



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"CROMATOGRAFÍA DE GASES APLICADA
A LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA"**

**TRABAJO ESCRITO
VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
MARLENE ANAID VILCHIS LEAÑOS**



MÉXICO, D.F.

2008



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: Ernestina Cervera Flores

VOCAL: Adolfo García Osuna

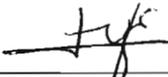
SECRETARIO: Pedro Valadez Eslava

1er SUPLENTE: María del Socorro Alpizar Ramos

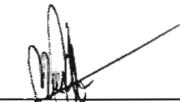
2do SUPLENTE: Jorge Rafael Martínez Peniche

Sitio donde se desarrollo el tema: FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Asesor: QFB Pedro Valadez Eslava


Firma

Sustentante: Marlene Anaid Vilchis


Firma

DEDICATORIAS

A mis padres Guadalupe y Javier por su invaluable e incondicional apoyo y el amor que me han dado sin importar la distancia. Los quiero mucho.

A mi hermanito Javier que me hace ver que las cosas son simples y fáciles.

A mi hermana Aline por hacerme sentir cerca de casa.

A mis abuelitos Delia y Pascual por haberme brindado un hogar durante mi carrera universitaria, muchas gracias sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis tías (Vilchis) que contribuyeron cada una con un pedazo para mi formación.

A mis primas Nayeli y Aranza por contagiarme su alegría en momentos difíciles y alegres también.

A mis queridos amigos Ame, Alf y Rodrigo que siempre me han estado a mi lado en las buenas y en las malas.

A mis amigos de la Facultad Gerardo (LuMiVi), Angel, Mario, JC que siempre me apoyaron y no me dejaron dar por vencida.

A mis profesores, compañeros de trabajo, amigos y todos aquellos que hicieron posible la elaboración de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las bases de un mejor futuro profesional y académico.

A la Profesora Socorro Alpizar por brindarme su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Profesor Pedro Valadez Eslava por las enseñanzas que ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Profesor Adolfo García Osuna por compartirme sus conocimientos, por todo el tiempo y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la Profesora Ernestina Cervera por sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I.	OBJETIVO.....	2
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES.....	3
IV.	DISCUSIÓN DEL USO DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.....	6
	1. ENSAYOS.....	8
	A. CONTENIDO DE ETANOL EN JARABES.....	8
	B. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL BENCÍLICO EN INYECTABLES.....	10
	2. IDENTIFICACIONES.....	12
	C. IDENTIFICACIÓN DE PERFUMES Y ACEITES.....	12
	D. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN MANTECA DE CACAO.....	13
	3. SOLVENTES RESIDUALES.....	15
	E. METANOL, ACETONA Y TETRAHIDROFURANO COMO SOLVENTES RESIDUALES.....	16
	4. DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS.....	18
	F. SUSTANCIAS RELACIONADAS DE DEXCLORFENIRAMINA MALEATO.....	19
	G. DETERMINACIÓN DE OXIDO DE ETILENO.....	20
V.	RESUMEN DE LA DISCUSIÓN.....	22
VI.	CONCLUSIONES	23
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	24

I. OBJETIVO

Realizar una revisión general de la aplicación de la cromatografía de gases en la industria farmacéutica.

II. INTRODUCCIÓN

La cromatografía de gases es un método de separación y detección de compuestos volátiles orgánicos y de gases inorgánicos, en la industria farmacéutica se aplica en la identificación y determinación analítica de materias primas (principios activos y excipientes), material de empaque, productos terminados y en proceso, cuantificación analítica de productos terminados, solventes residuales e impurezas.

Avances tecnológicos significativos en las áreas de electrónica, computación y desarrollo en la tecnología de columnas han permitido a esta técnica tener límites de detección más bajos, identificación de sustancias más exactas con la mejora de la resolución. Mezclas de compuestos muy complejas se pueden separar. Cuando se acopla a un espectrómetro de masas como detector se pueden identificar los compuestos eluidos, creando así una herramienta analítica muy poderosa.

Debido a las características de los compuestos que se analizan por cromatografía de gases ésta es muy utilizada en el control de calidad durante y después del proceso de síntesis de principios activos y excipientes ya que sirve para identificar y cuantificar solventes residuales que quedaron presentes aun después de la purificación.

La cromatografía de gases hace posible que el análisis de algunos compuestos sea más confiable, preciso y exacto.

La creciente demanda de la industria farmacéutica para generar más datos, tanto en calidad como en cantidad, ha generado el desarrollo de más métodos analíticos automatizados de principios activos en varias matrices.

III. ANTECEDENTES

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos, la muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los compuestos de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria en la cual las sustancias individuales exhiben diferencias en adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño de partícula o densidad de carga iónica. Una vez separadas las sustancias pueden ser identificadas y cuantificadas.^{(1) (2)}

La cromatografía de gases es una técnica de separación creada por James y Martin en 1952; en la cual la fase móvil es un gas. Puede tener una fase estacionaria sólida o líquida retenida en un soporte adsorbente (columnas empacadas), o en la pared interna de una columna tubular abierta (columnas capilares), con la excepción de algunas áreas especializadas como por ejemplo el análisis de gases inorgánicos, la cromatografía gas-líquido es la más usada.⁽¹⁾

Las separaciones en la fase estacionaria ocurren debido a los efectos de la partición o adsorción, que se basan en establecer un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil.⁽³⁾ La adsorción es el resultado de la interacción de grupos funcionales polares en el soluto con sitios de adsorción discretos en la superficie adsorbente como zeolitas (silicatos de aluminio), Poropacks (poliestirenos entrecruzados) y mallas moleculares. La partición es aquel en el cual un soluto en contacto con un gas y un líquido se distribuye entre éstos de acuerdo a su coeficiente de distribución.⁽¹⁾

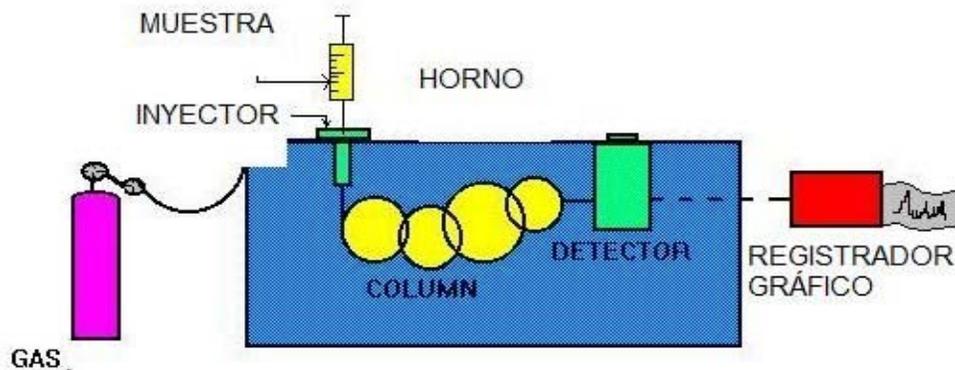


Figura 1.

