

FACULTAD DE QUIMICA-FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis para optar el grado de Licenciado en Ciencias Farmacéutica

TÍTULO: *Desarrollo y Validación de una técnica analítica empleando dispersión en matriz sólida y cromatografía de gases con detección por captura electrónica para la determinación de G-1 en plasma.*

AUTOR: *Maidelys Velázquez Aday*

TUTORES: *Dr. Sergio Morales Fernández.
Lic. Amalia Calvo Alonso.*

CURSO 2006 – 2007
“AÑO 49 DE LA REVOLUCIÓN”

Pensamiento

*No progresas mejorando lo que ya esta hecho, sino
esforzándote por Lograr lo que aun queda por hacer.*

Khalil Gibran

Dedicatoria

Dedicatoria:

- *A mis padres, en especial a mi madre por ser mi fuente de inspiración, mi quía y a ambos por ser las personas que más quiero en este mundo.*
- *A mi única hermana por ser tan especial para mí.*
- *A toda mi familia porque ellos son mi fuente de felicidad.*

Agradecimientos

Agradecimientos:

- *A Dios por conducirme por la senda correcta, por darme la fuerza y la fe que necesitaba para creer en mi misma.*
- *A mis padres quiero agradecerles la dedicación, confianza y la educación que me dieron, por ayudarme en todo y por ser quien soy.*
- *A mi abuela por aportarme toda su experiencia, darme buenos consejos y por ayudarme en todo lo que pudo.*
- *A mi familia y amistades por el apoyo que me ofrecieron.*
- *A mi novio yoandy por estar todo el tiempo a mi lado, por su dedicación y apoyo.*
- *A la familia de mi novio porque siempre estuvieron atentos a todo lo que me hizo falta.*
- *A mis tutores Amalia y Sergio quiero agradecerles muchísimo toda la ayuda que me han brindado para la realización de este trabajo.*
- *A Adalberto por brindarme su ayuda en la parte experimental.*

Muchas Gracias.

Resumen

Resumen

Se establecieron los parámetros operacionales para la determinación de G-1 por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica. Las temperaturas del inyector, horno (columna) y detector se fijaron en 230, 200 y 280 °C respectivamente. El valor óptimo determinado para el flujo de fase móvil (nitrógeno) fue de 0,5 mL/min y el volumen de inyección de 1 µL (modo splitless), con uso de benzoato de bencilo como estándar interno para corregir los errores asociados con la inyección manual.

La técnica estudiada para la extracción de G-1 desde plasma humano mediante Dispersión en Matriz Sólida, con adsorbente de sílica modificada C-18, co-columna de silicagel, elución con n-hexano y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica se sometió a un proceso de validación, siguiendo la metodología ICH, resultando ser sensible, con límite de detección de 0,0741 mg/L y límite de cuantificación de 0,1452 mg/L, lineal en el intervalo de 0,5 a 8 mg/L, precisa, exacta y selectiva.

Índice

INDICE	pág
INTRODUCCION	1
Objetivos	2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Generalidades de la molécula de G-1.	3
1.2 Actividad biológica y toxicidad del G-1.	3
1.3 Solubilidad y Estabilidad del G-1.	4
1.4 Componentes del plasma sanguíneo.	5
1.5 Determinación de los parámetros de desempeño del método analítico.	6
1.5.1 Linealidad.	6
a) Coeficiente de correlación (r).	7
b) Ensayos de linealidad.	7
c) Ensayo de proporcionalidad.	9
1.5.2 Sensibilidad de calibrado.	10
1.5.3 Valores aceptables de los parámetros de linealidad.	10
1.5.4 Límite de detección y cuantificación.	10
1.5.5 Precisión.	12
a) Desviación estándar y coeficiente de variación.	13
b) Límites de confianza.	13
c) Procesamiento de los Datos.	14
1.5.6 Exactitud.	14
1.5.7 Especificidad.	14
1.6 Fundamento teórico de la técnica analítica Dispersión en Matriz Sólida (MSPD).	15
1.7 Generalidades de cromatografía.	17
1.7.1 Fundamento teórico de la técnica analítica Cromatografía G.	19
1.7.1.1 Clacificación de la cromatografía de gases según la naturaleza de las fases involucradas.	20
1.7.1.2 Instrumentación.	20
1.7.1.3 Sistema de inyección de muestra.	20
1.7.1.4 Columna.	21
1.7.1.4.1 Tipos de columnas.	21
1.7.1.4.2 Factores que Afectan la Eficiencia de una Columna.	23
1.7.1.5 La fase estacionaria.	24
1.7.1.6 Detectores.	25
1.7.1.6.1 Detectores más usados en Cromatografía de Gases.	26
1.7.1.6.2 Detector de Captura Electrónica.	26
1.7.1.7 Aplicaciones de la Cromatografía de gases.	28
1.8 Antecedentes sobre la utilización de Dispersión en Matriz sólida en muestras diversas.	28

MATERIALES Y METODOS	
2.1 Equipamiento.	31
2.2 Reactivos y disolventes.	31
2.3 Materiales e Instrumental.	31
2.4 Técnicas.	32
2.4.1 Procedimiento de extracción mediante MSPD.	32
2.4.2 Cromatografía de gases y detección por captura electrónica (GC-ECD).	32
2.4.2.1 Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector	33
2.4.2.2 Selección del flujo de fase móvil.	33
2.4.2.3 Volumen de inyección.	33
2.4.2.4 Selección del estándar interno.	33
2.5 Validación.	33
2.5.1 Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)).	33
2.5.2 Linealidad.	34
2.5.3 Precisión.	35
2.5.3.1 Repetibilidad de instrumental.	35
2.5.3.2 Repetibilidad a diferentes niveles de concentración.	35
2.5.3.3 Precisión intermedia.	35
2.5.4 Exactitud.	35
2.5.5 Selectividad.	35
2.6 Procesamiento estadístico de los datos.	36
RESULTADO Y DISCUSION	
3.1 Procedimiento de extracción mediante MSPD.	37
3.2 Selección del flujo de fase móvil.	37
3.3 Selección del estándar interno.	38
3.4 Validación.	41
3.4.1 Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)).	41
3.4.2 Linealidad.	41
3.4.3 Precisión.	43
3.4.3.1 Repetibilidad de instrumental.	43
3.4.3.2 Repetibilidad a diferentes niveles de concentración.	44
3.4.3.3 Precisión intermedia.	45
3.4.4 Exactitud.	46
3.4.5 Selectividad.	46
CONCLUSIONES.	49
RECOMENDACIONES.	50
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	51
ANEXOS.	

Introducción

Introducción

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, conocido como G-1 es un ingrediente farmacéutico activo sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas. Este producto posee una potente actividad bactericida - fungicida de amplio espectro, demostrada frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, hongos y levaduras, [González, O., 1993, I; González, O., 1993, ^{III}] por lo que constituye un reto hoy día formular un medicamento para uso sistémico con acción antimicrobiana a partir del mismo.

Para el registro de un medicamento es requisito indispensable, entre otros, la realización de ensayos que definan las propiedades y parámetros farmacocinéticos que caractericen la absorción, biodistribución, metabolismo y excreción del fármaco, así como la cantidad y posibilidad para llegar al sitio de acción y de esta forma, garantizar su efecto farmacológico.

Las matrices biológicas como la sangre, plasma, suero o tejidos son generalmente muy complejas en cuanto a su composición [http://enciclopedia.us.es; http://www.portalplanetasedna.com.ar; http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre; http://www.terra.com] y, en la mayoría de los casos, contienen a los analitos de interés a concentraciones muy bajas, además de que pueden presentar interferencias que entorpecen el posterior análisis. Por estas razones, cuando se trabaja con este tipo de muestras, a la determinación analítica frecuentemente le antecede procesos de extracción.

El procedimiento tradicional de extracción desde muestras biológicas como la sangre, suero o plasma tiene una serie de desventajas que son superadas por un nuevo método denominado “Dispersión en Matriz Sólida” (MSPD), con el cual se consigue poca manipulación de la muestra, que puede traer consigo pérdidas de analito, gracias a que permite ejecutar la extracción en pocos pasos, además, requiere volúmenes pequeños de disolventes y, por tanto, se obtienen disoluciones más concentradas del analito y con menos interferencias para el análisis. [Technical

Note ¹¹¹. Argonaut Technologies. Inc. 2002]

Los métodos de cuantificación más empleados para este tipo de estudio son los cromatográficos porque ofrecen un análisis completo que puede realizarse en un tiempo relativamente corto (unos 30 minutos como promedio), proporcionando

información para los análisis cualitativo y cuantitativo (velocidad), una mejor resolución, es decir que usando las condiciones analíticas adecuadas se pueden hacer separaciones imposibles de realizar por otros métodos y la mejor razón para utilizarlos es que tienen buena sensibilidad, utilizando detectores selectivos se han logrado detectar cantidades hasta de 10^{-12} gramos. [Cela R., 2002; Robinson, K.A, 2000]. Ahora bien, para elegir el método específico es necesario demostrar con anterioridad su adecuado funcionamiento y fiabilidad, es decir, debe cumplir con los requerimientos de validación correspondientes. [Catiñeira Díaz, M., 2002; González San Miguel, H.M., 2002].

En consecuencia, se ha identificado como problema científico el hecho de que en el Centro de Bioactivos Químicos no se pueden realizar los estudios farmacocinéticos, farmacológicos y/o toxicológicos necesarios para el registro de medicamentos, porque no existen técnicas analíticas para determinar las concentraciones de G-1 en fluidos biológicos.

Sobre esta base se formuló la siguiente hipótesis: “Es posible desarrollar y validar una técnica analítica aplicando la dispersión en matriz sólida y cromatografía de gases con detección por captura electrónica para determinar la concentración de G-1 en fluidos biológicos”.

Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo General:

Proponer una técnica analítica validada en la que se emplee la dispersión en matriz sólida y la cromatografía de gases con detección por captura electrónica para determinar la concentración de G-1 en muestras de plasma.

Objetivos Específicos:

- Establecer los parámetros operacionales para la determinación de G-1 mediante cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica.
- Validar la técnica de extracción mediante dispersión en matriz sólida y determinación de G-1 en muestras de plasma, por cromatografía de gases con detección por captura electrónica.

Revisión Bibliográfica

1.1. Generalidades de la molécula de G-1

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, conocido como G-1, es un ingrediente farmacéutico activo sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas. Su estructura química ha sido corroborada por diferentes técnicas como la espectrofotometría de masa, espectrofotometría infrarroja en estado sólido, espectrofotometría ultravioleta – visible y espectroscopía de resonancia magnético nuclear (RNM- ^1H) [Estrada, E., 1993]

La fórmula estructural se muestra en la Figura 1.

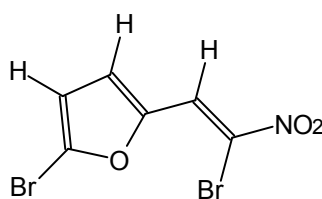


Figura 1. Estructura química del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.

1.2. Actividad biológica y toxicidad del G-1

El G-1 ha mostrado potencial actividad in vitro como bactericida - fungicida de amplio espectro; comprobándose su efectividad frente a 908 cepas de bacterias Gram negativas y 119 cepas Gram positivas. Otros trabajos refieren su actividad frente a *Enterobacter* sp, *Klebsiella* y *Pseudomona aeruginosa*. Por otra parte, González y col. en 1993 obtuvieron resultados similares frente a 293 cepas de hongos gemantes del género *Candida*. [González, O., 1993, I; González, O., 1993, II] Esta actividad ha sido demostrada también frente a hongos dermatofitos y filamentosos. [Estrada, E., 1993, II; González, O., 1993]

Estudios realizados por Boldeau y col. en 1997, amplían y corroboran estos resultados de actividad in vitro frente a 2702 microorganismos multi-resistentes. [Boldeau, J.M., 1997]

Como resultado de un estudio de toxicidad aguda por las vías oral y percutánea, en ratas Sprague Dawley machos y hembras, el G-1 ha sido clasificado como ligeramente tóxico, con valores de dosis letal media de 1856,3 – 1506,2 mg/kg y 2370 – 2205 mg/kg de masa corporal, respectivamente. [Cortes, R.R., 1997, II] Los estudios subcrónicos y crónicos por vía tópica, no registran manifestaciones clínicas

relacionadas con daños orgánicos de interés toxicológico por lo cual permiten su utilización por esta vía de administración. [Cortes, R.R., 1997, I, II]

En cuanto al criterio del riesgo genotóxico se han tomado en cuenta los resultados de diez pruebas de mutagénesis y/o genotoxicidad realizadas a este ingrediente farmacéutico activo, incluidos estudios teóricos [Estrada, E., 1998], estudios in vitro [Pant, K.J., 1996; Pérez, G., 1996 & Xu J., 1996] y estudios in vivo; [Rasbasco, A.M., 1991; Carballo, N., 1997, I, II, III, IV] de las cuales los tests de Ames y Aberraciones cromosómicas en CHO fueron positivos. En general, los resultados de las pruebas de mutagénesis sugieren que el G-1 se puede utilizar de forma segura como medicamento tópico en enfermedades infecciosas. [Pant, K.J., 1996]

En relación con los resultados de la actividad biológica y toxicidad de este ingrediente farmacéutico activo, el G-1 constituye una molécula tentativamente favorecida como alternativa terapéutica en la línea de los antiinfecciosos. En la actualidad se amplían los estudios de toxicidad y de preformulación, que permitan la diversificación de este ingrediente farmacéutico activo en cuanto a formas farmacéuticas para su posible empleo en el tratamiento de numerosas afecciones a través de las distintas vías de administración de fármacos. [Szejtli, J., 1988]

1.3. Solubilidad y Estabilidad del G-1

Diversos estudios han evaluado la solubilidad y estabilidad del G-1, en estado sólido, disuelto en varios disolventes y en presencia de algunos excipientes de uso tradicional en formulaciones farmacéuticas.

El G-1 es muy fácilmente soluble en dimetilformamida, fácilmente soluble en éter etílico, cloroformo, dimetilsulfóxido, acetonitrilo y benceno; soluble en tetracloruro de carbono, poco soluble en metanol absoluto y etanol 90 °GL, difícilmente soluble en etanol 70 °GL y muy difícilmente soluble en agua. [Jorge, E., 1993]

Jorge y col. [Jorge, E., 1993] realizaron un estudio de estabilidad del G-1 materia prima, donde se obtuvo que no sufrió degradación a una exposición de 35 días a condiciones de humedad de 100, 95, 86 y 76 %, además, no se presentaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros evaluados en muestras expuestas durante 91 días a la luz.

