

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DETERMINACION DE TRAZAS DE FIERRO EN CLORHIDRATO DE LINCOMICINA POR ESPECTROFOTOMETRIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
ELENA CHIN CHING
MEXICO, D. F. 1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	4
III. PARTE EXPERIMENTAL	19
3.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO	20
3.2 PROCEDIMIENTO	22
3.3 RESULTADOS	26
3.4 VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS	44
IV. CONCLUSIONES	52
V. BIBLIOGRAFIA	55
VI. APENDICE	58

I. I N T R O D U C C I O N

El Clorhidrato de Lincomicina es un antibiótico de acción predominantemente bactericida. Su espectro antimicrobiano abarca principalmente algunas bacterias grampositivas, así se emplea en el tratamiento de infecciones producidas por estafilococos, estreptococos y neumococos.

Debido a la naturaleza corrosiva de este antibiótico, se puede incorporar a la materia prima trazas de fierro, procedente de las instalaciones en su proceso de fabricación.

La cantidad del elemento metálico presente en la muestra es un parámetro que nos indica el destino que se le dará al antibiótico. De esta manera se distinguen tres grados de lincomicina: USP, USP grado inyectable y grado agrícola.

La lincomicina USP grado inyectable se utiliza para soluciones estériles y su contenido de fierro no debe ser mayor de 0.2 ppm, ya que de lo contrario se afectaría la estabilidad física del medicamento por la aparición de un color azul-verdoso en la solución.

La lincomicina USP se emplea para productos no estériles como jarabes y cápsulas, en donde el límite de fierro que se da es mayor, hasta 0.8 ó 1.0 ppm. Si la cantidad de trazas metálicas es mayor, se destina a uso veterinario, grado agrícola.

La detección y cuantificación de este elemento metálico en la materia prima se ha venido realizando hasta la fecha en la casa matriz, en Kalamazoo, Mich., E.U.A. por método de

fluorescencia de rayos X. Esto representa para el laboratorio farmacéutico un costo de aproximadamente trescientos dólares por análisis y un tiempo estimado de 45 días para obtener resultados.

Considerando la posibilidad de implementar un método analítico apropiado a las condiciones del laboratorio de control, se desarrolló este trabajo, aprovechando las ventajas que representa el utilizar métodos sensibles y específicos como son la espectrofotometría visible y de absorción atómica.

II. G E N E R A L I D A D E S

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION MOLECULAR

Cuando una molécula en estado fundamental absorbe energía en forma de luz, de una longitud de onda específica, el contenido de energía de la molécula se incrementa y eleva a un nivel energético superior ó estado excitado. Como este estado es inestable, la molécula retorna rápidamente a su configuración estable ó estado fundamental. En este proceso se ha de perder energía equivalente a la cantidad de luz inicialmente absorbida en el proceso de excitación.

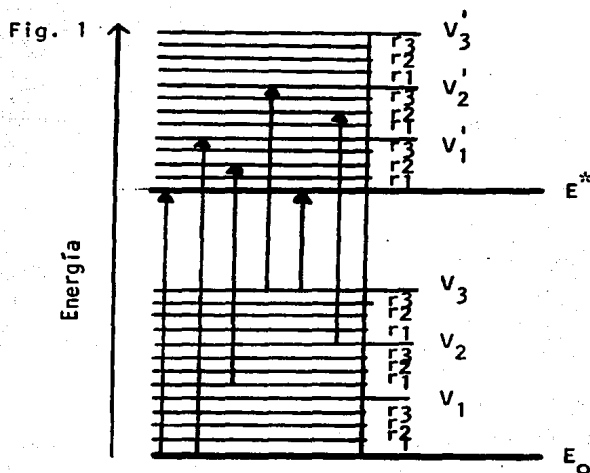
Este salto de energía desde un nivel a otro se conoce como transición. Existen tres clases de transiciones de interés en una molécula: (1) transiciones electrónicas (2) vibracionales (3) rotacionales; cada una de las cuales ocurren a diferentes energías.

La luz visible y la ultravioleta proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas.

Las transiciones vibracionales, que son de menor energía ocurren en el intervalo de energías asociadas con la luz infrarroja; mientras que la cantidad de energía que se requiere para las transiciones de rotación, las menos energéticas puede suministrarla la radiación del Raman.

Aunque estas transiciones están cuantizadas, es decir, que únicamente ciertos estados de energía bien definidos se per-

miten en una molécula, en la mayoría de ellas los tres tipos de transiciones se superponen una a otra. Este efecto origina que cada transición electrónica vaya asociada a diversos estados vibracionales y rotacionales, por lo que da como resultado bandas de absorción relativamente anchas en el espectro electrónico.^{13,14}



La molécula se puede excitar desde un estado fundamental E_0 hasta un estado excitado E^* y recibir también suficiente excitación vibracional para moverse desde un estado fundamental V_0 a un estado vibracional más alto, como V_1 .

ORIGEN DE LAS ABSORCIONES ELECTRONICAS
EN LA REGION VISIBLE

Cuando se dice que una molécula se eleva a un nivel electrónico superior, quiere decir que se cambia un electrón de un orbital a otro de energía mayor.

La energía requerida para la transición de dobles enlaces conjugados disminuye y el máximo de absorción se desplaza hacia longitudes de onda superiores (desplazamiento batocrómico). Si la conjugación comprende un número suficiente de dobles enlaces, la absorción se desplaza hacia la región visible (400-750 nm), pasando el compuesto a ser coloreado.^{13,15}

ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

Las mismas consideraciones generales sobre excitación electrónica por las moléculas, se aplican también a los átomos, con la única diferencia de que en el átomo aislado no existen transiciones vibracionales y rotacionales, ya que no hay enlaces alrededor del cual vibren ó roten. De este modo, la irradiación de especies atómicas producen líneas de absorción muy estrechas (transiciones electrónicas puras) a las longitudes de onda permitidas, correspondientes a sus niveles de energía.

La espectrofotometría de absorción atómica es el proce-

so que ocurre cuando un átomo en estado fundamental absorbe energía radiante y se eleva a un estado excitado.

Este método consiste en introducir la solución problema en forma de vapor ó nube, en una flama caliente para disociar a los compuestos químicos en átomos libres.

Bajo condiciones apropiadas de la flama (temperatura, proporción del aire y gas combustible), una amplia proporción de átomos permanecerán en su estado fundamental y serán capaces de absorber energía, de longitud de onda apropiada, proveniente de una fuente de luz, alineada sobre la flama.¹⁶

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS ESPECTROS
DE ABSORCION

Si se hace pasar luz monocromática, de intensidad inicial I_0 , a través de una solución (que contiene átomos ó moléculas al estado fundamental), se observa una disminución en la intensidad de luz, I , determinada por su paso a través de la solución.

Esta disminución de la intensidad de la fuente, a la longitud de onda seleccionada, indica la concentración de elemento en la solución original de la muestra.

La transmitancia es el término que relaciona la intensidad de luz transmitida y la de la incidente: $T=I/I_0$

Por otra parte, la absorbancia (A), es el término $\log 1/T$. Este último es más conveniente para caracterizar la absorción de luz en la espectrofotometría de absorción, pues esta cantidad guarda una relación lineal con la concentración de la sustancia absorbente.

La ley de Beer establece esta relación:

$$A = a b c$$

donde:

A= absorbancia

a= absortividad, constante de proporcionalidad

b= longitud del paso de luz a través de la solución

c= concentración de las especies absorbentes en unidades de peso/ volumen.

Cuando la concentración se expresa en moles por litro, la constante de proporcionalidad recibe el nombre de absorptividad molar " ϵ ".

$$A = \epsilon b c$$

EXTRACCION Y DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FIERRO CON 8-HIDROXIQUINOLINA

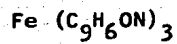
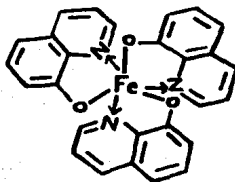
Las técnicas de extracción son adecuadas para la separación de pequeñas cantidades de metales.

Mediante el empleo de reacciones de complejación adecuadas, la selectividad de la mayoría de las extracciones puede aumentar notablemente.¹⁷

El presente trabajo se basa en la extracción directa con dos diferentes disolventes orgánicos, de un complejo metálico, soluble, formado entre el ión férrico (Fe^{3+}) y la 8-hidroxiquinolina (oxina), y su posterior análisis espectrofotométrico.

La 8-hidroxiquinolina se emplea frecuentemente como una solución en cloroformo para la extracción directa del ión metálico en soluciones acuosas. Puesto que estas soluciones clorofórmicas son fuertemente coloridas (verde oscuro para el ión férrico), proporcionan un medio para la determinación espectrofotométrica en la región visible.

La oxina absorbe por sí sola fuertemente a 318 nm y un poco, arriba de 375 nm; mientras que el oxinato de fierro (III) presenta el máximo de absorción a 470 nm y 580 nm. ¹



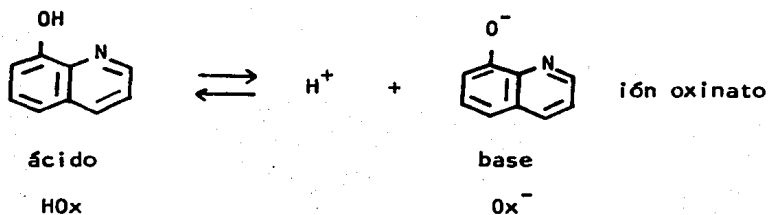
Estructura del oxinato de fierro (III)

EXTRACCION DE OXINA CON CLOROFORMO

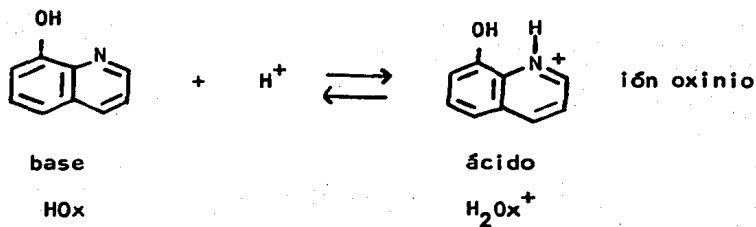
La oxina es un reactivo orgánico que forma compuestos quelatos con muchos metales (se sabe que reacciona por lo menos con 43 metales) ^{2,3}, pero sólo los complejos de fierro (III) y vanadio son coloridos (color magenta oscuro para el vanadio).