El sistema de cromatografía de gases (*Figura 1*) consiste en un gas acarreador inerte (helio, nitrógeno o hidrógeno) que fluye continuamente desde un cilindro de gas a través del inyector, la columna y el detector. La muestra es inyectada por medio de una jeringa (que mide volumen del orden de microlitros) al inyector, donde la muestra se vaporiza, después es acarreada por la fase móvil hacia la columna la cual contiene a la fase estacionaria que puede ser sólida o líquida.

La función de los detectores es producir una respuesta eléctrica proporcional a la concentración o masa de la muestra. El calentamiento del detector es indispensable para evitar que la muestra se condense. ⁽⁴⁾ Entre los detectores más usados en la industria farmacéutica se encuentra en primer lugar el detector de ionización de flama y el detector de conductividad térmica que tiene un uso menos frecuente que el detector de ionización de flama. En general el detector responde uniformemente a compuestos volátiles pero es considerablemente menos sensible que el detector de ionización a la flama. ⁽²⁾

La señal que sale del detector es registrada en una gráfica contra el tiempo, el área o altura del pico puede ser medida ya sea electrónicamente usando un integrador o manualmente. ⁽⁴⁾

Características de los compuestos que se analizan por cromatografía de gases

Los componentes que son inyectados al cromatógrafo de gases deben pasar a estado gaseoso (si es que no son un gas), los componentes de la muestra al vaporizarse pueden ser acarreados por la fase móvil gaseosa, por lo tanto el requerimiento básico de los componentes que son analizados por cromatografía de gases es que sean volátiles ⁽⁴⁾, y además los componentes de la muestra tienen que ser termoestables a la temperatura de trabajo a la cual se lleve a cabo el análisis.

El inyector y el detector son calentados a una temperatura que mantenga a los compuestos en su estado gaseoso. El inyector y el detector se mantienen a una temperatura más alta que la columna para promover la rápida evaporación de la muestra y prevenir la condensación de la muestra en el detector. ⁽³⁾

Ventajas de la cromatografía de gases en la industria farmacéutica:

- Alta eficiencia de separación.⁽²⁾
- Alta sensibilidad de detección de las especies separadas, ésta es una de las razones para utilizar esta técnica. Utilizando detectores selectivos se logran detectar cantidades del orden de 10^{-12} a 10^{-15} gramos.⁽³⁾
- Precisión y exactitud.
- Tiempos de análisis cortos.⁽²⁾

Desventajas de la cromatografía de gases en la industria farmacéutica:

- En comparación con la cromatografía de líquidos, la cromatografía de gases es menos usada, la razón principal es que la mayoría de los fármacos son polares, tienen características termolábiles y son de naturaleza iónica.⁽²⁾
- No se pueden analizar compuestos moleculares termolábiles como proteínas y polímeros.⁽²⁾

IV. CROMATOGRAFÍA DE GASES APLICADA A LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El uso de la cromatografía de gases en la industria farmacéutica se ve reflejada sobre todo en las farmacopeas en donde se publican muchas determinaciones que utilizan esta técnica.

De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM):

Los métodos publicados para la determinación de principios activos (materia prima) son aproximadamente 30% para pruebas como ensayos, sustancias relacionadas, pruebas límite de solventes residuales e impurezas orgánicas volátiles. En el caso de excipientes, el uso de la cromatografía de gases se incrementa notablemente hasta en un 60% del total de métodos publicados.

Para productos terminados el uso de la cromatografía de gases es menor que para materias primas, aun así se pueden encontrar varios productos que se analizan por esta técnica.

En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de las pruebas que se realizan por cromatografía de gases en distintas formas farmacéuticas.⁽⁵⁾

A continuación se describen algunos ejemplos de los métodos analíticos publicados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

1. ENSAYOS

Determinación de la concentración de un compuesto en su forma pura o en una formulación farmacéutica.

A. CONTENIDO DE ETANOL EN JARABES

AI. Importancia del análisis

A menudo se incluye el etanol como conservador y también como solvente de las esencias aromatizantes en jarabes, los cuales son muy eficaces para enmascarar el sabor de fármacos amargos o salados (como bromuros, yoduros o cloruros). El contenido de etanol en medicamentos de libre venta al público va desde 0.3% para medicamentos dirigidos a menores de 6 años, el límite es de 5% para niños de 6 a 12

FORMA FARMACÉUTICA	PRINCIPIO ACTIVO	PRUEBA	USO
Inyectables	<ul style="list-style-type: none"> • Ampicilina • Fluoresceína sódica • Fenitoína sódica • Naloxona 	<p>Límite de diclorometano</p> <p>Límite de dimetilformamida</p> <p>Contenido de etanol y propilenglicol.</p> <p>Ensayo</p>	<p>Antibiótico</p> <p>Substancia fluorescente</p> <p>Anticonvulsivo</p> <p>Antagonista de los receptores opioides.</p>
Soluciones oftálmicas	<ul style="list-style-type: none"> • Atropina • Bromhidrato de homatropina 	<p>Ensayo</p> <p>Ensayo</p>	<p>Midriático</p> <p>Relajador del músculos ciliares en el ojo.</p>
Soluciones	<ul style="list-style-type: none"> • Enflurano • Isoflurano líquido • Ciclosporina 	<p>Ensayo, identificación.</p> <p>Ensayo</p> <p>Contenido de etanol</p>	<p>Anestésico</p> <p>Anestésico</p> <p>Péptido inmunosupresor</p>
Ungüentos	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato de atropina 	<p>Ensayo</p>	<p>Midriático</p>
Suspensión	<ul style="list-style-type: none"> • Griseofulvina • Lindano • Primidona 	<p>Ensayo</p> <p>Ensayo</p> <p>Ensayo</p>	<p>Antimicótico</p> <p>Plaguicida</p> <p>Anticonvulsivo</p>
Tabletas	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato de atropina y clorhidrato de difenoxilato • Clorhidrato de amantadina • Clorfenamina compuesta 	<p>Ensayo</p> <p>Ensayo</p> <p>Ensayo clorfenamina maleato</p>	<p>Antidiarreico</p> <p>Tratamiento de enfermedad de Parkinson</p> <p>Antihistamínico</p>
Grageas	<ul style="list-style-type: none"> • Estrógenos conjugados 	<p>Identificación</p>	<p>Terapia hormonal</p>
Jarabes	<ul style="list-style-type: none"> • Clorfenamina maleato • Etoxuximida • Valproato sódico 	<p>Contenido de etanol, ensayo e identificación</p> <p>Ensayo</p> <p>Ensayo</p>	<p>Antihistamínico</p> <p>Anticonvulsivo</p> <p>Antiepiléptico</p>