Los estudios del comportamiento en disolución, evidencian que el G-1 es inestable en aceite de girasol, etanol absoluto; etanol comercial y 2-propanol, mostrando una mayor estabilidad en alcohol bencílico. [Landry, F., 1990; Jorge, E., 1993] Se ha comprobado que es estable en acetonitrilo y en mezcla de acetonitrilo/agua (80:20 % v/v), durante, al menos, una semana. Existe una fuerte acción de la luz sobre la degradación del G-1 en disolución, lo cual se le atribuye a una interacción específica disolvente / G-1 catalizada por la luz. [Ravin, L.J.]

Molina y Rosada en 1994 en un estudio sobre productos de degradación del G-1 en mezclas de agua y diferentes disolventes a pH ácido, básico y neutro demostraron la rápida degradación del mismo en estas condiciones, con la formación de 5-bromofurfural. [Molina, R y Rosada, A., 1994]

1.4. Componentes del plasma sanguíneo

[<http://enciclopedia.us.es>; <http://www.portalplanetasedna.com.ar>; <http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre>; <http://www.terra.com>]

La sangre está compuesta por muchos tipos de corpúsculos, estos elementos constituyen alrededor de un 45 % de su contenido, lo que se conoce con el nombre de hematocrito. El otro 55 % es plasma sanguíneo, un fluido acuoso, amarillento y salado que conforma el medio líquido de la sangre, en el que se encuentran en suspensión millones de células y que además de transportarlas, también lleva los alimentos y las sustancias de desecho recogidas de las células. El plasma, cuando se coagula la sangre, origina el suero sanguíneo.

[<http://www.terra.com>; <http://enciclopedia.us.es>; <http://www.portalplanetasedna.com.ar>; <http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre>]

El plasma sanguíneo está formado por: agua (96 %), Proteínas plasmáticas (albúmina, fibrinógeno, protrombina y aglutininas), Factores de coagulación de la sangre, Inmunoglobulinas (anticuerpos), hormonas, Otras proteínas (varias), Sustancias inorgánicas (sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato), azúcares, enzimas, lípidos, amoniácidos, productos de degradación como urea y creatinina.

Juntos, plasma y corpúsculos forman un fluido no-newtoniano, cuyas propiedades de flujo son adaptadas únicamente a la arquitectura de los vasos sanguíneos.

1.5. Determinación de los parámetros de desempeño del método analítico [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Skoog, D., 1994; ICH., 2005]

Validación de un método analítico: Es el proceso por el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requerimientos para la aplicación analítica deseada. [Catiñeira Díaz, M., 2002; González San Miguel, H.M., 2002; ICH., 2005]

Existen características de funcionamiento que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina. Dichas características son las siguientes.

Características de practicabilidad: Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Características de idoneidad: Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.

Características de fiabilidad: Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.

1.5.1. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico, es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración (la cantidad) de analito en la muestra. [ICH., 2005]

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta, así como los intervalos o rango de concentraciones del analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona además, con la sensibilidad de calibrado o coeficiente diferencial entre la señal medida y la concentración del analito. Debe definirse la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Fernández, A., 1996]

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre disoluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito. Se debe efectuar un tanteo previo con varios patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer, para así asegurar que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar. Posteriormente se preparan una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes. El número de disoluciones patrón pueden ser de 3 a 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra. [Castro, M., 1989; Calpena, A.C., 1990; Fernández, A., 1996]

Tratamiento estadístico de los datos obtenidos:

Se debe efectuar una interpretación estadística de regresión:

a) Coeficiente de correlación (r)

Refleja el grado de relación entre las variables X (concentración), y Y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte relación entre X e Y, es decir, existe correlación con una probabilidad elevada.

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}} = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}} \quad (1)$$

En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien en el análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990). [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996].

b) Ensayos de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

I. Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f).

El factor de respuesta es la relación existente entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente, por lo que el coeficiente de variación de respuesta

puede tomarse como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5 % indican falta de linealidad. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

$$\text{Factores de respuesta: } f_i = \frac{Y}{X} \quad (2)$$

$$\text{Media de } f: \bar{f} = \frac{\sum f_i}{n} \quad (3)$$

$$\text{Desviación estándar de } f: s_f = \sqrt{\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1}} \quad (4)$$

$$\text{Coeficiente de variación de } f: CV_f = \frac{s_f}{\bar{f}} 100 \quad (5)$$

II. Significación estadística de la varianza de la pendiente b de la recta de regresión.

La pendiente b se llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

La varianza de la pendiente S^2b se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor varianza mejor linealidad. Se determina según:

$$Sb^2 = \frac{S^2Y, X}{\sum (X - \bar{X})^2} = \frac{S^2Y, X}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} \quad (6)$$

Siendo S^2Y, X la varianza del error experimental total, varianza residual o varianza de regresión de Y sobre X.

El valor de S^2Y, X se obtiene mediante las ecuaciones siguientes:

$$S^2Y, X = \frac{\sum (Y - \bar{Y})^2 - \left(\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) \right)^2}{n-2} \bigg/ \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-2} = \frac{\sum Y^2 - a \sum Y - b \sum XY}{n-2} = \frac{\sum (Y - \bar{Y})^2}{n-2} (1-r^2) \quad (7)$$

La desviación estándar o error estándar de la pendiente Sb y la desviación estándar relativa Sb_{rel} (%), también pueden ser empleadas para expresar la linealidad. Sus fórmulas son:

$$Sb = \sqrt{Sb^2} \quad (8)$$

$$Sb_{rel}(\%) = \frac{Sb}{b} 100 \quad (9)$$

Criterio de aceptación $Sb_{rel}(\%) \leq 2\%$.

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión: $b \pm tSb$

siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($p = 0,05$)

Otro test estadístico de b se deduce de la expresión:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{Sb} \quad (10)$$

En la tabla de t se halla el grado de significación para $n-2$ grados de libertad. Hipótesis nula: $b = 0$.

Si $t_{exp} > t_{tab}$ significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

c) Ensayo de proporcionalidad

En el caso ideal el valor de la intercepción con el eje de ordenadas: valor de (a) debe ser cero pues indica el error sistemático del método.

La varianza del término independiente se calcula según:

$$Sa^2 = Sb^2 \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2Y, X}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}} \frac{\sum X^2}{n} = \frac{S^2Y, X}{\sum (X - \bar{X})^2} \frac{\sum X^2}{n} \quad (11)$$

Siendo S^2Y, X la varianza del error experimental total.

La desviación o error estándar del término independiente es:

$$Sa = \sqrt{S_a^2} \quad (12)$$

$$Sa_{rel}(\%) = \frac{Sa}{a} 100 \quad (13)$$

I. Los límites de confianza del término independiente son: $a \pm tSa$

siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida, generalmente $P = 0,05$. Si estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

II. La significación estadística de a se puede deducir también de la expresión:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} \quad (14)$$

En la tabla de t se halla el grado de significación para $n-2$ grados de libertad. Hipótesis nula $a = 0$. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

1.5.2. Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado, o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito, es igual al valor de la pendiente de la curva de calibrado a una concentración determinada. En el caso de una calibración lineal, la pendiente b de la recta de regresión coincide con la sensibilidad de calibrado y con el factor de respuesta. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

La sensibilidad indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones en la concentración del analito.

En un método analítico sensible, ligeros incrementos de concentración conducen a incrementos notables de señal o respuesta.

1.5.3. Valores aceptables de los parámetros de linealidad [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

- a. Expresión de la recta de regresión: $Y = bX + a$
- b. Coeficiente de correlación: $r \geq 0,99$
- c. Prueba de linealidad: $CV_f \leq 5\%$, $Sb_{rel} \leq 2\%$
- d. Prueba de proporcionalidad: $a \pm t.Sa$ debe incluir al cero para $p = 0,05$

1.5.4. Límite de detección y cuantificación [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F. 2001]

La precisión y la exactitud de un ensayo dependen sobre todo de tres factores: la magnitud de la señal del fondo (nivel constante de señal, también denominado línea base), la magnitud de la señal del analito y el nivel de ruido (fluctuación aleatoria indeseable que, dependiendo del tiempo, cambia el registro de la señal).

Estas ideas son cualitativas y raramente se incluyen en la información de los resultados, por lo que se necesitan parámetros cuantitativos de calidad como el límite de detección y cuantificación.

La ICH ha definido el límite de detección y el límite de cuantificación así: [ICH., 2005]

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud. Es un parámetro de ensayo cuantitativo para niveles bajos de compuestos en la muestra, y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

Determinación de los límites de detección y cuantificación:

Se pueden utilizar diferentes procedimientos:

- a) Relación Señal / Ruido.
- b) Estudio de la menor cantidad detectable.
- c) Estimación del límite de detección mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración.
- d) Análisis repetido del blanco de la muestra.
- e) Extrapolación a concentración cero de muestras que contienen baja concentración de analito.

En el análisis repetido de un blanco se analizan una serie de blancos de la muestra ($n \geq 10$) y se calcula la media $\bar{y}_{bl}$ y la desviación estándar s_{bl} de las respuestas obtenidas.

Las fórmulas a utilizar varían en función de:

- El procedimiento: métodos con corrección de lectura frente al blanco o métodos sin corrección.
- El grado de ajuste de la recta de calibración.

- Del número de réplicas que se efectúan.

I) Existe corrección de la lectura frente al blanco (espectrofotometría ultravioleta visible, espectrofluorimetría).

II) No existe corrección de la lectura frente al blanco (cromatografía de gases, cromatografía de alta eficacia).

$$C_L = \frac{\bar{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b} \quad (15)$$

Donde: CL= límite de detección o cuantificación.

K = constante ≥ 3 (K = 3 para límite de detección y K = 10 para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

$\bar{y}_{bl}$ = media de la respuesta de los n blancos.

1.5.5. Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas.

La precisión puede ser considerada a tres niveles: la repetibilidad, la precisión intermedia y reproducibilidad. [ICH., 2005]

Debe investigarse la precisión utilizando muestras homogéneas, auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea se emplean muestras artificialmente preparadas o una disolución de la muestra.

Normalmente, la precisión de un procedimiento analítico se expresa como la variación, desviación normal o coeficiente de variación de una serie de medidas.

- Repetibilidad: expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un corto intervalo de tiempo. También se conoce como precisión de intra-ensayo. [ICH., 2005]

-Precisión intermedia: expresa las variaciones dentro del laboratorio: días diferentes, diferentes analistas, diferentes equipos. [ICH., 2005]

- Reproducibilidad: expresa la precisión entre los laboratorios (estudios colaborativos, normalmente aplicado a la estandarización de metodología). [ICH., 2005]

Expresión de la precisión de un método analítico:

a) Desviación estándar y coeficiente de variación

El valor aceptable de precisión de un método analítico depende de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis. [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

$$\text{Media aritmética: } \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (16)$$

$$\text{Desviación estándar: } s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (17)$$

$$\text{Coeficiente de variación: } CV = \frac{s}{\bar{X}} 100\% \quad (18)$$

La relación entre el coeficiente de variación del método y el coeficiente de variación del sistema es aproximadamente la siguiente: $CV_{\text{método}} = CV_{\text{sistema}} \sqrt{2}$

b) Límites de confianza [Castro, M., 1989; Fernández, A., 1996]

I. De los resultados individuales:

$$\text{- Media más-menos la desviación estándar } (\bar{X} \pm S) \quad (19)$$

$$\text{- Media más-menos dos veces la desviación estándar } (\bar{X} \pm 2S) \quad (20)$$

- Media más-menos la desviación estándar multiplicada por la t de Student

$$(\bar{X} \pm tS) \quad (21)$$

Estadísticamente esta última es la expresión más correcta ya que tiene en cuenta la distribución de Student cuando el número de réplicas es inferior a 30. Estando el valor de t de Student tabulada para $n-1$ grados de libertad y una significación, generalmente, del 95 %.

II. De los resultados promedio:

Los límites de confianza de la media de una serie de resultados son:

$$\bar{X} \pm tS_{\bar{X}} \quad (22)$$

siendo $S_{\bar{X}}$ la desviación estándar de la media $\left(\frac{S}{\sqrt{n}} \right)$

Determinación de la repetibilidad: [ICH., 2005]

La repetibilidad debe evaluarse:

- a) un mínimo de 9 determinaciones que cubren el rango especificado para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones/3 repeticiones de cada uno) o;
- b) un mínimo de 6 determinaciones a 100% de la concentración de la prueba.

Determinación de la precisión intermedia: [ICH., 2005]

La extensión de este ensayo depende de las circunstancias en que se realice el procedimiento analítico. Las variaciones típicas que se puede incluir son: día, analista, equipo, etc. No es necesario estudiar los efectos de estos factores de forma independiente. Puede realizarse a través de un diseño de experimento.

c) Procesamiento de los Datos

La desviación normal, la desviación normal relativa (el coeficiente de variación) y el intervalo de confianza debe informarse para cada tipo de precisión investigado. [ICH., 2005]

1.5.6. Exactitud [ICH., 2005]

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta como un valor verdadero o un valor de la referencia aceptado y el valor hallado. Y puede determinarse a partir del por ciento de recobrado.

1.5.7. Especificidad [ICH., 2005]

Es la capacidad de detectar inequívocamente el analito en presencia de compuestos que pueden estar presentes en la muestra (impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc).

Esto implica en ensayos de identificación asegurar la identidad del analito en cuestión y en ensayos cuantitativos para asegurar que todo el procedimiento

analítico ejecutado brinda una respuesta exacta del contenido del analito en la muestra.

La tendencia mayoritaria es la utilización de métodos relativamente específicos (cromatografía líquida y de gases) en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados.

La especificidad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias.

1.6. Fundamento teórico de la Dispersión en Matriz Sólida (MSPD) ^[Technical Note ¹¹¹]

Argonaut Technologies. Inc. 2002]

La extracción convencional de analitos orgánicos comienza generalmente con la precipitación de proteínas usando ácido tricloacético (TCA), luego se centrifuga, se toma el sobrenadante, se hacen sucesivas extracciones líquido-líquido y se concentra el extracto para luego analizar por el método analítico adecuado. Esta metodología requiere mucha manipulación de la muestra, volviéndose larga y engorrosa de forma tal que puede traer consigo pérdidas considerables de analito, además de requerir una cantidad relativamente grande de muestra y el consumo de disolvente es alto, por lo que se prefiere la utilización de un método que supere estas desventajas, este es el caso de la dispersión en matriz sólida (MSPD).

La Dispersión en Matriz Sólida (MSPD) es una técnica de preparación de muestras para el uso con matrices sólidas. Primero fue desarrollada para extraer residuos veterinarios de matrices biológicas complejas tales como hígado, músculo y carne pero un trabajo más reciente ha demostrado la aplicabilidad de la técnica para extraer analitos orgánicos tales como drogas, esteroides y pesticidas de otros tipos de matrices.

