

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PLANTEAMIENTO DEL DESARROLLO DE UNA  
METODOLOGÍA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA PARA  
EL ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA (VALPROATO DE  
MAGNESIO) PARA UN MEDICAMENTO”.**

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA**

PRESENTA

**LIDIA NOEMÍ LÓPEZ CUREÑO**

MÉXICO, D.F

2007



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	Profa. Silvia de Jesús Mendoza Arellano
Vocal	Prof. Francisco Rojo Callejas
Secretario	Prof. Adolfo García Osuna
1er. Suplente	Profa. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2do. Suplente	Profa. Zoila Nieto Villalobos

Sitio en donde se desarrolló el tema	Departamento de Química Analítica Edificio "A" Laboratorio 3 B Facultad de Química Ciudad Universitaria
--------------------------------------	--

Asesor del tema	Q. Adolfo García Osuna.
-----------------	-------------------------

Sustentante	Lidia Noemí López Cureño.
-------------	---------------------------

*Aquí termina hoy este viaje  
En que me habéis acompañado  
A través de la noche y el día  
Y del mar y del hombre.*

*Todo cuanto os he dicho,  
Pero mucho más es la vida.*

*P.N.*

*Agradezco a Dios por haberme dado la luz de la vida y  
haberme puesto en este lugar y en este tiempo; pues me ha dejado  
conocer a personas maravillosas que han llenado mi vida de  
amor y sabiduría.*

*A mi Abuelita Teté por su amor y ejemplo de fortaleza.*

*A mis Papás Javier y Fela por su amor, ejemplo, apoyo,  
comprensión y paciencia incondicional.*

*A mis hermanos Belém, Rive e Ivan por los momentos que  
compartimos y nos hicieron crecer juntos.*

*Y a la más pequeña Aura por su alegría de vivir.*

*A mis amigos Yani, y Luis, Paty, Ale, Marco y Charly por  
todos los momentos compartidos y su apoyo incondicional.*

*A todos mis Tíos y Primos por estar siempre conmigo.*

*Y a mi Ángel porque ha llevado mi vida por un camino que no imaginé.*

*LNCC*

*Gracias a todas aquellas personas que me han regalado una sonrisa, pues eso me impulsa a seguir adelante.*

*Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y  
A la Facultad de Química.*

*Y especialmente al Q. Adolfo García Osuna por su apoyo en la realización de este trabajo.*

# ÍNDICE

<u>CAPÍTULO</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.- INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA</b>	<b>3</b>
<b>2.1 MATERIA PRIMA</b>	<b>4</b>
<b>2.2 CROMATOGRAFÍA</b>	<b>5</b>
<b>2.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES</b>	<b>6</b>
<b>III.- OBJETIVO</b>	<b>13</b>
<b>IV.- DISCUSIÓN Y DESARROLLO DEL TEMA</b>	<b>15</b>
<b>4.1 PLANTEAMIENTO GENERAL</b>	<b>16</b>
<b>4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b>	<b>17</b>
<b>4.3 TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA Y     PLANTEAMIENTO DE SU ANÁLISIS CUANTITATIVO</b>	<b>20</b>
<b>4.4 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL SISTEMA     Y RESULTADOS CUANTITATIVOS</b>	<b>22</b>
<b>V.- CONCLUSIONES</b>	<b>24</b>
<b>VI.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>29</b>

# **CAPÍTULO I**

# **INTRODUCCIÓN**

# 1.- INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica se manejan diferentes tipos de materiales que formarán parte de la composición de un medicamento, el cual sale al mercado para consumo humano; por lo que es de suma importancia conocer las características físicas y químicas de ésta, entre ellas la pureza de las materias primas que se utilizan como principio activo en el medicamento; este conocimiento ayuda a dosificar el principio activo y a que la forma farmacéutica tenga el nivel terapéutico adecuado que ayude a mejorar nuestra salud.

En la industria farmacéutica las técnicas cromatográficas son muy utilizadas para éste propósito, ya que proporcionan sensibilidad, rapidez y confianza en sus resultados. Por lo anterior es importante para el usuario de esta técnica el conocer la información necesaria que le lleve a tomar las decisiones adecuadas y optimizarlas condiciones de trabajo a buscar, para resolver de la mejor manera el problema planteado.

En este trabajo se propondrá el planteamiento de cómo aplicar la técnica de cromatografía de gases para la cuantificación como materia prima del Valproato de Magnesio que se utiliza como principio activo en medicamentos.

Se tratarán de indicar los pasos básicos para elegir las mejores condiciones de trabajo en esta técnica, dejando ver con esto qué criterios se toman para llegar a dicha conclusión.



**CAPÍTULO II**  
**INFORMACIÓN**  
**GENERAL SOBRE**  
**EL TEMA**

## 2.- INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA

### 2.1.- Materia prima

El Valproato de Magnesio es una sustancia utilizada terapéuticamente como un antiepiléptico de amplio espectro, que ha demostrado su eficacia en el control de las crisis generalizadas y parciales. El Valproato es un medicamento de elección en síndromes epilépticos que cursan con ausencias, epilepsia fotosensible y aquellas que cursan con múltiples tipos de crisis como las encefalopatías epilépticas, también está indicado en los casos de crisis febriles atípicas, es útil en el episodio maniaco asociado con la enfermedad bipolar, y está indicado para la profilaxis de las cefaleas de tipo migraña.<sup>1</sup>

Después de una dosis oral en el torrente circulatorio las sales de Valproato se hidrolizan rápidamente a Ácido Valpróico, y como ácido graso se fija altamente a las proteínas plasmáticas (80 a 95%) alcanzando su máxima concentración en 1 a 4 horas. Se distribuye rápidamente en todo el cuerpo, se metaboliza en el hígado y es excretado por la orina, algo se elimina por las heces y en el aire exhalado. Los valores de la leche materna son de 1 a 10% de los valores séricos.<sup>2</sup>

El Valproato de Magnesio aumenta los niveles cerebrales de GABA (ácido gama amino butírico) y potencia sus efectos post-sinápticos inhibidores. GABA es un neurotransmisor central con actividad inhibidora, con lo que la acción del Valproato es una disminución neta del umbral convulsivo, ya que inhibe las enzimas encargadas de degradar el GABA, también tiene un efecto activador sobre el glutamato descarboxilasa, la enzima que se encarga de la síntesis del GABA.<sup>1</sup>