La oxina es una sustancia anfotérica en medio acuoso ⁴:

Puede jugar el papel de un ácido dentro de la reacción:



Como también el de una base:



Y debido a su naturaleza anfotérica, el control del pH es de vital importancia en la extracción del complejo metálico.

Coefficiente de partición

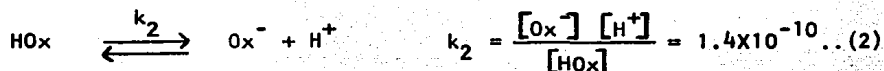
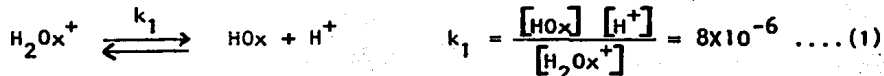
Para determinar la distribución de la oxina entre cloroformo y agua, se debe considerar la ionización de éste en la fase acuosa, de tal forma que aunque el coeficiente de partición, K_d , de la oxina permanece esencialmente constante, 720 a 18°C⁴, el rendimiento de la extracción varía considerablemente con las condiciones experimentales, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Variación del coeficiente de distribución de la oxina (HOx) con el pH^{2,4}.

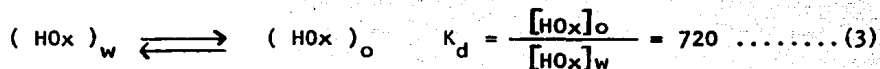
pH	1a. Extracción % HOx extraído	K* experimental	K* calculado	2a. Ext. % HOx ex.
0	0.59	0.006	0.006	1.2
1	5.57	0.059	0.058	10.7
2	37.10	0.590	0.580	60.4
3	83.70	5.900	5.800	97.6
4	97.80	59.000	58.000	100.0
5	100.00	720.000	720.000	100.0
7	100.00	720.000	720.000	100.0
9	100.00	720.000	720.000	100.0
10	99.80	500.000	300.000	100.0
11	98.00	50.000	48.000	100.0
12	88.00	5.000	5.000	97.0
13	33.30	0.500	0.500	72.0
14	5.00	0.053	0.050	10.0

Las reacciones pueden describirse en términos de las siguientes ecuaciones.

Equilibrio de ionización:



Distribución:



Donde:

k_1 y k_2 = constantes de ionización para los respectivos equilibrios

K_d = coeficiente de partición de la oxina

Ox^- = ión oxinato ú 8-hidroxiquinolato

H_2Ox^+ = ión oxinio

w y o = fase acuosa y orgánica respectivamente.

Considerando la ionización de la oxina en agua, el coeficiente de partición generalmente determinado, K_d , se debe designar como un coeficiente de distribución aparente, K^* , que refleje el comportamiento de distribución total de todas las especies de

oxina presentes.

$$K^* = \frac{\text{Conc. total de soluto en la fase orgánica}}{\text{Conc. total de soluto en la fase acuosa}}$$

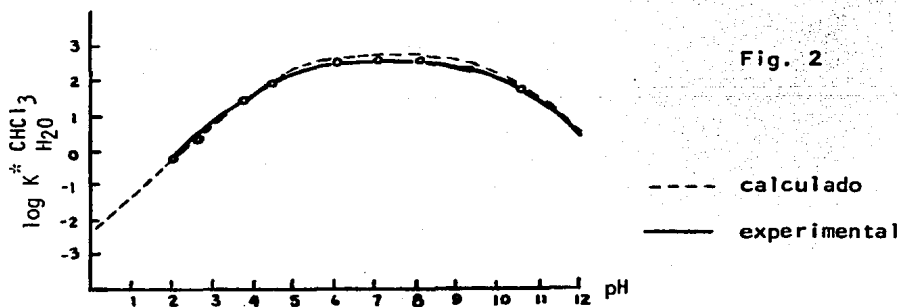
$$K^* = \frac{[\text{HOx}]_o}{[\text{HOx}]_w} = \frac{[\text{HOx}]_o}{[\text{H}_2\text{Ox}^+]_w + [\text{HOx}]_w + [\text{Ox}^-]_w} \dots (4)$$

Despejando las ecuaciones (1) y (2):

$$[\text{H}_2\text{Ox}^+] = \frac{[\text{HOx}]_w [\text{H}^+]}{k_1} \quad \text{Ox}^- = \frac{[\text{HOx}]_w k_2}{[\text{H}^+]}$$

y sustituyendo en la ecuación (4), tomando como factor común $[\text{HOx}]_w$, se tiene:

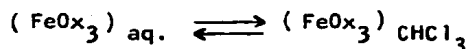
$$K^* = \frac{K_d}{\frac{[\text{H}^+]}{k_1} + 1 + \frac{k_2}{[\text{H}^+]}}$$



Coefficiente de distribución de la oxina entre CHCl_3 y agua como función del pH.

EXTRACCION DEL OXINATO DE FIERRO (III) CON CLOROFORMO

Cuando una solución clorofórmica de oxina se agita con una solución acuosa en la cual está presente el ión férrico, el oxinato metálico formado se distribuirá entre las dos fases, según el equilibrio:

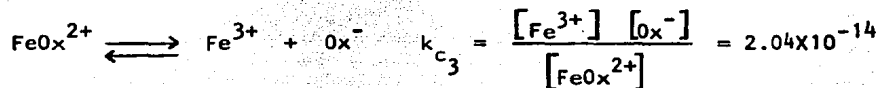
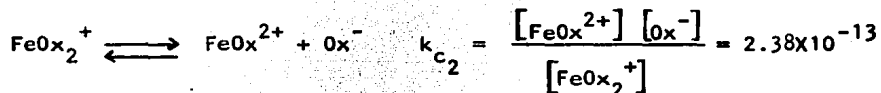
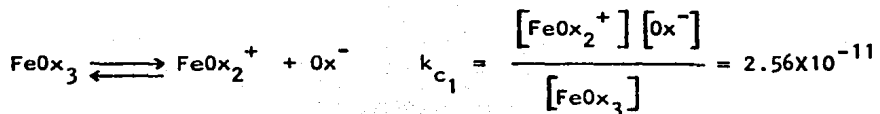


Si el Fe^{3+} fuera la única especie metálica presente en la fase acuosa, el coeficiente de partición entre cloroformo y agua saturada con cloroformo se expresaría como:

$$K_d = \frac{[\text{FeOx}_3]_{\text{CHCl}_3}}{[\text{FeOx}_3]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Sin embargo, la oxina muestra una marcada tendencia para formar complejos cargados de hierro (FeOx_2^+ , FeOx^{2+}), por lo que se deben considerar las constantes de ionización de estos complejos intermedarios antes de calcular el coeficiente de distribución.

La determinación espectrofotométrica de las constantes de ionización de los complejos de Fe (III)- oxina en una solución de NaClO_4 0.1 M a 25°C dieron los siguientes valores ⁵:



El valor de $\log K_d$ encontrado en tablas es de 42.3⁶.

Se estableció también el intervalo de pH para la extracción completa del ión férrico en presencia de tartrato de sodio y potasio. Fig. 3

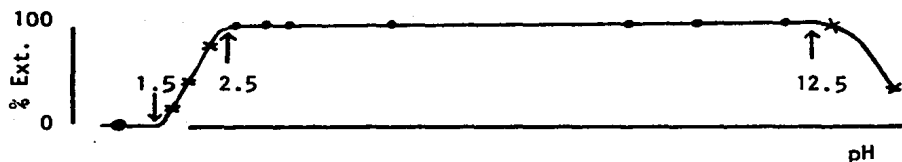


Fig. 3 Efecto del pH en la extracción de hierro.

El intervalo de pH para la extracción completa de Fe^{3+} es de 2.5 a 12.5. Con una doble ó triple extracción, el hierro se puede extraer completamente de soluciones muy ácidas, ej. a pH 2⁷.

EXTRACCION DEL OXINATO DE FIERRO (III) CON MIBK

El uso del cloroformo en la espectrofotometría de absorción atómica (AAS) puede originar productos de combustión tóxicos en el proceso de nebulización, además de que produce flamas inestables que rápidamente se extinguen. Debido a esto se prefiere el uso de ésteres y cetonas, de este último la metil isobutil cetona (MIBK) para la extracción de los complejos de oxina y su determinación espectrofotométrica correspondiente ^{8,9}.

Puesto que las soluciones de Fe (III)- oxina en MIBK son también coloridas (verde oscuro), se aprovecha esta propiedad para la determinación de la concentración del metal por método colorimétrico.

El mayor rendimiento en la extracción de fierro con MIBK y 8-hidroxiquinolina como agente complejante se obtiene a pH 7 ¹⁰.

NOTA: Las soluciones de la 8-hidroxiquinolina y de los hidroxiquinolatos son estables indefinidamente si no se exponen a la luz, especialmente luz solar ¹.

La intensidad de máximo color del complejo Fe (III)- HOx se alcanza muy rápidamente ¹¹.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El análisis se efectuó de la siguiente manera:

a) Formación del complejo Fe-oxina.

b) Extracción del complejo formado con $\begin{cases} \text{MIBK} \\ \text{Cloroformo} \end{cases}$

c) Lectura de las muestras:

Usando MIBK $\begin{cases} \text{Espectrofotometría visible} \\ \text{Espectrofotometría de absorción atómica} \end{cases}$

Usando cloroformo — Espectrofotometría visible

Las muestras usadas para establecer las condiciones óptimas del método de análisis consistieron de soluciones estándar de fierro (FeCl_3). Para el desarrollo del mismo mediante el procedimiento de adición de estándar y curva patrón, se consideraron y evaluaron los siguientes puntos:

- 1.- El pH de máxima extracción para el complejo Fe-oxina y comparación del resultado obtenido con el reportado en la literatura. Las soluciones buffer probadas fueron de pH 1, 3, 5, 7, 9 y 10.
- 2.- La longitud de onda de máxima absorción para el complejo metálico en ambos disolventes orgánicos (Cloroformo y MIBK).
- 3.- El intervalo de concentraciones dentro del cual se cumple con la ley de Beer.
- 4.- El volumen empleado para realizar cada extracción y el número de extracciones necesarias para efectuar un análisis cuantitativo.

Establecidas las condiciones anteriores, las muestras estudiadas consistieron de diferentes lotes de lincomicina, analizadas previamente por la casa matriz. Se efectuó una comparación de los resultados obtenidos con los reportados por el método de fluorescencia de rayos X; así mismo se estableció si la presencia del antibiótico interfería ó no en las determinaciones espectrofotométricas del oxinato férrico.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el método espectrofotométrico más adecuado para efectuar la validación del mismo en un tamaño de muestra mayor.