Es una técnica de extracción a microescala, usando típicamente menos que 1g de la muestra y de bajos volúmenes de disolventes, su aplicación implica primeramente la homogenización de una cantidad pequeña de la muestra con el adsorbente (sílica gel, C-8, C-18) en un mortero con pistilo. Las fuerzas mecánicas producen en el proceso de molienda la ruptura de la estructura del tejido, dispersando la muestra

sobre la superficie del material adsorbente con la ayuda de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. El proceso hace que la mezcla llegue a ser de flujo libre y homogéneo, lo cual permite obtener recuperaciones más altas y más reproductivas. Esta mezcla entonces se embala en una columna o cartucho, si es necesario se realizan lavados para eliminar las posibles interferencias utilizando disolventes adecuados y luego se procede a la elución de los analitos. Si se desea se puede utilizar un émbolo que se coloca adentro, en la tapa, para aplicar presión y acelerar la salida del lavado y (o) eluato.

Pre-tratamiento de la muestra:

La cantidad típica de muestra que se usa es 0,5 g, sin embargo, la concentración prevista del analito y los límites de detección de la técnica analítica se deben considerar durante el desarrollo del método. La muestra se debe colocar en un mortero de cristal, y el adsorbente es agregado en proporción 1:4. La mezcla se debe realizar suavemente en el mortero hasta un polvo liso, seco, homogéneo y de flujo libre, luego se transfiere a un depósito vacío (jeringuilla-barril) que contiene una frita inferior, se golpea ligeramente el depósito (verticalmente y horizontalmente) para que el polvo quede lo más empaquetado posible y se inserta una frita superior comprimiéndola suavemente.

Elución de interferencias:

El propósito de la elución de interferencias es quitar selectivamente compuestos indeseados sin el enjuague de los analitos. Los disolventes típicos de elución de interferencias son agua desionizada, o almacenadores intermediarios que contengan metanol o acetonitrilo, los cuales son conveniente para interferencias lipofílicas. En sentido general, según la composición de la matriz utilizada así será la variedad de disolventes a emplear.

El volumen de disolvente para el lavado puede aminorarse, e incluso obviarse con el uso de una co-columna compuesta por un material que tenga afinidad por los elementos obstaculizantes contenidos en la matriz biológica, de forma tal que cuando se proceda a la elución del analito el eluato contenga, en el mejor de los casos, ninguna interferencia o de lo contrario haya que aplicar menos lavados y la disolución quede lo más limpia posible. Esta co-columna se coloca en la parte inferior

del cartucho o columna, encima se coloca una frita y posteriormente se añade la muestra homogenizada con el material adsorbente seguida por otra frita en la parte superior.

Elución del analito:

El disolvente de elución debe ser uno en el cual los analitos son solubles y debe también ser compatible con la técnica final del análisis. Por ejemplo, para un análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), un disolvente similar a la fase móvil es una buena opción y un disolvente volátil se selecciona generalmente para el análisis subsecuente en cromatografía gaseosa. Los disolventes típicos de elución son metanol, acetona, diclorometano, acetonitrilo u otros disolventes o mezclas de disolventes. Si el disolvente usado para la elución es inadecuado para el análisis por GC, HPLC u otra técnica, puede ser evaporado al estado seco después de la elución y ser sustituido por un disolvente más apropiado. El procedimiento antes dicho se puede variar para satisfacer necesidades individuales.

Seguidamente se muestran los pasos a seguir para la aplicación de la técnica de MSPD:

The Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) process

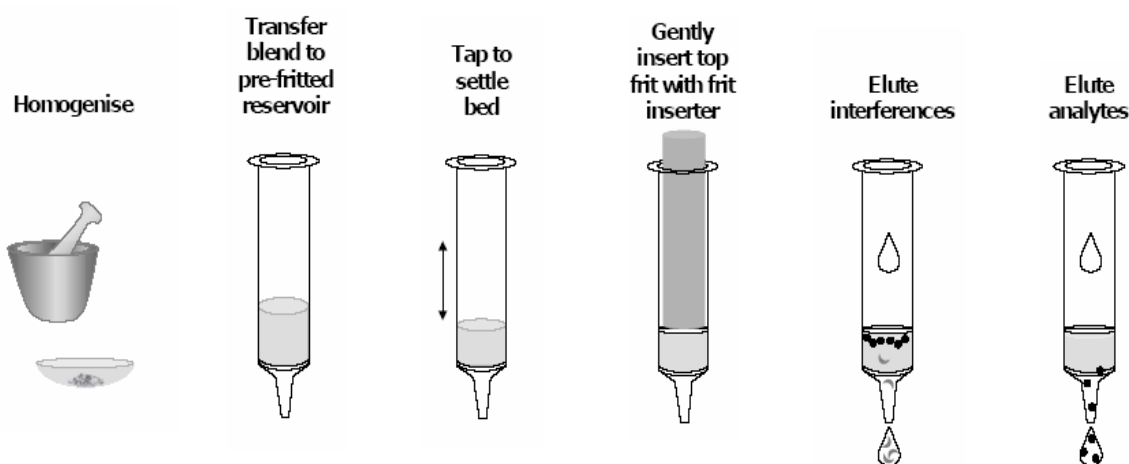


Figura 2. Esquema que representa los pasos de la técnica de MSPD).

1.7. Cromatografía. Generalidades [Rubinson, K.A & Rubinson, J.F., 2001]

La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia. La separación se consigue a través de una gran variedad de técnicas

cuyas bases moleculares tienen diferencias muy diversas. Se pueden separar moléculas en función de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, sus constantes de ionización o en función de la disposición de sus enlaces. Como resultado, hay una gran cantidad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia, la cual tiene lugar en gases, líquidos y fluidos supercríticos.

Las técnicas cromatográficas se fundamentan en el empleo de una columna de cromatografía consistente en un tubo relleno con un material sólido sobre cuya superficie se enlazan las moléculas, conocido como soporte sólido, sorbente, fase estática, materia empaquetada o fase estacionaria. La muestra se introduce en una fase fluida en movimiento –un líquido o gas- denominada fase móvil. La fase móvil transporta la muestra a través de la fase estacionaria proporcionando la separación. Las interacciones químicas tienen lugar en la superficie de la fase estacionaria con la misma superficie del soporte sólido, con líquidos que estén en contacto con esa superficie o con moléculas enlazadas a dicha superficie.

En los análisis modernos es posible detectar los componentes separados midiendo los cambios que se producen en una serie de diferentes propiedades físicas o químicas: conducción de corriente eléctrica, absorción de luz y habilidad para conducir el calor, por citar sólo algunos. Para esto se utiliza el detector.

El detector registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasa por él. (El cambio sucede a medida que cada componente llega, fluye a través de la columna y pasa por el detector). Estos cambios son producidos en forma de gráfica observándose la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo. Esta gráfica que recoge la respuesta del detector en función del tiempo se denomina cromatograma.

La gran aplicabilidad de los métodos cromatográficos se debe a la amplia variedad de condiciones que pueden utilizarse para separar los componentes de una sustancia. Se pueden utilizar distintas fases móviles (gases, líquidos o fluidos supercríticos) y distintas fases estacionarias (mineral, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos).

En cromatografía la separación de una sustancia tiene lugar en gases, líquidos o fluidos supercríticos, de ahí la denominación de cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida (LC) y cromatografía de fluido supercrítico (SFC), respectivamente.

1.7.1. Fundamento teórico de la Cromatografía Gaseosa [Cela R., 2002; Robinson, K.A., 2000]

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que la fase móvil es un gas; comúnmente se emplean helio y nitrógeno, mientras que la fase estacionaria, contenida en una columna, es un sólido o un líquido impregnado en un soporte sólido inerte, o una película líquida que recubre uniformemente las paredes de la columna, en ella se produce la separación de los solutos.

Cuando la fase estacionaria es de baja polaridad la separación se produce en base a la volatilidad relativa de los compuestos, la cual está en función de la temperatura de ebullición y ésta a su vez está en correspondencia con la masa molecular y la distribución espacial de la molécula. Para la obtención del cromatograma se hace indispensable la utilización de detectores.

La Cromatografía de Gases es el método de elección para la separación de sustancias volátiles y térmicamente estables. Este campo de aplicación involucra un enorme número de sustancias orgánicas y organometálicas, así como gases permanentes, lo cual convierte a la técnica en una de las más versátiles y potentes en el laboratorio analítico.

Ninguna otra técnica de separación es capaz de proporcionar una resolución equivalente y a la vez, una sensibilidad tan elevada. Esto significa que, en realidad, la principal limitación de la técnica está en la estabilidad térmica de los componentes de la mezcla o de la propia matriz.

La cromatografía de gases ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación de ingredientes farmacéuticos activos, tal es el caso, del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1); [Bravo, L., 1999] el cual puede ser cuantificado por Cromatografía de Gases usando nitrógeno como gas portador, columna de vidrio de 1 metro de longitud y 4 mm de diámetro interno, relleno de 6% de silicona GE SE-30 sobre Chromosorb W/HMDS de 80 a 100 mallas y detector por captura electrónica.

1.7.1.1. Clasificación de la cromatografía de gases según la naturaleza de las fases involucradas

1-La cromatografía gas-sólido (GSC)

2-La cromatografía gas-líquido (GLC) (esta es la variante más frecuentemente utilizada y se suele llamar simplemente cromatografía de gases).

1.7.1.2. Instrumentación [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

La cromatografía de gases se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno) y el detector.

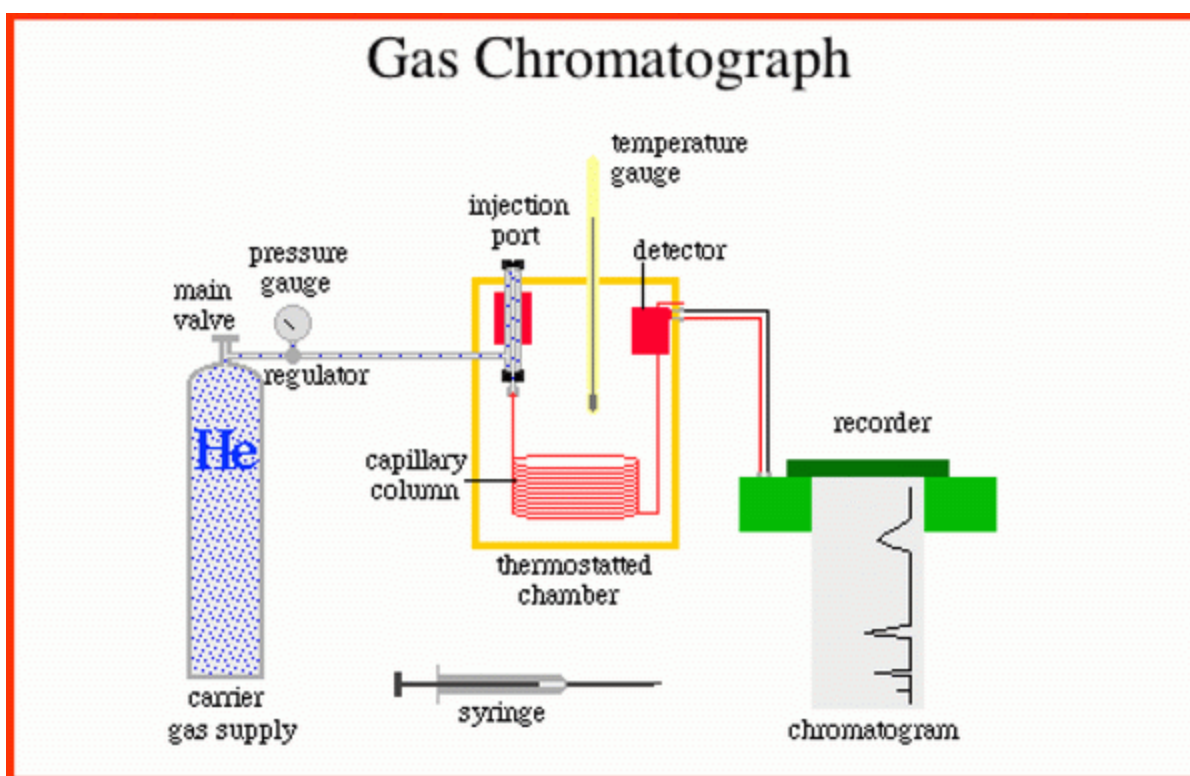


Figura 3. Diagrama de un cromatógrafo de gases.

1.7.1.3. Sistema de inyección de muestra [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

La inyección de muestra es un apartado crítico, se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de

vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona llamado septa o septum.

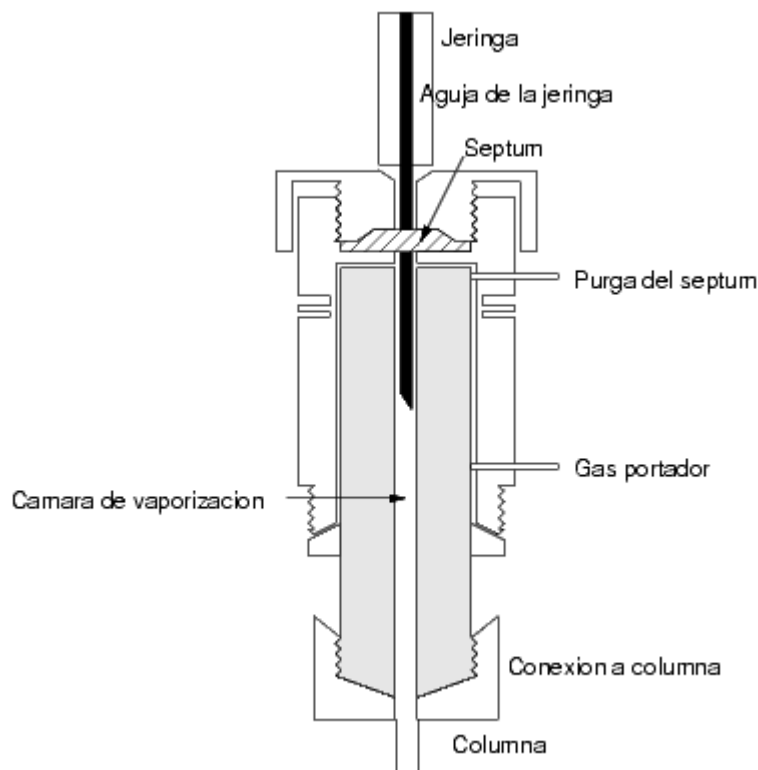


Figura 4. Inyector de muestra para un Cromatógrafo de gases (GC).

