



3 07181915 827 N=27 2 Ej.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DETERMINACION DE IMPUREZAS ORGANICAS
VOLATILES EN METILDOPA POR CROMATOGRFIA
DE GASES CAPILAR-INYECCION DE LA FASE VAPOR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MARTHA UGALDE HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Presento a mis padres
Martha y José Juan,
este trabajo,
símbolo de nuestro esfuerzo
y del gran amor que les tengo.
Gracias por confiar en mí.

Comparto con mis hermanos
María Estela, María Leonor y
Miguel Ángel, la maravillosa
experiencia de alcanzar un anhelo.

Comparto también contigo Aurora,
este trabajo, como un ejemplo más,
de que todo es posible ...
... aunque no parezca.
Mi abuelita querida.

A ti, Marco Antonio, te agradezco
la ayuda y apoyo incondicionales,
cuando todo parecia gris y no tener fin.
Hoy sé, que lo único que no tiene fin,
es el amor verdadero, como el nuestro.

Como correspondencia a tu fiel compañía,
y a la confianza que me diste,
cuando tú y yo sabíamos que era necesaria;
te ofrezco este trabajo,
Santo Niño de las Suertes.

Al Centro A. F. de Estudios Tecnológicos,
gracias por permitirme realizar
en sus instalaciones este trabajo;
especialmente a aquellas personas
que me ofrecieron apoyo y empeño sinceros
para que el presente culminara.

Me despido así,
de la Universidad Motolinía,
quien construyó mi educación,
desde su inicio, hasta hoy ...
... mi Única escuela.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
CAPITULO I. INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Objetivos	3
1.3 Hipótesis	4
CAPITULO II. GENERALIDADES	
2.1 Datos monográficos de metildopa	6
2.1.1 Sinonimia	6
2.1.2 Fórmula semidesarrollada	6
2.1.3 Síntesis y purificación	7
2.1.4 Especies	9
2.1.5 Propiedades físicas	9
2.1.6 Identificación	10
2.1.7 Estabilidad	10
2.1.8 Farmacocinética	11
2.1.9 Propiedades farmacológicas	11
2.1.10 Dosis y formas farmacéuticas	12
2.2 Impurezas orgánicas volátiles	13
2.2.1 Definición	13
2.2.2 Ensayo oficial	13

2.2.3	Métodos de análisis	15
2.2.4	Toxicidad	19
2.2.5	Propiedades físicas	21
2.3	Cromatografía	22
2.3.1	Clasificación de técnicas cromatográficas	22
2.3.2	Teoría de la cromatografía	23
2.3.3	Cromatografía líquido-gas	27
2.3.3.1	Análisis de la fase vapor	27
2.3.3.2	Instrumentación	30
Automuestreador de la fase vapor		31
Puerto de inyección e inyector con divisor de flujo		32
Columnas		34
Detector de ionización de llama		37
Integrador		39
2.3.3.3	Temperatura programada	40
2.3.3.4	Métodos de cuantificación	41
2.4	Validación	43
2.4.1	Definición	43
2.4.2	Parámetros de validación para impurezas orgánicas volátiles (prueba límite)	43

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1	Diagrama de flujo	51
3.2	Material, reactivos y equipo	52
3.2.1	Material	52

3.2.2 Reactivos	53
3.2.3 Equipo	53
3.3 Metodología	54
3.3.1 Soluciones y muestras	54
3.3.2 Condiciones de operación del sistema	57
3.3.3 Procedimiento	59
3.4 Validación	66
3.4.1 Selectividad	66
3.4.2 Precisión (repetibilidad)	66
3.4.3 Intervalo y límite de detección	66
3.4.4 Tolerancia	66
3.4.5 Exactitud al 100 %	68

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados	70
4.1.1 Metodología	70
4.1.2 Validación	75
4.1.2.1 Selectividad	75
4.1.2.2 Precisión (repetibilidad)	76
4.1.2.3 Intervalo y límite de detección	77
4.1.2.4 Tolerancia	85
4.1.2.5 Exactitud al 100 %	86
4.2 Discusión	86

CAPITULO V. CONCLUSIONES

94

BIBLIOGRAFIA

96

APENDICE. ABREVIATURAS

103

CAPITULO I

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

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen normas oficiales en la Industria Farmacéutica que establecen que todas las materias primas y productos de uso farmacéutico, deben cumplir con una serie de especificaciones mediante las cuales se garantice su estabilidad, potencia, pureza y desde luego, su inocuidad ante el consumidor. Para determinar si el producto o materia prima se encuentra dentro de sus especificaciones, se requiere aplicar métodos de análisis debidamente validados.

Las impurezas orgánicas volátiles son los restos provenientes de los disolventes orgánicos volátiles utilizados en los procesos de síntesis y/o purificación de materias primas, y en la fabricación de los preparados farmacéuticos. La presencia de estos disolventes en los preparados farmacéuticos, pone en peligro la salud del consumidor debido a su toxicidad, especialmente si los medicamentos se destinan a la administración por periodos prolongados, como es el caso de la metildopa (la terapia con cualquier fármaco antihipertensivo como la metildopa así lo requiere). Por lo tanto, el control de las impurezas orgánicas volátiles en materias primas, ha cobrado gran importancia en los últimos años, y empieza a formar parte del control de calidad de algunas de ellas (3,7,34,36,38,44, 45,54,65,66).

Es así como surge la necesidad de un método de análisis para la determinación de impurezas orgánicas volátiles en metildopa, materia prima. Dado que hasta la fecha la Comisión de la Farmacopea y del Formulario Nacional de los Estados Unidos Americanos, es la única que ha establecido oficialmente que el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano, cloruro de metileno y tricloroetileno deben controlarse en algunas materias primas como impurezas orgánicas volátiles, se adoptará su criterio para establecer cuáles disolventes se determinarán en metildopa, materia prima. Debido a que en las rutas de síntesis y purificación de la metildopa, reportadas en la literatura no se ha empleado al tricloroetileno, se excluye su cuantificación en esta materia prima (8-19,21-29,31-33).

1.2 OBJETIVOS

Determinar cuantitativamente benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno en metildopa materia prima, por cromatografía de gases capilar - inyección de la fase vapor.

Determinar los parámetros de validación de selectividad, precisión, intervalo, límite de detección, tolerancia y exactitud para determinar si el método de análisis cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

1.3 HIPOTESIS

La metildopa se descompone térmicamente, por lo que no es conveniente realizar la determinación de impurezas orgánicas volátiles, de acuerdo al método V propuesto por la Farmacopea de los Estados Unidos Americanos para esta materia prima, ya que se descompone dentro de la columna. Por lo tanto, alternativamente se propone determinar las impurezas orgánicas volátiles en metildopa materia prima, por cromatografía de gases capilar - inyección de la fase vapor (método IV de la misma Farmacopea).

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 DATOS MONOGRAFICOS DE METILDOPA

2.1.1 SINONIMIA

Alfa-metildopa

3-hidroxi- α -metil-L-tirosina

L-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metilalanina

α -metil- β -(3,4-dihidroxifenil)-alanina

L-(-)- α -metil- β -(3,4-dihidroxifenil)alanina

(-)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metil-L-alanina

α -metil-L- β -(3,4-dihidroxifenil)- α -alanina

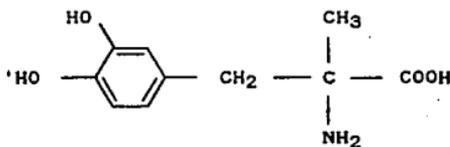
Acido (-)-2-amino-2-(3,4-dihidroxibencil) propiónico

Acido L-2-amino-2-metil-3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico

(6,26,27,29,35,40,42,57,64)

2.1.2 FORMULA SEMIDESARROLLADA

Figura 1. Fórmula química de metildopa (20,64).



2.1.3 SINTESIS Y PURIFICACION

Las primeras rutas de síntesis química de la metildopa están reportadas a partir de los años sesenta. Todas ellas se caracterizan por involucrar múltiples disolventes orgánicos. En la Tabla 1 se presenta una lista de los disolventes involucrados en la síntesis y purificación de esta materia prima.

Tabla 1. Disolventes utilizados en la síntesis y purificación química de metildopa materia prima.

Compuesto(s) precursor(es)	Disolvente(s)	Ref
3,4-Dimetoxifenilacetona	Cloruro etileno Cloruro metileno	8
DL-N-Acetil-3-(3,4-dimetoxifenil)- 2-metilalanina l- α -feniletilamina	Agua	9
Quinina Me(4,3-HO(MeO) C ₆ H ₃ CH ₂) CC1CO ₂ H DL-Me(3,4-(HO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂) CC1CO ₂ H Estricnina Me(3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂) CBrCO ₂ H Brucina	Isopropanol Metanol Butanol Agua Etanol Secbutanol Piridina Benceno	10
DL- α -amino- α -(3,4-dimetoxibencil) propionitrilo Isocianato acético DL- α -(3,4-dimetoxibencil)- α - (w-carbalcoximetilureido) propionitrilo	Eter Etanol Butanol Agua	11
L- α -amino- α -vainillilpropionamida	Isopropanol Terbutanol Metanol Agua	12

Tabla 1. Continuación.

Compuesto(s) precursor(es)	Disolvente(s)	Ref
Metil-vainillil-cetona 1-canfor-10-ácido sulfónico	Isopropanol Dioxano Eter Acetona Piridina Cloruro metileno Terbutanol Agua	13
3,4-dimetoxibromobenceno L- α -amino- α -metil- β -bromopropionato β -cloro- α -amino- α -metilpropionato	Benceno	14
3,4-dihidroxifenilacetona Oxido de propileno 3,4-dihidroxi-aminonitrilo	Benceno Acetona Agua	15
3,4-dihidroxifenilacetona Bencilamina	Metanol Cloruro metileno Agua Cloroformo	16
L- α -acilamido- α -(3,4-dialcoxibencil) propionitrilo	Agua	17
3,4-(metilendioxi)fenilacetona	Metanol Agua	18
metil- α -isocianopropionato 3,4-dimetoxibencil-bromuro	Metanol	19
Esteres del ácido pirúvico Aminas primarias	Metanol	26
Sales de DL-metildopa	Etanol	27
Metildopa (purificación)	Agua	33

La vía microbiológica también es una alternativa de síntesis de metildopa (Tabla 2):

Tabla 2. Disolventes utilizados en la síntesis microbiológica de metildopa.

Compuesto(s) precursor(es)	Género(s) productor(es)	Disolventes	Ref
N-benzoil-DL-3-(3,4-metilendioxfenil)-2-metilalanina	<u>Alcaligenes</u>	Metanol Acetona	28
α -metil-L-tirosina	<u>Pseudomona</u> <u>Bacillus</u> <u>Vibrio</u> <u>Streptomyces</u> <u>Aspergillus</u> <u>Neurospora</u>	(no indica ninguno)	29

2.1.4 ESPECIES

Anhidra: $C_{10}H_{13}NO_4$ (P.M. = 211.22)

Sesquihidrato: $C_{10}H_{13}NO_4 \cdot 1.5 H_2O$ (P.M. = 238.24)

Clorhidrato (éster etílico): $C_{12}H_{17}NO_4 \cdot HCl$ (P.M. = 275.73)
(35,64).

2.1.5 PROPIEDADES FÍSICAS

Polvo fino o cristales monoclinicos color blanco o blanco amarillento que puede contener trozos desmenuzables. Muy higroscópica. Inodora e insípida. Funde a una temperatura superior a los 290°C (hasta 310°C) con descomposición. Solubilidad: 1 g en 100 ml de agua, 1 g en 0.5 ml de ácido

clorhídrico diluido (al 10 %), 1 g en 400 ml de etanol, insoluble en éter y cloroformo. Sus constantes de disociación ácida (pKa) son: 2.25 (-COOH), 10.35 (-NH₂), 9.0 (-OH) y 12.6 (-OH') (4,6,20,30,35,40).

2.1.6 IDENTIFICACION

Reacciones coloridas (6):

Nitrato de plata amoniacal: café rojizo-negro

Cloruro férrico: verde

Reactivo de Folín-Ciocalteu: azul

Potasa metanólica: amarillo-anaranjado

Espectro ultravioleta: Máximos de absorbancia a 279 y 302 nm en solución acuosa ácida y alcalina respectivamente (6).

Espectro infrarrojo: Principales señales a 1600, 1288, 1261, 1530, 1123, 1219 cm⁻¹ en pastilla de bromuro de potasio (6).

Espectro de masas: Principales señales a 124, 123, 89, 88, 77, 51, 44 y 42 m/z (6).

2.1.7 ESTABILIDAD

La metildopa es estable a pH ácido-neutro hasta por 50 horas, en cambio, a pH de 8 se degrada en un periodo de 3-5 horas. La inestabilidad de la metildopa en solución acuosa está ligada a la degradación oxidativa del grupo catecol de su estructura (-C₆H₃O₂), la cual aumenta sensiblemente de forma directa en presencia de oxígeno y con el pH, e inversamente con la cantidad de reactivo

inicial. La reacción de descomposición se puede catalizar con iones manganeso, de cobalto, de níquel, cúpricos y férricos. En la primera etapa de degradación se forma alfametildopacromo (rosado-rojizo) y en la segunda un polímero de alfametildopamina (negro) (35).

2.1.8 FARMACOCINETICA

Se absorbe pobremente por vía oral (50 %), aunque también se absorbe por vía intravenosa. Se distribuye en todo el organismo con un volumen de distribución de aproximadamente 0.6 l/kg, alcanza una vida media de 2 h y presenta unión a las proteínas plasmáticas del 20 %. Se metaboliza principalmente a su forma conjugada, el mono-O-sulfato, y en mínima proporción (menos del 5 % de la dosis) en 3-O-metil-alfametildopamina, alfametildopamina, 3-O-metil- α -metildopamina y 3,4-dihidroxifenilacetona; o bien, permanece inalterada. Su principal vía de eliminación es la fecal, aunque pequeñas cantidades se eliminan en la orina (con una depuración plasmática de 3 ml/min/kg) (3,6,42,43).

2.1.9 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

Se utiliza como antihipertensivo en el tratamiento de hipertensión arterial mediante un mecanismo de bloqueo adrenérgico conocido parcialmente. El isómero levógiro de la metildopa actúa indirectamente a través de la α -metil-noradrenalina (en quien se

transforma) sobre neuronas adrenérgicas centrales relacionadas con la regulación cardiovascular (3,42,43,60).

La hipertensión arterial es un padecimiento de presión sanguínea elevada, puede ser provocada por fármacos, glomerulonefritis, producción y liberación excesiva de esteroides endógenos de actividad mineralocorticoide, eclampsia del embarazo, tensión mental, estado emocional depresivo, ansiedad, angustia, estilo activo de vida, obesidad, alto consumo de electrolitos, edad avanzada, etc. Debido a que las causas mencionadas por lo general están presentes en el paciente, el tratamiento antihipertensivo requiere de ser prolongado, convirtiéndose así los fármacos antihipertensivos en medicamentos de administración crónica o prolongada (3).

La terapia con metildopa produce somnolencia, tolerancia, náuseas, debilidad, cefalea, bradicardia, diarrea, alteraciones sexuales, congestión nasal, fatiga, depresión psíquica y parkinsonismo (3,42,57).

2.1.10 DOSIS Y FORMAS FARMACEUTICAS

Para adultos se prescriben 0.5 - 2.0 g diarios por vía oral. Para niños se prescriben 10 mg/kg al día repartidos en 2, 3 ó 4 dosis como tratamiento inicial, y 65 mg/kg con un máximo de 3 g al día como dosis de mantenimiento. Dosis máxima diaria 3 g (42,57).

Disponible en suspensión oral (50 mg/ml), comprimidos (125, 250 y 500 mg) y solución inyectable (en forma de éster etílico, 50 mg/ml) (42).

2.2 IMPUREZAS ORGANICAS VOLATILES

2.2.1 DEFINICION

Las impurezas orgánicas volátiles (I.O.V.) son disolventes orgánicos volátiles, que se encuentran presentes en algunas materias primas y preparados farmacéuticos debido a los procesos de síntesis, purificación y/o fabricación; los cuales son potencialmente tóxicos, aún en muy bajas concentraciones (ppm), en muchos de los casos de manera irreversible (7,34).