3.2 PROCEDIMIENTO

1. "Determinación de la longitud de onda de máxima absorción".

Se agitaron por separado dos porciones de 1.0 ml cada una de una solución estándar de fierro (100 ppm)^{*} con 10 ml de oxina al 0.2% en cloroformo y MIBK respectivamente, durante 15 min.

Se realizó un barrido de 400-700 nm del oxinato férrico formado frente a un blanco de oxina. (Fig. 1a y 1b)

2. "Influencia del pH en el rendimiento de la extracción".

Se transfirieron 6 alícuotas de 100 ml de una solución estándar de 0.1 ppm de fierro^{*} dentro de sus correspondientes embudos de separación de 250 ml. Se adicionaron por separado 10 ml de solución buffer-tartrato a diferentes pH y 10 ml de oxina al 0.2% en MIBK. La mezcla se agitó durante 15 min y se retuvo la fase orgánica para su análisis. (Fig. 2a)

El mismo procedimiento empleado se siguió utilizando una solución al 0.2% de oxina en cloroformo. (Fig. 2b)

3. "Comprobación de la ley de Beer".

Se preparó una serie de soluciones del complejo metálico en cloroformo en concentraciones de 1 a 10 ppm y se determinó la absorbancia de cada solución en función de su concentración, a las λ max. encontradas. (Fig. 3a, 3b y 3c)

* ver apéndice

4. "Variación del % de extracción de fierro con el número y volumen de extracciones".

Una primera serie consistió en agitar por separado 10 ml de oxina en MIBK con diferentes porciones del estándar de fierro de 100 ppm y leer directamente el complejo metálico formado (Referencia).

La segunda serie consistió en la extracción sucesiva del metal (solución estándar de fierro de 1 ppm): 1.- Con una sola porción de 10 ml de oxina/MIBK. 2.- Con dos porciones de 5 ml y 3.- Con tres porciones de 3 ml ^c/u de la solución extractante. Los resultados se compararon con las soluciones de referencia. (Tabla 4).

Todas las series realizadas se hicieron por triplicado, el dato que aparece en la tabla 4 es el promedio de los tres resultados.

5. "Determinación de fierro por curva patrón y adición de estándares".

Antes de iniciar el estudio con la muestra problema, se analizaron soluciones estándar de fierro de 1 ppm, utilizando dos métodos para su cuantificación: 1.- Por interpolación de los datos en la curva patrón y 2.- Por adición de estándares.

Los resultados obtenidos por ambos métodos se compararon con las concentraciones teóricas agregadas del estándar. (Tabla 5. Fig. 5a, 5b, 5c, 5d, 5e y 5f)

6. "Preparación y cuantificación de la muestra".

6.1 Por extracción directa.

Se pesaron 100 g de clorhidrato de lincomicina y se disolvieron en aproximadamente 200 ml de agua destilada deionizada, saturada en el disolvente apropiado*. Se adicionó 30 ml de solución de tartrato de sodio y potasio-buffer pH 7 y se efectuaron extracciones sucesivas del metal con porciones de 5 ml ^C/u de una solución al 0.2% de oxina en cloroformo y oxina en MIBK, agitando la mezcla durante 3 min en cada extracción. Los extractos orgánicos se reunieron en un matraz aforado de 25 ml y se llevó a volumen con el disolvente cloroformo ó MIBK (adicionar si es necesario, una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, decantar). Una vez extraído el fierro de la muestra, se procedió a su cuantificación empleando el método de adición de estándares; para ello se tomaron 4 alícuotas de 5 ml ^C/u de la solución anterior y se colocaron en sus respectivos frascos viales; se adicionaron alícuotas de 5 ml de solución al 0.2% oxina y volúmenes conocidos de 0, 0.1, 0.2 y 0.4 ml de estándar de fierro de 100 ppm a cada frasco, respectivamente. Se agitaron las muestras durante 15 min en agitador mecánico y se midieron las absorbancias de las soluciones a las longitudes de onda analíticas. (Tabla 6.1, Fig. 6a)

Para calcular el contenido de fierro en la muestra (ppm), se multiplica la concentración obtenida en la curva por el factor

* ver apéndice

de dilución y se refieren los μg de fierro encontrados por cada gramo de lincomicina.

6.2 Por digestión previa y extracción.

Se pesaron 100 g de clorhidrato de lincomicina y se procedió a la digestión de la muestra con volúmenes de ac. nítrico, agua oxigenada dil. (1:1) hasta la completa destrucción de la materia orgánica. El residuo obtenido se restituyó con la mínima cantidad de ac. clorhídrico y se transfirió a un matraz aforado de 50 ml, llevando a volumen con agua destilada.

Posteriormente se siguió la misma técnica descrita en el inciso 6.1 referente a la extracción y cuantificación del contenido de fierro en la muestra. (Tabla 6.2)

La digestión se realizó por triplicado y el dato que aparece en la tabla es el promedio de los tres resultados, mismo que se compara con el resultado obtenido sin previa digestión de la muestra y mediante análisis por espectrofotometría de absorción atómica en MIBK y espectrofotometría visible en cloroformo y MIBK.

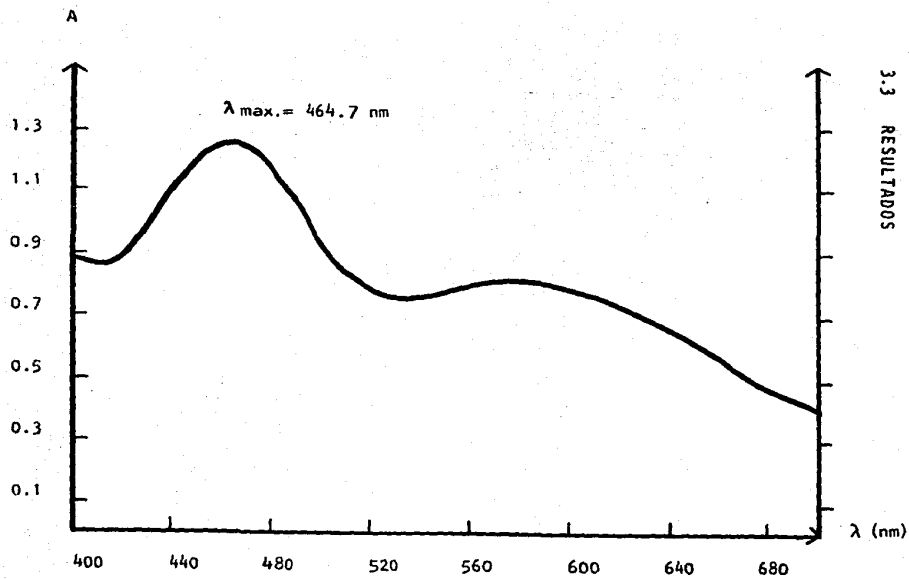


Fig. 1a Determinación de la $\lambda_{\text{max.}}$

Gráfica de $A=f(\lambda)$ para el complejo FeOx_3 en MIBK; $b=1 \text{ cm}$, $c=10 \mu\text{g/ml}$

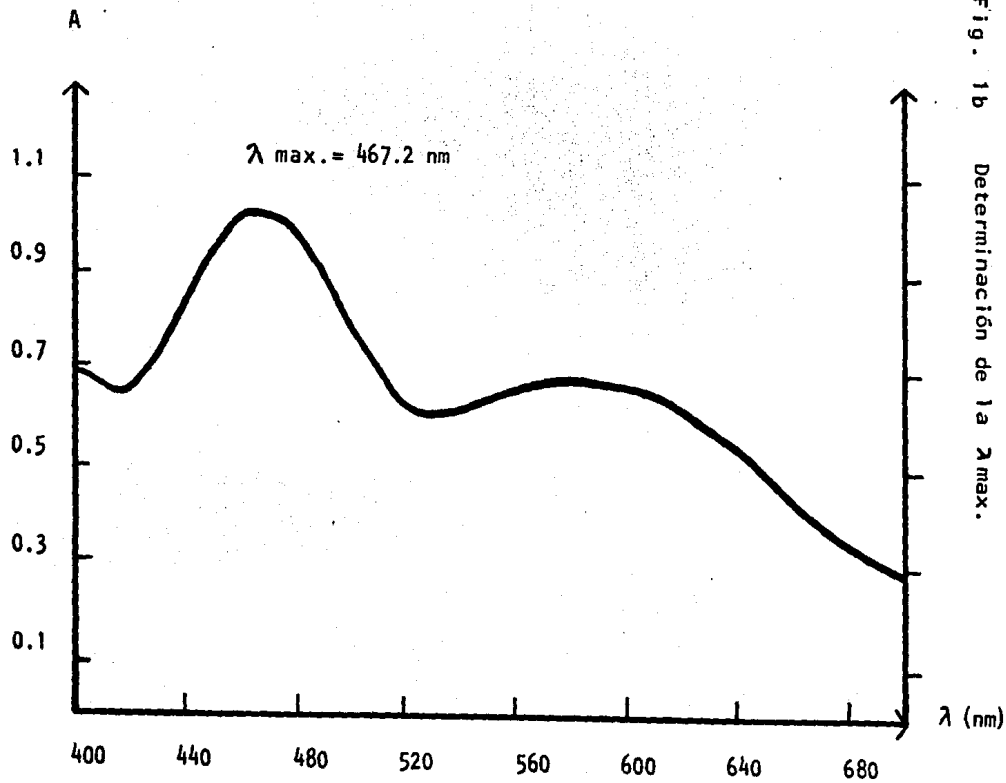
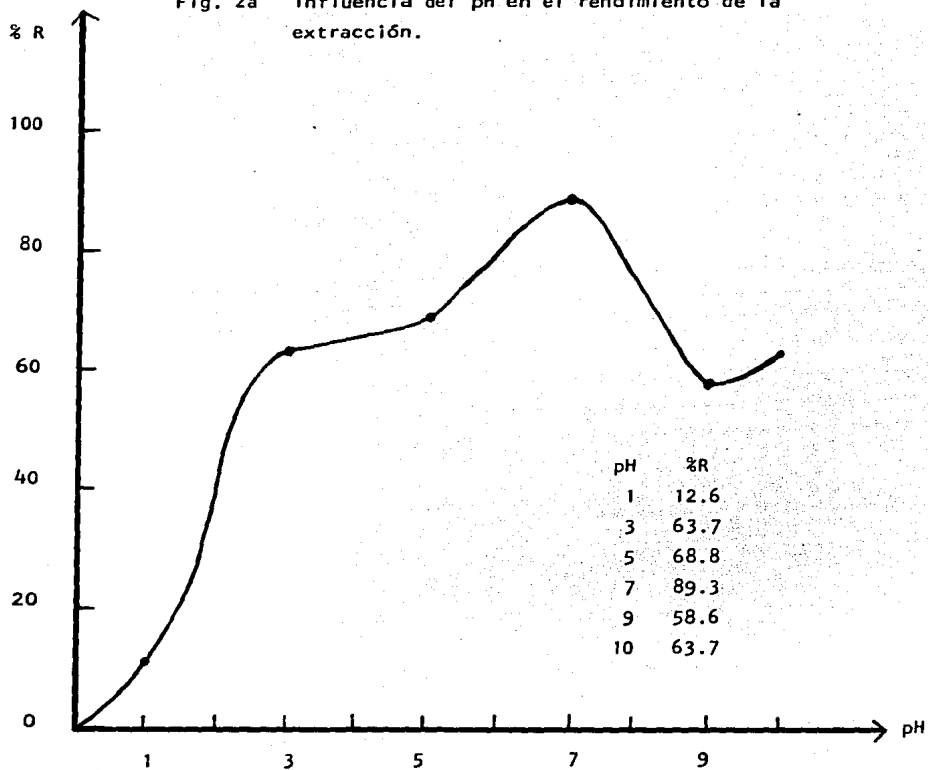


Fig. 1b Determinación de la λ max.