El Valproato de Magnesio tiene un peso molecular de 310,715g/mol; su fórmula condensada es  $C_{16}H_{30}MgO_4$ . Es un polvo amorfo, blanco soluble en agua al 1%, metanol, y alcohol caliente. Para ser utilizado como principio activo en un medicamento debe contener no menos del 98% de pureza y no más de 5% de contenido de agua. Por analizarse no en su forma de sal sino libre como ácido se dan las cualidades de este compuesto también.<sup>3,4</sup>

El Ácido Valpróico es un líquido claro, incoloro o ligeramente amarillo, ligeramente viscoso, muy ligeramente soluble en agua, miscible en alcohol y en cloruro de metileno. Tiene un peso molecular de 144,20g/mol, y su fórmula condensada es  $C_8H_{16}O_2$ .<sup>5,6,7,8,9</sup>

## **2.2.- Cromatografía**

La cromatografía es una técnica que presentó su etapa de mayor desarrollo a mediados del siglo XX que permite la separación de sustancias que se encuentren en una mezcla. Es un método físico de separación siendo la característica que la distingue de otros métodos físicos y químicos de separación la distribución de la sustancia entre dos fases una estacionaria y otra móvil. El nombre de cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, las cuales se observaron como bandas coloridas, (kromos: color, graphos: descripción).<sup>10</sup>

La mezcla de la muestra, que se pone en contacto con la fase móvil, produce una serie de interacciones (particiones) repetitivas entre la fase estacionaria y la fase móvil. Las interacciones se basan en las diferencias de propiedades físicas y químicas de las componentes de la muestra. Estas diferencias determinan la velocidad de migración de los componentes individuales, bajo la influencia de una fase móvil que se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado es el primero en salir, es decir, el que tiene menos interacción con la fase estacionaria, y el material más fuertemente retenido es el último en salir pues tiene más interacción con la fase estacionaria.<sup>11</sup>

En general la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido, y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

Así la cromatografía es un método de separación de una muestra entre dos fases. Este método es muy utilizado en la Química Analítica, aplicándose tanto en compuestos orgánicos como inorgánicos.<sup>11,12</sup>

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

### **I.- CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

a) Mecanismo de separación:

- ✓ Gas – líquido (partición).
- ✓ Gas – sólido (adsorción).

b) Tipo de muestra:

- ✓ Fase de vapor.

- ✓ Líquida.

## II.- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.

### a) Cromatografía plana:

- ✓ Capa delgada (adsorción).
- ✓ Papel (partición).

### b) Cromatografía en columna:

- ✓ Líquido – sólido (adsorción).
- ✓ Líquido – líquido (reparto).
- ✓ Fases químicamente unidas.
- ✓ Intercambio iónico.
- ✓ Pares de iones.
- ✓ De exclusión.<sup>10</sup>

Estas dos técnicas instrumentales proporcionan una herramienta poderosa para la separación y cuantificación de sustancias puras o de mezclas complejas, ya que con ellas se tienen bajos niveles de detección, con una excelente precisión, por lo que son muy utilizadas en la industria farmacéutica.<sup>13</sup>

### **2.3.- Cromatografía de gases**

Con la cromatografía de gases podemos separar mezclas complejas o solutos muy parecidos (poder de separación y resolución), es una técnica rápida donde se pueden obtener los resultados en minutos utilizando un volumen en microlitros de muestra.

El comportamiento cromatográfico de una sustancia puede describirse de muchas maneras, donde los parámetros de uso más frecuente son el tiempo de retención y la relación de partición. Al variar las combinaciones de fase estacionaria y móvil, y los diversos parámetros de operación, el grado de retención puede variar desde una retención total hasta un estado de migración total.<sup>11</sup>

La optimización de los parámetros de operación implica una combinación adecuada de una buena separación de los máximos de los picos, la obtención de picos compactos y una alta velocidad de elución.<sup>11</sup>

## INSTRUMENTO.

Las partes básicas de un cromatógrafo de gases son:<sup>12,13</sup>

- 1.- Cilindro de gas portador (fuente de fase móvil).
- 2.- Control de caudal de gas (flujo).
- 3.- Inyector (entrada de la muestra).
- 4.- Horno y columna analítica (termostato de la columna).
- 5.- Detector (salida de la muestra).
- 6.- Integradores o computadoras (registro gráfico y procesamiento de éste).

La secuencia de una separación cromatográfica de gases es como sigue:

Una muestra que contiene los solutos se inyecta en un bloque de calentamiento donde se vaporiza instantáneamente y se arrastra en forma de vapor por medio de un gas transportador hacia la entrada de la columna. Los solutos se adsorben dentro de la columna en la fase estacionaria y después son desorbidos hacia la fase móvil. Cada soluto se moverá a su propia velocidad a través de la columna dependiendo a su peso y constante de equilibrio que tiene entre las 2 fases y, por consiguiente, esto forma un pico de tipo gaussiano por cada soluto. Los picos se separarán en una magnitud dependiente de las proporciones de partición de los solutos y del grado de desplazamiento de los picos. Los solutos eluyen sucesivamente en orden creciente de sus proporciones de partición y entran a un detector conectado a la salida de la columna. Las señales aparecen en un gráfico generado por el integrador o computadora en forma de una curva de la composición de la corriente del gas portador en función del tiempo conocido como cromatograma. El tiempo en el que emerge un pico identifica al componente, y el área de dicho pico indica la concentración del componente en la mezcla.<sup>11,12</sup>

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas y la estacionaria un sólido, o un líquido. En la cromatografía gas-sólido el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, que puede ser carbón, porapak, carbosphere, etc.. En la cromatografía de gas-líquido, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como chromosorb (tierra de diatomeas), etc. y el gas que transporta al soluto.<sup>10</sup>

Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas transportador a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases. El gas transportador debe cumplir con algunos requisitos como: ser de baja viscosidad, inerte, inocuo, de alta pureza y económico. Podemos encontrar con estas características al hidrógeno, nitrógeno, y helio, los cuales están disponibles en cilindros provistos de válvulas para regular la presión y el control adecuado de la velocidad de flujo requerida para el análisis. El flujo recomendado está entre los 25 a 60ml/min para columnas empacadas y de 1 a 3ml/min para capilares.<sup>10,13</sup>

