

## CAPÍTOL II

### DETERMINACIÓ D'ACETAT D'HIDROCORTISONA

---

#### II.1 OBJECTIU

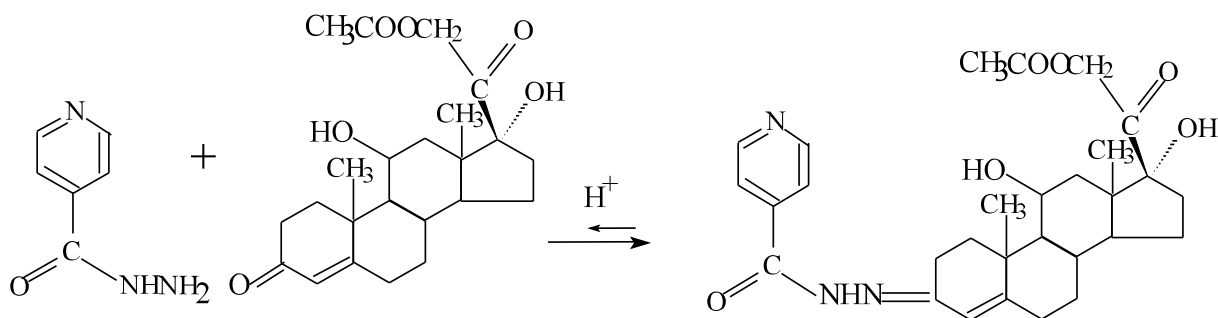
En aquest capítol es posa a punt un mètode cinètico-espectrofotomètric altament selectiu per l'anàlisi de l'acetat d'hidrocortisona en el preparat farmacèutic comercial, Hemorrane®, presentat en forma de pomada i que conté com a principis actius: acetat d'hidrocortisona, prednisona, benzocaina i excipients insolubles en dissolvents polars. És important destacar la presència en el fàrmac de dos compostos químicament molt semblants, els quals poden reaccionar amb el mateix reactiu; l'acetat d'hidrocortisona (un <sup>4</sup>-3-oxoesteroide), i la prednisona (un <sup>1,4</sup>-3-oxoesteroide).

El mètode es basa en la reacció de condensació de l'acetat d'hidrocortisona amb l'àcid isonicotínic hidrazina o isoniàcid (INH), i l'aplicació de la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS).

## II.2. INTRODUCCIÓ

Els mètodes cinètics d'anàlisi químic presenten algunes avantatges potencials respecte als mètodes en equilibri. Entre aquestes hi ha la possibilitat de resoldre sistemes on poden donar-se altres reaccions abans que el procés finalitzi, i la resolució de mesclures de compostos molt semblants per reacció a diferents velocitats amb un reactiu comú.

Encara que han estat utilitzats normalment en la determinació simultània de varis components, també semblen ser molt interessants en les determinacions cinètiques individuals [López-Cueto, 1997], donat que a l'avantatge clàssica dels mètodes multivariables de millorar la precisió dels univariats [Quencer, 1993; Owen, 1987], es pot afegir la possibilitat de modelar els efectes d'una petita interferència producte d'una reacció més lenta, o els possibles efectes de la matriu de la mostra, o ser utilitzats en sistemes no-lineals, és a dir, quan la cinètica es desvia del comportament de primer o pseudoprimer ordre respecte a l'analít.



Esquema 2.1

En aquest treball es posa a punt un mètode cinètic espectrofotomètric per l'anàlisi d'acetat d'hidrocortisona, basat en la reacció de condensació d'aquest 4-3-oxoesteroide amb l'àcid isonicotínic hidrazina o isoniàcid (INH) (esquema 2.1). L'objectiu és analitzar aquest compost en el preparat comercial Hemorrane®, que conté acetat d'hidrocortisona, prednisona i benzocaina com a principis actius. El mètode cinètic proposat és selectiu per l'acetat d'hidrocortisona, ja que a pesar de la gran similitud química amb la prednisona, aquesta reacciona més lentament i no contribueix pràcticament al senyal registrat. S'utilitza la calibració per PLS i es comparen els resultats amb els obtinguts per aplicació del mètode de la velocitat inicial de reacció aplicat sobre

les mateixes mostres. S'obtenen valors molt més exactes i precisos mitjançant la utilització del PLS.