Gráfica de $A=f(\lambda)$ para el complejo $FeOx_3$ en $CHCl_3$; $b=1cm$, $c=10 \mu g/ml$

Fig. 2a Influencia del pH en el rendimiento de la extracción.

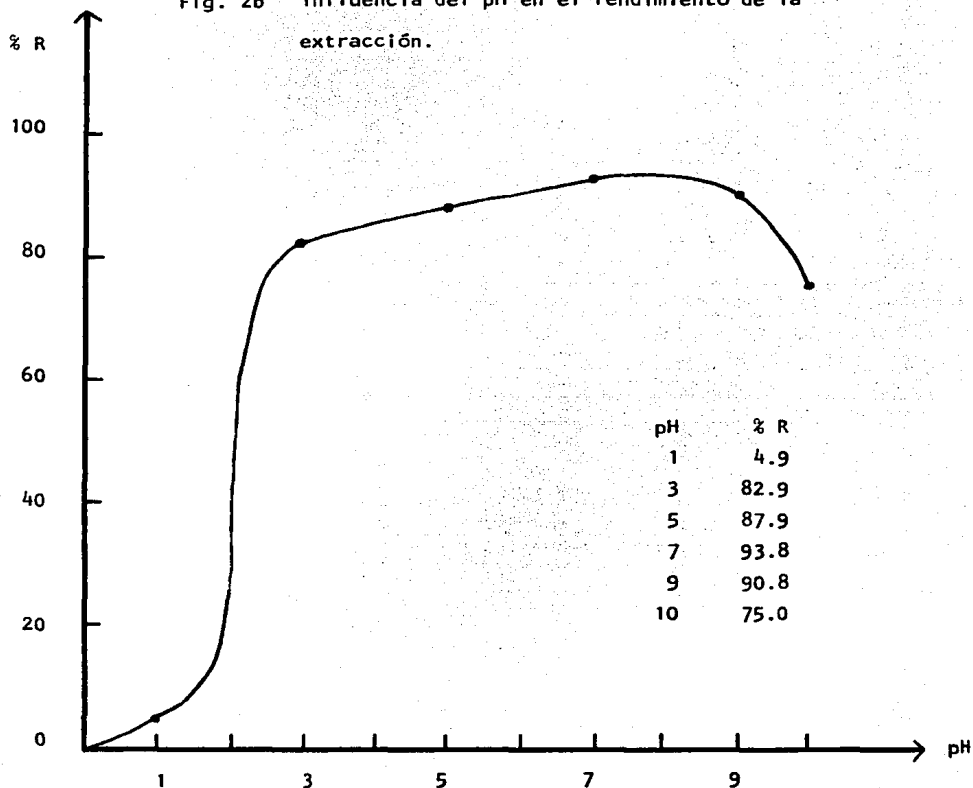


Gráfica %R = f(pH) para el complejo FeOx_3 en MIBK.

Espectrofotometría de absorción atómica. $\lambda_{\text{max.}} = 248.3 \text{ nm}$

Conclusión: el mayor rendimiento de la extracción se obtiene a pH 7.

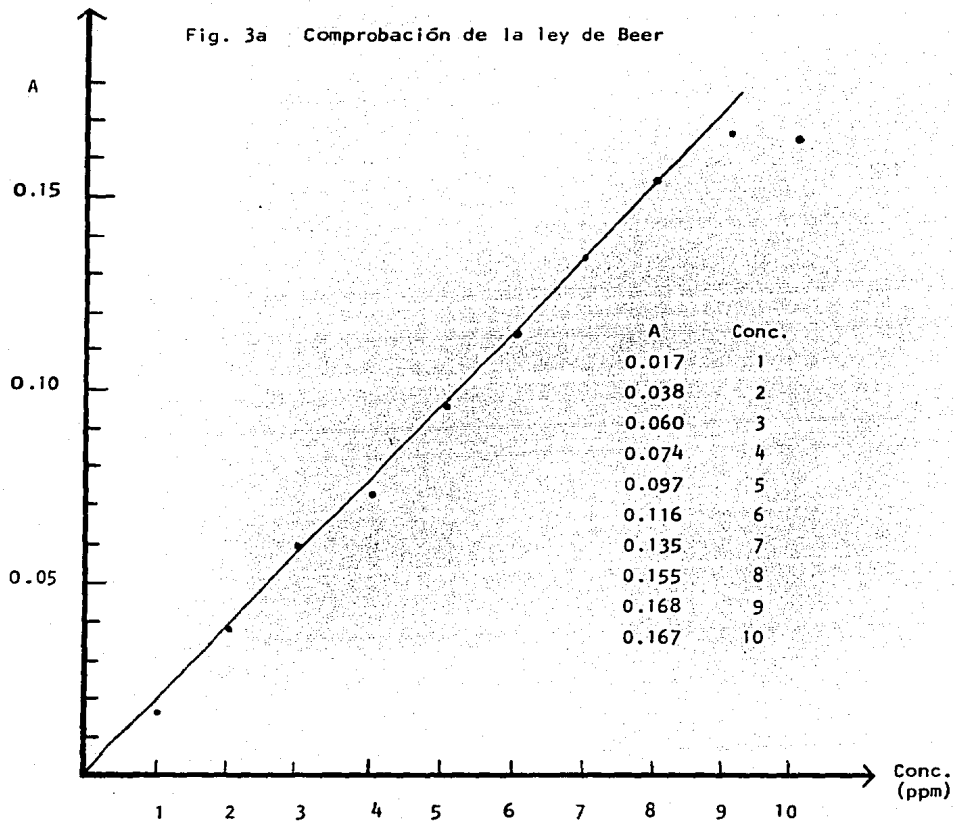
Fig. 2b Influencia del pH en el rendimiento de la extracción.



Gráfica de $\%R = f(\text{pH})$ para el complejo FeOx_3 en CHCl_3 .
Espectrofotometría visible. $\lambda_{\text{max}} = 467.2 \text{ nm}$

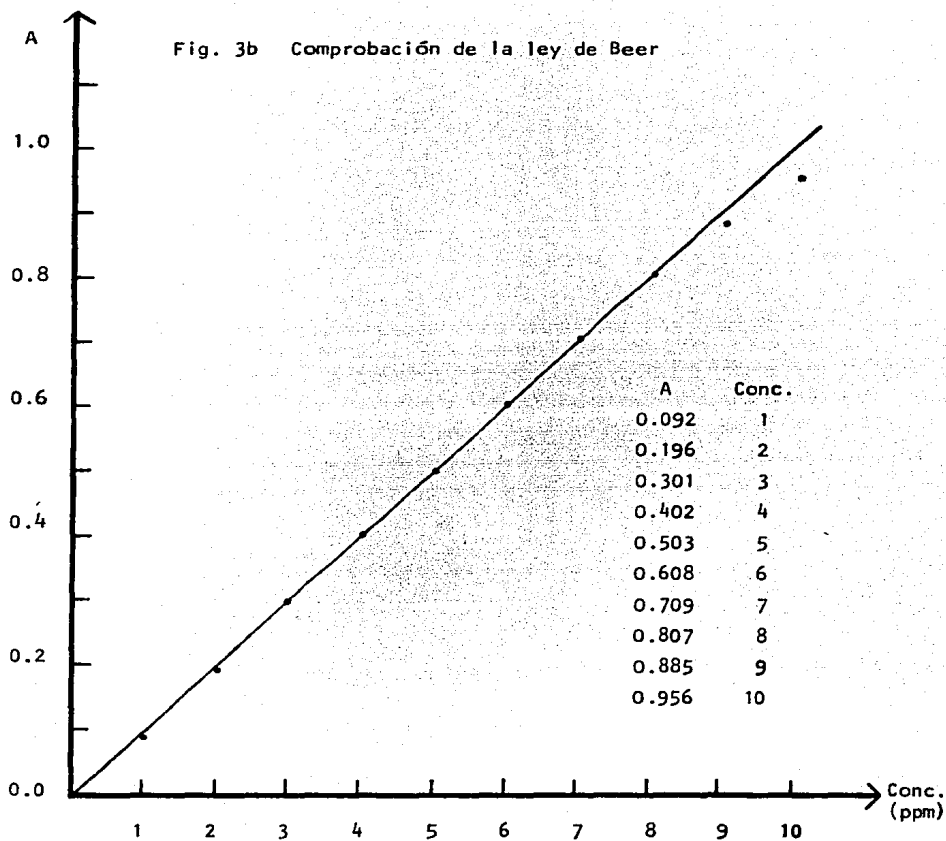
Conclusión: el mayor rendimiento de la extracción se obtiene a pH 7.

