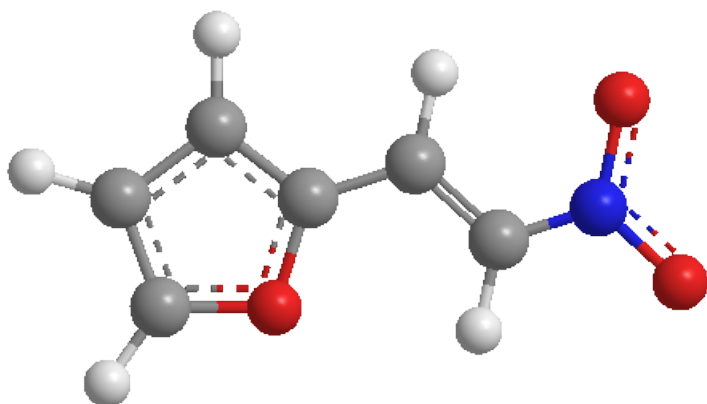




UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

# Desarrollo y validación de una técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

**Rosaly Morales Guevara**



## **Tutores:**

MSc. Amalia María Calvo Alonso

Dr. Sergio Morales Fernández

Facultad de Química-Farmacia  
Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Santa Clara

Julio 2017

## Resumen

*E*n el laboratorio de Control de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) se desarrolló y validó una técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0). Se seleccionaron las condiciones cromatográficas a las cuales se obtuvieron picos cromatográficos con la resolución requerida: temperatura del horno de 140 °C, del inyector de 230 °C y del detector de 280 °C; flujo de nitrógeno: 0.7 mL/min, de hidrógeno: 40 mL/min y de aire: 450 mL/min; se inyectó 1  $\mu$ L de muestra; splitless como modo de inyección; 7 min de tiempo de corrida y etanol como disolvente. La técnica analítica por cromatografía de gases para la determinación de la pureza de G-0 es exacta, específica, precisa, tiene un límite de detección y cuantificación de 83 mg/L y 99 mg/L, respectivamente y es lineal en el intervalo de concentraciones de 800 mg/L a 1200 mg/L según el coeficiente de determinación.

## Abstract

*I*n the laboratory of Quality Control at Center of Chemical Bioactives (CBQ) an analytical technique was developed and validated by gas chromatography to determine the purity of 2-[(E)-2-nitroethenyl]furan (G-0). Chromatographic conditions to which chromatographic peaks were obtained with the required resolution were selected: oven temperature of 140 °C, injector 230 °C and detector 280 °C; nitrogen flow: 0.7 mL/min, hydrogen: 40 mL/min and air: 450 mL/min; it was injected with 1  $\mu$ L of sample; splitless as injection mode; 7 min of run time and ethanol as solvent. The analytical technique by gas chromatography to determine the purity of G-0 is exact, specific, precise, has a limit of detection and quantification of 83 mg/L and 99 mg/L, respectively and is linear in the concentration range of 800 mg/L to 1200 mg/L according to the coefficient of determination.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b>	<b>II</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Problema científico</b>	<b>2</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>2</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>2</b>
<b>1. Marco teórico</b>	<b>3</b>
1.1. Cromatografía de gases . . . . .	3
1.1.1. Mecanismos de la cromatografía . . . . .	3
1.1.2. Fundamentos teóricos . . . . .	4
1.1.3. Descripción del equipo . . . . .	7
1.1.4. Sistemas de introducción de muestras . . . . .	8
1.1.5. Detectores . . . . .	10
1.1.6. Columna cromatográfica . . . . .	11
1.1.7. La fase estacionaria . . . . .	13
1.2. Validación de métodos analíticos . . . . .	13
1.2.1. Determinación de la linealidad . . . . .	14
1.2.2. Determinación de la precisión . . . . .	14
1.2.3. Determinación de la veracidad . . . . .	15
1.2.4. Determinación del límite de detección y cuantificación . . . . .	15
1.2.5. Determinación de la especificidad . . . . .	16
1.3. G-0 . . . . .	17

