

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



**“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ETANOL EN
JARABES PEDIÁTRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO presentado
ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
por la Br. Ariday Ramos Calzadilla, para optar al
título de Licenciado en Química, mención
Tecnología.

Tutores: Dr. Luis R. Gómez
Dr. Jimmy Castillo

Caracas, Octubre de 2014

Profesor Luis R. Gómez, investigador del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela y el Profesor Jimmy Castillo, investigador del Centro de Fisicoquímica de la Universidad Central de Venezuela, certifican que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ETANOL EN JARABES PEDIÁTRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”

Presentado por la Br. Ariday Ramos Calzadilla, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre 2014

Dr. Luis R. Gómez
(Tutor)

Dr. Jimmy Castillo
(Tutor)

Resumen

Las formas farmacéuticas líquidas que se administran por vía oral son las de mayor uso en el área pediátrica. Generalmente los jarabes son la elección de preferencia por su capacidad de enmascarar los sabores amargos o salados de algunos componentes. La mayoría de estos fármacos contienen en su formulación EtOH, utilizado como agente solubilizador para componentes insolubles en agua. Cuando este es administrado en concentraciones o dosis altas, producen numerosos efectos sobre la salud del niño, por esta razón, el siguiente trabajo de investigación se propuso desarrollar un método analítico sencillo, rápido y económico para su determinación.

Se desarrolló un método por la técnica de Cromatografía de Gases, utilizando el sistema de introducción de muestra por Headspace (HS), las condiciones cromatográficas de trabajo son las siguientes: columna capilar de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, con fase estacionaria DB-WAX de 0,25 μm de grosor, la cual se mantuvo isotérmicamente a 80 °C y la fase móvil fue N_2 con un flujo de 1,5 mL/min. Se utilizó un detector FID a una temperatura de 250°C. Por otra parte, las condiciones de trabajo de HS fueron de 40 °C para la temperatura de equilibrio y 15 minutos como tiempo de equilibrio.

Este método fue validado utilizando el protocolo establecido por el apartado <611> de la USP 30 NF25, encontrando que no había diferencias significativas entre los resultados obtenidos a partir del método desarrollado y el método clásico. Esto indica que el método cromatográfico podría sustituirlo, por su rapidez a la hora de analizar grandes números de muestra.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ETANOL EN JARABES PEDIÁTRICOS MEDIANTE LA TÉCNICA HS-GC”** presentado por la Br. Ariday Ramos Calzadilla, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Luis Gómez
(Tutor)

Dr. Jimmy Castillo
(Tutor)

Dr. Rafael Golding
(Jurado)

Esp. Marisabel Bor
(Jurado)

Agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecer a Dios y a la Virgen Del Valle por haberme acompañado y guiado a lo largo de este trayecto, fueron mi fortaleza en momentos de debilidad, mis alentadores en momentos en los cuales las ganas de rendirme y tirar la toalla me invadían. Les agradezco haberme permitido tener momentos tanto dulces como amargos a lo largo de mi carrera, esto me hizo crecer académicamente y aún más como persona.

Le doy gracias a mi madre por brindarme su apoyo en todo momento, por haberme inculcado buenos valores y velar siempre por mi buena educación, agradezco cada uno de sus sabios consejos y sus palabras de aliento, esto fue lo que me permitió recorrer este largo camino. Siempre orgullosa de su niña, pero yo más, porque es un excelente ejemplo a seguir. Mi madre junto a Pepe me brindaron una familia pequeña pero unida, con un ambiente tranquilo y estable, fundamentales piezas para hacer de mí la persona que soy hoy en día.

Especiales agradecimientos a mis tutores, a los Prof. Gustavo Pérez y José Chirinos, por su formación académica, sus buenos consejos y apoyo, pero sobre todo por darme la oportunidad de realizar pasantías en el Centro de Química Analítica, fue mi gran escuela.

Agradezco a cada uno de los grandes amigos que tuve el placer de conocer en aquellos pasillos de Narnia, un grupo bastante variado donde no sólo habían químicos, sino computistas y hasta matemáticos, algunos me acompañaron durante más tiempo que otros, pero gracias por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. No puedo dejar de lado aquellos amigos que no compartían mi gusto por la ciencia, pero que en todo momento me apoyaron y estuvieron presentes.

Por último (pero no por eso menos importante), dedico este logro a mi ángel Rosa Calzadilla, que aunque no me acompañe físicamente, siempre está en mi corazón. Gracias por siempre estar presente y cuidarme, esto también es para ti.

Índice:

I.- Introducción	1
II.- Revisión Bibliográfica	2
II.1.- Formas farmacéuticas	3
II.2.- Jarabes	5
II.2.1.- Excipientes en jarabes	6
II.2.2.- Disolventes en jarabes	8
II.3.- Propiedades físicas y químicas del etanol	9
II.4.- Efectos del etanol en la salud	10
II.5.- Introducción a las técnicas cromatográficas	13
II.6.- Cromatografía de gases	14
II.6.1.- Gas de arrastre o gas portador	15
II.6.2.- Sistema de introducción de muestra	16
II.6.3.- Columnas cromatográficas	18
II.6.4.- Detectores	22
II.7.- Cuantificación de muestras por análisis en espacio confinado (HS-Headspace)	25
II.7.1.- Teoría básica del análisis por HS	26
II.7.2.- Bases Fisicoquímicas para el HS	29
II.7.3.- Factores que afectan la sensibilidad del HS	32
II.7.4.- Tipos de headspace	33

III.- Antecedentes	37
IV.- Justificación	45
V.- Objetivos	46
VI.- Metodología Experimental	47
VI.1.- Materiales y equipos utilizados	47
VI.2.- Condiciones cromatográficas preliminares	50
VI.3.- Elaboración del material de referencia interno	53
VI.4.- Condiciones cromatográficas de trabajo	54
VI.5.- Estudio de las condiciones de trabajo por HS	56
VI.6.- Métodos de cuantificación	65
VI.7.- Validación del método HS-CG	74
VI.8.- Determinación del contenido de etanol en jarabes comerciales	77
VII.- Conclusiones	78
VIII.- Recomendaciones	81
IX.- Bibliografía	82
X.- Apéndice	85

I.- Introducción:

Durante mucho tiempo la farmacología clínica para adultos ha exhibido un gran desarrollo en la mayoría de las especialidades médicas, suceso que no se ha replicado en la farmacología pediátrica. Sin embargo, en las últimas décadas la investigación clínica en pacientes pediátricos ha tomado un carácter prioritario, siendo actualmente impulsada por las industrias farmacéuticas. Los estudios relacionados con la administración de medicamentos a niños, apuntan hacia las formas farmacéuticas líquidas, por su fácil administración y capacidad de enmascarar sabores “desagradables”.

Una de las fórmulas más exitosas para la administración de los principios activos en los niños son los jarabes, no obstante, este tipo de presentación posee diversos excipientes que pudieran desencadenar un efecto tóxico en los niños. Uno de los componentes más comunes que pudieran contener los jarabes es el etanol, agregado fundamentalmente para ayudar a la disolución de los diferentes componentes del mismo. Si no existe un control estricto de la concentración de etanol, o desde otro punto de vista, si se requiere de tratamientos muy prolongados, este puede tener secuelas graves en el organismo de un niño. De allí la importancia del desarrollo de métodos de análisis rápidos, sencillos y eficaces para la determinación de las cantidades de etanol en jarabes.

Por consiguiente, el objetivo fundamental del siguiente trabajo se resume en la determinación de etanol en jarabes pediátricos comercializados en el país, mediante la técnica de Headspace-Cromatografía de Gases.

II.- Revisión Bibliográfica:

En todas las épocas el hombre ha utilizado sustancias minerales, vegetales o animales con el fin de procurar su salud. En este orden de ideas se fue desarrollando una “ciencia farmacológica”, que en una primera etapa tuvo carácter empírico, basada en experiencias, y suele anunciarse con cierta frecuencia que tenía un carácter mítico. En Grecia se dio el salto a un nuevo tipo de concepción a la enfermedad y a su remedio en particular, caracterizándola por el cambio de una farmacología de un rango empírico a otra más precisa y técnica. Entre los siglos XVI y XVIII se asentaron las bases de una nueva farmacología, el viejo sistema impuesto por los médicos griegos fue cediendo su paso a otro sistema conforme a los cánones de la ciencia experimental, apareciendo con detalles los ensayos de validación a finales del siglo XVIII. Luego ocurrió un brote de la homeopatía como exploración de nuevos caminos de la farmacología moderna.^[1]

En la cultura contemporánea los químicos no se conformaron solo con extraer de la naturaleza los productos activos purificados, también querían sintetizarlos en los laboratorios, o producir otros que no existían en el entorno. Los nuevos productos químicos eran aislados para comprobar su acción farmacológica. En el siglo XX se observó un enorme desarrollo en la farmacología específica, gracias al poder económico de los países occidentales, que aumentó el poder adquisitivo de su población, haciendo que se dinamizara el mercado farmacéutico.^[1]

En los últimos años ha existido un auge en la investigación de medicamentos pediátricos, debido a la falta de información acerca de la eficacia y seguridad de muchos medicamentos que permita aprobar su uso en niños.

Por otra parte, no puede considerarse la farmacología pediátrica como una mera adaptación de la farmacología adulta, con la utilización de dosis más pequeñas. La infancia es un período de crecimiento y desarrollo constante, paulatinamente se van madurando órganos y sistemas que conllevan a una importante variabilidad en la respuesta hacia los medicamentos.

Entre las diferencias con respecto a los adultos, cabe destacar los procesos farmacocinéticos y los farmacodinámicos, estos convierten al niño en un ser único desde el punto de vista farmacológico, por lo que se añade una patología exclusivamente pediátrica. La ausencia de formas farmacéuticas apropiadas conlleva a un peligroso empleo de medicamentos no autorizados a estas edades.^[1]

II.1.- Formas Farmacéuticas:

Un medicamento es todo aquel fármaco, producto químico o microbiológico que se administra a un paciente con fines terapéuticos. En todo medicamento se pueden diferenciar dos conceptos:

- Sustancia medicamentosa o principio activo: Es la porción del medicamento con capacidad terapéutica. Por lo general, se encuentra pequeña proporción

respecto al resto del medicamento y no es adecuada para su administración o aplicación directa al organismo.^[2]

- **Forma farmacéutica:** Es la disposición externa que se le da a las sustancias medicamentosas o principios activos, para facilitar su administración y asimilación en el organismo. Estas pueden existir en varios estados: sólido, semisólido y líquido. Generalmente en el área pediátrica las formas farmacéuticas líquidas son las de mayor uso, ya que poseen una gran ventaja porque pueden ser administradas por vía oral a niños o adultos incapaces de deglutir comprimidos o cápsulas.^[2]

Los líquidos para la administración oral que contienen uno o más principios activos disueltos, se pueden clasificar en:

Emulsiones: Son sistemas dispersos heterogéneos donde una fase líquida (interna o discontinua) está dividida en forma de glóbulos en el seno de una fase dispersante (externa o continua) también líquida. Este concepto implica que ambas fases son inmiscibles, y dependiendo de cada fase se distinguen como: emulsiones con fase interna oleosa y externa acuosa o viceversa.^[2]

Suspensiones: Son preparados líquidos constituidos por partículas sólidas dispersadas en una fase líquida en la cual las partículas no son solubles. Algunas suspensiones están preparadas y listas para su uso, mientras otras se presentan como mezclas de polvos para reconstituirse antes de uso, con el vehículo que corresponda. Si están destinados para el uso oral poseen diversidad de agentes saborizantes.^[2]

Soluciones: Son preparados líquidos que contienen una o varias sustancias disueltas en un solvente o una mezcla apropiada de solventes, miscibles entre sí. Ya que las moléculas en las disoluciones se dispersan uniformemente, el empleo de estas como forma farmacéutica contempla en general la seguridad de dosificación uniforme con la administración. En el área pediátrica las soluciones que son más utilizadas son los jarabes.^[2]

II.2.-Jarabes:

El jarabe es una solución oral, comúnmente de disoluciones acuosas, que contienen azúcar (natural o sintética) en concentraciones cercanas a las de saturación. Son de consistencia viscosa, pueden contener polioles tales como la glicerina o el sorbitol, esto con el fin de retardar la cristalización de la sacarosa o aumentar la solubilidad de componentes agregados.

Generalmente se presentan como líquidos homogéneos, translúcidos, brillantes, poseen sabor y olor agradable, y pueden ser incoloros o coloreados. Debido a estas características son muy eficaces a la hora de enmascarar el sabor amargo o salado de algunos componentes. Por esta razón los jarabes son adecuados para la elección como vehículo para muchos fármacos pediátricos.

Hay diversos tipos de jarabes, si solo se utiliza agua purificada para preparar la solución de sacarosa se habla de un **jarabe simple**, en cambio un **jarabe aromatizado** es aquel que no es medicado, pero que contiene diversas sustancias aromáticas de olor y sabor agradable, es utilizado como vehículo o agente aromatizante en ciertas prescripciones,

por ejemplo: el jarabe de goma arábica, de cereza, de cacao ó naranja. Si la preparación acuosa contiene alguna sustancia medicinal o principio activo se denominan **jarabes medicados**. Por lo general, este tipo de jarabes contienen ciertas cantidades de alcoholes que tienen como papel principal el de conservantes, además de ser coadyuvante para la disolución de algunos componentes que pudieran tener poca solubilidad en agua.^[2]

II.2.1.- Excipientes en los jarabes:

Los excipientes son sustancias que carecen de actividad farmacológica, que se emplean con el fin de dotar a la forma farmacéutica estabilidad, aceptabilidad y facilitar la administración del principio activo. En los jarabes los excipientes más utilizados son: edulcorantes, saborizantes y colorantes.

II.2.1.1.- Edulcorantes:

Un edulcorante puede actuar como base constitutiva, coadyuvante o correctivo del sabor, pueden ser naturales o sintéticos. Como edulcorante natural se encuentra la sacarosa, esta es soluble en agua y en alcoholes de poca graduación, a medida que esta aumenta, la sacarosa disminuye su solubilidad. Los edulcorantes sintéticos sustituyen al azúcar para dar sabor dulce a los jarabes para diabéticos, entre este grupo se encuentran aspartame y la sucralosa.

II.2.1.2.-Saborizantes y Colorantes:

El uso de jarabes de colores y sabores apropiados, aunque no ofrecen ninguna ventaja terapéutica particular, tienen considerable importancia psicológica en especial cuando se trata de tratamientos pediátricos. Un medicamento claro con aspecto similar al agua, no es particularmente aceptado por la mayoría de los pacientes, y en general, lo consideran inerte.

Muchos de los principios activos de estos fármacos son de sabor “desagradable”, y el paciente lo rechaza sencillamente debido a que el sabor o el aspecto son inaceptables. Los medicamentos con estas características pueden hacerse de sabor agradable y atractivo a la vista, gracias a una selección cuidadosa de colorantes y saborizantes.

Las formas farmacéuticas líquidas tienen mayor contacto con las papilas gustativas, esto hace que se perciba de forma más acentuada cualquier propiedad organoléptica “desagradable” de los fármacos. Los saborizantes pueden ser naturales, entre estos se encuentran una gama de aceites esenciales, extractos frutales, entre otros, o pueden ser sintéticos, entre los que se destacan los aldehídos, ésteres y las cetonas. Para hacer el uso de estos saborizantes, estos deben estar permitidos y avalados por autoridades sanitarias.

Los agentes colorantes pueden definirse como compuestos utilizados con el único objeto de impartir color. Pueden ser clasificados de distintas maneras: orgánicos e inorgánicos, o colorantes naturales y sintéticos. Dependiendo de la intensidad de color

que se desee, la concentración de colorante en líquidos varía en un rango entre 0,0005 % a 0,001 % v/v.^{[3][4][5]}

II.2.2.-Disolventes en jarabes:

El agua destilada por sus propiedades fisicoquímicas y la perfecta tolerancia por el organismo, es el solvente de elección para muchos principios activos tales como, sales minerales, ácidos orgánicos, azúcares, proteínas, entre otros. En muchos casos hay ciertos componentes que no presentan completa solubilidad en agua, en este caso se puede mejorar la solubilidad por adición de otras sustancias, éstas reciben el nombre de solubilizadores. Por lo general se utilizan mezclas hidroalcohólicas.