Fig. 3a Comprobación de la ley de Beer



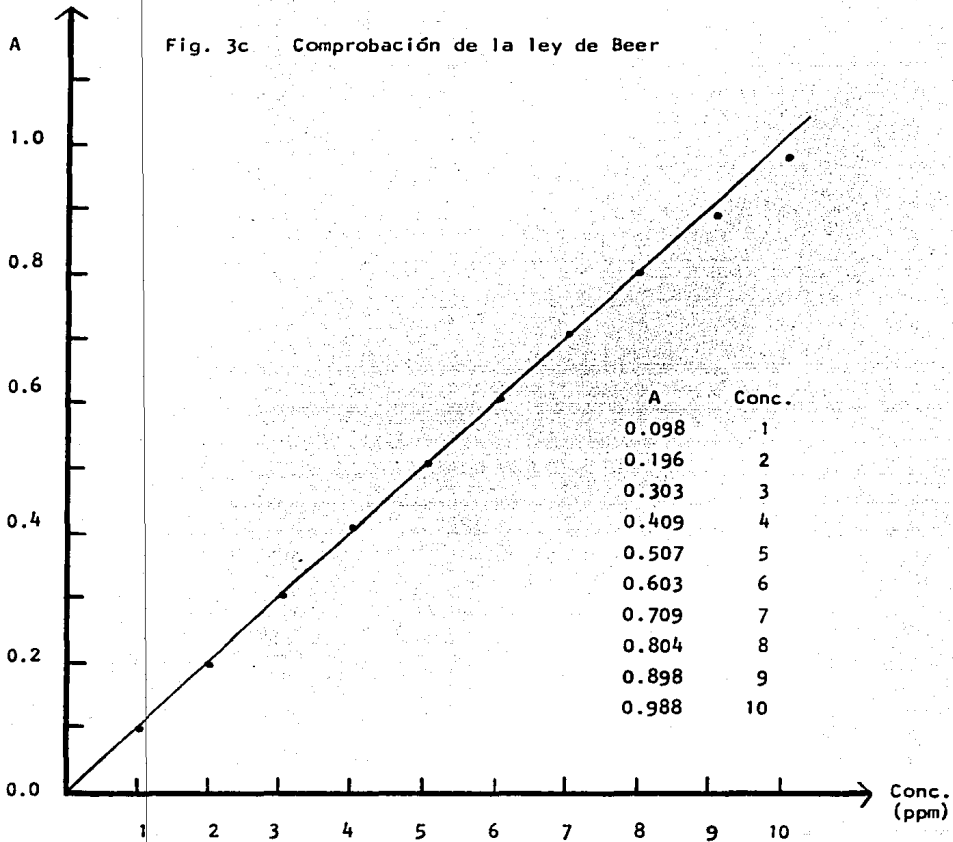
Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenido por espectrofotometría de absorción atómica.

Conclusión: la ley de Beer se cumple de 0-8 ppm.



Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenido por espectrofotometría visible.

Conclusión: la ley de Beer se cumple de 0-8 ppm.



Curva $A=f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en CHCl_3 ,
obtenido por espectrofotometría visible.

Conclusión: la ley de Beer se cumple de 0-8 ppm.

Tabla 4. Variación del % Extracción de fierro con el número y volumen de extracciones.

No. Extracc.	Vol. (ml) extractante	ppm		% Rendimiento (% R)		
		agregados	extraídos	a	b	
1	10	0.5	0.3	0.4	60.0	80.0
		1.0	0.7	0.8	70.0	80.0
		3.0	2.7	2.6	90.0	86.7
		5.0	4.3	4.6	86.0	92.0
		8.0	6.4	6.2	80.0	77.5
2	5	0.5	0.5	0.5	100.0	100.0
		1.0	1.0	1.0	100.0	100.0
		3.0	3.3	2.9	110.0	96.7
		5.0	5.2	5.2	104.0	104.0
		8.0	7.1	7.6	88.8	95.0
3	3	0.5	0.4	0.5	80.0	100.0
		1.0	1.0	1.0	100.0	100.0
		2.0	1.9	2.1	95.0	105.0
		4.0	4.0	4.0	100.0	100.0
		6.0	5.7	5.8	95.0	96.7

a Extractante: oxina 0.2% en MIBK. Absorción atómica

b Extractante: oxina 0.2% en MIBK. Visible

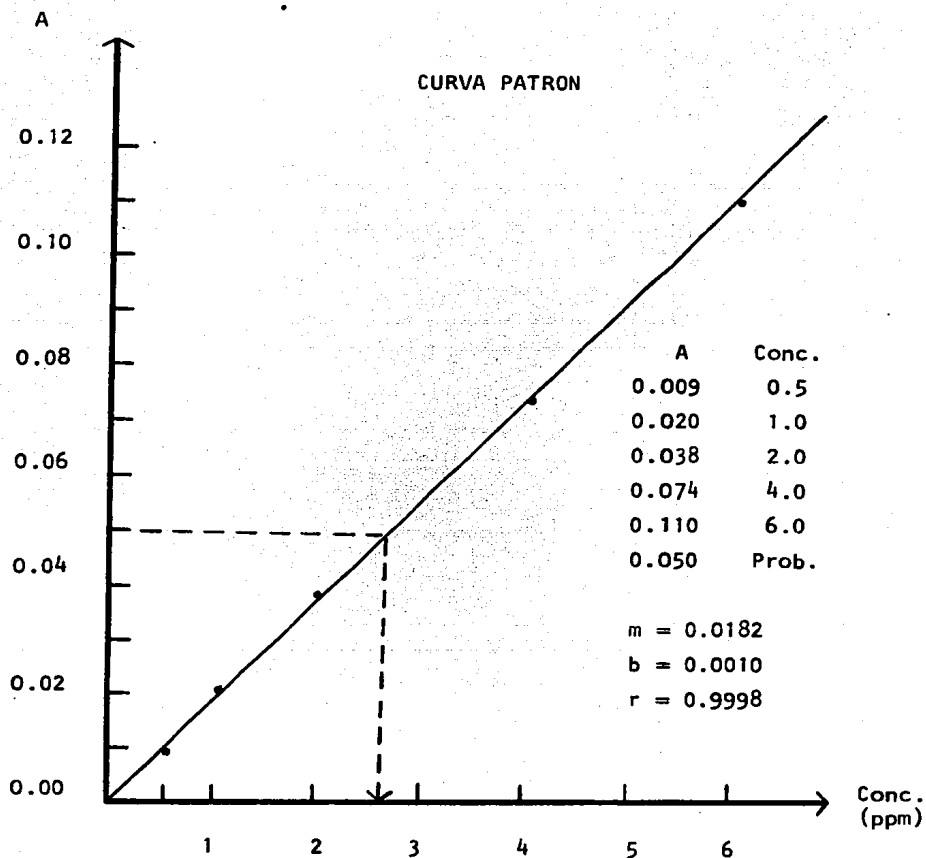
Conclusión: la extracción de fierro es cuantitativa empleando una doble ó triple extracción.

Tabla 5. Determinación de fierro por curva patrón y adición de estándares.

CURVA PATRON			
Conc. (ppm) agregada del estándar	Conc. (ppm) recuperada de estándar		
	Abs. At.	Visible _{MIBK}	Visible _{CHCl₃}
3.0	2.7	2.8	2.9

ADICION DE ESTANDAR			
Conc. (ppm) agregada del estándar	Conc. (ppm) recuperada de estándar		
	Abs. At.	Visible _{MIBK}	Visible _{CHCl₃}
0.5	0.6	0.5	0.5

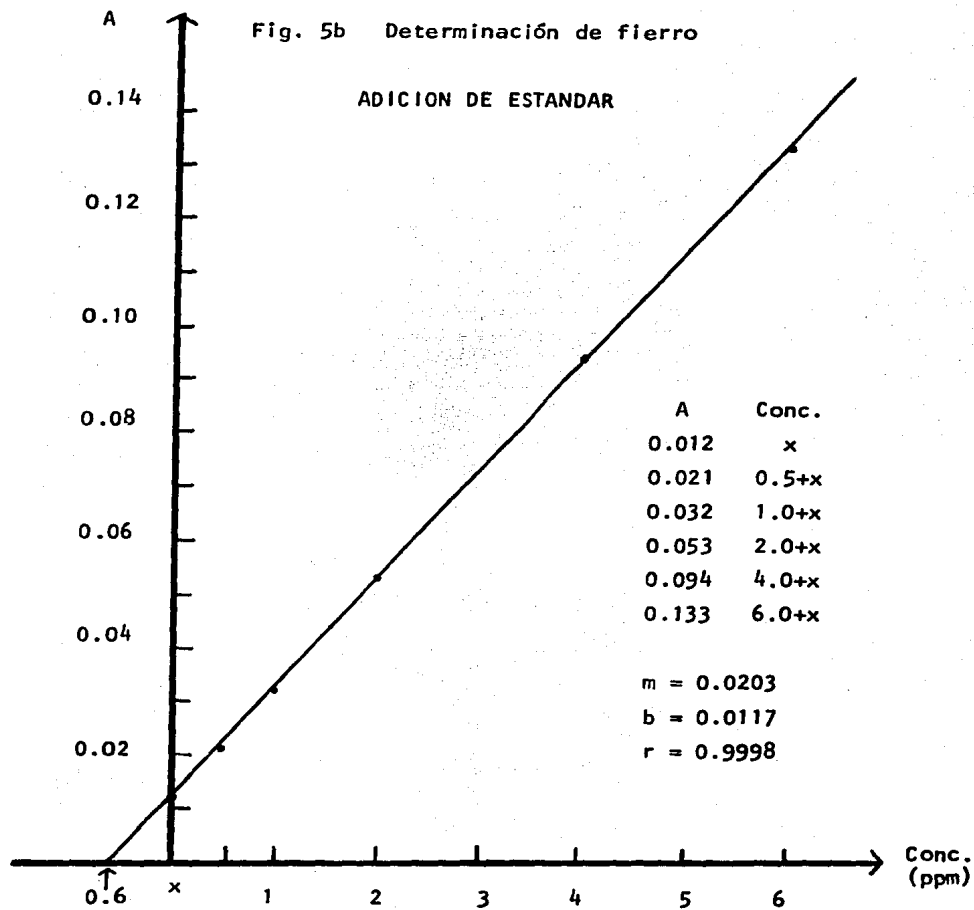
Fig. 5a Determinación de fierro.



Curva de $A = f(\text{Conc.})$ para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenida por espectrofotometría de absorción atómica.