---

<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>19</b>
2.1. Equipos . . . . .	19
2.2. Materiales . . . . .	19
2.3. Reactivos . . . . .	19
2.4. Disoluciones . . . . .	20
2.5. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0	20
2.5.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos . . . . .	21
2.5.1.1. Selección de la fase estacionaria . . . . .	21
2.5.1.2. Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector . . . . .	21
2.5.1.3. Selección del flujo de fase móvil . . . . .	21
2.5.1.4. Volumen de inyección . . . . .	21
2.5.1.5. Selección del estándar interno . . . . .	21
2.5.1.6. Selección del disolvente para la muestra . . . . .	22
2.5.1.7. Concentración de la muestra . . . . .	22
2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0	22
2.6.1. Pruebas de adecuación del sistema . . . . .	22
2.6.1.1. Repetibilidad de los tiempos de retención . . . . .	22
2.6.1.2. Eficacia de la columna o número de platos teóricos . . . . .	22
2.6.1.3. Simetría del pico de G-0 . . . . .	23
2.6.2. Linealidad . . . . .	23
2.6.3. Precisión . . . . .	24
2.6.3.1. Repetibilidad instrumental . . . . .	24
2.6.3.2. Repetibilidad del método . . . . .	24
2.6.3.3. Precisión intermedia . . . . .	25
2.6.4. Veracidad . . . . .	25
2.6.5. Determinación de los límites de detección y cuantificación . . . . .	25
2.6.6. Especificidad . . . . .	26

---

<b>3. Resultados y su discusión</b>	<b>28</b>
3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0	28
3.1.1. Selección de la fase estacionaria . . . . .	28
3.1.2. Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector . . . . .	29
3.1.3. Selección del flujo de fase móvil . . . . .	29
3.1.4. Selección del estándar interno . . . . .	30
3.1.5. Selección del disolvente para la muestra . . . . .	32
3.1.6. Concentración de la muestra . . . . .	32
3.1.7. Condiciones cromatográficas para el análisis de G-0 . . . . .	32
3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0	34
3.2.1. Pruebas de adecuación del sistema . . . . .	34
3.2.2. Linealidad . . . . .	35
3.2.3. Precisión . . . . .	38
3.2.3.1. Repetibilidad instrumental . . . . .	38
3.2.3.2. Repetibilidad del método . . . . .	39
3.2.3.3. Precisión intermedia . . . . .	40
3.2.4. Veracidad . . . . .	43
3.2.5. Límites de detección y cuantificación . . . . .	45
3.2.6. Especificidad . . . . .	45
<b>Conclusiones</b>	<b>51</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>56</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Esquema de un cromatógrafo de gases . . . . .	8
2.	Esquema de un inyector de “split” . . . . .	9
3.	Estructura del poli(dimetildifenil)siloxano. . . . .	28
4.	Estructura del G-0. . . . .	28
5.	Curva de flujo de fase móvil con respecto a H. . . . .	30
6.	Estructura del benzoato de etilo . . . . .	31
7.	Cromatograma del benzoato de etilo en etanol. . . . .	31
8.	Cromatograma del etanol. . . . .	32
9.	Cromatograma de G-0 disuelto en etanol a 1 000 mg/L con benzoato de etilo como estándar interno. . . . .	34
10.	Curva de calibración del G-0. . . . .	36
11.	Residuales con respecto al número de réplicas. . . . .	38
12.	Residuales con respecto al logaritmo de los residuales al cuadrado (LNR2). . . . .	42
13.	Ploteo de las concentraciones contra los % de Recuperación. . . . .	44
14.	Residuales con respecto a los % de Recuperación. . . . .	45
15.	Cromatograma del benzoato de etilo en etanol. . . . .	46
16.	Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo (solución recién preparada). . . . .	46
17.	Cromatograma del G-0 fundido a 70 °C en etanol con benzoato de etilo. . . . .	47
18.	Cromatograma del G-0 envejecido en etanol con benzoato de etilo. . . . .	47
19.	Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de 24 h de exposición a la luz del laboratorio. . . . .	48
20.	Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle HCl 0.2 mol/L. . . . .	48
21.	Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle NaOH al 1 %. . . . .	49
22.	Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 3 %. . . . .	49

*En toda recopilación, el dato más obviamente correcto, más allá de toda necesidad de comprobación, es el error.*