El problema más crítico de la cromatografía de gases es el sistema de inyección de la muestra. La muestra debe introducirse como vapor en el volumen más pequeño y en un mínimo de tiempo, sin descomponerla o fraccionarla. Tanto la cantidad de muestra introducida como la técnica para hacerlo, deben ser reproducibles con un alto grado de precisión.<sup>11</sup>

La columna efectúa la separación, por lo que escoger la columna apropiada es la decisión más importante para tener una buena técnica para cromatografía de gases. Para esto debe tomarse en cuenta: el tipo de fase líquida, los soportes sólidos, la tubería si es capilar (de vidrio o sílice fundida) o empacada (de vidrio o metal), la longitud y diámetro de éstas.<sup>12</sup>

La columna está en el horno y se mantiene a una temperatura, seleccionada, la cual determina el tiempo de retención y en cierta manera la resolución y la eficiencia de la columna.<sup>10</sup>

Las columnas capilares tienen diámetros internos de 0,2 a 0,53mm y de 5 a 60m de longitud, en las columnas empacadas se utilizan varias dimensiones pero normalmente son de 0,6 a 1,8m de longitud y de 2 a 4mm de diámetro interno. Las columnas capilares tienen una ventaja sobre las columnas empacadas en cuanto a la gran eficiencia que tienen las primeras (casi 20 veces más platos teóricos) proporcionando una mejor resolución en mezclas más complejas. Las columnas empacadas de capacidad muy baja que tienen alrededor del 5%(w/w) o menos de fase líquida en el soporte sólido, son las más adecuadas para el soporte analítico. Las columnas de alta capacidad como aquellas que tienen un 20%(w/w) de fase líquida pueden ser utilizadas para algunas sustancias de peso molecular muy bajo.<sup>10</sup>

Los materiales utilizados como soporte se encuentran disponibles en varios tamaños de partícula entre los usados son los de malla 80/100 y de 100/120, con columnas de 2 a 4mm de diámetro, este material debe ser totalmente inerte particularmente para fármacos polares que están separados en columna con fase líquida de baja capacidad y baja polaridad. Para el análisis

de fármacos frecuentemente se utiliza tierra diatomea calcinada y lavada con ácido. Las fases líquidas están compuestas por una gran variedad de sustancias tales como polietilenglicoles, ésteres, amidas de alto peso molecular, hidrocarburos y gomas de silicona (polisiloxanos sustituidos con metilos, fenilos, nitrilos, vinilos, fluoroalquilos o mezclas de estos grupos).<sup>10</sup>

Cuando el compuesto sale de la columna pasa a través del detector; en el detector debe controlarse la temperatura para prevenir la condensación. Los detectores más comunes en cromatografía de gases son los de conductividad térmica, ionización de flama, ionización de flama alcalina, captura de electrones y espectrómetro de masas.<sup>10</sup>

El uso de un detector de ionización de flama ya sea con helio o con nitrógeno como gas transportador, es lo más recomendado ya que dicho detector es sensible a todos los compuestos de carbono y tiene un intervalo amplio y dinámico de respuesta y no responde ni al aire ni al agua. El detector de flama alcalina es un detector específico para análisis de pesticidas, compuestos organofosforados, y halogenados. El detector de captura de electrones es selectivo a algunos compuestos que contienen halógenos o aminas. El espectrómetro de masas se puede emplear dependiendo de la naturaleza del análisis como parámetro de identificación de la sustancia no sólo por su tiempo de retención sino por el espectro de masas que se obtiene.<sup>10</sup>

Los detectores de cromatografía suelen operarse en forma diferencial con respecto a la concentración del soluto o a la velocidad de flujo de masa. Las unidades que se operan por concentración producen una señal que es proporcional a la concentración del soluto que atraviesa por el detector. Al graficar la señal en función del tiempo, se obtiene un pico de elución. Para estos detectores el área bajo el pico es proporcional a la masa de un componente e inversamente proporcional a la velocidad de flujo de la fase móvil. Es muy importante que el flujo de la fase móvil se mantenga constante cuando se usan detectores diferenciales, para poder llevar a cabo análisis cuantitativos. En los detectores diferenciales que se operan con base en la velocidad de flujo, el área del pico es directamente proporcional a la masa total y no existe una dependencia con respecto a la velocidad de flujo de la fase móvil.<sup>11</sup>

El registro de los datos obtenidos depende de la alternativa con que se cuente ya sea un registrador, un integrador, o una computadora con tarjetas A/D. Siendo esta última la que permite optimizar la calidad de los resultados y reprocesarlos cuando se necesite. Se pueden obtener datos cuantitativos a partir de las áreas bajo los picos calculando éstas gráficamente o por

medio de un integrador electrónico automático obteniéndose un cromatograma que podrá utilizarse para el análisis de datos y llevarnos a la cuantificación.<sup>13</sup>

En el análisis cuantitativo de los métodos instrumentales se pueden llevar a cabo diversos métodos dependiendo de la metodología utilizada.

- ▲ Método de normalización: En este caso se suman las áreas de cada uno de los compuestos obtenidos en el cromatograma donde se obtiene un área total y después se divide las áreas de cada uno de los compuestos entre el área total y se multiplica por 100.

$$A_1 + A_2 + A_3 = A_T$$

$$(A_1/A_T)100 = \%C_1$$

Éste es un cálculo muy simple, pero todos los picos en el cromatograma deben ser de los compuestos que formen a la muestra, por lo tanto deben de introducirse, separarse y detectarse.

- ▲ Método de normalización con factor de respuesta: En este método las áreas obtenidas del cromatograma se multiplica o dividen por el factor que compensa la respuesta que el compuesto da en el detector obteniendo un área corregida, realizándose posteriormente el mismo proceso mencionado para normalización.

$$A_1' + A_2' + A_3' = A_T'$$

$$(A_1'/A_T')100 = \%C_1$$

- ▲ Método de estándar externo: Se basa en la definición del factor de respuesta (Fr) de un detector y que por definición es:

$$Fr = \text{área} / \text{concentración}$$

y si se reordena la definición de la siguiente manera

$$\text{Área} = Fr \times \text{concentración}$$

se obtiene que si se grafica área vs concentración se puede obtener una curva de calibración de tendencia lineal, con tendencia al origen y cuya pendiente es el Fr (factor de respuesta).