Conc. teórica = 3.0 ppm

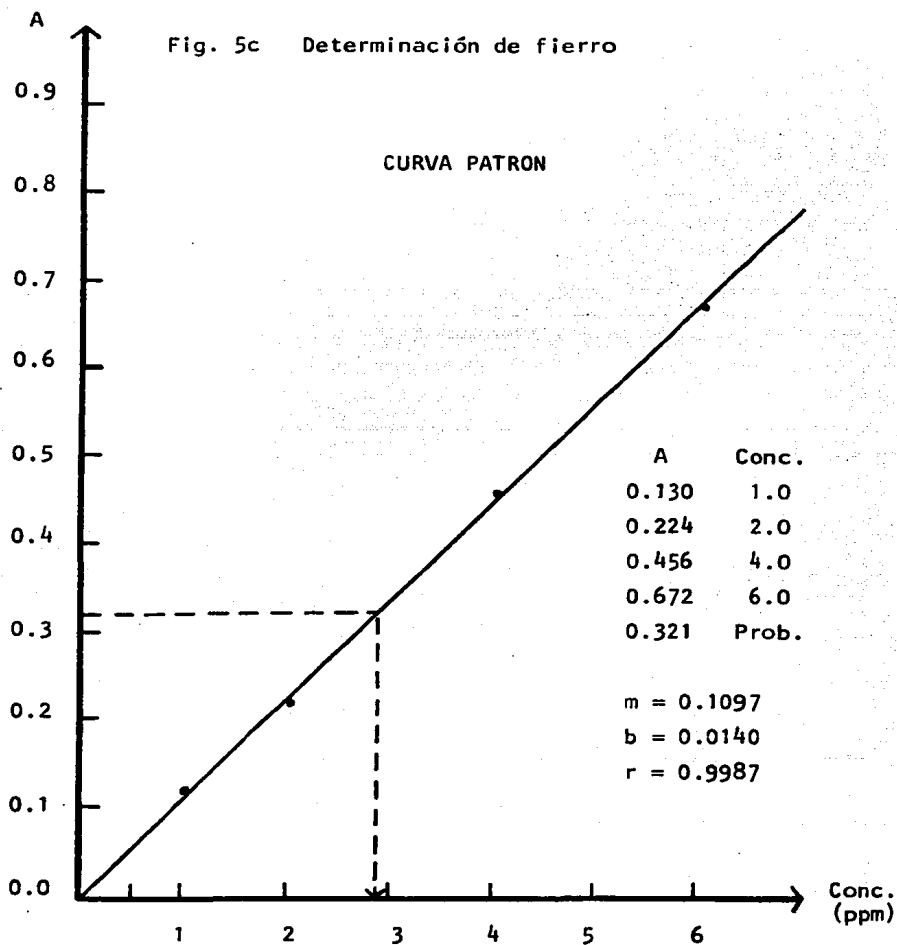
Conc. obtenida experimentalmente = 2.7 ppm



Curva A = f(Conc) para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenida por espectrofotometría de absorción atómica.

Conc. teórica = 0.5 ppm

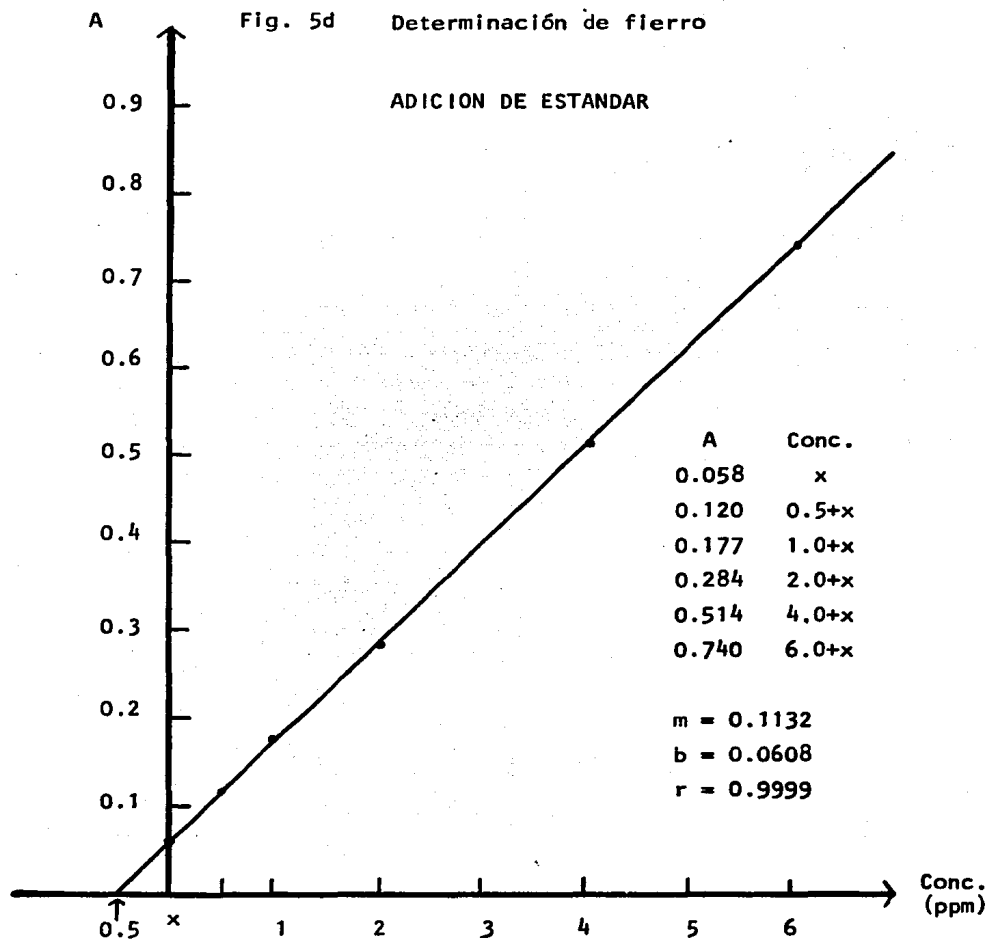
Conc. obtenida exp. = 0.6 ppm



Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenida por espectrofotometría visible.

Conc. teórica = 3.0 ppm

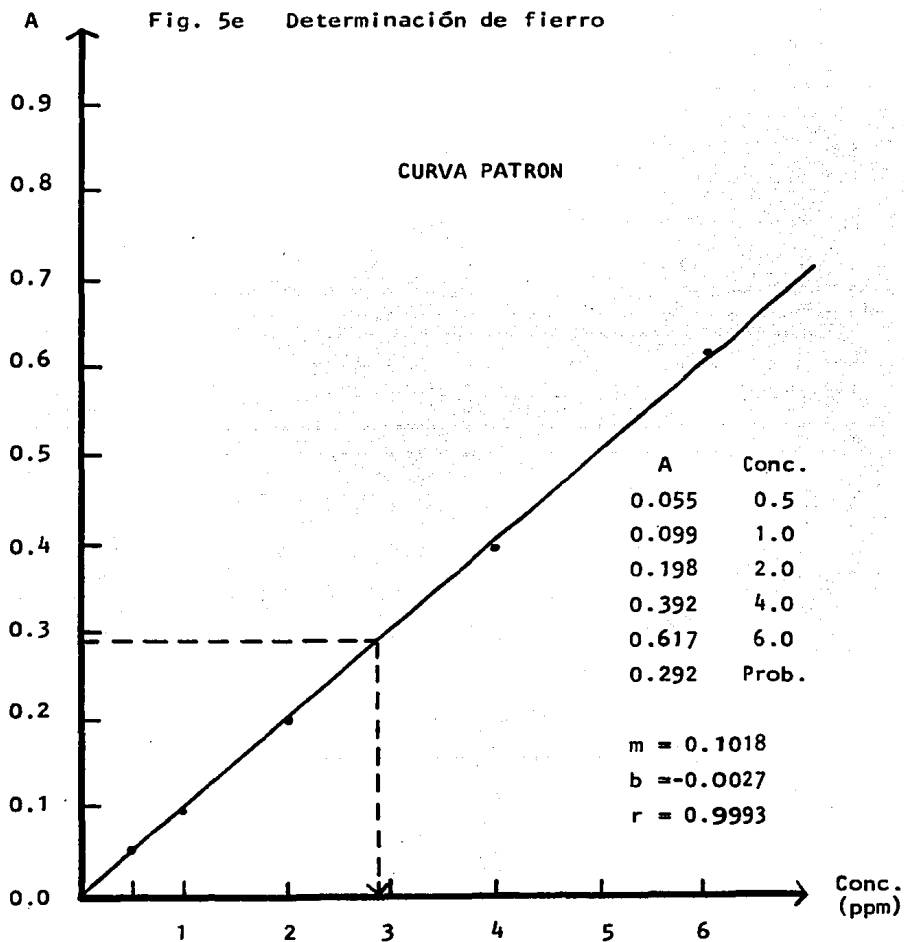
Conc. obtenida exp. = 2.8 ppm



Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en MIBK,
obtenida por espectrofotometría visible.

Conc. teórica = 0.5 ppm

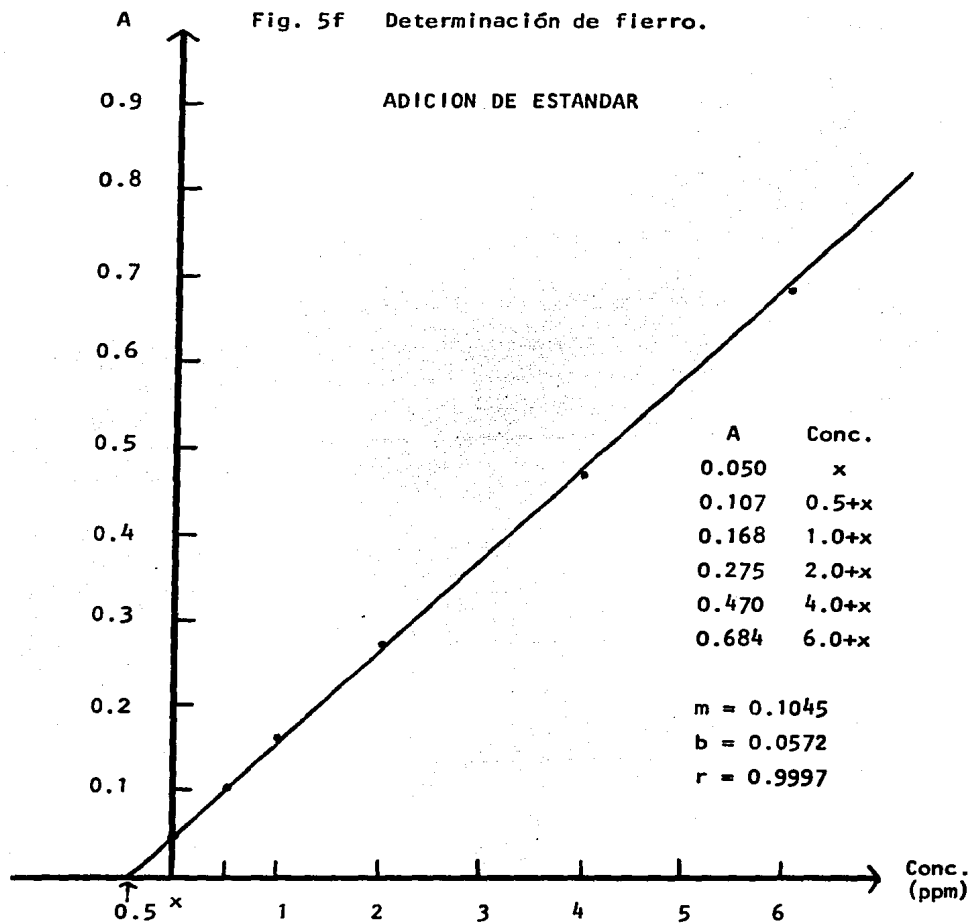
Conc. obtenida experimentalmente = 0.5 ppm



Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en CHCl_3 ,
obtenida por espectrofotometría visible.