Tabla 1.

años y el límite de etanol recomendado para adultos es de 10%. Los jarabes más comunes incluyen principios activos tales como antihistamínicos o descongestionantes orales. ⁽⁶⁾

El etanol sigue en importancia al agua como solvente, se usa mucho en la elaboración de medicamentos debido a su miscibilidad con el agua y además puede disolver varios compuestos insolubles en agua como lo son fármacos, sabores y preservativos antimicrobianos. Otra ventaja que ofrece el etanol es que evita el crecimiento de microorganismos no ocurre en las soluciones que contienen alcohol en una concentración razonable. ⁽⁶⁾

El porcentaje de etanol para un jarabe de maleato de clorfenamina por ejemplo debe estar entre 6 y 8% v/v, en una presentación comercial Clorotrimeton, es un antihistamínico indicado para el tratamiento sintomático de la rinitis alérgica estacional y perenne, rinitis vasomotora, conjuntivitis alérgica, manifestaciones alérgicas cutáneas no complicadas y angioedema, mejoramiento de reacciones alérgicas en sangre o plasma. También están indicadas en el tratamiento de reacciones anafilácticas conjuntamente con epinefrina y otras medidas de rigor después de controlar las manifestaciones agudas. ⁽⁸⁾

La cuantificación de etanol en jarabes es importante ya que la administración concomitante de los antihistamínicos con alcohol puede incrementar el efecto sedativo del maleato de clorfenamina, además de que el etanol potencia los efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) de numerosos sedantes. ⁽⁸⁾

All. Método de preparación

Se usa el método de estándar interno para disminuir la variabilidad en la preparación de muestras y estándares, se utiliza n-propanol como estándar interno que se distingue del etanol en tener un metileno más en su estructura molecular, se prepara a una concentración de 20 μ L/mL en agua tomando 2mL de n-propanol en 100mL de agua. Para el estándar de referencia se toman 2mL de etanol en 100mL de agua para tener una concentración de 20 μ L/mL. Para la solución de estándar combinado se toma una alícuota de 10mL de solución de estándar de referencia y 10mL de solución de

estándar interno en 100mL de agua para tener una concentración final de 2 μ L/mL de etanol y 2 μ L/mL de n-propanol.

Para la preparación de la muestra se toman 25mL del jarabe con una pipeta para dar (to delivery por su nombre en inglés) a un matraz volumétrico de 100mL, permitiendo que la muestra baje de la pipeta al matraz en 5 minutos aproximadamente, la pipeta no se enjuaga con agua, el matraz volumétrico de 100mL se lleva a volumen con agua, se toma una alícuota de 10mL de esta solución y se coloca en un matraz volumétrico de 100mL, se agregan 10mL de solución de estándar interno y se lleva a volumen con agua .

Se inyecta al cromatógrafo de gases 1 μ L de la solución de estándares combinados y de la muestra combinada.

La resolución entre el etanol y el n-propanol debe de ser mayor a 2 y el coeficiente de variación para la adecuación del sistema no debe ser mayor al 4%, el factor de coeol para el etanol no debe ser mayor a 1.5 para que se tenga la certeza de que la medición es correcta.⁽⁵⁾

AIII. Condiciones cromatográficas

Se puede usar como gas de arrastre N₂ o He con un flujo de 20mL/min.

Para la cuantificación de etanol se reporta en la literatura el uso de una columna empacada de vidrio de 2m de longitud x 4mm de diámetro interno, empacada con una fase estacionaria sólida de copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno, con un tamaño de partícula de malla de 100 a 120.

La columna se trabaja en formato isotérmico, se mantiene a 160°C durante todo el análisis.

Se utiliza un detector de ionización de flama, éste y el inyector se ponen a una temperatura de 170°C. Se usa un detector de ionización a la flama debido a que este responde a todos los compuestos orgánicos, y no detecta el agua, esta característica lo hace el detector de elección para la determinación de etanol en jarabes los cuales están compuestos mayoritariamente por agua.⁽⁵⁾

El soporte sólido debe de tener tamaño de partícula pequeño y uniforme, un tamaño estrecho en partículas pequeñas permiten una presión aceptable. Los empaques de

polímeros porosos pueden ser usados directamente sin ser cubiertas por fase estacionaria, y requieren muy poco acondicionamiento debido a que el etanol es un compuesto de bajo peso molecular.

AIV. Manejo de resultados

En este caso se realiza la cuantificación del compuesto.⁽⁵⁾

Primero se calcula el factor respuesta relativo con la siguiente ecuación:

$$Frr = \frac{Ae}{Ap} \times \frac{Vi}{100\text{mL aforo}} \times \frac{10\text{mL alicuota std int}}{100\text{mL aforo std comb}} \times \frac{100\text{mL aforo std ref}}{Ve} \times \frac{100\text{mL aforo std comb}}{10\text{mL alicuota std ref}}$$

Donde:

Frr= factor respuesta relativo

Ae= área del pico de etanol en la solución de estándar combinado.

Ap= área del pico de *n*-propanol en la solución de estándar combinado.