Per comprovar l'exactitud dels resultats obtinguts en l'anàlisi de mostres del preparat farmacèutic, s'utilitza la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) com a mètode alternatiu de validació.

L'exactitud dels resultats és comparable, mentre que la precisió del mètode cinètic és més alta. Això últim ja que amb el mètode cinètic és possible treballar en un medi suficientment apolar que permet mantenir dissolts tots els components de la pomada i s'evita, d'aquesta manera, l'extracció de l'analit del fàrmac objecte d'anàlisi, requerida pel procediment cromatogràfic.

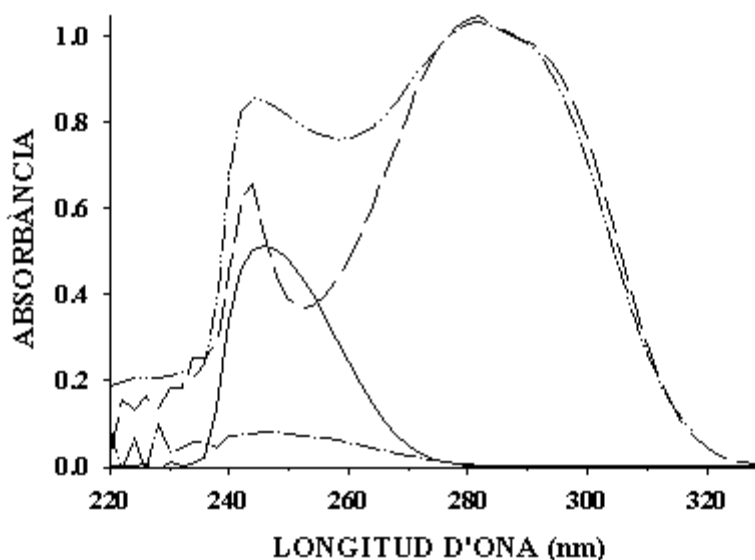
## II.3. EXPERIMENTAL

### II.3.1. REACTIUS I DISSOLUCIONS

Tots els reactius i dissolvents utilitzats són de grau analític. Es prepara cada dia una dissolució estoc  $2,5 \times 10^{-3}$  M d'acetat d'hidrocortisona (Sigma), pesant amb exactitud una quantitat d'aproximadament 0,100 g en 100 ml de cloroform (Panreac), i a partir d'aquesta es prepara la dissolució de treball  $2,5 \times 10^{-4}$  M per dilució amb cloroform. La dissolució un cop preparada es protegeix de la llum amb paper d'alumini i es guarda a  $4-5^{\circ}\text{C}$  a la nevera, ja que es comprova que es descompon lentament a temperatura ambient.

Es prepara àcid clorhídric 0,05 M en Metanol (Promochem), per dilució a partir de l'àcid clorhídric concentrat (Panreac), i s'estandaritza amb TRIS.

Una dissolució  $5 \times 10^{-3}$  M del reactiu, l'àcid isonicotínic hidrazina (Fluka), es prepara diàriament pesant amb exactitud una quantitat aproximada de 0,07 g del reactiu, se li afegixen 20 ml de la dissolució de HCl 0,05 M i es porta a un volum de 100 ml amb metanol.



**Figura 2.1.** Espectre UV de Hemorrane (---), ac. hidrocortisona (—), prednisona (- -) i benzocaina (- - -).

### II.3.2. MOSTRES

S'analitzen mostres, comprades a la farmàcia, de dos lots de producció diferents del preparat farmacèutic Hemorrane® (Laboratoris Nycomed Leo, Madrid, Spain). Aquest preparat es presenta en forma de pomada contenint, per g de la mateixa, 15 mg d'acetat d'hidrocortisona, 2,5 mg de prednisona i 10 mg de benzocaina com a principis actius. A la figura 2.1 es mostren els seus espectres UV. Els excipients de la pomada són insolubles en dissolvents polars, a diferència dels principis actius que són solubles tant en cloroform com en alcohol.