Según la U.S.P. XXII, la prueba de orgánicos volátiles es una prueba límite de impurezas tóxicas; la cual consiste en este caso, en demostrar que las impurezas orgánicas volátiles presentes en la metildopa no exceden el límite de contenido ya establecido (Tabla 3, pag. 14) (64-66).

2.2.2 ENSAYO OFICIAL

Ayudada en datos de los disolventes orgánicos volátiles usados en los procesos de síntesis y purificación de las materias primas utilizadas por la industria farmacéutica, y en la preparación de los productos farmacéuticos (propiedades físicas y químicas, frecuencia de uso, farmacocinética y toxicología); así como en datos de animales de laboratorio y humanos (promedio de vida, volumen de agua y aire recibidos al día, período de gestación), y en estudios toxicológicos realizados a través de los cuales se determinó cuál era el órgano vital más sensible a estos disolventes, dependiendo de la vía de administración; la Comisión

de la Farmacopea de los Estados Unidos Americanos, determinó cuáles son los disolventes que producen efectos crónicos (neurotoxicidad y efectos reproductivos adversos) o irreversibles (teratogenicidad), y los denominó impurezas orgánicas volátiles. Para cada uno de ellos estableció la cantidad máxima permisible o límite que podían contener algunas materias primas y los comprimidos recubiertos, mismos que se presentan en la Tabla 3 (34,45,65):

Tabla 3. Límites U.S.P. para I.O.V. (66).

Impureza Orgánica Volátil	Límite (ppm)
Benceno	100
Cloroformo	50
1,4-Dioxano	100
Cloruro de metileno	100
Tricloroetileno	100

En 1988 la Farmacopea y el Formulario Nacional de los Estados Unidos Americanos (U.S.P. Y N.F.), introdujeron el control del contenido de impurezas orgánicas volátiles ("Organic Volatile Impurities <467>") como una nueva regulación y como parte del control de las materias primas que se emplean en la fabricación de medicamentos de administración prolongada (al menos 30 días consecutivos), y de comprimidos recubiertos también de administración prolongada (susceptibles de contener alguna o todas las I.O.V.) (45).

No obstante, de la lista de materias primas para la cual es aplicable la prueba de I.O.V. (hasta 425), pueden excluirse aquellas cuya monografía indique la prueba de pérdida al secado

(siempre y cuando la impureza esté presente en la superficie del cristal y pueda ser removida bajo las condiciones de la pérdida al secado) sólo si cumplen con los requisitos que señala la Tabla 4 (45):

Tabla 4. Criterio de exclusión para la prueba de I.O.V. en materias primas (45).

Límite de pérdida al secado	Dosis máxima (mg/día) (menor o igual que)
Mayor o igual que 0.1 %	50.0
Mayor o igual que 0.2 %	25.0
Mayor o igual que 0.3 %	33.0
Mayor o igual que 0.4 %	12.5
Mayor o igual que 0.5 %	10.0
Mayor o igual que 1.0 %	5.0

2.2.3 METODOS DE ANALISIS

La U.S.P. propone seis métodos de análisis para I.O.V. en materias primas, todos consisten en el análisis de una muestra de vapor o líquida por cromatografía de gases, cuya descripción es la siguiente (66):

Método I

Preparación de soluciones:

1. Solución de referencia: Disolver 1.0 µg de cloroformo, 2.0 µg de benceno, 1,4-dioxano, cloruro de metileno y tricloroetileno en cada ml de agua o del disolvente especificado en la monografía.
2. Solución problema: Disolver en agua o en el disolvente especificado en la monografía una cantidad exactamente pesada de la

materia prima para obtener una solución de concentración aproximada a 20 mg/ml.

Sistema cromatográfico: Columna de sílica fundida de 30 m de longitud, 0.53 mm de d.i. y 5 μ m de fase fenilmetil polisiloxano. Guardacolumna de sílica desactivada con fenilmetil siloxano de 5 m de longitud y 0.53 mm de d.i. Inyector sin divisor de flujo. Detector de ionización de llama y puerto de inyección a 260 y 70°C. Helio como gas portador a una velocidad lineal de 35 cm/seg. Programa de temperatura para la columna de 35°C (5 min), alcanzar los 175°C a una velocidad de calentamiento de 8°C/min, y después a una velocidad de calentamiento de 35°C/min elevar la temperatura a 260°C (16 min).

Validez del sistema: La resolución entre cada par de señales del cromatograma de la solución de referencia debe ser al menos de 1.0 y el coeficiente de variación de las respuestas individuales cuando mucho del 15 %.

Procedimiento: Inyectar volúmenes iguales y por separado de 1 μ l de las soluciones problema y de referencia. Medir las respuestas de todas las señales que aparezcan en el cromatograma correspondiente a la solución problema. Identificar conforme al tiempo de retención cada señal y calcular la cantidad de I.O.V. detectadas; la cual no debe exceder los límites especificados en la Tabla 3, a menos que la monografía individual indique otros.

Método II

Emplea un sistema dinámico de inyección de la fase vapor con purga y trampa (con nitrógeno como gas de purga) acoplado a un cromatógrafo de gases. La trampa es de al menos 25 cm de longitud con un d.i. de por lo menos 2.67 mm, empacada con óxido de 2,6-difenilo, sílica gel y carbón de coco. El desorbedor tiene la capacidad de elevar la temperatura rápidamente hasta 250°C.

Preparación de soluciones: La preparación de las soluciones problema y de referencia es la misma que la descrita en el método I.

Sistema cromatográfico: Columna de vidrio de 2.44 m de longitud y 2 mm de d.i., con 1 % de fase polietilenglicol-diepóxido esterificado con ácido tereftálico sobre carbón como soporte. Detector de ionización de llama. Helio como gas portador a un flujo de 40 ml/min. Programa de temperatura de la columna: 45°C (3 min), elevarla a una velocidad de 8°C/min hasta 220°C (15 min).

Procedimiento: Introducir 5.0 ml de ambas soluciones por separado en el sistema de purga y trampa, purgar durante 10 min a T.A. Desorber las I.O.V. de la trampa elevando su temperatura a 180°C (4 min) e iniciar su separación cromatográfica. Identificar cada señal del cromatograma de la solución problema en base al tiempo de retención y calcular la cantidad de I.O.V. en la materia prima, la cual no debe exceder los límites especificados en la Tabla 3, a menos que la monografía individual indique otros.

Validez del sistema: La resolución entre cada par de señales del cromatograma de la solución de referencia debe ser al menos de 1.5

y el coeficiente de variación de las respuestas individuales cuando mucho del 10 %.

Método III

Emplea el mismo sistema cromatográfico que el método II, pero utiliza un espectrofotómetro de masas como detector y un sistema computarizado para la adquisición y almacenamiento de datos. La preparación de las soluciones problema y de referencia es la misma que la descrita en el método I.

Método IV

La preparación de las soluciones problema y de referencia es la misma que la descrita en el método I, de las cuales se transfiere por separado, una alícuota de 5 ml a un vial que contenga 1 g de sulfato de sodio, calentar el vial sellado a 80°C durante 60 min. El procedimiento es el mismo que el descrito en el método I, sólo que se inyecta 1 ml de la fase vapor.

Sistema cromatográfico: Columna de 30 m de longitud, 0.53 mm de d.i., de sílica fundida recubierta con 3.0 μ m de cianopropilfenil dimetil polisiloxano. Emplea una guardacolumna de 5 m de longitud y 0.5 mm de d.i. con sílica desactivada con fenilmetilsiloxano. Programa de temperatura para la columna: 40°C (20 min) hasta 240°C (20 min). Inyector sin divisor de flujo. Puerto de inyección y detector de ionización de llama a 140 y 260°C respectivamente. Emplea helio como gas portador a una velocidad lineal de 35 cm/seg.

Validez del sistema: La resolución entre cada par de señales del cromatograma de la solución de referencia debe ser al menos de 3.0

y el coeficiente de variación de las respuestas individuales cuando mucho del 15 %.

Método V

El sistema cromatográfico es el mismo que el descrito en el método IV. La preparación de las soluciones problema y de referencia, y el procedimiento son los mismos que los descritos en el método I. Sigue el mismo criterio de validez del sistema que el método IV.

Método VI

Empieza un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama. La preparación de las soluciones problema y de referencia, y el procedimiento son los mismos que los descritos en el método I. El sistema cromatográfico se especifica en la monografía individual conforme a una tabla que aparece en la descripción de los métodos para I.O.V. que propone la U.S.P. en su capítulo "Organic Volatile Impurities <467>". Sigue el mismo criterio de validez del sistema que el método I.

2.2.4 TOXICIDAD

Benceno: Es tóxico por cualquier vía de administración. Es un fuerte irritante de la piel causando daño tisular y quemaduras dérmicas si el contacto con el disolvente es persistente. El contacto con los ojos inflama la conjuntiva y produce quemaduras corneanas. La sintomatología de la exposición aguda (elevada concentración por un periodo corto) al benceno consiste en

anorexia, inflamación respiratoria, edema y hemorragia pulmonar, congestión renal y edema cerebral; acompañada de tos, carraspera, cefalea, náuseas, vértigo, somnolencia, fiebre, cianosis, convulsiones y delirio que pueden desencadenar la muerte. La exposición crónica (prolongada a bajos niveles) genera alteraciones en la producción de las células sanguíneas, siendo las principales causas de muerte la anemia aplásica y la leucemia (5,39,43,67).

Cloroformo: La exposición aguda a este disolvente produce trastornos gastrointestinales, desvanecimiento, narcosis y arritmias cardíacas que pueden inducir el paro cardíaco. La exposición crónica produce degeneración del tejido hepático y de las nefronas. Produce necrosis hepática severa debido a su metabolito, el fosgeno (5,43).

Cloruro de metileno: Es una sustancia hepatotóxica potencial narcótica, además (aunque no tanto como el cloroformo) muy irritante del tracto respiratorio y de la piel (39,43).

Tricloroetileno: Es narcótico potencial, por exposición crónica causa degeneración lenta del sistema nervioso y digestivo, y posiblemente pérdida de la visión. Es un poderoso irritante de la piel produciendo eritema y ampollas en la piel más sensible. Sus efectos hepatotóxicos son mínimos (39,43).

El cloroformo, cloruro de metileno y tricloroetileno pertenecen a la categoría de los hidrocarburos halogenados, la cual se caracteriza toxicológicamente por producir depresión del sistema

nervioso central y lesiones a nivel renal y hepático tan severas como la necrosis y el cáncer. La sintomatología producida por exposición moderada a ellos, consiste en irritación ocular, nasal y de la garganta, cefalea, vómito y náuseas (43,67).

1,4-Dioxano: La exposición aguda al 1,4-dioxano produce irritación ocular y de las vías respiratorias, vértigo, cefalea, anorexia, trastornos gástricos, náuseas, vómito, somnolencia, uremia, e incluso coma y muerte. Los efectos del contacto prolongado producen degeneración y necrosis principalmente a nivel renal, hepático, cerebral y de células epiteliales (5).

2.2.5 PROPIEDADES FISICAS

Tabla 5. Fórmula estructural de impurezas orgánicas volátiles (58).

	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{CH} - \text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array}$
Benceno	Cloroformo
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{Cl} \\ \\ \text{Cl} \end{array}$
1,4-Dioxano	Cloruro de metileno

Tabla 6. Punto de ebullición de impurezas orgánicas volátiles (4,58).

Impureza Orgánica Volátil	Punto de ebullición (°C)
Benceno	80.1
Cloroformo	61.2
1,4-Dioxano	101.5
Cloruro de metileno	40.7

Tabla 7. Solubilidad de impurezas orgánicas volátiles (59).

Impurezas Orgánicas Volátiles	En agua (g/100 ml)	En alcohol
Benceno	0.06	= (etilico)
Cloroformo	0.82	= (etilico)
1,4-Dioxano	"	muy soluble (etilico)
Cloruro de metileno	0.198	= (etilico)

2.3 CROMATOGRAFIA

2.3.1 CLASIFICACION DE TECNICAS CROMATOGRAFICAS

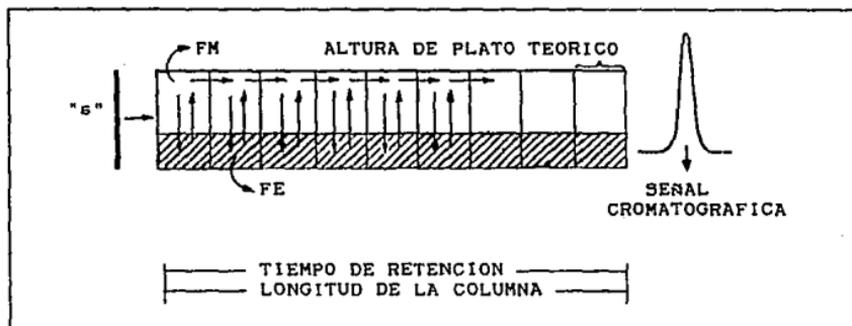
Las técnicas cromatográficas se clasifican de acuerdo a la fase estacionaria en (53):

1. Fase estacionaria sólida (adsorción):
 - Fase móvil líquida (cromatografía sólido-líquido)
 - Fase móvil gaseosa (cromatografía sólido-gas)
2. Fase estacionaria líquida (partición):
 - Fase móvil líquida (cromatografía líquido-líquido)
 - Fase móvil gaseosa (cromatografía líquido-gas)

2.3.2 TEORIA DE LA CROMATOGRAFIA

En cromatografía cada soluto ("s") o componente de la muestra sufre una serie de equilibrios entre una fase estacionaria (FE) y otra móvil (FM), desde que entra a la columna hasta que eluye de ella (Figura 2) (61):

Figura 2. Proceso cromatográfico (61).



Tales equilibrios están relacionados por una constante de partición o distribución (K) (61,63):

$$K = C_{FE} / C_{FM} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde C_{FE} = Concentración de "s" en la FE
 C_{FM} = Concentración de "s" en la FM

Esta constante de distribución K puede expresarse en términos de una relación de distribución o partición, llamada también factor de capacidad (k') y una relación de fases (β):

$$K = k'B$$

(Ec. 2)

donde B es la relación del volumen de fase móvil (V_M) y el volumen de fase estacionaria (V_E); y k' es la relación del número de moles de "s" en la FM (n_M) y el número de moles de "s" en la FE (n_E) (61,63):

$$B = V_M / V_E$$

(Ec. 3)

$$k' = n_E / n_M$$

(Ec. 4)

Una vez que se establecen los repetidos equilibrios de "s" entre ambas fases, éste eluye de la columna a un tiempo llamado de retención (t_R), el cual se define como el tiempo que tarda "s" en salir de la columna. El t_R es el resultado de la suma del tiempo que "s" permanece en la FE, el tiempo de retención neto (t_e), y del tiempo que "s" permanece en la FM, el tiempo muerto (t_m) (61).

Análogamente surgen los parámetros volumen de retención (V_R), volumen muerto (V_m) y volumen de retención neto (V_e). El V_R es el volumen de FM requerido para que "s" eluya de la columna. V_m es el volumen de FM requerido para que un soluto no retenido (N_2 , Ar, He o CH_4) eluya de la columna. V_e es el resultado de la sustracción de V_M a V_R . La conversión de un parámetro de tiempo a su análogo de volumen se consigue por introducción del flujo de la FM (F) como por ejemplo (61,63):

$$V_R = (t_R)(F)$$

(Ec. 5)

La separación de los componentes de la muestra obedece a que existe entre ellos, una diferencia en la velocidad de migración a lo largo de la columna cromatográfica; la cual a su vez radica en la diferencia de afinidades (por la fase móvil y estacionaria), la cual es evidente en aspectos prácticos gracias al t_R (53,61).

La calidad o eficiencia de la separación cromatográfica se estima por otros parámetros como lo son el número de platos teóricos (N), la altura equivalente a un plato teórico (H), la resolución (R_s), el factor de capacidad (k') y la selectividad relativa (α) (53,61).