*TERCERA LEY DE FINAGLE*

# DEDICATORIA

*A mis padres y mi esposo por apoyarme y confiar en mí siempre.*



# AGRADECIMIENTOS

*A mis padres por todo el sacrificio que han tenido que hacer para que yo pudiera estar aquí y por todo el amor que me han brindado siempre.*

*A mi esposo porque siempre ha sido mi apoyo, por toda la ayuda que me ha brindado desde que nos conocimos, por compartir sus vastos conocimientos conmigo y por el amor que me ha dado durante los últimos años de mi vida.*

*A mi tutora Amalia por guiarme con mucha sabiduría y por permitirme ampliar las fronteras de mis conocimientos, pero además por dedicarme tanto tiempo y brindarme su cariño y comprensión siempre que fue necesario durante los últimos 3 años.*

*A mi tutor Sergio por guiarme con mucha sabiduría y por permitirme ampliar las fronteras de mis conocimientos.*

*A Daniellys Alejo Sánchez por darme el empujón que necesitaba en el segundo año de la carrera para convertirme en una profesional mejor preparada.*

*A mis profesores que durante los 5 años de la carrera han hecho su mejor esfuerzo por transmitirme sus conocimientos y experiencias.*

*A mi profesora de química de la Secundaria Básica, María Caridad, que fue la primera persona que dio las primeras pinceladas que mis ojos observaron sobre Química y me inspiró a optar por la química pura.*

*A todas las trabajadoras del Laboratorio de Control de la Calidad del CBQ que siempre que necesité su ayuda me la brindaron con mucho cariño.*

*A todos los que de una forma u otra han tenido que ver con el hecho de que yo me esté graduando hoy como Licenciada en Química.*

La industria azucarera es una de las principales ramas de la economía nacional, por esto es de gran interés el aprovechamiento intensivo de la caña de azúcar. Los derivados de su procesamiento aportan materias primas y nuevos productos de aplicación en la industria química y farmacéutica, que hacen de la industria de los derivados de la caña de azúcar un objeto de desarrollo muy importante del complejo agroindustrial en los últimos tiempos.

Debido a la necesidad que presenta el país de eliminar importaciones de productos bioactivos y crear una base sólida en este sentido, se vienen realizando estudios con el objetivo de obtener compuestos a partir de otros existentes en Cuba. Un ejemplo significativo de la labor desarrollada está presente en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) donde se han sintetizado más de 600 productos, entre ellos derivados del furfural tales como: 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0), 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitroetenil)furano (G-1) y 2-[(E)-2-nitropropenil]furano (UC-244), a los que se le han realizado pruebas para comprobar su bioactividad con resultados muy positivos.

En el caso del G-0 se sintetiza a escala piloto en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ); tiene propiedades coccidicidas, además de ser una de las materias primas para la síntesis del bactericida - fungicida de amplio espectro denominado G-1.

Debido a que el G-0 constituye la materia prima fundamental para la obtención del G-1 es necesario llevar a cabo un control exhaustivo de su calidad mediante un estudio de su estabilidad a largo plazo que incluye la evaluación en el tiempo de propiedades físicas, químicas y microbiológicas, que pueden sufrir variaciones durante el almacenamiento y por tanto influir en la calidad, la seguridad y la eficacia del mismo. Para completar este proceso hay que realizar varios ensayos: características organolépticas, identificación del G-0, intervalo de fusión, cuantificación de la pureza del G-0, residuo de ignición y metales pesados. Actualmente la determinación de la pureza no se realiza según las exigencias de las regulaciones vigentes que exigen técnicas cromatográficas para este tipo de ensayo. El CBQ no cuenta con un procedimiento fiable para determinar la pureza del G-0 por lo que es necesario desarrollar y validar uno.

## Introducción

---

### Situación problémica

- El Centro de Bioactivos Químicos no dispone de una técnica para determinar la pureza del G-0 que cumpla las exigencias de las regulaciones vigentes.

### Objetivo general

- Desarrollar una metodología analítica que permita cuantificar el contenido de 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0) en lotes de producción.