### II.3.3. PROCEDIMENT CINÈTIC D'ANÀLISI

Les diferents dissolucions de treball són preparades directament a la cel·la espectrofotomètrica, mitjançant l'ús de micropipetes i aquesta es manté tapada durant la mesura per tal d'evitar l'evaporació del solvent i l'absorció d'humitat de l'aire. Es coneix que l'acetat d'hidrocortisona és fotosensible, i per evitar la seva descomposició a mesura que avança la reacció, es col·loca un filtre de tall (190-300 nm) davant del camí òptic i després de la font de radiació.

S'afegeix en primer lloc un volum comprès entre 0,05 i 1 ml de la dissolució de treball de l'acetat d'hidrocortisona i després es porta a 2 ml amb cloroform. Aleshores es col·loca la cubeta al espectrofotòmetre, i es manté a temperatura constant a 25°C i agitada durant un minut. Posteriorment, es registra la referència. A continuació s'afegeix 0,5 ml de la dissolució del reactiu isoniàcid, i s'agafa com a temps zero, el moment en què s'afegeix la primera gota de reactiu. Es registra l'espectre UV-Visible a intervals de 2 nm en el rang de longituds d'ona de 300-500 nm, durant un temps total de 30 minuts a intervals d'un minut, utilitzant un temps d'integració de 1 segon. Aquesta zona de l'espectre conté fonamentalment la banda d'absorció del producte de la reacció ( $\lambda_{\text{max}} = 388 \text{ nm}$ ) però també hi ha la contribució de la cua de la banda d'absorció del reactiu. L'agitació a l'interior de la cubeta es manté durant tot el registre cinètic.

Per a la determinació de la velocitat inicial, s'utilitza únicament la corba cinètica registrada a la longitud d'ona del màxim d'absorbància del producte de reacció.

Els models de calibració es construeixen amb 11 mostres que cobreixen regularment l'interval de concentracions de  $(0,5-10) \times 10^{-5} \text{ M}$  d'acetat d'hidrocortisona. Aquestes mostres es preparen per duplicat en dies diferents i en un ordre totalment aleatori. La capacitat predictiva dels

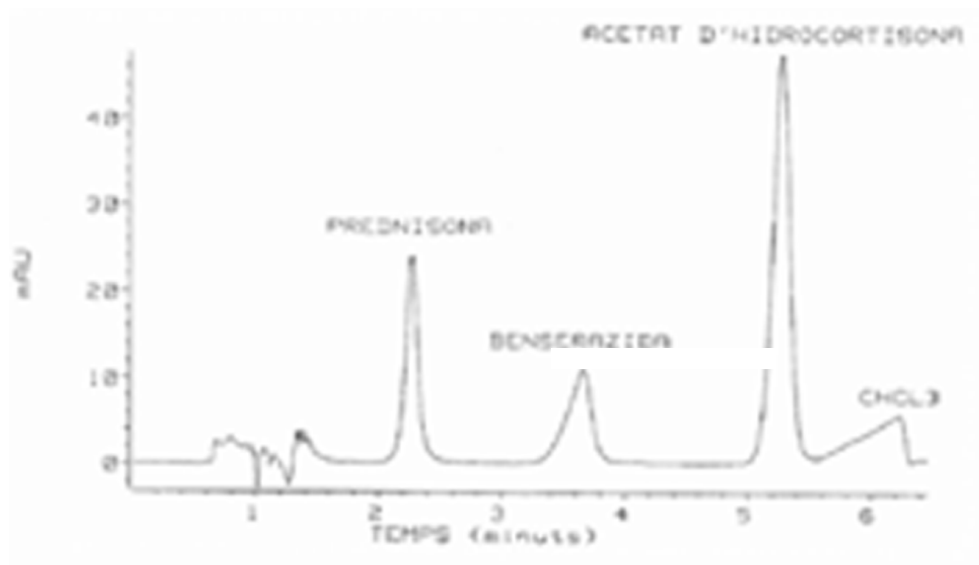
diferents models s'avalua amb 17 mostres amb concentracions compreses dins de l'interval de calibració. La reproduïbilitat del mètode cinètic es calcula a partir de les corbes cinètiques d'un conjunt de 11 mostres de la mateixa concentració d'acetat d'hidrocortisona ( $3.0 \times 10^{-5}$  M) preparades en dies diferents.