El número de platos teóricos representa el número de equilibrios que sufre "s" en la columna, se calcula con el ancho de la señal medido en la línea base cortada por las tangentes a ésta (W) y con su t_R . Este parámetro se relaciona con H, que se define como la sección de la columna en la que se efectúa un equilibrio, e involucra la longitud de la columna (L) (53,61).

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$H = L / N \quad (\text{Ec. 7})$$

Van Deemter estudió las contribuciones de diferentes factores relacionados con la velocidad de la fase móvil (u), en el ensanchamiento de las señales cromatográficas, expresándolas como el valor de H (53,63):

$$H = A + B/u + C u \quad (\text{Ec. 8})$$

"A" se refiere a la existencia de una diversidad de trayectorias que ofrecen las partículas del empaque a "s"; es independiente de la velocidad de la fase móvil. Desde luego su influencia es nula en columnas carentes de soporte, donde la FE líquida está depositada directamente sobre el tubo (53,63).

"B/u" se refiere a la difusión longitudinal de "s" en la FM, consecuencia del efecto del gradiente de concentración que se genera al entrar las moléculas de "s" a la cabeza de la columna; de manera que a mayor velocidad de fase móvil, la separación de las moléculas de "s" respecto al centro de la señal será más pronunciada. En cromatografía de gases, de los tres términos de la ecuación de Van Deemter, es éste el que contribuye mayormente en el ensanchamiento de la señal, debido a los grandes coeficientes de difusión de las moléculas gaseosas de "s" en la fase móvil (53,63).

"C" se refiere a la resistencia a la transferencia de masa de "s" en ambas fases. Si la penetración de "s" en la FE, así como su liberación de la misma se dificultan, el establecimiento de un equilibrio de "s" entre ambas fases se retarda. La FM arrastrará a aquellas moléculas que se encuentren en ella, dejando atrás a las que se encuentran en la FE; por lo que el aumento de la velocidad de la FM produce ensanchamiento de la señal, y con ello aumento del valor de H (53,63).

La resolución entre dos señales cromatográficas se define como el cociente que resulta de dividir la diferencia de sus tiempos de

retención entre el promedio de sus anchos medidos en línea base (53,61,64):

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (\text{Ec. 9})$$

La selectividad o retención relativa es la relación entre un parámetro de retención de "s" y el mismo de un compuesto de referencia (sr) (53,63):

$$\alpha = t_R ("s") / t_R (sr) \quad (\text{Ec. 10})$$

2.3.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDO-GAS (CLG)

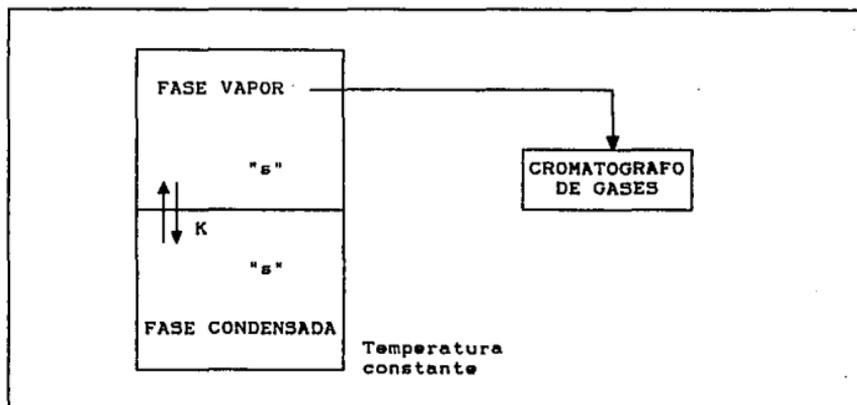
2.3.3.1 ANALISIS DE LA FASE VAPOR

El análisis de la fase vapor tiene el mismo principio de la destilación por arrastre de vapor. En este tipo de destilación la muestra se calienta a una temperatura tal que se previene la descomposición de ésta, de manera que los componentes volátiles se reparten entre las fases líquida y vapor para ser arrastrados por una corriente de vapor de agua (50,53).

En el análisis de la fase vapor, una muestra líquida o sólida contenida en un vial perfectamente sellado, se mantiene a temperatura constante un lapso dado, durante el cual se establece el equilibrio del soluto "s" entre las fases condensada y vapor a esa temperatura; para que después se analice cuantitativamente una muestra de la fase vapor por cromatografía de gases. De esta

manera, en la destilación por arrastre de vapor y en el análisis de la fase vapor, se establece el equilibrio de "s" entre la fase condensada y su fase vapor; de acuerdo a una constante de distribución (K) y a temperatura constante (Figura 3) (50).

Figura 3. Equilibrio de un soluto "s" en el análisis de la fase vapor (50).



Los métodos de análisis de la fase vapor se clasifican en estático (sistema cerrado) y dinámico (sistema abierto). El método estático consiste del análisis de una muestra de vapor (de una etapa) tomada de un vial sellado; o bien, de más de una muestra de vapor tomadas consecutivamente (etapas múltiples). El método dinámico consiste del análisis de dos muestras de vapor tomadas una antes y la otra después de pasar sobre la fase vapor del vial, un flujo de gas puro (aire) (50).

La principal aplicación del análisis de la fase vapor es la determinación de trazas (≤ 100 ppm) de sustancias volátiles. En este caso, dado que "s" se encuentra en muy baja concentración en la muestra original, se requiere recuperar la mayor cantidad posible de "s" en la fase vapor; es decir, aumentar la sensibilidad del análisis. Para ello, se pueden aprovechar los beneficios de los siguientes efectos (50):

- a. Aumentar la temperatura del vial, con lo que se desplaza el equilibrio de "s" hacia la fase vapor, aumentando así su concentración en esta fase.
- b. La disolución de un disolvente orgánico (miscible con agua) en agua desplaza el equilibrio de "s" hacia la fase vapor, si la solubilidad de "s" es menor en el agua.
- c. La adición de una sal (cloruro de sodio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, carbonato de potasio, citrato de sodio, entre otras) en proporción del 10 al 20 % también desplaza el equilibrio de "s" hacia la fase vapor. La sal actúa como un inhibidor parcial competitivo.
- d. La retención de la muestra de vapor previa a su entrada a la columna por medio de un adsorbente o una trampa criogénica, permite la entrada de una muestra de mayor volumen a la columna (sistema de purga y trampa).

Las ventajas del análisis de la fase vapor son (47,50):

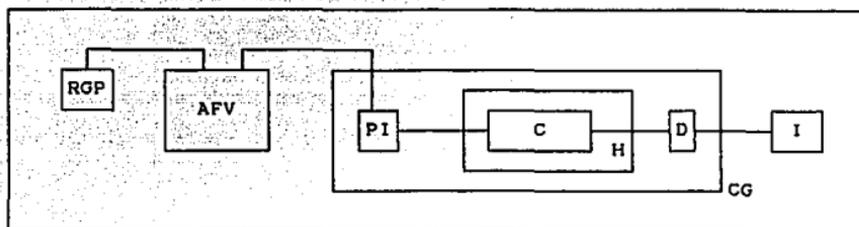
- a. Ofrece mayor sensibilidad que la inyección de la muestra líquida. La muestra de vapor puede ser de 1 ó 3 ml.
- b. Elimina el riesgo de la contaminación de la columna con material no volátil. Util en el análisis de muestras biológicas.
- c. Evita un complejo pretratamiento de la muestra antes de analizarla.
- d. Reduce considerablemente la señal del disolvente.
- e. Elimina la interferencia de los componentes no volátiles de la muestra.
- f. Puede ser automatizado aumentando con ello la precisión del sistema.

2.3.3.2 INSTRUMENTACION

La instrumentación básica para el análisis de la fase vapor consta de los siguientes componentes (Figura 4) (55,61):

1. Reservóreo para el gas portador (RGP)
2. Automuestreador de la fase vapor (AFV)
3. Cromatógrafo de gases (CG)
 - Puerto de inyección (PI)
 - Horno termostaticado (H) y columna (C)
 - Detector (D)
4. Integrador o graficador (I)

Figura 4. Esquema de la instrumentación para el análisis de la fase vapor.



AUTONUESTREADOR DE LA FASE VAPOR

El automuestreador de la fase vapor opera mediante un sistema de una válvula y un rizo para transferir la muestra de vapor al cromatógrafo de gases. La muestra condensada contenida en un vial se calienta a una determinada temperatura, la cual se mantiene constante durante un lapso dado (tiempo de equilibración). Una vez transcurrido ese tiempo, se inyecta gas portador a través de la aguja al interior del vial, para aumentar la presión interna (presurización); para que en la siguiente etapa se llene automáticamente el rizo con la fase vapor del vial; y finalmente ésta se transfiere al puerto de inyección del cromatógrafo a través de una línea de transferencia precalentada. El rizo y la aguja se purgan con un flujo continuo de gas portador para evitar que queden en ellos residuos de la muestra de vapor anterior (47).

PUERTO DE INYECCION E INYECTOR CON DIVISOR DE FLUJO

El puerto de inyección es la sección del cromatógrafo destinado a recibir la muestra, ya sea líquida o gaseosa. Debe estar diseñado para poder alojar a los distintos tipos de inyectores; así como para adaptarse a diferentes temperaturas y columnas. Dado que es en él donde se vaporizan las muestras no gaseosas, debe estar a una temperatura que lo permita. En cromatografía de gases existen cuatro tipos de inyectores: inyector con divisor de flujo, inyector sin divisor de flujo, inyector directo e inyector en columna (41.55).

En el análisis de trazas resultan particularmente útiles el inyector sin divisor de flujo y el directo; sin embargo, algunas de sus características se convierten en desventajas o limitantes de su uso cuando no es fácil implementar sus requerimientos. El primero genera señales anchas si los solutos de la muestra (la cual es grande) no se concentran antes de entrar a la columna; para lo cual se requiere una diferencia mínima de 100°C entre los puntos de ebullición del disolvente y del soluto. El inyector directo requiere de un diseño y de jeringas especiales para depositar la muestra muy cerca de los primeros centímetros de la columna (7,41.55).

El inyector en columna no sólo requiere del implemento para la concentración de solutos previa a su separación, sino además, dado que la muestra se deposita en forma líquida "en la columna" se requiere que ésta esté libre de material no volátil con objeto de

evitar que quede atrapado en la columna. También la muestra debe ser grande ya que se requiere analizar trazas (7,41,55).

Aún cuando la principal aplicación del inyector con divisor de flujo es el análisis de solutos presentes en altas concentraciones en la muestra, puede ser adaptado mediante una relación de división de flujo baja (según se verá más adelante) para analizar trazas (≤ 100 ppm) de éstos (55).

El fundamento de operación del inyector con divisor de flujo es el siguiente: El flujo total de gas portador previamente calentado se divide en dos flujos, uno que pasa por debajo del septa del puerto de inyección para realizarle una purga (2-5 ml/min) y el otro más grande, que entra a la cámara de vaporización o inserto (consisten de un tubo de borosilicato de aproximadamente 2-4 mm de d.i. y 5-10 cm de longitud) en donde se mezcla con la muestra vaporizada. Posteriormente, cerca de la entrada de la columna este flujo de gas portador-muestra vaporizada sufre otra división en dos flujos (establecida mediante una válvula), el más pequeño de los cuales entra a la columna y el restante es eliminado a la atmósfera (55).

La división del flujo gas portador-muestra se conoce como relación de división de flujo y puede adoptar dos expresiones (41,55):

FT : FPC

FPC : FT

donde FT = flujo total
FPC = flujo parcial que entra a la columna

Los valores numéricos de estas relaciones oscilan entre 1:5 y 1:1000 (de acuerdo a la expresión $FPC:FT$) (41,55).

Las características de este inyector son linealidad, reproducibilidad, amplia gama de relaciones de división de flujo, inercia química y estabilidad térmica. La reproducibilidad es especialmente importante, ya que la división de flujo debe realizarse siempre a una misma proporción que además, deber ser representativa de la muestra. La reproducibilidad es sensiblemente dependiente de la reproducibilidad de las inyecciones, por lo que la automatización resulta una alternativa excelente. La inercia química es fundamental en el análisis de trazas para evitar la pérdida de los componentes de interés (55).

Las desventajas del inyector con divisor de flujo son: pérdida de solutos de baja volatilidad (la vaporización de la muestra es casi instantánea), restricción del análisis de solutos termolábiles y consumo de grandes cantidades de gas portador (55).

COLUMNAS

Es en la columna donde se desarrolla el proceso de separación de los componentes de una muestra. La cromatografía de gases se inició con el uso de las columnas empacadas; sin embargo, posteriormente aparecieron las capilares (1956). La Tabla 8

compara algunas características de columnas empacadas y capilares (41,51,61).

Tabla 8. Columnas empacadas y capilares (41,61).

Características	Empacadas	Capilares
Longitud (m)	0.5 - 6.0	5 - 150
Diametro interno (mm)	2 - 6	0.2 - 0.75
Espesor de película (µm)	1 - 10	0.05 - 1.0
Relación de fase (β)	5 - 20	20 - 500
Flujo (ml/min)	10 - 60	0.5 - 15
Presión (psi)	10 - 40	3 - 40
N/m*	2500	5000

* N/m = número de platos teóricos por metro.

Las columnas capilares se construyen con un tubo generalmente de vidrio (sílica fundida) de diámetro y longitud variable, en cuyo interior se deposita la fase líquida estacionaria con o sin soporte sólido. Se clasifican como sigue (41,51,61):

a. Capilares de pared recubierta. La fase estacionaria se deposita en la pared interior del tubo:

- Gran calibre o megaboro: 0.50 - 0.75 mm de d.i.
- Pequeño calibre: 0.20 - 0.35 mm de d.i.

b. Capilares de capa porosa. La fase estacionaria se deposita en la pared interior de un tubo atacado por algún medio fuertemente ácido o básico.

c. Capilares con soporte. La fase estacionaria se deposita sobre un soporte inerte finamente dividido (tierras silíceas o alumina).

Gracias a sus pequeños diámetros internos, las columnas capilares sufren bajas caídas de presión, por lo que soportan ser de tantos metros de longitud. Las relaciones de fase de las columnas capilares y su gran longitud comparadas con las de las columnas empacadas, ofrecen mayor eficiencia. En el caso particular de las columnas con pared recubierta, el ensanchamiento de las señales por efecto de la multiplicidad de paso, debida a las partículas del soporte, desaparece. Además, las columnas capilares ofrecen sobre las empacadas alta resistencia mecánica debido a la cubierta externa de poliimida o poliamida (1,51,61).

La fase estacionaria constituye la parte activa en la separación cromatográfica, cuyos atributos deseables son: selectividad, estabilidad química (no se modifica su estructura), estabilidad térmica (no se desprende al trabajar a temperaturas cercanas a su límite superior) y larga vida útil. Dada la necesidad de evitar que la fase estacionaria se desprenda con el cambio de temperatura de la columna (temperatura programada), se introdujeron las columnas con fase de enlaces entrecruzados, generando así columnas mucho más estables térmicamente y de larga vida útil (1,61).

Las fases estacionarias utilizadas en columnas capilares abarcan todo el intervalo de polaridad. Los polietilenglicoles y los cianopropilpolisiloxanos son fases polares, las cuales presentan interacciones ácido-base e interacciones entre el grupo CN y los electrones π de solutos insaturados. Los enlaces C-Cl (halógeno), C-O y C-N, actúan como dipolos permanentes y los dobles

enlaces de los solutos sufren polarización formando dipolos inducidos (1,61).

La columna DB-624 "J & W Scientific" con fase cianopropil-fenil-dimetilpolisiloxano es una columna de pared recubierta de pequeño calibre y alta polaridad, con intervalo de temperatura de -20 a 260 °C, útil en el análisis de hidrocarburos halogenados (52).

DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA

El detector es el dispositivo del cromatógrafo destinado a generar una señal debida a aquel compuesto que llegue a él después de haber eluido de la columna, que sea de composición química diferente a la de la fase móvil; y que además, tenga la capacidad de hacer que el detector genere tal señal. El detector debe operar a la temperatura necesaria para impedir la condensación de los solutos provenientes de la columna, y con ello evitar su contaminación y el entorpecimiento de la emisión de señales (46,55).