1.7.1.4. Columna [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

La columna es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo. En la cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes en la actualidad (2005) debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 50 metros. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio ó teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

1.7.1.4.1. Tipos de columnas

Columnas de relleno

Las columnas de relleno consisten en unos tubos de vidrio, metal (inerte a ser posible como el acero inoxidable, cobre o aluminio) o teflón, de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros, típicamente de 2 a 4. El interior se rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción y recubierto con una capa de espesores entre 50 nm y 1 μm . Para que puedan introducirse en el horno, se enrollan convenientemente.

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionar la fase estacionaria y el analito. La superficie específica mínima ha de ser de 1 m^2/g . Como todos los componentes de columnas para la cromatografía de gases, debe ser inerte a altas temperaturas (400 $^{\circ}\text{C}$) y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria durante el proceso de fabricación. El material preferido actualmente (2005) es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural.

Columnas capilares

Las columnas capilares son normalmente con un diámetro pequeño en la que o bien la pared interior del tubo o bien un sólido activo o un líquido inmovilizado en la pared del tubo actúan como fase estacionaria de modo que existe un paso abierto, sin restricciones, para la fase móvil.

Tipos de columnas capilares

- Columnas capilares de paredes impregnadas (WCOT).
- Columnas capilares con soporte impregnado (SCOT) o de capa porosa (PLOT).
- Columnas capilares de sílice fundida (FSOT)

Las columnas WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase estacionaria. Se fabrican a partir de sílice fundida, conocidas como columnas tubulares abiertas de sílice fundida o FSOT. Estas columnas se fabrican a partir de sílice especialmente pura, sin apenas contenido de óxidos metálicos. Debido a la fragilidad inherente a este material, en el mismo proceso de obtención del tubo se recubre con una capa de poliimida, de esta

forma la columna puede enrollarse con un diámetro de unos pocos centímetros. Estas columnas, con propiedades como baja reactividad, resistencia física y flexibilidad, han sustituido a las WCOT clásicas.

Las columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material adsorbente como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se ha adherido la fase estacionaria. Las ventajas de las SCOT frente a las WCOT es la mayor capacidad de carga de esta última, ya que en su fabricación se emplean mayores cantidades de fase estacionaria, al ser la superficie de intercambio mayor. Por orden de eficacia, en primer lugar están las WCOT, luego las SCOT y por último las columnas de relleno.

Las columnas FSOT tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320 μm (para columnas normales) y 150-200 μm para columnas de alta resolución. Estas últimas requieren menor cantidad de analito y un detector más sensible, al eluir menor cantidad de gas. Existen asimismo columnas macrocapilares con diámetros de hasta 530 μm , que admiten cantidades de analito comparables a las de relleno pero con mejores prestaciones.

1.7.1.4.2. Factores que Afectan la Eficiencia de una Columna

- Longitud de la Columna
- Diámetro de la Columna (1/4", 1/8", 1/16" de diámetro externo)
- Tamaño de las partículas del relleno
- Naturaleza de las fases
- Cantidad de fase estacionaria
- Temperatura de la columna
- Velocidad del gas portador
- Cantidad de muestra inyectada
- Material del cual está elaborada la columna
- Enrollado de la columna

1.7.1.5. La fase estacionaria

La fase estacionaria en cromatografía de gas juega un papel protagonista puesto que la fase móvil es prácticamente inerte. En la cromatografía de gas-sólido la retención de los solutos sobre la fase estacionaria se produce mediante mecanismos de adsorción sobre la superficie de las partículas que forman el relleno de la columna y en el momento actual resume sus aplicaciones a la separación de gases permanentes e hidrocarburos ligeros o compuestos de bajo punto de ebullición (formaldehído y metanol) y los materiales más usados como adsorbentes son: gel de sílice, alúmina, carbón activado, Tamices moleculares (carbón grafetizado), Carbón microparticulados esférico y zeolitas, Sales inorgánicas

La selección del material se establece dependiendo de la polaridad de las moléculas a separar. Para solutos muy polares, se emplean fases poco absorbentes. Cuando hay que separar moléculas polarizables se emplean fases más absorbentes y también polarizables (por ejemplo, carbón activo), mientras que para moléculas no polares se emplean las fases más absorbentes (por ejemplo, gel de sílice, en la separación de mezclas etileno, etano, dióxido carbono).

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

- Características de reparto (factor de capacidad κ' y factor de selectividad α) adecuados al analito.
- Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.
- Baja reactividad.
- Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elusión.

Existen como mucho una docena de disolventes con estas características. Para elegir uno, debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria. Algunas fases estacionarias utilizadas actualmente (2005) son:

- Polidimetilsiloxano, fase no polar de uso general para hidrocarburos, aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCBs.

- Poli(fenilmetildifenil)siloxano (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcaloides, drogas y compuestos halogenados.
- Poli(fenilmetil)siloxano (50% fenilo), para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.
- Poli(trifluoropropildimetil)siloxano, para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituidos.
- Polietilenglicol, sirve para compuestos polares, también para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales.
- Poli(dicianoalildimetil)siloxano, para ácidos grasos poliinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un peróxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres que tiene como resultado la formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica.

1.7.1.6. Detectores [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

Un detector es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica. Se puede expresar que el detector son los “ojos” de un cromatógrafo.

El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

En cromatografía un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico ó integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes.

1.7.1.6.1. Detectores más usados en Cromatografía de Gases [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

- Detector de Conductividad Térmica. Mide la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de sustancias eluidas.
- Detector de Ionización de Llama. Basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de sustancias eluidas.
- Detector de Captura Electrónica. Basado en la electronegatividad de las sustancias eluidas, y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones.
- Detector de Fotometría de Llama. Basada en la medida de la intensidad de la emisión molecular de la fluorescencia de heteroátomos en las moléculas orgánicas.
- Detector de Ionización de Llama Alcalina.
- Detector de Espectrometría de Masas.
- Otros.

1.7.1.6.2. Detector de Captura Electrónica [Rubinson, K .A; Rubinson, J.F., 2001]

El detector de captura electrónica consiste en una cavidad que contienen dos electrodos y una fuente de radiación. Las colisiones entre los electrones (emisión B) emitidos por la fuente de ^{63}Ni o ^3H y el gas portador (metano más argón o más nitrógeno), producen un plasma que contienen electrones e iones positivos y estos electrones son atraídos hacia el ánodo. Cuando pasa por el detector un compuesto que contiene átomos electronegativos, algunos de los electrones serán (capturados), produciendo iones negativos y la corriente de electrones hacia el ánodo disminuirá. El primer detector de captura electrónica utilizaba una fuente de CC con un potencial constante, pero los instrumentos modernos utilizan pequeños pulsos para atraer a los electrones. Estos pulsos son lo suficientemente largos como para recoger los electrones más móviles, pero no los iones más pesados y lentos. Este método produce una distribución más uniforme de iones en plasma, lo que por otro lado,

desencadena una respuesta más estable y un intervalo lineal mayor. La manera más normal de utilizar estos pulsos es definir una corriente constante que se mantenga y después un circuito de realimentación ajusta la frecuencia de los pulsos para mantener la corriente deseada.

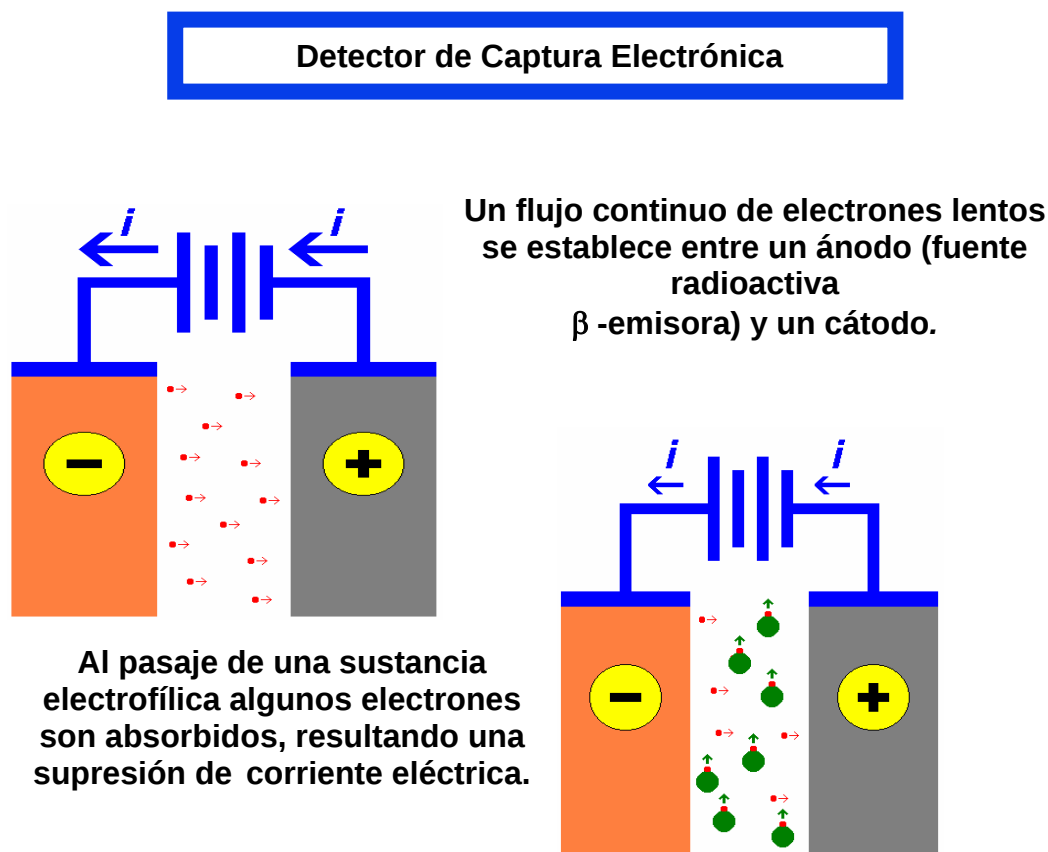


Figura 5: Principio de funcionamiento del detector de captura electrónica.

Los factores de respuesta de un detector de captura electrónica son función del tipo y del número de átomos electronegativos que existen en una molécula determinada. Por ejemplo, la respuesta para un compuesto orgánico policlonado como los que se encuentran en los pesticidas puede llegar a ser un millón de veces más grande que la de un hidrocarburo. De hecho la selectividad y sensibilidad de un detector de captura electrónica es ideal para el análisis de muestra que contienen trazas de estos compuestos.

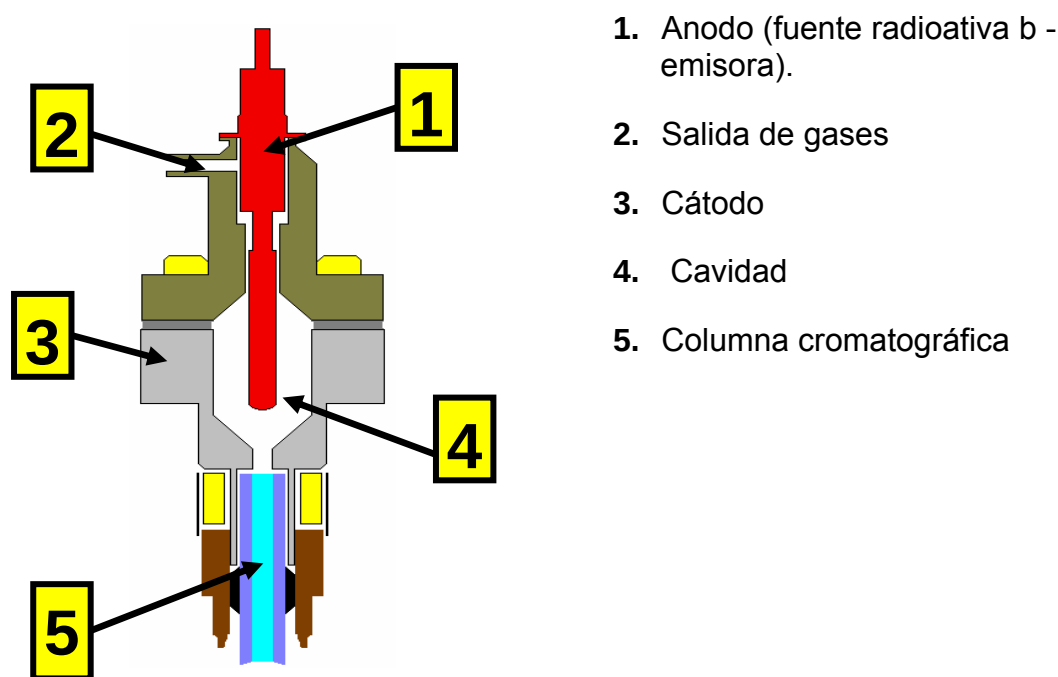


Figura 6: Esquema del detector de captura electrónica.

1.7.1.7. Aplicaciones de la Cromatografía de gases [SKoog, D.A Y Leary, J.J., 1994]

La cromatografía de gases tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para resolver (separar) mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.

1.8. Antecedentes sobre la utilización de la Dispersión en Matriz Sólida en muestras diversas

La combinación de la dispersión en matriz sólida (MSPD) y la cromatografía para la cuantificación de analitos en matrices complejas ha sido ampliamente utilizada en los

últimos años. Tanto la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como la cromatografía de gases (CG) han visto ampliadas sus utilidades.

La combinación de MSPD y HPLC se ha aplicado en diversos tipos de matrices y para disímiles analitos.

McGrane, M; O'Keeffe, M y Smyth, M analizaron 5 penicilinas en leche. [McGrane, M y Col., 1998] Otros antibióticos como macrólidos y lincomicina han sido determinados en leche y yogurt. [Bogialli, S y Col., 2007] En el año 2007 se detectaron y cuantificaron 6 sulfonamidas en carne de cerdo y pollo. [Kunihiro, K., 2007] Arribas, A y colaboradores analizaron herbicidas en papas. [Arribas y Col., 2007] En el año 2006 se determinaron 4 herbicidas (simazine, atrazine, diuron y terbutylazine) en aceite de oliva. [García – Reyes, JF y Col., 2006] También en frutas (manzanas, naranjas, plátano, lechuga, uva y tomate) hay reportes de determinación de residuos de fungicidas. [Wang, S; Xu, Y; Pan, C; Jiang, S; Liu, F., 2006] En sebo de carne y pollo Furusawa, N llevó a cabo la separación de dichloro – diphenyl – trichloroethanes que son contaminantes de estas matrices. [Furusawa, N., 2006] Otros autores realizaron el aislamiento y purificación de compuestos del phenolic (ácido benzoico) en muestras naturales de melissa officinalis. [Karasová, G., 2006] En el año 2005 Ruiz determinó microcystins (MCs)-MC-LR en hígado o riñón. [Ruiz, M., 2005] En ocasiones se compara más de una técnica de extracción, como es el caso de la determinación simultánea de imidacloprid 6 – chloronicotinic ácido, carbaryl, sulfoxide del aldicarb y sulfone del aldicarb en las abejas melíferas por las técnicas de MSPD y LLE (extracción líquido-líquido) donde se llegó a la conclusión que la técnica MSPD mostró recuperaciones más altas y mayor sensibilidad que la de LLE para la mayoría de los pesticidas menos para el carbaryl. [Tutti, S., 2006]

La combinación de MSPD y CG también se ha aplicado en diversos tipos de matrices y para disímiles analitos.