Estos solubilizadores no deben alterar la actividad del medicamento, no deben provocar efectos fisiológicos secundarios no deseados, además no deben tener acción tóxica principalmente si el uso del medicamento es prolongado y deben ser compatibles física y químicamente con todos los componentes del preparado. Estos alcoholes que funcionan como agentes solubilizadores también actúan como agentes antimicrobianos, ya que el agua es un medio particularmente favorable para el desarrollo de bacterias, y al adicionarle cantidades específicas de alcohol aumenta la resistencia ante ataques bacterianos.

El etanol es el agente solubilizador más común que se puede encontrar para algunos principios activos que son insolubles en agua. El rango de concentraciones puede variar dependiendo de la formulación del producto.

Kulkarni et al. han reportado que el 80% de los medicamentos de uso pediátrico se producen en forma líquida, y estos poseen un contenido de etanol que varía en un rango de 2,8% al 20% v/v.^[6]

II.3.- Propiedades físicas y químicas del Etanol:

Un alcohol es un compuesto químico que tiene un grupo hidroxilo (-OH) enlazado covalentemente a un átomo de carbono. El alcohol etílico o comúnmente llamado etanol, es un alcohol primario de fórmula molecular C_2H_6O , su peso molecular es de 46,07 g/mol, y a condiciones normales de temperatura y presión (25 °C y 1 atm) su estado de agregación es líquido, además es incoloro y volátil. Su volatilidad se debe a su alta presión de vapor que hace que los átomos superficiales “escapen” del seno del líquido, pasando al vapor con mayor facilidad. Su punto de ebullición es de 78 °C.^[7]

La diferencia de electronegatividad entre los heteroátomos hace que los enlaces C-O y O-H tengan un momento dipolar, orientado hacia el átomo más electronegativo que es el oxígeno, haciendo que la molécula adquiera carácter polar. Esta propiedad hace que sea miscible en agua.

Además de haber entre ellos fuerzas intermoleculares del tipo Van der Waals y dipolo-dipolo, sobre estas se impone la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno son atracciones intermoleculares, que ocurren entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo electronegativo (N, O o F), y un átomo que tenga exceso de densidad electrónica (pares de electrones libres) estabilizando la

deficiencia de carga del hidrógeno. Esta tipo de interacción es la responsable de la miscibilidad entre el agua y el etanol.^{[7][8]}

II.4.- Efectos del Etanol en la salud:

Tras su ingestión, el etanol es rápidamente absorbido por la mucosa del estómago en un 30 % y después por el intestino delgado el 70 % restante. La oxidación ocurre casi completamente en el hígado (90 %), vía alcohol deshidrogenasa, siguiendo una cinética de orden cero, es decir, independiente de la concentración. El otro 10 % puede ser eliminado por vías accesorias, como el riñón y el pulmón.

El sistema nervioso central (SNC) es el más afectado por el alcohol, ya que el mismo es un depresor primario y continuo de este sistema. El alcohol produce tolerancia y aparte de sus efectos sobre el SNC, puede producir hipoglicemia, hepatitis aguda, trastornos cardíacos, entre otros.^[9]

Los síntomas que puede presentar un paciente según los niveles (mg/dL) de etanol en sangre, son los siguientes:

- Intoxicación legal (50-100 mg/dL): euforia, verborrea, desinhibición e incoordinación.
- Intoxicación leve (100-200 mg/dL): farfullar de palabras, labilidad emocional, torpeza motora, ataxia, alteración de reflejos, somnolencia y náuseas.

- Intoxicación moderada (200-300 mg/dL): lenguaje incoherente, agresividad, letargia, estupor y vómitos.
- Intoxicación grave (300-400 mg/dL): depresión del SNC, coma. El coma suele ser profundo sin signos de focalidad. Aparecerán hipotermia, midriasis bilateral poco reactiva, hipotonía, abolición de los reflejos osteotendinosos, bradicardia e hipotensión.
- Intoxicación potencialmente letal (> 400 mg/dL): depresión respiratoria, convulsiones, «shock» y muerte. La muerte puede sobrevenir también por aspiración de un vómito, por coma cetoacidótico, y por hipoglicemia.^[9]

La presencia de etanol en las medicaciones líquidas orales pediátricas tiene un interés toxicológico importante, tanto para la ingestión aguda como la exposición pasiva que se puede producir durante tratamientos prolongados de medicamentos que lo contengan. El etanol después de ser ingerido por infantes puede causar depresión del SNC, además puede producir un cuadro de hipoglicemia, esto es una grave complicación que debe ser detectada y tratada a tiempo, por su capacidad para producir secuelas neurológicas, también incluyen síntomas como disminución del tiempo de reacción, incoordinación muscular y cambios de comportamiento. Se ha reportado que incluso la exposición prenatal de etanol puede tener influencia en el desarrollo del niño, incluyendo hiperactividad, problemas de atención, déficit de memoria y problemas con el desarrollo emocional y social.^[10]

Por esta razón, el Comité contra las drogas de la Academia Americana de Pediatría, ha hecho las siguientes recomendaciones específicas a la FDA (U.S. Food and Drugs Administration):

- Las preparaciones líquidas de venta libre deberían limitarse a un máximo de 5% v/v de etanol.
- Es necesaria la supervisión médica cuando se receta a niños menores de 6 años de edad, preparaciones que contienen alcohol.
- La cantidad de etanol contenido en cualquier preparación medicinal no debería ser capaz de producir una concentración en la sangre mayor a 25 mg/100 mL, luego de ser administrada una dosis.
- Se debe recetar un intervalo adecuado entre las dosis de los medicamentos, para prevenir la acumulación de alcohol en la sangre.
- El volumen del envase de los productos que contienen etanol se deben reducir a un mínimo razonable para evitar posibles ingestiones letales, además se recomienda el uso de cierres de seguridad contra niños, para los medicamentos con un contenido de etanol mayor al 5%.^[11]

Debido a la toxicología del etanol en niños, es importante el control y la determinación de las concentraciones de alcohol permitidas en las medicaciones pediátricas. Dichas determinaciones generalmente se realizan por las técnicas cromatográficas.

II.5.- Introducción a las técnicas cromatográficas:

La cromatografía agrupa un conjunto de diversas técnicas que permiten separar componentes de mezclas complejas, en la cual la muestra es transportada por una fase móvil a través de otra muy interactiva, conocida como fase estacionaria. Estas fases se eligen de forma tal que los componentes de la muestra se distribuyan entre cada una de ellas de forma distinta. Aquellos analitos que interactúen más fuertemente con la fase estacionaria serán más “retenidos”, y se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil, por el contrario, los analitos que tengan interacción pobre con la fase estacionaria se moverán más rápido. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en *bandas* que pueden ser analizadas cualitativa o cuantitativamente.^[12]

II.5.1.- Clasificación de las técnicas cromatográficas:

Existen tres tipos generales de técnicas cromatográficas: Cromatografía de Gases, Cromatografía de Líquidos y Cromatografía de Fluidos Supercríticos, según la fase móvil sea un gas, un líquido o un fluido en condiciones supercríticas respectivamente. Estas técnicas con sus respectivas ventajas y limitaciones, compiten entre sí en las aplicaciones en cuanto al tipo de analitos a determinar, sin embargo, debido al carácter volátil y la estabilidad térmica del etanol, así como lo versátil, sencilla y económica de la

cromatografía de gases, se decidió realizar el análisis por esta técnica. Por lo tanto, se hará énfasis en la misma.

II.6.- Cromatografía de gases:

En cromatografía de gases se hace pasar el analito volatilizado a través de una columna que contiene la fase estacionaria a una temperatura determinada, este es arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamado gas portador o de arrastre. La muestra, la cual puede ser un gas o un líquido volátil y térmicamente estable, es inyectada a través de un septum (diafragma de silicona), y depositada sobre un cuerpo caliente, en cuyo interior es volatilizada rápidamente. Con ayuda del gas de arrastre la muestra atraviesa la columna cromatográfica, donde se separarán sus componentes en función de la interacción que estos tengan con la fase estacionaria a una temperatura dada. Los analitos luego de ser separados llegan a un detector, cuya respuesta es una señal transitoria, que aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador, en forma de una banda aproximadamente gaussiana. La selectividad en la retención viene determinada por la naturaleza de la fase estacionaria, el flujo de la fase móvil, longitud y diámetro de la columna. ^[13]

A continuación se describirán las partes de un equipo de cromatografía de gases.

II.6.1.- Gas de arrastre o gas portador:

El objetivo principal del gas portador es transportar la muestra a través de la fase estacionaria donde los analitos que la componen serán momentáneamente retenidos. Seguidamente por efecto de la temperatura, abandonan la fase estacionaria y son arrastrados a un flujo predeterminado hacia el detector.

Los gases de arrastre comúnmente son inertes para evitar que reaccionen con los analitos de interés a la temperatura de la columna, entre los mas comunes tenemos He, N₂ e H₂. La elección de este dependerá de los coeficientes de difusión de los analitos ($B_M/u = 2\gamma D_M/u$, en la ecuación de van Deemter) y en algunos casos del detector.^[12]

Ya que son inertes y no interactúa fisicoquímicamente con la muestra, en principio no afectan la selectividad en la separación, ya que no tienen ninguna influencia sobre interacción entre los analitos y la columna. Sin embargo, la difusión del analito en la fase móvil, si depende de la naturaleza del gas portador, y esto influirá sobre la velocidad óptima de la fase móvil y en consecuencia sobre anchos de bandas. Por otra parte, en muchos casos la elección del gas viene determinada por el sistema de detección utilizado. El control de la velocidad del gas portador a través de la columna es una variable muy importante en la separación, por lo tanto se debe realizar por medio de válvulas de control muy fino.

II.6.2.- Sistema de introducción de muestra:

Los dispositivos de inyección de muestras tienen la misión de volatilizar la muestra a analizar, e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. En cromatografía de gases, el procedimiento de inyección es donde se produce la mayor imprecisión, esto si las demás etapas del análisis se han realizado de forma correcta. Aunque existen diversos modos de inyección, a continuación se comentarán los dos tipos más utilizados e importantes en esta técnica.

II.6.2.1.- Inyector “split” (con divisor de flujo):

La muestra se inyecta en una cámara caliente, en donde ésta es vaporizada de forma instantánea y se mezcla con el gas portador. En este tipo de inyectores solo una pequeña fracción del flujo inicial se introduce en la columna, ya que la mayor parte se desincorpora gracias a un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de inyección. La división del flujo sirve para dos propósitos: Primero, la división reduce el volumen de muestra que entra a la columna, haciendo que esta cantidad sea compatible con la capacidad de la columna. En segundo lugar debido al alto flujo inicial permite un tiempo corto de residencia en la cámara, lo que conlleva a un pulso estrecho de la muestra en la cabeza de la columna, En la figura I se muestra un esquema de un inyector con split.

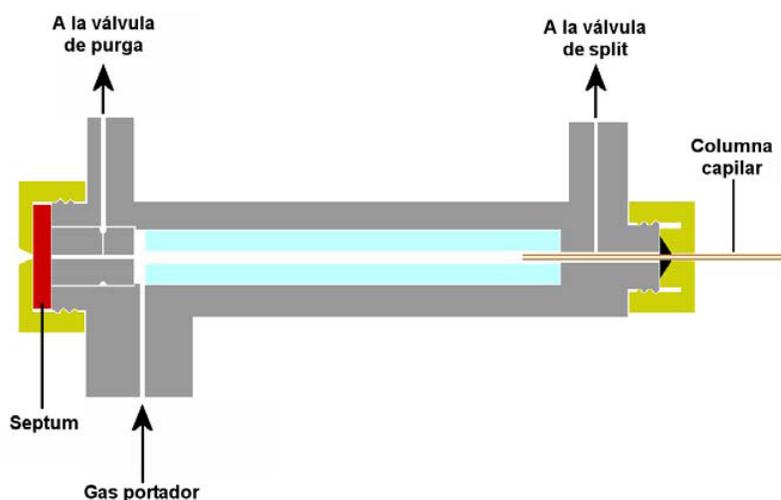


Figura I.- Esquema de un inyector "split"

La inyección "split" es simple y robusta en su diseño, además permite bandas estrechas del analito en la columna, sin embargo, posee desventajas importantes, ya que en muchos casos no es adecuado para el análisis de trazas y presenta límites de detección mayores.

II.6.2.2.-Inyector "splitless" (sin divisor de flujo):

El dispositivo para la inyección sin división es muy similar al utilizado para las inyecciones divididas. Al igual que en el caso anterior, la muestra se evapora en una cámara precalentada, pero, la línea de división se encuentra cerrada mediante una válvula, haciendo que el flujo del gas portador con la muestra se dirija completamente hacia la columna. Después que la muestra se ha introducido en la columna (por lo general de 10 a 40 segundos después de la inyección), se abre la línea de división para

purgar la cámara de mezcla. Esta forma de inyección es empleada en las columnas empacadas y columnas capilares de mayor calibre.

Posee la ventaja de ser adecuada para el análisis de trazas, dado que la muestra completa se introduce en la columna. La degradación térmica es generalmente mucho más pronunciada que en la inyección “split” debido al mayor tiempo de permanencia de la muestra en el inyector caliente. La reproducibilidad de las áreas de las bandas es comparable a los valores obtenidos en la inyección dividida.

II.6.3.- Columnas cromatográficas:

Las columnas cromatográficas son cilindros que varían en longitud desde 2 a 50 metros, construidas de metal, teflón, vidrio o sílice fundida, en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria propiamente dicha. La columna se configura en forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, con el fin práctico de colocarla en el interior de un horno, donde la temperatura es controlada eficientemente, ya que es una variable operacional muy importante. En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las empacadas o de relleno, y las columnas capilares o tubulares abiertas.

II.6.3.1.- Columnas empacadas o de relleno:

Las columnas de relleno se fabrican con un tubo de vidrio, acero inoxidable, cobre, aluminio, o de teflón, con una longitud característica de 1 a 3 m y un diámetro interno de

2 a 4 mm. Estos tubos se empacan densamente con un material de relleno sólido, finamente dividido, homogéneo y altamente poroso. Cuando la fase estacionaria es el propio sólido poroso, se denomina cromatografía de gas-sólido y cuando al sólido se le unen líquidos de alto punto de ebullición se denomina cromatografía de gas-líquido. La cromatografía de gas-líquido es la más usada debido a su mayor versatilidad en cuanto a las diferentes tipos de fases que se pueden disponer. Este líquido se recubre en el soporte sólido en forma de una delgada capa de 0,05 a 1 μm de espesor.

En un principio, la mayor parte de la cromatografía de gases se realizó en columnas de relleno, sin embargo, en la actualidad casi todas las aplicaciones han sido sustituidas por las columnas capilares, ya que son más eficaces (mayor número de platos, mayor resolución, anchos de bandas más estrechos y mejor relación señal-ruido al detector, por lo tanto menores límites de detección).

II.6.3.2.- Columnas tubulares abiertas o capilares:

Está formada por un tubo capilar (normalmente de vidrio o sílice fundida) de un diámetro comprendido entre 0,1 y 0,8 mm, en cuya pared interna se dispone una capa fina de la fase estacionaria. Las columnas con un diámetro interno de 530 μm se denominan normalmente "Megabore", y aquellas con diámetros menores a 100 μm se llaman "Microbores". Las megabore soportan mayor cantidad de muestra que las microbore, estas cantidades son comparables a las que soportan las columnas empacadas, pero las capilares son significativamente más eficientes que estas.

Es evidente que la permeabilidad de las columnas tubulares hacia los gases es mucho mayor que la de las columnas empacadas (del orden de 100 veces mayor), por lo que este tipo de columnas pueden tener una longitud bastante grande (son muy frecuentes columnas de 50 m) sin provocar presiones excesivamente elevadas en la entrada de la columna.