Per l'anàlisi de les mostres del preparat farmacèutic Hemorrane®, es pesen amb exactitud sis porcions d'uns 0,27 g de cada lot i es dissolen en 50 ml de cloroform. Aleshores es registra la cinètica de la reacció de cada una d'elles per duplicat seguint la mateixa metodologia que per les mescles de calibració, afegint a la cubeta 0,5 o 0,75 ml de la mostra, que correspon a unes concentracions d'acetat d'hidrocortisona de  $4 \times 10^{-5}$  i  $6 \times 10^{-5}$  M, respectivament.

#### II.3.4.PROCEDIMENT CROMATOGRÀFIC

Per a la determinació cromatogràfica és necessari extreure prèviament els components actius de la pomada. Es pesen amb exactitud tres porcions d'uns 0,12 g de cada lot del preparat farmacèutic, i es dissolen en 5 ml de cloroform. S'agafen 4 ml i es dipositen en un tub de centrífuga que es troba submergit dins un bany d'ultrasons, i s'afegeixen lentament 45 ml de metanol calent. Es deixa refredar i es centrifuga. S'injecten per triplicat 20  $\mu$ l del líquid sobrenedant, prèviament filtrats mitjançant un filtre de xeringa de nylon de 0,45  $\mu$ m de dimensió de porus, i s'elueixen amb un fase mòbil d'acetonitril: H<sub>2</sub>O, mantenint el cabal constant a 1 ml/min. S'utilitza un gradient d'elució de la fase mòbil que consisteix en fer passar durant el primer minut una mescla 40:60 d'acetonitril: H<sub>2</sub>O (v:v), i aleshores variant gradualment aquesta relació fins el 70:30 en 4 minuts. En aquestes condicions, els pics es troben ben definits, separats i no presenten cua. Els temps de retenció per la prednisona, benzocaina i acetat d'hidrocortisona són de 2,3, 3,7 i 5,3 minuts, respectivament (figura 2.2). Les mostres s'injecten per triplicat i es registren els cromatogrames a les longituds d'ona dels màxims d'absorbància de cada una de les espècies, a 245, 290 i 240 nm, respectivament, utilitzant una amplada de banda de 4 nm.

Després d'estudiar l'interval de concentracions en què hi ha una relació lineal entre l'àrea integrada i la concentració, es quantifiquen les mostres a partir de la injecció de solucions de referència de concentració molt pròxima a la teòrica en el fàrmac.



**Figura 2.2.** Cromatograma d'una mostra de Hemorrane a 240 nm.

### II.3.5. REGISTRE I PROCESSAMENT DE LES DADES

El registre dels espectres a diferents temps per a cada una de les mostres, s'ha realitzat en aquest treball mitjançant l'espectrofotòmetre UV-Visible de díodes en línia Hewlett-Packard model HP8451A que porta incorporat un bany termostàtic i un sistema d'agitació intern. Del registre cinètic, s'obté per a cada mostra un vector que conté l'evolució espectral del producte de reacció de l'acetat d'hidrocortisona amb el ionsàcid.

A partir de la matriu de dades cinètico-espectrofotomètrica obtinguda amb el conjunt de totes les mostres, es construeixen els diferents models de calibració utilitzant l'algoritme PLS incorporat en el programa Unscrambler versió 6.1.

S'assagen diferents models per tal d'optimitzar el mode espectral; absorbància i primera derivada (dimensió de finestra total de 21 punts), el rang de longituds d'ona de treball, i el número de components principals utilitzats en la regressió, amb l'objectiu de minimitzar l'error de predicció de les mostres. Per a la construcció dels diferents models PLS s'utilitza el mètode de validació creuada [Martens, 1989], amb un número de segments de cancelació igual al número de mostres que constitueixen la matriu de calibració, deixant sempre a fora els dos replicats de cada

mostra. S'escull com a número factors significatius el menor que presenti un  $MSECV_j$  no significativament diferent del mínim  $MSECV$  [Haaland, 1988; Blanco, 1994], i com a criteri de significació es segueix el proposat per Haaland i Thomas [Haaland, 1988] amb un valor de  $\alpha = 0,25$ .