### Objetivos específicos

1. Desarrollar un procedimiento por cromatografía de gases para la determinación del contenido de 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0) en lotes de producción.
2. Validar el procedimiento desarrollado según las exigencias de las regulaciones internacionales vigentes.

## 1.1 Cromatografía de gases

Entre las técnicas cromatográficas utilizadas con fines analíticos, la cromatografía de gases es probablemente la técnica de más amplia utilización, ninguna técnica analítica puede ofrecer su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles.

Por otra parte, el hecho de que con esta técnica las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que estarán marcados fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar. Por lo general, la utilización de la cromatografía de gases está restringida a la separación de compuestos con un peso molecular menor de 1 000 a una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C.

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura; esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas-líquido), de adsorción (cromatografía gas-sólido) o, en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos. Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras.

### 1.1.1 Mecanismos de la cromatografía

El movimiento de las sustancias durante la cromatografía es el resultado de dos fuerzas oponibles, la fuerza de manejo de la fase móvil y la fuerza resistente o acción de retardo del sorbente. La fuerza de manejo mueve las sustancias del origen de la columna en dirección del flujo de la fase móvil. La acción de retardo impide el movimiento de las sustancias arrastrándolas del flujo y adhiriéndolas al adsorbente. Las moléculas se encuentran alternando entre estar pegadas al adsorbente o despegadas en el flujo, esto da como consecuencia que pese a que el flujo es constante, solo una fracción de las moléculas se están moviendo. Las sustancias que se mueven más lentamente es porque están siendo

## 1.1. Cromatografía de gases

---

unidas más fuertemente a la fase estacionaria, mientras que aquellas que se mueven más rápidamente es porque son menos solubles o de poca afinidad.

La habilidad de tener una migración diferencial entre los componentes de la mezcla es el resultado de la selectividad del sistema cromatográfico. El flujo de la fase móvil no es selectivo en el sentido de que no afecta el movimiento de los solutos. Como parte del sistema cromatográfico, sin embargo, la fase móvil debe ser un poco selectiva para ayudar a la absorción de los solutos con la fase estacionaria. La fase estacionaria también juega un papel importante dentro del cromatograma debido a su acción resistiva como una fuerza selectiva de la velocidad de flujo de los solutos.

### 1.1.2 Fundamentos teóricos

Se han propuesto muchas teorías con complejos modelos matemáticos para explicar el comportamiento de los solutos en las columnas cromatográficas. Las más estudiadas son: Teoría de las placas teóricas (Martin y Synge), Teoría cinética (Van Deemter, Zuiderweg, Klinkenberg y Sjenitzer) y Teoría desarrollada para columnas capilares (Golay).

La principal es la teoría de las placas teóricas (theoretical plates theory), la cual plantea que una columna cromatográfica está constituida por una serie de placas contenidas en la fase estacionaria. Supone como constante el volumen de la fase estacionaria en cada placa; que el volumen de fase móvil entre placas es constante; que las dos fases están en equilibrio en cada placa, y que el valor de coeficiente de distribución es constante e independiente de la concentración del soluto. Desventaja: además de que se basa en muchas suposiciones, la principal desventaja es la falta de conexión entre la eficiencia de la columna y las propiedades fisicoquímicas de la partícula.

La ecuación de esta teoría:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (1.1.1)$$

donde:

$N$  = número de placas teóricas (adimensional).

$t_r$  = tiempo de retención de un compuesto (*min*).

$w$  = ancho del pico a media altura (*min*).

La teoría cinética considera el comportamiento en un proceso cromatográfico en función de los

## 1.1. Cromatografía de gases

---

factores cinéticos que intervienen: variaciones en las velocidades de flujo, debido a las diferentes rutas que puede tomar el analito durante su migración a través del empaque, difusión axial o longitudinal del soluto en la fase móvil y resistencia a la transferencia de masas entre la fase móvil y la fase estacionaria.

La ecuación de Van Deemter:

$$HETP \text{ o } H = A + \left(\frac{B}{u}\right) + C \cdot u \quad (1.1.2)$$

donde:

$HETP \text{ o } H$  = altura equivalente a una placa teórica ( $mm$ ).

$u = \left(\frac{L}{t_{r \text{ aire}}}\right)$  promedio de la velocidad lineal ( $cm/s$ ).