Vi= volumen de *n*-propanol (mL)

Ve= volumen de estandar de etanol (mL)

Std int= Estándar interno

Std ref= Estándar de referencia

Std comb Estándar combinado

$$\% \text{ E tan ol (v/v) =}$$

$$\frac{1}{Frr} \times \frac{Ae}{Ap} \times \frac{Vi}{100\text{mL aforo}} \times \frac{10\text{mL alicuota de std int } M}{100\text{mL aforo } M} \times \frac{100\text{mL aforo}}{Vm} \times \frac{100\text{mL aforo } M}{10\text{mL alicuota } M} \times 100$$

Donde:

Ae= área del pico de etanol en la solución de la muestra.

Ap= área del pico de *n*-propanol en la solución de la muestra.

Vi= volumen de estandar interno (mL)

Vm= volumen del jarabe (mL)

100= factor de conversión a porcentaje %.

M= Muestra

B. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL BENCÍLICO EN INYECTABLES.

BI. Importancia del análisis

El alcohol bencílico es el antimicrobiano más utilizado en formulaciones parenterales, hay evidencia que es un neurotóxico y esta contraindicado en el Reino Unido.⁽⁹⁾ Se ha demostrado por medio de estudios retrospectivos en neonatos que se disminuye la mortalidad por hemorragia intraventricular en infantes que pesan menos de 1kg de peso después de que se descontinuo el uso de soluciones que contenían alcohol bencílico. El síndrome jadeante se presenta con el deterioro progresivo neurológico en infantes prematuros que sufren de envenenamiento por alcohol bencílico.⁽⁷⁾

Con dosis de alcohol bencílico en un intervalo de 99 a 234mg/kg/día se presentan los siguientes síntomas: hipotensión, acidosis metabólica severa, perdida de la conciencia, leucopenia, trombopenia, hiperamonemia y dificultad para respirar son observados con tasas altas de mortalidad.

En el caso del Diacepam un inyectable de 1ml contiene 5mg de diazepam, 0.5mmol de sodio y 15.7mg de alcohol bencílico, cuando se administra continuamente vía intravenosa en un estado epiléptico se debe usar una dosis no mayor a 1mg/kg/hora, con esta dosis el alcohol bencílico se mantiene en 75mg/kg/día que es una dosis más baja que a la cual se presentan síntomas adversos, de aquí la importancia de conocer la concentración de alcohol bencílico en productos farmacéuticos.⁽⁹⁾

El alcohol bencílico se puede volatilizar fácilmente, por lo que es ideal para analizarse por cromatografía de gases. Este método se basa en la determinación cuantitativa del alcohol bencílico contenido en parenterales, utilizando fenol como estándar interno.

BII. Método de preparación

Se utiliza fenol como estándar interno preparando una solución madre a una concentración de 10mg/mL, pesando 1g de fenol en un matraz aforado de 100mL. La solución madre del estándar de alcohol bencílico se prepara a una concentración de 9mg/mL, pesando 450mg de estándar de alcohol bencílico en un matraz aforado de 50mL; tanto el estándar interno como el estándar de referencia se disuelven en agua.

La solución de estándares se prepara mezclando 1 mL de solución madre del estándar interno y 1 mL del estándar de alcohol bencílico en un matraz aforado de 10 mL que se lleva a volumen con agua.

Para la preparación de la muestra se toma una alícuota equivalente a 9 mg de alcohol bencílico del inyectable con una pipeta para contener, se transfiere a un matraz de 10 mL, se enjuaga la pipeta con pequeñas porciones de agua, se adiciona 1 mL de solución madre del estándar interno y se lleva a volumen con agua. Se inyecta 1 mL de la muestra y el estándar respectivamente.

BIII. Condiciones cromatográficas

Se puede utilizar helio o nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 30 mL/min.

Se reporta en la literatura que se requiere una columna de vidrio de 180 cm de longitud X 3 mm de diámetro, empacada con tierras silicias recubierta con polietilenglicol de alto peso molecular al 5% (Carbowax 20M) muy polar que debe ser líquido a la temperatura de operación. La temperatura de la columna se mantiene de manera isotérmica a 140°C. El detector y el inyector de ionización de flama se deben mantener a 250°C.⁽⁵⁾ Aunque las columnas capilares son las que se usan con mayor frecuencia, en este caso en particular se utiliza una columna empacada debido a que tienen mayor capacidad de muestra, permitiendo que la muestra completa sea inyectada sin la necesidad de aplicar un split porque las columnas empacadas tienen un mayor volumen de fase estacionaria por unidad de longitud de la columna, así no se diluye el alcohol bencílico presente en la muestra.⁽⁵⁾

BIV. Manejo de resultados

$$Frr = \frac{Ab}{Af} \times \frac{Wf}{100 \text{ mL aforo}} \times \frac{1 \text{ mL alícuota std int}}{10 \text{ mL aforo std comb}} \times \frac{50 \text{ mL aforo}}{Wb} \times \frac{10 \text{ mL aforo std comb}}{1 \text{ mL alícuota std ref}}$$

Donde:

Frr= factor respuesta relativo

Ab= área del pico de alcohol bencílico en la solución de estándar combinado

Af= área del pico de fenol en la solución de estándar combinado

Wf= peso de fenol (mg)

Wb= peso de alcohol bencílico (mg)

Std int= Estándar interno

Std ref= Estándar de referencia

Std comb= Estándar combinado

$$\text{mg Alcohol bencílico/ mL} = \frac{1}{Frr} \times \frac{Ab}{Af} \times \frac{Wf}{100\text{mLaforo}} \times \frac{1\text{mLa lícuaotastd int}}{10\text{mLaforoM}} \times \frac{10\text{mLaforoM}}{Vm}$$

Donde:

Ab= área del pico de alcohol bencílico en la solución de la muestra.

Af= área del pico de fenol en la solución de la muestra.

Wf= volumen de estándar interno (mg)

Vm= volumen del inyectable (mL)

M= Muestra

2. IDENTIFICACIONES

El método de identificación debe discriminar entre compuestos muy similares en estructura que puedan estar presentes en muestras con mezcla de compuestos. Las pruebas de identidad deben ser específicas para el fármaco a analizar.⁽⁶⁾

El tiempo de retención es muy útil para confirmar la identidad de una sustancia, pero cuando se trata de sustancias sin caracterizar no es muy recomendable usar este parámetro ya que compuestos similares pueden tener tiempos de retención muy parecidos, para lo cual es recomendable utilizar el tiempo de relación relativo.⁽³⁾

A continuación se describe el método de identificación de perfumes y aceites como ejemplo.

