

13
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

" OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAR IMPUREZAS
VOLÁTILES ORGÁNICAS EN SULFAMETOXAZOL
MATERIA PRIMA PARA USO FARMACÉUTICO "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A :

JOSE LUIS CASTAÑEDA RAMIREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

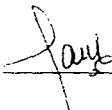
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

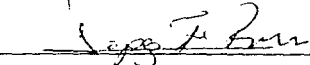
PRESIDENTE: M. en C. Santiago Capella Vizcaíno
VOCAL: M. en C. Reyna Carmen Labastida Rubio
SECRETARIO: M. en C. Francisco Rojo Callejas
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Adolfo García Osuna
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Victor Manuel Ugalde Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO EXPERIMENTAL:
**CENTRO APLICACIONES FARMACEUTICAS DE ESTUDIOS
TECNOLOGICOS, S.A.**
(C.A.F.E.T., S.A.)
MEXICO, D.F.

ASESOR:
M. en C. Santiago Capella Vizcaíno



SUPERVISOR TECNICO:
M. en C. Rosa María López Flores



SUSTENTANTE:
JOSE LUIS CASTAÑEDA RAMÍREZ



DEDICATORIAS

A MIS PADRES

**GREGORIA RAMIREZ Y
BARDOMIANO CASTAÑEDA**

Quiénes con su amor y sacrificios me han impulsado
a alcanzar una meta muy importante de mi vida.
Gracias por su amor y confianza.

A MIS HERMANOS

Octavio
Carmen
Alfredo
Francisco
Alejandro
Carlos
Erika

A CARMEN

Quien con su amor incondicional, ha engrandecido
mi vida y con quien he aprendido a compartir momentos
de tristeza y alegría.

AGRADECIMIENTOS

Con todo respeto y orgullo a la U.N.A.M y la Facultad de química.

Un profundo agradecimiento a mi asesor el M. en C. Santiago Capella Vizcaino y a la M. en C. Carmen Labastida Rubio, por brindarme su apoyo y compartir conmigo sus conocimientos.

A la M. en C. Rosa María López Flores, quien con su amistad y apoyo hizo posible que este trabajo se llevara a cabo.

A los miembros del Jurado por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

Al personal del Centro Aplicaciones Farmacéuticas de estudios Tecnológicos S.A. en especial a:

Q.F.B. Araceli Garcia Pérez.

Q.F.B. Juan Angeles Uribe.

M. en C. Salvador Salado Carbajal.

Q.F.B. Teresita Costales Gonzalez.

Gracias por su apoyo y consejos.

INDICE

1.-RESUMEN.....	1
2.- OBJETIVO.....	1
3.- GENERALIDADES.	
3.1.-INTRODUCCION.....	2
3.2.-MONOGRAFIA DE LAS SUSTANCIAS DE INTERES.	
3.2.1.-BENCENO.....	9
3.2.2.-CLORURO DE METILENO.....	10
3.2.3.-PIRIDINA.....	11
3.3.-SULFAMETOXAZOL.....	
3.3.1.-DESCRIPCION.....	12
3.3.2.-SINTESIS.....	13
3.3.3.-FARMACOLOGIA.....	13
3.4.- TEORIA DEL ANALISIS DE VAPOR EN EQUILIBRIO "HEADSPACE".	
3.4.1.-PRINCIPIOS BASICOS Y TERMINOLOGIA.....	16
4.- PARTE EXPERIMENTAL.	
4.1.- MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.....	
4.1.1.-MATERIAL.....	20
4.1.2.-EQUIPO.....	21
4.1.3.-REACTIVOS.....	22
4.2.-CONDICIONES DE ANALISIS.....	
4.2.1.-CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.....	23
4.2.2.-CONDICIONES DEL SISTEMA AUTOMATICO DE MUESTREO DE VAPOR CONFINADO.....	23
4.3.-PREPARACION DE SOLUCIONES.....	
4.3.1.-OBTENCION DE SULFAMETOXAZOL LIBRE DE IMPUREZAS VOLATILES.....	24
4.3.2.- AGUA LIBRE DE ORGANICOS.....	24
4.3.3.- SOLUCION DE METANOL-AGUA (90:10).....	24
4.3.4.- SOLUCION DE NaOH 0.25 N.....	24
4.3.5.- SOLUCION DE REFERENCIA INTERNA.....	24
4.3.6.- SOLUCION PATRON DE REFERENCIA.....	25

4.3.7.- PREPARACION DE LA SOLUCION DE REFERENCIA AL 100%.	26
4.3.8.-PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA (CURVA DE CALIBRACION).	26
4.3.9.-PREPARACION DE LA SOLUCION BLANCO.	26
4.3.10.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS.	27
5.-RESULTADOS Y DISCUSION.	
5.1.- DETERMINACION DEL ORDEN DE ELUCION.	29
5.2.-ELECCION DE LA SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA.	29
5.3.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.	
5.3.1.- AJUSTE DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.	30
5.3.2.- DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD.	
5.4.-OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE ANALISIS EN EL SISTEMA AUTOMATICO DE MUESTREO DE VAPOR CONFINADO (HEADSPACE).	
5.4.1.-DETERMINACION DEL TIPO Y CANTIDAD DE SAL.	34
5.4.2.-DETERMINACION DE LA TEMPERATURA DE EQUILIBRIO.	42
5.4.3.-DETERMINACION DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO.	43
5.4.4.-DETERMINACION DE LA RELACION DE FASES.	46
6.-VALIDACION DEL METODO ANALITICO.	
6.1.-LINEALIDAD Y PRECISON DEL SISTEMA	
6.1.1.-ESTUDIO PARA BENCENO.	48
6.1.2.-ESTUDIO PARA CLORURO DE METILENO.	51
6.1.3.-ESTUDIO PARA PIRIDINA.	53
6.2.-LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO	
6.1.1.-ESTUDIO PARA BENCENO.	55
6.1.2.-ESTUDIO PARA CLORURO DE METILENO.	59
6.1.3.-ESTUDIO PARA PIRIDINA.	62
6.3.-TOLERANCIA DEL METODO.	
6.3.1.-A LA CANTIDAD DE SULFATO DE SODIO.	65
6.3.2.-A LA TEMPERATURA DE EQUILIBRIO.	67
6.3.3.-A LA PRESION DE PRESURIZACION.	69
6.3.4.-A LA TEMPERATURA DE LA LINEA DE TRANSFERENCIA.	71
7.- CONCLUSIONES.	73
8.-BIBLIOGRAFIA.	75

1.-RESUMEN.

La creciente necesidad de controlar sustancias de elevada toxicidad a concentraciones de trazas (partes por millón) ha motivado a grupos de investigación a desarrollar tecnología analítica capaz de realizar estas determinaciones.

Una de las técnicas más usadas, en el caso de compuestos volátiles, que reúne las características necesarias para este propósito, es la cromatografía de gases con columnas capilares acoplada a un sistema de muestreo de vapor confinado (Headspace Analysis), la cual requiere de un gasto mínimo de disolventes, permite reducir notablemente la manipulación de la muestra previa al análisis y proporciona resultados rápidos y reproducibles.

En el presente trabajo se adaptó, optimizó y validó un método analítico para determinar impurezas volátiles orgánicas en diversas formas farmacéuticas, el cual fue sugerido por la Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.)^(1,2) y se aplicó a la determinación de cloruro de metileno, benceno y piridina en materia prima de Sulfametoxazol.

Se usó un cromatógrafo de gases capacitado para soportar columnas capilares y realizar gradientes de temperatura, con detector de ionización de llama y acoplado a un sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace).

Se encontraron los valores óptimos de los parámetros cromatográficos y del sistema automático de muestreo de vapor confinado, se determinó la especificidad, la precisión, la linealidad del sistema y del método analítico y su tolerancia.

2.-OBJETIVOS.

Optimizar y validar un método analítico para determinar impurezas volátiles orgánicas (I.V.O.) en Sulfametoxazol, materia prima para uso farmacéutico.

La prueba será montada para determinar cloruro de metileno, benceno y piridina. Estos componentes son utilizados en los procesos de síntesis y purificación y por lo tanto es necesario comprobar que la existencia de ellos no exceda el límite de concentración establecido.

3.-GENERALIDADES

3.1.-INTRODUCCION

El concepto de pureza de una sustancia ha cambiado con el tiempo, estos cambios son inseparables del desarrollo en Química Analítica. Si un material que se considera puro puede resolverse en más de un componente, entonces debe ser redefinido en nuevos términos de pureza e impureza

De acuerdo con la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (30), podemos considerar los siguientes tipos de impurezas: Orgánicas, Inorgánicas y Disolventes residuales.

Impurezas Orgánicas: Pueden estar asociadas al proceso de síntesis del fármaco, a la fabricación del producto farmacéutico y a su almacenamiento. Pueden ser identificadas o no identificadas, volátiles o no volátiles e incluyen:

- Materias primas.
- Subproductos de síntesis.
- Intermediarios.
- Productos de degradación.
- Reactivos, ligantes y catalizadores.

Impurezas Inorgánicas: Se pueden derivar del proceso de manufactura del producto farmacéutico. Estas son normalmente conocidas e identificadas e incluyen:

- Reactivos, ligantes y catalizadores.
- Metales pesados.
- Sales inorgánicas.
- Otros materiales (por ejemplo: carbón activado, residuos de filtros, etc.)

Disolventes residuales: Pueden ser líquidos orgánicos o inorgánicos que hayan sido usados durante el proceso de manufactura del producto farmacéutico. Son generalmente de toxicidad conocida y por lo tanto, el establecimiento de los controles necesarios para este tipo de impurezas es relativamente más sencillo.

Otros contaminantes que son menos comunes en los productos farmacéuticos, activos y demás excipientes, tales como enantiómeros, polimorfos, especies microbiológicas, etcétera, están relacionados comúnmente al seguimiento de las buenas practicas de laboratorio y de manufactura.

Para fijar los límites para las impurezas en sustancias farmacéuticas se requiere de un proceso complejo, en el cual se toman en cuenta los siguientes factores: (13,14,15,16,17)

- 1)- La toxicología de las sustancias
- 2)- Ruta de administración del medicamento (oral, tópica o parenteral)
- 3)- Dosis administrada, frecuencia y cantidad
- 4)- La población a la que se le suministra
- 5)- La farmacología de la impureza.
- 6)- La procedencia de la sustancia (sintética, producto natural o biotecnológico)
- 7)- El costo

Además este tipo de estudios son parte de un proceso, que incluye las siguientes etapas:

- 1.- Selección de los disolventes orgánicos volátiles involucrados en la fabricación del producto farmacéutico
- 2.- Establecimiento de los límites de aceptación de las impurezas.
- 3.- Desarrollo de métodos para determinar las sustancias de interés y aplicación de los límites fijados.

A continuación se presenta un resumen de los métodos recomendados por la U.S.P. para la determinación de Impurezas Volátiles Orgánicas

METODO I (1)

En este método se utiliza un cromatógrafo de gases equipado con programador de temperatura, detector de ionización de llama, una columna analítica de sílica fundida de 30m x 0.53 mm D.I. y 5µm de espesor de una película entrecruzada de 5% de fenilmetilsilicón y una precolumna de 5m x 0.53 mm D.I. desactivada con fenilmetilsilicón.

SOLUCION DE REFERENCIA A: Preparar una solución acuosa que contenga 0.5 µg/mL de cloroformo y 1.0 µg/mL de cada uno de las siguientes sustancias: benceno, 1,4 dioxano, cloruro de metileno y tricloroetileno.

SOLUCION DE PRUEBA: Disolver una cantidad de la forma farmacéutica en agua libre de compuestos orgánicos o el disolvente especificado en la monografía, tal que la solución final tenga una concentración de ésta de aproximadamente 20 mg por mililitro.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

- Temperatura en el inyector y detector: 180° y 260 °C respectivamente.
- Gas acarreador: Helio con una velocidad lineal de 35 cm/seg.

PROGRAMA DE TEMPERATURA EN EL HORNO

- La temperatura de la columna se programa de acuerdo a las siguientes etapas: 35°C por 5 minutos, aumentar la temperatura hasta 175°C con un gradiente de 8°C por minuto, aumentar nuevamente la temperatura hasta 260°C con un gradiente de 35°C por minuto y mantener a 260°C durante 16 minutos.

PROCEDIMIENTO Inyectar por separado volúmenes iguales (1µl) de la solución de referencia y la preparación de prueba en el cromatógrafo e identificar los componentes basándose en los tiempos de retención de los picos presentes en el cromatograma de la preparación de prueba y calcular la cantidad de impurezas volátiles orgánicas presentes

A menos que se especifique otra cosa en la monografía, la cantidad de cada IVO presente en la forma farmacéutica, no debe exceder los límites que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1 Límites máximos permitidos por la U.S.P. de I.V.O. en principios activos y excipientes utilizados en la industria farmacéutica

SUSTANCIA	LÍMITE (ppm)
BENCENO	100
CLOROFORMO	50
1,4 DIOXANO	100
CLORURO DE METILENO	100
TRICLOROETILENO	100

Debido a que para Piridina no hay un límite establecido por la U.S.P. porque aún no se han completado los estudios de toxicidad como los realizados con las cinco sustancias mencionadas en la tabla N° 1 (12), el límite para esta sustancia en este trabajo se fijó en 100 ppm, como lo hace la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (E.P.A.) el cual esta reportado como límite máximo en el agua (13), pues éstos y los límites fijados por la Farmacopea para las otras sustancias son prácticamente iguales.

METODO II. (14)

En este metodo se utiliza el sistema de muestreo en fase vapor (purga y trampa), en donde las IVO son retenidas en un adsorbente (trampa) con ayuda de un gas inerte que se pasa a través de la muestra, despues las IVO son desorbidas de la trampa por calentamiento y llevados hacia el cromatógrafo de gases por un flujo rapido de gas acarreador

SOLUCION DE REFERENCIA: Preparar como se indica en el Método I

SOLUCION DE PRUEBA: Preparar como se indica en el metodo I.

SISTEMA DE PURGA Y TRAMPA: Consiste en 3 secciones separadas: purga de la muestra, la trampa y el adsorbente

La trampa debe tener una longitud no mayor a 25 cm, debe tener un diámetro no mayor a 2.67 mm; debe estar empacada con 7.7 cm de polimero de 2,6-difenil oxido, 7.7 cm de silica gel y 7.7 cm de carbón activado. Debe calentarse a no mas de 250 C

Las condiciones de trabajo de la trampa son temperatura inicial de 225 C con un flujo de gas inerte no mayor a 20 mL/min. Acondicionar la trampa a 225°C durante 15 min

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS: El sistema de purga y trampa se conecta al cromatógrafo de gases el cual esta equipado con:

- Detector de ionización de Llama
- Columna de 2.34 m x 2 mm DI empacada con polietilenglicol al 1% sobre carbón grafitizado de área de superficie de 12 m²/g.
- Gas acarreador: Helio a un flujo constante de 40 mL/min.