Li-Bin, L y colaboradores determinaron pesticidas en comidas (papas, zanahorias, manzanas, naranjas, pepinos y arroz) al igual que Dórea, H.S Y Lima Sobrinho. [Li-Bin, L y Col., 2007; Dorea, H.S y Lima Sobrinho., 2004] Otros investigadores en el año 2003 emplearon la metodología en nueces. [Husain, S.W y Col., 2003] Valsamaki, V.I; Boti, V.I; Sakkas, V.A; Triantafyllos, A aplicaron estas técnicas para determinar 20 pesticidas del organochlorine y 8 congéneres de PCB en los huevos del pollo. [Valsamaki, V.I y Col., 2006] En muestras biológicas que contenían grasa Martínez y colaboradores utilizaron esta

combinación para determinar 6 ésteres de diphenyls de polybrominated (PBDES) y 7 diphenyls del polychlorinated (PCBS). [Martínez, A y Col., 2005]

Gizaand, I y Sztwiertnia, U determinaron azoxytrobin y trifoxytrobin en pulpa de manzanas. [Gizaand, I y Sztwiertnia, U., 2003]

Todos emplearon la detección por captura electrónica. La detección por espectrometría de masas es también muy empleada en estos casos.

Ferrer, C; Gómez, MJ; García-Reyes, JF; Ferrer, I; Thurman, EM; Fernández-Alba, AR, determinaron 12 pesticidas que pueden encontrarse en aceite de oliva y aceitunas haciendo uso de la misma técnica MSPD y emplearon dos métodos el de GC-MS y LC-MS, obteniendo los mejores resultados con GC-MS. [Ferrer, C y Col., 2005] En el año 2005 se determinaron 266 pesticidas del jugo de manzana, utilizando la técnica MSPD y el método GC-MSD. [Chu, X; Hu, X; Yao, H., 2005] Lehotay, SJ; Mastovská, K; Yun, SJ, determinaron 32 pesticidas que representan una gama amplia de propiedades del physicochemical en leche, huevos y aguacate, ellos utilizaron dos técnicas, la QuEChERS y la MSPD y dos métodos de análisis: cromatografía de gases y cromatografía líquida, compararon las dos técnicas y llegaron a la conclusión que la mejor es la de dispersión en matriz sólida. [Lehotay, S.J; Mastovska, K; Yun, S.J., 2005]

La MSPD ha demostrado ser aplicable al aislamiento de drogas, pesticidas y otros contaminantes de los tejidos animales, frutas y verduras, en unión de técnicas separativas como la cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficacia. En estos casos los detectores más ampliamente utilizados son captura electrónica para cromatografía de gases y espectrometría de masas tanto para cromatografía líquida como gaseosa.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

2.1. Equipamiento

- Balanza analítica Sartorius BP121S, máx. 120 g, d = 0,1 mg.
- Baño ultrasónico Sonorex, modelo RK 52.
- Cromatógrafo de Gases DANI GC1000, con inyector split/splitless, detector de Captura electrónica y columna capilar VB-5 (5% Fenil) metipolisiloxano, Valcobond®, de 30 m de longitud, 0,53 mm de diámetro interno y 1,5 micras de espesor de película de fase estacionaria.
- Generador de Nitrógeno (fase móvil). Domnick hunter, (Dukesway, Team Valley Trading Estate, England). presión máxima: 145 psi.

2.2. Reactivos y disolventes

- G-1 muestra de referencia, lote 03-3-34 (Anexo 1) y G-1 lote 03-3-13 (Anexo 2). Suministrados por el Laboratorio de Control de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas.
- Silicagel. Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,040 mm, Merck.
- Fase estacionaria C-18 (encapad). Tamaño de partícula 0,015 mm – 0,035 mm, Fluka.
- Acetonitrilo para HPLC, Panreac.
- Agua destilada y desionizada.
- n-hexano para cromatografía, Merck.
- Plasma humano. Suministrado por el Banco de Sangre Provincial de Villa Clara (Anexo 3).
- Muestras puras de G-0, UC-244, UC-245, obtenidos en el Laboratorio de Síntesis del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central de Las Villas.
- Benzoato de Bencilo p.a. de Merck.

2.3. Materiales e Instrumental

- Mortero de ágata, 6 cm de diámetro con pistilo de ágata.

- Jeringuillas plásticas de 10,0 mL.
- Matrices y pipetas verificadas.
- Micropipeta Eppendorf de 20 μ L - 200 μ L y de 100 -1000 μ L.
- Microjeringuilla Hamilton de 10 μ L.

2.4. Técnicas

2.4.1. Procedimiento de extracción mediante MSPD

Se siguió el procedimiento descrito en el trabajo de diploma “Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de G-1 en plasma humano” de Dairemis Estévez, año 2006. [Estévez, D., 2006]

A 0,5 mL de plasma humano se adicionaron 20 μ L de una disolución de G-1 de 1000 mg/L en acetonitrilo y 0,5 mL de Benzoato de Bencilo 5550 mg/L en acetonitrilo que es el estándar interno. La muestra resultante se mezcló en el mortero de ágata con 1 g de fase C-18 (sílice modificada) hasta obtener un polvo con suficiente fluidez para conformar la columna (cartucho) de MSPD. Previamente se conformó una co-columna en la porción inferior del cartucho, adicionando 1 g de sílicagel. Finalmente se eluyó con dos porciones de 4 ml de n-henaxo que se combinaron en un matraz de 10 mL y se llevó a volumen con el mismo disolvente, constituyendo esta la disolución de medida.

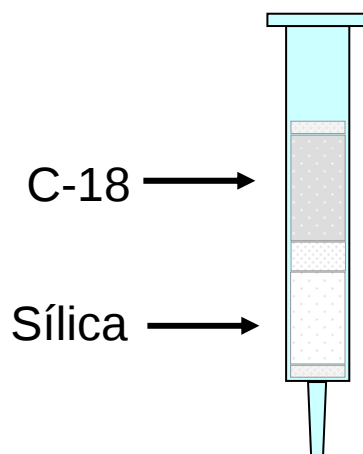


Figura 7: Esquema del cartucho para la extracción empleando MSPD.

2.4.2. Cromatografía de gases y detección por captura electrónica (GC-ECD)

2.4.2.1. Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector

Se utilizaron las temperaturas de trabajo descritas en el procedimiento 02.4.301, “G-1 puro. Determinación de la pureza por Cromatografía de Gases”, vigente en el Laboratorio de Control de Calidad del CBQ: Temperatura del horno 200 °C, Inyector 230 °C y detector, 280 °C. [Bravo, L., 2006]

2.4.2.2. Selección del flujo de fase móvil

Se inyectaron disoluciones de G-1 muestra de referencia utilizando flujos de fase móvil (Nitrógeno) de 0,3; 0,5; 0,7 y 1 mL/min. Se calculó en cada caso el número de platos teóricos (N) en base al pico del G-1 utilizando la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2 \quad \text{donde } tr \text{ es el tiempo de retención y } W \text{ el ancho de la base del pico.}$$

2.4.2.3. Volumen de inyección

En todos los casos se inyectó manualmente, modo splitless, un volumen de muestra de 1 µL y se realizó la corrección de los errores asociados a la inyección manual mediante el uso de un estándar interno.

2.4.2.4. Selección del estándar interno

Se inyectaron disoluciones patrón de diferentes compuestos, con estructura semejante a la del G-1 y con propiedades en dicha estructura que garanticen una respuesta apropiada al utilizarse el detector de captura electrónica. Se incluyeron en este análisis los compuestos denominados G-0, UC-244, UC-245 y Benzoato de Bencilo. En todos los casos se evaluó la medida en que cada uno cumple los requisitos exigidos para un estándar interno.

2.5. Validación

2.5.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC))

Se preparó un blanco con la misma composición de las muestras estudiadas excepto en lo referente a la adición de G-1 y se siguieron todos los pasos en la confección y elución del cartucho.

Se realizaron tres inyecciones de este blanco por GC-ECD y se integraron los picos.

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se procedió según:

$$C_L = \frac{\bar{Y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b}$$

Donde:

C_L = límite de detección o cuantificación.

K = constante ≥ 3 ($K = 3$ para límite de detección y $K = 10$ para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

$\bar{Y}_{bl}$ = media de la respuesta de los n blancos.

2.5.2. Linealidad

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 mg/L y 8 mg/L, con valores intermedios de 2; 4; 5 y 6 mg/L.

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales y siguiendo la metodología ICH [ICH., 2005] se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación lineal (r), y se realizaron los test de student para intercepto y pendiente así como el Análisis de Varianza para comprobar la bondad de ajuste. Los criterios para la evaluación de la regresión lineal son:

- Ecuación de la recta: $y = a.x + b$
- Coeficiente de correlación. $r > 0,999$
- t-test para el intercepto: $t_{cal} < t_{tab}$ para $\alpha = 0,05$ y $n-2$ grados de libertad.
- t-test para la pendiente: $t_{cal} > t_{tab}$ para $\alpha = 0,05$ y $n-2$ grados de libertad.
- ANOVA para la bondad de ajuste: $F_{cal} < F_{tab}$ (0,05 y n_1, n_2).

- Coeficiente de calidad: $QC \leq 2,5 \%$

$$QC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i - \hat{y}}{\hat{y}} \right)^2}{n-1}} * 100$$

2.5.3. Precisión

2.5.3.1. Repetibilidad de instrumental

Se inyectaron 6 réplicas de una disolución patrón de G-1 a 2 mg/L con estándar interno en n-hexano. Se calculó la media de la respuesta, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

2.5.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración

Se analizaron tres muestras a 1, 2 y 6 mg/L (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración) con tres réplicas en cada caso. Se calculó el CV por grupo y el CV total. Se compararon las varianzas entre los grupos mediante un análisis de varianza .

Criterios de evaluación: Si en el ANOVA $F_{cal} < F_{tab}$, puede concluirse que desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre las varianzas a los diferentes niveles de concentración.

2.5.3.3. Precisión intermedia

Se analizaron tres muestras a la concentración de 2 mg/L en tres días sucesivos. Se calculó el coeficiente de variación por día y el global. Se compararon las medias y las varianzas entre los grupos.

Criterios de evaluación: Si en el ANOVA $F_{cal} < F_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y 2,6 grados de libertad, puede concluirse que desde el punto de vista estadístico no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos a los diferentes días.

2.5.4. Exactitud

Se calculó el por ciento de recuperación para una muestra de plasma humano, a la que se adicionó G-1 muestra de referencia a una concentración de 2 mg/L y fue sometida al proceso de extracción por MSPD descrito anteriormente. Se determinó el contenido de G-1 por el mismo método de GC-ECD.

2.5.5. Selectividad

Se compararon los cromatogramas de una disolución de G-1, muestra de referencia, con los de las muestras de plasma conteniendo G-1 y de blancos preparados con la matriz de las muestras sin adición de G-1. Se observó si aparecía algún pico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al G-1.

2.6. Procesamiento estadístico de los datos.

Se utilizaron los programas Statgraphics Plus for Windows 4.1, Professional Version, 1999 y Microsoft® Office Excel 2003.

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

3.1. Procedimiento de extracción mediante MSPD

Según se especifica en Materiales y Métodos, para la extracción de las muestras de plasma con adición de G-1 mediante MSPD se siguió unos de los procedimientos descritos en el trabajo de diploma “Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la determinación de G-1 en plasma humano” de Dairemis Estévez, año 2006.

[Estévez, D., 2006]

Como la detección por captura electrónica en cromatografía de gases no permite el análisis de muestras cuya matriz sea acuosa, ni de disoluciones preparadas en disolventes con átomos electroatrayentes en su estructura, para la extracciones mediante MSPD se utilizó la variante en que la muestra (0,5 mL de plasma al que se adicionó una cantidad conocida de G-1) se dispersa en un gramo de fase C-18, al tiempo que se conforma una co-columna de silicagel en el cartucho de extracción para retener posibles interferencias polares contenidas en la matriz. La elución del G-1 desde el cartucho se hace con n-hexano.

En ensayos preliminares con muestras tipo se confirmó lo que ya había sido demostrado previamente [Estévez, D., 2006] respecto a la capacidad de la co-columna de silicagel para retener interferencias polares. Este hecho, unido al limitado poder de elución del n-hexano para desorber dichas interferencias, permite obtener un eluato relativamente limpio que, según se demostró, puede inyectarse directamente en el sistema de cromatografía de gases con detección por captura electrónica.

3.2. Selección del flujo de fase móvil

Es conocido que según las teorías básicas de la cromatografía, la eficacia de un sistema, expresada en términos de número de platos teóricos (N) depende del tiempo de contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria, el cual, a su vez, depende del caudal de la fase móvil. Por esa razón, los estudios de eficacia generalmente se realizan determinando “N” o la altura equivalente de plato (H) como una función del flujo de fase móvil.

En el caso de la determinación de G-1 mediante GC-ECD con columna capilar, para la determinación del flujo adecuado se ensayaron varios valores de caudal de fase móvil, tomando como referencia inicial el flujo de 1 mL/min que es el valor más frecuentemente recomendado cuando se trabaja con este tipo de columnas.

Según se describe en la Tabla 1, la disminución sucesiva del flujo originó un incremento marcado de N para el pico correspondiente al G-1, con el consiguiente aumento del tiempo de retención. Un comportamiento similar se aprecia para el Benzoato de Bencilo que se utilizó como estándar interno.

Tabla 1. Comportamiento de la eficacia del sistema cromatográfico a diferentes flujos de fase móvil.

Benzoato de Bencilo				G-1		
Flujo (mL/min)	Tiempo de retención	Ancho pico (min)	Eficacia (N)	Tiempo de retención	Ancho pico (min)	Eficacia (N)
0,3	6,007	0,321	4935	4,977	0,349	3058
0,5	3,973	0,26	4073	3,320	0,297	2186
0,7	3,100	0,263	2206	2,583	0,28	1663
1,0	2,407	0,219	1897	2,013	0,278	882

Para ambas señales, al pasar de valores de flujo de 0,5 mL/min a 0,3 mL/min, el aumento de la eficacia es comparativamente menos marcado que el incremento en los tiempos de retención, además de que se observa un ligero crecimiento del ancho de la base de los picos. Por estas razones se escogió el valor de 0,5 mL/min, con el que se consigue un balance adecuado entre eficacia y tiempo de análisis.