Conc. teórica = 3.0 ppm

Conc. obtenida exp. = 2.9 ppm



Curva $A = f(\text{Conc})$ para el complejo FeOx_3 en CHCl_3 ,
obtenida por espectrofotometría visible.

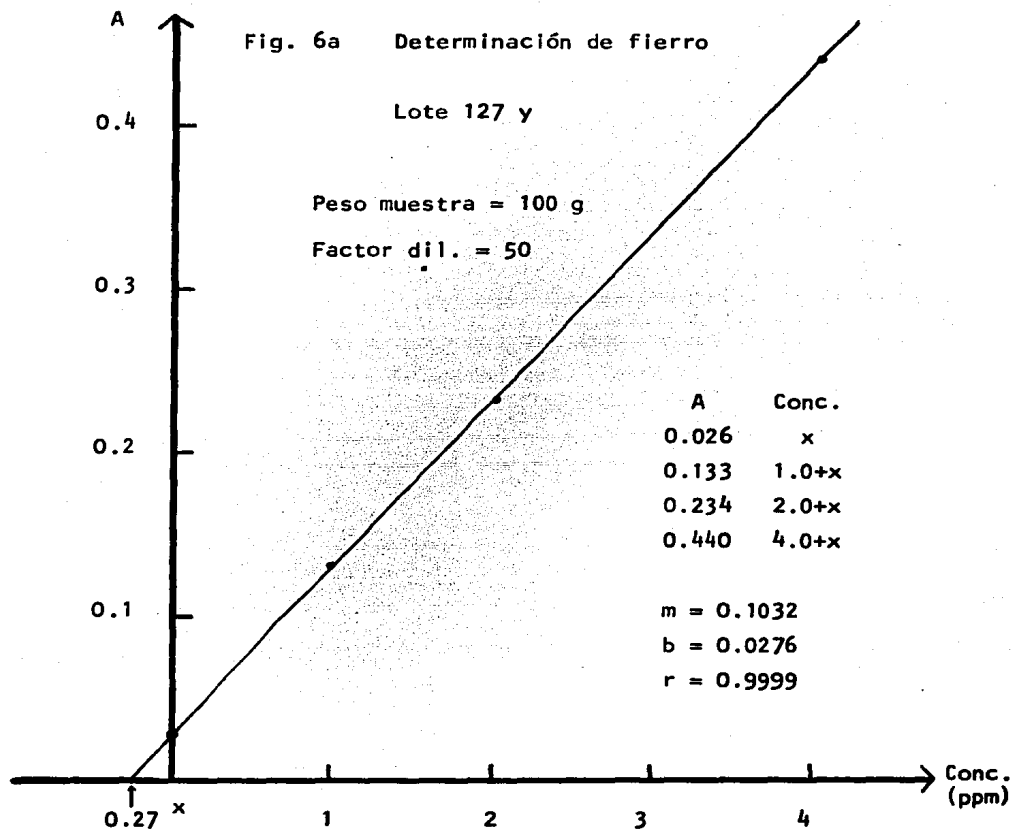
Conc. teórica = 0.5 ppm

Conc. obtenida exp. = 0.5 ppm

Tabla 6.1 Análisis por extracción directa de diferentes lotes de lincomicina y comparación de los resultados obtenidos con los reportados por el método de fluorescencia de rayos X.

No. lote	Resultados (ppm)		
	Abs. At. MIBK	Visible MIBK	Fluoresc.
124 y	0.1	0.2	0.1
135 y	0.1	0.2	0.3
845 y	0.4	0.4	0.4
847 y	0.2	0.1	0.1

No. lote	Resultados (ppm)	
	Visible CHCl ₃	Fluorescencia
118 y	0.1	0.1
124 y	0.2	0.1
127 y	0.1	0.1
135 y	0.3	0.3
144 y	0.2	0.2



Curva A = f(Conc) para el complejo FeOx_3 en CHCl_3 ,
obtenida por espectrofotometría visible.

$$0.27 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 50 \text{ ml} = 13.5 \mu\text{g Fe}$$

$$\frac{13.5 \mu\text{g}}{100 \text{ g}} \times 1 \text{ g} = \underline{0.1 \text{ ppm Fe}}$$

Tabla 6.2 Relación de resultados obtenidos con y sin digestión previa de la muestra.

Con digestión (ppm)	Sin digestión (ppm)		
	Abs. At.	Visible _{MIBK}	Visible _{CHCl₃}
0.5	0.5	0.5	0.5

Conclusión: no se requiere de un tratamiento de destrucción previa de la materia orgánica, ya que la lincomicina no interfiere en la formación del complejo metálico para su determinación.

3.4 Validación del Método de análisis para trazas de hierro por espectrofotometría visible a 467.2 nm en cloroformo.

ppm de hierro agregados	ppm de hierro recuperados	% Recobro
(x)	(y)	
1.0	1.0	100.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.0	100.0
1.0	0.9	90.0
1.0	1.0	100.0
1.0	0.9	90.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.1	110.0
1.0	1.1	110.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.1	110.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.1	110.0
1.0	1.0	100.0
1.0	1.0	100.0
2.0	2.1	105.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.1	105.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.1	105.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0

ppm de fierro agregados (x)	ppm de fierro recuperados (y)	% Recobro
2.0	2.1	105.0
2.0	2.1	105.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.0	100.0
2.0	2.1	105.0
2.0	2.1	105.0
4.0	4.1	102.5
4.0	4.0	100.0
4.0	4.1	102.5
4.0	4.0	100.0
4.0	4.0	100.0
4.0	3.9	97.5
4.0	4.0	100.0
4.0	4.1	102.5
4.0	4.0	100.0
4.0	4.0	100.0
4.0	4.0	100.0
4.0	4.1	102.5
4.0	4.1	102.5
4.0	4.1	102.5
4.0	4.0	100.0
4.0	4.0	100.0
4.0	4.1	102.5
Conc. (ppm)	% Recobro promedio	
1.0	101.2	
2.0	102.0	
4.0	100.9	

Según FDA: un recobro entre 80 - 120% es aceptable para
concentraciones arriba de 100 ppb. 12

EXACTITUD DEL METODO DE MEDICION.

$$n = 51$$

$$\bar{X} = 101.4 \quad (\% \text{ Recobro})$$

$$s^2 = 14.4$$

$$s = 3.8$$

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Intervalo de confianza: $IC_{95\%} = \pm 1.1$

Límite de confianza: $LC_{95\%} = (100.3, 102.5)$

Prueba de hipótesis: $H_0 : \bar{X} = \mu \quad \mu = 100\%$

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

Estadístico de prueba para demostrar la hipótesis:

$$Z^* = \frac{\bar{X} - \mu}{s / \sqrt{n}} = 2.6$$

De tablas: $Z_{0.025} = \pm 2.01$

Comparando: $- 2.01 < 2.6 > 2.01$

Conclusión: La media muestral no es equiparable a la media poblacional. Se rechaza H_0 y por lo tanto el método no es exacto

LINEARIDAD DEL METODO DE MEDICION.

$$n = 51$$

$$S_x = 1.3$$

$$\sum X = 119.0$$

$$\sum Y = 120.5$$

$$\sum X^2 = 357.0$$

$$\sum Y^2 = 365.2$$

$$\sum XY = 361.0$$

$$\sum (X_i - \bar{X})^2 = 79.3$$

$$A = \text{ordenada al origen} = 0.01$$

$$B = \text{pendiente} = 1.01$$

$$r = \text{coef. de correlación} = 0.9991$$

$$r^2 = \text{coef. de determinación} = 0.9992$$

$$S_{y/x} = \text{error estándar de regresión} = 0.05$$

$$\widehat{S}_{y/x} = \text{error estándar estimado} = 0.05$$

$$\text{De tablas: } Z_{0.025} = \pm 2.01$$

Intervalos de confianza:

a) Para el intercepto (-0.02, 0.04)

b) Para la pendiente (0.9990, 1.0209)

Hipótesis para comprobar la linealidad:

a) Intercepto: $H_0: A = A_0 \quad A_0 = 0$

$H_i: A \neq A_0$

$$Z^* \text{ exp.} = 0.7$$

Comparando: $- 2.01 < 0.7 < 2.01$

Conclusión: la ordenada al origen obtenida es equiparable a la ordenada ideal ($A_0 = 0$). No se rechaza H_0 .

b) Pendiente: $H_0: B = B_0 \quad B_0 = 1$

$H_1: B \neq B_0$

$$Z^* \text{ exp.} = 1.8$$

Comparando: $- 2.01 < 1.8 < 2.01$

Conclusión: La pendiente obtenida es equiparable a la pendiente ideal ($B_0 = 1$)

En ambos casos se acepta H_0 y por lo tanto el método es lineal.