- La temperatura de la columna se programa de acuerdo a las siguientes etapas: 45°C por 3 min. aumentar la temperatura hasta 220°C con un gradiente de 8°C por minuto y mantener a 220°C durante 15 minutos.

PROCEDIMIENTO: Ajustar la purga de gas de nitrógeno a un flujo de 40 mL/min. Por separado introducir 5 mL de cada una de las soluciones de referencia y de prueba dentro del contenedor de muestra y purgar durante 10 minutos (\pm 0.1 min.) a temperatura ambiente. Después de este tiempo, conectar la trampa al cromatógrafo de gases. Ajustar el sistema y calentar la trampa rápidamente a 180°C y mantener la temperatura durante 4 minutos, mientras se mantiene un flujo de nitrógeno de 40 mL/min.

METODO III ⁽¹⁾

Al igual que en el método II se utiliza la técnica de muestreo en fase vapor (sistema de purga y trampa), pero en lugar de un detector de ionización de llama se usa un detector selectivo de masas.

Solución de Referencia. Preparación de Prueba y el sistema de purga y trampa se preparan como se indica en el método II.

METODO IV ⁽¹⁾

SOLUCION DE REFERENCIA: Preparar como se indica en el método I, de la solución de referencia A transferir 5 mL a un vial de 10 mL de capacidad, el cual contiene 1g de sulfato de sodio, sellar herméticamente y calentar a 80°C por 60 minutos.

PREPARACION DE PRUEBA: Preparar como se indica en el método I. En un vial de 10 mL de capacidad, el cual contiene 1g de sulfato de sodio, transferir 5 mL de la solución de prueba, sellar herméticamente y calentar a 80°C por 60 minutos.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS Y PROCEDIMIENTO: Proceder bajo las mismas condiciones del método II, excepto en el sistema de inyección. Se utiliza inyección manual con una jeringa con sello de teflón, o bien utilizar una jeringa con la que se pueda tomar 1 mL del vapor de equilibrio sobre la muestra (Headspace).

METODO V (1)

En este método se tienen condiciones cromatográficas diferentes a las mencionadas en el método 1, pero el procedimiento es el mismo (volumen de inyección 1 µl).

SOLUCION DE REFERENCIA Y PREPARACION DE PRUEBA: Se procede como se indica en el Método 1.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

- Detector de ionización de llama a una temperatura de 140°C.
- Temperatura del inyector: 140°C.
- Columna analítica 30 m x 0,53 mm DI de sílice fundida, con una película de 3.0 µm de espesor de fase estacionaria de 6% de cianoptopifenil-94% de dimetil polisiloxano.
- Sistema de inyección sin división de flujo (splitless).
- Gas acarreador: Helio a una velocidad lineal de 35 cm/seg.

PROGRAMA DE TEMPERATURA EN EL HORNO:

- La temperatura de la columna se programa de acuerdo a las siguientes etapas: 40°C por 20 min, aumentar la temperatura hasta 240°C con un gradiente de 30°C por minuto y mantener a 240°C durante 20 minutos.

PROCEDIMIENTO: Se procede de la misma forma que en el método 1. Inyectar al sistema 1 µL de la solución de referencia, reportar la respuesta de las señales y determinar la resolución, R, que entre cualesquiera 2 componentes de esta debe ser mayor o igual a 3 y calcular el coeficiente de variación, el cual debe ser menor o igual al 15% entre inyecciones repetidas de la misma solución.

METODO VI (1)

SOLUCION DE REFERENCIA Y SOLUCION DE PRUEBA: Se procede como se indica en el método 1.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

- Detector de ionización de Llama.
- Columna y temperatura de la columna son como las que se especifican en la tabla No.2

- Las temperaturas del detector, inyector, gas acarreador, velocidad lineal y relación de flujo, deberán fijarse de acuerdo a las dimensiones y temperatura de la columna, elegida de la tabla N° 2 (1).

PROCEDIMIENTO: Se sigue el procedimiento descrito en el método I, el volumen de inyección es de 1µl. Con la inyección de Referencia determinar: La resolución R, que entre 2 componentes cualesquiera de esta debe ser mayor o igual 1.0 y el coeficiente de variación calculado menor o igual a 15%.

Tabla II Condiciones cromatograficas y columnas del metodo VI para la determinacion de impurezas volatiles organicas en principios activos y excipientes utilizados en la industria farmaceutica

Condiciones Cromatograficas	Designacion U.S.P. de la columna cromatografica	Dimensiones de la columna	Temperatura de la columna
A	S3	3-mm X 2-m	100°C
B	S2	3-mm X 2.1-m	100°C
C	G18	0.53-mm X 30-m	40°C
D	G39	3-mm X 2-m	65°C
E	G16	3-mm X 2-m	70°C
F	S4	2-mm X 2.5-m	Mantener a 120°C por 35 minutos Gradiente de 120 a 200°C a 2°C/min Mantener a 200°C por 20 minutos Mantener a 45°C por 3 minutos
H	G14	2-mm X 2.5-m	Gradiente de 45 a 120°C a 8°C/min Mantener a 120°C por 15 minutos Mantener a 35°C por 5 minutos
I	G27	0.53-mm X 30-m	Gradiente de 35 a 175°C a 8°C/min Mantener a 175°C por 10 minutos Mantener a 50°C por 20 minutos
J	G16	0.33-mm X 30-m	Gradiente de 50 a 165°C a 6°C/min Mantener a 165°C por 20 minutos

3.2-MONOGRAFIA DE LAS SUSTANCIAS DE INTERES

3.2.1.- BENCENO (19):

Peso molecular 78.11 g/mol.

Gravedad específica: 0.8790 (20/4) g/ml.

Punto de Fusión: 5.5°C

Punto de Ebullición: 80.1 C

Índice de refracción: 1.5011 (20 C)

Temperatura de autoignición: 580 °C

Presion de vapor: 100 mm Hg

Densidad del vapor: 2.77 g/cm³.

Solubilidad en H₂O a 25°C. (g/100mL.) 0.180

Es un líquido incoloro o debilmente amarillo, no polar, altamente inflamable, volátil, de olor aromático; es miscible con alcohol, acetona, eter, cloroformo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono, acido acetico glacial y aceites; es prácticamente insoluble en agua y sus vapores arden con flama humeante

TOXICIDAD:

Valor limite de tolerancia en el aire: 10 ppm^(9,17)

Concentración toxica minima: 210 ppm^(9,19).

Síntomas: Produce euforia, dolor de cabeza, vértigo, incoherencia al hablar, narcosis; estimulación del sistema nervioso central, luego depresión con muerte via parálisis respiratoria; irritación pulmonar y edema; irritación gastrointestinal con vómito y cólico; puede producir cáncer y se sospechan efectos teratogenicos y mutagenicos

Síntomas crónicos:

Anorexia (perdida del apetito), nausea, fatiga, debilidad, dolor de cabeza, vahido, nerviosismo, irritabilidad, palidez.

LIMITE ESTABLECIDO POR LA U.S.P.: 100 ppm^(9,17)

LIMITE ESTABLECIDO POR LA E.P.A.: 100 ppm^(9, 19, 26)

3.2.2.- CLORURO DE METILENO ⁽¹⁹⁾:

Peso molecular: 84.94 g/mol.

Gravedad específica: 1.335 (15/4).

Punto de ebullición: 40.1°C.

Índice de refracción: 1.4244 (20).

Temperatura de ignición: 556°C.

Presión de vapor: 440 mm Hg (25).

Densidad del vapor: 2.9 g/cm³.

Solubilidad en H₂O a 20°C, (g/100ml.): 1.32

Forma mezclas inflamables vapor-aire a cerca de 100°C ó más.

Líquido incoloro volátil, ligeramente soluble en agua, miscible con alcohol y éter, olor penetrante parecido al éter, los vapores no son flamables, no es explosivo cuando se mezcla con aire a temperatura ambiente.

TOXICIDAD.

Valor límite de tolerancia en el aire: 500 ppm ^(9,10).

Concentración tóxica mínima: 500 ppm ^(9,10).

Síntomas: Irritación de ojos y tracto respiratorio; dolor de cabeza, vahido y estupor; náuseas, vomito, anemia, inflamación de la piel y quemaduras; inconsciencia; se sospecha un agente mutagénico.

LIMITE ESTABLECIDO POR LA U.S.P.: 100 ppm ^(1,13)

LIMITE ESTABLECIDO POR LA E.P.A.: 100 ppm ^(19,26)

3.2.3.- PIRIDINA (19);

Peso molecular: 79.10 g/mol.

Gravedad específica: 0.978 (25/4).

Punto de fusión: -42.0°C.

Punto de ebullición: 115-116°C.

Índice de refracción: 1.5102 (20).

Temperatura de ignición: 482°C.

Densidad del vapor: 2.73 g/cm³.

Solubilidad en H₂O a 20°C. (g/100mL): Miscible

El vapor forma mezcla explosivas con aire.

Es líquido con ligero color amarillo o incoloro, tiene olor nauseabundo y sabor ardiente, es miscible en agua, alcohol, éter, éter de petróleo, benceno y ligroína. Es inflamable y volátil; es una base débil y forma sales con ácidos fuertes.

TOXICIDAD

Valor límite de tolerancia: 5 ppm^(19, 20)

Síntomas: Conjuntivitis, inflamación de la piel, dolor de cabeza, vaho, anorexia, náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea, ansiedad e insomnio, deficiencia de control muscular, irritación del tracto respiratorio con respiración asmática; se han reportado parálisis de cuerdas bucales, músculos y vejiga. Puede producir cáncer.

LÍMITE ESTABLECIDO POR LA U.S.P.: 100 ppm

(No existía cuando se realizó el trabajo.)

LÍMITE ESTABLECIDO POR LA E.P.A.: 100 ppm⁽²⁰⁾

3.3.-SULFAMETOXAZOL-

3.3.1.- DESCRIPCION.

NOMBRE, FORMULA Y PESO MOLECULAR:

Sulfametoxazol o N¹ - (5-metil -3-isoxazolil) sulfanilamida.

Fórmula estructural:

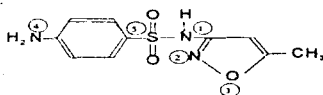


Figura N° 1 Fórmula desarrollada de Sulfametoxazol y la asignación de los heteroátomos en la molécula

Fórmula condensada: C₁₀H₁₁N₃O₃S

Peso Molecular: 253.28 g/mol.

Sulfametoxazol es un polvo blanco cristalino o débilmente amarillo, es prácticamente inoloro;

Punto de Fusión (intervalo): 170-173 °C; constante de disociación: 5.60 a 25°C. La solubilidad del Sulfametoxazol se resume en la siguiente tabla

Tabla III Solubilidad de Sulfametoxazol en varios disolventes de uso común (11)

Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
Benceno	0.5
Cloroformo	2.3
Etanol 95%	37.8
Eter etílico	2.7
Isopropanol	8.8
Metanol	90.3
Eter de petróleo	0.2
NaOH 0.1 N	16
Agua	0.5

3.3.2.-SINTESIS

El Sulfametoxazol se sintetiza por reacción de 5-metil-3-aminoisoxazol con N-acetil-p-amino-bencen-sulfonil cloruro. El producto de la reacción se hidroliza para dar Sulfametoxazol (fig 2).

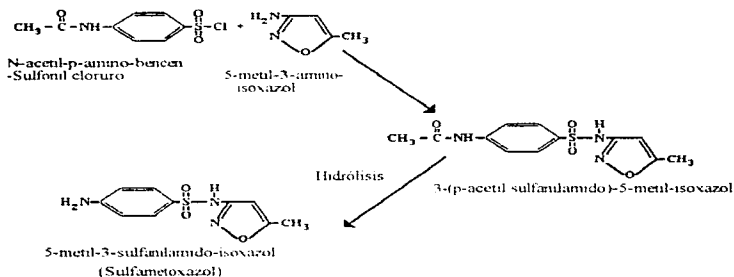


Figura N° 2 Ruta de síntesis de Sulfametoxazol, a partir de cloruro de N-acetil-p-amino-bencen-sulfenilo y 5-metil-3 amino isoxazol

3.3.3.-FARMACOLOGIA

El Sulfametoxazol pertenece a las sulfonamidas, las cuales fueron los primeros agentes quimioterapéuticos efectivos que se usaron en forma sistémica para la prevención y curación de las infecciones bacterianas en el hombre. La considerable importancia médica y para la salud pública de su descubrimiento y su amplio uso posterior se reflejaron con rapidez en la declinación brusca de las cifras de mortalidad de las enfermedades infecciosas tratables. El advenimiento de la penicilina y de otros antibióticos disminuyó la utilidad del sulfametoxazol, en la actualidad ocupa un lugar relativamente pequeño en el arsenal terapéutico del médico. No obstante la introducción de la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol en la mitad de la década de 1970 produjo un aumento en el uso del sulfametoxazol para el tratamiento de infecciones microbianas específicas.

El término sulfonamida se emplea como un nombre genérico para los derivados de la para-aminobencensulfonamida (sulfanilamida). La mayoría de ellos y en particular el Sulfametoxazol son relativamente insolubles en agua, pero sus sales de sodio se solubilizan con rapidez. La característica importante de esta molécula es que el azufre está unido en forma directa con el anillo benzénico. El grupo para $-NH_2$ (cuyo N ha sido denominado N^4) es esencial y sólo puede ser reemplazado por radicales que puedan convertirse en un grupo amino libre *in vivo*. Las sustituciones hechas en el grupo amino NH_2 (cuyo N ha sido denominado N^1) tienen efectos variables sobre la actividad antibacteriana de la molécula. No obstante, la sustitución de nucleos aromáticos heterocíclicos en N^1 produce compuestos de alta potencia.

El Sulfametoxazol tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana. Sin embargo, en los últimos años se han hecho comunes las cepas resistentes, disminuyendo la utilidad de este agente en forma correspondiente. En general, el sulfametoxazol sólo ejerce un efecto bacteriostático y los mecanismos de defensa celular y humoral del huésped son esenciales para la erradicación final de la infección.

Absorción, destino y excreción.

Se absorbe alrededor del 70 al 100% de una dosis oral y puede encontrarse Sulfametoxazol en la orina 30 minutos después de su ingestión. El intestino delgado es el sitio principal de la absorción, pero parte del fármaco se absorbe en el estómago. La absorción en otros lugares, como la vagina, el tracto respiratorio o la piel erosionada es variable y poco confiable, pero puede ingresar una cantidad suficiente en el organismo como para causar reacciones tóxicas en las personas susceptibles o producir sensibilización. El sulfametoxazol y otras sulfonamidas se unen en grados variados en las proteínas plasmáticas, en particular a la albumina.

El Sulfametoxazol se distribuye en todos los tejidos del cuerpo, ingresa con rapidez en los líquidos pleural, peritoneal, sinovial, ocular y fluidos orgánicos similares, pudiendo alcanzar allí de un 50 a 80% de las concentraciones sanguíneas determinadas en forma simultánea.