Hay dos tipos de columnas capilares, denominadas capilares de pared recubierta (WCOT) y capilares con soporte recubierto (SCOT). Las columnas WCOT son simplemente tubos capilares con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria. En las columnas SCOT, la superficie interna del capilar está revestida de una fina capa (de unos 30 μm) de un material soporte, tal como tierra de diatomeas. Este tipo de columnas contiene varias veces la fase estacionaria de una columna WCOT y, por lo tanto, tienen una mayor capacidad de carga. Generalmente, la eficacia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero en ambas es mayor comparada con una columna de relleno.^{[12] [14]}

II.6.3.3.- Fases Estacionarias (FE):

En una columna cromatográfica de gas-líquido las propiedades deseables para una fase líquida, incluyen: (1) baja volatilidad (idealmente, el punto de ebullición del líquido debe ser al menos 100 °C mayor que la temperatura de trabajo máxima de la columna); (2) estabilidad térmica; (3) químicamente inerte; (4) características de disolvente tales que los valores del factor de capacidad y selectividad de los solutos a resolver estén dentro de un intervalo conveniente.^[12]

Al introducirse en la columna, los analitos de la muestra se distribuyen de manera distinta entre la fase estacionaria y la móvil. Las moléculas realizan un recorrido por la columna en conjunto con la fase móvil, las que tengan mas interacción con la FE quedarán retenidas y las otras seguirán en el flujo de la fase móvil, ocurriendo así la separación.

Todas las moléculas de un analito en específico recorren la columna aproximadamente a la misma velocidad y se muestran como una banda de moléculas (conocida como banda de muestra). La velocidad a la que cada banda de muestra avanza por la columna depende de la estructura del compuesto, la estructura química de la fase estacionaria y la temperatura de columna. Del mismo modo, el ancho de la banda depende de las condiciones de funcionamiento y de la dimensión de la columna.

Para la elección de la columna, se puede aplicar el principio de «semejante disuelve semejante», donde «semejante» se refiere a las polaridades del analito y del líquido inmovilizado (FE). La polaridad de la fase estacionaria se establece por medio de la polaridad de los grupos sustituidos y sus cantidades relativas. La polaridad de la fase estacionaria es sólo uno de los muchos factores que afectan a la retención y la separación. Si bien la polaridad no está directamente relacionada con la selectividad, ejerce una influencia muy notable en la retención del compuesto y, en consecuencia, en la separación. Los compuestos polares presentan una mayor retención en una fase estacionaria polar que en una fase estacionaria menos polar y viceversa. Los cambios en el orden de retención y elución pueden atribuirse en gran medida a los cambios en la polaridad de la fase estacionaria.^[14]

II.6.4.- Detectores:

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, debe haber a la salida de esta un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él.

Los detectores usados en CG pueden dividirse de forma genérica en detectores universales y detectores específicos; los primeros ofrecen la ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto que pueda eluir de la columna, no obstante, esta misma propiedad puede convertirse en un serio inconveniente cuando se procede al análisis de mezclas muy complejas; en este último caso, la utilización de detectores específicos resulta muy ventajosa, ya que al responder únicamente frente a un grupo limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen resultan muy simplificados.

Los detectores en CG son de tipo diferencial, quiere decir que no ofrecen señal cuando solamente pasa por ellos el gas portador, pero si responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando éste se encuentra mezclado con alguna sustancia eluida de la columna.^[12]

Entre las propiedades medibles mas importantes, en las que se basa la detección de los analitos que son eluidos de la columna, se encuentran: la conductividad térmica (TCD), la electronegatividad de los analitos y su habilidad de formar iones negativos por captura de electrones (ECD), la capacidad de ionizar por medio de fotones los compuestos eluidos (PID), entre otras.

Uno de los detectores de mayor utilización en cromatografía de gases, es el detector de ionización de la llama (FID), ya que ofrece una elevada sensibilidad, gran estabilidad de la señal y un rango dinámico lineal elevado, además su uso es sencillo. Este tipo de detector es selectivo hacia los analitos que presenten enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él, es por esto que se amplía la información por ser el detector idóneo para la determinación de etanol.

II.6.4.1: Detector de Ionización de la llama (FID):

En los detectores (FID), el efluente que proviene de la columna se mezcla con hidrógeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. La mayoría de los compuestos orgánicos se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrogeno/aire, produciendo iones positivos y negativos que pueden conducir la electricidad a través de la llama.

Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado negativamente con el fin de recoger los iones generados; sobre este dispositivo se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector. En la figura II se observa el esquema de un detector FID.

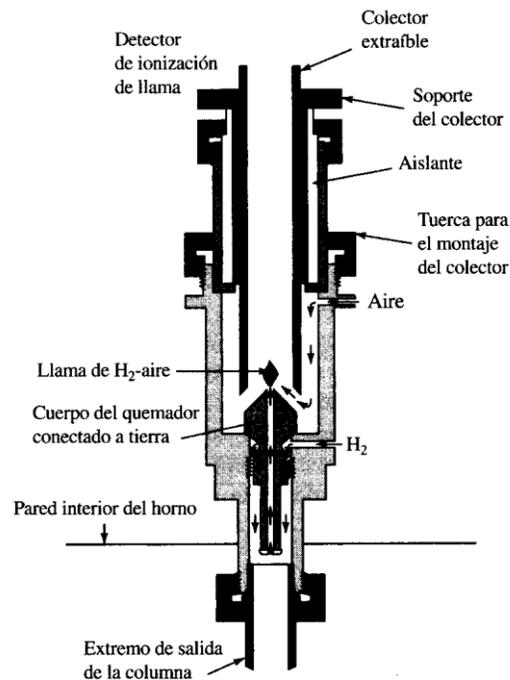


Figura II.- Esquema de un detector de ionización a la llama.

Posee una ventaja ya que es insensible a los gases no combustibles, como por ejemplo el agua, permitiendo un amplio rango de utilización sin que el agua actúe como interferencia. Aunque posee una desventaja ya que es un detector destructivo de la muestra. [12][15]

Luego que la señal transitoria sale del detector en forma analógica, es convertida en digital, para ser procesada en un ordenador. Se mostrará la señal del detector en función del tiempo, esto es conocido como cromatograma. Los valores correspondientes a los tiempos de retención y altura o área de las bandas, servirán para cualificar o cuantificar respectivamente los analitos.

El problema de determinar compuestos de interés analítico mediante CG en matrices complejas, es la interferencia que pudiera tener los otros componentes con el analito, además hay muestras que pueden obstruir los diferentes componentes del equipo de medida. Para evitar esto se puede realizar la determinación de analitos volátiles en matrices complejas mediante una técnica denominada Headspace, en la cual se inyecta en el cromatógrafo el vapor que está en equilibrio con la muestra, y este sólo contendrá los componentes volátiles de la misma, haciendo el análisis más sencillo.

II.7.- Cuantificación de muestras por su análisis en un espacio confinado (HS, *Headspace*):

Esta forma de análisis de muestra para cromatografía de gases, ha estado disponible desde finales de los años 80, siendo una forma sencilla para la determinación de analitos volátiles, en muestras con una matriz de componentes no volátiles, sin los inconvenientes que estos compuestos pudiesen ocasionar. Dicho sistema prescinde de las sucesivas extracciones que pudieran estar involucradas en el tratamiento de la muestra, evitando las pérdidas de analito y la contaminación característica de las mismas.

Es una metodología muy simple, donde la muestra se coloca en un contenedor cerrado y sellado con un septum, pero, lo suficientemente grande para permitir algo de espacio “vacío” en el vial, de allí surge el término en ingles de headspace, (“espacio de cabeza” o dicho de una manera más elegante “espacio confinado”). La muestra se calienta a temperatura controlada durante un período de tiempo, para permitir que los componentes volátiles de la matriz entren en fase gaseosa, hasta alcanzar el equilibrio con sus equivalentes líquidos. La ley de Dalton, Raoult y Henry, establecen que debe

existir una proporcionalidad entre la composición de la fase líquida con respecto a la fase gaseosa, por lo tanto, es posible cuantificar los componentes volátiles del líquido, analizando solamente la fase gaseosa. La fase gaseosa contenida en el volumen confinado o headspace, es la que se inyecta en el cromatógrafo, por cualquiera de los modos de inyección estudiados.^{[16] [17]}

II.7.1.- Teoría básica para el análisis por HS:

Es una técnica que implica los equilibrios entre la fase líquida con la fase vapor, debido al coeficiente de partición los analitos volátiles deben estar en proporción en el vapor y el líquido. En la figura III se observa un vial con dos fases: la muestra (fase condensada o líquida) y la fase gaseosa (en el “*headspace*”), si en el sistema hay analitos volátiles que son solubles en la fase condensada, estos se distribuirán entre ambas fases de acuerdo con el equilibrio controlado termodinámicamente.

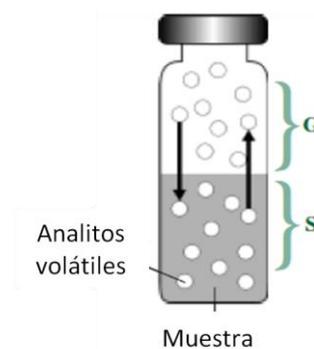


Figura III.- Vial de *headspace*, que contiene una muestra líquida.

Donde:

V_V = Volumen total del vial

V_G = Volumen de la fase gaseosa ("headspace")

V_S = Volumen de la muestra (fase condensada)

El volumen relativo entre las dos fases en el vial está caracterizado por la *relación volumétrica de fases* β :

$$\beta = V_G / V_S \quad (1)$$

Como: $V_V = V_G + V_S$; la ecuación queda 1, queda de la siguiente manera:

$$V_G = V_V \beta / (1 + \beta) \quad (2)$$

Asumiendo que el volumen de la fase líquida (V_S) después del equilibrio es igual al volumen de la muestra original (V_O), es decir, el analito transferido a la fase gaseosa durante el equilibrio no ofrece un cambio apreciable en el volumen de la muestra original, entonces:

$$V_O = V_S \quad (3)$$

Adicionalmente la cantidad de analito en la muestra original es W_O , y su concentración es C_O , entonces se tiene:

$$C_O = W_O / V_S \quad (4)$$

Después del equilibrio las cantidades respectivas del analito en las dos fases son W_S y W_G y sus concentraciones son:

$$C_S = W_S/V_S \quad (5)$$

$$C_G = W_G/V_G \quad (6)$$

Por lo tanto:

$$W_O = W_S + W_G \quad (7)$$

Por otra parte, la distribución del analito entre las dos fases en equilibrio es controlada termodinámicamente por una *constante de equilibrio* o *coeficiente de partición* (K). Este coeficiente es un parámetro fundamental que expresa la distribución masiva entre las dos fases presentes en el sistema y depende de la solubilidad del analito con la fase líquida o condensada.

$$K = C_S/C_G \quad (8)$$

Cuando los analitos tienen mayor solubilidad en la fase líquida los valores de K serán más altos.

Con las expresiones (4), (5), (6) y tomando en cuenta el balance de masas representado en la expresión (7), resulta:

$$C_G = C_O/(K + \beta) \quad (9)$$

En un sistema dado y bajo condiciones tal que K y β son constantes, se establece que la concentración del analito en la fase vapor (“headspace”) es proporcional a la concentración en la muestra original.

En caso particular de cromatografía de gases, donde por headspace se analizará la concentración de la muestra en la fase gaseosa, existe una proporcionalidad directa entre el área de la misma (A) y su concentración:

$$A = S C_G \quad (10)$$

Donde A es el área de la banda cromatográfica y S , la constante de proporcionalidad (viene dada por la sensibilidad cromatográfica). Sustituyendo 9 en 10, se obtiene:

$$A = S (C_O / K + \beta) \quad (11)$$

Ya que S , K y β , son constantes, implica que el área cromatográfica, medida por headspace es proporcional a la concentración original en el líquido de muestra:

$$A = C_{cte} C_O \quad (12) \quad [16]$$

II.7.2.- Bases Fisicoquímicas para HS:

Dentro de un sistema dado (con un analito y el disolvente) el valor del coeficiente de reparto (K) puede ser manipulado mediante el cambio de condiciones analíticas. Para investigar los factores que influyen en este, utilizamos tres leyes básicas: estas son la ley de Dalton, la ley de Raoult y la ley de Henry.

De acuerdo con la ley de Dalton la presión total de una mezcla de gases es igual a la suma de las presiones parciales (P_i) de los gases presentes en la mezcla:

$$P_T = \sum P_i \quad (13)$$

Se deduce a partir de esta ley que la fracción de presión ejercida por un gas, es igual a la fracción del número total de moles presentes en la mezcla gaseosa:

$$P_i / P_T = n_i / n_T = X_G \quad (14)$$

En donde n representa el número de moles presentes y X_G es la fracción molar de un componente en particular de la mezcla.

La ley de Raoult afirma que la presión de vapor de un soluto (presión parcial P_i) es directamente proporcional a la fracción molar (X_i) de este en la disolución y la constante de proporcionalidad es la presión de vapor del analito puro (P_i^0):

$$P_i = P_i^0 \cdot X_{s(i)} \quad (15)$$

Esto es válido solo para mezclas ideales y en muchos casos hay desviaciones de la ley de Raoult, para compensar estas desviaciones otro factor es introducido en la ecuación anterior:

$$P_i = \gamma_i \cdot P_i^0 \cdot X_{s(i)} \quad (16)$$

Este nuevo parámetro es el coeficiente de actividad (γ_i) del compuesto i , puede ser considerado un factor de corrección de la concentración. Este depende de la naturaleza del componente y refleja la interacción intermolecular entre el analito y otros componentes de la muestra. Para altas concentraciones del analito, el coeficiente de actividad pasa a ser función de la concentración, mientras que en disoluciones diluidas esta constante es independiente de la concentración del analito.

En una solución ideal diluida existe una linealidad entre la presión de vapor parcial y la concentración molar del analito, esto viene expresado por la ley de Henry:

$$P_i = H \cdot X_i \quad (17)$$

Donde H es la constante de Henry, en una solución ideal $\gamma_i = 1$ y $H = P_i^0$. La ley de Henry es la base de la cromatografía y del análisis por HS.

En una solución diluida ideal, cada molécula de analito disuelto está rodeado solamente por moléculas de disolvente. Por lo tanto, sólo las fuerzas de interacción intermoleculares entre las moléculas de soluto - disolvente son eficaces, mientras que la probabilidad de interacción adicional soluto - soluto aumenta con la concentración del analito.

Finalmente se tiene que:

$$P_i = P_T \cdot X_{G(i)} = \gamma_i \cdot P_i^0 \cdot X_{S(i)} \quad (18)$$

En una solución ideal diluida la concentración puede ser sustituida por la fracción molar, por lo tanto:

$$P_T / \gamma_i \cdot P_i^0 = X_{S(i)} / X_{G(i)} = C_{S(i)} / C_{G(i)} = K \quad (19)$$

En otras palabras el coeficiente de partición es inversamente proporcional a la presión de vapor y al coeficiente de actividad del analito, al aumentar estos valores hace que disminuya el valor del coeficiente de actividad, por otra parte, cuando disminuye este valor se incrementa la concentración del analito en el HS en el equilibrio, aumentando la sensibilidad de la técnica. ^[16]

II.7.3.- Factores que afectan la sensibilidad de HS:

II.7.3.1.- Volumen de la muestra:

La concentración del analito en el “headspace” (C_G) es proporcional al área del pico obtenido (A), esto está representado en la expresión (11) y (12):

$$A = S (C_O / K + \beta) ; A = Ctte C_O$$

De acuerdo con las expresiones anteriores la sensibilidad de la técnica de headspace depende inversamente de una combinación de K y β . Adicionalmente la relación volumétrica de las fases (β) a su vez depende del volumen de la muestra (V_S).

$$A = S (C_O / K + \beta) = S (C_O / (K + V_G/V_S)) \quad (20)$$

La expresión (20) indica que la sensibilidad final en headspace (Ctte) es función de $S / (K + V_G/V_S)$, donde S es la sensibilidad de la curva de calibración (señal vs. concentración). Si K es mucho mayor V_G/V_S , el volumen de la muestra no tiene influencia significativa sobre la sensibilidad final. Por ejemplo, el etanol en agua posee un valor de $K = 1000$, con estos valores tan altos el área no se verá afectada con los cambios en el volumen de muestra, y cualquier permuta que este tenga no tendrá ninguna contribución relevante. A diferencia de lo que sucede con el tricloroetileno en agua, que tiene un valor de K cercano a 0, en este caso pequeñas variaciones en el volumen de la muestra afectará el área del pico.^[16]

II.7.3.2.- Temperatura:

La presión de vapor de un compuesto puro se ve influenciada por la temperatura, y la relación es exponencial, esta puede ser descrita por la siguiente fórmula general:

$$\text{Log } P_i^{\circ} = - (B/T) + C \quad (21)$$

Donde B y C son constantes específicas para cada sustancia y T es la temperatura.