3.3. Selección del estándar interno

Como es ampliamente conocido, en los sistemas cromatográficos que no cuentan con un inyector automático se hace necesario utilizar un estándar interno para corregir los errores asociados a la inyección manual. También en los casos en que el análisis vaya precedido de un proceso de extracción, suele adicionarse el estándar interno desde el comienzo de la extracción para estimar las pérdidas de analitos debido a la manipulación de la muestra.

Para que una sustancia pueda ser usada como estándar interno debe cumplir los siguientes requisitos. [Cela, R., 2002]

- La sustancia no debe estar presente en la muestra.

- Debe resolverse correctamente ($R \geq 1,5$), con respecto a cualquiera de los componentes de la muestra.
- Resultar retenida en el sistema de manera similar a las especies con respecto a las cuales será utilizada como patrón interno,
- No contener impurezas.
- No reaccionar con ninguno de los componentes de la muestra ni alterarse por la matriz de las mismas.

Como se ha explicado antes en Materiales y Métodos, los compuestos ensayados con este fin fueron el G-0, el UC-244, el UC-245 y el benzoato de bencilo.

Los dos primeros fueron descartados debido a tener, bajo las condiciones de análisis utilizadas, un comportamiento de retención muy diferente al del G-1. Además, al no contarse con muestras de referencia certificadas, la inyección de las muestras disponibles originaron al menos un pico secundario en el cromatograma, lo cual también los invalida para ser usados como estándar interno.

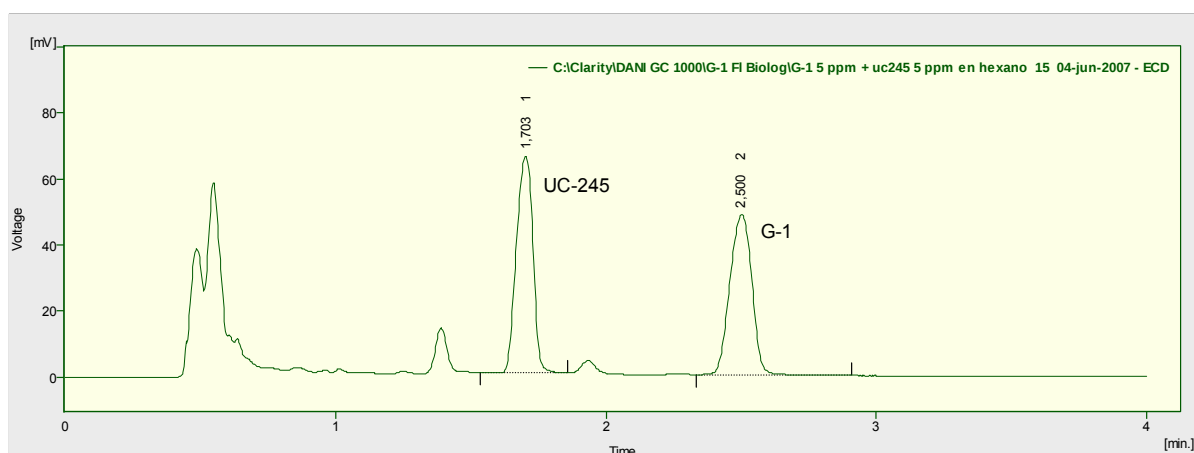


Figura 8. Cromatograma correspondiente a la inyección de G-1 muestra de referencia con adición de UC-245.

La muestra disponible de UC-245 origina una sola señal a un tiempo de retención cercano, pero menor, que el correspondiente al G-1. Ver Figura 8. Como se observa en la Figura 9, el Benzoato de Bencilo también origina un único pico pero a un tiempo de retención superior al del G-1.

Aun cuando ambos compuestos cumplen los requisitos básicos, se escoge como estándar interno al benzoato de bencilo que exhibe un tiempo de retención mayor

que el G-1 (ver Figura 10), lo que supone un menor riesgo de solapamiento entre el pico del estándar interno y los correspondientes a potenciales productos de la degradación del G-1 en contacto con el plasma. Sería razonable esperar que, a menos que se trate de reacciones de adición u otro tipo de asociaciones moleculares, la degradación del G-1 conduzca a la formación de compuestos de menor masa que este y mayor volatilidad, por lo que aparecerían en el cromatograma a tiempos de retención inferiores al del G-1.

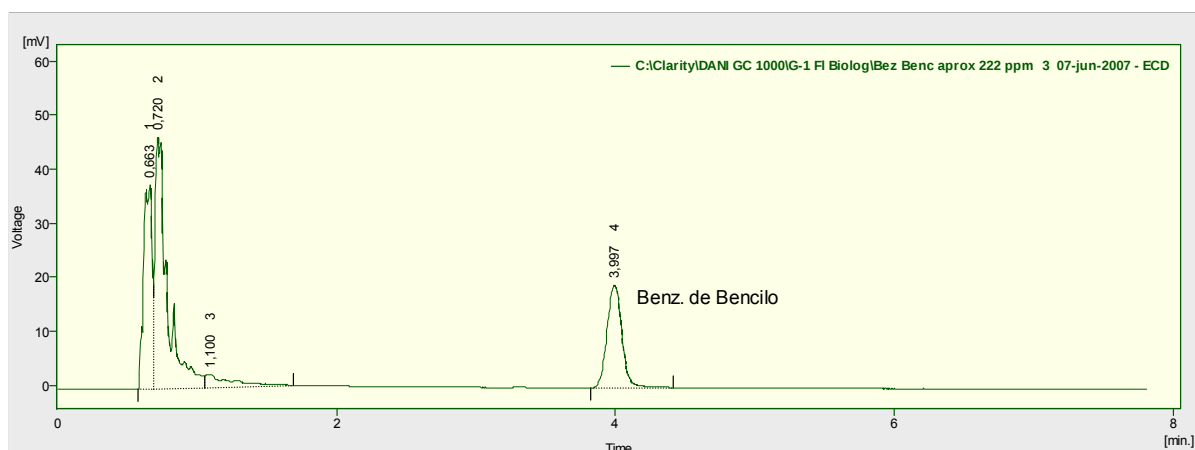


Figura 9. Cromatograma correspondiente a la inyección de una disolución de benzoato de bencilo en n-hexano.

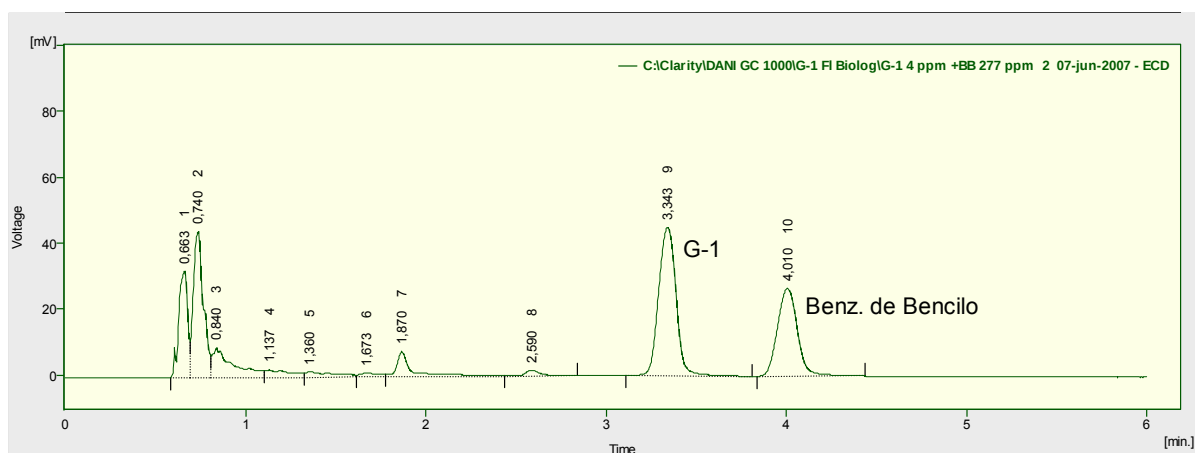


Figura 10. Cromatograma correspondiente a la inyección de G-1 muestra de referencia con adición de benzoato de bencilo.

Por demás se dispone de una experiencia de trabajo con el benzoato de bencilo que es precisamente el estándar interno usado en las determinaciones de G-1 por cromatografía de gases y detección con ionización por llama.

3.4. Validación

3.4.1. Sensibilidad (límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC))

Los límites de detección y cuantificación para la determinación del G-1 mediante cromatografía de gases y detección por captura electrónica son:

Tabla 2. Límites de detección y cuantificación para la determinación del G-1 por GC-ECD.

Límite de detección: $LD = \frac{\bar{X} + 3S}{b}$	0,0741 mg/L
Límite de cuantificación: $LQ = \frac{\bar{X} + 10S}{b}$	0,1452 mg/L

Estos valores son seis veces más bajos que los obtenidos en trabajos previos con determinación del G-1 por cromatografía líquida de alta eficacia y detección ultravioleta-visible. [Estévez, D., 2006] y por cromatografía de gases con columna empacada y detector de ionización por llama. [Arbona, G., 2005]

3.4.2. Linealidad

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración de G-1 en el intervalo de 0,5 a 8 mg/L, así como los parámetros para evaluar la calidad de la regresión se muestran en las Tabla 3 y 4 así como en las Figuras 11 y 12.

Tabla 3. Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración de G-1 por GC-ECD.

	Concentración (mg/L)	Rp1	Rp2
Estándar 1	0,5008	0,15384993	0,14505249
Estándar 2	2,013	0,79811606	0,8347833
Estándar 3	4,026	1,4834298	1,52601461
Estándar 4	5,008	1,82058843	1,8731341
Estándar 5	6,039	2,20785076	2,13801043
Estándar 6	8,128	2,97411576	2,90382768

*Rp: relación de respuestas (área del pico del patrón de G-1 dividido el área del pico del estándar interno)

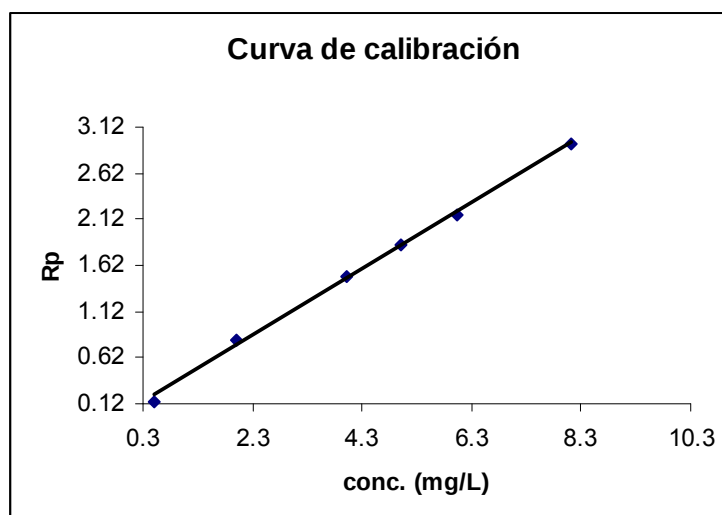


Figura 11. Curva de calibración para G-1 por GC-ECD.

Tabla 4. Parámetros estadísticos de la recta de regresión de G-1 por GC-ECD

Parámetros	Resultados	
Ecuación de la recta $y = a_x + b$	$Y = 0,35929 X + 0,031716$	
Coefficiente de correlación, $r \geq 0,999$	$r = 0,9990$	
t-test para el intercepto: $t_{cal} < t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y $n-2$ grados de libertad,	$T_{cal}: 1,068$	$t_{tab}: 2,776$
t-test para la pendiente: $t_{cal} > t_{tab}$ para $\alpha=0,05$ y $n-2$ grados de libertad	$T_{cal}: 60,125$	$t_{tab}: 2,776$
ANOVA para la bondad de ajuste: $F_{cal} < F_{tab}$,	$F_{cal}: 3,64$	$F_{tab}: 4,53$
Coeficiente de calidad: $QC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i - \hat{y}}{\bar{y}} \right)^2}{n-1}} * 100$ $QC < 2,5 \%$	$QC = 2,7 \%$	

Según la metodología ICH, la toma de decisión sobre la bondad de ajuste en base al cálculo del coeficiente de calidad (QC) debe hacerse solamente en aquellos casos donde el ANOVA, realizado previamente con el mismo fin, sea significativo ($F_{cal} > F_{tab}$), condición que no se cumple aquí, por lo tanto el valor de QC superior a 2.5 % no debe interpretarse como un resultado negativo dentro del conjunto de parámetros que evalúan la calidad de la regresión.

Finalmente, como se aprecia en la Figura 12, la distribución de los residuales es aleatoria, con aproximadamente la misma cantidad de residuales positivos que negativos por lo que se cumple la condición de homogeneidad de varianzas.

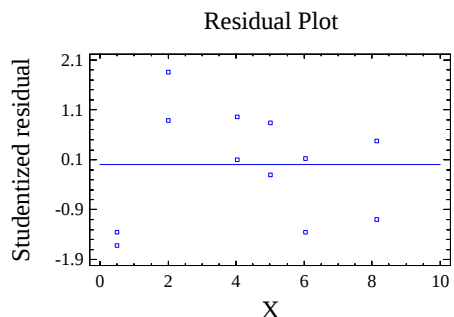


Figura 12. Distribución de los residuales en la regresión.

En resumen, los parámetros calculados para evaluar la calidad de la regresión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

3.4.3. Precisión

3.4.3.1. Repetibilidad instrumental

La precisión de un método analítico expresa la correspondencia entre una serie de mediciones obtenidas por análisis múltiples de una muestra homogénea. En el caso de la "precisión del sistema" o "precisión instrumental", se evalúa solamente el error asociado a la medición analítica y se determina analizando repetidas veces una misma muestra en un corto periodo de tiempo.

En cromatografía de gases, la repetibilidad del volumen de inyección es un factor crítico cuando se trabaja con instrumentos que carecen de sistema de inyección automática. Por tal razón es una práctica habitual el uso de un estándar interno para corregir esos errores relativos a la inyección.

En la siguiente tabla se exponen los resultados de 6 inyecciones sucesivas de una disolución de G-1 a 2 mg/L con benzoato de bencilo como estándar interno (volumen de inyección, 1 μ L).

Tabla 5. Resultados de la repetibilidad instrumental.