C. IDENTIFICACIÓN DE PERFUMES Y ACEITES.

Cl. Importancia del análisis

Los perfumes comprenden una amplia variedad de compuestos sintéticos y naturales que son seleccionados en base a su olor placentero. Los perfumes naturales están hechos a partir de mezclas de extractos de plantas como vainilla, cítricos o flores. Los aceites esenciales se encuentran en diversos órganos y tejidos vegetales, y constituyen los principios de sabor y aroma de las plantas en las que aparecen, estos aceites son generalmente volátiles lo que les da su olor característico a las plantas como por

ejemplo lavanda, limón, rosas, clavo entre otros. Los perfumes sintéticos contienen gran variedad de compuestos seleccionados en base a su similitud con compuestos naturales como el aroma a banana y de durazno.

El propósito de los perfumes en productos farmacéuticos es producir un aroma agradable, enmascarar el olor de algunos ingredientes, o para enmascarar olores biológicos desagradables como el sudor. Los perfumes y aceites esenciales se utilizan como aromatizantes en varios productos farmacéuticos como protectores solares, talcos, lociones y cremas corporales.

Las reacciones alérgicas a perfumes dependen de la exposición prolongada, la exposición tópica puede causar alergia o irritación. El 95% de los compuestos sintéticos usados en fragancias son compuestos derivados de petróleo incluyen derivados de benceno, aldehídos y otros tóxicos que pueden causar cáncer, efectos teratogénicos, desórdenes del sistema nervioso central y reacciones alérgicas.

La cromatografía de gases es la técnica de elección para realizar las identificaciones de aceites y perfumes, debido a que se trata de sustancias volátiles y la prueba se realiza relativamente en poco tiempo aunque la mezcla sea compleja.⁽⁷⁾

CII. Método de preparación

Se compara contra un estándar de perfume de rosas, se inyectan 0.5µL tanto de la muestra como del estándar, no se requiere tratar la muestra puesto que se trata de una identificación, además de que debido a su formulación esta lista para ser analizada.⁽⁵⁾

CIII. Condiciones cromatográficas

Se puede usar helio o nitrógeno como gas acarreador, con un flujo aproximado de 7 mL/min.

Esta reportado en la literatura que para la identificación de perfumes se utiliza una columna capilar de 25m de longitud X 0.25mm de diámetro interno y un espesor de fase estacionaria de 0.3µm, se requiere gran eficiencia para resolver los picos obtenidos de los compuestos debido a que los perfumes son mezclas complejas de compuestos muy parecidos estructuralmente entre sí; se utiliza una fase estacionaria

OV-101 (dimetil silicón), esta fase estacionaria es de tendencia no polar como lo son los compuestos de los perfumes en su mayoría.

Se trabaja con un programa de temperatura iniciando en 100°C debe mantenerse constante por 4min y se aumenta hasta 200°C (0min) a una velocidad de 4°C/min, con esta rampa de temperatura se asegura que eluyan los compuestos con diferentes puntos de ebullición.

Se utiliza un detector de ionización de flama. La temperatura del inyector y del detector es de 250°C. El inyector se trabaja en formato split.

CIV. Manejo de resultados

Debido a que se trata de una identificación en este caso solo se comparan los perfiles cromatográficos de la sustancia de referencia contra la muestra.

D. COMPOSICIÓN DE ACIDOS GRASOS EN MANTECA DE CACAO.

DI. Importancia del análisis

La manteca de cacao es un triglicérido natural que se utiliza como base para supositorios, en menor medida es usado para la elaboración de óvulos y cremas emolientes. La concentración aproximada de los ácidos grasos en la manteca de cacao es de 38,1% de ácido oleico, 35,4% de esteárico y 24,4% de palmítico, el ácido linoleico puede estar presente en alrededor de 2%.²² La manteca de cacao está sometida a transformaciones polimórficas, estas variaciones se pueden presentar de lote a lote y pueden causar que el producto final no cumpla con las especificaciones ya que dependiendo del contenido de sus diferentes ácidos grasos la manteca tendrá una consistencia característica por ejemplo el ácido oleico por si sólo es líquido a temperatura ambiente mientras que el ácido palmítico y el ácido esteárico son sólidos con puntos de ebullición de 60°C y 71°C respectivamente, por lo tanto si cambian las proporciones de los ácidos se cambiara la consistencia final de la manteca de cacao afectando así la calidad de los productos farmacéuticos en los que se utilice este material.⁽⁷⁾

Para cuantificar el porcentaje de cada ácido graso se hace por medio de cromatografía de gases, el porcentaje de cada ácido graso se calcula por normalización de áreas.

DII. Método de preparación

Se pesan de 100 a 150mg de manteca de cacao en un matraz de bola de 50mL, se añaden 4mL de solución de hidróxido de sodio en metanol 0.5N. El matraz se conecta a un condensador para poner la mezcla bajo reflujo hasta que los glóbulos de grasa se mezclen con la solución. Añadir 5.0mL de trifluoruro de boro (en metanol 2M) a la mezcla en ebullición a través del condensador y continuar en ebullición por 2 minutos más, agregar de 2 a 5mL de n-heptano y continuar la ebullición por otro minuto. Remover el matraz del reflujo, para dejar enfriar, agregarle solución saturada de cloruro de sodio hasta el que el nivel del líquido llegue al cuello del matraz. Transferir 1mL de la capa orgánica a un tubo de ensayo, añadir sulfato de sodio anhidro para remover las últimas trazas de agua y filtrar (con embudo de filtración normal y papel filtro), de este filtrado se inyecta 0.1 μ L al cromatógrafo de gases.

Se utiliza estearato de metilo y oleato de metilo a una concentración de 1mg/mL de n-heptano como solución de comprobación del sistema. La resolución entre estos dos compuestos debe ser mayor a 1.5 y el coeficiente de variación para todas las inyecciones de la solución de comprobación del sistema no debe ser mayor al 5.0%.⁽⁵⁾

DIII. Condiciones cromatográficas

Se emplea helio como gas acarreador a una velocidad de 48 cm/s.

Se inyecta por el modo split en una relación de split de 1:60 debido a que se trata de una muestra viscosa y con varias impurezas que pudieran saturar la columna, produciendo una baja eficiencia. La temperatura del inyector se mantiene a 250°C.