$A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$  difusión aparente.

$B = 2 \cdot \gamma \cdot D_m$  coeficiente del término debido a la difusión molecular.

$C = \left(\frac{8}{\pi}\right) \left(\frac{k'}{[1 + k']^2}\right) \left(\frac{d_f}{D_s}\right)$  coeficiente del término debido a la resistencia a la transferencia de masas.

En la teoría para las columnas capilares se considera que la difusión aparente no contribuye de manera apreciable al ensanchamiento de los picos en este tipo de columnas. El coeficiente relacionado con la difusión molecular tiene un valor de uno debido a que la distancia que recorre la partícula es igual a la longitud de la columna. El término relacionado con la transferencia de masas viene dado en función del diámetro de la columna, pues en este tipo de columna es más importante que el tamaño de partícula de relleno.

La ecuación de esta teoría es un caso particular de la ecuación de la teoría cinética, en este caso se omite el término A pues su valor es despreciable; se relacionan las magnitudes que caracterizan la geometría del soporte y el término C se presenta de manera distinta pues en este tipo de columna es más importante la fase móvil que el tamaño de partícula.

### ***Circulación del gas portador***

La ley de Darcy correlaciona la velocidad lineal de un gas que circula por una columna con el gradiente de presión.

$$u = - \left( \frac{k}{\eta} \right) \left( \frac{dP}{dz} \right) \quad (1.1.3)$$

donde:

$u$ = velocidad lineal en un punto de la columna.

$z$ =distancia a la entrada de la columna.

$\eta$ = viscosidad del gas.

$dP$ = gradiente de presión de un elemento.

$dz$ = longitud de columna.

$k$ =constante de permeabilidad.

Las respectivas integraciones de la ecuación permiten obtener una que relaciona el valor de la presión con la posición de la columna, otra que indica la velocidad media, la compresibilidad o factor de obstrucción.

### ***Coefficiente de reparto (K)***

Propiedad termodinámica del sistema soluto-fase estacionaria-fase móvil independiente del proceso cromatográfico. Concentración de soluto en la fase estacionaria frente a concentración de soluto en fase móvil a temperatura constante.

### ***Factor de capacidad ( $k'$ )***

Depende de las propiedades termodinámicas del sistema (K) y además es función de las características de la columna en particular. Probabilidad de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil.

### ***Relación frontal ( $R_f$ )***

La relación frontal y el factor de capacidad son dos maneras de medir el mismo fenómeno. Representa la relación entre las velocidades medias del soluto y la fase móvil en su recorrido por la columna.

### ***Tiempo muerto ( $t_m$ )***

Es el tiempo de retención de una sustancia insoluble en la fase estacionaria (K=0).

### ***Volumen de retención ( $V_R$ )***

Es el volumen de fase móvil necesario para transportar el soluto de un extremo a otro de la co-

## 1.1. Cromatografía de gases

---

lumna. Se denomina volumen de retención neto al volumen verdadero y corregido, el cual se obtiene a partir de la ecuación que involucra además la compresibilidad del gas portador. El volumen de retención específico está delimitado por la temperatura.

### **Retención relativa** ( $r_{x:p}$ )

Conservan las propiedades del coeficiente de reparto y son fáciles de calcular, su manejo se dificulta al momento de elegir un patrón adecuado. Se utiliza para disminuir el efecto de errores, sobre todo, en el conocimiento del peso de la fase estacionaria en la columna.

### **Resolución**

Cada sustancia se desplaza a una velocidad característica dada por el valor de su relación frontal en dichas condiciones. Por tratarse de un método donde se separa por elución es mejor referirse a tiempo de elución más que a distancias recorridas. La resolución se define como el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas y el valor medio de la anchura de las mismas.

### **Eficacia**

Una columna será más eficaz mientras mayor sea el número de placas teóricas que tenga. Para poder hacer comparaciones entre columnas es necesario establecer condiciones similares de trabajo.

[1]

### 1.1.3 Descripción del equipo

El esquema general de un cromatógrafo de gases se muestra en la [Figura 1](#). Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases son: fuente de gas, sistema de inyección, horno y columna cromatográfica, sistema de detección y sistema de registro.