- ▲ Método de estándar interno: Se basa en la definición del factor de respuesta relativo (Frr) que por definición es:



$$F_{rr} = Fr_M / Fr_{EI}$$

en donde

$$Fr_M = \text{área}_M / \text{área}_{EI}$$

$$Fr_{EI} = \text{concentración}_M / \text{concentración}_{EI}$$

y si se reordena la definición de la siguiente manera

$$\text{Área}_M / \text{Área}_{EI} = F_{rr} (\text{concentración}_M / \text{concentración}_{EI})$$

se obtiene que si se gráfica la relación de áreas vs la relación de concentraciones se puede obtener una curva de calibración de tendencia lineal, con tendencia al origen y cuya pendiente es el  $F_{rr}$ .

Este método es el que se aplicará en este trabajo por lo que se explicará de manera más amplia. El estándar interno debe ser químicamente parecido al compuesto a cuantificar, que eluya a un tiempo cercano al del compuesto problema, con una respuesta semejante, y separado del compuesto a determinar y debe ser agregado a la misma concentración tanto en la disolución de la muestra que contiene al compuesto a analizar como en las disoluciones estándar de éste. La relación del área del pico del compuesto a analizar con el área del pico del estándar interno se compara de un cromatograma a otro de la siguiente manera:

$$ArE = \text{área del pico de referencia} / \text{área del pico del estándar interno.}$$

$$ArP = \text{área del pico del problema} / \text{área del pico del estándar interno.}$$

Las áreas relativas obtenidas se emplean para los cálculos de concentración de la muestra considerando la concentración de la referencia y los pesos y/o diluciones llevados a cabo al preparar la muestra. También se pueden utilizar las áreas de los picos.

Cuando la referencia interna es químicamente similar a la sustancia problema, se pueden controlar pequeñas variaciones en parámetros de la columna y el detector. Al hacer las curvas de calibración una cantidad del soluto puede ser absorbida en el sistema y esto se reflejará en que la recta no tenderá a pasar a través del cero sino que lo hará a través de algún punto en las ordenadas (de preferencia del lado positivo).

Este efecto puede contribuir al error, particularmente en la medida de cantidades pequeñas y cuando se usa un solo punto de referencia. A concentraciones altas de la sustancia, el soluto puede saturar la fase líquida dando una pérdida relativa a la altura o a la simetría del pico. Para evitar estos problemas se recomienda hacer una curva de calibración. Los disolventes utilizados

deberán ser de grado especial (CG) con el objeto de evitar impurezas que puedan interferir en el análisis.

- ▲ Método de Adición Patrón: Este es un método que se aplica en los casos de que la lectura de la muestra se encuentra cercana a la incertidumbre de lectura del instrumento o que la técnica instrumental presenta el fenómeno de matriz.

En este método se adicionan a las soluciones estándar una cantidad constante de la muestra, lo que provoca que la curva de calibración suba de manera paralela y al extrapolar la curva a las abscisas el valor absoluto obtenido del origen a este valor dará el valor de concentración de la muestra.

# **CAPÍTULO III**

## **OBJETIVO**

### **3.- OBJETIVO**

Por lo mencionado anteriormente en este trabajo se plantearán los diferentes pasos para desarrollar el análisis cualitativo y cuantitativo de una materia prima de tipo farmacéutico (Valproato de Magnesio) por la técnica de Cromatografía de Gases. Lo anterior debido a que esta técnica proporciona alta resolución, velocidad, sensibilidad, sencillez, poca cantidad de muestra y proporciona resultados cuantitativos precisos y exactos.

**CAPÍTULO IV  
DISCUSIÓN Y  
DESARROLLO DEL  
TEMA**

## 4.- DISCUSIÓN Y DESARROLLO DEL TEMA

### 4.1.- PLANTEAMIENTO GENERAL

Se empezará por establecer las condiciones de operación de cada parte que compone el cromatógrafo de gases, basándonos principalmente en las características y propiedades fisicoquímicas de la muestra; entonces es importante considerar: solubilidad, polaridad, punto de ebullición y temperatura de descomposición.

El Valproato de Magnesio es un sólido el cual es la sal magnésica del Ácido Valpróico que es un líquido soluble en diferentes disolventes como metanol, cloruro de metileno, heptano, etc., por lo que se hará la conversión de la sal al ácido por razones de que en el organismo la sal se hidroliza inmediatamente y así se fija a las proteínas, además de que de esta manera se puede introducir al cromatógrafo de gases lo que no sería tan aceptable como sal. Para tener al compuesto en su forma ácida será necesario realizar una reacción de hidrólisis alcalina previa a su inyección, la cual se realizará con NaOH diluido (0.1N que es la más utilizada en técnicas semejantes) y agitación, lo que permitirá que el magnesio se separe de la molécula principal, sustituyéndose el ion  $Mg^{2+}$  por el ion  $H^+$  para la obtención del Ácido Valpróico al adicionar posteriormente HCl diluido (0.1N que permitirá también neutralizar el exceso de sosa que no hubiera reaccionado) y agitación. En la mayoría de los casos los análisis farmacéuticos requieren de comparaciones cromatográficas y la cantidad inyectada es una gran fuente de error que se minimiza por la adición de un estándar interno; por lo que se propone utilizar este método cuantitativo, se plantea utilizar ácido nonanóico o bifenilo como estándares internos, pues estos compuestos tienen características similares al compuesto a analizar y son fáciles de conseguir con una muy buena pureza, por lo tanto posteriormente se pasará la muestra a un matraz aforado y se adicionará el estándar interno a la misma concentración a la que se le adicionará a los estándares de referencia.

Como se mencionó párrafos arriba al estar haciendo la prueba de concentraciones también se buscará optimizar las condiciones de trabajo para la técnica cromatográfica para lograr la separación de la materia prima y el estándar interno y buscando también el tiempo más corto para lograr la separación y por lo tanto el análisis cuantitativo respectivo.

Para ello el analista debe aplicar un criterio en las diferentes partes que componen al sistema cromatográfico, siendo éstos los que a continuación se desean plantear.