Per tal de facilitar la comparació i interpretació dels resultats obtinguts en cada un dels models provats, es va calcular l'error estàndard relatiu de predicció (RSEP%), pel conjunt de mostres de calibració i de predicció.



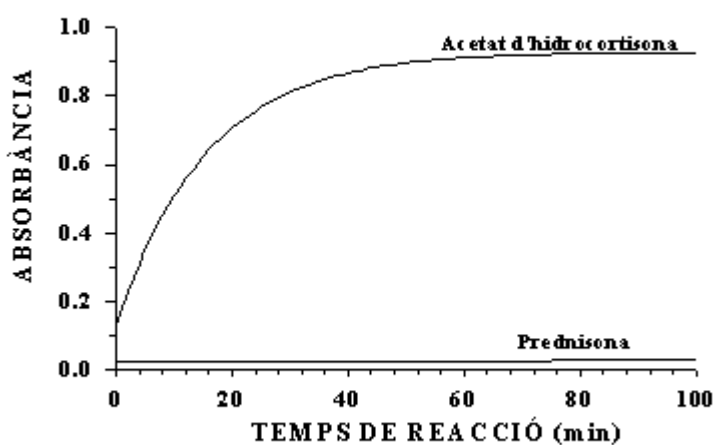
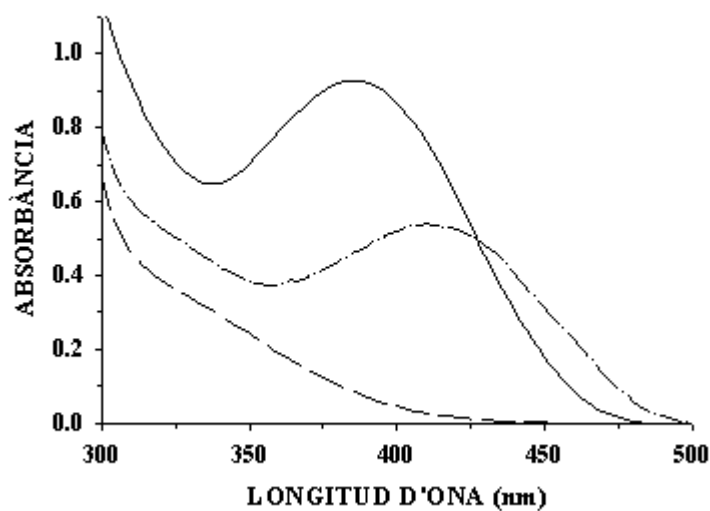
## II.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### II.4.1. REACCIÓ DE L'ACETAT D'HIDROCORTISONA AMB INH

La reacció de condensació amb l'isoniàcid per a formar les hidrazones en solució dèbilment àcida, és general en tots els esteroides que contenen un grup carbonil a la seva estructura, i es troba ben descrita a la bibliografia i aplicada en química analítica [Umberger, 1955; Smith, 1959; Ringler, 1961]. Es tracta d'una reacció reversible, que segueix una cinètica de segon ordre, amb una velocitat de reacció dependent del pH del medi. Els grups <sup>4</sup>-3-oxoesteroides, com és el cas de l'acetat d'hidrocortisona, reaccionen quantitativament a temperatura ambient en menys d'una hora. Altres grups carbonílics reaccionen només després d'un llarg temps, o bé forçant molt les condicions de treball.

Abans de procedir a la calibració del sistema, s'escullen les condicions experimentals més idònies per a la quantificació de l'acetat d'hidrocortisona. La principal limitació experimental ve donada per la forma física de la preparat farmacèutic a analitzar. La mostra només és soluble en cloroform i precipita en presència de dissolvents polars, com ara el metanol. Aquest últim, es troba citat a la bibliografia com solvent més satisfactori per dur a terme la reacció [Jencks, 1959]. Les millors condicions trobades són cloroform i metanol a una relació de 4:1, donat que permet mantenir dissolt tant als polímers de la pomada com el clorhidrat de l'isoniàcid, i a l'aigua que es forma, producte de la reacció. L'altre paràmetre que s'optimitza és la concentració de l'àcid clorhídric. L'àcid actua com a catalitzador de la reacció i també afecta a l'espectre de la hidrazona formada. Es proven diferents concentracions i es troba com a òptima una concentració d'àcid clorhídric d'aproximadament dos cops superior a la concentració del reactiu, ja que l'absorbància és superior a altres relacions estudiades. Aquest fet es troba en acord amb altres observacions recollides a la bibliografia [Umberger, 1955].