Como fuentes de gas portador se suelen utilizar cilindros de gas comprimido de elevada pureza, capaces de suministrar una presión de gas adecuada y constante; es de hacer notar que, en muchos casos, es necesario eliminar las trazas de impurezas que pueda contener el gas ( $O_2$  y  $H_2O$  fundamentalmente) que pueden afectar al sistema cromatográfico, por medio de filtros adecuados. El control de la velocidad del gas portador a través de la columna, se realiza por medio de válvulas que suministran un caudal constante (columnas empaquetadas) o que mantienen constante la presión en cabeza de columna (sistemas capilares).



## 1.1. Cromatografía de gases

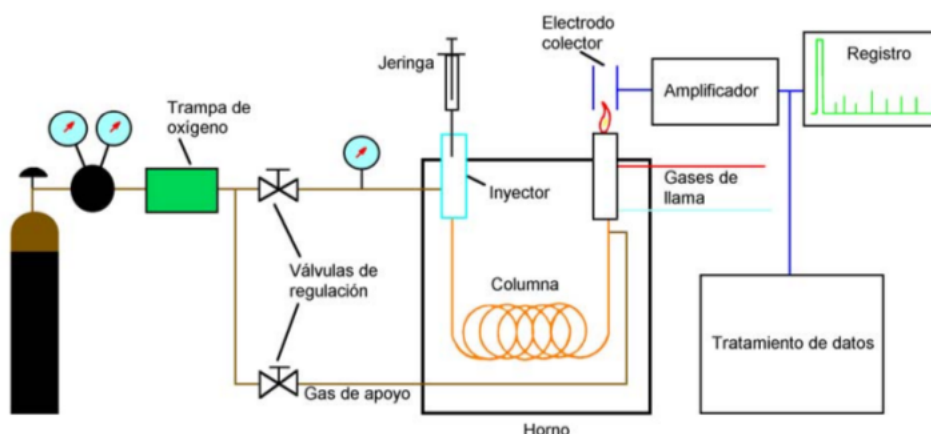


Figura 1: Esquema de un cromatógrafo de gases

El horno de un cromatógrafo de gases, tiene como misión el mantener la columna termostatizada a una temperatura fijada con gran precisión (dentro de unos límites de  $\pm 1$  °C); por otro lado, es necesario que el control de termostatización del horno permita incrementar la temperatura de éste a una velocidad prefijada y constante (para trabajar con técnicas de temperatura programada). Evidentemente, el primer requisito es fácil de cumplir, pero cuando se requiere trabajar con temperatura programada, el horno debe cumplir una serie de requisitos tales como tener escasa inercia térmica (particularmente si es necesario realizar rampas de temperatura muy rápidas) y poseer un sistema de control de temperatura muy sofisticado que incluya la posibilidad de programar las posibles variaciones de temperatura del horno así como los tiempos a los que han de realizarse. [2]

### 1.1.4 Sistemas de introducción de muestras

En esencia, los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

1. La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
2. La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
3. La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

### Inyectores para columnas capilares

La diferencia fundamental entre los sistemas que utilizan columnas empaquetadas y los que utilizan columnas capilares, radica en que la cantidad de muestra que estas últimas pueden separar es mucho menor que en el primer caso; por otra parte, las columnas capilares son muy afectadas por los disolventes, de forma que los volúmenes que se pueden inyectar en ellas son extremadamente bajos.

### Inyección con división de muestra

Este tipo de inyección (más conocida como inyección “split”), es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar. El inyector de “split” (Figura 2), consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna.