## **4.2.- CONDICIONES DEL CROMATÓGRAFO DE GASES**

### **▲ FASE ESTACIONARIA (COLUMNA ANALÍTICA)**

Puesto que se trata de un compuesto “puro” la columna a utilizar puede ser una columna empacada y no se necesita una capilar (será más económico) ya que no se requiere una alta eficiencia para este análisis ya que en principio se separaran la materia prima y el estándar interno; debido a que estos compuestos no son reactivos se podría utilizar una columna de acero inoxidable que permitiría un ahorro comparado a usar una de vidrio, con medidas de 2m de longitud x 1/8 de pulgada de diámetro que son las medidas de las columnas analíticas más utilizadas. Por las características polares del compuesto es mejor utilizar una fase estacionaria de tendencia polar ya que en caso de presentarse impurezas (que deben venir de la síntesis de la materia prima) éstas deberán ser semejantes estructuralmente y por lo tanto en polaridad también lo que permitirá en caso de presentarse éstas ser separadas del analito de interés y del estándar interno, por lo anterior se plantea utilizar la fase estacionaria polar más utilizada en CG que es la de Carbowax 20M (polietilenglicol) preparada al 10%(w/w) colocada en Chromosorb WHP (soporte sólido de tierra de diatomeas tratado de manera que le da propiedades de soporte casi inactivo) más utilizada en el mercado, de 80/100 ó 100/120 mallas de tamaño.<sup>9</sup> En el mercado las compañías dedicadas a vender columnas pueden surtir esta columna fácilmente.<sup>14,15</sup>

### **▲ FASE MÓVIL (GAS ACARREADOR)**

El propósito primario de la fase móvil gaseosa es transportar a los componentes volátiles de la muestra a través de la columna analítica, esta selección puede influir tanto en la separación como en la velocidad del análisis, pero al utilizarse en CG sólo 3 gases que son el He, H<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, y como se planteó en el punto anterior el utilizar una columna empacada esto reduce el uso a sólo N<sub>2</sub> y He, además el propósito secundario del gas acarreador es el de obtener una matriz adecuada para que el detector mida el componente de la muestra.

Para el caso del Detector de Conductividad Térmica el He producirá una sensibilidad 7 veces mayor que con el N<sub>2</sub>. En los detectores de tipo de ionización en flama se especifica al gas acarreador mediante la respuesta del mecanismo del detector pero en general la presencia de N<sub>2</sub> y He no tendrá gran variación.

También un gas de peso molecular más alto genera más platos teóricos, el N<sub>2</sub> (el de mayor peso molecular) muestra mayor número de platos teóricos que el He, pero genera un mayor tiempo de corrida para optimizar la velocidad del análisis porque en este punto es mejor escoger un gas ligero como el He. Con el He se puede contrarrestar una pequeña pérdida de la eficiencia de la columna con una importante ganancia de la velocidad de análisis por lo que se propone para el método.

Es importante que el gas acarreador sea de alta pureza (grado cromatográfico o de alta pureza) pues las impurezas en especial el oxígeno y el agua pueden alterar químicamente la fase líquida y modificar los tiempos de retención, las fases estacionarias de polietilenglicol son susceptibles a ser degradadas por estos compuestos<sup>12</sup>, pero para obtener esta pureza se tiene una diferencia en el precio entre los dos gases mencionados, el He cuesta 11 veces más que el N<sub>2</sub>, por lo que por precio se escogería utilizar este último, pero hay que decir que también se puede utilizar el He.

#### ▲ ***FLUJO DE LA FASE MÓVIL***

Para fijar el flujo del gas portador el criterio se basaría en que las columnas empacadas trabajan a flujos normalmente de entre 25 y 60mL/min, optando por usar 30mL/min para obtener un flujo que permita sacar los compuestos más rápido pero sin moverse del caudal óptimo reportado para los gases acarreadores mencionados en el punto anterior.

#### ▲ ***VOLUMEN DE INYECCIÓN***

Para conseguir la mejor forma del pico y la resolución máxima debe usarse la mínima cantidad de muestra posible, para columnas empacadas se recomienda normalmente entre 1 a 10μL, por lo que se utilizará para comenzar 1μL.

#### ▲ ***TEMPERATURA DEL INYECTOR***

Generalmente se debe calentar la muestra para facilitar su vaporización instantánea, esta temperatura debe ser superior a las temperaturas de ebullición de los compuestos a analizar en la muestra, se propone una temperatura en el inyector de 200°C que basados en los puntos de ebullición del Ácido Valpróico y los estándares internos mencionados es temperatura suficiente para que volatilicen, no se condensen y no se descompongan.



### ▲ **TEMPERATURA DEL HORNO**

En el control de la temperatura de la columna podemos promover la separación, esta temperatura deberá ser suficiente para que el análisis se efectúe en un tiempo razonable y se logre una separación adecuada. En la técnica de CG se pueden trabajar dos modos variando la temperatura del horno (y por lo tanto de la columna y fase estacionaria) conocidas como isotérmica (temperatura constante durante el análisis) y programa de temperatura (variación de la temperatura durante el análisis). En un análisis cromatográfico isotérmico se mantiene a una sola temperatura la columna mientras se realiza la separación de los componentes de la muestra, en cambio en una temperatura programada se aumenta linealmente la temperatura con el tiempo para lograr la separación de los diferentes compuestos de la muestra, este último es útil para mezclas de compuestos con puntos de ebullición muy distintos; pero en este caso la materia prima a analizar y el estándar interno son muy semejantes en sus propiedades por lo que se aplicaría por una temperatura constante es decir de modo isotérmico. Esta temperatura depende también de las especificaciones de la columna proporcionada por el proveedor, lo cual indica un intervalo de 60°C a 200°C. Por lo que de comienzo para este estudio se propone una temperatura constante de 150°C y dependiendo del cromatograma obtenido, se subir o bajara ésta hasta lograr mantener una resolución igual o mayor a 1.5 en el menor tiempo de análisis posible.