Aquí se evidencia que el control termostático de la muestra es importante, debido a la naturaleza exponencial de la relación entre la presión de vapor y la temperatura. Un pequeño cambio de temperatura puede provocar una diferencia considerable en la sensibilidad.

A temperaturas altas el termino B/T se hace más pequeño, y como la relación es exponencial, K disminuye haciendo que la concentración del analito en la fase vapor sea mayor.^[16]

II.7.4: Tipos de Headspace:

II.7.4.1- Headspace Estático:

Es utilizado generalmente para análisis que no requieran la extracción completa de los analitos de la muestra. El mecanismo de análisis es sencillo, una muestra se coloca en

un vial sellado, los analitos volátiles se difunden a través del espacio libre confinado. En la figura IV se muestra como se realiza la toma de muestra del “headspace”.

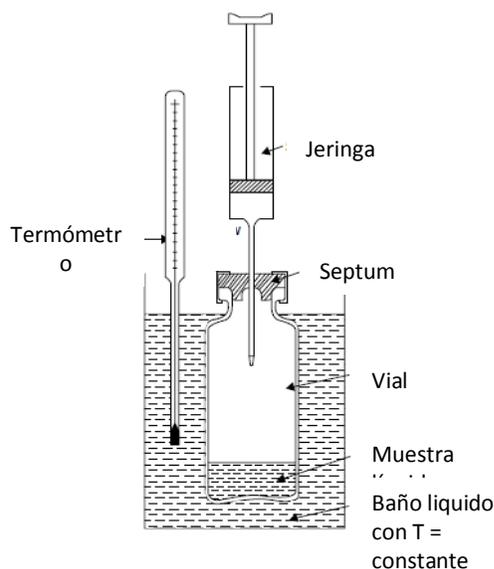


Figura IV.- Diagrama que ilustra la ubicación de la muestra a analizar y del “headspace”.

Una vez que la concentración del analito en el “headspace” del vial alcanza el equilibrio con la concentración en la matriz de la muestra, se toma una alícuota del vapor y se pasa a un cromatógrafo de gases para su análisis. Esto se puede hacer por medio de una jeringa hermética de gas manual, como se muestra en la Figura IV, o mediante el uso de un muestreador automático. Una de las ventajas de esta técnica es la facilidad de preparación de la muestra. A menudo, para el análisis cualitativo, la muestra puede ser colocada directamente en el vial y se analiza sin preparación adicional requerida. Sin embargo, para el análisis cuantitativo, puede ser necesario comprender y optimizar los efectos de la matriz para lograr una aceptable linealidad, exactitud, y precisión.

En el HS estático, la preparación de las muestras líquidas suele ser bastante simple, se transfiere la muestra al vial y este se sella inmediatamente para reducir al mínimo las pérdidas por volatilización. Los sólidos se pueden colocar directamente en el vial y analizarse, esto para análisis cualitativos. Sin embargo, para los análisis cuantitativos se debe dejar un tiempo razonable (al menos 60 minutos) para que alcance el equilibrio el vapor con la matriz de la muestra sólida, los analitos pueden quedar atrapados en el interior de la muestra si esta es muy grande, esto hace que se requiera demasiado tiempo para alcanzar el equilibrio e incluso nunca llegar a él. Por lo tanto, a menudo es necesario cambiar el estado físico de la muestra.

Se puede triturar la muestra o dispersar el sólido en un líquido. En el primer caso se aumenta el área de superficie disponible para que el analito volátil entre en equilibrio más fácilmente con el vapor, en el segundo caso se transfiere la muestra a un líquido, este es preferible ya que las muestras en líquido son generalmente más fáciles de trabajar. Los analitos volátiles por lo general alcanzan el equilibrio más rápido con el vapor, cuando están dispersos en el seno de un líquido que cuando están en un sólido.^{[16][17]}

II.7.4.2.- Headspace Dinámico (“purga y trampa”):

Se utiliza generalmente para el análisis de cantidades trazas del analito en la muestra, o cuando se necesita una extracción exhaustiva, las muestras pueden ser tanto sólidas como líquidas, incluyen muestras de origen ambiental (agua y suelo), biológico, industrial, farmacéutico y agrícola.

Esta técnica también depende de la volatilidad de los analitos para lograr su extracción de la matriz. Sin embargo, los analitos volátiles y la matriz no llegan a un estado de equilibrio, ya que continuamente se hace pasar un gas portador a través del vial en donde se encuentra la muestra, proporcionando así un gradiente de concentración que ayuda en la extracción de los analitos. Una vez en el gas portador, los analitos son arrastrados del vial y son atrapados en un adsorbente, la ventaja que tiene es que luego de esto se puede almacenar y transportar y se desorben los analitos al momento de hacer el análisis. ^{[15] [16]}

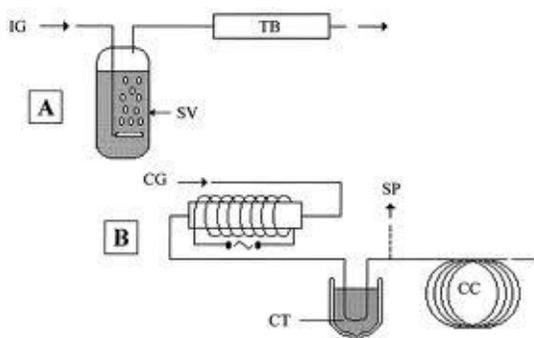


Figura V.- Esquema que muestra el principio del headspace dinámico (purga y trampa).

(A)Purga de la muestra y recolección de los componentes volátiles por una trampa TB (trampa); (B) desorción de los volátiles de la trampa, y son transferidos a un cromatógrafo de gases.

III.- Antecedentes:

III.1.- Método clásico para la determinación de alcoholes en formas farmacéuticas líquidas, The United States Pharmacopeial (USP) 30 NF25 <611> Año 2013.^[18]

Este método es adecuado para el análisis de alcoholes que pudieran contener extractos líquidos y tinturas. Se realiza mediante una destilación de la muestra, luego de estabilizar a temperatura ambiente el destilado, el contenido de etanol se determina por la medición de la densidad específica y con ayuda de una tabla alcoholimétrica (ver tabla VIII.1 en el apéndice).

El procedimiento experimental se diferencia dependiendo de la cantidad de alcohol que se presume que contiene la muestra, para líquidos que contienen 30 % de alcohol o menos: se transfiere con ayuda de una pipeta 25 mL de la muestra a un balón de destilación, la capacidad de este debe estar en función a la cantidad de muestra a analizar (comúnmente de dos a cuatro veces el volumen del líquido), para evitar las pérdidas de alcohol por evaporación, se deben tomar las precauciones necesarias a la hora de realizar el montaje.

Luego se añade un volumen igual de agua destilada, y se procede a comenzar la destilación, se recoge un volumen de destilado de aproximadamente 2 ml menos que el volumen de la muestra inicial. Se determina la densidad del destilado a 25 °C mediante picnometría, y con estos resultados se determina el alcohol contenido en la muestra, mediante el uso de una tabla alcoholimétrica, que relaciona la densidad del líquido con el porcentaje de alcohol contenido.

III.2.- E. Huzar, A. Wodnicka, Szczecin, Polonia, Año 2013. ^[19]

En esta investigación, se estudió el método de HS-CG para la cuantificación de etanol en jarabes medicinales de consumo nacional. El análisis cuantitativo se llevó a cabo mediante los métodos de adición estándar y estándar externo e interno.

Se prepararon las muestras tomando un volumen de 1 mL de jarabe y se enrasaron en un volumen de 10 mL, de esta muestra diluida se tomaron 5 mL y se colocaron en viales de 65 mL. Para la cuantificación mediante un estándar externo, se realizó una curva de calibración con patrones de etanol. En el método de estándar interno se le agregaron 0,25 mL de Metanol (EI) a las muestras antes de ser enrasadas a los 10 mL. Finalmente, para el método de adición estándar se agregó a cada vial 40 µL de una solución de etanol con una concentración de 500 mg/mL y luego de que alcanzaron el equilibrio las muestras fueron analizadas.

Antes de realizar el análisis los viales con las muestras se estabilizaron en un baño termostático (Ultratermostato UL-1) a 30 °C por una hora. Pasado este tiempo se tomaron 0,5 mL del headspace mediante una extracción manual, con una jeringa hermética (Hamilton) y este fue inyectado en un cromatógrafo de gases (CHROM 5). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I.

Tabla I.- Cantidad de etanol en jarabes comerciales determinado por diferentes métodos.

Muestra	etanol (mg/mL) \pm SD		
	CV		
	Estándar Externo	Estándar Interno	Adición Estándar
S1	66,55 \pm 1,57 2,36	68,22 \pm 0,95 1,39	62,16 \pm 2,54 4,09
S2	57,25 \pm 0,83 1,45	59,06 \pm 0,82 1,39	54,82 \pm 2,03 3,70
S3	44,47 \pm 0,48 1,08	46,22 \pm 0,57 1,23	43,04 \pm 1,44 3,35
S4	30,10 \pm 0,47 1,89	33,66 \pm 1,25 3,71	29,63 \pm 1,36 4,59
S5	25,28 \pm 0,71 1,86	26,17 \pm 0,56 2,14	23,62 \pm 0,53 2,24
S6	43,78 \pm 0,71 1,62	47,75 \pm 0,79 1,65	42,69 \pm 0,87 2,04
S7	36,94 \pm 0,25 0,68	38,86 \pm 0,36 0,93	34,63 \pm 0,59 1,70

Se encontró que la concentración de etanol en las muestras analizadas variaba en un intervalo de 25 a 68 mg/mL. Los resultados obtenidos indican que el método HS-CG aplicado es selectivo, sensible, lineal y preciso. El uso de un estándar interno hace que sea mas preciso a la hora de cuantificar. Y ellos plantearon que el método desarrollado se podría considerar como una herramienta analítica para el control de calidad de diversas preparaciones de fármacos líquidos.

III.3.- G. Vannucchi, J. Marchini, A. Jordão, Ribeirao Preto, Brasil, 2008.^[20]

El objetivo de este estudio fue validar una metodología para la determinación de etanol y otras sustancias volátiles (acetaldehído, metanol y acetona) en la sangre y en la orina por la técnica de Cromatografía de gases, utilizando como método para la toma de muestra el *headspace* (HS).

Para el procedimiento de HS, se tomaron tubos de recolección de sangre con un volumen de 5 mL y se agregaron alícuotas de 0,5 ml de muestra y 0,5 ml de acetonitrilo (EI). Los tubos se sellaron con tapones de goma, y se colocaron en un baño de agua a 60 °C durante 20 minutos para permitir alcanzar el equilibrio. Una alícuota 150 µL del vapor fue retirado a través del tapón de goma con una jeringa hermética (SGE) y se inyectó directamente en el cromatógrafo de gases. La jeringa se mantuvo a 60 °C con el fin de evitar la condensación en las paredes internas.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases (17A) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar DB-WAX (Con una longitud de 30 m y un diámetro interno de 0,25 mm), las condiciones en el cromatógrafo fueron las siguientes: temperatura de la columna, rampa de 45 °C a 125 °C; la temperatura del inyector 115 °C; la temperatura del detector 200 °C; presión de la columna 70 kPa. En las tablas II y III se presentan los resultados obtenidos.

Tabla II.- Figuras de mérito y linealidad de calibración para los analitos

Analitos	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Coef. correlación (R²)
Acetaldehído	0,1682	0,4205	0,9985
Acetona	0,1986	0,4965	0,9993
Metanol	0,2016	0,5040	0,9979
Etanol	0,1995	0,4986	0,9991

Tabla III.- Coeficientes de variación entre las corridas y el % de recuperación de los analitos en la sangre y en la orina

Analitos	CV (%), n=9		Recuperación (%) ± SD; n=3	
	Sangre	Orina	Sangre	Orina
Acetaldehído	11,1	8,6	87,3 ± 5,8	100,0 ± 4,1
Acetona	3,3	3,7	100,2 ± 2,3	100,8 ± 5,5
Metanol	8,1	7,2	101,6 ± 2,1	106,1 ± 5,9
Etanol	5,6	7,1	101,4 ± 1,1	103,2 ± 4,9

Los valores del LOD y LOQ para el etanol estaban dentro del rango reportado en la literatura, que varía de 0,025 mg/L a 10 mg/L para el límite de detección, y de 0,08 mg/L a 0,25 mg/L para el límite de cuantificación. Se encontró que la linealidad obtenida en este estudio que eran adecuados, lo que demuestra que el método se puede aplicar a los estudios sobre la toxicidad aguda o crónica de etanol.

De acuerdo con los criterios de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) y la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA-Brasil), el coeficiente de variación y el % de recuperación para la determinación no deben superar el 15%. En este caso el

mayor coeficiente de variación detectado fue del 11,1% para el acetaldehído en la muestra de sangre (Tabla III), demostrando que el método es preciso y exacto.

III.4.- L. Marotta, Connecticut, USA, Año 2006.^[21]

El objetivo de este trabajo fue desarrollar los parámetros del análisis por headspace, que permitan obtener una mejora 1000 veces en los límites de detección de impurezas orgánicas volátiles (OVIs), que los especificados en la USP <467> Método IV.

El método para el análisis de OVIs se llevó a cabo utilizando un Cromatógrafo de Gases (Clarus 500), con un inyector automático de Headspace (PerkinElmer), configurado con un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones del headspace fueron: temperatura de la muestra: 85 °C; temperatura de la aguja: 120 °C; línea de transferencia de temperatura: 130 °C; tiempo De Equilibrio: 20 min; tiempo de presurización: 1,0 min; tiempo de inyección: 0,1 min. Las condiciones del cromatógrafo fueron: Columna: 6% cianopropilfenil / 94% dimetil polisiloxano de 30 m x 0.53 mm x 3.0 µm, con una rampa de temperatura de 40 °C a 50 °C y una velocidad de cambio 2 °C/min; flujo de 10 mL/min; temperatura del detector: 250 °C. Se realizaron los experimentos utilizando un volumen de muestra de 10 mL y de 5 mL. Obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla IV y V respectivamente.

Tabla IV.- Linealidad, repetitividad y los límites mínimos de detección (MDL) de varios componentes usando 10 mL de muestra

Analito	Coef. Correlación R²	Repetibilidad n=6 % RDS	% de recuperación	MDL ppb
Cloruro de metileno	0,99989	1,5	102	0,5
Cloroformo	0,99997	1,8	101	0,5
Benceno	0,99991	1,5	99,5	0,05
Tricloroetileno	0,99935	2	99,7	0,1
Dioxano	0,99995	1,5	99,7	5

Tabla V.- Linealidad y repetitividad de varios componentes usando 5 mL de muestra.

Analito	Coef. Correlación R²	Repetibilidad n=6 % RDS
Cloruro de metileno	0,99993	0,5
Cloroformo	0,99994	1,1
Benceno	0,99959	1,3
Tricloroetileno	0,99975	1,8
Dioxano	0,99891	1,8

Con los resultados obtenidos se observa que se cumplió objetivo de mejorar los límites de detección de este método por un factor de 1000, que permite la detección mínima de analitos de interés y permite la reducción de la cantidad de muestra utilizada. Además, los datos generados en este estudio demuestran que el HS-CG es una técnica cuantitativa que puede proporcionar un rango dinámico de 3-4 órdenes de magnitud, superiores a los requisitos del método de la USP. Los datos también demuestran desviaciones estándar relativas muy bajas, de alta precisión y muy buenas recuperaciones.

III.5.- J. Musselman, A. Solanky, W. Arnold, Phoenix, USA, Año 2006.^[22]

El propósito de este trabajo era demostrar la mayor precisión posible, utilizando el método de HS-CG para el análisis de niveles de alcohol (principalmente etanol) en la sangre. Se utilizó un sistema que combina la temperatura y la presión (hasta de 40 psi) para conducir componentes que se encuentran en el headspace. La presión se utiliza como un flujo de gas que pasa de forma continua por el headspace y lleva los analitos a la columna.