La limitació en la concentració de metanol en la barreja de dissolvent limita la concentració màxima de reactiu que es pot utilitzar. En aquest treball s'utilitza una concentració de reactiu constant de  $1 \times 10^{-3}$  M. En aquestes condicions, l'excés de reactiu vers la concentració d'analit fa que la reacció per les dissolucions diluïdes segueixi una cinètica de pseudoprimer ordre respecte



**Figura 2.3 A-B.** Espectres del INH (---), i derivats de l'ac. d'hidrocortisona (—) i prednisona (- -), després de 2 i 24 h, respectivament; Perfils a 388 nm a igualtat de condicions.

l'anàlit, amb un temps de semireacció de  $11 \pm 1$  minuts, mentre que en les dissolucions més concentrades es produeix una lleugera desviació d'aquest comportament.

La prednisona, a pesar de tenir una estructura similar, reacciona a velocitat molt més lenta, cosa que fa que la seva reacció no contribueixi pràcticament al senyal registrat durant els 30

primers minuts de reacció. Si es deixa temps suficient també té lloc la condensació d'aquest 1,4-3-oxoesteroide amb l'isoniàcid per a donar lloc a la hidrazona corresponent, que presenta un màxim d'absorbància a 406 nm. A la figura 2.3 A-B es mostren els espectres d'absorbància i els perfils cinètics d'ambdues hidrazones.

## II.4.2. ANÀLISI DE L'ACETAT D'HIDROCORTISONA

Un cop escollides les condicions experimentals més idònies per a dur a terme la reacció, es passa a l'estudi i determinació de l'acetat d'hidrocortisona en les mostres preparades al laboratori.

### II.4.2.1. MÈTODE DE LA VELOCITAT INICIAL DE REACCIÓ

La representació de la velocitat inicial, en absorció  $\text{min}^{-1}$ , vers la concentració inicial de l'acetat d'hidrocortisona per les diferents mostres de calibració és una recta. Els paràmetres de la recta de regressió calculats i els límits de confiança, per un nivell de significació del 95% són:

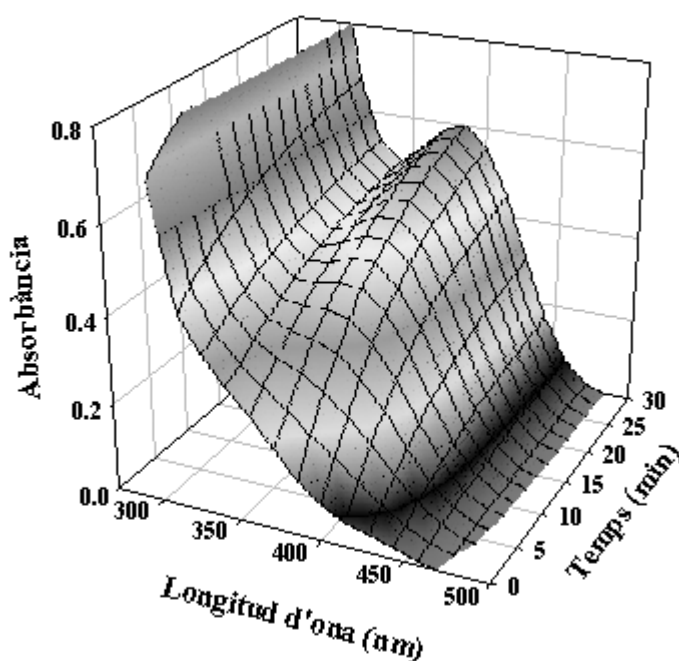
$$\text{velocitat}_0 = (-0,5 \pm 1,7) \times 10^{-3} + (810 \pm 40) \times [\text{acetat d'hidrocortisona}]_0 \quad (r = 0,996)$$

### II.4.2.2. MÈTODE DE CALIBRACIÓ PLS

La calibració per PLS permet utilitzar tota la informació continguda en l'evolució de l'espectre d'absorbància amb el temps. A la figura 2.4, es mostra aquesta variació en l'interval de 300 a 500 nm durant els primers 30 minuts de la reacció, per una concentració de  $6 \times 10^{-5}$  M d'acetat d'hidrocortisona.