Este fármaco pasa con rapidez a través de la placenta y alcanza la circulación fetal. Las concentraciones que se obtienen en los tejidos fetales son suficientes para producir efectos antibacterianos y tóxicos.

El Sulfametoxazol se metaboliza *in vivo*, en especial en el hígado. El Sulfametoxazol N⁴ acetilado es el derivado metabólico principal. Cada sulfonamida sufre un grado diferente de acetilación; este proceso es desventajoso porque los productos resultantes no tienen actividad antibacteriana y retienen las potencialidades tóxicas de la sustancia de origen.

Parte del Sulfametoxazol se elimina en forma inalterada y parte como productos metabólicos. La fracción más grande se excreta por la orina por lo que la vida media del Sulfametoxazol en el organismo depende de la función renal. Se eliminan pequeñas cantidades por la heces y la bilis, leche y otras secreciones.

Propiedades Farmacológicas

El Sulfametoxazol es un compuesto que tiene un comportamiento similar al sulfisoxazol, pero sus porcentajes de absorción entérica y excreción urinaria son menores. Se emplea para infecciones sistémicas y del tracto urinario. Deben tomarse precauciones para evitar la cristaluria (formación de cristales del fármaco o productos acetilados del mismo en el organismo) por sulfametoxazol, debido a la alta proporción de la forma acetilada, relativamente insoluble, del fármaco en la orina. Se le encuentra disponible para uso oral en comprimidos de 500 mg y de 1 g y como suspensión (100 mg/mL). La dosis inicial para niños es de 50 a 60 mg/Kg, seguida de 20 a 30 mg/Kg en la mañana y tarde siguientes. La dosis para adulto con infecciones leves es de 2 g, seguida de 1 g cada doce horas; para enfermedad grave, la dosis inicial es de 2 g y luego 1 g cada 8 horas. La vida media del sulfametoxazol en los primeros 10 días de vida es bastante mayor que en los adultos. Cae con rapidez, siendo de alrededor de 9 horas a las tres semanas de edad y de 4 a 5 horas al año. Luego aumenta hacia la vida media característica de los adultos, es decir, 6 a 12 horas. El sulfametoxazol en la actualidad se comercializa en combinaciones de dosis fija con fenazopiridina como antiséptico y analgésico urinarios y con trimetoprim.

3.4.-TEORIA DE ANALISIS DE VAPOR EN EQUILIBRIO "HEADSPACE"

3.4.1.-PRINCIPIOS BASICOS Y TERMINOLOGIA

El método de cromatografía de gases con sistema automático de muestreo de vapor confinado "Headspace" se usa para determinar sustancias volátiles en muestras líquidas o sólidas por el análisis de la fase gaseosa que se encuentra en equilibrio termodinámico con la muestra líquida o sólida en un sistema cerrado.

Este método predominantemente se usa para la determinación de sustancias volátiles a concentraciones de trazas (ppm, ppt) en muestras que son difícilmente analizables por métodos cromatográficos convencionales. Un caso típico son las soluciones diluidas donde la matriz enmascara o interfiere con la determinación de los disolventes de interés, daña la columna o requiere de tiempos de análisis excesivamente largos debido a la presencia de componentes que eluyen con mucha lentitud; Las muestras inorgánicas o polímeros de alto peso molecular los cuales no pueden volatilizarse o solubilizarse bajo condiciones normales y las muestras no homogéneas o suspensiones como sangre, aguas negras, coloides, etcétera, las cuales requieren de un proceso de limpieza muy prolongado previo al análisis.

El sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace) economiza en esfuerzo en el tratamiento de la muestra, la cual está relativamente libre de su matriz de origen y salva los problemas asociados con las propiedades cromatográficas de las mismas.

Es obvio que la principal desventaja de los análisis cuantitativos por "Headspace" es la necesidad de realizar una amplia y cuidadosa calibración del sistema.

Para obtener una expresión cuantitativa que relacione la concentración de la sustancia de interés entre una fase gaseosa fija y una fase líquida o sólida en equilibrio termodinámico se procede de la siguiente forma:

El área cromatográfica A_B de la sustancia B en la fase vapor sobre el líquido es proporcional a su presión parcial de vapor, P_B^s , de acuerdo a la siguiente ecuación

$$A_B = C_B P_B^s \quad (1)$$

Donde:

C_B = Constante de proporcionalidad dependiente de la sustancia

P_B^* = Presión parcial de vapor de B.

De acuerdo con la ley de Henry la presión parcial del vapor de una sustancia sobre su solución depende de la fracción mol. X_B , de la sustancia B y de la presión de vapor saturado de la sustancia B pura, P_B^* , corregida de la desviación de la linealidad por el coeficiente de actividad γ_B .

$$P_B = X_B \gamma_B P_B^* \quad (2)$$

Si se combinan las ecuaciones 1 y 2 y se elimina P_B^* obtenemos una expresión para X_B en función de la composición de la sustancia en la fase vapor

$$X_B = A_B / [C_B \gamma_B P_B^*] \quad (3)$$

Alternativamente, la concentración de equilibrio de la sustancia B en la fase gaseosa sobre el líquido es proporcional a el coeficiente de partición, K_B

$$K_B = C_B^g / C_B \quad (4)$$

Donde:

K_B = Coeficiente de partición de la sustancia B entre la fases líquida y gaseosa a una temperatura fija

C_B^g = Concentración de la sustancia de interés en la fase gaseosa.

C_B = Concentración de la sustancia de interés en la fase líquida.

En condiciones de equilibrio también se satisface la siguiente relación:

$$C_B^g V_G = C_B V_L + C_B V_G \quad (5)$$

Donde:

C_B^g = Concentración inicial de B en la fase líquida

V_L = Volumen de la fase líquida

V_G = Volumen de la fase gaseosa

Si se combinan las ecuaciones 4 y 5 y se elimina C_B obtenemos:

$$C_B^g = [C_B (K_B V_L + V_G)] / V_L \quad (6)$$

De las ecuaciones 3 y 5 podemos ver que la concentración de B en la fase gaseosa sobre el líquido en equilibrio con el vapor dependerá de la relación de volumen entre las fases líquida y gaseosa

y del coeficiente de partición de la sustancia específica, K_{11} , la cual a su vez depende de la matriz en que se encuentre la sustancia.

Desde el punto de vista experimental las técnicas de muestreo de vapor en equilibrio ("Headspace") son muy simples.

La muestra ya sea líquida o sólida, se introduce a un vial de vidrio de tamaño apropiado y herméticamente cerrado con un sello de silicón. El vial es cuidadosamente calentado a una temperatura fija constante hasta que se establece el equilibrio entre las dos fases.

El muestreo de la fase gaseosa se puede realizar manualmente con una jeringa especial o por medio de sistemas electroneumáticos que toman automáticamente la muestra bajo condiciones bien controladas. Con el sistema automático de muestreo, una aguja penetra el vial con la muestra a través del septum de silicón y se presuriza la fase gaseosa hasta que esta iguala la presión de la cabeza de la columna cromatográfica. En este punto la válvula de flujo de gas acarreador se cierra y automáticamente se libera el exceso de presión en el vial y los componentes volátiles en la muestra (gaseosa) son conducidos a la columna cromatográfica. Al término de la secuencia de muestreo la válvula del inyector automático se cierra y el suministro de gas acarreador a la columna se restablece.

Cuando se usa el sistema automático de muestreo de vapor confinado en combinación con columnas capilares, lo más recomendable es usar un gas acarreador viscoso como helio. Además para una suficientemente buena operación del equipo, es recomendable usar columnas capilares de elevada longitud (independientemente de la resolución necesaria para la separación) para poder generar una suficientemente alta presión diferencial en el sistema.

Se puede mejorar en algunos casos la detectabilidad de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado cuando se ajusta el pH de la solución muestra, cuando se adiciona alguna sal (inorgánicas con mayor frecuencia), o cuando se incrementa la temperatura de la muestra. Como la concentración de la sustancia de interés en la fase gaseosa es proporcional a la concentración de la parte no disociada, si se ajusta el pH de la misma se modifica el equilibrio y se favorece que la sustancia de interés se encuentre principalmente en la forma no disociada, lo que promueve que las sustancias más volátiles pasen a la fase gaseosa en mayor proporción.

Existe un coeficiente relativo de temperatura K_i que esta involucrado en los fenómenos de desplazamiento del equilibrio y es igual a:

$$1/K_i * (\Delta K_i / \Delta t) \approx A_i / R T^2$$

Donde: A_i = Respuesta de la sustancia i.

R = Constante universal de los gases.

T = Temperatura en grados centigrados.

Ya que los valores de A_i / R para la mayoría de las sustancias orgánicas investigadas están en un intervalo de 2300-7000, el cambio en K_i para 1° C (a temperatura ambiente) es de 3-8%.

Como una regla general, los análisis cuantitativos por "Headspace" deben de llevarse a cabo bajo condiciones isotérmicas bien controladas, con una exactitud de una décima de grado.

4.-PARTE EXPERIMENTAL

4.1.-MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

4.1.1.-MATERIAL.

- 5 Matraces volumetricos de 100 mL.
- 6 Matraces volumetricos de 200 mL.
- 1 Matraz volumetrico de 500 ml.
- 3 Matraces Erlenmeyer de 1 Lt
- 6 Pipetas volumetricas de 5 mL.
- 1 Pipeta automatica con capacidades de 1 a 5 mL.
- 1 Pipeta automática de 10 mL de capacidad.
- 10 Vasos de precipitados de 100 mL.
- 80 Viales para sistema automatico de muestreo de vapor confinado de 10 mL.
- 80 Septum de silicon con recubierta de teflón de 20 mm de diámetro.
- 80 Sellos de aluminio de 20 mm. de diámetro.
- 1 Probeta graduada de 100 mL.
- 5 Pipetas Pasteur
- 4 Jeringas con sello de teflon y válvula de paso de 2 mL de capacidad.
- 1 Agitador mecanico de vórtice
- 20 Tapones de hule natural para juntas 14-18.
- 20 Tapones de hule para tubos de ensayo 20 mm de diámetro
- 1 Cinta de teflón
- 1 Columna analítica de sílice fundida de 30 m de longitud por 0.32 mm de diámetro interno y una película de Cianopropil metil difenil siloxano (DB-624) químicamente unida de 1.8 micras de espesor

4.1.2.-EQUIPO

Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard 5890 Serie II Capacitado para soportar columnas capilares, realizar programas de temperatura en el horno y realizar inyección con y sin división de flujo de gas acarreador, equipado con detector de ionización de llama.

Sistema automático de muestreo de Vapor Confinado ("Headspace") Hewlett-Packard Modelo: 19395A Capacitado para realizar programas de inyección automáticos y semiautomáticos y con rizo de muestreo de 1 mL de capacidad.

Integrador Electrónico Hewlett-Packard Modelo 3390 Serie II Equipado con memoria y control remoto al cromatógrafo de gases.

Balanza Analítica Marca: Mettler Modelo: AE260 Delta Range

Parrilla de Calentamiento Marca: Thermoline Modelo: Sybron 1000

Sistema de Osmosis Inversa MilliQ Water System Millipore Modelo: 3002

Horno de vacío Precision Scientific Inc. Modelo: 19

4.1.3.-REACTIVOS

Sustancia	Marca	Grado
Sulfametoxazol	Napp Chemicals	Materia Prima
Agua		HPLC Libre de Orgánicos
Cloruro de metileno	Baxter	HPLC
Benceno	Aldrich	HPLC
Piridina	Baker	Reactivo.
n-Propanol	Merck	Reactivo.
Metanol	Baxter	HPLC
Hidróxido de sodio	Merck	Reactivo
Sulfato de sodio	Merck	Reactivo
Helio	Linde	Ultra Alta Pureza.
Hidrógeno	Linde	Cromatográfico.
Aire comprimido	Linde	Ultra Seco.
1,4 Dioxano	Baxter	HPLC
Isooctano	Merck	Reactivo.
n-Butanol	Baxter	HPLC
iso-Butanol	Baxter	HPLC
Cloruro de sodio	Merck	Reactivo
Cloruro de amonio	Baker	Reactivo.
Sulfato de amonio	Merck	Reactivo.
Sulfato de magnesio	Merck	Reactivo.
Cloruro de bario	Merck	Reactivo.
Fosfato de sodio	Merck	Reactivo.
Carbonato de sodio	Merck	Reactivo.

4.2.-CONDICIONES DE ANALISIS.

4.2.1.-CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Temperatura del inyector:	200°C.
Relación de división de flujo de gas acarreador en el inyector:	15 : 1
Velocidad lineal del gas acarreador:	22 cm/seg.
Presión en la cabeza de la columna:	7.4 psi
Temperatura del detector:	260°C

PROGRAMA DE TEMPERATURA EN EL HORNO.

Temperatura inicial:	85 °C
Tiempo inicial:	3 min.
Gradiente de calentamiento:	25 °C/min.
Temperatura final:	130 °C
Tiempo final:	3 min.

4.2.2.-SISTEMA AUTOMATICO DE MUESTREO DE VAPOR CONFINADO (HEADSPACE).

PROGRAMA DE INYECCION

Temperatura de calentamiento de las muestras:	85°C
Tiempo de calentamiento de las muestras:	30 minutos
Temperatura de las válvulas y de la línea de transferencia:	90°C
Presión de presurización de la muestra:	1.5 bar
Capacidad del rizo de muestreo:	1 mililitro.
Tiempo de presurización:	7 segundos.
Tiempo de venteo y de llenado del Rizo de muestreo:	5 segundos.
Tiempo de inyección:	30 segundos.

PRESIONES DEL SISTEMA.

Gas Acarreador:	1.6 bar Helio
Gas Auxiliar:	1.5 bar Helio
Sistema neumático:	3.5 bar Aire comprimido.

4.3.- PREPARACION DE SOLUCIONES.

4.3.1.-OBTENCION DE SULFAMETOXAZOL LIBRE DE IMPUREZAS VOLATILES

Pesar aproximadamente 6 g de Sulfametoxazol materia prima en un pesafiltros y someter a 105 °C por 3 horas en una estufa de vacío. Sacar y permitir que se enfríe a temperatura ambiente. Guardar en un frasco aníbar y en un lugar fresco y seco

4.3.2.- AGUA LIBRE DE ORGANICOS

El día previo al análisis hervir durante 15 minutos aproximadamente 2 Lt de agua HPLC permitir que se enfríe a temperatura ambiente y almacenar a 20 ± 1°C

4.3.3.- SOLUCION DE METANOL-AGUA (90:10)

A un matraz eilenmeyer de 500 ml. que contiene 270 mL de metanol HPLC. transferir 30 mL de agua libre de organicos y homogeneizar. Tapar herméticamente y almacenar a 20 ± 1°C hasta el momento de ser usada

4.3.4.- SOLUCION DE NaOH 0.25 N

Pesar aproximadamente 1 g de NaOH grado reactivo en un vaso de precipitados de 50 mL. Transferir aproximadamente 30 mL de agua libre de organicos. Agitar hasta completa disolución y transferir cuantitativamente a un matraz volumetrico de 100 mL. Llevar a volumen, tapar y agitar para homogeneizar. Almacenar la solución a 20 ± 1°C

4.3.5.- SOLUCION DE REFERENCIA INTERNA.