Para este análisis se utilizó un cromatografo de gases (PerkinElmer), equipado con un automuestreador de headspace (TurboMatrix HS 110) y un detector FID, además de contar una columna capilar Restek con fase estacionaria BAC-1 (*proprietary phase*) de 30 m de largo con un diámetro interno de 0,32 mm. Obteniendo los resultados mostrados en la tabla VI.

Tabla VI.- Precisión y exactitud a diferentes concentraciones.

% Etanol	0,005	0,01	0,100	0,188	0,400
Exactitud (%)	13,0	8,5	-1,8	0,6	-1,6
Precisión (%)	1,8	0,4	0,2	0,5	0,2

Con esto concluyen que el método empleado es robusto y fiable, logrando un valor de RSD de 1,23%, muy por debajo de los obtenidos por otros métodos. Valores de la RSD de este nivel hacen posible que los toxicólogos puedan declarar con confianza sus resultados con una precisión de $\pm 5\%$

IV.- Justificación:

Considerando lo planteado en el desarrollo de las referencias bibliográficas, en lo relacionado a la importancia del control en la concentración de Etanol en jarabes pediátricos, se justifica el desarrollo de métodos sencillos, prácticos y económicos para su determinación.

V.- Objetivos:

V.1.- Objetivo General:

Desarrollar el método de Headspace para la determinación de etanol en jarabes pediátricos comerciales mediante la técnica de cromatografía de gases.

V.2.- Objetivos Específicos:

- Seleccionar las condiciones cromatográficas preliminares.
- Realizar un material de referencia interno, ya que en el mercado nacional no se dispone de estándares certificados para determinar EtOH es este tipo de muestras.
- Reajuste de las condiciones cromatográficas, basado en condiciones de HS reportadas en la literatura.
- Evaluación de los parámetros para la metodología de headspace.
- Seleccionar el método de Cuantificación idóneo para la determinación de EtOH en jarabes pediátricos, mediante la técnica de HS-GC.
- Validación del método cromatográfico contra el método clásico reportado en la USP.
- Cuantificación de EtOH contenido en jarabes pediátricos comerciales.

VI.- Metodología Experimental:

VI.1.- Materiales y equipos utilizados:

VI.1.1.- Cromatógrafo de Gases:

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases marca Thermo Finnigan, modelo TRACE GC Chromopack CP-9001, equipado con un inyector split-splitless y un detector de Ionización a la Llama (FID, Flame Ionization Detector). Para la adquisición y procesamiento de datos, este equipo cuenta con el software CHROMCARD. En la figura VI se observa una fotografía del equipo utilizado.



Figura VI.- Equipo de GC-FID

VI.1.2.- Baño Termostático: Marca Julabo modelo VC-5 ($\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). En la figura VII se observa el termostato utilizado.



Figura VII.- Baño termostático.

VI.1.3.- Desionizador de agua (18 M Ω): Marca Barnstead, modelo NANOpure. El mismo se puede visualizar en la figura VIII.



Figura VIII.- Desionizador de agua.

VI.1.4.- Viales:

Se utilizaron viales color ámbar con un volumen de 17 mL con septum de silicona, ver en la figura IX.



Figura IX.- Viales con septum de silicona.

VI.1.5.- Reactivos:

Agua Grado 18 M Ω .

Etanol (CH₃CH₂OH), 99,9 % de pureza, grado HPLC, Merck.

1-Propanol (CH₃CH₂CH₂OH), 99,5% de pureza, Merck.

VI.1.6.- Materiales de Laboratorio:

Balones aforados Pyrex de 25, 50 y 100 mL respectivamente, clase A.

Micropipeta de volumen variable, marca Eppendorf, con capacidad de 1000 a 5000 μ L respectivamente. Puntas desechables.

Balanza analítica con una resolución digital de 0,1 mg.

VI.1.7.- Muestras:

VI.1.7.1.- Jarabe pediátrico expectorante:

Nombre: Broxol TOS Pediátrico.

Principio activo: S-carboximetilcisteína.

Laboratorio: La Santé.

VI.1.7.2.- Jarabe pediátrico fluidificante bronquial

Nombre: PectoVital.

Principio Activo: Extractos de sauco, eucalipto, jengibre, malva y regaliz.

Laboratorio: Natural Premium C.A.

VI.2.- Condiciones cromatográficas preliminares.

Este ensayo de carácter preliminar, consistió en examinar si con los equipos e insumos disponibles en nuestro laboratorio era posible una adecuada retención del analito de interés (etanol) y su respectiva separación con respecto a un estándar interno. La función del estándar interno estuvo orientada en corregir las posibles faltas de repetibilidad en las áreas cromatográficas cuando se realicen las curvas de calibración, hecho atribuido fundamentalmente tanto al sistema de HS, como a la introducción de muestra por inyección manual en el cromatógrafo de gases disponible.

Se escogió el 1-propanol como estándar interno, ya que al tener pocas diferencias en su estructura molecular con respecto al etanol, es posible que tenga afinidad similar por la fase estacionaria, de manera tal, que al realizar los ensayos cromatográficos se pudiera obtener su separación en un tiempo de retención relativamente prudencial. Por otra parte y pensando a futuro, debido a la similitud en sus propiedades fisicoquímicas, este sería ideal para compensar las posibles faltas de repetibilidad debido a la metodología de HS.

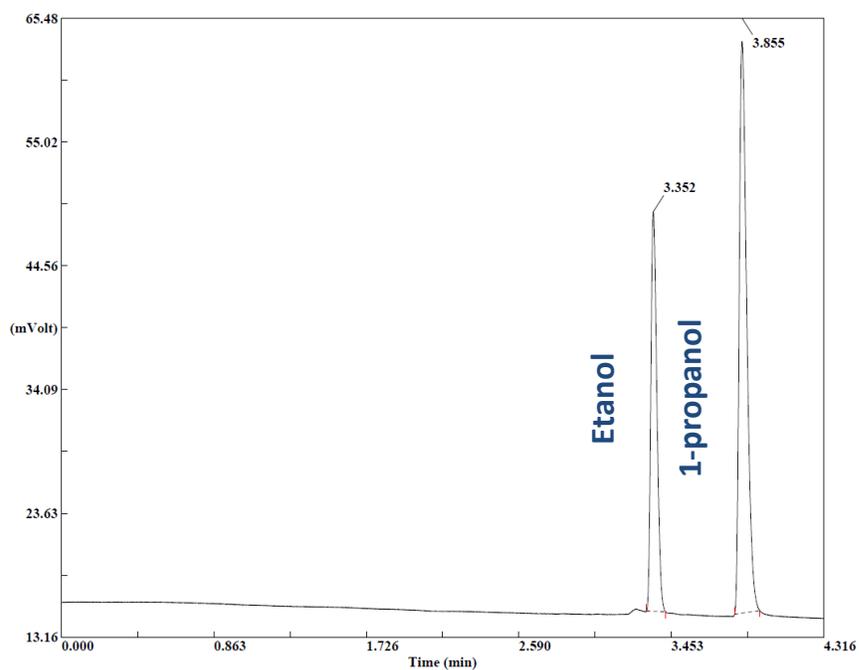
Para los ensayos preliminares se empleó una mezcla de patrones diluidos de etanol y 1-propanol (1:1). Se probaron diversas columnas capilares de variadas longitudes y con fases estacionarias de carácter polar, adicionalmente se modificaron parámetros cromatográficos adaptados de la literatura revisada. Después de diversos ensayos se optó por las condiciones establecidas en la tabla VII.

El cromatograma de ambos patrones obtenido bajo estas condiciones cromatográficas descritas, se muestra en la figura X.

Se obtuvo una buena separación entre ambos compuestos en un tiempo total de corrida de 4,5 minutos aproximadamente, adicionalmente se puede observar una buena simetría de las bandas cromatográficas.

Tabla VII.- Condiciones preliminares óptimas para el análisis de etanol por CG.

Columna	Capilar ; J&W Scientific Fase Estacionaria: DB-WAX (0,25 μ m) 30 m x 0,25 mm (ID)
Temperatura de la columna	80 $^{\circ}$ C
Fase móvil	Nitrógeno
Flujo	1,5 mL/min
Inyector	Modo Split Split flow: 30 mL/min split ratio: 20 mL/min
Temperatura del inyector	250 $^{\circ}$ C
Detector	Flujo H ₂ : 35 mL/min Flujo Aire: 350 mL/min Flujo N ₂ (make-up): 20 mL/min
Temperatura del detector	250 $^{\circ}$ C

**Figura X.-** Cromatograma de patrones diluidos de etanol y 1-propanol

Ya que las condiciones preliminares fueron optimizadas con patrones acuosos, ello no garantiza que algún componente de las muestras reales pudiera coeluir, interfiriendo con alguna de las especies de interés. Por lo tanto, la siguiente etapa consistió en examinar, si bajo las condiciones cromatográficas preliminares era posible medir el etanol en una matriz con las mismas características de la muestra a analizar. En vista de ello, se procedió a elaborar un material de referencia.

VI.3.- Elaboración del material de referencia interno.

Debido a la inexistencia de un material de referencia certificado de etanol en jarabe, se decidió preparar un material de referencia interno (procedimiento analítico sugerido cuando no se dispone de un material comercial de referencia certificado o no certificado). Para ello, se adquirieron del mercado varios frascos del jarabe Broxol TOS Pediátrico®, los cuales fueron mezclados para obtener cantidad suficiente, a fin de que pudiera alcanzar para todos los ensayos. Una vez homogenizado se mantuvo herméticamente cerrado y refrigerado en un envase de color ámbar, hasta el momento de ser empleado.

Hay que hacer notar, que debido a la poca disponibilidad en el mercado del jarabe Broxol TOS Pediátrico®, no se utilizaron ejemplares de un mismo lote para la elaboración del material de referencia interno. En todo caso, el mismo fue empleado para optimizar la metodología de análisis por comparación de resultados, por consiguiente el valor absoluto de la concentración de etanol no es determinante. Sin embargo, cuando empleamos esta marca comercial o cualquier otra como una muestra real, nos aseguramos de trabajar sobre un lote determinado.

VI.4.- Condiciones cromatográficas de trabajo.

Ya que no era posible inyectar directamente en el cromatógrafo el material de referencia interno (debido a la alta cantidad de solutos no volátiles), se decidió realizar un ensayo de HS de los reportados en la literatura para este tipo de análisis. Consistió en colocar una alícuota de muestra en un vial de HS a una temperatura de 30 °C por 1 hora.

Debido al alto contenido de etanol reportado por fabricante en el material de referencia (5 % aprox.), se le realizó un factor de dilución de 10, y se aprovechó para añadir una pequeña cantidad del estándar interno.

Posteriormente se colocó 5 mL de esta disolución en un vial “herméticamente” sellado con papel parafilm a las condiciones de HS elegidas. Pasado este tiempo se tomó 500 µL del vapor del recipiente de HS y se inyectó en el cromatógrafo. El cromatograma obtenido bajo estas condiciones se muestra en la figura XI.

En el cromatograma se puede observar que el material de referencia interno no posee un componente volátil adicional que interfiera con los analitos de interés. Además se observa que se mantiene una aceptable separación entre ambas bandas cromatográficas.

Basándose en los resultados obtenidos, se puede inferir que las condiciones cromatográficas preliminares (ver Tabla VII), son aceptables para determinar el

contenido de etanol en este tipo de muestras. Concluimos con un tiempo total de corrida de 5 minutos aproximadamente, siendo el tiempo de retención del etanol de 3,37 minutos y del 1-propanol 3,88 minutos.

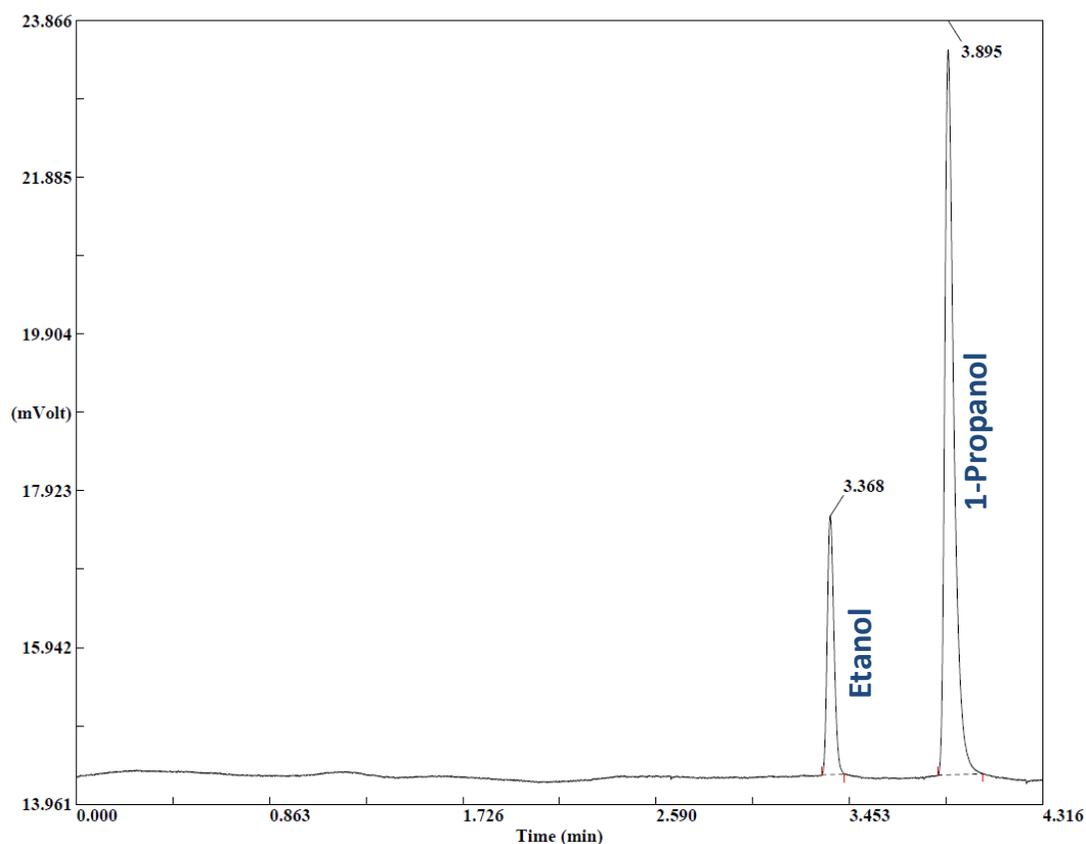


Figura XI.- Cromatograma del material de referencia interno y 1-propanol.

La siguiente etapa consistió en el estudio de las condiciones ideales de trabajo en el modo de HS, ya que las anteriormente seleccionadas de la literatura, no necesariamente son las más convenientes, en especial por los largos tiempos de empleados para establecer los equilibrios.

VI.5.- Estudio de las condiciones de trabajo por HS.

Hay que tomar en cuenta, que el indicador para evaluar las condiciones óptimas de cualquier método de medida son las señales absolutas, ya que al emplear señales relativas como es el caso al medir con un estándar interno, los cambios operacionales son enmascarados por la compensación de la señal. Por lo tanto, para medir las condiciones de trabajo por HS emplearemos las áreas absolutas, a pesar de la inyección manual en el cromatógrafo de gases (contribuyente de peso a la falta de repetibilidad).

Por otra parte, antes de emprender la búsqueda de las condiciones de trabajo por HS, se procedió a realizar un estudio, con la idea de establecer si a unas condiciones específicas, un mismo patrón pudiera emplearse para medir la repetibilidad de las mediciones. Es de esperar que a unas condiciones determinadas de HS y al inyectar consecutivamente un mismo patrón (obviamente esperando las condiciones de equilibrio) la composición en la fase líquida se vea consecuentemente alterada y por consiguiente la composición de la fase de vapor, cambiando continuamente el valor de las áreas absolutas, tal y como se muestra en la figura XII.

No obstante, si la alícuota de vapor en inyecciones sucesivas es muy pequeña es posible que no se altere considerablemente el sistema original. Siendo ese el caso, un mismo patrón pudiera ser empleado para medir la repetibilidad por HS. Ello significa que las áreas se deben mantener relativamente constante en inyecciones sucesivas, como se muestra en la figura XIII.