Inyección	Respuesta (Rp)	Variabilidad
Inyección 1	6,8061836	
Inyección 2	6,99252802	Media: 6,52733195
Inyección 3	6,37118252	Desv, Estándar: 0,13547863
Inyección 4	6,23526221	Coef, de variación: 2,076 %
Inyección 5	6,14424746	
Inyección 6	6,61458789	

*Rp: relación de respuestas (área del pico del patrón de G-1 dividido el área del pico del estándar interno)

La variabilidad de la respuesta, expresada como desviación estándar relativa fue de aproximadamente un 2 %, con una adecuada correspondencia entre las respuestas obtenidas para las inyecciones repetidas. Dicho resultado demostró que con este procedimiento es posible minimizar los errores potenciales asociados a la inyección manual de las muestras y con ello conseguir la precisión instrumental requerida. En consecuencia, para todas las determinaciones realizadas en este trabajo, se sigue el procedimiento de inyectar cada muestra por duplicado y utilizar para los cálculos el valor medio de la respuesta para ambas inyecciones.

3.4.3.2. Repetibilidad a diferentes niveles de concentración

Según las normativas la ICH para la validación de métodos analíticos, la repetibilidad de un procedimiento debe ser demostrada con un mínimo de 9 determinaciones, cubriendo el intervalo lineal específico para el mismo (por ejemplo, tres réplicas a tres niveles de concentración) o un mínimo de 6 determinaciones al nivel medio de concentración.

En la Tabla 6 se exponen los resultados obtenidos del análisis de muestras de plasma a tres niveles de concentración (niveles bajo, medio y alto del intervalo lineal) con tres réplicas en cada caso.

Tabla 6. Resultados de la repetibilidad a tres niveles de concentración de G-1.

	Conc 1 mg/L	Conc 2 mg/L	Conc 6 mg/L
Resultado Réplica 1	0,666 mg/L	1,591 mg/L	4,776 mg/L
Resultado Réplica 2	0,944 mg/L	1,875 mg/L	5,943 mg/L
Resultado Réplica 3	0,707 mg/L	1,973 mg/L	6,583 mg/L
Media	0,772 mg/L	1,813 mg/L	5,767 mg/L
Desv, Estándar	0,150	0,198	0,916
Coef, de variación	19,415 %	10,939 %	15,889 %

Según los resultados del ANOVA realizado, las varianzas a los tres niveles de concentración no difieren significativamente $F_{cal} (0,17) < F_{crítica} (5,14)$ para $\alpha=0,05$ y 2,6 grados de libertad. Además, los valores de desviación estándar relativa en cada grupo están dentro de los límites admisibles para métodos bioanalíticos, es decir, $CV \leq 15\%$, excepto para el menor nivel de concentración donde se acepta un CV de hasta un 20 %. [FDA, 2001]

3.4.3.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa la precisión bajo la influencia de variaciones intra-laboratorio, como por ejemplo, diferentes días, analistas, instrumentos, etc.

La Tabla 7 contiene los resultados obtenidos para el análisis de muestras de plasma humano con adición de G-1 a 2 mg/L, tres días sucesivos y preparando tres réplicas cada día.

Tabla 7. Resultados del estudio de la precisión intermedia.

Muestra	Día 1	Día 2	Día 3
Muestra 1	1,591 mg/L	2,141 mg/L	2,282 mg/L
Muestra 2	1,875 mg/L	2,371 mg/L	2,413 mg/L
Muestra 3	1,973 mg/L	1,973 mg/L	2,092 mg/L
Media	1,813 mg/L	2,162 mg/L	2,262 mg/L
Desv. estándar	0,198	0,200	0,161
CV "por día"	10,939 %	9,239 %	7,140 %
CV "global"	12,544 %		

Según los resultados del análisis de varianzas, las concentraciones medias determinadas a los diferentes días son significativamente diferentes entre sí ($F_{cal} (15,88) > F_{crítica} (5,14)$ para $\alpha=0,05$ y 2,6 grados de libertad). Sin embargo, las varianzas asociadas a esas concentraciones medias por día no son significativamente diferentes. ($F_{cal} (2,00) < F_{crítica} (5,14)$ para $\alpha=0,05$ y 2,6 grados de libertad).

Además, tanto los valores de desviación estándar relativa (CV) para cada día como la cifra global, están dentro de los límites admisibles para métodos bioanalíticos, en los que se aceptan valores de CV que no excedan el 15 %. [FDA, 2001]

3.4.4. Exactitud

El porcentaje de recuperación obtenido para una muestra de plasma humano, a la que se adicionó G-1 muestra de referencia a una concentración de 2 mg/L fue de 90,7 %.

Este valor es superior a la recuperación media (67,2 %) que se obtuvo en trabajos precedentes, [Estévez, D., 2006] donde en el proceso de extracción mediante MSPD se lavaba el cartucho con agua destilada para eliminar interferencias (básicamente proteínas plasmáticas). Sin embargo, con el procedimiento de extracción empleado ahora, las proteínas quedan retenidas en la co-lumna sin que sea necesario lavar el cartucho con agua. Los resultados sugieren que el menor contacto del G-1 con el agua (limitado aquí a la interacción con la matriz acuosa del plasma) conduce a una menor degradación del mismo, con lo que se incrementa el por ciento de recuperación.

3.4.5. Selectividad

A continuación se exponen los cromatogramas registrados para el n-hexano utilizado en la elución de los cartuchos de MSPD (Figura 13) y el correspondiente a la disolución resultante del lavado de 1 g del material C-18 y 1 g de silicagel con el mismo disolvente (Figura 14).

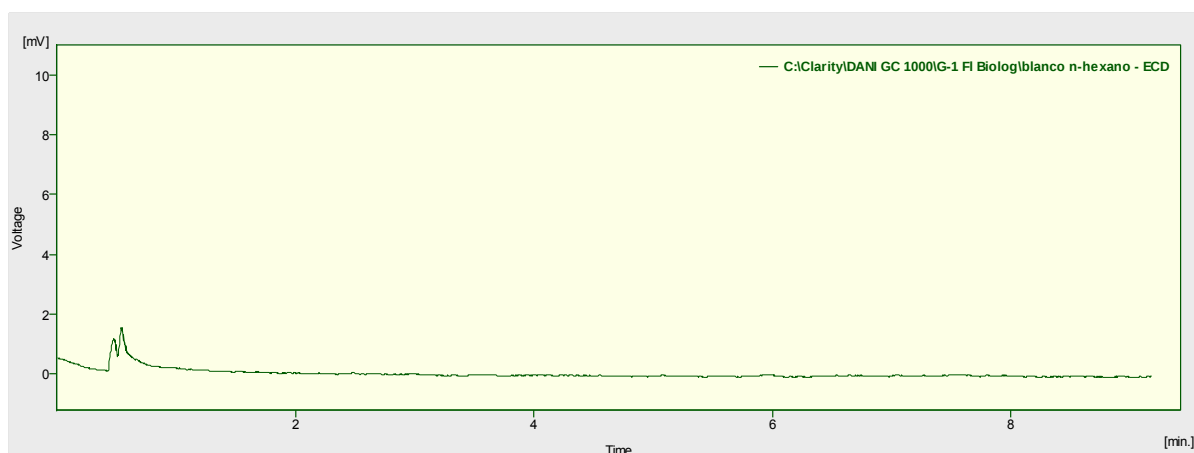


Figura 13. Cromatograma correspondiente a la inyección de n-hexano puro

Como puede apreciarse, ni el disolvente ni los materiales adsorbentes (C-18 y sílica gel) contienen impurezas capaces de originar señales potencialmente interferentes durante el análisis del eluato que se obtiene en el proceso de extracción del G-1

desde el plasma, mediante MSPD. Es decir, que estos resultados descartan al n-hexano, al material C-18 y a la silicagel como fuentes de señales potencialmente interferentes en el cromatograma final.

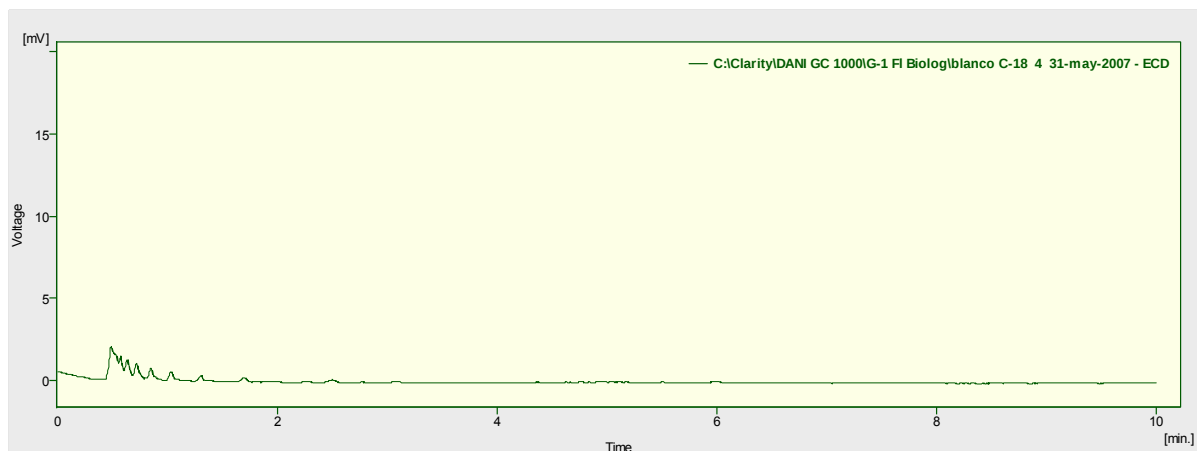


Figura 14. Cromatograma correspondiente a la inyección de la disolución de lavado de 1 g de material C-18 con n-hexano.

La Figura 15 contiene el cromatograma correspondiente a un blanco (plasma con estándar interno y sin adición de G-1) sometido al proceso de MSPD y analizado según el procedimiento de GC-ECD descrito en este trabajo.

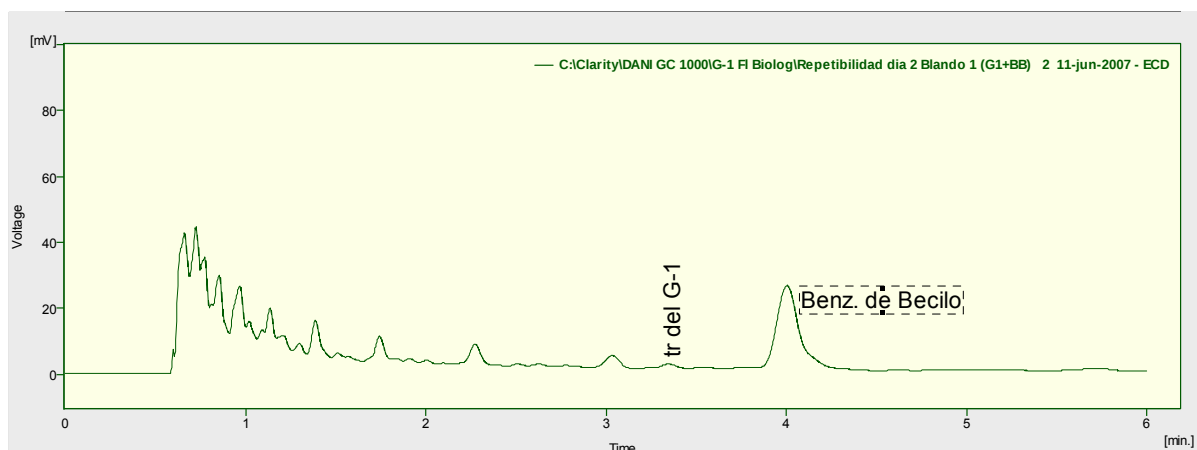


Figura 16. Cromatograma correspondiente a la extracción por MSPD de un blanco (plasma con estándar interno).

En el intervalo alrededor del tiempo de retención del G-1 (aproximadamente 3,3 minutos) no aparecen señales debido a componentes del plasma que pudieran interferir en la determinación del G-1. No obstante, en la posición que se indica en el cromatograma, aparece una señal no cuantificable que, debido a su escasa intensidad, no se puede distinguir con certeza del ruido (oscilaciones normales) de la

línea base. Esto aparentemente se debe a contaminación con G-1 presente en el material utilizado en la preparación de la muestra o en componentes del instrumento (por ejemplo, el septum y otras partes del inyector) y que se hacen evidentes al utilizarse un sistema de detección tan sensible como el de captura electrónica, con límite de detección para el G-1 en el orden de las pocas partes por billón ($74,1 \mu\text{g/L}$).

En la Figura 17 se exhibe un cromatograma típico de la extracción de G-1 desde plasma mediante MSPD y análisis por GC-ECD

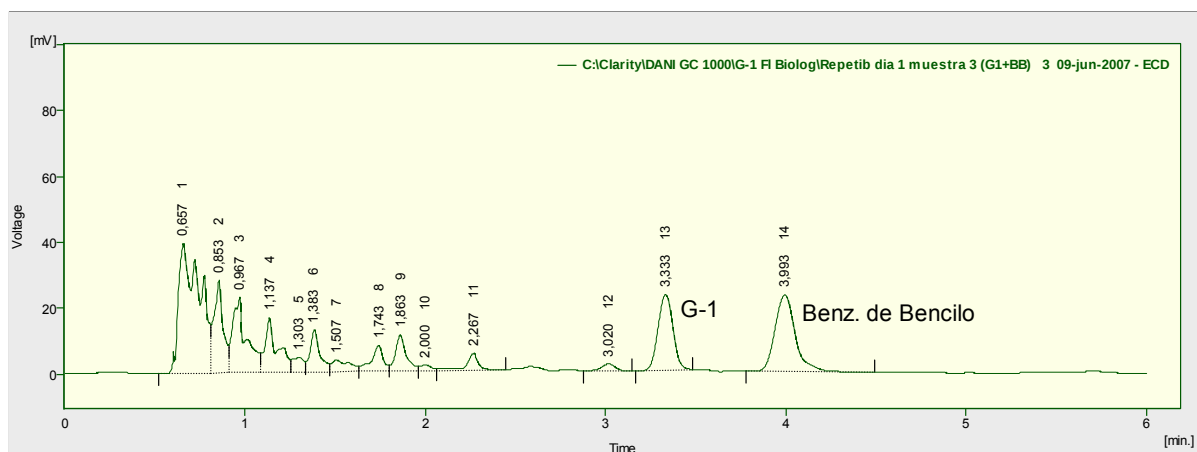


Figura 17. Cromatograma correspondiente a la extracción de G-1 desde una muestra de plasma mediante MSPD y análisis por GC-ECD.

Conclusiones

Conclusiones

1. Los parámetros operacionales para la determinación de G-1 por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica son: temperaturas de inyector, horno (columna) y detector de 230, 200 y 280 C° respectivamente; flujo de fase móvil (nitrógeno) de 0,5 mL/min y volumen de inyección de 1 µL (modo splitless).
2. La técnica estudiada para la extracción de G-1 desde plasma humano mediante Dispersión en Matriz Sólida, con adsorbente de sílica modificada C-18, co-columna de silicagel, elución con n-hexano y determinación por cromatografía de gases, con columna capilar y detección por captura electrónica resultó ser sensible, lineal, precisa, exacta y selectiva.