En cromatografía de gases existen los siguientes detectores: ionización de llama (DILL), captura de electrones (DCE), conductividad térmica (DCT), termiónico o ionización de llama alcalina (DT o DILLA), fotométrico de llama (DFF), espectrofotómetro de masas (CG-EM) e infrarrojo (CG-IR). Algunos son selectivos como el DFF (azufre y fósforo), DILLA (fósforo y nitrógeno) y el DCE (elementos electrón atrayentes). El resto se

consideran detectores de respuesta universal, pues responden a una amplia gama de sustancias. Los espectrofotómetros de masas e infrarrojo son técnicas que se han acoplado a un cromatógrafo de gases con el objeto de identificar cada soluto proveniente de la columna mediante la obtención del espectro correspondiente. Debido al costo e instrumentación inherentes de estos detectores especializados, su aplicación en el análisis de trazas resulta impráctica; además de que en este tipo de análisis lo que se busca primordialmente es la alta sensibilidad del detector, la cual puede conseguirse con otro detector como el DILL o el DCT. No obstante, el DILL se prefiere sobre el DCT para el análisis de impurezas orgánicas volátiles a nivel de partes por millón, ya que es más sensible, cubre un amplio orden lineal y ofrece gran estabilidad y reproducibilidad (46,55).

El principio de operación del detector de ionización de llama es el siguiente:

Los solutos provenientes de la columna se mezclan con un flujo de hidrógeno para entrar a un quemador sobre la salida del cual, gracias a un flujo de aire u oxígeno que llega al mismo sitio, se produce una llama. Es en esta llama donde se queman los solutos o componentes de la muestra, generando iones positivos, negativos y electrones libres; quienes son atraídos por un par de electrodos situados a ambos lados de la llama. La corriente resultante se captura en un convertidor analógico digital, el cual envía la señal a un graficador para que la registre (46,55).

El DILL es un detector de alta sensibilidad, la cual está en función de la relación de los flujos de aire e hidrógeno, siendo la óptima aproximadamente diez veces mayor el primero, con respecto al segundo. Responde a los compuestos orgánicos linealmente. Es estable a las fluctuaciones de temperatura y del flujo de la fase móvil. En ausencia de muestra genera una línea base muy estable. El tamaño de su respuesta es proporcional al número de enlaces C-H de la molécula que detecta. No detecta al aire, agua, CO, CO₂, O₂, N₂, NO, NO₂, N₂O, N₂O₃, NH₃, HCN, H₂S, CS₂, CCl₄, SiCl₄, CH₃SiCl₃, SiF₄, y gases inertes; además de que su respuesta se atenúa con la presencia de heteroátomos y grupos funcionales. La condensación del vapor de agua se evita con una temperatura superior a los 100°C (46,55).

INTEGRADOR

Es un sistema registrador con integradores electrónicos para proporcionar información con respecto a la cantidad de soluto que llega al detector. Los parámetros de integración se definen como sigue (46):

- Atenuación: Medida del tamaño de las señales en el cromatograma expresada como 2^n , donde $n+1$ reduce la altura de la señal cromatográfica a la mitad, $n-1$ aumenta al doble la altura de la señal cromatográfica (48).

- Velocidad de carta: Corresponde al desplazamiento del papel graficador en el integrador, expresado en cm/mín (48).

- Ancho de la señal: Separación entre las tangentes de la señal cromatográfica, medida a la mitad de su altura y expresada en minutos (48).
- Nivel de ruido: Altura mínima para la detección de la señal cromatográfica, donde una unidad de aumento duplica la altura mínima aceptada para el cálculo y reporte correspondientes (48).
- Área de rechazo: Superficie total bajo la curva de la señal cromatográfica mínima requerida para incluirse en el cálculo y reporte correspondientes (48).

2.3.3.3 TEMPERATURA PROGRAMADA

En la retención la temperatura es el parámetro más importante después de la fase estacionaria. Las ventajas de la cromatografía de gases a temperatura programada son tiempos de análisis cortos y señales menos anchas y coileadas. La cromatografía de gases a temperatura programada (CGTP) consiste en iniciar el proceso cromatográfico a una temperatura inicial (T_0), aumentarla o disminuirla a una velocidad (V , °C/min) hasta alcanzar la temperatura final (T_f); pudiendo sostener por tiempos (t_0 y t_f) deseados las temperaturas inicial y final. Un programa de temperatura se puede expresar de manera simplificada como: $T_0(t_0) - V - T_f(t_f)$. Util en el análisis de mezclas complejas cuyos componentes cubren un amplio intervalo de puntos de ebullición (46,61).

2.3.3.4 METODOS DE CUANTIFICACION

La respuesta de la sustancia de interés en un sistema cromatográfico, puede medirse como altura (de la línea base al punto máximo) o como área (superficie total) de la señal correspondiente. La medida por altura requiere de una línea base estable para mayor precisión y exactitud. Es especialmente útil en la cuantificación de picos coleados y ligeramente sobrepuestos. La medida por área es conveniente con picos bien resueltos y ligeramente asimétricos (61,62).

Los métodos de cuantificación con referencia externa e interna son comúnmente usados en cromatografía de gases:

- Referencia Externa:

La cuantificación de una sustancia de interés consiste en interpolar el tamaño de su respuesta en una curva de calibración construida con una serie de concentraciones a diferentes niveles de la sustancia de referencia del mismo compuesto (variable independiente) y la respuesta de cada concentración (variable dependiente). Es requisito indispensable que la medida de estas respuestas provengan de un mismo sistema y bajo las mismas condiciones (62).

- Referencia Interna:

La cuantificación de una sustancia de interés consiste en interpolar la respuesta relativa de la sustancia de interés en una curva de calibración construida con diferentes concentraciones de

la sustancia de referencia del mismo compuesto (preparadas con volúmenes diferentes de una solución de la sustancia de interés adicionados de una cantidad fija de la sustancia de referencia interna) (variable independiente), y la respuesta relativa de la sustancia de referencia (variable dependiente) (62).

$$RR\ SI = \frac{RA\ SI}{RA\ SR} \quad (Ec. 11)$$

donde: RR SI = Respuesta relativa de la sustancia de interés
RA SI = Respuesta absoluta de la sustancia de interés
RA SR = Respuesta absoluta de la sustancia de referencia interna

La cuantificación con sustancia de referencia interna compensa los errores analíticos; pero para que una sustancia funcione como tal, debe cumplir con los siguientes requisitos (61,62):

- Aparecer como una señal perfectamente separada del resto de las señales del cromatograma y tener un tR cercano al de la sustancia de interés.
- Ser altamente pura, no reaccionar con los componentes de la muestra ni con las fases móvil y estacionaria, ni formar parte de la muestra original.
- Ser estable térmicamente y de volatilidad y estructura química similares a las de la sustancia de interés.
- Estar presente en la muestra en una concentración tal que su respuesta sea de tamaño similar al de la sustancia de interés (proporcionar una respuesta relativa cercana a la unidad).

2.4 VALIDACION

2.4.1 DEFINICION

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual se establece que el método cumple con los requisitos para cuyas aplicaciones se desarrolló (64).

2.4.2 PARAMETROS DE VALIDACION PARA I.O.V. (PRUEBA LIMITE)

Los parámetros recomendados por la U.S.P. XXII para validar métodos analíticos para pruebas límite son: selectividad, intervalo, límite de detección, tolerancia y exactitud. No obstante, es conveniente evaluar la precisión obtenida ya que en este caso se manejan sustancias volátiles. Estos parámetros de validación se definen como sigue (64):

Selectividad: Es la capacidad del sistema para proporcionar la respuesta de la sustancia de interés, inalterada por la presencia de otros componentes de la muestra (impurezas, productos de degradación, componentes del placebo). Usualmente se expresa como la diferencia entre los resultados de la muestra adicionada de estos componentes y los resultados de la muestra que no los contiene. Es una medida del grado de interferencia (o ausencia de ella) en el análisis de muestras complejas (64).

Se evalúa mediante el cálculo de la resolución entre cada par de señales adyacentes en el cromatograma de la muestra de referencia al 100 %, e identificando cada señal del cromatograma

por comparación de los tiempos de retención de cada I.O.V. y de la substancia de referencia interna. El valor de la resolución debe ser mayor o igual a 3 (64,66).

Resolución (Rs):

$$Rs = \frac{2 (tR2 - tR1)}{W1 + W2} \quad (\text{Ec. 9})$$

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación. Es una medida del grado de repetibilidad del método analítico. La repetibilidad es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, laboratorio, etc.). El coeficiente de variación global de las respuestas individuales no debe ser mayor del 15 % (37,64,66).

Media aritmética (\bar{x}): $\bar{x} = \Sigma x / n$ (Ec. 12)

Desviación estándar (S): $S = \frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$ (Ec. 13)

Coficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = (S \times 100) / \bar{x} \quad (\text{Ec. 14})$$

Intervalo: Está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la substancia de interés (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es lineal, preciso y exacto. Usualmente se expresa con las unidades obtenidas en el método analítico (por ciento, partes por millón) (64).

Se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de variación del factor respuesta de todo el intervalo estudiado (al menos tres réplicas de por lo menos tres niveles de concentración, inferiores y superiores al 100 % inclusive). También mediante el cálculo por el método de mínimos cuadrados, de los coeficientes de determinación y de correlación del gráfico partes por millón contra respuesta, así como un análisis de varianza de regresión lineal simple. El coeficiente de variación del factor respuesta no debe ser mayor del 15 % (37,64,66).

Factor respuesta (F):

$$F = \frac{\text{respuesta relativa}}{\text{ppm experimental}} \quad (\text{Ec. 15})$$

Media aritmética del factor respuesta (\bar{F}):

$$\bar{F} = \Sigma F / n \quad (\text{Ec. 16})$$

Desviación estándar del factor respuesta (SF):

$$SF = \frac{\Sigma (F_i - \bar{F})^2}{n - 1} \quad (\text{Ec. 17})$$

Coefficiente de variación del factor respuesta (C.V.F.):

$$\text{C.V.F.} = (\text{SF} \times 100) / \bar{F} \quad (\text{Ec. 18})$$

Coefficiente de determinación (r^2):

$$r^2 = \frac{b^2 (\sum x^2 - (\sum x)^2/n)}{(\sum y^2 - (\sum y)^2/n)} \quad (\text{Ec. 19})$$

Coefficiente de correlación (r):

$$r = \sqrt{r^2} \quad (\text{Ec. 20})$$

Pendiente (b):

$$b = \frac{n (\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2} \quad (\text{Ec. 21})$$

Ordenada al origen (a):

$$a = \frac{\sum y - b (\sum x)}{n} \quad (\text{Ec. 22})$$

Análisis de varianza de regresión lineal simple:

Suma de cuadrados de regresión (SCR):

$$\text{SCR} = b (\sum xy) + a (\sum y) - ((\sum y)^2 / n) \quad (\text{Ec. 23})$$

Suma de cuadrados residual (SCR):

$$\text{SCR} = \sum y^2 - b (\sum xy) - a (\sum y) \quad (\text{Ec. 24})$$

Suma de cuadrados total (SCT):

$$\text{SCT} = \text{SCR} + \text{SCR} \quad (\text{Ec. 25})$$

Grados de libertad de regresión (GLR):

$$\text{GLR} = \text{Número de variables} - 1 \quad (\text{Ec. 26})$$

Grados de libertad residual (GLr):

$$\text{GLr} = \text{Número de pares de datos} - 2 \quad (\text{Ec. 27})$$

Grados de libertad total (GLT):

$$\text{GLT} = \text{GLR} + \text{GLr} \quad (\text{Ec. 28})$$

Cuadrado medio de regresión (CMR):

$$\text{CMR} = \text{SCR} / \text{GLR} \quad (\text{Ec. 29})$$

Cuadrado medio residual (CMr):

$$\text{CMr} = \text{SCR} / \text{GLr} \quad (\text{Ec. 30})$$

Razón de varianza (RV):

$$\text{RV} = \text{CMR} / \text{CMr} \quad (\text{Ec. 31})$$

Límite de detección: Es la concentración mínima de una sustancia que puede ser medida y reportada con un 95 % de confianza ($\alpha = 0.05$) de que la concentración de esta sustancia es mayor que cero. Para aspectos cuantitativos, el límite de detección debe ser al menos cinco veces menor que el 100 % de la sustancia de interés. Usualmente se expresa en términos de concentración (por ciento, partes por billón, etc.) (2,49,64).

Una alternativa para calcular el límite de detección es mediante la ecuación 33. La conversión del límite de detección a las unidades de concentración del método (en este caso, partes por millón) se realiza calculando "x", y substituyendo en "y" el valor del LD, a partir de la ecuación de regresión (ecuación 34) (2,37).

Desviación estándar de los puntos observados X,Y (S y/x):

$$S_{y/x} = \frac{n-1}{n-2} (\text{Sy}^2 - b^2 \text{Sx}^2) \quad (\text{Ec. 32})$$

Límite de detección (LD):

$$LD = a + (t)(S x/y) \quad (\text{Ec. 33})$$

Ecuación de regresión (mínimos cuadrados):

$$y = bx + a \quad (\text{Ec. 34})$$

Tolerancia: Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos del análisis de una muestra homogénea del producto, y al aplicar modificaciones de las condiciones normales de operación a algunos parámetros críticos. En este caso se evaluará cantidad de sulfato de sodio, presión, temperatura y estabilidad de la muestra a 24 horas. La cantidad de sulfato de sodio en el vial, la presión de presurización del vial y la temperatura del baño del automuestreador de la fase vapor son variables que afectan la sensibilidad del análisis. La estabilidad de la muestra es una característica particularmente importante para muestras constituidas por componentes volátiles; ya que rápidamente pueden cambiar las concentraciones sin proporción, debido a que generalmente existe una diferencia de volatilidad entre ellos (47,64).

Se evalúa mediante el coeficiente de variación global de las respuestas individuales, el cual no debe ser mayor al 15 % (64,66).

Exactitud al 100 %: Es la concordancia entre el valor obtenido al aplicar el método analítico a la muestra y el valor verdadero. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado el 100 % de la substancia de interés (placebos adicionados) (56,64).

Se evalúa mediante el cálculo de la media aritmética y el coeficiente de variación de los porcentos de recobro de al menos tres muestras placebo adicionado de solución de referencia al 100 %. Deberá realizarse por el mismo analista y bajo las mismas condiciones. El coeficiente de variación de las respuestas individuales no debe ser mayor del 15 % (56,66).