### ▲ **DETECTOR**

Como ya se mencionó anteriormente los detectores más utilizados son el detector de ionización de flama (DIF), el de conductividad térmica (DCT), el de captura de electrones (DCE) y el de espectrometría de masas (DEM). Para este caso lo más recomendable es un detector de ionización de flama ya que este es el más común en el mercado y de precio accesible (en general viene incluido en el precio base de un cromatógrafo de gases), es un detector sensible a todos los compuestos de carbono, tiene un intervalo amplio y dinámico de respuesta<sup>1</sup>, permitiendo resultados óptimos, por lo que para el análisis de materia prima es adecuado. Como se requiere calentar a este detector se propone una temperatura de 200°C ya que a esta temperatura se coloca también el inyector asegurando así mantener la vaporización de los compuestos.

### **4.3.- TRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA Y PLANTEAMIENTO DE SU ANÁLISIS CUANTITATIVO**

Se realizará una curva patrón del Valproato de Magnesio para ver el orden de magnitud en donde se cumpla la linealidad de la relación planteada por el método de estándar interno:

$$\frac{\text{Área}_M}{\text{Área}_{EI}} = F_{rr} \left( \frac{\text{concentración}_M}{\text{concentración}_{EI}} \right) \quad (\text{ecuación 1})$$

Para ello se fabrica una disolución con una concentración conocida y se va diluyendo e inyectando al cromatógrafo de gases (en estas pruebas es cuando también se buscarán las mejores condiciones de trabajo en el sistema) y recreando la curva con los valores obtenidos hasta visualizar un orden de áreas y concentraciones que permita visualizar una tendencia lineal.

Al lograr esto se prepararán por lo menos 5 disoluciones estándar partiendo de la misma disolución madre (el mínimo para realizar una curva patrón es de 5 puntos)<sup>16</sup> para realizar la curva de calibración, e inyectando por triplicado cada disolución estándar. Al realizar esto se debe buscar también que la disolución de la muestra caiga en el centroide de esta curva patrón, por lo que es importante también realizar un tanteo de preparación de ésta para buscar estos valores.

Como en la Cromatografía de Gases se pueden medir concentraciones bajas y utilizar volúmenes pequeños debido a la sensibilidad del método, se propone entonces pesar una cantidad de Valproato de Magnesio para obtener una concentración de 12mg/ml (300mg/25ml) en metanol, por lo tanto 300mg de Valproato de Magnesio se pesan y se pasan cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25ml y se afora con metanol al volumen. El tratamiento de la muestra puede ser como sigue:

Del matraz con la concentración de 12mg/ml se toma una alícuota de 1ml y se colocan en un vial de reacción o tubo de ensayo para efectuar la reacción, adicionar 5ml de la disolución de NaOH agitar por 30seg aprox. o hasta completar la reacción; posteriormente adicionar 5ml de la disolución de HCl agitando 30seg aprox. o hasta completar la reacción; se adicionan 2ml de la disolución del estándar interno; aquí se tendrá un sistema de dos fases, entonces se agita para extraer de la fase acuosa al Ácido Valpróico formado que es soluble en heptano, en el que está disuelto el estándar interno.

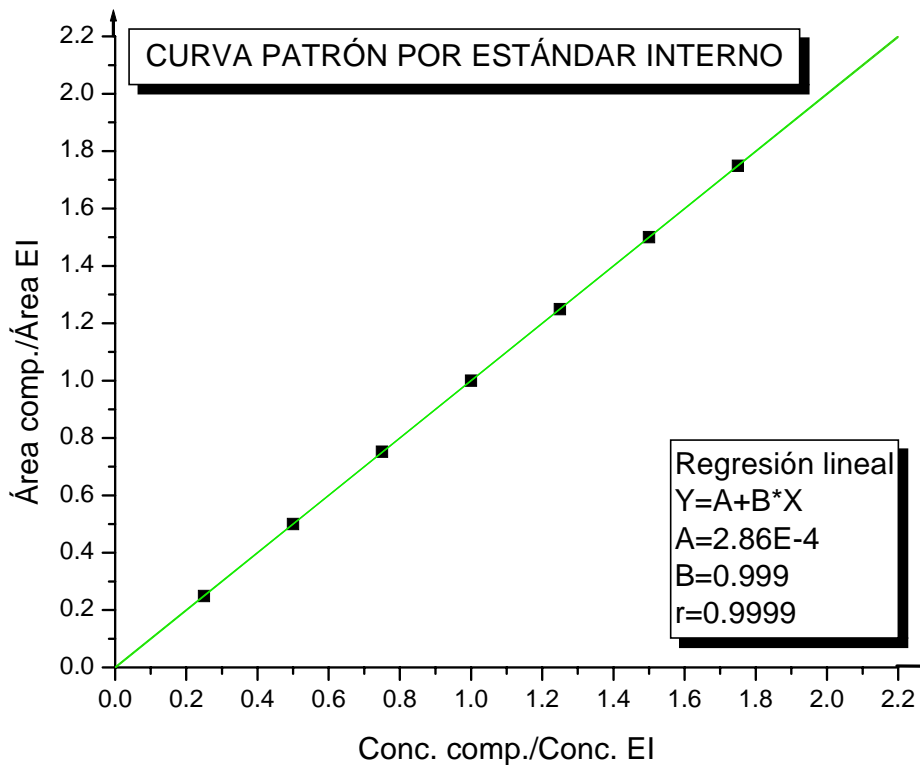
Para preparar el estándar interno se buscará que su concentración en las disoluciones estándar y muestra este en el punto medio de la curva de calibración 12mg/ml, por lo que se

plantearía pesando aprox. 300mg y llevándolo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25ml utilizando heptano como disolvente, se va a utilizar a este disolvente porque permitirá también extraer de la fase acuosa al Ácido Valpróico que se va a cuantificar.

Las disoluciones estándar deben estar preparadas a concentraciones parecidas por lo que la disolución madre se preparará pesando 1000mg del estándar de Ácido Valpróico USP en 25ml de metanol medidos volumétricamente (Sm). Para realizar la curva de calibración de la disolución madre (Sm) se toman alícuotas de 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml y se llevan a matraces aforados de 10ml, lo que permitirá obtener concentraciones de 4, 8, 12, 16, 18 mg/ml respectivamente quedando el centroide con el valor que se espera presente la muestra. De cada dilución se toma 1ml y se hace el mismo tratamiento que se hizo con la muestra.