4.3.5.1.- SOLUCION N° 1

A un matraz volumetrico de 100 mL transferir aproximadamente 80 mL de la solución de metanol-agua (9 1) y tapar con un tapon de hule natural recubierto con teflón.

Transferir, con ayuda de una jeringa con sello de teflón y válvula de paso aproximadamente 1.5 g (1.9 mL) de n-propanol grado HPLC. Tener cuidado de descargar el disolvente en el seno del

líquido. Agitar suavemente el matraz y llevar a volumen con la solución de metanol-agua y homogeneizar. El peso exacto transferido de n-propanol al matraz se obtiene de la diferencia de pesos entre la jeringa llena y vacía. La concentración final aproximada de n-propanol será de 15 mg/mL.

4.3.5.2.- SOLUCION N° 2

A un matraz volumétrico de 200 mL que contiene aproximadamente 180 mL de agua libre de orgánicos, transferir una alícuota de 5 mL de la solución N° 1, llevar a volumen con agua libre de orgánicos y agitar para homogeneizar. La concentración final aproximada de n-propanol en la solución será de 375 µg/mL.

4.3.5.3.- SOLUCION N° 3

A un matraz volumétrico de 200 mL que contiene aproximadamente 180 mL de agua libre de orgánicos. Transferir una alícuota de 5 mL de la solución N° 2 y llevar a volumen con agua libre de orgánicos y homogeneizar. La concentración final aproximada de n-propanol en la solución será de 9.4 µg/mL.

4.3.6.- SOLUCION PATRON DE REFERENCIA

4.3.6.1.- SOLUCION A

A un matraz volumétrico de 100 mL transferir aproximadamente 80 mL de la solución de metanol-agua (9.1) y tapar con un tapón de hule natural recubierto con teflón.

Transferir con ayuda de una jeringa con sello de teflón y válvula de paso, 0.53 g (0.6 mL) de benceno. Tener cuidado de descargar el disolvente en el seno del líquido y después agitar suavemente. El peso exacto de benceno transferido al matraz se obtiene de la diferencia de pesos entre la jeringa llena y vacía. De la misma forma, transferir al matraz 0.53 g de cloruro de metileno (0.4 mL) y 0.53 g piridina (0.54 mL). Llevar a volumen con la solución de metanol-agua y homogeneizar. La concentración final aproximada de las sustancias de interés será de 5.3 mg/mL.

4.3.6.2.- SOLUCION B

A un matraz volumétrico de 200 mL que contiene aproximadamente 180 mL de agua libre de orgánicos, transferir una alícuota de 5 mL de la solución A. Agitar y llevar a volumen con agua libre de orgánicos. Tapar y homogeneizar. La concentración final aproximada de las sustancias de interés será de 133 µg/mL.

4.3.7.- SOLUCION DE REFERENCIA AL 100%

Transferir a un matraz volumétrico de 200 mL que contiene aproximadamente 180 mL de agua libre de orgánicos una alícuota de 5 mL de la solución N° 2 (referencia interna) y una alícuota de 5 mL de la solución B. Llevar a volumen con agua libre de orgánicos y homogeneizar. La concentración final aproximada de benceno, cloruro de metileno y piridina será de 3.3 µg/mL y de n-propanol de 9.4 µg/mL respectivamente.

4.3.8.-SOLUCIONES PARA LA LINEALIDAD DE SISTEMA (CURVA DE CALIBRACION).

A cinco matraces volumétricos de 200 mL transferir aproximadamente 180 mL de agua libre de orgánicos a cada uno de ellos. Identificarlos como nivel 60, 80, 100, 120 y 140. Transferir a cada matraz una alícuota de 5 mL de la solución N° 2 (referencia interna) y alícuotas de 3, 4, 5, 6 y 7 mL de la solución B respectivamente. Llevar a volumen cada matraz con agua libre de orgánicos y homogeneizar. La concentración final aproximada de benceno, cloruro de metileno y piridina en cada solución será de 2.0, 2.67, 3.33, 4.0 y 4.67 µg/mL respectivamente.

4.3.9.-SOLUCION BLANCO

A un matraz de volumétrico de 100 mL que contiene aproximadamente 80 mL de agua libre de orgánicos, transferir una alícuota de 60 µL de metanol y llevar a volumen con agua libre de orgánicos, tapar y homogeneizar.

4.3.10.- PREPARACION DE LAS MUESTRAS

4.3.10.1.- LINEALIDAD DE SISTEMA

En 20 viales de 10 mL para el sistema automático de muestreo de vapor confinado, se pesan aproximadamente y con exactitud 2.5 ± 0.01 g de Na_2SO_4 en cada uno. Transferir a cada vial una alícuota de 2 mL de la solución de NaOH 0.25 N y agitar con vortex por 1 minuto. Transferir alícuotas de 3 mL de la solución del nivel correspondiente (60, 80, 100, 120 y 140%) de la calibración para obtener cuatro réplicas por nivel. Tapar, sellar herméticamente y agitar en vortex por 1 minuto.

Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2

4.3.10.2.- LINEALIDAD DEL METODO

En 15 viales de 10 mL para el sistema automático de muestreo de vapor confinado, pesar aproximadamente y con exactitud 100 ± 0.1 mg de Sulfametozazol materia prima libre de orgánicos volátiles y 2.5 ± 0.01 g de Na_2SO_4 en cada uno. Continuar de la misma manera que describe en el punto 4.3.10.1 y obtener cinco réplicas de los niveles 80, 100 y 120%.

Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2.

4.3.10.3.- REPETIBILIDAD

Se preparan el mismo día 3 soluciones patrón de referencia independientes tal como se describe en los puntos 4.3.6.1, 4.3.6.2 y 4.3.7.

En 18 viales de 10 mL para el sistema automático de muestreo de vapor confinado, pesar 2.5 ± 0.01 g de Na_2SO_4 grado reactivo en cada uno de ellos. Identificar en grupos de 6 como Solución Patrón 1, 2 y 3 y continuar con el procedimiento descrito en el punto 4.3.10.1. Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2

4.3.10.4.- ESPECIFICIDAD

En un vial de 10 mL para el sistema automático de muestreo de vapor confinado transferir alícuotas de 100 μL de cada uno de los 28 disolventes que se mencionan en la tabla VII. De la mezcla obtenida transferir una alícuota de 10 μL a un vial de 10 mL para el sistema de muestreo de vapor confinado con 2.5 g de Na_2SO_4 grado reactivo y disuelto en 2 mL de solución de NaOH 0.25 N y 3 mL de agua libre de orgánicos. Tapar y sellar herméticamente. Agitar en vortex por 1 minuto. Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2.

4.3.10.5.- SOLUCION BLANCO**4.3.10.5.1.- PARA LA CURVA DE CALIBRACION, REPETIBILIDAD.**

En 4 viales de 10 mL para el sistema automático de muestreo de vapor confinado, pesar 2.5 ± 0.01 g de Na_2SO_4 grado reactivo en cada uno. Transferir una alícuota de 2 mL de solución de NaOH 0.25 N, y una alícuota de 3 mL de la solución blanco descrita en el punto 4.3.9. Tapar, sellar herméticamente y agitar en vortex por 1 minuto. Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2

4.3.10.5.2.- PARA LA LINEALIDAD DE METODO

La preparación de los blancos para la linealidad del método es semejante a la descrita en el punto 4.3.10.5.1. con la diferencia de que esta vez también se pesan en cada vial 100 ± 0.1 mg de Sulfametoxazol materia prima libre de orgánicos volátiles. Analizar en el sistema a las condiciones descritas en el punto 4.2.

5.0.-RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1.- DETERMINACION DEL ORDEN DE ELUCION.

Para determinar el orden de elución y la resolución de las sustancias de interés (cloruro de metileno, benceno y piridina), se utilizaron las condiciones instrumentales recomendadas por el Pharmacopeial Forum⁽⁵⁾. Se inyectaron manualmente cloruro de metileno, benceno y piridina puros y luego una mezcla de ellos.

Los resultados obtenidos de estas pruebas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla IV. Tiempo de retención de las sustancias de interés, obtenidos con las condiciones de análisis recomendadas por la U.S.P.⁽⁵⁾

SUSTANCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN (min.)
Metanol	2.32
Cloruro de Metileno	4.38
n-Propanol	6.02
Benceno	9.42
Piridina	19.28

Tabla V. Concentración, respuesta promedio, tiempo de retención y resolución de las sustancias de interés, obtenidos con las condiciones propuestas para el método de analítico.

Sustancia	Concentración (µg/ml)	Respuesta prom. (µV-seg)	Tiempo de Retención (min)	Resolución
Metanol	Cosolvente	2.71
Cloruro de Metileno	2	20900	3.49	4.24
Benceno	2	110000	4.81	8.67
Piridina	2	7090	6.28	11.74

5.2.-ELECCION DE LA SUSTANCIA PATRON DE REFERENCIA INTERNA.

En la literatura podemos encontrar que el criterio principal para la elección de una sustancia como referencia interna, es que sea un compuesto de estructura y propiedades similares a la sustancia de interés, sin embargo en nuestro metodo las estructuras de cloruro de metileno, benceno y piridina son muy diferentes entre si, lo que provoca que la elección de la sustancia de referencia interna se vuelva una tarea difícil.

Las sustancias que se enlistan en la tabla VI, se probaron como posibles referencia internas, debido a sus características como punto de ebullición, solubilidad en agua y metanol. Sin embargo ninguna dio resultados aceptables con las tres sustancias de interés juntas.

El n-propanol fue el que dio mejores resultados con piridina, ya que la variabilidad en su respuesta sin referencia interna era muy alta. Para benceno y cloruro de metileno se observó que era mejor cuantificarlos por referencia externa. La razón de esto fue que, la presencia de sitios activos (Si-OH) debidos al uso de NaOH 0.1N en la preparación de las muestras, provocaban pérdidas de las sustancias más polares (n-propanol y piridina), fenómeno que no se presentaba con benceno y cloruro de metileno. La absorción de n-propanol en dichos sitios activos provocaba por lo tanto una más alta variabilidad en las determinaciones cuando ésta se utilizaba como referencia interna de benceno y cloruro de metileno, que cuando no se utilizaba.

Tabla VI Punto de Ebullición y solubilidad en agua y metanol de algunas sustancias posibles a usar como referencia interna.

SUSTANCIA	P. de EBULLICIÓN (°C)	SOLUBILIDAD EN AGUA (g / 100 mL)	SOLUBILIDAD EN METANOL (g / 100 mL)
n-Propanol	97.2	miscible	miscible
Isobutano	99.2	insoluble	3.2
n-Butanol	117.7	7.4	miscible
iso-Butanol	99.5	12.5	miscible

5.3.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Las condiciones de análisis de partida se tomaron de las reportadas en el *Pharmaceutical Forum* (5) y se optimizaron de acuerdo a los siguientes criterios: obtener una resolución mayor a 1.5, entre dos cualesquiera sustancias de interés, una precisión mayor a 15%, expresada como coeficiente de variación entre 6 inyecciones repetidas de una misma solución, fijados por la U.S.P. y un tiempo de análisis entre 5 y 10 minutos como característica deseada para el método.

5.3.1.- AJUSTE DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las principales condiciones cromatográficas que se modificaron en este estudio fueron las siguientes:

Programa de temperatura del horno.

Relación de división del flujo de gas acarreador en el puerto de inyección (Relación "Split").

Temperatura en el puerto de inyección.

Temperatura del detector.

De acuerdo con los criterios fijados en el punto 5.3. las condiciones cromatográficas con las que se obtuvo el mejor resultado se describen en el punto 4.2. En la figura N° 3 se muestra un cromatograma típico, obtenido a estas condiciones.

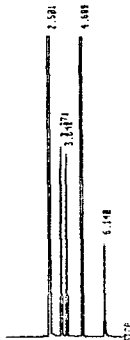


Figura N° 3 Cromatograma típico de la sustancias de interés, obtenido con las condiciones de análisis del punto 4.2, metanol (2.58 min.), cloruro de metileno 2 $\mu\text{g/mL}$ (3.3 min.), n-propanol 5.6 $\mu\text{g/mL}$ (3.6 min.), benceno 2 $\mu\text{g/mL}$ (4.6 min.) y piridina 2 $\mu\text{g/mL}$ (6.1 min.)

Los flujos de aire e hidrógeno necesarios para la formación de la llama en el detector, se fijaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor del equipo. (flujo de aire: 390 mL/min. y 35 mL/min. de Hidrógeno).

5.3.2.-DETERMINACION DE ESPECIFICIDAD

Para determinar la especificidad del método se inyectaron al sistema cromatográfico 28 de los 33 disolventes comúnmente usados en la industria farmacéutica y aceptados por U.S.P. (5).

Los resultados de esta prueba se muestran en la figura No 4 y se resumen en la tabla VII.

Tabla VII Valores de tiempo de retención, ancho a la base y resolución de los 28 disolventes más usados en la industria farmacéutica y aceptados por la U.S.P., para la prueba de especificidad de sistema

DISOLVENTE	Tiempo de retención (min)	Ancho a la base (min)	Resolución
METANOL	2 659	0 066	
ETANOL	2 973	0 065	4 798
ETER ETILICO	3 076	0 065	1 594
ACETONA *a	3 223	0 060	2 246
iso-PROPANOL *a	3 223	0 066	
ACETONITRILLO *b	4 422	0 068	2 964
t-BUTANOL *b	3 422	0 068	
CLORURO DE METILENO	3 468	0 065	0 694
n-HEXANO *c	3 797	0 077	4 663
n-PROPANOL *c	3 797	0 077	
iso-PROPILETER *d	4 130	0 066	4 664
ACETATO DE ETILO *d	4 130	0 066	
CLOROFORMO	4 276	0 068	2 174
TETRAHIDROFURANO	4 384	0 085	1 412
iso-BUTANOL	4 518	0 068	1 752
c-HEXANO	4 698	0 071	1 148
BENCENO	4 792	0 070	2 750
n-HEPTANO *e	4 977	0 070	2 654
n-BUTANOL *e	4 977	0 070	
TRICLOROETILENO	5 237	0 073	3 641
DIOXANO	5 500	0 075	3 638
ALCOHOL ISOAMILICO	6 077	0 080	7 382
PIRIDINA	6 331	0 068	3 435
TOLUENO	6 408	0 080	1 041
m-XILENO	8 365	0 099	21 927
p-XILENO	8 545	0 104	1 730
o-XILENO	9 302	0 112	7 013
DIMETILSULFOXIDO	10 049	0 109	6 760
RESOLUCION DE LAS SUSTANCIAS DE INTERES			
METANOL	2 659	0 0663	
CLORURO DE METILENO	3 468	0 0646	12 361
n-PROPANOL	3 797	0 0765	4 663
BENCENO	4 792	0 0697	13 611
PIRIDINA	6 331	0 068	22 353

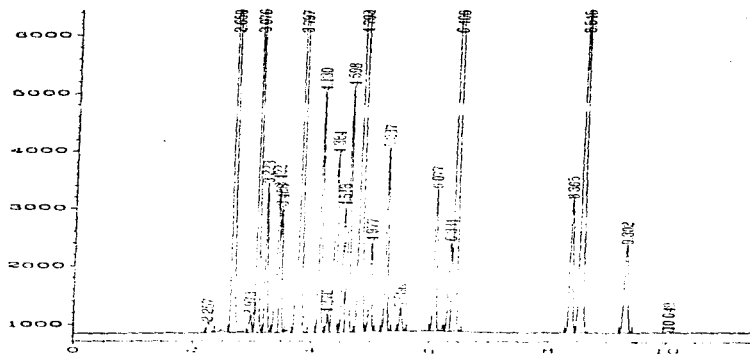


Figura N° 4 Cromatograma de los 28 disolventes más usados en la industria farmacéutica y aceptados por la U S P , utilizados para la prueba de especificidad de sistema

Como se puede observar en la tabla No VI existen problemas de resolución entre muchos de los disolventes, particularmente algunas parejas que no se resuelven entre sí (las marcadas con *a,b,c,d y e).