Un factor que podria afectar a la reproduïbilitat de les dades registrades és que amb el temps un component de la pomada precipités inadvertidament. Encara que aquest fet s'intenta evitar, utilitzant un dissolvent amb un elevat contingut en cloroform i mantenint una agitació constant, si en algun cas es produís, provocaria una terbolesa en el medi que afectaria al valor de l'absorbància d'un mode pràcticament constant amb la longitud d'ona. Aquest efecte es pot corregir fàcilment [Levillain, 1986] utilitzant la derivada dels espectres originals enlloc de la mesura directa de l'absorbància. Per aquest motiu, els models de calibració es construeixen

utilitzant tant l'espectre d'absorbància com el de la primera derivada. Per altra banda, s'ha descrit que encara que el PLS sigui un sistema d'espectre complet, en el cas d'una elevada correlació entre la informació continguda en les diferents variables, pot ser convenient una selecció d'aquestes eliminant del model aquelles que no aportin informació analítica rellevant. Aquesta selecció es fa escollint diferents intervals de longituds d'ona i diferents temps. A pesar d'això, no s'obtenen diferències significatives entre els diferents models assajats, que tan sols produeixen resultats lleugerament millors quan de la informació espectral es redueix la contribució de la cua d'absorció del reactiu. Així, només es presenten els resultats obtinguts utilitzant els valors registrats durant els 30 minuts de l'absorbància i de la primera derivada, en l'interval de 350-460 nm i 370-480 nm, respectivament. En la construcció d'ambdós models s'utilitzen 3 i 5 factors respectivament. El fet de què sigui necessari més d'un factor, s'atribueix a què el PLS està corregint la desviació de la cinètica de pseudoprimer ordre de les mostres més concentrades.



**Figura 2.4.** Evolució espectral de l'ac. d'hidrocortisona.

**Taula 2.1.** Resultats obtinguts en els diferents mètodes. RSEP(%) de calibració i predicció, i el valor mig d'ac. hidrocortisona amb el RSD(%) d'onze mostres de concentració  $3 \times 10^{-5}$  M.

	Velocitat inicial	Absorbància <sup>a</sup>	1r derivada <sup>b</sup>
RSEPC (%)	4,02	1,24	0,52
RSEPV (%)	9,1	1,46	1,01
Mitjana/ mol l <sup>-1</sup>	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,01 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^{-5}$
RSD (%)	15	1,5	1,8

Número de factors utilitzats en el model: a = 3, b = 5

A la taula 2.1 es mostra l'error estàndard relatiu de predicció obtingut al quantificar el conjunt de mostres de calibració i de predicció mitjançant aquests models PLS, així com el valor mig en acetat d'hidrocortisona obtingut per les onze mostres de concentració  $3 \times 10^{-5}$  M utilitzades en l'estudi de la reproduïbilitat, i el valor de la desviació estàndard relativa calculada a partir d'aquestes mostres. S'observa que els resultats obtinguts utilitzant espectres d'absorbància o de primera derivada són pràcticament idèntics, cosa que confirma que la pomada resta totalment dissolta al llarg de la reacció, i que els resultats obtinguts per PLS presenten una exactitud i reproduïbilitat molt superior als obtinguts pel mètode de la velocitat inicial de reacció.

Els resultats individuals obtinguts per les 17 mostres de predicció es mostren a la taula 2.2. Encara que varies mostres tenen la mateixa concentració, s'ha de tenir present que són dissolucions preparades a partir de pesades diferents, en dies diferents. Destaca que la precisió de la quantificació és molt bona i equivalent en tot l'interval de concentracions utilitzat. Donat que les resultats són equivalents, s'ha escollit per la seva major simplicitat, el procediment que utilitza els espectres d'absorbància.