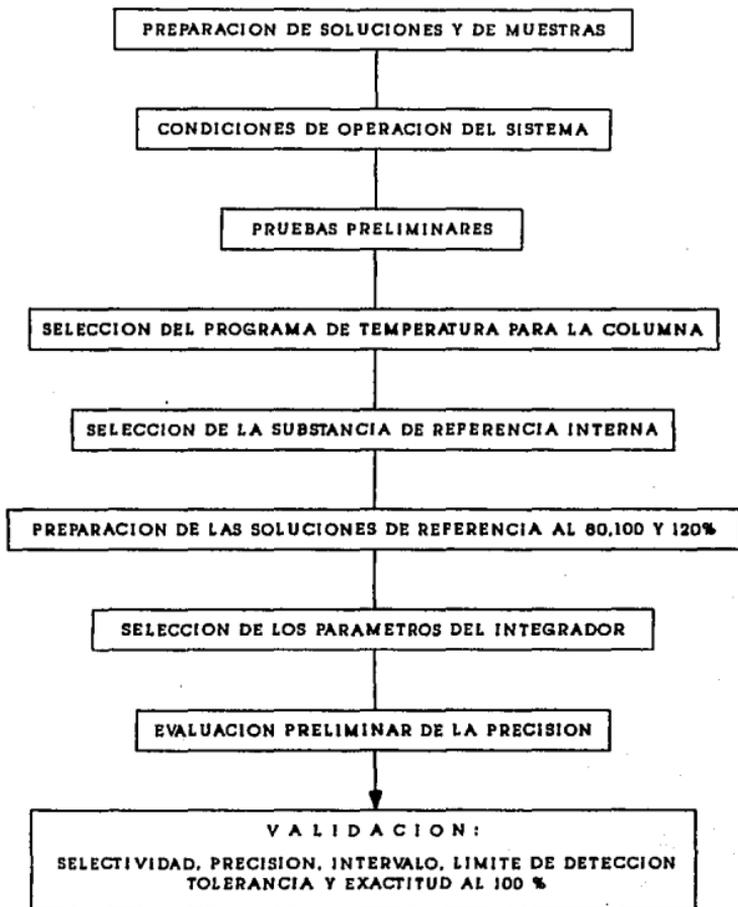
Porcentaje de recobro (% recobro):

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100 \quad (\text{Ec. 35})$$

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL

Pipetas graduadas (5 y 10 ml)

Pipetas volumétricas (1 y 5 ml)

Pipetas automáticas Eppendorf

Pipetas Pasteur

Propipetas

Matraces volumétricos (50, 100, 200 y 500 ml)

Matraces erlenmeyer (500 y 1000 ml)

Probetas de vidrio (25, 100 y 500 ml)

Vasos de precipitados (25, 50, 100, 250 y 1000 ml)

Tubos de ensaye (13 X 100 mm)

Tubos capilares

Viales para análisis de la fase de vapor incoloros (10 ml)

Septas de silicón con una cubierta de teflón (20 mm diámetro)

Casquillos de aluminio (20 mm diámetro)

Microjeringas (10 µl)

Jeringas con sello de teflón y válvula de paso (0.5, 1.0 y
2.0 ml)

Engargolador de viales de 20 mm de diámetro

Desengargolador de viales de 20 mm de diámetro

Gradilla para tubos de ensaye

Espátulas de diferentes tamaños

Burbujómetro

3.2.2 REACTIVOS

Sulfato de sodio. Grado reactivo. Merck.
Acido clorhídrico. Grado analítico. Baker.
Agua. Grado CLAR (≥ 14 Mohm).
Benceno. Grado CLAR. Aldrich.
Ciclohexano. Grado alta pureza. Baxter B & J.
Cloroformo. Grado CG-capilar/CG-EM. Baxter B & J.
1,4-Dioxano. Grado alta pureza. Baxter B & J.
n-Heptano. Grado analítico. Merck.
Isobutanol. Grado analítico. Baker.
Cloruro de metileno. Grado alta pureza. Baxter B & J.
Alcohol metílico. Grado ChromAR CLAR. Mallinckrodt.
n-Propanol. Grado alta pureza. Baxter B & J.
Tetrahidrofurano. Grado LiChrosorb. Merck.
Tolueno. Grado analítico. Merck.
Xileno. Grado analítico. Baker.
Metildopa, sesquihidrato, materia prima. Grado U.S.P.
Proveedor Sochimia. Lote único. Libre de cualquier residuo
de disolvente orgánico volátil.

3.2.3 EQUIPO

Agitador mecánico Vortex.
Aparato para punto de fusión en capilar Thomas Hoover Serie
70-480 con intervalo de temperatura de -10 a 360°C .
Automuestreador de la fase vapor Hewlett-Packard 19395A,
equipado con un rizo de 1 ml.

Balanza analítica Mettler AE-260, con sensibilidad de 0.1 mg.

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Serie II, de temperatura programable. Equipado con un detector de ionización de llama, inyector con divisor de flujo e inserto de borosilicato. Columna DB-624 "J & W Scientific" de sílice fundida de 30 m de longitud, 0.32 mm de d.i., 1.8 µm de espesor de fase del polímero de cianopropilfenil dimetilpolisiloxano, con intervalo de temperatura de -20 a 260°C. Helio como gas portador.

Integrador Hewlett-Packard 3396A.

Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

Refrigerador Ojeda RV2P-30 con intervalo de temperatura de 2 a 8°C.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 SOLUCIONES Y MUESTRAS

3.3.1.1 AGUA LIBRE DE RESIDUOS VOLATILES

Hervir la cantidad necesaria de agua CLAR en un matraz erlenmeyer durante 20 min y dejar enfriar a T.A. Preparar un día antes de su uso. Toda el agua que se utilice en este trabajo será de esta calidad, por lo que en lo subsecuente se referirá a ella como agua simplemente.

3.3.1.2 SOLUCIONES DE ACIDO CLORHIDRICO

De acuerdo a la Tabla 9, transferir el volumen aproximado de ácido clorhídrico concentrado a un matraz volumétrico de 50 ml que contenga 20 ml de agua. Diluir, llevar a volumen y mezclar.

Tabla 9. Soluciones molares de ácido clorhídrico

Solución de HCl (concentración aproximada)	Mililitros de HCl concentrado (volumen aproximado)
0.1 M	0.42
0.5 M	2.12
1.0 M	4.24
1.5 M	6.36

3.3.1.3 SOLUCION DE REFERENCIA AL 80 %

La preparación de esta solución se indicará una vez establecida en la sección 3.3.3.4.

3.3.1.4 SOLUCION DE REFERENCIA AL 100 %

La preparación de esta solución se indicará una vez establecida en la sección 3.3.3.4.

3.3.1.5 SOLUCION DE REFERENCIA AL 120 %

La preparación de esta solución se indicará una vez establecida en la sección 3.3.3.4.

3.3.1.6 MUESTRA DE IMPUREZAS ORGANICAS VOLATILES (MUESTRA IOV)

- a. Transferir 5 ml de metanol a un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 5 μ l de cada uno de los siguientes disolventes: benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno.
- c. Sellar perfectamente y mezclar suavemente.

3.3.1.7 MUESTRA DE IMPUREZAS ORGANICAS VOLATILES Y REFERENCIA INTERNA (MUESTRA IOV-RI)

- a. Transferir 5 ml de metanol a un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 5 μ l de cada uno de los siguientes disolventes: benceno, cloroformo, 1,4-dioxano, cloruro de metileno y el disolvente elegido como sustancia de referencia interna.
- c. Sellar perfectamente y mezclar suavemente.

3.3.1.8 MUESTRA PROBLEMA

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar los mg de metildopa establecidos en 3.3.3.1 (pag. 60).
- c. Adicionar 5 ml del medio de disolución elegido en 3.3.3.1 (pp. 59-60).
- d. Sellar perfectamente y mezclar suavemente.

3.3.1.9 MUESTRA DE REFERENCIA AL 80 %

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 5 ml de la solución de referencia al 80 %.
- c. Sellar de inmediato perfectamente y homogeneizar suavemente.

3.3.1.10 MUESTRA DE REFERENCIA AL 100 %

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 5 ml de la solución de referencia al 100 %.
- c. Sellar de inmediato perfectamente y homogeneizar suavemente.

3.3.1.11 MUESTRA DE REFERENCIA AL 120 %

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 5 ml de la solución de referencia al 120 %.
- c. Sellar de inmediato perfectamente y homogeneizar suavemente.

3.3.1.12 MUESTRA PLACEBO ADICIONADO DE SOLUCION DE REFERENCIA AL 100 %

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar los mg de metildopa establecidos en 3.3.3.1 (pag. 60).
- c. Adicionar 5 ml de la solución de referencia al 100 %.
- c. Sellar de inmediato perfectamente y homogeneizar suavemente.

3.3.2 CONDICIONES DE OPERACION DEL SISTEMA

El sistema consta del automuestreador de la fase vapor, del cromatógrafo de gases y del integrador. Las condiciones de trabajo del automuestreador se establecieron en un trabajo previo.

AUTOMUESTREADOR DE LA FASE VAPOR

- Temperatura del baño: 85°C
- Tiempo de equilibración: 45 min

- Temperatura de la válvula y del rizo: 90°C
- Programa de inyección:
 - Tiempo de presurización: 7 seg
 - Tiempo de llenado del rizo: 5 seg
 - Tiempo de transferencia de la muestra: 30 seg
 - Tiempo de purga del rizo y la aguja: 5 min
- Flujo del gas portador: 15 ml/min
- Presión de aire (para el sistema neumático): 3.5 bar
- Presión del gas de presurización (helio): 1.2 bar
- Número de inyecciones por vial: 1

CROMATOGRAFO DE GASES

- Presión a la cabeza de la columna: *
- Flujo a la salida de la columna: *
- Temperatura del detector: *
- Temperatura del puerto de inyección: *
- Flujo de gas auxiliar: 20 ml/min
- Flujo de hidrógeno: 35 ml/min
- Flujo de aire: 350 ml/min
- Flujo de la purga del septa: 2.5 ml/min
- Flujo total de gas portador: *
- Programa de temperatura de la columna: *
- Tiempo de equilibrio de la temperatura del horno: 0.5 min

* Condición que se determinará durante el desarrollo del procedimiento (3.3.3).

INTEGRADOR

La atenuación, velocidad de carta, ancho de la señal, nivel de ruido y área de rechazo, se determinarán en la sección 3.3.3.5.

3.3.3 PROCEDIMIENTO

3.3.3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Para que las I.O.V. se liberen de la estructura cristalina de la metildopa y pasen a formar parte de la fase líquida (medio de disolución), es necesario que la metildopa se disuelva. Dado que la molécula de metildopa es estable en solución neutra y ácida, sólo se probarán estos medios de disolución (ácido y neutro).

Una vez elegido el medio de disolución, se determinará la cantidad máxima de metildopa que es soluble bajo las condiciones en las que va a estar en la muestra problema (temperatura del baño del automuestreador).

SELECCION DEL MEDIO DE DISOLUCION DE LA METILDOPA

- a. Preparar los tubos de ensaye como se indica en la Tabla 10. Agitar y observar.
- b. Determinar cuál de los dos medios de disolución disuelve completamente a la metildopa.

Tabla 10. Solubilidad de metildopa en soluciones molares de ácido clorhídrico.

Tubo	Concentración aproximada de HCl (M) (5 ml)	Agua (ml)	Metildopa (mg)
1	0.1	0	200
2	0.5	0	200
3	1.0	0	200
4	1.5	0	200
5	-	5	200

DETERMINACION DE LA CANTIDAD MAXIMA DE METILDOPA QUE SE PUEDE ANALIZAR

- a. Preparar los viales como se indica en la Tabla 11.
- b. Sellarlos perfectamente, agitarlos suavemente y mantenerlos a temperatura constante de 85°C durante 45 min y observar.

Tabla 11. Solubilidad de metildopa en una solución molar de ácido clorhídrico en presencia de sulfato de sodio.

Vial	Sulfato de sodio (g)	Metildopa (mg)	Medio de Disolución (ml)
1	2.5	100	5
2	2.5	150	5
3	2.5	175	5
4	2.5	200	5
5	2.5	500	5
6	2.5	0	5

- c. Establecer como cantidad máxima de metildopa que se puede analizar a la cantidad (mg) más grande que esté completamente solubilizada.

DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO DE LA METILDOPA CON RESPECTO A LA TEMPERATURA

- a. Colocar una pequeña muestra de metildopa en un tubo capilar especial para determinar punto de fusión.
- b. Insertar el tubo capilar con metildopa y comenzar a elevar la temperatura aproximadamente 5°C/min.
- c. Observar cuidadosamente el comportamiento de la metildopa y determinar cuál es la temperatura a la que se empieza a descomponer.

3.3.3.2 SELECCION DEL PROGRAMA DE TEMPERATURA PARA LA COLUMNA

Según lo especificado por la U.S.P. XXII, se requiere que la resolución entre dos señales adyacentes sea mayor o igual a 3.0 (66). Si las señales cromatográficas no presentan tal resolución, ajustar las condiciones de trabajo (temperatura inicial, tiempo inicial, velocidad de calentamiento, temperatura final y velocidad lineal).

- a. Acondicionar el sistema durante 20 min a la temperatura máxima de trabajo de la columna.
- b. Preparar una muestra IOV (3.3.1.6, pag. 56).
- c. Inyectar la fase vapor (1 µl) de la muestra IOV recién preparada.

d. Ajustar las condiciones del sistema cromatográfico tal que se cumpla el criterio de resolución establecido por la U.S.P. XXII (Ecuación 9, pag. 27).

e. Identificar cada componente de la muestra IOV de acuerdo a los tiempos de retención (por inyección de la fase vapor de cada disolvente por separado).

3.3.3.3 SELECCION DE LA SUBSTANCIA DE REFERENCIA INTERNA

a. Elegir todos aquellos disolventes que cumplan con la mayoría de los requisitos para funcionar como sustancias de referencia interna (mismos que se describieron en 2.3.3.4, pag. 42) y que se tengan disponibles).

b. Acondicionar el sistema durante 20 min a la temperatura máxima de trabajo de la columna. Utilizar el programa de temperatura elegido en 3.3.3.2.

c. Inyectar por separado la fase vapor (1 μ l) de cada uno de los disolventes elegidos como sustancias de referencia interna.

d. Observar sus tiempos de retención e impurezas, y seleccionar el que se comporte de la forma más adecuada.

e. Preparar e inyectar la fase vapor de una muestra IOV-RI (3.3.1.7, pag. 56). Calcular nuevamente la resolución (ecuación 9, pag. 27), si se cumple el criterio ya establecido, las condiciones del sistema quedarán tal cual, si no se cumple, volver a ajustar los parámetros de trabajo hasta que se cumpla el criterio.

f. Comparar el tamaño de la señal de la sustancia de referencia interna con el de las señales de las I.O.V. Ajustar de una manera aproximada la concentración de la sustancia de referencia interna.

3.3.3.4 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE REFERENCIA

En la validación del método analítico para la determinación de I.O.V. en metildopa, se requiere de una solución de referencia al 100 % para todos los ensayos, y de soluciones de referencia al 80 y 120 % para el ensayo de intervalo. El benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno deberán estar contenidos en las soluciones de referencia al 80, 100 y 120 %, a una concentración tal que en 5 ml de cada una de ellas, se encuentre el equivalente al 80, 100 y 120 % del límite U.S.P. de cada disolvente. Estos equivalentes se calcularán en base a la cantidad de metildopa que se puede analizar (determinada en 3.3.3.1, pag. 60) y considerando que el límite U.S.P. de cada I.O.V. corresponde al 100 %. Los límites U.S.P. para las I.O.V. expresados en ppm aparecen en la Tabla 3 (pag. 14). Las soluciones de referencia también deberán contener a la sustancia de referencia interna a la concentración ajustada en 3.3.3.3.

a. Proponer por medio de diluciones seriadas (utilizando metanol en la primera y medio de disolución en las restantes), la preparación de las soluciones de referencia al 80, 100 y 120 %; de manera que las impurezas orgánicas volátiles estén contenidas en las

soluciones de referencia a las concentraciones que resulten de aplicar la ecuación 36 para cada I.O.V. y para cada solución de referencia. Asegurar la completa disolución de cada disolvente en cada dilución conforme a los datos bibliográficos de solubilidad de las I.O.V. y de la sustancia de referencia interna.

$$I.O.V. = \frac{(MDP) (ppm)}{5 \times 10^6} \quad (\text{Ec. 36})$$

donde:

I.O.V. = concentración de las impurezas orgánicas volátiles en las soluciones de referencia expresada en mg/ml.

MDP = cantidad de metildopa que puede ser analizada expresada en mg (determinada en 3.3.3.1, pag. 60).

ppm = partes por millón de cada I.O.V. conforme a la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración (ppm) de I.O.V. en cinco mililitros de las soluciones de referencia.

Impureza Orgánica Volátil	Partes por millón para preparar la solución de referencia al		
	80 %	100 %	120 %
Benceno	80	100	120
Cloroformo	40	50	60
1,4-Dioxano	80	100	120
Cloruro de metileno	80	100	120

3.3.3.5 SELECCION DE LOS PARAMETROS DEL INTEGRADOR

- Atenuación: elegir una atenuación tal que se registren todas las señales de los componentes de la muestra de referencia al 100 %, sin que abarquen toda la carta.