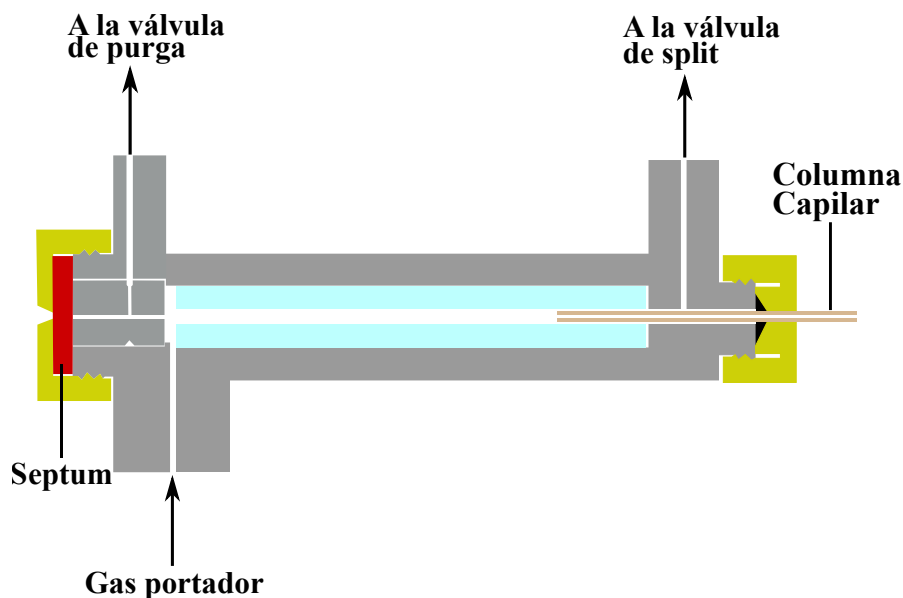


Figura 2: Esquema de un inyector de “split”

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes; en primer lugar la división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas,

## 1.1. Cromatografía de gases

---

por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente a la hora de realizar análisis de trazas. Por otra parte, los inyectores de “split” pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.

### Inyección “splitless”

En la técnica de inyección “splitless”, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada, lógicamente condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis.

La utilización de la técnica de “splitless” supone dos importantes ventajas. En primer lugar, dado que no existe división de muestra, permite un aumento notable de la sensibilidad, por lo que es muy adecuada para el análisis de trazas. Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menor importancia que en otras técnicas de inyección.

El diseño de un inyector “splitless” es básicamente el mismo que el del inyector de “split” (Figura 2), pudiéndose realizar la purga del inyector bien a través de la válvula de split, bien a través de una válvula de purga adicional situada cerca del septum. La mayoría de los inyectores de “split” comerciales, están diseñados para poder trabajar también en modo “splitless”. [2-4]

### 1.1.5 Detectores

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

## 1.1. Cromatografía de gases

---

Los detectores utilizados en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no ofrecen señal cuando pasa por ellos solamente el gas portador y responden ante alguna propiedad que pueda variar cuando este se encuentra mezclado con alguna sustancia eluida de la columna.

Los detectores usados en cromatografía de gases, pueden dividirse de forma genérica en detectores universales y detectores específicos. Algunos tipos de detectores son: detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector), detector termoiónico (TID, ThermoIonic Detector), detector de captura de electrones (ECD, Electron Capture Detector), detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector), etc.

### Detector de ionización de llama (FID)

El detector de ionización de llama, es tal vez el más ampliamente utilizado en cromatografía de gases. Este tipo de detector es en la práctica de respuesta universal, ya que es selectivo hacia los compuestos que presenten enlaces C-H, por lo que son muy pocos los compuestos que no dan señal en él.

En un detector de ionización de llama, el gas procedente de la columna se mezcla con hidrógeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire. Por encima de la llama, se dispone un colector cilíndrico polarizado con el fin de recoger los iones generados; sobre este dispositivo, se mide la corriente iónica que se establece entre la punta del quemador y el electrodo colector.

Los detectores de ionización de llama ofrecen una elevada sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado; todo ello, junto con una gran sencillez de utilización ha hecho que este tipo de detectores, como ya se ha mencionado, sean con mucho los de mayor utilización. [2, 5–7]

### 1.1.6 Columna cromatográfica

Al igual que sucede en todas las técnicas cromatográficas, la columna es el corazón del cromatógrafo de gases. Es necesario tener siempre presente que la columna es el auténtico elemento de separación de los componentes de la muestra; así, una mala elección de la columna, una columna

## ***1.1. Cromatografía de gases***

---

deteriorada o unas condiciones de trabajo inadecuadas, nunca permitirán obtener buenos resultados aunque se disponga del mejor equipo en el resto del cromatógrafo, siendo además las causas citadas las responsables de la mayor parte de los problemas que se encuentran a la hora de realizar un análisis por cromatografía de gases.

