de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  de 5 (-1,+1)**Cromatograma d.**80% de acetonitrilo en la fase móvil y pH de la solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  de 5 (+1,+1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



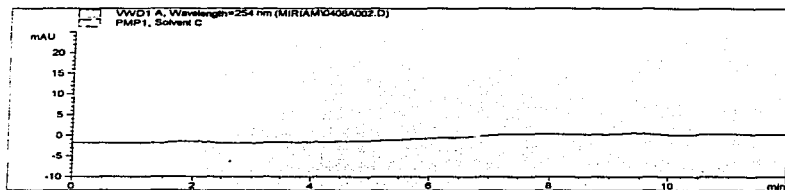


## 7.2. APÉNDICE II. CROMATOGRAMAS DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos con las condiciones aquí desarrolladas:

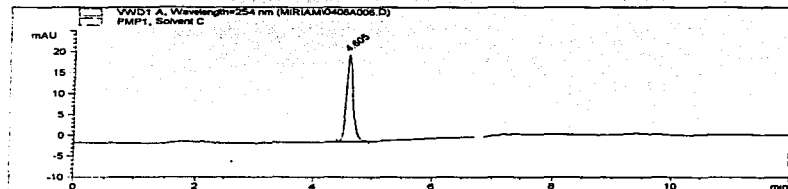
### Cromatograma 1

Fase móvil utilizada en el método con gradiente.



### Cromatograma 2

Solución de referencia Naproxeno en metanol ( $T_r = 4.60$  min).

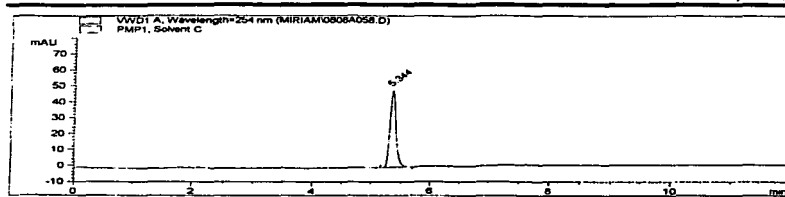


### Cromatograma 3

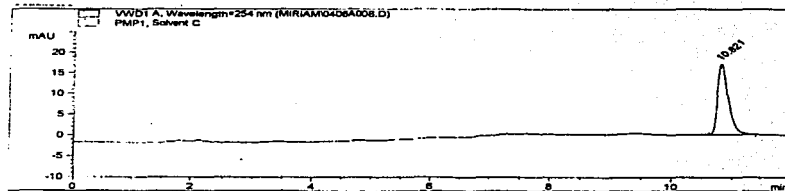
Solución de referencia Naproxol en metanol ( $T_r = 5.34$  min)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



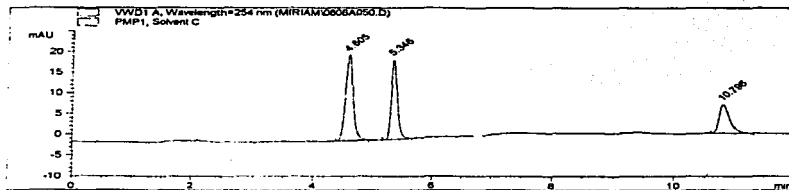


Cromatograma 4

Solución de referencia Naproxenato de naproxilo en metanol ( $T_r = 10.70$  min).

Cromatograma 5

Solución de referencia Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxilo en metanol.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**VIII**  
**BIBLIOGRAFÍA**



1. Goodman & Gilman. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª ed. en español. Mc Graw Hill Interamericana, México, pag 666-689.
2. USP DI Volume III. Approved Drug Products and Legal Requirements. 2001. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. NI Publishing, Philadelphia.
3. The Index Merck. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicas, 9ª edición. O'Neil J, Smith A, Heckelman P y Obenchain J Jr., Eds. 1996. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
4. USP DI Volume III. Approved Drug Products and Legal Requirements. 2001. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. NI Publishing, Philadelphia.
5. Diccionario de especialidades farmacéuticas. DEF, Edición 46. 2000. PLM Ediciones, México.
6. Banker, G.S y Rhodes, C.T. 1990. Modern Pharmaceutics, 3ª ed. En: Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Marcel Dekker Inc., Estados Unidos de América, pag 451, 596-599, 627-628.
7. Avendaño López, M.C. 1993. Introducción a la química farmacéutica. Interamericana-Mc. Graw Hill, España, pag 198-200.
8. González-de la Parra, M., Ramos Mundo, C., et al. 1998. A Germination bioassay as a toxicological screening system for studying the effects of potential prodrugs of naproxen. ATLA, 26: 635-647.
9. Food and Drug Administration. 1998. The CDER Handbook, Drug Approval Application Process. FDA, Estados Unidos de América, pag 3-8.
10. Harris, D.C. 1992. Análisis Químico Cuantitativo, 3ª edición. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª edición. 2000. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, México.
12. Montgomery, Douglas C. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo editorial Iberoamérica, México.
13. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Secretaría de Salud, México.



14. Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures ICH-Q2A, March 1995. Food and Drug Administration, EUA.
15. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. 1998. Food and Drug Administration, EUA.
16. Bumann, T.J. 1996. Pharmacotherapy. A Pathophysiologic Approach, 3ª edición. Appleton y Lange, Estados Unidos de América, pag 1259-1275.
17. Fritz, James S. Analytical Solid Phase Extraction. John Wiley & Sons, Inc., pag. 1-14 y 63-87.
18. Hall, R. y Malia, R.G. 1984. Medical Laboratory Haematology. Betterworths, Londres, pag 80-83.
19. Harris, Daniel C. 1992. Análisis Químico Cuantitativo, 3ª ed. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
20. Montgomery, D. C. y Runger G. C. 1996. Probabilidad y Estadística Aplicados a la Ingeniería. Mc. Graw Hill, México.
21. Smith, R.V. y Stewart, James T. 1981. Textbook of Biopharmaceutic Analysis. Lea and Febiger Co., Estados Unidos de América, Capítulo 3, pag 27-51.
22. Desager, J.P., Vanderbist, M. y Harvengt, C. 1976. Naproxen plasma levels in volunteers after single dose administration by oral and rectal routes. Journal of Clinical Pharmacology, 16 (4): 189-193.
23. Slattery, J.T. y Levy, G. 1979. Determination of naproxen and its desmethyl metabolite in human plasma or serum by High Performance Liquid Chromatography. Clinical Biochemistr., 12 (3): 100-3.
24. Broquaire, M., Rovéi, V. y Braithwaite, R. 1981. Quantitative determination of naproxen in plasma by a simple High Performance Liquid Chromatography method. Journal of Chromatography, 224: 43-49.
25. Goto, J., Goto, N. y Nambara, T. 1982. Separation and determination of naproxen enantiomers in serum by HPLC. Journal of Chromatography, 239: 559-564.
26. Shimek, J.L., Rao, N.G. y Khalil, S.K. 1982. An isocratic High-Pressure liquid chromatographic determination of naproxen and desmethylnaproxen in human plasma. Journal of Pharmaceutical Science, 71(4): 436-439.

27. Yokoyama, H., Hone, T. y Awazu, S. **1993**. Lipid peroxidation in rat liver microsomes during naproxen metabolism. *Biochemical Pharmacology*, **45** (8): 1721-1724.
28. Upton, R.A., Buskin, J.N., Guentert, T.W., Williams, R.L. y Riegelman S. **1980**. Convenient and sensitive High-Performance Liquid Chromatography assay for ketoprofen, naproxen and other allied drugs in plasma or urine. *Journal of Chromatography*, **190** (1): 119-128.
29. Owen, S.G., Roberts, M. S. y Friesen, W.T. **1987**. Rapid High Pressure Liquid Chromatography assay for the simultaneous analysis of Non-steroidal antiinflammatory drugs in plasma. *Journal of Chromatography*, **416**: 293-302.
30. Street, P.J. **1989**. Rapid High Performance liquid chromatographic methods for the determination of overdose concentrations of some non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma or serum. *Journal of Chromatography*, **495**: 179-193.
31. Singh, A. K., Jang, Yin, Mishra, U. y Granley, L. **1991**. Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urina by HPLC and GC-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography and Biomedical Applications*, **568**: 351-361.
32. Blagbrough, I.S., Daykin, M.M., Doherty, M., Patirick, M. y Shaw, P.N. **1992**. High performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in plasma and synovial fluid in man. *Journal of Chromatography*, **578** (2): 251-7.
33. Herráez- Hernández, R., van de Merbel, N. C. y Brinkman, U. **1995**. Determination of the total concentration of highly protein-bound drugs in plasma by on-line dialysis and column liquid chromatography: application to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Chromatography B*, **666**: 127-137.
34. Hirai, T., Matsumoto, S. y Kishi, S. **1997**. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by HPLC with normal solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, **692**: 375-388.
35. Andersen, J. V. y Hansen, S. T. **1992**. Simultaneous determination of (R ) and (S) naproxen and (R ) and (S)- 6- o desmethylnaproxen by HPLC on a chiral AGP column. *Journal of Chromatography and Biomedical Applications*, **577**: 362-365.

36. Vree, T. B., van den Biggelaar-Martea, M. y Verwey-van Wissen, C. P. **1992**. Determination of Naproxen and its metabolite O-desmethylnaproxen with their acylglucuronides in human plasma and urina by means of direct gradient. High Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography and Biomedical Applications, 578: 239-249.
37. Lalande, D. L., Wilson, D. L. y Mc Gilveray, I. J. **1986**. Rapid High Pressure Liquid Chromatography determination of ibuprofen in human plasma. Journal of Chromatography and Medical Applications, 377: 410-414.
38. Ekpe, A., Tong, J. H. y Rodriguez, L. **2001**. High performance liquid chromatographic method development and validation for the simultaneous quantitation of N- sodium and pseudoephedrine hydrochloride impurities. Journal of Chromatographic Science, Vol 39: 81-86.
39. Balogh, M. P. **1996**. Adaptation of HPLC methods to multiple spectral analysis. Journal of Chromatography A, 728: 351-357.
40. Miners, J. O. y Coulter, S. et al. **1996**. Cytochromes P450, 1A2 and 2C9 are responsible for the human hepatic 0-desmethylation of R and S naproxen. Biochemical Pharmacology, 51: 1003-1008.
41. Zecca, I., Ferrario, P. y Pirola, R. **1987**. Analysis of clorodesmethyl diazepam and its metabolites in plasma and urine. Journal of Chromatography and Biomedical Applications, 420: 417-424.
42. Barwick, V.J. **1998**. VAM Project 3.2.2 Evaluating Confidence in Analytical Measurement. Part a: literature review of uncertainty in laboratory operations. Review of sources in gas chromatography and high performance liquid chromatography. LGC. Setting Standards in analytical science. National Measurement Systems Valid Analytical Measurement (VAM) Programme, EUA.
43. Dolan, J. **2001**. Guide to LC Methods Development. The six-parts series by John Dolan. LC Resources Inc., Estados Unidos de América.