- Velocidad de carta: elegir la velocidad de carta con la cual todas las señales se puedan distinguir con claridad.
- Ancho de la señal: elegir aquel valor que cubra el ancho de todas las señales.
- Nivel de ruido: con el sistema acondicionado, programar el integrador para que evalúe el nivel de ruido de forma automática.
- Área de rechazo: elegir el área de la señal de interés más pequeña, calcular un 10 % menos en el área y asumirla como área de rechazo.

3.3.3.6 EVALUACION PRELIMINAR DE LA PRECISION

Según lo especificado por la U.S.P. XXII, se requiere que el coeficiente de variación de las respuestas individuales sea menor al 15 % (66).

- a. Acondicionar el sistema durante 20 min de la forma indicada anteriormente. Utilizar el programa de temperatura establecido en 3.3.3.3 y los parámetros del integrador elegidos en 3.3.3.5.
- b. Preparar cinco muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57).
- c. Inyectar las muestras de referencia al 100 %.
- d. Calcular el C.V. (ecuación 14, pag. 44) de las respuestas de las I.O.V. y de la sustancia de referencia interna.

3.4 VALIDACION

3.4.1 SELECTIVIDAD

- a. Preparar dos muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57).
- b. Inyectar las muestras de referencia al 100 %.

3.4.2 PRECISION (REPETIBILIDAD)

- a. Preparar quince muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57) a partir de tres soluciones de referencia al 100 %, preparadas de forma independiente el mismo día y por el mismo analista (cinco muestras de cada solución de referencia al 100 %).
- b. Inyectar las muestras de referencia al 100 %.

3.4.3 INTERVALO Y LIMITE DE DETECCION

- a. Preparar al menos tres muestras de referencia al 80 %, al menos tres muestras de referencia al 100 % y al menos tres muestras de referencia al 120 % (3.3.1.9, 3.3.1.10, 3.3.1.11, pp. 56-57).
- b. Inyectar las muestras de referencia al 80, 100 y 120 %.

3.4.4 TOLERANCIA

3.4.4.1 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

- a. Preparar al menos seis muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57).
- b. Inyectar la mitad de las muestras de referencia al 100 % al tiempo cero o inicial (t_0). Inyectar el resto de las muestras a

las 24 horas (t_{24}), cuyas condiciones de almacenamiento son temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación natural.

3.4.4.2 CANTIDAD DE SULFATO DE SODIO

- a. Preparar al menos seis muestras de referencia al 100 %, la mitad de ellas deberán contener 2.49 g de sulfato de sodio y el resto 2.51 g de sulfato de sodio (3.3.1.10, pag. 57).
- b. Inyectar las muestras de referencia al 100 %.

3.4.4.3 PRESION DEL AUTOMUESTREADOR DE LA FASE VAPOR

- a. Preparar al menos seis muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57).
- b. Inyectar la mitad de las muestras de referencia al 100 % operando el automuestreador a 1.0 bar, e inyectar el resto de las muestras de referencia al 100 % a 1.4 bar.

3.4.4.4 TEMPERATURA DEL BANO DEL AUTOMUESTREADOR DE LA FASE VAPOR

- a. Preparar al menos seis muestras de referencia al 100 % (3.3.1.10, pag. 57).
- b. Inyectar la mitad de las muestras de referencia al 100 %, operando el baño del automuestreador a 84°C , e inyectar el resto de las muestras de referencia al 100 % a 86°C .

3.4.5 EXACTITUD AL 100 %

- a. Preparar tres muestras placebo adicionado de solución de referencia al 100 % (3.3.1.12, pag. 57).
- b. Inyectar las muestras placebo adicionado de solución de referencia al 100 %.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

4.1.1 METODOLOGIA

La solubilidad de la metildopa en los medios acuosos de disolución ácido y neutro fue comparable. La metildopa a una concentración de 40 mg/ml (a 85°C) es perfectamente soluble en una solución de ácido clorhídrico 0.5 M en presencia de 2.5 g de sulfato de sodio. Por lo tanto el medio de disolución apropiado para disolver 150 mg de metildopa es la solución de HCl 0.5 M (concentración que debe quedar en el vial, es decir, en una muestra de referencia). Así pues, la preparación de la muestra problema es la siguiente:

Muestra problema

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 150 ± 1 mg de metildopa.
- c. Adicionar 5 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.5 M.
- d. Sellar perfectamente y mezclar suavemente.

En el análisis del comportamiento de la metildopa con respecto a la temperatura se encontró que ésta se descompone a los 275°C.

Entre el tetrahidrofurano, xileno, tolueno, ciclohexano, isobutanol, n-heptano y n-propanol se seleccionó al n-propanol como

substancia de referencia interna para el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases e integrador establecidas durante el desarrollo del procedimiento fueron:

Cromatógrafo de gases:

- Presión a la cabeza de la columna: 7.5 psi
- Flujo a la salida de la columna: 1.80 ml/min.
- Temperatura del detector: 260°C
- Temperatura del puerto de inyección: 180°C
- Flujo total de gas portador: 35 ml/min (15 ml provienen del automuestreador de la fase vapor).
- Programa de temperatura de la columna:
50°C (1.5 min) - 20°C/min - 200°C (0.1 min).

Integrador:

- Atenuación: 2^0 (tR=0 a tR=5.9) 2^{-1} (tR=6 a tR=9.1)
- Velocidad de carta: 0.7 cm/min
- Ancho de la señal: 0.04 min
- Nivel de ruido: 2
- Area de rechazo: 1000 unidades

Los tiempos de retención de cada disolvente, correspondientes al programa de temperatura establecido se presentan en la Tabla 13:

Tabla 13. Tiempos de retención de I.O.V., substancia de referencia interna y disolvente con el programa de temperatura: 50°C (1.5 min) - 20°C/min - 200°C (0.1 min).

Disolvente	tR (min)
Metanol	2.8
Cloruro de metileno	4.0
n-propanol	4.5
Cloroformo	5.1
Benceno	5.6
1,4-Dioxano	6.3

Dentro de la revisión de los factores que afectan la exactitud del método analítico, se propuso la preparación de las soluciones de referencia al 80, 100 y 120 % y de las muestras de referencia al 80, 100 y 120 % como sigue:

Soluciones de referencia

1. Solución de I.O.V.

1.1 Solución de cloroformo

Diluir 1.0 g (aproximadamente 0.66 ml) de cloroformo con mezcla metanol/agua (9:1) y llevar a volumen de 100 ml.

1.2 Solución de benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno.

Diluir una alícuota de 10 ml de la solución de cloroformo, 0.2 g (aproximadamente 0.22 ml) de benceno, 0.2 g (aproximadamente 0.20 ml) de 1,4-dioxano y 0.2 g (aproximadamente 0.15 ml) de cloruro de metileno con mezcla metanol/agua (9:1) y llevar a volumen de 100 ml. Diluir una alícuota de 5 ml de la solución anterior con agua y llevar a volumen de 100 ml.

2. Solución de sustancia de referencia interna

Diluir 0.4 g (aproximadamente 0.5 ml) de n-propanol con mezcla metanol/agua (9:1) y llevar a volumen de 100 ml. Diluir una alícuota de 5 ml de la solución anterior con agua y llevar a volumen de 100 ml.

3. Solución de referencia al 80 %

Diluir una alícuota de 4 ml de la solución de I.O.V. y una alícuota de 5 ml de la solución de sustancia de referencia interna con agua y llevar a volumen de 100 ml.

4. Solución de referencia al 100 %

Diluir una alícuota de 5 ml de la solución de I.O.V. y una alícuota de 5 ml de la solución de sustancia de referencia interna con agua y llevar a volumen de 100 ml.

5. Solución de referencia al 120 %

Diluir una alícuota de 6 ml de la solución de I.O.V. y una alícuota de 5 ml de la solución de sustancia de referencia interna con agua y llevar a volumen de 100 ml.

Muestras de referencia

1. Muestra de referencia al 80 %

- a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.
- b. Adicionar 2 ml de una solución de HCl 1.25 M. Mezclar vigorosamente y refrigerar (5°C) durante 60 min.
- c. Adicionar 3 ml de la solución de referencia al 80 %.

d. Sellar de inmediato y perfectamente. Mezclar suavemente.

2. Muestra de referencia al 100 %

a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.

b. Adicionar 2 ml de una solución de HCl 1.25 M. Mezclar vigorosamente y refrigerar (5°C) durante 60 min.

c. Adicionar 3 ml de la solución de referencia al 100 %.

d. Sellar de inmediato y perfectamente. Mezclar suavemente.

3. Muestra de referencia al 120 %

a. Pesar 2.5 g de sulfato de sodio en un vial de 10 ml.

b. Adicionar 2 ml de una solución de HCl 1.25 M. Mezclar vigorosamente y refrigerar (5°C) durante 60 min.

c. Adicionar 3 ml de la solución de referencia al 120 %.

d. Sellar de inmediato y perfectamente. Mezclar suavemente.

Las partes por millón nominales del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano, cloruro de metileno y n-propanol en las muestras de referencia al 80, 100 y 120 % son (Tabla 14):

Tabla 14. Partes por millón nominales de I.O.V. y substancia de referencia interna en las muestras de referencia.

Disolvente	Muestra de referencia al		
	80 %	100%	120%
Benceno	80	100	120
Cloroformo	40	50	60
1,4-Dioxano	80	100	120
Cloruro de metileno	80	100	120
n-Propanol	160	200	240

4.1.2 VALIDACION

4.1.2.1 SELECTIVIDAD

En la Figura 5 aparece el cromatograma del análisis de la fase vapor de una muestra de referencia al 100 %, y en la Tabla 15 el valor de resolución obtenido entre cada par de señales adyacentes.

Figura 5. Análisis de la fase vapor de una muestra de referencia al 100 %.

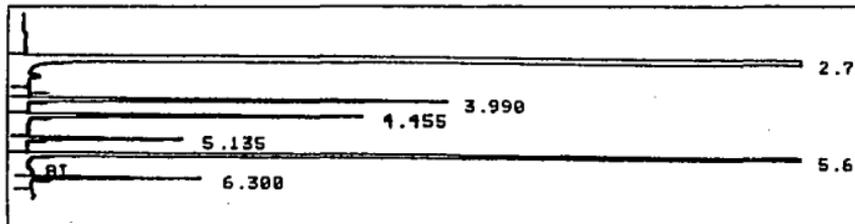


Tabla 15. Resolución entre cada par de señales adyacentes en una muestra de referencia al 100 %.

Par de señales	Tiempo de retención (min)	Resolución
Cloruro de metileno - n-Propanol	4.0 - 4.5	3.63
n-Propanol - Cloroformo	4.5 - 5.1	6.67
Cloroformo - Benceno	5.1 - 5.6	5.17
Benceno - 1,4-Dioxano	5.6 - 6.3	8.30

4.1.2.2 PRECISION (REPETIBILIDAD)

Tabla 16. Precisión (repetibilidad) del sistema (respuestas relativas al n-propanol).

Impureza Orgánica Volátil	Parámetro Estadístico	Solución de referencia al 100 %		
		1	2	3
Benceno	n	5	5	5
	\bar{X}	11.8847	11.7226	11.1945
	C.V. %	3.95	3.71	4.71
	C.V.G. %	3.11		
Cloroformo	n	5	5	5
	\bar{X}	0.4296	0.4305	0.4034
	C.V. %	3.26	2.28	4.04
	C.V.G. %	3.65		
1,4-Dioxano	n	5	5	5
	\bar{X}	0.1843	0.1829	0.1820
	C.V. %	1.47	1.15	2.53
	C.V.G. %	0.63		
Cloruro Metileno	n	5	5	5
	\bar{X}	1.5445	1.5236	1.4616
	C.V. %	2.91	2.10	3.50
	C.V.G. %	2.86		

n Número de datos
 \bar{X} Media aritmética de respuestas relativas al n-propanol
C.V. % Coeficiente de variación
C.V.G. % Coeficiente de variación global de las tres soluciones de referencia al 100 %.

4.1.2.3 INTERVALO Y LIMITE DE DETECCION

Tabla 17. Intervalo del sistema (niveles nominales de 80, 100 y 120 ppm para el benceno, 1,4-dioxano y cloruro de metileno; y de 40, 50 y 60 ppm para el cloroformo).

Benceno		Cloroformo	
Nivel experimental (ppm)	Respuesta relativa	Nivel experimental (ppm)	Respuesta relativa
78.88	9.2625	39.89	0.3356
	9.4074		0.3388
	9.4108		0.3399
	9.4246		0.3370
	8.7826		0.3160
	9.5601		0.3410
98.60	11.2253	49.87	0.4073
	12.0640		0.4336
	11.0261		0.3956
	11.0136		0.4007
118.32	14.3730	59.84	0.5179
	14.1347		0.5091
	13.1315		0.4805
1,4-Dioxano		Cloruro de metileno	
Nivel experimental (ppm)	Respuesta relativa	Nivel experimental (ppm)	Respuesta relativa
85.72	0.1448	81.52	1.2472
	0.1391		1.2468
	0.1342		1.2602
	0.1480		1.2256
	0.1433		1.1536
	0.1432		1.2210
107.15	0.1732	101.90	1.4904
	0.1876		1.5698
	0.1742		1.4390
	0.1707		1.4857
128.58	0.2141	122.28	1.8800
	0.2146		1.8588
	0.2112		1.7774

Tabla 18. Datos estadísticos del intervalo y límite de detección del sistema (niveles nominales de 80, 100 y 120 ppm para el benceno, 1,4-dioxano y cloruro de metileno; y de 40, 50 y 60 ppm para el cloroformo).

Parámetro estadístico y Límite de detección	Impureza orgánica volátil			
	Benceno	Cloroformo	1,4-Dioxano	Cloruro metileno
n	13	13	13	13
\bar{F}	0.1169	0.0083	0.0017	0.0149
C.V.F. %	3.70	3.47	3.91	3.20
a	0.2227	0.0011	-0.000017	0.0077
b	0.1144	0.0083	0.00165	0.0148
r	0.9753	0.9805	0.9859	0.9837
r ²	0.9512	0.9614	0.9721	0.9676
Límite de detección (ppm) *	9	4	7	8

n Número de pares de datos o puntos observados (X,Y)

\bar{F} Media aritmética del factor respuesta

C.V.F. % Coeficiente de variación del factor respuesta

a Ordenada al origen

b Pendiente

r Coeficiente de correlación

r² Coeficiente de determinación

* LD = a + ((t)(S_x/y)); $\alpha = 0.05$

Tabla 19. Análisis de varianza de regresión lineal simple del benceno en el ensayo de intervalo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianza
Regresión	42.3219	1	42.3219	215.60
Residual	2.1590	11	0.1963	
Total	44.4809	12		

F (0.95,1,11) = 4.84

H₀: X y Y no están relacionadas linealmente

H_a: X y Y están relacionadas linealmente

Tabla 20. Análisis de varianza de regresión lineal simple del cloroformo en el ensayo de intervalo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianza
Regresión	0.0569	1	0.0569	261.01
Residual	0.0024	11	2.18×10^{-4}	
Total	0.0593	12		

$F(0.95, 1, 11) = 4.84$

H₀: X y Y no están relacionadas linealmente

H_a: X y Y están relacionadas linealmente

Tabla 21. Análisis de varianza de regresión lineal simple del 1,4-dioxano en el ensayo de intervalo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianza
Regresión	0.0105	1	0.0105	580.11
Residual	0.0002	11	1.81×10^{-5}	
Total	0.0107	12		

$F(0.95, 1, 11) = 4.84$

H₀: X y Y no están relacionadas linealmente

H_a: X y Y están relacionadas linealmente

Tabla 22. Análisis de varianza de regresión lineal simple del cloruro de metileno en el ensayo de intervalo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de varianza
Regresión	0.7558	1	0.7558	279.93
Residual	0.0298	11	0.0027	
Total	0.7856	12		

$F(0.95, 1, 11) = 4.84$

H₀: X y Y no están relacionadas linealmente

H_a: X y Y están relacionadas linealmente

Las Figuras 6, 7, 8 y 9 (pp. 81-84) corresponden a la representación gráfica del intervalo para el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno respectivamente.