Ec. de la recta ajustada

$$\hat{Y} = 1.01 (x_i) + 0.01$$

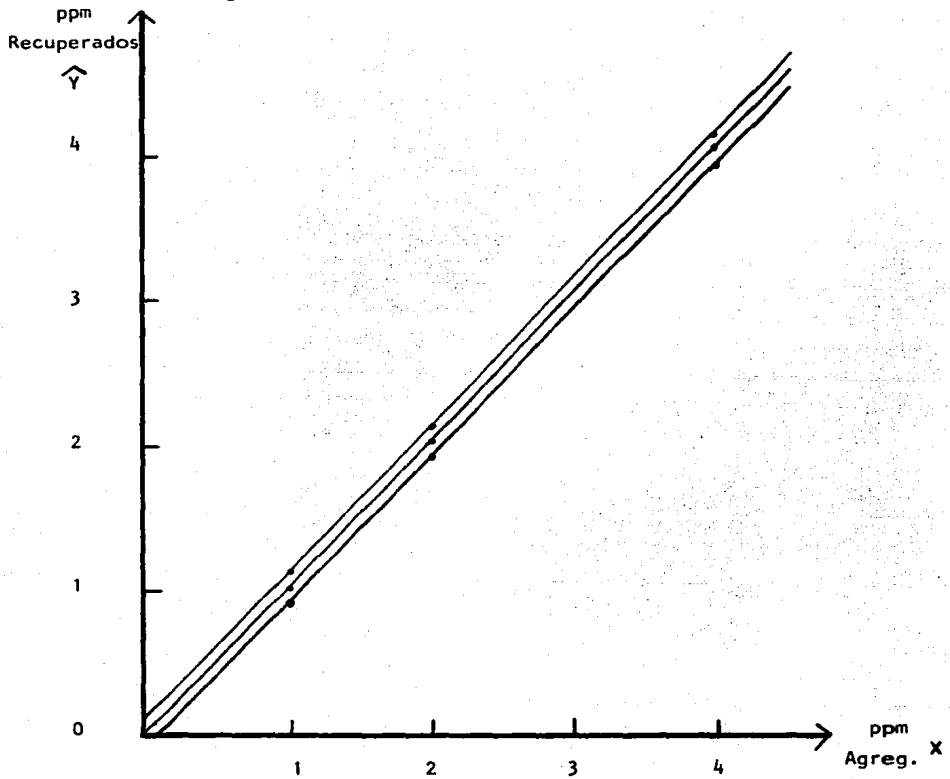
X	\hat{Y}
1	1.02
2	2.03
4	4.05

Intervalos de confianza

$$Y = \hat{Y} \pm 2.01 (0.05)$$

X	Y
1	(0.92, 1.12)
2	(1.93, 2.13)
4	(3.95, 4.15)

Fig. 7 Linealidad del método de medición.



Gráfica de Conc. de hierro recuperado contra Conc. de hierro agregado, obtenida por espectrofotetría visible.

REPETIBILIDAD DEL METODO DE MEDICION.

$$n = 51$$

$$\bar{X} = 101.4 \quad (\% \text{ Recobro})$$

$$s = 3.8$$

$$s^2 = 14.4$$

$$\sigma^2_{\text{seleccionada}} = 5$$

$$\sigma^2 \quad \text{"} \quad = 25$$

De tablas para $n-1 = 50$ g.l.:

$$\chi^2_{0.025} = 71.4$$

$$\chi^2_{0.975} = 32.4$$

Intervalo de confianza:

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

$$\text{I.C.}_{95\%} = (3.2 < \sigma < 4.7)$$

Prueba de hipótesis: $H_0: s^2 \leq \sigma^2$ cuando $\sigma^2 = 25$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

$$\chi^2_{\text{calc.}} = \frac{(n-1) s^2}{\sigma^2} = 28.8$$

De tablas: $\chi^2_{0.95} (50 \text{ g.l.}) = 34.8$

Comparando: $28.8 < 34.8$

Conclusión: La varianza muestral es equiparable con la poblacional. Se acepta H_0 y por lo tanto el método es repetible.

Resultados obtenidos de los 17 análisis efectuados en el lote A para la validación del método. (Espectrofotometría visible en cloroformo).

mcg fierro / g lincomicina

2.0

1.9

1.8

1.8

1.8

1.9

1.9

1.9

1.9

2.0

1.9

2.0

1.9

1.9

1.9

1.9

1.9

$n = 17$

$\bar{x} = 1.9$

$s = 0.06$

resultado de Kalamazoo: 1.9 ppm

IV. C O N C L U S I O N E S

- 1) La longitud de onda de máxima absorción del complejo FeOx_3 es de 464.7 nm en MIBK y de 467.2 nm en cloroformo.
- 2) El control del pH de la fase acuosa constituye un factor importante durante el proceso de extracción. El mayor rendimiento se alcanza a pH 7.
- 3) El tiempo de reacción no es un factor determinante para la cuantificación del complejo FeOx_3 , ya que el color se forma casi inmediatamente y se mantiene estable durante el desarrollo del análisis.
- 4) Las concentraciones en las que se sigue la ley de Beer es de 0-8 ppm. (Datos provenientes de las fig. 3a, 3b, 3c)
- 5) La eficiencia en la extracción de fierro se incrementa empleando una doble ó triple extracción.
- 6) Los resultados obtenidos por el método de espectrofotometría visible fueron mejores que los obtenidos por absorción atómica. Tanto el cloroformo como la metil isobutil cetona resultaron ser disolventes adecuados para el análisis colorimétrico, sin embargo, en el aspecto económico, se prefiere el uso del primero por ser mucho más barato que la MIBK.
- 7) No se requiere de un tratamiento de destrucción previa de la materia orgánica, ya que la lincomicina no interfiere en la formación del complejo metálico para su determinación; además, la ventaja que presenta el método directo sobre el de digestión es un ahorro en el tiempo de análisis, una menor

manipulación de la muestra y por lo tanto sujeto a menos errores experimentales, lo cual lo hace adecuado para un análisis de control de calidad.

- 8) Los resultados del análisis de fierro efectuado en los diferentes lotes de lincomicina, así como en el tratamiento estadístico reflejan que la reproducibilidad de los datos obtenidos es comparable a los reportados por el método de fluorescencia de rayos X.
- 9) El análisis estadístico indica que el método propuesto no es aceptable, ya que únicamente se cumple con la linealidad y la repetibilidad, sin embargo, considero que en trabajos como el que se presenta, no es posible basarse en el estudio de una sola persona para obtener conclusiones válidas acerca de la exactitud, la precisión y la confiabilidad de un método.
- 10) El método de análisis colorimétrico desarrollado es en general sencillo, específico, rápido, con poco número de pasos; la cantidad y los reactivos utilizados son mínimos, con excepción de la materia prima, cuya cantidad empleada eleva el costo del análisis, sin embargo, si se compara éste con el costo actual invertido, resulta razonable y en beneficio económico para la empresa.

V. B I B L I O G R A F I A

- 1.- Sandell, E.B., "Colorimetric determination of traces of metals", 3^a ed., Interscience publishers, Inc, New York, 1959. Pag. 179-189.
- 2.- Morrison, "Solvent extraction in analytical chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York. Pag. 10-11, 162-165.
- 3.- Burger, K., "Organic reagents en metal analysis", 1^a ed., Pergamon Press Inc., New York, 1973. Pag. 56, 96, 160.
- 4.- Lacroix, S., Analytica Chimica Acta, 1, 260 (1947).
- 5.- Sillen, L.G., Martell, A.E., "Stability constants of metal-ion complexes, The Chemical Society, Supplement No. 1, Special publication 25, London, 1964.
- 6.- Ringbom, "Formación de complejos en química analítica", 1^a ed., Alhambra, S.A., España, 1979. Pag. 436.
- 7.- Gentry, C.H.R., Sherrington, L.G., Analyst-London, 75, 17 (1950).
- 8.- Kirkbright, Sargent, "Atomic absorption and Fluorescence spectroscopy ", Academic Press, New York, 1974. Pag. 493.
- 9.- Allan, J.E., Spectrochimica Acta, 17, 467 (1961).
- 10.- Jones, J.L., Eddy, R.D., Analytica Chimica Acta, 43, 165 (1968).
- 11.- Sandell, E.B., Spindler, D.C., J. Am. Chem. Soc., 71, 3806 (1949).
- 12.- Guerra, J., Finkelson, M.J., "Validation of analytical methods by FDA laboratories", Pharmaceutical Technology,

1986. Pag. 74-84.
- 13.- Connors, "Curso de análisis farmacéutico", 1^a ed., Reverté, S.A., España, 1981. Pag. 195-245.
- 14.- Morcillo, "Espectroscopía", 1^a ed., Alhambra, S.A., España, 1972. Pag. 1-10.
- 15.- Morrison R., Boyd R., "Química orgánica", Fondo Educativo Interamericano, S.A., México, 1970. Pag. 426-427.
- 16.- Slavin, W., "Atomic absorption spectroscopy", Interscience, New York, 1969. Pag. 28-59.
- 17.- Ringbom, "Formación de complejos en química analítica", 1^a ed., Alhambra, S.A., España, 1979. Pag. 301.
- 18.- Ottaway, J.M., Coker, D.T., Rowston, W.B., Bhattarai, D.R., Analyst, 95, 567 (1970).
- 19.- Miller, I., Freund, J.E., "Probabilidad y estadística para ingenieros", 3^a ed., Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., México, 1986. Pag. 192-233, 318-331.
- 20.- Litter, Manuel, "Farmacología experimental y clínica", 5^a ed., El Ateneo, Argentina, 1975. Pag. 1579-1582.

VI. A P E N D I C E

EQUIPO:

- Espectrofotómetro UV, Spectronic 100. Bausch & Lomb.
- Espectrofotómetro de absorción atómica, modelo 2380. Perkin Elmer; equipado con lámpara de hierro de cátodo hueco.

REACTIVOS:

- 8-hidroxiquinolina (para análisis). Merck.
- Isobutilmetilcetona (para análisis por extracción). Merck.
(saturada en agua).
- Cloroformo. Productos químicos Monterrey, S.A. (saturado en agua)
- Solución patrón de hierro $1.000 \text{ g} \pm 0.002 \text{ g Fe (FeCl}_3\text{)}$ en 1000 ml de agua (1000 ppm). Tritisol, Merck.

A partir de esta disolución se prepararon conc. de 100, 10, 1.0 y 0.1 ppm de Fe.

- Tartrato de sodio y potasio. J.T. Baker.
- Fosfato monobásico de potasio. J.T. Baker.
- Sodio hidróxido. J.T. Baker.
- Agua destilada y deionizada saturada en MIBK y en cloroformo.

PREPARACION de la solución de tartrato-buffer a pH 7.

Disolver 8.0 g de tartrato de sodio y potasio en agua destilada deionizada saturada en el disolvente apropiado y aforar a 100 ml con agua (0.38 M). Transferir 50 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con solución buffer de fosfatos a pH 7.