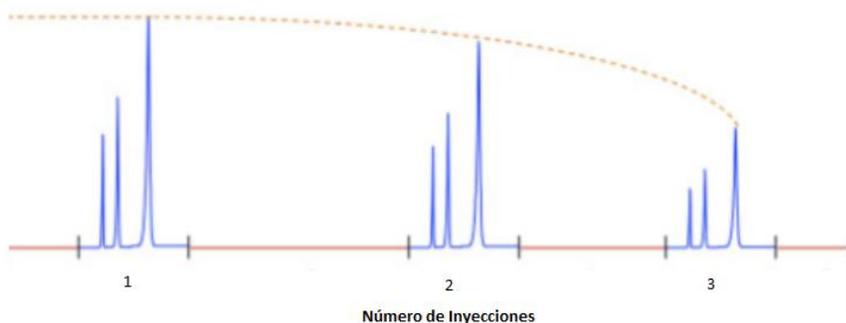


Figura XII.- Imagen referencial donde se refleja la posible disminución del área en tres inyecciones sucesivas del HS, después de alcanzado el equilibrio.

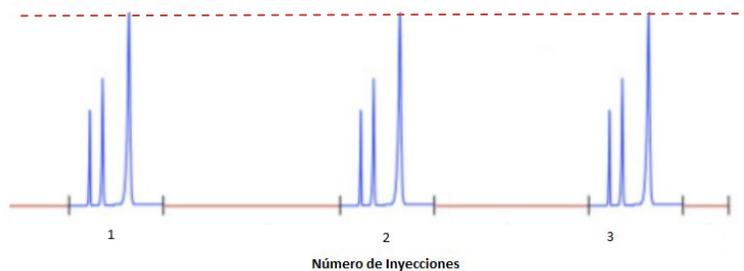


Figura XIII.- Imagen referencial en donde las áreas absolutas se mantienen relativamente constantes después de tres inyecciones sucesivas del HS.

En el caso de que ocurra lo establecido en la primera descripción, no podrá utilizarse el mismo patrón para medir la repetibilidad de la medida del HS, teniendo que preparar el patrón nuevamente para evaluar una misma condición, lo que conlleva a la elaboración un gran número de patrones.

Con la idea de investigar lo anteriormente descrito, establecimos el criterio que el CV del sistema HS e inyección manual debe ser menor al 5 % en áreas absolutas.

Experimentalmente se preparó una disolución de la misma concentración de etanol y 1-propanol al 2,5 % en agua. Seguidamente se colocó 5 mL de la disolución en un vial de HS, el cual fue sellado y colocado durante un tiempo prudencial (1 hora aprox.) en un baño termostático a 30 °C. Equilibrado el sistema de HS, se ajustó el cromatógrafo a las condiciones anteriormente descritas y se realizaron 10 inyecciones sucesivas de 500 µL del vapor. En la tabla VIII se muestran los valores de áreas absolutas y relativas para cada inyección.

Tabla VIII.- Estudio de repetibilidad en la inyección en HS.

N° inyección	A_{etanol}	A_{1-propanol}	A_{etanol} / A_{1-propanol}
1	1240890	2098430	0,5913
2	1247896	2125104	0,5872
3	1209495	2116291	0,5715
4	1161807	2015427	0,5765
5	1181807	2008859	0,5883
6	1102240	1828627	0,6028
7	1195235	2026548	0,5898
8	1200025	2084312	0,5757
9	1220624	2127467	0,5737
10	1166121	2040364	0,5715
PROMEDIO	1192614	2047143	0,582
DEVEST	42757	89451	0,01
CV (%)	4	4	2

Las áreas absolutas presentaron un CV fue del orden del 4 % y considerando que empleamos inyección manual nos permite inferir que las áreas se mantienen relativamente constantes. Podemos asumir que la composición en la fase de vapor prácticamente no se ve alterada, ya que el volumen extraído para las inyecciones sucesivas es muy pequeño (del orden de los microlitros) y por consiguiente la composición en el líquido se mantiene constante.

En conclusión, este ensayo nos permitió deducir que para unas condiciones de HS determinadas, un mismo patrón puede ser inyectado varias veces para evaluar la dispersión en la medida del mismo.

Por otra parte, se obtuvo una relación promedio entre las áreas de etanol y 1-propanol de 0,58 y partiendo del hecho de que ambos analitos poseen la misma concentración en el líquido, es de esperar que el valor en la relación de áreas sea cercano a 1. Esta diferencia se puede atribuir a los distintos factores de respuesta al detector y a las desigualdades entre los coeficientes de partición de ambos compuestos a la temperatura de trabajo.

Finalmente se procedió a estudiar las variables a modificar con la idea de conseguir las condiciones de trabajo por HS, para ello es necesario recordar la expresión que relacionan la señal cromatográfica en la fase de vapor con los parámetros de HS:

$$A = S \left(\frac{C_o}{K + \beta} \right)$$

Donde A es la señal cromatográfica en la fase de vapor, que la podemos llamar sensibilidad del HS; S es la sensibilidad de sistema cromatográfico (básicamente, la pendiente de la curva de calibración); C_0 es la concentración del analito en el líquido; K es el coeficiente de partición y β la relación volumétrica de las fases. A condiciones fijas de concentración del patrón (C_0), las variables a estudiar son K y β , ya que S viene determinado por las condiciones cromatográficas.

En nuestro caso en particular, el valor de K del etanol a 40 °C es 1355 (un valor relativamente alto), esto implica que para la mayoría de los casos prácticos donde empleamos envases de bajo volumen, el valor de K siempre será mucho mayor que el de β ($K + \beta \cong K$). Es decir, que variaciones del volumen de líquido con respecto al volumen de vapor, no ofrecerá cambios apreciables sobre la sensibilidad por HS, por lo tanto la expresión anterior se reduce a:

$$A \cong \left(\frac{S}{K}\right)C_0$$

En función a lo establecido anteriormente, se procedió a estudiar exclusivamente el coeficiente de partición (K), y por consiguiente los parámetros que lo modifican (temperatura y el efecto salino). Adicionalmente se estudió el tiempo necesario para alcanzar los equilibrios.

En una primera instancia decidimos ensayar la temperatura y tiempo de equilibrio, dejando el efecto salino para más adelante, cuando desarrollemos los métodos de

cuantificación, ya que puede ser tratado como un efecto matriz, y probablemente su repercusión puede ser despreciable debido a los efectos de dilución.

Para este ensayo se empleó el material de referencia interno, y como mencionamos anteriormente, aunque no se sabe la concentración exacta de etanol, no es de interés porque se busca conseguir a que temperatura se obtiene la mayor señal (sensibilidad de HS).

Experimentalmente se le realizó un factor de dilución de 10 al material de referencia interno, quedando el etanol al 0,5 % aproximadamente (en función de la información suministrada por el proveedor). La concentración del 1-propanol en dicha dilución se ajustó al 0,5 %.

Seguidamente 5 mL de esta solución fueron agregados a un vial el cual se selló, para el estudio a las temperaturas de 30, 40 y 50 °C respectivamente. Aunque la relación volumétrica de las fases no es un parámetro a considerar, todos los ensayos se realizaron a la misma relación.

Para cada temperatura se colocó el vial en un baño termostático y a partir de este momento se empezó a contabilizar el tiempo de equilibrio correspondiente a 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente.

Se inyectó 500 µL del vapor y cada experiencia se realizó por triplicado, mostrándose los resultados en la tabla IX.

Tabla IX.- Áreas absolutas obtenidas a diferentes temperaturas y tiempos de equilibrio.

Temperatura 30 °C								
5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos		
A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	
67164	250762	62462	243042	65498	238680	65630	244967	
63212	237508	66592	266037	67151	245795	63151	238980	
69526	266711	64852	254138	70334	267111	69334	267111	
PROMEDIO	66634	251660	64635	254406	67661	250529	66038	250353
s	3190	14622	2074	11450	2458	14795	3112	14818
CV	4,8	5,8	3,2	4,5	3,6	5,9	4,7	5,9
Temperatura 40 °C								
5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos		
A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	
109188	439289	107134	428596	106564	437838	107457	436077	
119676	471249	115734	463921	110611	450510	101185	411301	
105977	430668	107337	435500	101438	415062	101382	417714	
PROMEDIO	111614	447069	110068	442672	106204	434470	103341	421697
s	7164	21380	4908	18723	4597	17962	3566	12859
CV	6,4	4,8	4,5	4,2	4,3	4,1	3,5	3,0
Temperatura 50 °C								
5 minutos		10 minutos		15 minutos		20 minutos		
A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	A _{etanol}	A _{1-propanol}	
189363	778056	172751	718223	168092	698637	173468	732399	
169102	703075	182716	754801	164865	689302	183127	768783	
174579	731646	170160	717540	156872	664880	162604	679464	
PROMEDIO	177681	737592	175209	730188	163276	684273	173066	726882
s	10481	37843	6629	21318	5776	17431	10267	44914
CV	5,9	5,1	3,8	2,9	3,5	2,5	5,9	6,2

Se observó una relativa repetibilidad entre los valores de las áreas absolutas (CV del orden del 4 al 5 %), esta dispersión incluye la proveniente de la técnica de HS, así como, la dispersión por la inyección manual.

Basándose en los valores obtenidos en las áreas absolutas de ambos analitos para cada temperatura, se puede concluir que 5 minutos es un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, ya que al evaluar tiempos mayores no se observa una diferencia considerable entre los valores de áreas. Sin embargo, se escogió un tiempo de 15 minutos por practicidad operacional, debido a que tiempos menores no se ajustaban a la duración total de la corrida, sumado a la posterior estabilización del equipo para poder realizar una nueva inyección.

Por otra parte, cuando se evalúa el parámetro de temperatura, es de esperar que a medida que esta aumente, los valores de K disminuyan y por consiguiente se obtiene mayor sensibilidad por HS. Desde este punto de vista podemos considerar que a temperaturas por encima de los 50 °C encontráramos mayor sensibilidad, sin embargo, problemas de condensación en la aguja de la inyectora por efecto de los cambios bruscos de temperatura, arrojan grandes inconvenientes.

Si bien es cierto que a mayores temperaturas se facilita la transferencia de los analitos volátiles desde la fase líquida hacia la fase vapor, favoreciendo a su vez mayores áreas absolutas, los resultados de las áreas relativas presentan un ligero descenso, tal y como se muestra en la tabla X. Esto probablemente se debe a la diferencia entre los coeficientes de reparto del etanol y del EI, de manera tal que al aumentar la temperatura el vapor se va enriqueciendo más en el EI, que en etanol.

Tabla X.- Áreas relativas obtenidas a diferentes temperaturas.

Temperatura 30 °C		Temperatura 40 °C		Temperatura 50 °C	
t_{eq} (min)	$A_{etanol} / A_{EI} \pm 0,005$	t_{eq} (min)	$A_{etanol} / A_{EI} \pm 0,005$	t_{eq} (min)	$A_{etanol} / A_{EI} \pm 0,005$
5	0,265	5	0,250	5	0,241
10	0,254	10	0,249	10	0,240
15	0,270	15	0,246	15	0,239
20	0,264	20	0,245	20	0,238

Lo anterior se puede comprobar en el gráfico obtenido a partir de los valores calculados con la ecuación de Antoine, este relaciona los valores de la fracción molar de ambas especies en agua en función de la temperatura. En la figura XIV se observa desde el punto de vista teórico, que al aumentar la temperatura, la relación molar en el vapor va disminuyendo, esto quiere decir que a temperaturas altas la transferencia de líquido a vapor del 1-propanol se realiza en mayor proporción con respecto al etanol. Esto explica el ligero descenso en la relación de áreas del analito y el EI a medida que aumenta la temperatura.

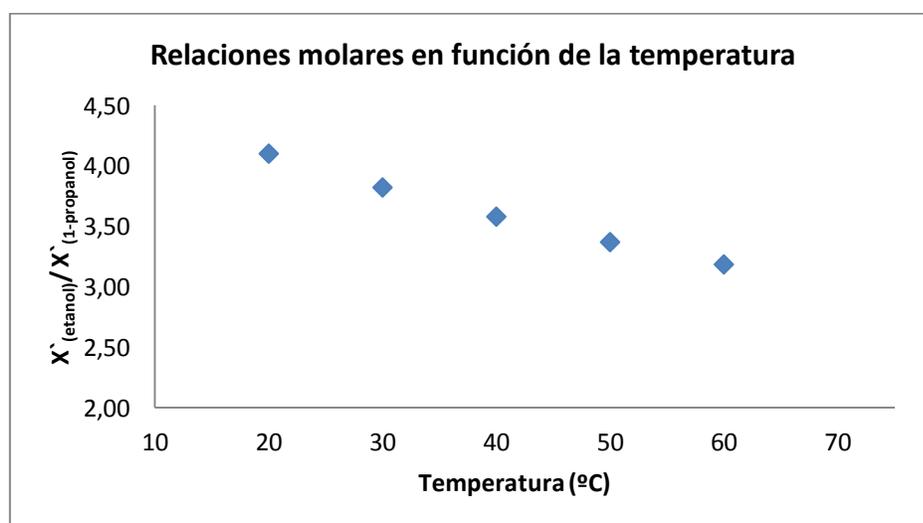


Figura XIV.- Relaciones molares en el vapor de etanol y EI en función de la temperatura

En base a lo anteriormente descrito, se decidió escoger 40 °C como la temperatura de trabajo para el HS, y aunque a 50 °C se obtiene mayor sensibilidad (cuando se habla de las áreas absolutas), se observó una ligera disminución de la relación de áreas, de menor conveniencia para la sensibilidad cromatográfica para la futura construcción de las curvas de calibración, realizadas por estándar interno. Pero, el hecho fundamental de trabajar a 40 °C es por comodidad operacional, facilidad de estabilización y el beneficio de no estar trabajando sobre muestras con baja concentración de Etanol.

Con estas condiciones de trabajo para HS y las condiciones cromatográficas definitivas, se procedió a evaluar los diferentes métodos de cuantificación para comprobar cuál era el óptimo para la determinación de etanol en este tipo de muestras.

VI.6.- Métodos de Cuantificación.

En base a los resultados anteriores se observó que la repetibilidad en áreas absolutas estuvo en el orden del 4 al 5 %, mientras que al evaluar las áreas relativas disminuye a un 2 %. Por lo tanto, en la elaboración de las curvas de calibración se empleó el método de estándar interno, para compensar la falta de repetibilidad de la inyección manual. Por otra parte, los métodos de cuantificación se evaluaron mediante la determinación de Etanol en la muestra catalogada como material de referencia interno.

VI.6.1.- Método de patrones con matriz acuosa:

Para este ensayo se utilizaron patrones de Etanol y 1-Propanol en agua destilada. En primer lugar se prepararon dos disoluciones acuosas de Etanol y 1-Propanol al 5 % (p/p) respectivamente. A partir de la disolución madre de Etanol se prepararon una serie de patrones del 0,1 al 0,9 % respectivamente y a cada uno de ellos se le agregó una alícuota fija de la disolución madre del EI. En tabla XI se muestran las concentraciones de los patrones con los valores exactos. Es importante recalcar que todos los patrones fueron preparados por pesada.

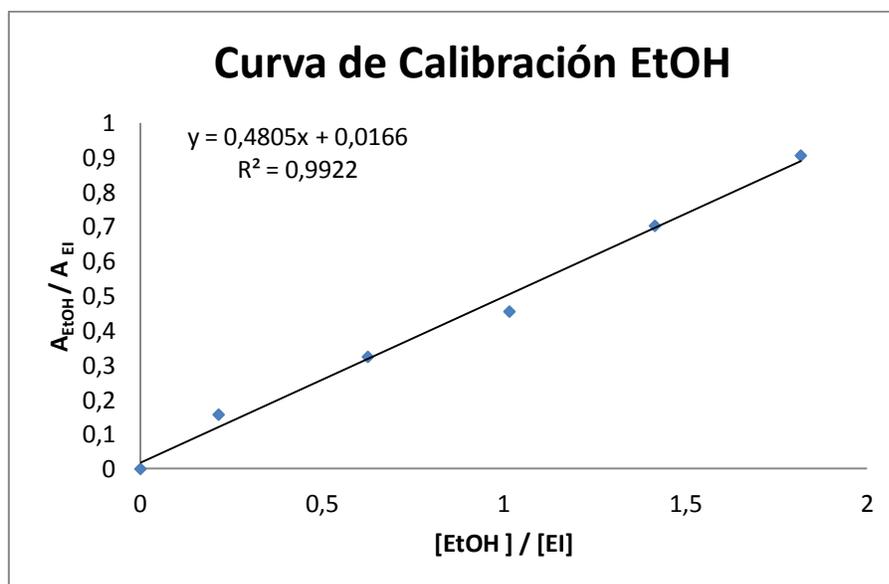
Tabla XI.- Concentraciones de EtOH y EI para la construcción de la curva de calibración.