Figura 6. Intervalo del Benceno.

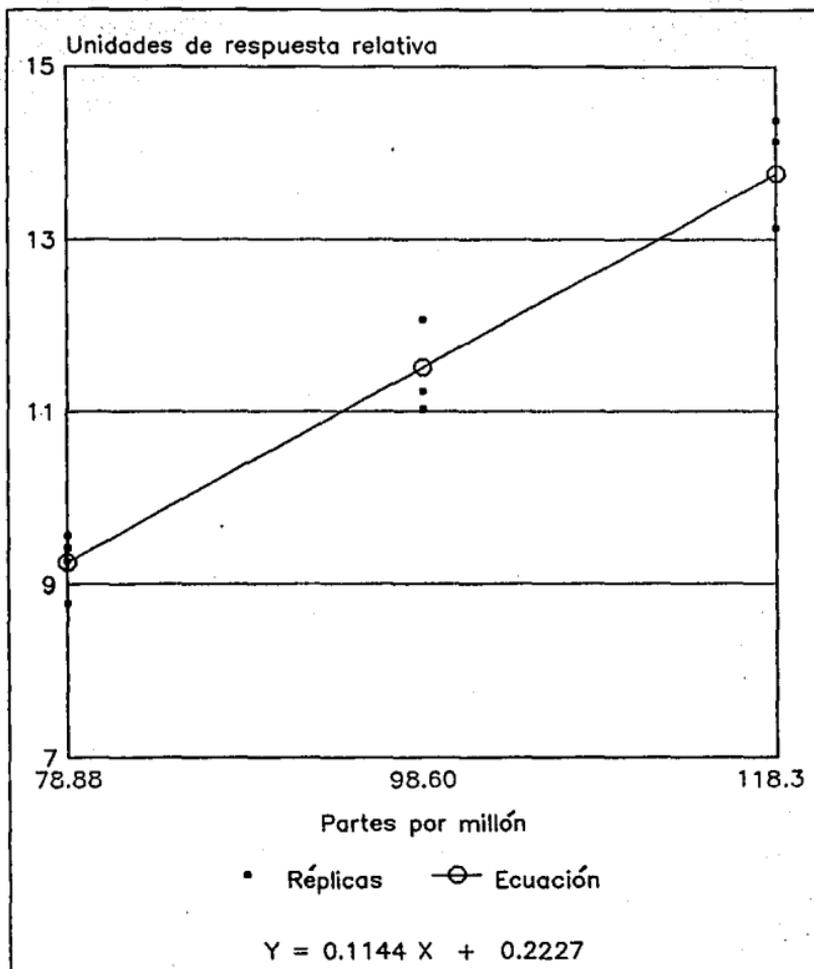


Figura 7. Intervalo del Cloroformo.

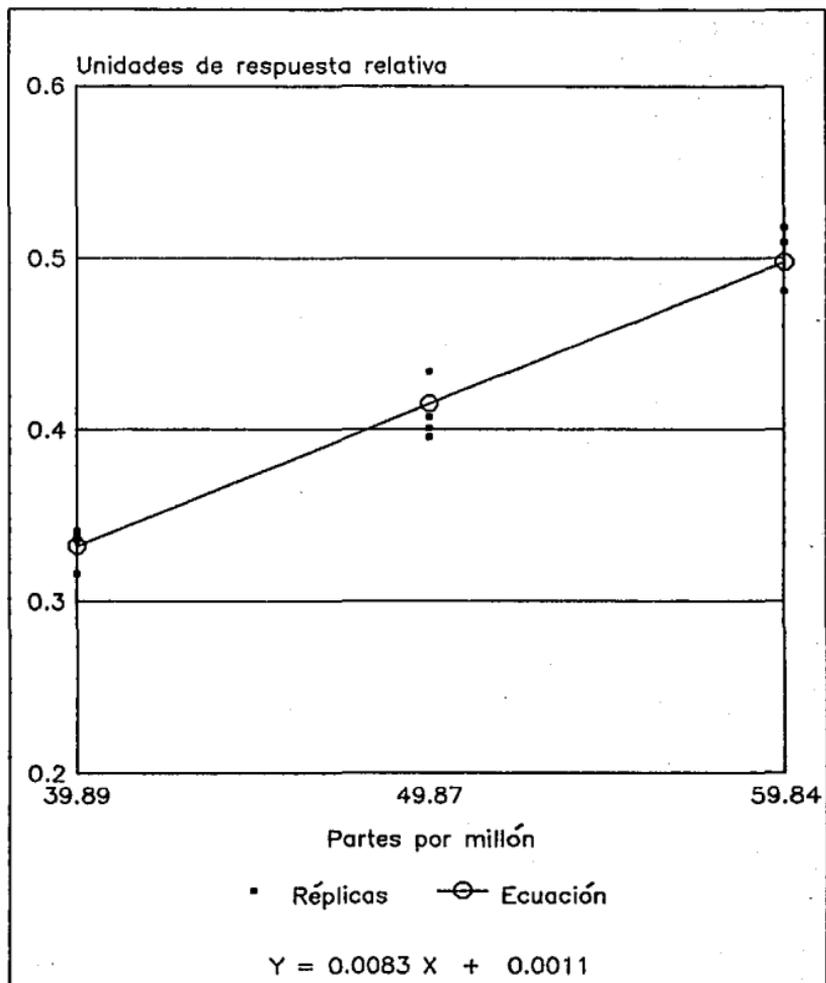


Figura 8. Intervalo del 1,4-Dioxano.

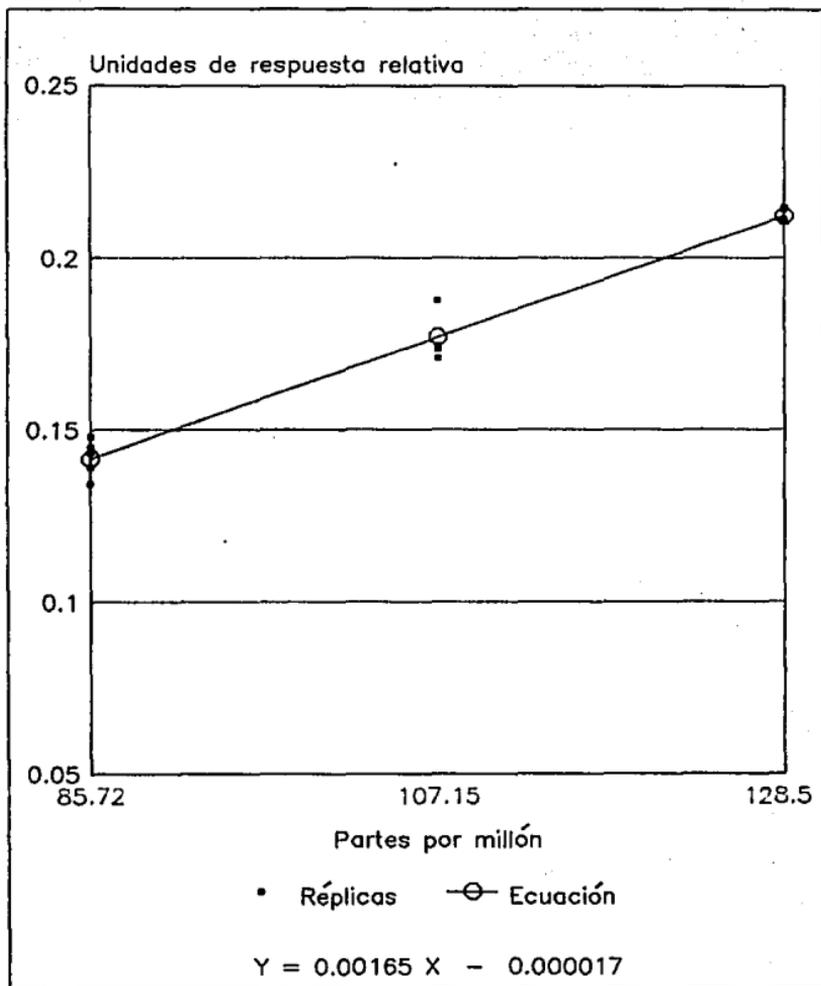
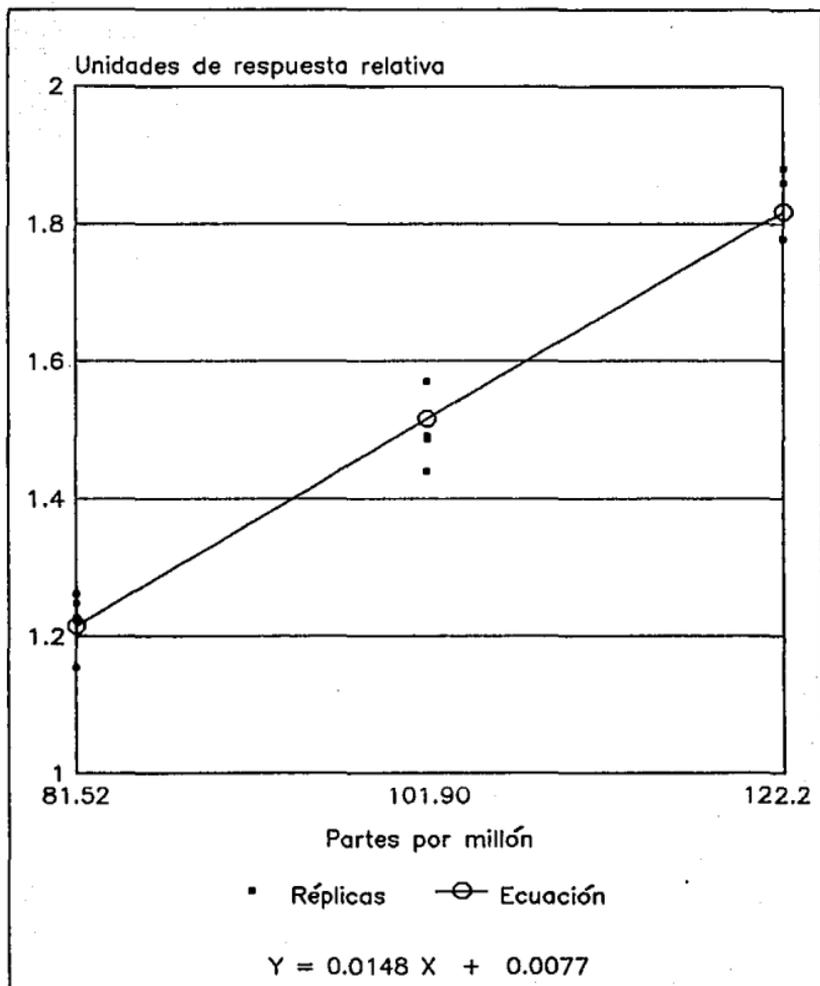


Figura 9. Intervalo del Cloruro de metileno.



4.1.2.4 TOLERANCIA

Tabla 23. Tolerancia del sistema (respuestas relativas al n-propanol).

Condición		Parámetro estadístico	Impureza Orgánica Volátil			
			Benceno	Cloroformo	1,4-Dioxano	Cloruro Metileno
Estabilidad de la muestra (horas)	0	n \bar{x} C.V. %	4 11.3322 4.38	4 0.4093 4.12	4 0.1764 4.29	4 1.4962 3.62
	24	n \bar{x} C.V. %	3 11.4224 1.04	3 0.4116 0.59	3 0.1774 0.86	3 1.4394 1.56
	C.V.G. %		0.56	0.40	0.40	2.74
Cantidad de sulfato de sodio (gramos)	2.49	n \bar{x} C.V. %	4 9.6956 6.96	4 0.3856 6.01	4 0.1739 4.08	4 1.4437 4.47
	2.51	n \bar{x} C.V. %	4 9.9579 5.04	4 0.3954 6.55	4 0.1770 1.02	4 1.4614 5.12
	C.V.G. %		1.89	1.77	1.25	0.86
Presión de presurización (bar)	1.0	n \bar{x} C.V. %	5 10.7989 4.31	5 0.4164 3.94	5 0.1670 1.50	5 1.5268 2.47
	1.4	n \bar{x} C.V. %	4 10.7870 3.02	4 0.4158 3.05	4 0.1689 0.74	4 1.5137 1.57
	C.V.G. %		0.08	0.10	0.80	0.61
Temperatura del baño del muestreador automático de la fase vapor (°C)	84	n \bar{x} C.V. %	4 9.5707 6.47	4 0.3823 5.21	4 0.1735 2.19	4 1.4562 4.15
	86	n \bar{x} C.V. %	4 10.0783 4.74	4 0.3949 4.20	4 0.1750 0.97	4 1.4552 3.09
	C.V.G. %		3.65	2.29	0.61	0.05

n Número de datos C.V. % Coeficiente de variación
 \bar{x} Media aritmética C.V.G. % Coeficiente de variación global

4.1.2.5 EXACTITUD AL 100 %

Tabla 24. Exactitud del método al 100 % (porcientos de recobro con respuestas relativas al n-propanol).

Parámetro estadístico	Impureza orgánica volátil			
	Benceno	Cloroformo	1,4-Dioxano	Cloruro metileno
n	3	3	3	3
\bar{x}	108.48	109.02	96.43	109.03
C.V. %	7.08	6.23	3.72	6.05

n Número de datos
 \bar{x} Media aritmética del porcentaje de recobro
 C.V. % Coeficiente de variación

4.2 DISCUSION

La temperatura del baño del automuestreador de la fase vapor, el tiempo de equilibración de las muestras y el efecto salino son las variables que determinan el desplazamiento del equilibrio líquido-vapor en el vial. Una temperatura de 85°C favorece el enriquecimiento de la fase vapor con los componentes volátiles de la muestra (cuyos puntos de ebullición están incluidos en el intervalo 40 - 102°C) sin provocar sobrepresión en el interior del vial, lo cual muy probablemente lo haría estallar o se producirían fugas, y con ésto la subestimación en la cuantificación correspondiente. Así pues, al someter a las muestras con sulfato de sodio a 85°C durante 45 minutos, el equilibrio líquido-vapor del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno se desplaza hacia la fase vapor por aumento de sus constantes de distribución.

El puerto de inyección a una temperatura de 180°C evita la condensación de la muestra de vapor que se deposita en él, la cual se encuentra a 90°C; de lo contrario esto provocaría irreproducibilidad en la división del flujo, y la fracción de la muestra que entra a la columna no sería representativa de la muestra original, situación que mermaría considerablemente la precisión del sistema.

Dada la baja capacidad de muestra de la columna, ésta podría saturarse con la muestra de vapor que toma el automuestreador (1 ml); sin embargo, esto no sucede ya que con la relación de división de flujo empleada (1:18), sólo entra a la columna aproximadamente 1/18 de la muestra.

Con el detector a una temperatura de 260°C (temperatura superior a la temperatura final del programa de la columna) los componentes de la muestra provenientes de la columna no se condensan al llegar a él. De lo contrario se contaminaría el detector y se alteraría la estimación de los componentes de la muestra.

Con el programa 50°C (1.5 min) - 20°C/min - 200°C (0.1 min) se obtiene la completa separación de los componentes de la muestra en un tiempo de análisis de 9.1 min. Con los valores de los parámetros de integración establecidos, las señales de las impurezas orgánicas volátiles y sustancia de referencia interna cubren aproximadamente desde el 20 hasta el 100 % de la carta y se obtiene una línea base caracterizada por ruido casi imperceptible.

La metildopa es un derivado aminoácido, cuyos grupos carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂) pueden cargarse eléctricamente según el medio en el que se encuentren. En medio ácido la molécula se protona (especie ácida) y en medio neutro (agua) permanece con carga neta de cero (especie neutra). La especie ácida es más soluble que la neutra, por lo que es razonable que la metildopa se disuelva mejor en la solución de HCl 0.5 M que en agua.

El cloroformo y el cloruro de metileno presentan uniones dipolo-dipolo con la fase estacionaria, el benceno interacción dipolo-dipolo inducido, y el n-propanol y 1,4-dioxano interacciones dipolo-dipolo y puente de hidrógeno. Debido a estas interacciones es posible su retención en la columna, cuyo orden de elución se debe a la mezcla de los efectos de sus puntos de ebullición y las fuerzas intermoleculares.