Recomendaciones

Recomendaciones

1. Aplicar el procedimiento descrito a muestras reales obtenidas de animales de experimentación, a los que se haya administrado, por vía sistémica, alguna formulación de G-1.

Referencias Bibliográficas

1. Arbona, G & Arbolaez, M. (2005) Método de determinación de G-1 en plasma humano. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.
2. Arribas, A., Bermejo, E., Chicharro, M. & Zaprdiel, A. (2007) Application of matrix solid-phase dispersion to the prothion and maleic hydrazide determination in potatoes by differential pulse voltammetry and HPLC. 71, 430-43.
3. Bogiatti, S., Dicorcia, A., Lagana, A., Mastrantonio, V. & Sergi, M. (2007) A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide erythromycin and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 21, 237-246.
4. Boldeau, J.M., González, O. & Medina, R. (1997) In vitro evaluation of G-1: A novel antimicrobial compound. Technical Report. Saskatoon. Department of Clinical Microbiology, St. Paul's Hospital.
5. Bravo, L. (2006) Procedimiento Normalizado de Operación G-1 puro. Determinación de la pureza por Cromatografía de Gases. 02.4.301 Villa Clara, Centro de Bioactivos Químicos.
6. Bravo, L.R., Jiménez, E., Muro, D., Calvo, A.M., Morales, S., Consuegra, S., Rodríguez, M. & Vardés, T. (1999) Validación de las técnicas para la determinación de la pureza del bioactivo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Revista Afinidad. 479.
7. Calpena Campmany, A.C. (1990) Validación de los métodos analíticos. Barcelona, Universidad de Barcelona.
8. Carballo, N. & Col. (1997) Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de las células germinativas del ratón C57BL/6J. Informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).
9. Carballo, N. & Col. (1997) Evaluación Mutagénica del G-1. Análisis citogénico de médula ósea en ratón C57BL/6J. Informe técnico. La Habana, Cuba.,

- Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).
10. Carballo, N. & Col. (1997) Evaluación Mutagénica del G-1. Ensayo de Anormalidades de la cabeza del espermatozoide del ratón Cenp: NMRI. informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).
 11. Carballo, N. & Col. (1997) Evaluación Mutagénica del G-1. Ensayo de micronúcleos en la médula ósea del ratón Cenp: NMRI. Informe técnico. La Habana, Cuba., Centro de Toxicología y Experimentación animal (CETEX)/ Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).
 12. Castiñeira Díaz, M. & González San Miguel, H.M. (2002) Contro de medicamentos 2. La Habana. Felix Varela.
 13. Castro Cels, M., Gastón Fora, S., Pujol Forn, M., Sans Roca, J.M. & Vicente Pla, L. (1989) Validación de métodos analíticos. Monografía A.E.F.I.
 14. Cela, R., Lorenzo, R. & Casais, M. (2002) Técnicas de Separación en Química Analítica., España, Síntesis Santiago de Compostela.
 15. Chu, X. & Yao, H. (2005) Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass selective detection. 1063, 201-210.
 16. Cortés, R.R. (1997) Algunos aspectos toxicológicos del G-1. Centro de Bioactivos Químicos. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.
 17. Cortés, R.R., Pérez, J.A, & Reinir, T. (1997) Some Toxicological issues of ophthalmic ointment Queratofural. 20, 292-293.
 18. Dorea, H. & Lima Sobrinho, L. (2004.) Analysis of Pesticide Residues in Rice Using Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD). 15 690-694.
 19. Estévez, D. (2006) Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la

- determinación de G-1 en plasma humano. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.
20. Estrada, E. (1998) Structure-mutagenicity relationships in 2-furylethylene derivatives. A molecular orbital study of the role of nitro groups. *Mut. Res.*, 420, 67 -75.
21. Estrada, E., Castañedo, N.R. & Pomés, R. (1993) Análisis estructural del G-1. En *Queratofural*. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No 211. ed. La Habana, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura.
22. Estrada, E., Rodríguez, J., González, O., Silveira, E.A., Castañedo, N.R. & (1993.) Actividad antifúngica del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) frente a hongos filamentosos. En *Queratofural*. La Habana, Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura.
23. Fernández Serret, A. (1996) Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. , La Habana, Editorial Pueblo y Educación.
24. Ferrer, C., Gómez, M., García-Reyes, J., Ferrer, I., Thurman, E. & Fernández -Alba, A. (2005) Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. . 1069, 183-194.
25. Food and Drug Administration (FDA). (2001) Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation.
26. Furusawa, N. (2006) Separating DDTs in edible animal fats using matrix solid-phase dispersion extraction with activated carbon filter, *Toyobo-KF.44*, 498-503.
27. García-Reyes, J., Ferrer, C., Thurman, E., & Fernández -Alba, A & Ferrer, I. (2006) Analysis of herbicides in olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *54*, 6493-500.
28. Giza, I & Sztwiertnia, U. (2003) Gas Chromatographic Determination of Azoxystrobin and Tifloxystrobin residues in apples. 226 -229.

29. González, O., Ramírez, T., Silveira, E. A., Herrada, N. & Machado, R. (1993) Estandarización de la técnica para la evaluación "in vitro" de la actividad antifúngica del producto G-1 frente a los hongos dermatofitos. En: Queratofural. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No`211. La Habana, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura.
30. González, O., Ramírez, T., Silveira, E.A., Medina, R., Delgado, M.S., Castañedo, N.R. & Col. (1993) Mínima Concentración Inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género Candida. En: Queratofural. . Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No`211. La Habana, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura.
31. http://enciclopedia.us.es/index.php/Plasma_sangu%EDneo
32. <http://es.wikipedia.org/wiki/Sangre>
33. <http://www.portalplanetasedna.com.ar/lasangre.htm>
34. <http://www.terra.com/especiales/sangresesegura/intocaracteristicas.htm>
35. Husain, S.W., Kiarostami, V., Morrovati, M. & Tagebakhsh, M.R. (2003) Multiresidue Determination of diazinon and ethion in pistachio nuts by use of matrix solid phase dispersion with a lanthanum silicate co-column and gas chromatography., 208-214.
36. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005) International conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology.
37. Jorge, E., Jiménez, I., Bravo, L.R., Díaz, M., Diduk, N., Morales, S. & Col. (1993) Estudio de estabilidad de la materia prima para medicamentos G-1. En: Queratofural. Registro de Medicamentos de Uso Veterinario No`211. La Habana, Laboratorio de control Estatal. Instituto de Medicina Veterinaria. Ministerio de la Agricultura.
38. Karasová, G., Lehotany, J., Klodzinska, E., Gadzala-Kopciuch, R. & Buszewski, B. (2006)) Comparison of Several Extraction Methods for the Isolation of Benzoic Acid Derivatives from *Melissa officinalis*. 29, 1633-1644.

39. Kunihiro, K. (2007) Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography–mass spectrometry with photodiode array detection. 18, 301-305.
40. Landry, F. (1990) Estudio de estabilidad preliminar del G-1, compuesto furánico. Villa Clara, Universidad Central de Las Villas.
41. Lehotay, S.J., Mastovská, K. & Yun, S.J. (2005) Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. 88, 630 - 8.
42. Li-Bin, L., Yuki, H., Ya-Ping, Q., Hai-Xia, Z & Jin-Ming, L. (2007) Development of automated online gel permeation chromatography–gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products. 845, 61-68.
43. Martínez, A., Ramil, M., Montes, R., Hernanz, D., Rubí, E., Rodríguez, I & Torrijos, R. (2005) Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection. 1072, 83-91.
44. Molina, R. & Rosado, A. (1994) Estudio de los productos de degradación del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano en medio acuoso. CBQ, UCLV.
45. McGrane, M., O'keeffea, M. & Smythb, M. (1998) Multi-residue analysis of penicillin residues in porcine tissue using matrix solid phase dispersion†. 123, 2779 - 2783.
46. Pant, K.J. (1996) Evaluation of a test article in the Salmonella typhimurium/Escherichia coli plate incorporation mutation assay in the presence and absence of Aroclor-induced Rat Liver S-9 with a confirmatory Study. Technical Report of G-1. Rockville. Maryland, Sitek Research Laboratory.
47. Pérez, G., Saíenz, O. & González, J. (1996) Evaluación in vivo del potencial del G-1 para inducir reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratón. Reporte técnico. Villa Clara, Cuba. Centro de Bioactivos Químicos; Unidad de Toxicología Experimental.

48. Rasbasco, A.M., Ginés, J.M., Fernández Arévalo, M. & Holgado, M.A. (1991) Dissolution rate of diazepam from polyethylene glycol 6000 solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 67, 201-205.
49. Ravin, L.J. & Radebaugh, G.W. Preformulation. In: Genaro A.R, Chase G.D, Marderosian A.D, Harvey S.C, Hussar D.A, Medwick T., .Remingtons pharmaceutical Sciences. 18a edition.
50. Robinson, K.A. & Robinson, J.F. (2000) *Análisis Intrumental.*, Madrid. Pearson Educación, S.A.
51. Robinson, K.A. & Robinson, J.F. (2001) *Análisis Instrumental.*, Madrid. Pearson Educación, S.A.
52. Ruiz, M., Cameán, A., Moreno, I. & Picó, Y. (2005) Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. 1073, 257-262.
53. Skoog, D. & Leary, J. (1994) *Análisis Intrumental.* 4ta edición.
54. Szejtli, J. (1988) *Cyclodextrin Technology.* Reporte técnico. London, Kluwer Academic Plublishers.
55. Technical Note¹¹¹. Argonaut Technologies. Inc.2002.
56. Totti, S., Fernández, M., Ghini, S., Picó, Y., Fini, F., Mañes, J. & Girotti, S. (2006) Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their may. metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. 69, 724-729.
57. Valsamak, V., Boti, V., Sakkas, V. & Albanis, T. (2006) Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. 573-574, 195-201.
58. Wang, S., Xu, Y., Pan, C., Jiang, S. & Liu, F. (2007) Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. 387, 673-685.
59. Xu, J. (1996) Test for Chemical induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow cells. Technical Report of G-1. Rockville. Maryland. Sitek Research Laboratory.

Anexos

Anexo 1

CBQ

Centro de Bioactivos Químicos
 Universidad Central de Las Villas
 Carretera de Camajuaní km 5½
 Teléfonos: 281473 / 281254
 FAX: 281130

Certificado de Calidad

Producto **G-1**

Folio: --

Fecha de Fabricación: 03-07-14

Lote: 03-3-34

ENSAYOS	RESULTADOS	LÍMITES
Características Organolépticas		
a) Aspecto	Cumple	Cristalino
b) Color	Cumple	Amarillo
c) Olor	Cumple	Característico
Identificación		
a) Rango de Fusión	-	89,0 °C – 92,0 °C
b) Espectro UV-VIS	Cumple	Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm
Pérdidas por Dsecación	0,06	No más que 0,50 %
Residuo de Ignición	0,03	No más que 0,10 %
Metales Pesados	Cumple	No más que 20 µg/g
Contenido de G-1	99,87	98,00 % – 102,00 %
Contenido de Monobromado	--	No más que 1,00 %
Límite Microbiano	Cumple	No más de: UFC de Bacterias/g = 10^3 UFC de Hongos/g = 10^2 Ausencia de: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Candida sp</i>

Bibliografía: G-1 materia prima. Métodos de Control. CBQ.

OBSERVACIONES: Contenido de G-1, según análisis por DSC.

Límite microbiano según NC 26-121:93 Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinaciones microbiológicas

	<i>Suministrado por:</i>
Nombre	Lic. Amalia Calvo Alonso
Cargo	J' Control de la Calidad
Firma	
Fecha	04-07-23

Anexo 2

CBQ

Centro de Bioactivos Químicos
 Universidad Central de Las Villas
 Carretera a Camajuani km 5½
 Teléfonos: 281473 / 281254
 FAX: 281130

Certificado de Calidad

Producto **G-1**

Folio: 82-04

Fecha de Fabricación: 03-03-27

Lote: 03-3-13

Fecha de reanálisis: 06-11

ENSAYOS	RESULTADOS	LÍMITES
Características Organolépticas		
a) Aspecto	Cumple	Cristalino
b) Color	Cumple	Amarillo
c) Olor	Cumple	Característico
Identificación		
a) Rango de Fusión	--	89,0 °C – 92,0 °C
b) Espectro UV-VIS	Cumple	Máximo a 389 nm y mínimo a 300 nm
Pérdidas por Dsecación	0,08	No más que 0,50 %
Residuo de Ignición	0,03	No más que 0,10 %
Metales Pesados	Cumple	No más que 20 µg/g
Contenido de G-1	99,76	98,00 % – 102,00 %
Contenido de Monobromado	0,21	No más que 1,00 %
Límite Microbiano	Cumple	No más de: UFC de Bacterias/g = 10^3 UFC de Hongos/g = 10^2 Ausencia de: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Candida sp</i>

Bibliografía: G-1 materia prima. Métodos de Control. CBQ.

OBSERVACIONES:

	<i>Aprobado por:</i>	<i>Supervisado por:</i>
Nombre	Tersita Ramos Gómez	Amalia Calvo Alonso
Cargo	J' Control Final	J' Control de Calidad
Firma		
Fecha	04-11-12	04-11-12

Anexo 3

MOD. 44-09-01
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
BANCO DE SANGRE
UNIDAD:

SOLICITUD Y ENVIO DE SANGRE
Y SUS COMPONENTES

UNIDAD Y DEPARTAMENTO: Bioactivo D.
NOMBRE Y APELLIDOS: Adelinda Wam, Jagger
FECHA: 5 DIA 4 MES 06 AÑO

UNIDAD Y DEPARTAMENTO: Banco de Sangre
NOMBRE Y APELLIDOS: Adelinda Wam, Jagger
FECHA: 5 DIA 4 MES 06 AÑO

SOLICITUD ☐ URGENTE ☒ NO URGENTE

ENVIO 755

DESCRIPCION DEL PRODUCTO	GRUPO FACTOR	U.M.	CANTIDAD SOLICITADA	CANTIDAD ENVIADA	TOTAL DE FRASCO O BOLSA	NUMERO DE HISTORIA CLINICA Y CODIGO
Plasma	B		1	1		319-12-4074
Plasma Sobrenadante CHIO			1	1		257-P ₂ -7394

RECIBIDO POR: Sergio Morales
NOMBRE Y APELLIDOS

CI: 67040104146
FIRMA

FECHA: 5 DIA 4 MES 06 AÑO

Publicigraf Ciego de Avila