Se requiere utilizar una columna capilar de 15m de longitud X 0.25 mm de diámetro interno, recubierta por 0.25 μ m de fase estacionaria de 25%fenil- 25%cianopropil- 50%metilpolisiloxano, ésta es una fase líquida de polaridad intermedia que se usa para separar ácidos grasos esterificados y alcoholes, con la cual se debe evitar el uso de solventes polares como agua y metanol.

Se trabaja con un programa de temperatura que empieza en 180°C y debe llegar a 240°C a una velocidad de 10°C/min y debe mantenerse en 240°C por 5 minutos. Este programa de temperatura permite la separación de compuestos con diferentes puntos de ebullición como los que presentan los ácidos grasos.

Se utiliza un detector de ionización de flama a una temperatura de 250°C.

DIV. Manejo de resultados

El cálculo del porcentaje de cada ácido graso en la manteca de cacao se realiza por medio de la normalización de áreas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Compuesto} = 100 \left(\frac{A_c}{A_T} \right)$$

A_c : área de cada pico

A_T : suma de las áreas de todos los picos obtenidos en el cromatograma.

3. PRUEBA DE SOLVENTES RESIDUALES

Los solventes residuales de acuerdo a la USP son compuestos orgánicos volátiles que son usados en la producción de fármacos o excipientes o en la preparación de productos farmacéuticos. La manufactura de fármacos o cualquier compuesto químico, requiere de grandes cantidades de solvente que pueden ser utilizados es cualquier etapa de la síntesis pero sobre todo en la etapa de purificación. Los solventes residuales no son removidos completamente por técnicas de manufactura. La selección adecuada del solvente para la síntesis de un fármaco o excipiente debe tomar en cuenta el rendimiento (del fármaco o del excipiente) o determinadas características como forma cristalina, pureza y solubilidad del compuesto que se va a sintetizar. Por lo tanto el solvente es un elemento crítico en la síntesis.

Debido a que los solventes residuales no proveen beneficios terapéuticos estos deberán ser removidos para alcanzar las especificaciones del producto, las buenas prácticas de fabricación y otros requerimientos de calidad. Los fármacos pueden contener niveles de solventes residuales no mayores de los que están reportados en las hojas de datos de seguridad médica (MSDS por sus siglas en inglés).⁽¹⁾

Los solventes residuales se clasifican en tres grupos dependiendo su toxicidad como se indica en la siguiente tabla 2.⁽¹⁾

Las pruebas de fármacos, excipientes y productos farmacéuticos para solventes residuales deben realizarse en los procesos de producción o purificación en los cuales se utilicen estos solventes.

CLASE I		CLASE II		CLASE III
Toxicidades inaceptables y deben ser evitados en la producción de fármacos.		Toxicidad menos severa, su uso debe ser limitado en la síntesis de fármacos		Menos tóxicos, son los solventes de elección para sintetizar fármacos.
Compuesto	Límite (ppm)	Compuesto	Límite (ppm)	Estos compuestos se determinan por medio de la prueba de pérdida por secado.
Benceno Dicloroetano Dicloroetano Tetracloruro de carbono	2 5 8 4	Cloroformo Piridina 1,4-Dioxano Diclorometano Tetrahidrofurano Metanol Acetona	60 200 380 600 720 3000 3000	

Tabla 2

E. METANOL, ACETONA Y TETRAHIDROFURANO COMO SOLVENTES RESIDUALES EN MATERIAS PRIMAS

EI. Importancia del análisis

En la síntesis de betametasona fosfato se emplea metanol, acetona y tetrahidrofurano por lo tanto requiere que la prueba de solventes residuales sea específica para estos tres solventes.

EII. Método de preparación

Se prepara una solución madre de los estándares de acetona y de metanol las cuales deben tener una concentración de 15mg/mL ambos se disuelven en agua. La solución madre del estándar de tetrahidrofurano debe tener una concentración de 3.6mg/mL y se disuelve en agua.

La solución estándar combinada debe contener 1mL de estándar de acetona, 1mL de estándar de metanol y 1mL de estándar de tetrahidrofurano en un matraz de 50mL el cual se lleva al aforo con agua.

La solución de la muestra se prepara de la siguiente manera: se pesa 1g de la muestra y se coloca en un matraz aforado de 10mL y se lleva al aforo con agua.

Se toman 10mL de la solución de estándar combinada y se coloca en un vial de 20mL, de la misma manera se colocan 10mL de la solución de la muestra en un vial de 20mL. Se inyecta 1mL de cada solución al cromatógrafo de gases.⁽¹⁾

Debido a que se cuantifican cantidades en ppm en la muestra se utiliza la técnica “headspace” para concentrar y aumentar la respuesta de los compuestos que se van a cuantificar.

La técnica de “headspeace” se trabaja de modo estático con las siguientes condiciones:

Temperatura del vial: 85°C

Temperatura de la línea de transferencia: 100°C

Tiempo de equilibrio del vial: 15minutos

EIII. Condiciones cromatográficas

Se usa nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 1.5mL/min.

Se requiere inyectar la muestra en modo split con un flujo de split de 25mL/min. El inyector debe mantenerse a una temperatura de 350°C.

Para la cuantificación de estos solventes residuales esta reportado en la literatura que se utiliza una columna Carbowax 20M (polietilenglicol) que es una fase estacionaria muy polar de 30m de longitud X 0.25mm de diámetro interno y un espesor de fase estacionaria de 0.25µm, se trabaja de manera isotérmica a una temperatura de 40°C.

El detector de ionización de flama se mantiene a una temperatura de 350°C.

EIV. Manejo de resultados

La resolución entre los picos de tetrahidrofurano y acetona debe ser mayor a 3; el número de platos teóricos debe ser mayor a 16000 para ambos compuestos, para asegurar que la cuantificación será correcta ya que se cuantifican cantidades muy pequeñas.

$$\text{Solvente residual (ppm)} = \frac{\text{As en la muestra}}{\text{As en el estándar}} \times C_s \times \frac{\text{aforo de la muestra}}{W_m} \times 10^6$$

Donde:

As= *área del solvente residual*

Cs= *concentración del solvente residual*

Wm= *peso de la muestra*

10⁶= *factor de conversión a ppm*

4. DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS

El perfil de impurezas es un grupo de actividades analíticas, en las cuales el objetivo es identificar y cuantificar impurezas orgánicas e inorgánicas, así como solventes residuales ya sea en fármacos a granel o en formulaciones.