Las sustancias de interés son claramente distinguibles en presencia de la mezcla de disolventes probada, además la resolución encontrada entre cualquier pareja formada por las cinco sustancias de interés es mayor a 2.

CONCLUSION

Con base en los resultados anteriores se puede concluir, que cualquier cambio mínimo detectado en el tiempo de retención o en la forma de la señal cromatográfica de n-propanol en la muestra con respecto al observado en la solución de referencia, deberá tomarse con mucho cuidado, ya que la cuantificación podría ser errónea si en la muestra está presente n-hexano. También podría analizarse primero la muestra sin la referencia interna y luego con ella, para verificar si existen realmente interferencias con ésta sustancia.

5.4.-OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE ANALISIS EN EL SISTEMA AUTOMATICO DE MUESTREO DE VAPOR CONFINADO (HEADSPACE).

Las condiciones de analisis de partida para el sistema automático de muestreo de vapor confinado, fueron las descritas en el *Pharmacoepial Forum* ⁽⁵⁾.

De acuerdo con los fines perseguidos, las condiciones del sistema automático de muestreo de vapor confinado, se pueden dividir en dos partes, según su efecto sobre las determinaciones analíticas de las sustancias de interés:

- a).- Variables que afectan el equilibrio termodinámico Líquido-Gas del sistema.
 - 1 - El tipo y cantidad de sal (Fuerza iónica de la solución).
 - 2 - La temperatura de equilibrio
 - 3 -El tiempo de equilibrio.
- b).- Variables operacionales que no tienen un efecto directo sobre el equilibrio Líquido-Gas.
 - 1 -El tiempo de presurización de la muestra.
 - 2.-El tiempo de venteo.
 - 3 - El tiempo de inyección y de purga del sistema.

5.4.1.-DETERMINACION DEL TIPO Y CANTIDAD DE SAL

En la literatura ^(10,12) podemos encontrar que el equilibrio líquido-vapor que se establece en un sistema cerrado puede ser desplazado por la presencia de una sal inorgánica soluble en la fase condensada, la cual favorece el aumento de la sustancias de interés en la fase gaseosa.

Para este experimento, se realizaron análisis de replicas de la solución patrón de referencia, de las sustancias de interés al 100% de la concentración especificada por la U.S.P y se usaron diferentes sales inorgánicas a diferentes valores de fuerza iónica, para determinar el efecto y magnitud del desplazamiento del equilibrio

Las sales utilizadas para este estudio fueron las siguientes: NaCl, NH₄Cl, Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, BaCl₂, Na₄PO₄, Na₂SO₄, a concentraciones de 0.1 a 0.8 g/mL con intervalos de 0.1g/mL y valores de fuerza iónica de entre 1.7 a 25.6 obtenidos con la ecuación de Gilbert Newton Lewis ⁽¹⁸⁾. De cada valor de concentración se realizaron análisis por triplicado y con los resultados obtenidos, se construyeron los gráficos correspondientes de respuesta (área en $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) contra fuerza iónica debida a cada una de las sales estudiadas.

Los gráficos obtenidos para cada sal se presentan a continuación:

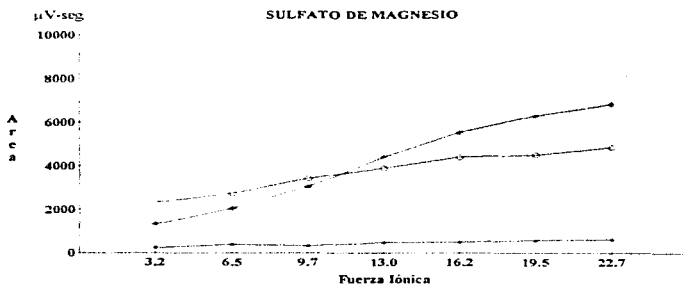


Figura N°5 Efecto de la Fuerza iónica debida a Sulfato de magnesio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). \circ CH_2Cl_2 , \blacktriangle n-Propanol, \blacksquare Pindina.

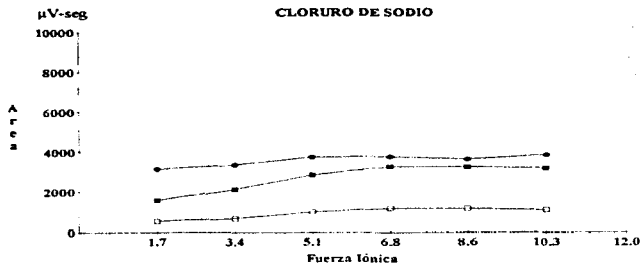


Figura N°6 Efecto de la Fuerza iónica debida a Cloruro de sodio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ■ n-Propanol, □ Pindina.

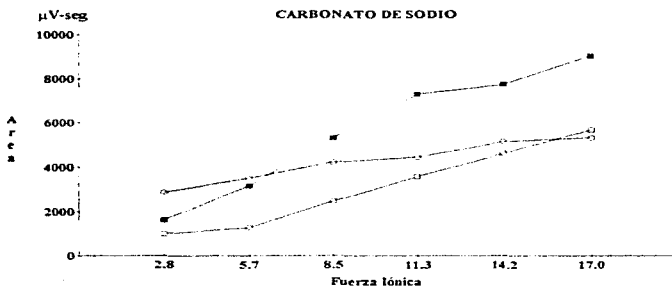


Figura N°7 Efecto de la Fuerza iónica debida a Carbonato de sodio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ○ CH₂Cl₂, ■ n-Propanol, □ Pindina.

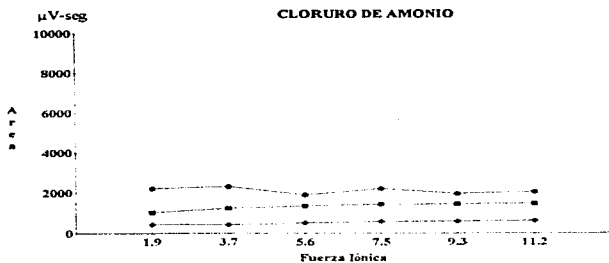


Figura N°8 Efecto de la Fuerza iónica debida a Cloruro de amonio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interes en el sistema automatico de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, * Piridina

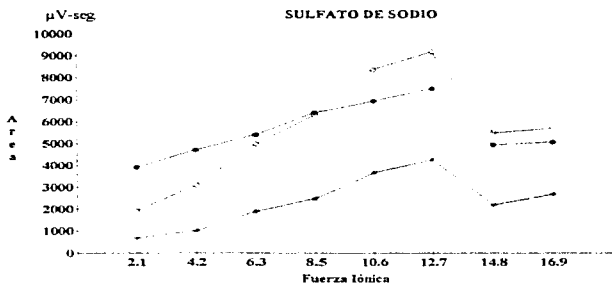


Figura N°9 Efecto de la Fuerza iónica debida a Sulfato de sodio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interes en el sistema de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, * Piridina

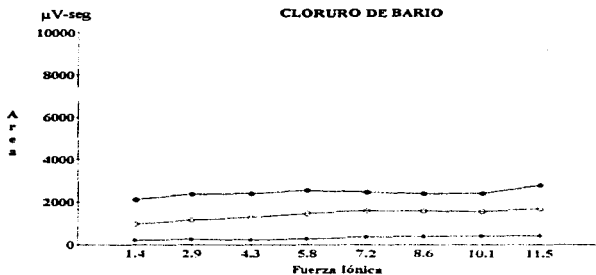


Figura N°10 Efecto de la Fuerza iónica debida a cloruro de bario sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, ▲ Piridina

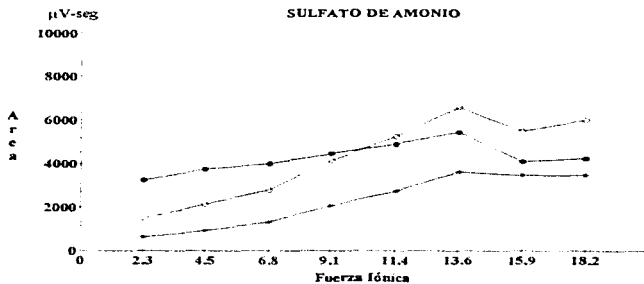


Figura N°11 Efecto de la Fuerza iónica debida a sulfato de amonio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, ▲ Piridina

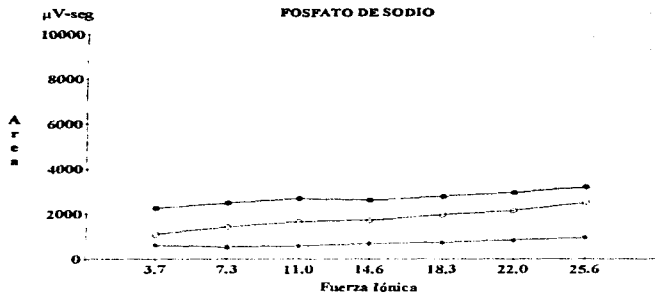


Figura N°12 Efecto de la Fuerza iónica debida a fosfato de sodio sobre la respuesta obtenida de las sustancias de interés en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, ▲ Piridina

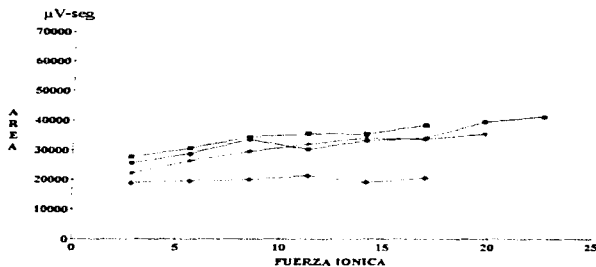


Figura N°13 Efecto de la Fuerza iónica debida a diferentes sales inorgánicas sobre la respuesta obtenida de benceno en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). ● Na₂CO₃, ◆ NH₄Cl, ■ NaCl, ▲ MgSO₄.

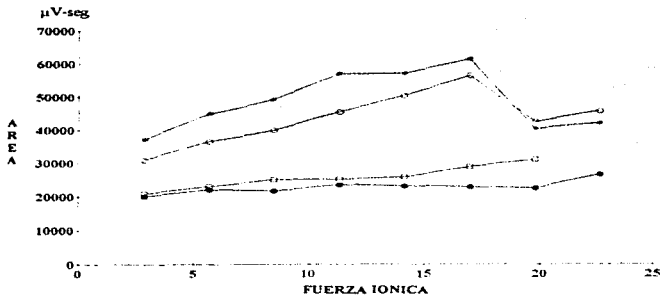


Figura N°14 Efecto de la Fuerza iónica debida a diferentes sales inorgánicas sobre la respuesta obtenida de beneceno en el sistema automático de muestreo de vapor confinado (Headspace). □ Na₂PO₄ ▲ Na₂SO₄ ● BaCl₂ ○ (NH₄)₂SO₄

En las gráficas anteriores (figuras 5 a 14) se observa que con las sales utilizadas que contienen un anión bivalente (Na₂CO₃, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, Na₂SO₄), existe un intervalo donde la respuesta de las sustancias de interes aumenta proporcionalmente con la fuerza ionica, y otro donde el cambio de respuesta es apreciablemente menor. Con las sales monovalentes, la sal con catión bivalente y la sal con anion trivalente (NaCl, NH₄Cl, BaCl₂, Na₃PO₄), se observa que desde un principio el cambio de respuesta de las sustancias de interes permanece prácticamente constante y es notablemente más bajo, comparado con la recuperacion obtenida con las sales con un anion bivalente.

El desplazamiento del equilibrio que la sal provoca en el sistema Líquido-Gas estudiado se suponía en un principio que estaba asociado directamente a la fuerza iónica impuesta al sistema, sin embargo existen otros efectos de origen fisicoquímico aun más complejo, que están asociados a este comportamiento, tal como el radio atómico de los iones, su carga y su interacción con el disolvente.

Por esta razón y debido a que el objetivo es otro, no se abordaron en éste trabajo

De entre todas las sales estudiadas, se decidió utilizar para nuestro método el sulfato de sodio, debido a que es con esta sal con la que se obtiene la magnitud de respuesta más alta para todas las sustancias de interés, respecto a las otras sales, con un efecto de desplazamiento más uniforme para todas ellas. Con el carbonato de sodio se obtenía una magnitud de respuesta más grande; sin embargo, esta sal además de que no ejerce un efecto uniforme en el aumento de respuesta de las sustancias de interés, al disolverla libera una gran cantidad de calor, fenómeno que provoca dificultades en las determinaciones analíticas de las impurezas volátiles de interés.

5.4.2.-DETERMINACION DE LA TEMPERATURA DE EQUILIBRIO.

Otro de los factores que afecta directamente el equilibrio Líquido-Gas, y por lo tanto la recuperación de las sustancias de interés, es la temperatura a la que se someten las muestras antes de ser analizadas (Temperatura de Equilibrio)

Como lo que nos interesa son las sustancias orgánicas volátiles, la temperatura de equilibrio a la que se realiza el análisis es obviamente crítica, pero a su vez esta estrictamente limitada por la temperatura de ebullición del disolvente utilizado. En este método el disolvente es agua, la cual tiene un punto de ebullición de 92°C a la presión de la ciudad de México, valor que no debe ser rebasado para que el sistema funcione adecuadamente.