**Taula 2.2.** Resultats obtinguts en la quantificació de les mostres de predicció per models PLS. Número de factors PLS: a = 3, b = 5

Mostra	Afegit ( $\times 10^5$ M)	Absorbància (350-460 nm) <sup>a</sup>		1r derivada (370-480 nm) <sup>b</sup>	
		Trobat ( $\times 10^5$ M)	Error (%)	Trobat ( $\times 10^5$ M)	Error (%)
1	1	0,99	0,9	1,01	-0,7
2	2	2,00	-0,2	2,01	-0,5
3	3	2,97	1	2,99	0,4
4	3	3,01	-0,5	3,00	-0,1
5	3	3,04	-1,2	3,06	-1,8
6	3	3,06	-2,1	3,04	-1,4
7	4	4,01	-0,2	3,95	1,3
8	4	3,99	0,2	4,00	0,1
9	4	4,05	-1,2	3,98	0,5
10	6	5,90	1,6	5,92	1,3
11	7	6,84	2,3	6,84	2,4
12	7	7,18	-2,5	7,09	-1,2
13	7	7,20	-2,9	6,99	0,2
14	9	8,92	0,9	9,01	-0,1
15	9	8,98	0,2	8,98	0,2
16	9	9,04	-0,4	8,99	0,1
17	9	9,00	0	8,89	1,2

## II.4.3. ANÀLISI DE L'ACETAT D'HIDROCORTISONA EN HEMORRANE®

Després de comprovar que el mètode cinètic proposat proporciona molt bons resultats en mostres preparades en el laboratori, s'aplica a l'anàlisi del preparat farmacèutic Hemorrane® de dos lots de producció diferents. Aquests resultats, conjuntament amb els obtinguts pel mètode de la velocitat inicial de reacció, es comparen a la taula 2.3 amb els valors trobats per HPLC. Es mostra el contingut mig (en mg per g de pomada) en cada lot, amb el seu interval de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

S'observa que els valors mitjos trobats per l'aplicació del model PLS coincideixen amb els trobats per HPLC, però que la precisió del mètode cinètic és clarament major. Aquest fet s'ha confirmat mitjançant un test F per un nivell de confiança del 95%. En canvi, els valors obtinguts en el mètode de la velocitat inicial de reacció, difereixen significativament dels valors trobats per HPLC en un dels lots.

**Taula 2.3.** Contingut d'ac. d'hidrocortisona ( $\text{mg g}^{-1}$  de pomada).

	Mètode cinètic		HPLC
	velocitat inicial	model PLS	
Lot K 04	$14,4 \pm 0,8$	$14,3 \pm 0,3$	$14,3 \pm 0,9$
Lot K 51	$13,2 \pm 1,3$	$14,4 \pm 0,3$	$14,3 \pm 1,0$

## **II.5. CONCLUSIONS**

S'ha demostrat el gran potencial analític de la simbiosi entre un registre multiparamètric d'un senyal cinètic i d'una calibració multivariable per PLS. Inclús en sistemes tan aparentment simples com l'objecte d'estudi en aquest treball, la utilització de tota la informació registrada permet millorar de forma molt considerable l'exactitud i precisió dels mètodes cinètics convencionals, fent dels mètodes cinètics procediments competitiu front el mètode HPLC, en els casos en què, com en el present, sigui necessària una etapa prèvia d'extracció de l'analit d'una matriu complexa. La possibilitat d'analitzar la mostra en fase homogènia, reduint al mínim la seva manipulació, permet millorar considerablement la precisió de l'anàlisi.



## II.6. REFERÈNCIES

- Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Redón, M., *Appl. Spectrosc.*, **48**, 37, 1994.
- Haaland, D. M.; Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
- Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 475, 1959.
- Levillain P.; Fompeydie D., *Analisis*, **14**, 1, 1986.
- López-Cueto, G.; Rodríguez-Medina, J. F.; Ubide, C., *Analyst*, **122**, 519, 1997.
- Martens, H.; Naes, T., *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- Quencer, B.M.; Crouch, S.R., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 243, 1993.
- Ringler, I.; Perrine, J., *Endocrinology*, **69**, 1095, 1961.
- Smith L.L.; Foell T., *Anal. Chem.*, **31**, 102, 1959.
- T. Owen, *Int. lab.*, **17**, 68, 1987.
- Umberger, E. J. *Anal. Chem.*, **27**, 768, 1955.