Las impurezas orgánicas se presentan debido a la degradación del mismo fármaco y debido al proceso de manufactura, por lo tanto deben ser monitoreados en fármacos nuevos y en los estudios de estabilidad de cada medicamento.⁽⁶⁾

Impurezas ordinarias son aquellas presentes en las materias primas que no poseen actividad biológica indeseable en las cantidades encontradas. Estas impurezas pueden provenir de la síntesis, preparación o degradación de la materia prima. La estimación de estas impurezas se efectúa por medio de métodos en los que no es necesaria la estricta comparación contra un estándar. El límite total de impurezas ordinarias para un compuesto en general debe ser de 2.0%.

Las impurezas específicas se diferencian de las ordinarias en que estas requieren identificación y cuantificación individual por medio de un método específico.

Las sustancias relacionadas son estructuralmente parecidas al compuesto de interés. Pueden ser productos de degradación identificados o no identificados, que se originaron del proceso de manufactura o durante el almacenamiento del material.

Sustancias extrañas son introducidas por contaminación o adulteración y no son consecuencia de la síntesis o preparación y por lo tanto no pueden ser previstas cuando se selecciona una prueba o ensayo.

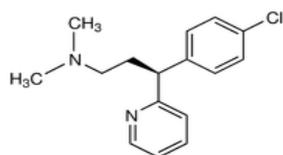
Si un material que previamente se considera puro, llega a separarse en más de un componente, se puede definir en nuevos términos de pureza.

La cromatografía ofrece una mayor facilidad para la separación de los compuestos de las muestras, por lo que es la herramienta de elección en el análisis de impurezas. Las farmacopeas tienen tres tipos de pruebas de pureza para materias primas:

- a. Un método cromatográfico acoplado con un ensayo no específico.
- b. Un método indicador de pureza que también se usa para determinar el ensayo.
- c. Un método específico para una impureza conocida. Generalmente tiene un límite determinado y se requiere un estándar de referencia.

Para producto el método analítico utilizado como indicador de estabilidad también es un indicador de pureza. Cuando se conocen impurezas más significativas, algunas monografías requieren pruebas límite específicas.⁽¹⁾

F. SUSTANCIAS RELACIONADAS DE MALEATO DE DEXCLORFENIRAMINA (Materia Prima).



Maleato de dexclorfeniramina

FI. Importancia del análisis

Debido al proceso de síntesis de maleato de dexclorfeniramina se deben medir las sustancias relacionadas de esta materia prima que se obtiene a partir de clorfeniramina racémica la cual es separada con la ayuda del ácido fenilsuccínico. El (+)-enantiomorfo de la base se libera de su sal fenilsuccinato mediante el tratamiento con hidróxido de sodio y se hace reaccionar con ácido maleico.⁽⁷⁾

FII. Método de preparación

La muestra se disuelve en cloruro de metileno, ya que se requiere que el compuesto principal y las sustancias relacionadas sean muy solubles para tener un nivel de concentración de la impureza razonable.

FIII. Condiciones cromatográficas

Se puede utilizar helio o nitrógeno como gas acarreador con un flujo ajustado para obtener un tiempo de retención de 6 a 7 minutos para el pico de maleato de dexclorfeniramina.

En esta prueba se utiliza una columna empacada de vidrio de 1.2m de longitud X 4mm diámetro con 3% de fase estacionaria 50% fenil-50% metilpolisiloxano de polaridad intermedia sobre un soporte de tierras silicias (Chromosorb WHP) con un tamaño de partícula de 100/120 mallas. Se trabaja de manera isotérmica a una temperatura de 190°C.

La temperatura del inyector y la del detector de ionización de flama se mantiene en 250°C.

FIV. Manejo de resultados

El factor de coeio para el pico de maleato de dexclorfeniramina no debe ser mayor a 1.8.

El área total relativa de todos los picos extraños (excepto el pico del disolvente y del ácido málico si se observa) no debe exceder el 2.0%⁽⁵⁾ al calcularse por el método de normalización de áreas.

G. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE ÓXIDO DE ETILENO EN MATERILES DE EMPAQUE PRIMARIO ESTÉRILES.

GI. Importancia del análisis

El óxido de etileno es usado para esterilizar material termolábil, es un gas incoloro con un distintivo olor dulce. La exposición a 200ppm de óxido de etileno puede causar irritación de ojos, y de las vías respiratorias altas. El equipo esterilizado con óxido de etileno al cual no se le removió adecuadamente los residuos de oxido de etileno puede causar quemaduras en la piel, además de causar hipersensibilidad

El óxido de etileno es un carcinógeno, usado para esterilizar dispositivos médicos, así como también en procesos asépticos en contenedores de plástico para productos farmacéuticos. Con el método apropiado se puede determinar cantidades desde 1 a

750ppm.⁽¹⁰⁾ Los niveles de óxido de etileno en fármacos y material de empaque debe apegarse a estrictas regulaciones.⁽¹¹⁾

La determinación de óxido de etileno en control de calidad de materiales de empaque, es necesario para monitorear la posible migración de este compuesto tóxico a la formulación.

GII. Método de preparación

Preparación del estándar

En un vial de 60mL se colocan unas cuantas perlas de ebullición con el fin de homogenizar las muestras, se sella con una septa headspace, se conecta a una bomba de vacío por espacio de 5 minutos, perforando con una aguja la septa para tener un vacío dentro del vial, registrar el peso en g. Para muestrear el óxido de etileno que se usará como estándar de referencia primero se abre la llave del tanque de óxido de etileno líquido lentamente hasta que se forme una gota en la punta de la jeringa, se introduce la aguja en el frasco por espacio de 10 segundos, se saca la aguja y se cierra el tanque, se registra el peso del vial con el estándar.

Preparación de la muestra

Se cortan cuadros de aproximadamente 5mm² del frasco que será usado como muestra y del blanco (muestra no esterilizada), se pesan alrededor de 2g de la muestra esterilizada y del blanco, se transfiere por separado a viales de 60mL, se colocan unas perlas de ebullición y los viales se sellan herméticamente. Se conectan a una bomba de vacío para extraer el aire, se calientan las muestras a 100°C por 2 horas para que el óxido de etileno contenido en el frasco se desorba, enfriar a temperatura ambiente, se agitan los viales por 30 minutos.