De acuerdo con el criterio anterior, para este experimento se analizaron replicas de la solución patrón de referencia de las sustancias de interés a la concentración límite establecida por la U.S.P. mas la sustancia de referencia interna, a 7 diferentes temperaturas de análisis (50, 60, 70, 80, 85 y 90 °C), cada una por triplicado y manteniendo constantes las otras variables del sistema. Se construyeron las correspondientes curvas de área de respuesta contra temperatura y se obtuvieron los siguientes resultados.

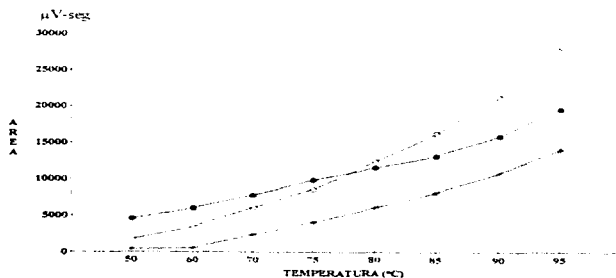


Figura N°15 Efecto de la temperatura sobre la respuesta de Cloruro de Metileno, n-Propanol y Pindina en el sistema de muestreo de vapor confinado ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, * Pindina

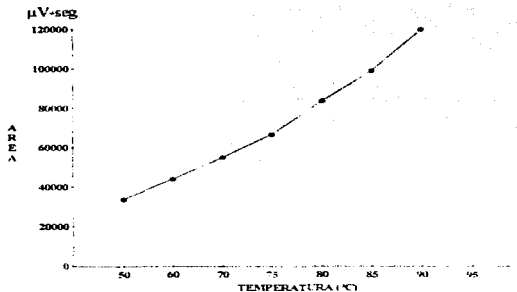


Figura Nº16 Efecto de la temperatura sobre la respuesta de Benceno en el sistema de muestreo de vapor confinado (HeadSpace).

En los gráficos anteriores se observa que al principio la respuesta de las sustancias de interés aumenta proporcionalmente con la temperatura, pero después de los 85°C la pendiente de la curva aumenta drásticamente de un punto a otro. El comportamiento observado es el típico de la presión de vapor de una sustancia volátil, en el cual la respuesta aumenta logarítmicamente respecto a la temperatura.

Con base en este resultado se decidió usar una temperatura de 85°C, con la condición de mantener un estricto control de la temperatura de trabajo, para evitar una elevada variación en los resultados de respuesta de las sustancias de interés (10,12).

5.4.3.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO.

El tiempo durante el cual se mantiene la muestra a la temperatura elegida es también una variable que afecta directamente la recuperación de las sustancias volátiles de interés, ya que después de un tiempo determinado el sistema alcanza la condición de equilibrio entre las dos fases en contacto.

De acuerdo con el criterio anterior, para este experimento se analizaron réplicas de la solución patrón de referencia de las sustancias de interés a la concentración límite establecida por la U.S.P. más la sustancia de referencia interna a diez diferentes tiempos de calentamiento y cada uno por triplicado. Los análisis se realizaron desde los 10 hasta los 100 minutos, se mantuvieron constantes las otras variables del sistema. Se construyeron las correspondientes curvas de área de respuesta contra tiempo de calentamiento. Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18.

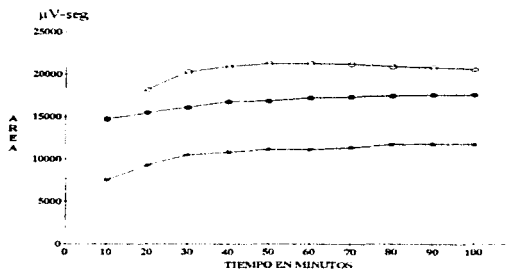


Figura Nº 17 Efecto del tiempo de calentamiento sobre la respuesta de Cloruro de Metileno, n-Propanol y Piridina en el sistema de muestra de vapor confinado. Temperatura de análisis 85°C: ● CH₂Cl₂, ○ n-Propanol, ✱ Piridina

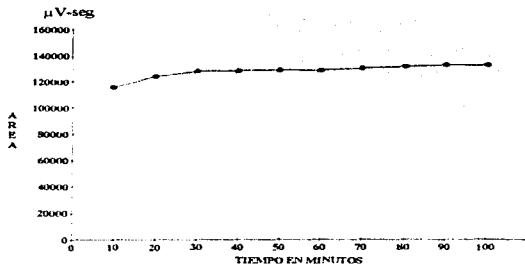


Figura N°18 Efecto del tiempo de calentamiento sobre la respuesta de Benceno en el sistema de muestra de vapor confinado. Temperatura de análisis 85°C.

En estas gráficas se puede apreciar una zona donde la respuesta obtenida de las sustancias de interés aumenta proporcionalmente con el tiempo de calentamiento y otra zona donde la respuesta permanece prácticamente constante. Esto indica que después de cierto tiempo la respuesta de las sustancias de interés prácticamente permanece constante y no tiene caso calentar durante más tiempo la muestra, ya que no se recuperará una mayor cantidad de las sustancias de interés.

De acuerdo con los resultados anteriores, en las figuras N° 17 y 18 se puede observar que el valor de interés para el método es de 30 minutos a una temperatura de 85°C.

5.4.4.- DETERMINACION DE LA RELACION DE FASES.

Se analizaron muestras por sextuplicado de la solución patrón de referencia de las sustancias de interés a la concentración límite permitida por la U.S.P. mas el estándar interno elegido, con una relación de fases líquido-vapor de 1:1 y de 1:3.

Tabla VIII Valores de Area de respuesta y estadísticos correspondientes a los disolventes de interés obtenidos con una relación de fases 1:3 en el sistema de muestreo de vapor confinado

RELACION DE FASES 1:3				
AREA DE RESPUESTA DE				
	CH ₂ CL ₂	n-PROPANOL	BENCENO	PIRIDINA
	5995	11219	39714	5218
	5827	10884	37997	5551
	6251	11039	41805	5814
	6008	11505	39247	5728
	5910	10998	39685	5549
	5997	11654	38987	5499
	6	6	6	6
PROM =	5998.33	11216.17	39655.83	5559.67
S =	142.91	304.40	1281.44	207.68
C.V. =	2.38	2.71	3.16	3.74

Tabla Nº VIIIa Valores de Area de respuesta y estadísticos correspondientes a los disolventes de interés obtenidos con una relación de fases 1:1 en el sistema de muestreo de vapor confinado

RELACION DE FASES 1:1				
AREA DE RESPUESTA DE				
	CH ₂ CL ₂	n-PROPANOL	BENCENO	PIRIDINA
	14846	18455	108714	9529
	14584	17884	107321	9479
	14476	16858	106138	8888
	13993	17269	104457	8072
	15608	18663	110722	8856
	15224	18048	112619	9320
	6	6	6	6
PROM =	14688.50	17762.83	108195.17	9195.67
S =	436.68	887.84	3283.85	287.36
C.V. =	2.97	3.31	3.04	3.12

Como puede apreciarse en las tablas VIII y VIIIa, la magnitud de la respuesta obtenida de las sustancias de interés es mayor cuando se usa una relación de fases de 1:1, lo que implica que con los parámetros de operación del sistema automatico de muestreo de vapor confinado utilizados (Tiempo de

presurización, tiempo de venteo y tiempo de inyección), se recupera mayor cantidad de sustancias volátiles.

Teóricamente deberíamos obtener una mayor cantidad de sustancia extraída al aumentar la cantidad del extractante, sin embargo en este experimento el equilibrio está totalmente desplazado hacia la fase vapor. Lo que provoca esto, al analizar un volumen igual (1mL) del espacio sobre el líquido cuando se usan diferentes relaciones de fases a las mismas condiciones de muestreo, es que la magnitud de la respuesta de los volátiles al usar una relación de 1:1 será mayor que al usar una relación de 1:3, pues en este último caso la muestra se encuentra más diluida que en el primero. Sin embargo si analizáramos el total de la fase vapor en ambos casos, la cantidad extraída deberá ser la misma con una u otra relación de fases.

Con base en los resultados anteriores, se decidió trabajar con la relación de fases de 1:1.

6.- VALIDACION DEL METODO ANALITICO

6.1.-LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA

Se determinó al analizar replicas de soluciones de las sustancias de interés, en un intervalo de concentraciones del 60 al 140% del valor limite permitido por la U.S.P. para las sustancias de interés, preparadas tal y como se describe en los puntos 4.3.8 y 4.3.10.1, y analizadas en el sistema y condiciones descritas en el punto 4.2.

Este análisis se realizó en forma simultánea con la determinación de la linealidad del método. Las fórmulas necesarias para realizar los cálculos del ajuste de la curva por mínimos cuadrados y el análisis de varianza para la prueba de linealidad se pueden encontrar en la bibliografía al final de este trabajo (6.7).

Los resultados obtenidos para cada una de las sustancias de interés se presentan a continuación.

6.1.1.-Estudio para Benceno.

Tabla IX Valores de Concentración y Area de respuesta de Benceno, para determinar la linealidad del sistema

NIVEL (%)	Concentración (µg / mL)	Respuesta (µV-seg)
60	1.22	83663
		84605
		93668
		88271
80	1.63	124057
		107314
		117333
		119331
100	2.03	141742
		140933
		137768
		151207
120	2.44	165423
		159567
		156106
		165971
140	2.85	201764
		186703
		190842
		20903

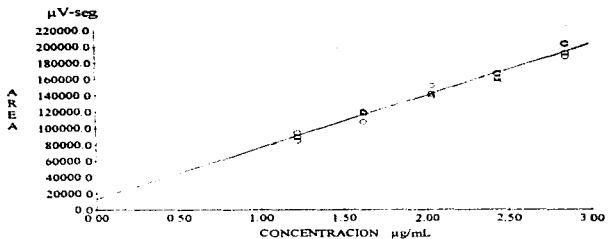


Figura N°19 Curva de Área absoluta vs Concentración para evaluar la linealidad del sistema con Benceno a cinco niveles de concentración

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:

$$a = 62918,3$$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:

$$b = 13375,7$$

Coefficiente de correlación:

$$r = 0,98624$$

PRECISION DEL SISTEMA

VARIACION DEL FACTOR DE RESPUESTA

EN TODO EL INTERVALO

$$\begin{aligned} n &= 20 \\ \text{Promedio} &= 1,430 \times 10^{-5} \\ \text{Desv. std.} &= 7,882 \times 10^{-7} \\ \text{c.v.} &= 5,51 \end{aligned}$$

AL NIVEL 100%

$$\begin{aligned} n &= 4 \\ \text{Promedio} &= 1,427 \times 10^{-5} \\ \text{Desv. std.} &= 5,649 \times 10^{-7} \\ \text{c.v.} &= 3,96 \end{aligned}$$

ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA ^(6,7).

Con el objetivo de saber si la curva de regresión es una recta, se realiza un análisis de varianza donde se espera que los valores medios (de la respuesta) se localicen en una recta de pendiente "a" y ordenada al origen "b" y que su desviación de la recta de regresión sea pequeña con respecto a las desviaciones de los valores de cada grupo y respecto a la media correspondiente. Por lo tanto, la prueba de hipótesis propuesta es la siguiente:

$$H_0 : y = a x + b$$

$$H_a : y \neq a x + b$$

Tabla X Análisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del sistema para Benceno.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE			
FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACION DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESION	3	158855614	52951871
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACION DE LA MEDIA)	15	578146321	2.5945E-08
TOTAL	18	732001935	

F calculada = 1.37 F tablas = 3.29 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (3,15)

Conclusión → Debido a que F calculada < F tablas. Se puede concluir que el sistema tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado. La hipótesis nula no se rechaza.

6.1.2.- Estudio para Cloruro de Metileno.

Tabla XI Valores de Concentración y Area de respuesta de Cloruro de Metileno, para determinar la linealidad del sistema.

NIVEL (%)	Concentración (µg / mL)	Respuesta (µV-seg)
60	1.21	11422
		10862
		11281
		10819
80	1.61	14980
		12239
		13458
		14596
100	2.02	15730
		15932
		15680
		17618
120	2.42	19092
		17950
		17062
		18400
140	2.82	22946
		20767
		21649
		23305

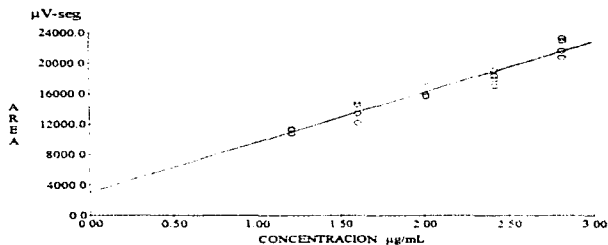


Figura Nº20 Curva de Area absoluta vs Concentración para evaluar la linealidad del sistema con Cloruro de metileno a cinco niveles de concentración.

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:

$$a = 6556.1$$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:

$$b = 3065.3$$

Coeficiente de correlación:

$$r = 0.96952$$

PRECISION DEL SISTEMA**VARIACION DEL FACTOR DE RESPUESTA
EN TODO EL INTERVALO AL NIVEL 100%**

$n = 20$	$n = 4$
Promedio = 1.225×10^{-4}	Promedio = 1.245×10^{-4}
Desv. std. = 1.081×10^{-5}	Desv. std. = 6.712×10^{-6}
c.v. = 8.83	c.v. = 5.39

ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA (6.7).

Tabla XII Análisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del sistema para Cloruro de Mercurio.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE			
FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACION DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESION	3	4162236	1387412
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACION DE LA MEDIA)	15	13710160	10941E-06
TOTAL	18	17872432	

F calculada = 1.52 F tablas = 3.29 con un $\alpha = 0.05$ g.L. = (3,15)

Conclusión = Debido a que F calculada < F tablas. Se puede concluir que el sistema tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentracion estudiado. La hipótesis nula no se rechaza.

6.1.3.- Estudio para Piridina.

Tabla XIII Valores de Concentración y Área relativa de Piridina, para determinar la linealidad del sistema.

NIVEL (%)	Concentración (µg / mL)	Respuesta área relativa a n-Propanol
60	1.20	0.2412
		0.2619
		0.2707
		0.2747
80	1.59	0.3538
		0.3611
		0.3660
		0.3600
100	1.99	0.4146
		0.4570
		0.4557
		0.4398
120	2.39	0.5402
		0.5483
		0.5400
		0.5456
140	2.79	0.6386
		0.6440
		0.6735
		0.6297

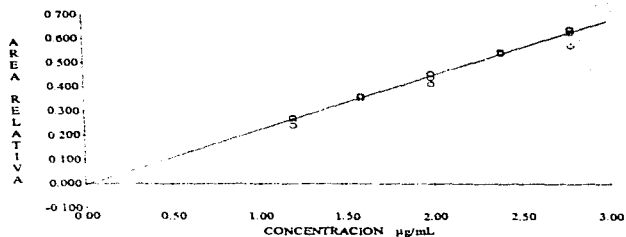


Figura N°21 Curva de Área relativa vs Concentración para evaluar la linealidad del sistema con Piridina a cinco niveles de concentración

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:

$a = 0.22643$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:

$b = -0.00517$

Coeficiente de correlación:

$r = 0.99141$

PRECISION DEL SISTEMA**VARIACION DEL FACTOR DE RESPUESTA****EN TODO EL INTERVALO**

$n = 20$
 Promedio = 4.4809
 Desv. std. = 0.1818
 c.v. = 4.06

AL NIVEL 100%

$n = 4$
 Promedio = 4.5146
 Desv. std. = 0.2089
 c.v. = 4.63

ANALISIS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA (6.7).