Se inyectarán volúmenes iguales de las disoluciones estándar de la curva patrón y de la disolución de la muestra, se registran los cromatogramas y se miden las áreas de los picos.

Se construye la curva de calibración graficando la relación del área de los picos del Ácido Valpróico entre el área del pico del estándar interno contra la relación de las concentraciones del Ácido Valpróico entre la concentración del estándar interno.



Conociendo el valor de la pendiente de la gráfica (Frr) despejamos a la concentración de la muestra de la ecuación 1. Para obtener la concentración del Valproato de Magnesio en la muestra (X) en %(w/w) se procede a utilizar la siguiente ecuación 2:

$$(X/W) \times (1,077) \times (100) = \% \text{ Valproato de Magnesio}$$

donde

W = (peso de la muestra/ volumen en que se afora la muestra) x (1ml/2ml).

Factor 1,077 que se obtiene de la operación de 310,715g/288,420g

310,715 es el peso molecular del Valproato de Magnesio.

288,420 es el peso molecular del Ácido Valpróico.

#### **4.4.- ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL SISTEMA Y RESULTADOS CUANTITATIVOS**

Para asegurar la efectividad del sistema, debe someterse a una prueba antes de utilizarse, para que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyan un sistema analítico completo.

Se pueden obtener datos específicos de inyecciones repetidas de la preparación del estándar. Estos datos pueden ser comparados con valores máximos y mínimos especificados tales como eficiencia, precisión interna, resolución, tiempo de retención, naturaleza de la curva de calibración, respuesta y recobros, entre otros parámetros. El parámetro más útil es la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con la solución de estándar interno. Esta reproducibilidad se expresa por medio del coeficiente de variación.

$$CV = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$$

Es importante mencionar que una vez establecidas todas las condiciones del método se debe confirmar que éste cumple los objetivos para lo que fue diseñado. Esto quiere decir que se debe garantizar que el método y el lugar donde se implementan son capaces de lograr resultados rutinarios dentro de las especificaciones del método y que sus resultados son confiables.

Los parámetros que otorgan validez son principalmente:

- Selectividad y especificidad.
- Linealidad, intervalo lineal y de trabajo.

- Precisión.
  - Repetibilidad.
  - Precisión intermedia.
  - Reproducibilidad.
  - Incertidumbre combinada de la medición.
- Exactitud.
  - Materiales de referencia (trazabilidad).
  - Ningún error sistemático en todo el intervalo de trabajo.
- Límites de detección y cuantificación.
- Ausencia de efectos de matriz.
- Estabilidad de la muestra.
- Robustez.

Las normas internacionales y las normas mexicanas de acreditación y certificación obligan a la validación de métodos. Por lo que se debe validar cuando se pretende una acreditación, se desarrolla un método nuevo, cuando se adquiere un equipo o en una transferencia de método, cuando se hace un cambio significativo a un método ya validado o cuando se quiere demostrar que un método propio es equivalente a uno publicado.<sup>13</sup>

# **CAPÍTULO V**

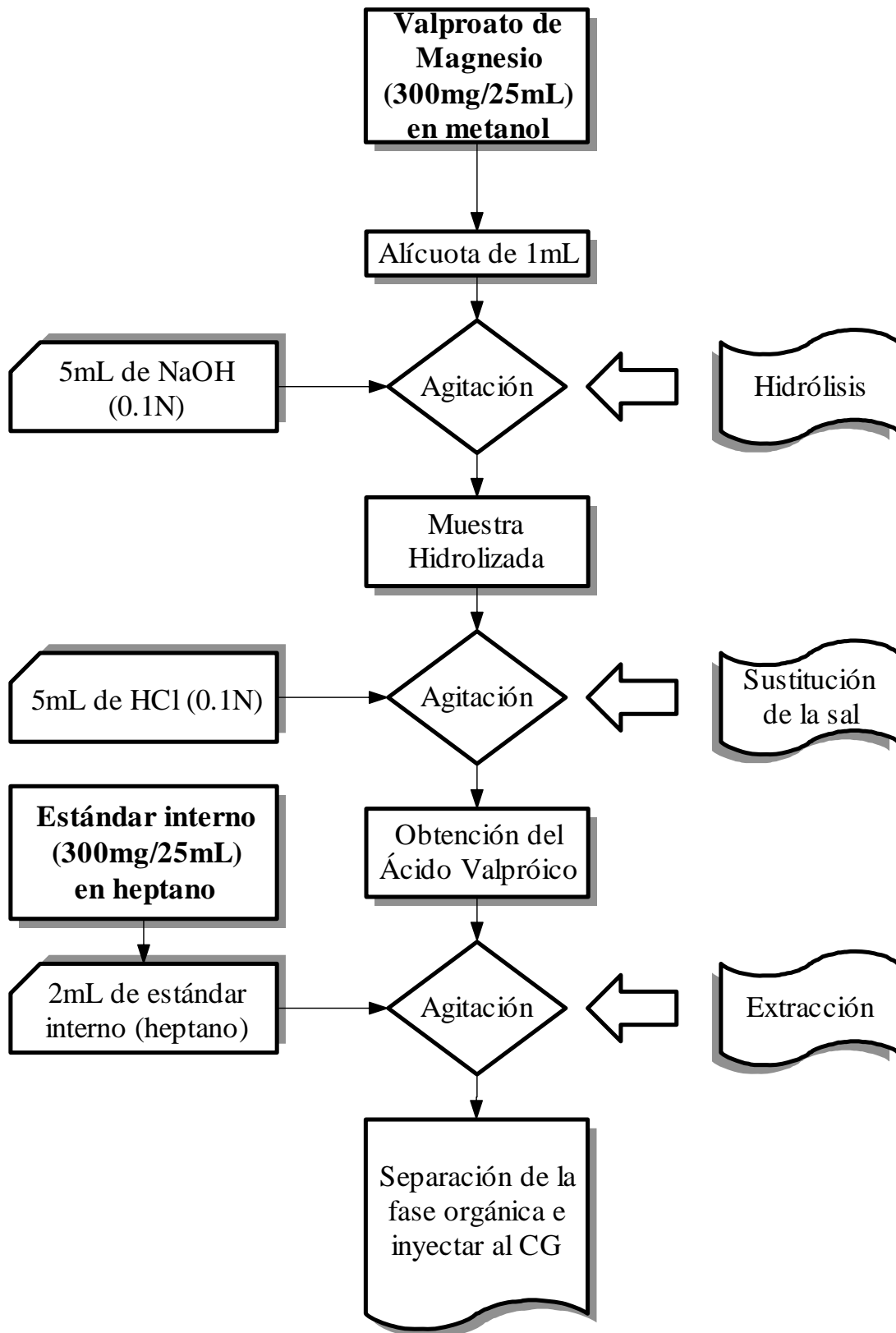
# **CONCLUSIONES**

## 5.- CONCLUSIONES

Después de plantear el trabajo en los capítulos anteriores podemos describir como conclusiones los siguientes puntos importantes a tomar en cuenta.