Con una micro jeringa se toma 1mL del estándar y se inyecta al cromatógrafo de gases, se hace la misma operación con la muestra y el blanco.⁽¹⁾

GIII. Condiciones cromatográficas

Se utiliza helio o nitrógeno con un flujo aproximado de 50mL/min ya que se trata de una columna empacada.

Por tratarse de un gas se utiliza una fase estacionaria sólida, se utiliza una columna empacada que puede ser de vidrio, teflón o de acero inoxidable en su tubería de 6 pies de longitud X 1/8 pulgadas de diámetro, empacada con Chromosorb 102 (divinilbenceno-estireno) la cual es usada para separar gases ligeros y compuestos de bajo peso molecular así como también para compuestos oxigenados de tamaño de partícula de malla 80/100. Se trabaja en modo isotérmico a una temperatura de 100°C. Se utiliza un detector de ionización de flama, éste y el inyector se mantienen a una temperatura de 200°C.

GIV. Manejo de resultados

$$\text{Óxido de etileno (ppm)} = \frac{Hm - Hbco}{Hs} \times \frac{Ws}{60 \text{ mL aforo}} \times \frac{60 \text{ mL aforo}}{Wm} \times 10^6$$

Donde:

Hm= altura del pico de la muestra

Hbco= altura del pico del blanco

Hs= altura del pico del estándar

Ws= peso del estándar

Wm= peso de la muestra

10⁶= factor de conversión a ppm

V. RESUMEN DE LA DISCUSIÓN

La química analítica juega un papel muy importante en el control de calidad tanto de productos intermediarios como del producto final, dependiendo de la naturaleza de los compuestos los métodos de cromatografía de gases se usan en el control analítico automatizado de rutina.

Es evidente la importancia de la cromatografía de gases en la industria farmacéutica; se refleja en los compendios farmacopeicos ya que cada con cada actualización de estas los métodos que requieren esta técnica aumentan considerablemente, por ejemplo con la armonización en todas las farmacopeas del mundo de la prueba de solventes residuales que se realiza gracias a la cromatografía de gases se incremento notablemente su uso.

La cromatografía de gases es una herramienta que simplifica y hace más rápido el análisis para los controles que se requieran en cuanto a calidad, debido a ello su uso se ha convertido en rutinario en el laboratorio, indispensable para la industria farmacéutica ya que éstas permiten tener un análisis más completo y más rápido de los productos que son fabricados; por lo que gracias a ellas podemos tener dictámenes más veraces, confiables y en un menor tiempo.

Los métodos de cromatografía de gases son usados en ensayos de materia prima, de producto en proceso y de producto terminando. Es una técnica sumamente importante en la determinación de impurezas ya que al ser un método de separación se pueden encontrar todas las impurezas propias de la síntesis del compuesto o las debidas a la degradación de éste, por medio de la normalización de áreas se simplifica el proceso para calcular las impurezas. Se pueden hacer identificaciones del principio activo comparando el tiempo de retención con el de un estándar al mismo tiempo que se realiza el ensayo o la determinación de impurezas.

Con la cromatografía de gases se pueden separar, identificar y cuantificar impurezas, se fijan límites que van de acuerdo a la toxicidad de cada impureza, lo cual cobra una importancia mayor cuando se habla de excipientes ya que estos son los constituyentes mayoritarios en el producto terminado (medicamento).

Al ser éste un método donde los compuestos más fáciles de analizar son las sustancias volátiles resulta la herramienta de elección para la determinación de solventes residuales provenientes de la síntesis del fármaco y excipientes empleados para la fabricación de medicamentos.

Este trabajo recopilatorio sobre cromatografía de gases nos muestra algunos ejemplos de la importancia que esta técnica tiene en el laboratorio de control de calidad en la industria farmacéutica además de la importancia que seguirá teniendo ya que los avances en esta técnica continúan surgiendo con lo cual aumentara su utilización en otras metodologías analíticas.

El desarrollo de nuevas fases para columnas, la construcción de detectores con mayor sensibilidad, el mejoramiento de los inyectores y los nuevos programas de computo hacen que la cromatografía de gases siga incrementando el campo de aplicación en la industria farmacéutica.

VI. CONCLUSIONES

Se realizó una revisión bibliográfica de algunas metodologías para el análisis de materia prima, productos terminados y material de empaque que requieren cromatografía de gases como técnica analítica, en la industria farmacéutica.

Se revisó la importancia que tienen estas pruebas durante el control de calidad en la fabricación de medicamentos y como impacta realizar correctamente el análisis en la salud del paciente.

También se revisaron las condiciones cromatográficas, el método de preparación de muestras y la cuantificación de los compuestos (cuando así aplica) de los métodos publicados por las farmacopeas.

Como conclusión final vemos que la cromatografía de gases es una técnica analítica que está presente en el laboratorio de control de calidad y además seguirá teniendo gran impacto en el desarrollo de nuevos métodos de análisis debido a las características de los compuestos que se manejan en cromatografía de gases.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. United States Pharmacopeia NF 30, 2008, **Chromatography** { 621 }, **Residual Solvents, Organic Volatile Impurities** { 467 }.
2. Mc Nair H., **Cromatografía de gases**, Washington DC, 1981, pages 3-19,
3. Christian, **Analytical Chemistry**, Ed. Wiley, USA, 2004.
4. Robards K, Haddad P, Jackson P, **Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods**, Ed Elsevier, Philadelphia USA, 1994. pages 2-74
5. **Farmacopea de los Estados Unidos de México**, 8ª edición, 2004
6. International Conference on Harmonisation (ICH) Quality Guidelines, **Impurities in new drug substances and in new drug products**, 2005.
7. Remington, **Farmacía**, Ed. Panamericana, Madrid, 2003.
8. **Diccionario de especialidades farmacéuticas**, PLM, 2002.
9. Ellenhorn, **Medical toxicology**, 2nd edition, Ed. Williams y Wilkins, 1997 pages: 1129-1133, 1159-1163.
10. <http://www.chem.agilent.com> Agilent Applications 17Mayo2008
11. P. Sandra, F. David, R. Szucs, **Some applications of state-of-the-art capillary gas chromatography in the pharmaceutical industry**, Trends in analytical chemistry, Vol. 21, (2002), pages 662-671