Tabla XIV Analisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del sistema para Piridina.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACION DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESION	3	0.0005143	0.0001714
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACION DE LA MEDI)	15	0.0051482	2913.7
TOTAL	18	0.0056624	

F calculada = 0.5 F tablas = 3.29 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (3,15)

Conclusión = Debido a que F calculada < F tablas. Se puede concluir que el sistema tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentracion estudiado. La hipotesis nula no se rechaza

6.2.- LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL METODO

Se determinó al analizar réplicas de soluciones de Sulfametoxazol materia prima libre de orgánicos volátiles adicionado con las sustancias de interés, en un intervalo de concentraciones del 80 al 120% del valor límite permitido por la U.S.P., preparadas tal y como se describe en el punto 4.3.10.2. y analizadas en el sistema y condiciones descritas en el punto 4.2.

Este experimento se llevó a cabo en forma simultánea con la determinación de la linealidad del sistema.

Las formulas necesarias para realizar los cálculos del ajuste de la curva por mínimos cuadrados, el cálculo de homoscedasticidad del método, el análisis de varianza para la prueba de linealidad y la determinación de errores sistemáticos y proporcionales se pueden encontrar en la bibliografía al final de este trabajo (6,7)

Los resultados obtenidos para cada una de las sustancias de interés se presentan a continuación.

6.2.1.- ESTUDIO PARA BENCENO

Tabla XV Valores de Concentración Nominal, de concentración Experimental y sus Estadísticos, para la determinación de la linealidad del Método de Benzeno

NIVEL %	CONC. NOMINAL	CONC. EXPERIMENTAL	ESTADÍSTICOS POR NIVEL	
	µg/mL	µg/mL		
80	1.6278	1.6250	n =	5
	1.6278	1.6218	Promedio =	1.50296
	1.6278	1.4175	Desv. std. =	0.117334
	1.6278	1.4670	c v =	7.57
	1.6278	1.3838		
	2.0348	1.8181	n =	5
100	2.0348	1.8601	Promedio =	1.93588
	2.0348	1.9963	Desv. std. =	0.0915097
	2.0348	1.0763	c v =	4.73
	2.0348	2.0286		
	2.4417	2.3182	n =	5
	2.4417	2.1548	Promedio =	2.30832
120	2.4417	2.3586	Desv. std. =	0.0884540
	2.4417	2.3357	c v =	3.83
	2.4417	2.3743		

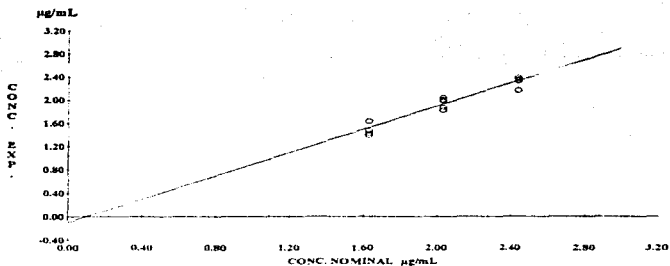


Figura Nº 22 Curva de Concentración experimental vs Concentración nominal para la determinación de la linealidad del método analítico para Benceno, a tres niveles de concentración

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:

$$a = 0.98951$$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:

$$b = -0.09770$$

Coefficiente de correlación:

$$r = 0.96505$$

Error estándar de estimación

$$S_e = 0.0959056$$

CALCULO DE HOMOSCEDASTICIDAD DEL METODO

Todas las ecuaciones y las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos son válidas si el sistema estudiado es homoscedástico.

Para determinar si las muestras de todo el intervalo de la linealidad y la muestra del nivel al 100%, provienen de poblaciones que tienen la misma varianza, realizamos una prueba F bilateral a un nivel de confiabilidad del 95%.

$$F \text{ calculada} = S_e^2 / S_y^2 = 1.0983845$$

$$F 0.025 \text{ (G.L. 1, G.L. 2)} < F \text{ calc.} < F 0.975 \text{ (G.L. 1, G.L. 2)}$$

$$F 0.025 \text{ (13,4)} < F \text{ calc.} < F 0.975 \text{ (13,4)}$$

$$0.25 < 1.0983845 < 8.75$$

Donde:

S_e = Error estándar de estimación.

S_y = Desviación estándar de la concentración cuantificada al nivel 100% = 0.0915097

G.L. 1 = Grados de libertad de numerador (Número de pares ordenados - 2) = 13

G.L. 2 = Grados de libertad de denominador (Número de réplicas al 100% - 1) = 4

De este resultado podemos concluir que el método analítico es homoscedástico en el intervalo de concentración elegido, pues el valor de la F calculada esta dentro de los límites encontrados.

EXACTITUD DEL METODO EN TODO EL INTERVALO

n =	15
Promedio =	94.0
Desv. std. =	5.004
c.v. =	5.32

AL NIVEL 100%

n =	5
Promedio =	95.1
Desv. std. =	4.497
c.v. =	4.73

ANALISIS DE LA LINEALIDAD DEL METODO^(6,7).

Con el objetivo de saber si la curva de regresión es una recta, se realiza un análisis de varianza, donde se espera que los valores medios de la concentración experimental se localicen en una recta de pendiente "a" y ordenada al origen "b" y que su desviación de la recta de regresión sea pequeña con respecto a las desviaciones de los valores de cada grupo y respecto a la media correspondiente. Por lo tanto, la prueba de hipótesis propuesta es la siguiente:

$$H_0: y = a x + b$$

$$H_a: y \neq a x + b$$

Tabla XVI Análisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del método para Benceno.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE			
FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACION DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESION	1	0.003038	0.003038
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACION DE LA MEDI)	12	0.116534	102.97
TOTAL	13	0.119573	

F calculada = 0.31 F tablas = 4.75 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (1,12)

Conclusión = Debido a que F calculada < F tablas. Se puede concluir que el método analítico tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado. La hipótesis nula no se rechaza.

DETERMINACION DE ERRORES SISTEMATICOS.

ERROR SISTEMATICO DE TIPO CONSTANTE ^(6,7).

t calculada = -0.6359

t tablas = 1.77 con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

ERROR SISTEMATICO DE TIPO PROPORCIONAL ^(6,7).

t calculada = -0.1406

t tablas = 1.77 con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

Debido a que t calculada < t tablas en ambas pruebas, podemos concluir que en el método analítico no existen errores sistemáticos de tipo constante ni de tipo proporcional, es decir, que la ordenada al origen es 0 (cero) y la pendiente es 1 (uno).

6.2.2.- ESTUDIO PARA CLORURO DE METILENO

Tabla XVII Valores de Concentración Nominal, de concentración Experimental y sus Estadísticos, para la determinación de la linealidad del Metodo de Cloruro de metileno.

NIVEL %	CONC. NOMINAL (µg/mL)	CONC. EXPERIMENTAL (µg/mL)	ESTADÍSTICOS POR NIVEL
80	1.6137	1.6593	n = 5
	1.6137	1.7014	Promedio = 1.46674
	1.6137	1.3328	Desv. std = 0.2057469
	1.6137	1.4102	c.v. % = 14.03
	1.6137	1.2300	
100	2.0171	1.9883	n = 5
	2.0171	1.7478	Promedio = 1.94652
	2.0171	2.0611	Desv. std = 0.2142943
	2.0171	2.0651	c.v. % = 11.01
	2.0171	2.1709	
120	2.4206	2.2987	n = 5
	2.4206	2.1809	Promedio = 2.28672
	2.4206	2.2932	Desv. std = 0.0737562
	2.4206	2.3061	c.v. % = 3.23
	2.4206	2.3690	

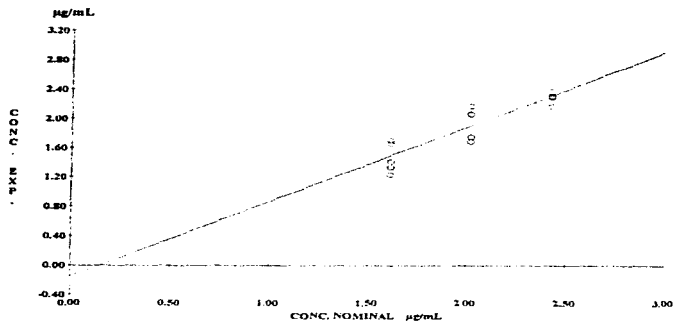


Figura Nº 23 Curva de Concentración experimental vs Concentración nominal para la determinación de la linealidad del metodo analítico para Cloruro de Metileno, a tres niveles de concentración

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:

$$a \approx 1.01620$$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:

$$b \approx -0.14982$$

Coeficiente de correlación:

$$r \approx 0.90071$$

Error estándar de estimación

$$Se = 0.1734346$$

CALCULO DE HOMOSCEDASTICIDAD DEL METODO

Todas las ecuaciones y las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos son válidas si el sistema estudiado es homoscedástico.

$$F \text{ calculada} \approx Se^2 / Sy^2 = 0.6550138$$

$$F 0.025 (13,4) \approx F \text{ calc.} \approx F 0.975 (13,4)$$

$$0.25 \approx 0.6550138 \approx 8.75$$

De este resultado podemos concluir que el método analítico es homoscedástico en el intervalo de concentración elegido, pues el valor de F calculada esta dentro de los límites encontrados.

**EXACTITUD DEL METODO
EN TODO EL INTERVALO**

$$n \approx 15$$

$$\text{Promedio} \approx 93.9$$

$$\text{Desv. std.} \approx 9.333$$

$$\text{c.v.} \approx 9.93$$

AL NIVEL 100%

$$n \approx 5$$

$$\text{Promedio} \approx 96.5$$

$$\text{Desv. std.} \approx 10.624$$

$$\text{c.v.} \approx 11.01$$

ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO (6,7).

Tabla XVIII Análisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del método para Cloruro de Metileno.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE			
FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACION DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESION	1	0.016259	0.016259
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACION DE LA MEDIA)	12	0.374775	32.02
TOTAL	13	0.391034	

$F_{calculada} = 0.52$ $F_{tablas} = 4.75$ con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (1,12)

Conclusión = Debido a que $F_{calculada} < F_{tablas}$ Se puede concluir que el método analítico tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado. La hipótesis nula no se rechaza.

DETERMINACION DE ERRORES SISTEMATICOS

ERROR SISTEMATICO DE TIPO CONSTANTE (6,7).

$t_{calculada} = -0.5392$

$t_{tablas} = 1.77$ con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

ERROR SISTEMATICO DE TIPO PROPORCIONAL (6,7).

$t_{calculada} = 0.1192$

$t_{tablas} = 1.77$ con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

Debido a que $t_{calculada} < t_{tablas}$ en ambas pruebas, podemos concluir que en el método analítico no existen errores sistemáticos de tipo constante ni de tipo proporcional, es decir, que la ordenada al origen es 0 (cero) y la pendiente es 1 (uno).

6.2.3.- ESTUDIO PARA PIRIDINA

Tabla XIX Valores de Concentración Nominal, concentración Experimental y sus Estadísticos, para la determinación de la linealidad del Método de Piridina.

NIVEL %	CONC. NOMINAL X µg/mL	CONC. EXPERIMENTAL Y µg/mL	ESTADÍSTICOS POR NIVEL
80	1.5936	1.3868	n = 5
	1.5936	1.4441	Promedio = 1.44542
	1.5936	1.4281	Desv. std = 0.0417336
	1.5936	1.4730	c.v. = 2.89
	1.5936	1.4951	
100	1.9920	1.8631	n = 5
	1.9920	1.7849	Promedio = 1.80248
	1.9920	1.7656	Desv. std = 0.0400942
	1.9920	1.8225	c.v. = 2.22
	1.9920	1.7763	
120	2.3904	2.1014	n = 5
	2.3904	2.0937	Promedio = 2.1151
	2.3904	2.0772	Desv. std = 0.0447969
	2.3904	2.1111	c.v. = 2.12
	2.3904	2.1921	

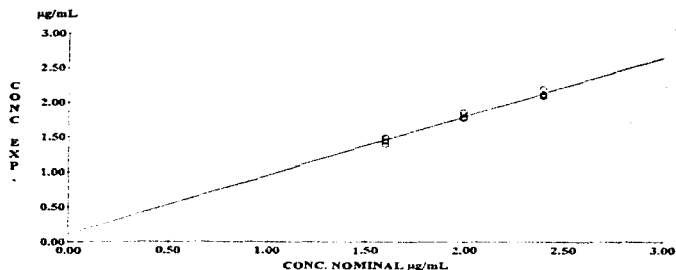


Figura N° 24 Curva de Concentración experimental vs Concentración nominal para la determinación de la linealidad del método analítico para Piridina, a tres niveles de concentración.

RESULTADOS DEL AJUSTE DE LA CURVA POR MINIMOS CUADRADOS

Pendiente de la ecuación de regresión:
 $a = 0.84046$

Ordenada al origen de la ecuación de regresión:
 $b = 0.11347$

Coefficiente de correlación:
 $r = 0.98987$

Error estándar de estimación
 $Se = 0.0421260$

CALCULO DE HOMOSCEDASTICIDAD DEL METODO

Todas las ecuaciones y las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos son válidas si el sistema estudiado es homoscedástico

$$F \text{ calculada} = Se^2 / Sy^2 = 1.1039203$$

$$F 0.025 (13,4) = F \text{ calc.} = F 0.975 (13,4)$$

$$0.25 = 1.1039203 = 8.75$$

De este resultado podemos concluir que el metodo analítico es homoscedástico en el intervalo de concentración elegido, pues el valor de F calculada esta dentro de los limites encontrados.

EXACTITUD DEL METODO EN TODO EL INTERVALO

$n = 15$
 Promedio = 89.89
 Desv. std. = 2.278
 e.v. = 2.53

AL NIVEL 100%

$n = 5$
 Promedio = 90.49
 Desv. std. = 2.013
 e.v. = 2.22

ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO (6,7).**Tabla XX.** Análisis de varianza de carencia de ajuste para la prueba de linealidad del método para Piridina.

PRUEBA DE CARENCIA DE AJUSTE			
FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
DESVIACIÓN DE MEDIAS DEBIDA A LA REGRESIÓN	1	0.001646	0.001646
DENTRO DE GRUPOS (DESVIACIÓN DE LA MEDIA)	12	0.021424	0.001785
TOTAL	13	0.023070	

F calculada = 0.92 F tablas = 4.75 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (1,12)

Conclusión = Debido a que F calculada < F tablas. Se puede concluir que el método analítico tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado. La hipótesis nula no se rechaza.