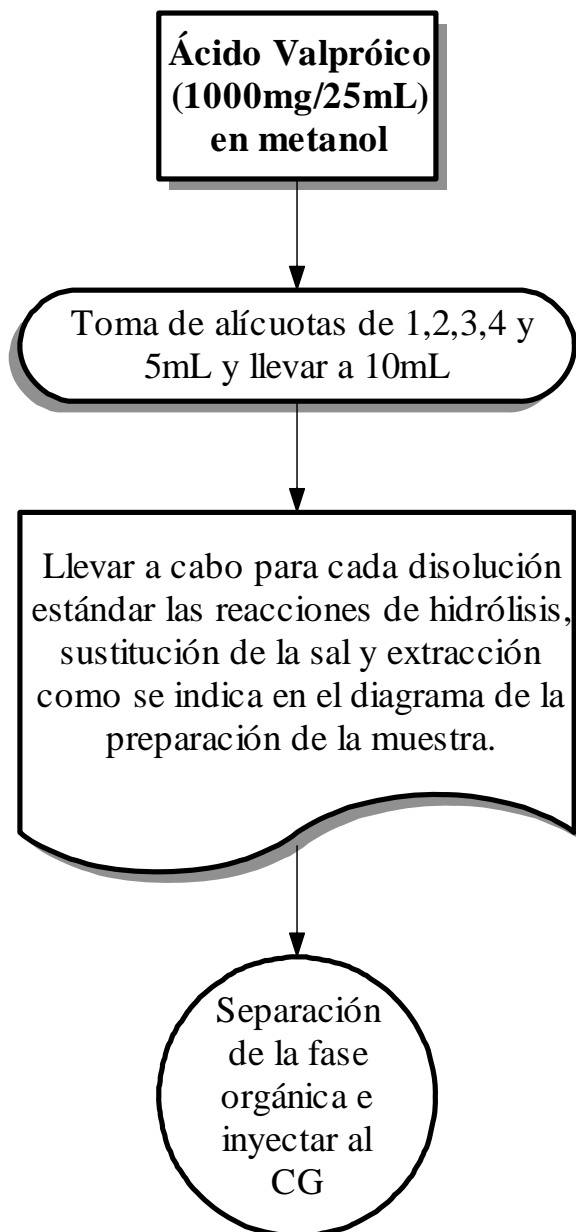
- Para minimizar el error de la introducción en CG para el análisis del Valproato de Magnesio y por lo tanto en su análisis cuantitativo se plantea trabajar el método de estándar interno.
- Se plantea el uso del ácido nonanóico o del bifenilo como estándar interno.
- El Valproato de Magnesio es la sal magnésica del Ácido Valpróico compuesto polar con grupos reactivos por lo que se requiere la conversión del fármaco a su forma ácida para poder ser inyectado al cromatógrafo de gases.
- Es importante conocer las características de los compuestos a utilizar, tanto muestra como estándar interno en este caso, para poder plantear condiciones iniciales de trabajo en el instrumento a utilizar, que en este trabajo es el Cromatógrafo de Gases.
- Después de lo discutido en los capítulos anteriores se plantean las siguientes etapas en forma de diagramas que resumen la metodología planteada para analizar a la materia prima de Valproato de Magnesio por medio de la técnica de Cromatografía de Gases.

## DIAGRAMA DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA





## DIAGRAMA DE REALIZACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN



# **CAPÍTULO VI**

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, Edición 52, 2006, Tomo I, a-j, Ed. Thomson PLM, pág.: 510-517.
2. Índice de medicamentos, Bárbara I. Macvan, Ed. Manual Moderno SA de CV, México, D.F., 2005, pág.: 1538-1539.
3. European Pharmacopoeia supplement 2000, European Directorate for de Quality of Medicines, Strasbourg, France, 2005 pág.: 1308.
4. The Merck Index, 13era. Edición, 2001, Editorial Staff, pág.: 9977.
5. Farmacopea de los Estados Unidos de América / 29 Formulario Nacional / 24, 2006, The United States Pharmacopoeia Convention, USA, pág.: 2434-2436.
6. European Pharmacopoeia, 5ta. Edición. Vol. 2, 01/2005, European Directorate for de Quality of Medicines, Strasbourg, France.  
pág.: 2669-2670.
7. Chromatography of Pharmaceuticals Natural, Synthetic and Recombinated products, Satinder Ahuja; American Chemical Society, Washington, D.C. 1992, cap. 1, 2, 3, 4, 6.
8. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). (10/feb/07).
9. The Merck Chemical Database, 2005' 1; [www.chemdata.info](http://www.chemdata.info). (10/feb/07).
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª. Edición, Volumen I y II, 2004, Secretaria de Salud, pág.: 367-374,1303-1304, 2104-2107.
11. Métodos Instrumentales de Análisis, Willard, Merritt, Dean, Settle; Compañía Editorial Continental, 1998, cap. 15, 16, 17, 18.
12. Cromatografía de gases, Harold M. McNair; Washington, D.C., 1981.
13. Diplomado en Química Analítica. Módulo III , Cromatografía de Gases y Líquidos; Modulo VI , Manejo estadístico de Datos en Química Analítica. 2006.
14. Catálogo de cromatografía Alltech, 03/04, Cat 550, pag. 122-152.
15. Productos de cromatografía para análisis y purificación, SUPELCO, 05/06, pág. 299-491.
16. Guía de Validación de Métodos Analíticos; editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.; registro ante la DGP-032; Edición 2002.