[EtOH] (%) \pm 0,0003	[EI] (%) \pm 0,0003	[EtOH] / [EI] \pm 0,0004
0,0000	0,4972	0,0000
0,1074	0,4992	0,2151
0,3151	0,5035	0,6258
0,5051	0,4975	1,0153
0,7019	0,4958	1,4157
0,9077	0,4995	1,8172

Se agregaron 5 mL de cada una de la soluciones patrones en viales que fueron sellados y colocados bajo las condiciones de trabajo de HS (40 °C; 15 minutos), transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 500 μ L del vapor y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XII y la curva de calibración por mínimos cuadrados se muestra en la figura XV.

Tabla XII.- Datos de la curva de calibración de Etanol con el EI.

$[\text{EtOH}] / [\text{EI}] \pm 0,0004$	$A_{\text{EtOH}} / A_{\text{EI}}$
0,0000	0,000
0,2151	$0,157 \pm 0,004$
0,6258	$0,324 \pm 0,006$
1,0153	$0,455 \pm 0,007$
1,4157	$0,703 \pm 0,007$
1,8172	$0,906 \pm 0,009$

**Figura XV.-** Curva de calibración de etanol con EI

Aunque se realizaron múltiples curvas de calibración con la preparación de nuevos patrones, en todo momento se observó que las curvas de calibración presentaron un coeficiente de determinación (R^2) del orden del 0,992, con variaciones en la tercera cifra significativa, a pesar de que las relaciones de áreas mantuvo una repetibilidad alrededor del 2 % para inyecciones sucesivas de un mismo patrón por HS.

Un coeficiente de determinación de ese orden, implica una dispersión ligeramente alta en la desviación estándar de la regresión, lo que a su vez repercute en los resultados de la concentración por encima del 2 % en el coeficiente de variación. No pudimos encontrar una razón por la cual nos alejamos ligeramente de la linealidad, pero una posible causa sería el sellado irregular en los diferentes viales, ya que al preparar réplicas de un mismo patrón y comparar sus señales promedios, las dispersiones estuvieron en el orden del 4 al 6 % respectivamente. Lo anterior nos llevó a concluir que tal causa era la principal variación de la dispersión en los valores en el ajuste del modelo de regresión lineal.

Para la determinación de la concentración de etanol en el material de referencia se tomó 5,0977 g del mismo y se le agregó 5,0244 g de la disolución de EI, esto fue llevado a un peso final de 50,8743 g. Seguidamente se agregaron 5 mL de la misma en tres viales diferentes, los cuales fueron sellados y colocados bajo las condiciones definitivas de HS, luego se inyectó 500 μ L del vapor, este paso se repitió por triplicado para cada vial, los resultados que se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII.- Datos obtenidos para el material de referencia interno

Réplica	$A_{\text{EtOH}} / A_{\text{EI}}$
1	0,472 \pm 0,008
2	0,451 \pm 0,009
3	0,437 \pm 0,008

Basándose en estos resultados el contenido de etanol en el material de referencia interno fue de 4,6 \pm 0,2 % con un CV del 4 %.

VI.6.2.- Método de patrones con la matriz simulada:

Este método se aplicó con el fin de observar si existía un efecto matriz, en general, esto se traduce en una diferencia en la sensibilidad en la curva de calibración cuando los patrones se preparan en un medio que difiere al de la muestra.

Para simular la matriz del material de referencia interno se decidió agregar a los patrones sorbitol y sacarosa, que son los componentes que se encuentran en mayor proporción. Para ello, se agregó una alícuota tal que la concentración de ambos azúcares quedara con el mismo factor de dilución del material de referencia a evaluar.

Se realizaron patrones de etanol con concentraciones del 0,1 al 0,9 % respectivamente, se agregaron alícuotas de EI tal que la concentración final del mismo fuese del 0,5 % aproximadamente, además de agregar alícuotas de una solución de sorbitol al 70% y de sacarosa al 50%. En la tabla XIV se muestran las concentraciones preparadas.

Tabla XIV.- Concentraciones de EtOH y EI para la construcción de la curva de calibración.

[EtOH] (%) $\pm 0,0003$	[EI] (%) $\pm 0,0003$	[EtOH] / [EI] $\pm 0,0004$
0,0000	0,4916	0,0000
0,1002	0,4936	0,2030
0,2970	0,4927	0,6028
0,4974	0,4927	1,0095
0,6895	0,4888	1,4106
0,8943	0,4940	1,8103

Un volumen de 5 mL de cada uno de los patrones fue agregado en viales que se sellaron y colocaron de igual manera bajo las condiciones de HS definitivas (40 °C; 15 min). Luego se inyectaron 500 μ L del vapor de cada uno en el cromatógrafo, esta experiencia se realizó por triplicado para cada patrón, los resultados obtenidos se muestran en la tabla XV y la curva de calibración por mínimos cuadrados se muestra en la figura XVI.

Tabla XV.- Datos obtenidos de la curva de calibración de Etanol simulando la matriz del material de referencia interno.

[EtOH] / [EI] $\pm 0,0004$	$A_{\text{EtOH}} / A_{\text{EI}}$
0,0000	0,000
0,2030	$0,297 \pm 0,007$
0,6028	$0,372 \pm 0,008$
1,0095	$0,541 \pm 0,006$
1,4106	$0,749 \pm 0,005$
1,8103	$0,820 \pm 0,008$

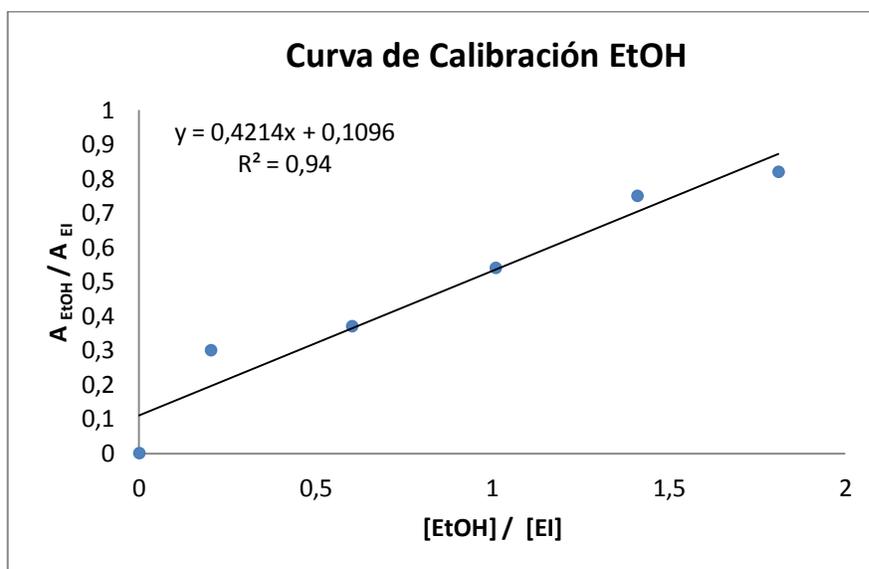


Figura XVI.- Curva de calibración de Etanol simulando la matriz del material de referencia interno.

Bajo esta curva de calibración se evaluó el material de referencia interno, para cuantificar el porcentaje de etanol contenido, para ello se tomó 2,5237 g del mismo y se le agregó 2,5400 g de la solución de EI, esto fue llevado a un peso final de 25,2999 g. Seguidamente se agregaron 5 mL de la misma en tres viales diferentes, los cuales fueron sellados y colocados bajo las condiciones definitivas de HS, luego se inyectó 500 μ L del vapor, este paso se repitió por triplicado para cada vial, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla XVI.

Tabla XVI.- Datos obtenidos para el material de referencia interno.

Réplica	$A_{\text{EtOH}} / A_{\text{EI}}$
1	0,523 \pm 0,009
2	0,559 \pm 0,007
3	0,541 \pm 0,007

Basándose en estos resultados obtenidos, el contenido de etanol calculado para el material de referencia interno fue de 5,1 \pm 0,2 %.

VI.6.3.- Método de Adición Estándar:

Aunque en el método anterior se simuló la matriz para la elaboración de los patrones, sólo participaron los componentes de mayor proporción en la muestra. Sin embargo, las matrices en los jarabes son más complejas ya que además de contener los azúcares, poseen uno o varios excipientes. Como era imposible replicar la matriz del material de referencia interno por no contar con todos los componentes reportados, se decidió realizar la cuantificación de etanol utilizando el método de adición estándar.

Para ello igualmente se realizaron patrones de etanol con concentraciones del 0,1 al 0,9 % respectivamente, agregando una alícuota del intermediario de EI correspondiendo a una concentración final de 0,5 %. Adicionalmente se le añadió una alícuota conocida del material de referencia.

Un volumen de 5 mL de cada uno de los patrones fue agregado en viales que se sellaron y colocaron bajo las condiciones de HS definitivas (40 °C; 15 min). Luego se inyectaron 500 µL del vapor de cada uno en el cromatógrafo, esta experiencia se realizó por triplicado para cada patrón, este procedimiento se realizó por triplicado, las curvas de calibración por mínimos cuadrados se muestran en la figura XVII.

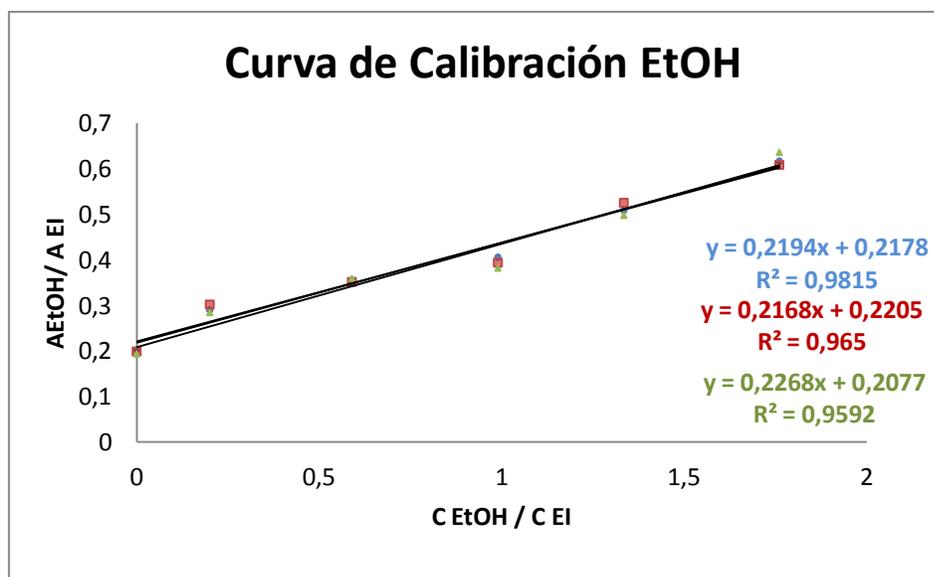


Figura XVII.- Curva de calibración de Etanol con adición estándar.

Basándose en estos resultados obtenidos, el contenido de etanol calculado para el material de referencia interno fue de $5,0 \pm 0,3$ %.

VI.6.4.- Comparación entre los métodos de cuantificación:

A los tres resultados obtenidos anteriormente se les realizó una prueba estadística para comprobar si existían diferencias significativas, para ello, se escogió una prueba de contraste de significación.

Al comparar las medias experimentales, el cálculo del estadístico (t) arrojó que ninguno de los valores experimentales supera el valor crítico reportado para 4 grados de libertad ($t_4 = 2,78$ ($P = 0,05$)), esto quiere decir que no existe diferencia significativa al nivel del 5% entre los valores de concentración de etanol obtenidos con los diferentes métodos.

VI.7.- Validación del método HS-CG.

En nuestro caso particular, como estamos estableciendo un método analítico nuevo, que será aplicado a un medicamento, debemos guiarnos por las pautas que ofrecen organismos como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

Para ello debimos comprobar que la concentración de etanol obtenida a partir del método de CG-HS está acorde con los reportados por el método reportado en la USP para determinar alcoholes en muestras líquidas [18].

El método de la USP consiste en realizar una destilación de la muestra diluida en agua, para posteriormente medir la densidad del destilado, y en base a una tabla alcoholimétrica determinar la concentración de EtOH en la muestra.

Para ello, en un balón de destilación se añadió 25 mL de la material de referencia y se completó con 25 mL de H₂O destilada. Se procedió a destilar tal y como se muestra en la figura VXIII.



Figura XVIII.- Montaje de destilación.

Se destiló hasta que el volumen recolectado del destilado fue de 23 mL (2 mL menos del volumen inicial de la muestra) y se enrasa en un cilindro graduado a 25 mL con agua destilada. Finalmente se procedió a medir la densidad de la mezcla hidroalcohólica con un picnómetro, obteniendo los resultados mostrados en la tabla XVII. La determinación se realizó por triplicado para el material de referencia.

Tabla XVII.- Densidades del destilado.

Réplica	$\rho_{(25^{\circ}\text{C})} (\pm 0,0003)$	[EtOH]
1	0,9922	4,353
2	0,9915	4,765
3	0,9912	4,941

Se procedió a realizar el cálculo para determinar la concentración de etanol, utilizando la gráfica correspondiente a la tabla alcoholimétrica y los valores de densidad obtenidos, encontrando una concentración de EtOH de $4,7 \pm 0,3$ %.

Luego de determinar la concentración de etanol en el material de referencia se deben comparar los resultados con los obtenidos por el método cromatográfico. Como se evidenció que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los tres métodos de cuantificación, se decidió hacer la comparación con el resultado de $5,0 \pm 0,3 \%$, obtenido a partir del método de adición estándar.

A los resultados obtenidos por ambas metodologías se les realizó una prueba estadística para comprobar si había diferencias significativas entre ellos, para ello, se escogió una prueba de contraste de significación.

Al comparar las medias experimentales, el cálculo del estadístico (t) arrojó que ninguno de los valores experimentales supera el valor crítico reportado para 4 grados de libertad ($t_4 = 2,78$ ($P = 0,05$)), esto quiere decir que no existe diferencia significativa al nivel del 5% entre los valores de concentración de etanol obtenidos con los diferentes métodos.

Lo anterior comprueba que el método cromatográfico desarrollado puede ser implementado para la determinación de EtOH en jarabes, ya que fue validado contra el método tradicionalmente utilizado por uno de los organismos que rigen el estudio sobre muestras farmacéuticas (USP).

VI.8.- Determinación de Etanol en jarabes comerciales.

Una vez validado el método de HS-CG el siguiente paso fue realizar la cuantificación de jarabes comerciales, para ello se emplearon dos muestras, la primera un jarabe expectorante llamado Broxol TOS Pediátrico, el principio activo es S-carboximetilcisteína y pertenece a Laboratorios La Santé con número de lote 3116004. La segunda muestra fue un jarabe “naturista” con acción fluidificante de nombre PectoVital de Laboratorio Natural Premium C.A perteneciente al lote 01270314.

Como se encontró que no había diferencias significativas entre los métodos de cuantificación, se decidió determinar la concentración de EtOH por el método más sencillo, correspondiente al estándar interno utilizando patrones con matriz acuosa.

Para ello, se utilizó el método desarrollado anteriormente y ambas muestras fueron analizadas por triplicado. Los resultados obtenidos para la concentración de etanol se encuentran en la tabla XVIII.

Tabla XVIII.- Concentración de EtOH contenido en jarabes pediátricos comerciales.

Muestra	Concentración EtOH (%p/p)
Broxol Tos Pediátrico	5,0 ± 0,3
PectoVital	3,4 ± 0,2

VII.- Conclusiones.