Considerando que para obtener una mezcla homogénea es indispensable la completa disolución del soluto en el disolvente, en la preparación de las soluciones de referencia, se utilizó en la primera dilución una mezcla metanol/agua (9:1) debido a que el benceno, cloroformo y cloruro de metileno son muy solubles en alcohol y casi no lo son en agua; en tanto que el 1,4-dioxano y el n-propanol son muy solubles en ambos disolventes. Las diluciones subsiguientes se realizaron con agua exclusivamente, y no con una solución de HCl 0.5 M, para evitar que se verifique una reacción ácido-base al momento de mezclarse la solución de referencia con el

sulfato de sodio en el vial. Dado que se está trabajando con sustancias volátiles, no es conveniente que se produzca una reacción de esta naturaleza, ya que se puede alterar su concentración en la muestra.

No obstante, como se requiere que en el vial quede una concentración 0.5 M de HCl, se propuso adicionar 2 ml de una solución de HCl 1.25 M al vial con sulfato de sodio y refrigerarlo; y después, adicionar 3 ml de la solución de referencia. De esta manera, se previene la reacción exotérmica y se obtiene una concentración 0.5 M de HCl en el vial. El vial se refrigera para controlar mejor la concentración de los componentes volátiles.

De las cuatro impurezas orgánicas volátiles el cloroformo debería de tener la respuesta de menor tamaño en el detector de ionización de llama, por tener sólo un enlace C-H y estar a la mitad de la concentración que el resto de ellas. Sin embargo, es el 1,4-dioxano el que produce la menor respuesta debido a que su solubilidad en agua es infinita, y por tanto su equilibrio está desplazado hacia la fase condensada del vial y su recuperación en la fase vapor es pobre; comportamiento que no presenta el cloroformo. El benceno tiene 6 enlaces C-H y además su equilibrio está desplazado hacia la fase vapor dada su casi insolubilidad en medio acuoso, de allí que su respuesta sea tan grande. El cloruro de metileno tiene 2 enlaces C-H, sin embargo su respuesta es mayor que la del n-propanol que tiene 7 enlaces de ese tipo, lo cual se debe a que la solubilidad en medio acuoso del primero es mucho

menor que la del segundo, y esto favorece el desplazamiento hacia la fase vapor. Así la respuesta del cloruro de metileno es mayor que la del n-propanol a pesar de que este último se encuentra al doble de concentración que el primero.

La resolución entre cada par de señales adyacentes en el análisis de la fase vapor de una muestra de referencia al 100 % es mayor que 3, por lo tanto, se cumple el criterio establecido por la U.S.P. XXII, 9o. suplemento.

Los coeficientes de variación de las respuestas individuales del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno en todos los ensayos de validación no exceden el límite establecido por la U.S.P. XXII, 9o. suplemento (15 %).

Aproximadamente el 95 % de la variabilidad total de las respuestas relativas del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno, es explicada por la regresión; es decir, la ecuación de regresión describe adecuadamente la relación entre las variables partes por millón y respuesta relativa. Ambas variables se relacionan linealmente en los intervalos nominales de 80 a 120 partes por millón para el benceno, 1,4-dioxano y cloruro de metileno y de 40 a 60 partes por millón para el cloroformo; con una intensidad mínima del 97 %.

El límite de detección del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno es al menos cinco veces menor que la concentración equivalente al 100 % de cada uno de ellos, por lo que su cuantificación es confiable en el sistema propuesto.

Los porcentos de recobro promedio están incluidos en el intervalo de 96 a 110 %.

Conforme a los resultados de validación, la manera de determinar benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno, en el control de calidad de un lote dado de materia prima, deberá ser la siguiente:

1. Preparar cinco muestras de referencia al 80 %, cinco al 100 % y cinco al 120 %, como se indica en la sección de resultados (pp. 72-74). Construir con ellas una curva de calibración con niveles nominales de 80, 100 y 120 ppm para el benceno, 1,4-dioxano y cloruro de metileno; y de 40, 50 y 60 ppm para el cloroformo.

2. Preparar tres muestras problema como se indica en la sección de resultados (pag. 70).

3. Inyectar la curva de calibración y las muestras problema en el sistema acondicionado durante una hora a las condiciones establecidas (pp. 57-58,71).

4. Calcular las partes por millón de cada impureza orgánica volátil en el lote problema de metildopa, aplicando la ecuación 37, cuyo resultado promedio (de las tres muestras problema) no deberá exceder los límites que se indican en la Tabla 25 para establecer que se encuentra dentro de especificación; ya que de lo contrario se deberá rechazar el lote:

$$\text{ppm} = \frac{(\text{respuesta relativa} - \text{ordenada al origen})(150)}{(\text{peso de la muestra})(\text{pendiente})} \quad (\text{Ec. 37})$$

Tabla 25. Límites de aceptación de impurezas orgánicas volátiles en metildopa, materia prima, por el método de análisis de la fase vapor.

Impureza orgánica volátil	Límite de aceptación (ppm)
Benceno	120
Cloroformo	60
1,4-Dioxano	105
Cloruro de metileno	120

CAPITULO V

CONCLUSIONES

El análisis de la fase vapor por cromatografía de gases capilar permite la adecuada determinación cualitativa y cuantitativa del benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno en metildopa materia prima, evitando la descomposición de ésta.

El método analítico y sistema propuestos, cumplen con los requisitos de selectividad, precisión, intervalo, tolerancia y exactitud establecidos por la U.S.P. XXII, 9o. Suplemento:

Ambos son selectivos para el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano, cloruro de metileno y n-propanol (sustancia de referencia interna).

El sistema es preciso con coeficientes de variación de 3.11, 3.65, 0.63 y 2.86 %, para el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno, respectivamente; todos inferiores al 15 % establecido.

El sistema es lineal en el intervalo de 80 a 120 partes por millón para el benceno, 1,4-dioxano y cloruro de metileno, y de 40 a 60 partes por millón para el cloroformo.

El sistema es tolerable en los intervalos de cantidad de sulfato de sodio de 2.49 a 2.51 g, presión de 1.0 a 1.4 bar, temperatura de 84 a 86°C; y la muestra es estable hasta por 24 horas.

El método analítico es exacto con coeficientes de variación para el benceno, cloroformo, 1,4-dioxano y cloruro de metileno de 7.08, 6.23, 3.72, 6.05 %, respectivamente; todos ellos también inferiores al 15 % establecido.

La calibración por referencia interna mejora considerablemente la precisión del sistema y del método analítico, lo cual es particularmente importante en un análisis de trazas de sustancias volátiles.

Deben evitarse los cambios bruscos de temperatura al preparar y manipular las muestras, las cuales preferentemente y en la medida de lo posible, deben permanecer a una temperatura menor que la ambiental.

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

1. Adamovics, J.A., CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES, Vol. 49, Chromatographic analysis of pharmaceuticals, Marcel Decker, Inc., New York, pp. 107-165 (1990).
2. Bonate, P.L., CHROMATOGRAPHIC CALIBRATION REVISITED, J. Chromatogr. Sci. 28/559-562 (1990).
3. Bowman, W.C., Rand, M.J., FARMACOLOGIA, 2a. edición, Interamericana S.A. de C.V., México, D.F., pp. 23.31, 23.39-23.40 (1984).
4. Budavari, S., THE MERCK INDEX, 11th edition, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A., pag. 166,330,521,953,954,1246, (1989).
5. Casarett & Dulis, TOXICOLOGY, 3rd. edition, Macmillan Publishing Co., New York, pp. 640-648, 658 (1986).
6. Clark, E.G.C., CLARK'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS, Second edition, The Pharmaceutical Press, London, pp. 764-765 (1986).
7. Clark, L., Scypinski, S., Smith, A.M., "Proposed modifications to USP method V for organic volatile impurities", Pharm Forum 19/2/5067-5074 (1993).
8. 1865f Chemical Abstracts; 63 (1965).
9. 12790f Chemical Abstracts; 64 (1966).

10. 17709g Chemical Abstracts; 64 (1966).
11. 3963f Chemical Abstracts; 65 (1966).
12. 3964e Chemical Abstracts; 65 (1966).
13. 32493n Chemical Abstracts; 67/3064 (1967).
14. 91108p Chemical Abstracts; 67/8595 (1967).
15. 22241k Chemical Abstracts; 68/2159 (1968).
16. 22247s Chemical Abstracts; 68/2159-2160 (1968).
17. 3760v Chemical Abstracts; 72/355 (1970).
18. 101105e Chemical Abstracts; 72/427 (1970).
19. 127022d Chemical Abstracts; 77/438 (1972).
20. 136638g Chemical Abstracts; 78/419 (1973).
21. 92591a Chemical Abstracts; 79/477 (1973).
22. 115891q Chemical Abstracts; 79/387 (1973).
23. 206510p Chemical Abstracts; 83/420 (1975).
24. 59268k Chemical Abstracts; 83/550 (1975).
25. 177927p Chemical Abstracts; 85/574 (1976).
26. 160520c Chemical Abstracts; 85/590 (1976).
27. 190466c Chemical Abstracts; 86/662 (1977).

28. 101961c Chemical Abstracts; 90/436-437 (1979).
29. 136270d Chemical Abstracts; 90/381 (1979).
30. 37283v Chemical Abstracts; 102/830 (1985).
31. 142318d Chemical Abstracts; 103/759-760 (1985).
32. 92517u Chemical Abstracts; 102/660 (1988).
33. 73912c Chemical Abstracts; 102/740-741 (1988).
34. Committee on Rational Specification for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association, "Procedures for setting limits for organic volatile solvents with methylene chloride as an example of the process", Pharm Forum 15/6/5748-5759 (1989).
35. Connors, K.A., Amidon, G.L., Stella, V.J., CHEMICAL STABILITY OF PHARMACEUTICALS, Second Edition, John Wiley & Sons, U.S.A., pp. 573-579 (1986).
36. Cyr, T.D., Lawrence, R.C., Lovering, E.G., "Specificity of proposed test <467> organic volatile impurities", Pharm Forum 16/1/129-135 (1990).
37. Daniel, W.W., BIOESTADISTICA, 3a. edición, Limusa, México, D.F., pp. 34-44, 355-414 (1988).

38. Dennis, K.J., Josephs, P.A., Dokladalova, J., "Proposed automated headspace method for organic volatile impurities <467> and other residual solvents", Pharm Forum 18/1/2964-2972 (1992).
39. Durrans, T.H., SOLVENTS, 7th edition, D. Van Nostrand Co. Inc., New York, pp. 60, 65, 67-68, 70 (1957).
40. FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, S.S.A., PP. 767-768 (1985).
41. Freeman, R.R., HIGH RESOLUTION GAS CHROMATOGRAPHY, Second edition, Hewlett-Packard Co., pp. 1-5, 29-30, 53-73 (1981).
42. Gennaro, A., FARMACIA REMINGTON, 17ava. edición, Tomo 2, Médica Panamericana, México, D.F., pag. 835 (1987).
43. Goodman & Gilman, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA, Sexta edición, Médica Panamericana, México, D.F., pp. 786-788, 1601-1602 (1982).
44. Gray, V.A., "Organic volatile impurities testing initiative: an update", Pharm Forum 18/2/3205 (1992).
45. Grady, L.T., Heller, W.M., "Organic volatile impurities", Pharm Forum 15/4/5256-5262 (1989).
46. Grob, R.L., MODERN PRACTICE OF GAS CHROMATOGRAPHY, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., pp. 199-201, 216-234, 244-253, 326-332 (1977).

47. HP 19395A Headspace Sampler. Operating and Service Manual. 3rd edition, Hewlett-Packard Company, pp. 3.1-3.6, 5.1-5.4, 7.1-7.4 (1988).
48. HP 3396 Integrator. Operation Manual. Hewlett-Packard Company, pp. 1.4-1.5, 3.6-3.7, 4.5-4.7, 4.10, (1987).
49. Inman, E.L., Frischmann, J.K., et al., "General method validation guidelines for pharmaceutical samples", J. Chromatogr. Sci. 25/252-256 (1987).
50. Ioffe, B.V., Vitenberg, A.G., HEAD-SPACE ANALYSIS AND RELATED METHODS IN GAS CHROMATOGRAPHY, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., pp. 10-26, 37-45, 57-65 (1984).
51. Jennings, W.G., COMPARISONS OF FUSED SILICA AND OTHER GLASS COLUMNS IN GAS CHROMATOGRAPHY, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, Ger., 1-11 (1981).
52. J & W Scientific. Products Catalog & Reference Guide. Fisons, pag. 4, (1992-1993).
53. Karger, B.L., Snyder, L.R., Horvath, C., AN INTRODUCTION TO SEPARATION SCIENCES, New York, pp. 121-155, 181-183, 201-202, 211-239 (1973).
54. Kidd III, W.C., "Evaluation of the proposed automated headspace method for organic volatile impurities", Pharm Forum 19/2/5063-5066 (1993).

55. Lee, M.L., Yang, F.J., Bartle, K.D., OPEN TUBULAR COLUMN GAS CHROMATOGRAPHY, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 1-13, 128-133, 201-204 (1984).
56. Lual, "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. La exactitud del método analítico, el error sistemático constante, 2a. parte", Pharma News 4/9/24-25.
57. MARTINDALE. THE EXTRA PHARMACOPOEIA, Twenty-ninth edition, The Pharmaceutical Press, pp. 487-490 (1989).
58. Morrison, R.T., Boyd, R.N., QUIMICA ORGANICA, 2a. edición, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., E.U.A., pp. 47, 406, 459, 534, 541,629 (1987).
59. Schefflan, L., Jacobs, H.B., THE HANDBOOK OF SOLVENTS, D. Van Nostrand Co., Inc., New York, pp. 121-122,209-210,267-268,324,608-609 (1953).
60. Scherer, J.C., INTRODUCCION A LA FARMACOLOGIA CLINICA, 2a. edición, Haria, México, D.F., pp. 135-151 (1983).
61. Schomburg, G., GAS CHROMATOGRAPHY, VCH VerlagsgesellschaftmbH, Weinheim, Germany, pp. 9-122 (1990).
62. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., pp. 545-556 (1979).

63. Tsuji, K., Morozowich, W., CHROMATOGRAPHIC SCIENCE SERIES, Vol. 9, Part 1, GLC And HPLC determination fo therapeutic agents, Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., pp. 2-13, 22-25 (1978).
64. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII - NATIONAL FORMULARY XVII, pp. 865-866, 1563-1566, 1710-1712 (1990).
65. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII - NATIONAL FORMULARY XVII, Sixth Supplement, pp. 2863, 2927-2929 (1992).
66. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII - NATIONAL FORMULARY XVII, Ninth Supplement, pp. 3581-3583 (1993).
67. Williams, P.L., Burson, J.L. INDUSTRIAL TOXICOLOGY, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 235-237, 252 (1985).

A P E N D I C E

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Ar	Argón
°C	Grados centígrados
CH ₄	Metano
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetro
C.V.	Coefficiente de variación
d.i.	Díametro interior
Ec.	Ecuación
g	Gramo(s)
h	Horas
Ha:	Hipótesis alterna
HCl	Acido clorhídrico
He	Helio
Ho:	Hipótesis nula
I.O.V.	Impurezas orgánicas volátiles
kg	Kilogramo
l	Litros
m	Metro
M	Molar (expresión de concentración)
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mohm	Megohms
m/z	Relación masa/carga
ug	Microgramo
ul	Microlitro
um	Micra(s)
N ₂	Nitrógeno
nm	Nanómetro(s)
pag.	Página
P.M.	Peso molecular
pp.	Páginas
ppm	Partes por millón
psi	Libra por pulgada cuadrada
"s"	Soluto (o componente de la muestra)
seg	Segundo
T.A.	Temperatura ambiente
tR	Tiempo de retención
U.S.P.	Farmacopea de los Estados Unidos Americanos
W	Ancho de la señal cromatográfica
X	Variable independiente (partes por millón)
Y	Variable dependiente (respuesta relativa)