DETERMINACION DE ERRORES SISTEMATICOS**ERROR SISTEMÁTICO DE TIPO CONSTANTE (6,7).**

t calculada = 1.68

t tablas = 1.77 con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

ERROR SISTEMÁTICO DE TIPO PROPORCIONAL (6,7).

t calculada = 4.77

t tablas = 1.77 con un $\alpha = 0.05$, g.l. = 13

De este resultado podemos concluir que en el método analítico no existen errores sistemáticos de tipo constante (t calculada < t tablas), es decir que la ordenada al origen es cero (0), sin embargo si existen errores sistemáticos de tipo proporcional (t calculada > t tablas), lo cual quiere decir que la pendiente es significativamente diferente a 1 y por lo tanto será necesario usar un factor de corrección en los resultados (1,a).

6.3.- TOLERANCIA DEL METODO

La tolerancia del método se determinó con el objetivo de saber de que magnitud podrían ser las diferencias en las variables críticas del método analítico.

Se analizaron muestras de la solución patrón de referencia al 100%, preparadas como se describe en el punto 4.3.7, a un nivel alto y uno bajo alrededor del valor óptimo encontrado para la variable de interés y con las otras variables fijas, según las condiciones establecidas en el punto 4.2.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza simple^(6,7) y el criterio aplicado fue el siguiente:

Si la diferencia en la varianza de la respuesta promedio obtenida para cada disolvente a los niveles estudiados de la variable resultaba significativa, el sistema se consideraba no tolerante a modificaciones en ella

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes tablas construidas para el análisis en cada variable y para cada disolvente:

6.3.1.- TOLERANCIA DEL METODO A LA CANTIDAD PESADA DE SULFATO DE SODIO

Tabla XXI Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la cantidad pesada de Sulfato de sodio. Efecto sobre la respuesta de Cloruro de metileno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	20560396.8	10280198.4
DENTRO DE GRUPOS	15	3961919	264127.9
TOTAL	17	24522315.8	

F calculada = 38.9

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXII Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la cantidad pesada de Sulfato de sodio. Efecto sobre la respuesta de Benceno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	658339134	329169567
DENTRO DE GRUPOS	15	186250630	12416708
TOTAL	17	844589764	

$F_{calculada} = 26.5$

$F_{tablas} = 3.68$ con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXIII Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la cantidad pesada de Sulfato de sodio. Efecto sobre la respuesta de Piridina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	0.00028	0.00014
DENTRO DE GRUPOS	15	0.00251	0.00017
TOTAL	17	0.00281	

$F_{calculada} = 0.83$

$F_{tablas} = 3.68$ $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

CONCLUSION

De los resultados anteriores se concluye que el método es no tolerante a cambios en la cantidad utilizada de sulfato de sodio en el vial para Benceno y Cloruro de Metileno ($F_{calculada} > F_{tablas}$), aunque si lo es para Piridina ($F_{calculada} < F_{tablas}$).

6.3.2.- TOLERANCIA DEL METODO EN LA TEMPERATURA DE EQUILIBRIO.

Tabla XXIV Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de equilibrio del sistema. Efecto sobre la respuesta de Cloruro de metileno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	5706283	2853141
DENTRO DE GRUPOS	15	954160	636107
TOTAL	17	15247891	

F calculada = 4.48

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXV Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de equilibrio del sistema. Efecto sobre la respuesta de Benceno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	130341074	65170537
DENTRO DE GRUPOS	15	380299212	25353280
TOTAL	17	510640286	

F calculada = 2.57

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXVI Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de equilibrio del sistema. Efecto sobre la respuesta de Piridina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	0.00027	0.00014
DENTRO DE GRUPOS	15	0.00107	0.00007
TOTAL	17	0.00134	

F calculada = 1.96

F (tablas = 3 e 8 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

CONCLUSION.

De los resultados anteriores se concluye que el método es no tolerante a cambios en la temperatura de equilibrio con Cloruro de Metileno (F calculada > F tablas), aunque para Benceno y Piridina no hay cambio significativo de la respuesta en los tres niveles estudiados (F calculada < F tablas).

6.3.3.- TOLERANCIA DEL METODO EN LA PRESION DE PRESURIZACION

Tabla XXVII Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la presión del sistema. Efecto sobre la respuesta de Cloruro de Metileno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	14315556	7157278
DENTRO DE GRUPOS	15	3213120	13496133
TOTAL	17	17528676	

F calculada = 33.41

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXVIII Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la presión del sistema. Efecto sobre la respuesta de Benceno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	6760320e1	338016030
DENTRO DE GRUPOS	15	202442908	13496133
TOTAL	17	8784740e9	

F calculada = 25.0

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

Tabla XXIX Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la presión del sistema. Efecto sobre la respuesta de Piridina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	0.00012	0.00006
DENTRO DE GRUPOS	15	0.00076	0.000051
TOTAL	17	0.00088	

F calculada = 1.18

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.l. = (15,2)

CONCLUSION

De los resultados anteriores se concluye que el método es no tolerante a cambios en la presión a la que se someten los viales para Benceno y Cloruro de Metileno (F calculada $>$ F tablas), aunque para Piridina no hay cambio significativo de la respuesta en los tres niveles estudiados (F calculada $<$ F tablas).

6.3.4.- TOLERANCIA DEL METODO EN LA TEMPERATURA DE LA LINEA DE TRANSFERENCIA

Tabla XXX Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de la línea de transferencia del sistema. Efecto sobre la respuesta de Cloruro de Metileno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	7868611	3934305
DENTRO DE GRUPOS	15	8519954	567996
TOTAL	17	16388565	

F calculada = 6.93

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.L = (15,2)

Tabla XXXI Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de la línea de transferencia del sistema. Efecto sobre la respuesta de Benceno.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	353675323	17683766
DENTRO DE GRUPOS	15	399033504	24602233
TOTAL	17	722708827	

F calculada = 7.19

F tablas = 3.68 con un $\alpha = 0.05$ g.L = (15,2)

Tabla XXXII Análisis de varianza de una vía para determinar la tolerancia del método a variaciones en la temperatura de la línea de transferencia del sistema. Efecto sobre la respuesta de Piridina.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO
ENTRE GRUPOS	2	0 00104	0 00052
DENTRO DE GRUPOS	15	0 00223	0 000149
TOTAL	17	0 00327	

F calculada = 3 40

F tablas = 3 68 con un $\alpha = 0 05$ g.L. = (15,2)

CONCLUSION.

De los resultados anteriores se concluye que el método es no tolerante a cambios en la temperatura de la línea de transferencia del sistema automático de muestreo de vapor confinado, para Benceno y Cloruro de Metileno (F calculada > F tablas), aunque para Piridina no hay cambio significativo de la respuesta en los tres niveles estudiados (F calculada < F tablas).

7.-CONCLUSIONES

1.- Se obtuvo una resolución de 1.64, 7.05 y 11.74 entre Cloruro de Metileno, n-Propanol, Benceno y Piridina respectivamente, con un tiempo de análisis cromatográfico de 8 minutos a las condiciones propuestas.

2.- Se encontraron los valores óptimos para los parámetros de trabajo del sistema de muestreo de vapor confinado (" Headspace ").

3.- Se encontró que el sistema es lineal en el intervalo estudiado (60 - 140 ppm), para las tres sustancias de interés (Benceno, Cloruro de metileno y Piridina).

4.- Se encontró que el método analítico es lineal y exacto en el intervalo estudiado (80 - 120 ppm), para las tres sustancias de interés.

5.- El uso del sistema automático de muestro de vapor confinado permite disminuir notablemente la manipulación de la muestra previa al análisis y obtener una precisión del 5 % (expresada como C.V.) mayor a la especificada por la U.S.P. (C.V. $\leq 15\%$).

6.- La repetibilidad alcanzada en el método analítico (C.V. $\leq 5\%$), es mejor que la especificada por la U.S.P. para la determinación de impurezas volátiles orgánicas (C.V. $\leq 15\%$).

7.- Se encontró que el sistema es no tolerante a cambios en la cantidad adicionada de sal (Na_2SO_4), para las tres sustancias de interés (2.5 ± 0.01 g).

8.- Es conveniente realizar la preparación e inyección de muestras de las sustancias orgánicas volátiles de interés bajo condiciones de temperatura controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

9.- El método analítico propuesto es no tolerante a cambios en las variables del sistema de muestreo de vapor confinado, lo cual significa que debe reproducirse tal como se especifica para obtener resultados equivalentes.

10.- Si se desea emplear este método para cuantificar disolventes orgánicos volátiles en otras formas farmacéuticas, es necesario demostrar que no hay interferencia de la matriz en el análisis.

8.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Eighth Supplement, U.S.P.-N.F., -467- Organic Volatile Impurities, Method IV, p. 335-4.
- 2.- J. A. Krasowski, H. Dinb, T. J. O'Hanlon et al., Comments on Organic Volatile Impurities, Method I, -467-, *Pharmaceutical Forum* 1991; 17(3): 1969-1971.
- 3.- Linda Clark, Stephen Scypinski, and Ann-Marie Smith, Proposed Modifications to USP Method V for Organic Volatile Impurities, *Pharmaceutical Forum* 1993; 19(2): 5067-5074
- 4.- Ted K. Chen, Winfried Moeckel, and Henry C. Surprenant, Proposed Changes to Method I for Organic Volatile Impurities -467-, *Pharmaceutical Forum* 1991, 17(1): 1475-1479.
- 5.- K. J. Dennis, P.A. Josephs, and J. Dokladalova, Proposed Automated Headspace Method for Organic Volatile Impurities -467- and other residual solvents, *Pharmaceutical Forum* 1992; 18(1): 2964-2972.
- 6.- Irwin Miller and John E. Freund, Probability and Statistics for Engineers, *Prenice-Hall, Inc.*, Englewood Cliffs, New Jersey, 1980 (version en español) pag. 215-220
- 7.- Erwin Krezig, Introduccion a la estadística matemática, principios y métodos, *Editorial Limusa*, Mexico, D.F., 1981, pag. 291-297.
- 8.- N. Irving Sax, Richard J. Lewis, Sr., Hazardous Chemical Desk Reference, *Van Nostrand Reinhold*, New York 1987.
- 9.- J. Angerer and K.H. Schaller, Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials Vol. 1, *Commission for the Investigation of the Health Hazards of Chemicals Compounds in the Work Area*, German Science Foundation., DFG.
- 10.- Colin F. Poak and Sheila A. Schutte, Contemporary Practice of Chromatography, *Elsevier Science Publishers, B.V.* 1985.
- 11.- Klaus Florey, Analytical profiles of drug substances, Vol 2, *Academic Press Inc.* New York 1975 pag. 467.
- 12.- B.V. Ioffe, A.G. Vitenberg, Headspace analysis and related methods in gas Chromatography, *John Wiley and Sons*, 1984.
- 13.- Procedures for Setting Limits for Organic Volatile Solvents With Methylene Chloride as an Example of the Process, Committee on Rational Specifications for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association *Pharmaceutical Forum* 1989; 15(6): 5748-5759

- 14.- Gary L. Sprague, SmithKline Beecham, and David L. Conine, Application of the PMA Procedure for Setting Residue Limits for Organic Volatile Solvents in Pharmaceuticals to **Chloroform**, Committee on Rational Specifications for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association, *Pharmaceutical Forum* 1990, 16(3): 543-549
- 15.- Lisa Brooks, Jeffrey S. Meltring, Application of the PMA Procedure for Setting Residue Limits for Organic Volatile Solvents in Pharmaceuticals to **1,4 Dioxano**, Committee on Rational Specifications for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association, *Pharmaceutical Forum* 1990, 16(3): 550-556.
- 16.- Bruce D. Naumann, Edward V. Sargent, Application of the PMA Procedure for Setting Residue Limits for Organic Volatile Solvents in Pharmaceuticals to **Trichloroethylene**, Committee on Rational Specifications for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association, *Pharmaceutical Forum* 1990, 16(3): 573-582.
- 17.- Diana Galer, Robert H. Ku, Charles S. Schwartz, Application of the PMA Procedure for Setting Residue Limits for Organic Volatile Solvents in Pharmaceuticals to **Benzene**, Committee on Rational Specifications for Impurities in Bulk Drug Substances-Pharmaceutical Manufacturers Association, *Pharmaceutical Forum* 1991, 17(1): 1443-1458.
- 18.- Richard W. Ramette, Equilibrio y analisis quimico, *Fondo Educativo Interamericano, Addison-Wesley Publishing Co.* Massachusetts, E. U. A. 1983.
- 19.- The Merck Index, An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biological, *Merck and Co., Inc.* Eleventh Edition Rahway, N. J., U.S.A. 1989
- 20.- Alfred Goodman Gilman, Theodore W. Rall, Alan S. Nies and Palmer Taylor, The Pharmacological Basis of Therapeutics, *Mc Graw Hill, Inc. Health Professions Division*, Eighth Edition, U.S.A. 1993.
- 21.- J. P. Guimbar, M. Person and J. p. Veignaud, Determination of residual solvents in pharmaceutical products by gas chromatography coupled to Head-space injection system and using an external standard, *Journal of Chromatography* (1987), 403, 109-121
- 22.- B. Kolb, Application of an automated Head-space procedure for trace analysis by gas chromatography, *Journal of Chromatography* (1976), 122, 553-568.
- 23.- Davis W. Foust and Michael S. Bergien, Analysis of solvent residues in pharmaceutical bulk drugs by wall coated open tubular gas chromatography, *Journal of Chromatography* (1989), 469, 161-173
- 24.- Jerome F. Harky and Thomas M. Stickney, Automated gas Chromatographic method for the determination of residual solvents in bulk Pharmaceuticals, *Journal of Chromatography* (1985), 321, 137-144
- 25.- Rex W. Souter, Gas chromatographic quantitation of residual impurities in raw material matrices, *Journal of Chromatography* (1980), 193, 207-212.

- 26.- Lawrence H. Keith, William Müller and David L. Smith, **Compilation of EPA's Sampling and analysis methods**, 1991, Lewis Publisher Inc.
- 27.- U.S. Environmental Protection Agency (E.P.A.), 1987, **National primary drinking water regulations sythetic organic chemicals; monitoring for unregulated contaminants; final rule**. 40 CFR Parts 141 & 142; Federal Register 52, No 130.
- 28.- U.S. E.P.A., 1986, **Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants under the clean water act**. 40 CFR Part 136, Federal Register 51, No 125.
- 29.- U.S. E.P.A., 600 / 4-8 - 039, **Method 524.2. VOC's in H₂O by Purge and Trap Capillary Column GC / MS.**
- 30.- F.D.A., **International Conference on Harmonisation, Guidelines Availability: Impurities in New Drug Substances**. Federal Register / Vol 61, N° 3 / Jan 4, 1996 / Notices.