- Se desarrolló una metodología analítica por Cromatografía de Gases con sistema de introducción de muestra por Headspace, para la determinación de etanol en fármacos líquidos con alto contenido de solutos no volátiles, como es el caso de los jarabes pediátricos comerciales.
- El tiempo total de la metodología HS-CG correspondió a 30 minutos por muestra y los valores de la concentración arrojaron una dispersión del orden del 4 % como CV.
- Las condiciones cromatográficas de trabajo fueron las siguientes: columna capilar DB-WAX (100 % Etilenglicol) de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, la cual se mantuvo isotérmicamente a una temperatura de 80 °C. Se utilizó Nitrógeno como fase móvil con un flujo de 1,5 mL/min, y el inyector se colocó en modo Split utilizando un *Split flow* de 30 mL/min, el detector FID se mantuvo a 250 °C y con un flujo de 20 mL/min para el make-up gas (N₂).
- Se escogió 1-propanol como estándar interno por las pocas diferencias en su estructura molecular con el analito de interés, lo cual es ideal tanto para el sistema cromatográfico como para el HS.
- El tiempo total de análisis cromatográfico fue de 5 minutos por muestra, los tiempos de retención fueron de 3,37 minutos para el Etanol y 3,88 minutos para

el 1-Propanol. Presenta una buena resolución y excelente simetría de las bandas cromatográficas. La repetibilidad del sistema cromatográfico medido para un mismo patrón o muestra, bajo la forma de áreas relativas y con respecto a un estándar interno, presentó una repetibilidad en áreas del orden del 2 %.

- Las condiciones de trabajo para el sistema de HS desarrollado son: temperatura de equilibrio 40 °C y un tiempo de equilibrio de 15 minutos, siendo irrelevante la relación volumétrica de las fases. El volumen de inyección fue de 500 µL.
- Se demostró que un mismo patrón o muestra puede ser inyectado sucesivamente para evaluar la repetibilidad de las medidas. Esto se debe a que no hay una alteración apreciable en las áreas absolutas de las bandas cromatográficas, ya que el volumen extraído es tan pequeño que no ofrece cambios en la composición en el líquido.
- El sistema de HS-CG desarrollado obtuvo una dispersión en la medida del orden del 4 % como CV.
- Las curvas de calibración ajustadas por mínimos cuadrados arrojaron coeficientes de determinación de 0,99, lo que implicó una dispersión del orden del 5 % como CV en los valores de concentración obtenidos bajo dichas curvas. No obtener una mejor linealidad se lo podemos atribuir al “deficiente” sellado de los viales durante la metodología por HS. Sin embargo, los resultados obtenidos son satisfactorios para la determinación de etanol en jarabes pediátricos, los cuales indican que la concentración no puede ser mayor del 5 ± 1 %. (CV 20 %).

- No se encontró diferencias significativas entre los resultados obtenidos empleando curvas de calibración con patrones preparados en sistema acuoso, patrones con matriz simulada y adición estándar. Esto se debe a que el factor de dilución realizado a las muestras de jarabes pediátricos elimina las interferencias por efecto salino u otros. El método elegido para realizar la cuantificación fue estándar interno con patrones acuosos, ya que es práctico, sencillo y económico.

- La validación del método se realizó según el protocolo pautado por la <611> de la USP 30 NF25. Arrojando que no había diferencias significativas entre el método establecido y el de la USP. Ello indica que el método de destilación puede ser sustituido por el método HS-CG.

- La ventaja del método nuevo sobre el tradicional, es la rapidez que ofrece cuando se quiere determinar la concentración en grandes números de muestra, lo que ofrece un aporte positivo a la industria farmacéutica ya que se pueden analizar varios lotes de producción en menor tiempo. Por otra parte, el método de HS no requiere que las muestras estén libres de compuestos no volátiles.

- La concentración de Etanol en el jarabe Broxol Tos Pediátrico perteneciente al lote N° 3116004 fue de $5,0 \pm 0,3$ %, por otra parte, el jarabe “naturista” PectoVital con N° de lote 01270314, arrojó un resultado de $3,4 \pm 0,2$ % de EtOH, cumpliendo ambos con el límite máximo aceptado para este tipo de fármacos (5 ± 1 % p/p).

VIII.- Recomendaciones.

- Recomendamos utilizar un auto-muestreador automático de headspace, para disminuir los coeficientes de varianza inherentes a una inyección manual, ya que al trabajar por la metodología de “loop” de inyección se corrigen muchas fuentes para la falta de reproducibilidad. Adicionalmente esto permitiría independizarse en todos los ensayos del uso de estándar interno, trabajar con áreas absolutas y explorar temperaturas superiores para el HS.

- De la misma manera sugerimos el empleo de un sellador mecánico para los viales, esto posiblemente corrija los problemas de linealidad en las curvas de calibración.

- Con las sugerencias anteriores, es posible modificar las condiciones de trabajo para extender el análisis para fármacos donde se desee determinar alcoholes en concentraciones más bajas u otro tipo de fármacos de interés.

IX.- Bibliografía:

[1] Lorenzo P., Moreno A., Lozasoain I., Cesa J., Moro M, Portolés A., **Velázquez Farmacología Básica y Clínica**, Editorial Médica Panamericana, 18º Edición, Madrid, Año 2008.

[2] Nairn J., **Remington Farmacia**, Capitulo 39, tomo I. Editorial Médica Panamericana, 20º Edición, Buenos Aires, Año 2003.

[3] Mendoza N., **Farmacología Médica**, Editorial Médica Panamericana, México, Año 2008.

[4] Hernández G., Moreno A., Zaragoza F., Porras A., **Tratado de medicina farmacéutica**, Editorial Médica Panamericana, Madrid, Año 2011.

[5] Valle P., Lucas B., **Toxicología de Alimentos**, Instituto Nacional de Salud Pública del Centro Nacional de Salud Ambiental, México, Año 2000.

[6] Kulkarni M., Sureshkumar C., Venkataramana V., **Couloring, flavouring and sugars in children´s medicines in India**, JJM Medical College, India, Año 1993.

[7] Martínez R., Rodríguez M., Sánchez L., **Química – American Chemical Society**, Editorial Reverté, Barcelona – España, Año 2007.

[8] Acuña F., **Química Orgánica**, Editorial Universidad Estatal a distancia, 1º Edición, Costa Rica, Año 2006.

[9] Lasarte J.R., **Manual de Intoxicaciones en Pediatría**, Capítulo 28, Editorial Ergon, 2º Edición, Madrid, Año 2008.

[10] Ruza F., **Tratado de Cuidados Intensivos Pediátricos**, Volumen II, Editorial Norma – Captel, Madrid, Año 2002.

[11] Academia Americana de Pediatría, **Ethanol in Liquid Preparations Intended for Children**, Committee on Drugs: Pediatrics Volumen 73, Año 1984.

[12] Skoog D., Holler J., Nieman T., **Principios de Análisis Instrumental**, Editorial Mc Graw Hill, 5º Edición, España, Año 2010.

[13] Harris D., **Análisis Químico Cuantitativo**, Editorial Reverté, 3º Edición, Barcelona – España, Año 2007.

[14] Agilent Technologies, **Guía de selección de columnas para cromatografía de gases**, Alemania, Año 2007.

[15] Barquero M., **Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases**, 1º Edición, Editorial Serie Química, Costa Rica, Año 2006.

[16] Kolb B., Ettre L., **Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice**, Editorial Wiley – VCH, Canadá, Año 1997.

[17] Restek, **A Technical Guide for Static Headspace Analysis using CG**.

[18] The United States Pharmacopeial (USP), **Alcohol determination, Method I – Distillation**, Año 2013.

[19] Huzar E., Wodnicka A., **Determination of ethanol content in medicated syrups by static headspace gas chromatography**, Szczecin – Polonia, Año 2013.

[20] Vannucchi G., Marchini J., Jordão A., **Validation of a manual headspace gas chromatography method for determining volatile compounds in biological fluids**, Ribeirao Preto – Brasil, Año 2008.

[21] Marotta L., **Determination of organic volatile impurities by headspace – gas chromatography**, Shelton – USA, Año 2006.

[22] Musselman J., Solanky A., Arnold W., **Increasing accuracy of blood alcohol analysis using automated headspace – gas chromatography**, Phoenix – USA, Año 2006.

X.- Apéndice:

X.1.- Tabla alcoholimétrica:

(1) Percentage of C ₂ H ₅ OH		(3) Specific gravity in air		(5) Percentage of C ₂ H ₅ OH		(7) Specific gravity in air	
By volume at 15.56°C	By weight	At 25°/25°	At 15.56°/15.56°	By weight	By volume at 15.56°C	At 25°/25°	At 15.56°/15.56°
0	0.00	1.0000	1.0000	0	0.00	1.0000	1.0000
1	0.80	0.9985	0.9985	1	1.26	0.9981	0.9981
2	1.59	0.9970	0.9970	2	2.51	0.9963	0.9963
3	2.39	0.9956	0.9956	3	3.76	0.9945	0.9945
4	3.19	0.9941	0.9942	4	5.00	0.9927	0.9928
5	4.00	0.9927	0.9928	5	6.24	0.9911	0.9912
6	4.80	0.9914	0.9915	6	7.48	0.9894	0.9896
7	5.61	0.9901	0.9902	7	8.71	0.9879	0.9881
8	6.42	0.9888	0.9890	8	9.94	0.9863	0.9867
9	7.23	0.9875	0.9878	9	11.17	0.9848	0.9852
10	8.05	0.9862	0.9866	10	12.39	0.9833	0.9839
11	8.86	0.9850	0.9854	11	13.61	0.9818	0.9825
12	9.68	0.9838	0.9843	12	14.83	0.9804	0.9812
13	10.50	0.9826	0.9832	13	16.05	0.9789	0.9799
14	11.32	0.9814	0.9821	14	17.26	0.9776	0.9787
15	12.14	0.9802	0.9810	15	18.47	0.9762	0.9774
16	12.96	0.9790	0.9800	16	19.68	0.9748	0.9763
17	13.79	0.9778	0.9789	17	20.88	0.9734	0.9751
18	14.61	0.9767	0.9779	18	22.08	0.9720	0.9738
19	15.44	0.9756	0.9769	19	23.28	0.9706	0.9726
20	16.27	0.9744	0.9759	20	24.47	0.9692	0.9714
21	17.10	0.9733	0.9749	21	25.66	0.9677	0.9701
22	17.93	0.9721	0.9739	22	26.85	0.9663	0.9688
23	18.77	0.9710	0.9729	23	28.03	0.9648	0.9675
24	19.60	0.9698	0.9719	24	29.21	0.9633	0.9662
25	20.44	0.9685	0.9708	25	30.39	0.9617	0.9648
26	21.29	0.9673	0.9697	26	31.56	0.9601	0.9635
27	22.13	0.9661	0.9687	27	32.72	0.9585	0.9620
28	22.97	0.9648	0.9676	28	33.88	0.9568	0.9605
29	23.82	0.9635	0.9664	29	35.03	0.9551	0.9590
30	24.67	0.9622	0.9653	30	36.18	0.9534	0.9574
31	25.52	0.9609	0.9641	31	37.32	0.9516	0.9558
32	26.38	0.9595	0.9629	32	38.46	0.9498	0.9541
33	27.24	0.9581	0.9617	33	39.59	0.9480	0.9524
34	28.10	0.9567	0.9604	34	40.72	0.9461	0.9506
35	28.97	0.9552	0.9590	35	41.83	0.9442	0.9488
36	29.84	0.9537	0.9576	36	42.94	0.9422	0.9470
37	30.72	0.9521	0.9562	37	44.05	0.9402	0.9451
38	31.60	0.9506	0.9548	38	45.15	0.9382	0.9432
39	32.48	0.9489	0.9533	39	46.24	0.9362	0.9412
40	33.36	0.9473	0.9517	40	47.33	0.9341	0.9392
41	34.25	0.9456	0.9501	41	48.41	0.9320	0.9372
42	35.15	0.9439	0.9485	42	49.48	0.9299	0.9352
43	36.05	0.9421	0.9469	43	50.55	0.9278	0.9331
44	36.96	0.9403	0.9452	44	51.61	0.9256	0.9310
45	37.87	0.9385	0.9434	45	52.66	0.9235	0.9289
46	38.78	0.9366	0.9417	46	53.71	0.9213	0.9268
47	39.70	0.9348	0.9399	47	54.75	0.9191	0.9246
48	40.62	0.9328	0.9380	48	55.78	0.9169	0.9225
49	41.55	0.9309	0.9361	49	56.81	0.9147	0.9203
50	42.49	0.9289	0.9342	50	57.83	0.9124	0.9181
51	43.43	0.9269	0.9322	51	58.84	0.9102	0.9159
52	44.37	0.9248	0.9302	52	59.85	0.9079	0.9137

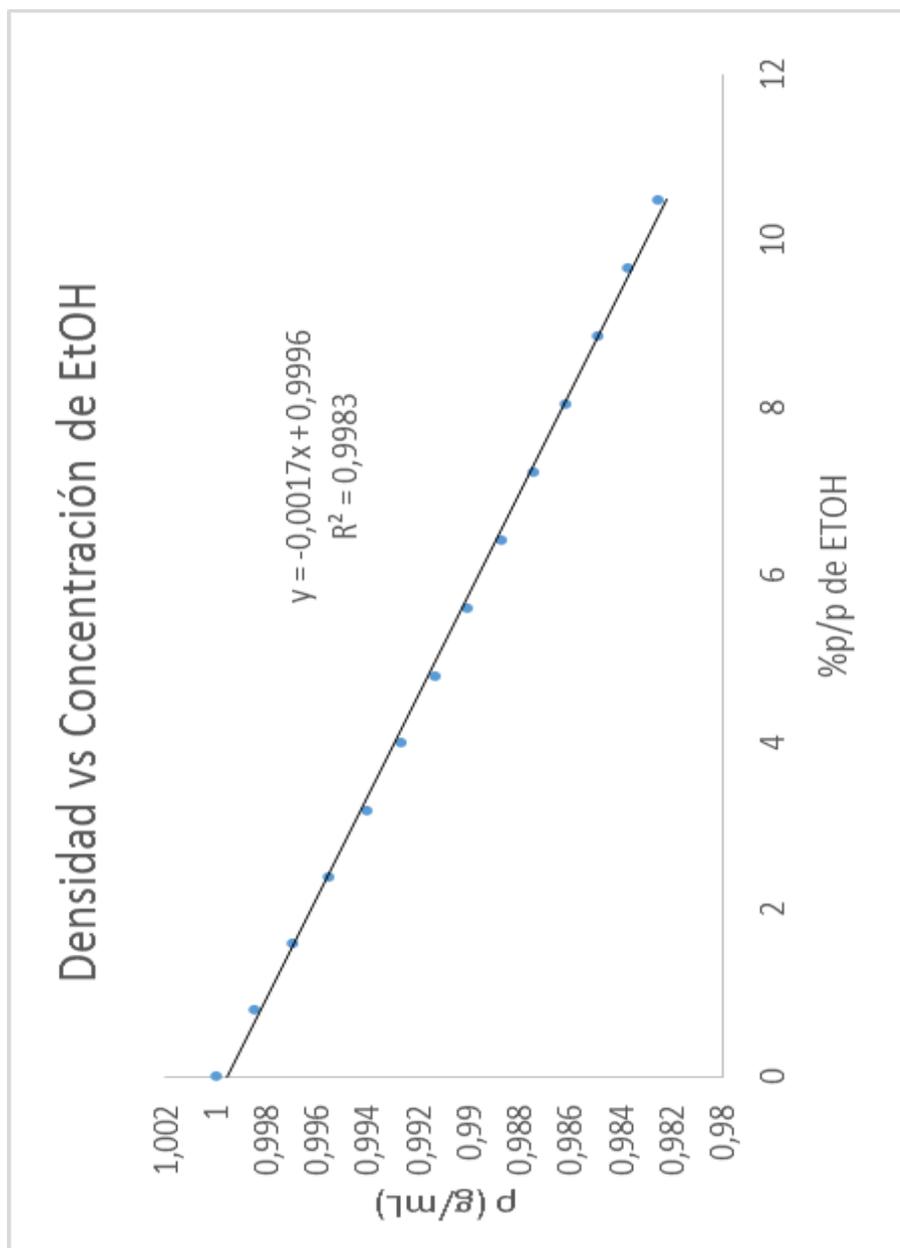


Figura XIX.- Gráfica obtenida a partir de los datos de la tabla alcoholimétrica.