Una columna para cromatografía de gases, está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales (preferiblemente inertes), dentro del cual se encuentra la fase estacionaria. Esta puede ser un sólido activo (cromatografía gas sólido), o con mayor frecuencia un líquido depositado sobre las partículas de un sólido portador (columnas empaquetadas o de relleno) o sobre las propias paredes del tubo (columnas tubulares abiertas).

### **Columnas tubulares abiertas**

Las columnas tubulares abiertas (conocidas normalmente como columnas capilares) fueron descritas inicialmente por Golay en 1957, y se encuentran entre las de más amplia utilización debido a la gran eficacia de separación que proporcionan.

Básicamente, una columna tubular está formada por un tubo (normalmente de vidrio o sílice fundida) de un diámetro comprendido entre 0.2 mm y 0.8 mm, en cuya pared interna se dispone la fase estacionaria.

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

El enorme uso que se hace de este tipo de columnas se debe fundamentalmente a la elevada eficacia que ofrecen (son frecuentes valores de 30 000 a 50 000 platos frente a los 2 000 - 4 000 de una columna empaquetada) y permiten la separación de mezclas muy complejas con relativa facilidad; por otra parte, la gran eficacia de este tipo de columnas permite conseguir buenas resoluciones sin recurrir a fases estacionarias de gran selectividad, lo que simplifica mucho el problema de la elección de la fase estacionaria (prácticamente todas las separaciones se pueden realizar con tres o cuatro columnas diferentes).

## 1.2. Validación de métodos analíticos

---

El principal inconveniente de este tipo de columnas es su pequeña capacidad de carga, lo que obliga a utilizar sistemas de inyección especiales para introducir pequeñas cantidades de muestra y detectores de muy alta sensibilidad. [2]

### 1.1.7 La fase estacionaria

La fase estacionaria tiene en cromatografía de gases un papel fundamental, ya que la fase móvil es cromatográficamente inerte y las separaciones son debidas exclusivamente a las interacciones específicas que se dan entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.

Las propiedades que debería cumplir una fase estacionaria son: tener un rango de temperaturas de utilización lo más amplio posible (idealmente entre  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), una presión de vapor lo más baja posible, ser térmicamente estable y químicamente inerte, tener baja viscosidad en las condiciones de trabajo, mojar bien el soporte, presentando además una adherencia suficiente como para que no sea arrastrada por la fase móvil.

Además de cumplir estos requisitos generales, la fase estacionaria debe ser selectiva frente a los compuestos a separar. Evidentemente, no existe ninguna fase estacionaria que cumpla todos los requisitos anteriores, aunque para realizar separaciones a temperaturas elevadas, la utilización de polímeros “líquidos” de elevado peso molecular ofrece resultados bastante buenos.

Para compuestos no polares, las únicas fuerzas de interacción entre el soluto y la fase estacionaria son las dispersivas; este tipo de fuerzas no son selectivas, y en las separaciones basadas en este tipo de fuerzas los solutos emergen de la columna, por lo general, en orden correspondiente a sus puntos de ebullición.

Las características de mayor interés a la hora de seleccionar una fase estacionaria concreta son el rango de temperaturas de trabajo, la viscosidad de la fase dentro de este rango y su capacidad para interactuar de forma selectiva con diferentes solutos. [2, 8–11]

## 1.2 Validación de métodos analíticos

La validación de los métodos analíticos utilizados en la actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de

## ***1.2. Validación de métodos analíticos***

---

calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de los mismos.

### **1.2.1 Determinación de la linealidad**

En ensayos físico – químicos los estudios de linealidad responden al diseño que se describe a continuación:

1. El ensayo se puede efectuar tanto con material de referencia del analito, como con muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de analito que cubran el intervalo del método. Cuando se trata de la valoración de una materia prima se analizan de 3 a 5 soluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 80 % y 120 % de la concentración teórica (el análisis se realiza como mínimo por triplicado).
2. Se evalúan los datos estadísticamente a fin de verificar la linealidad y proporcionalidad según se describe a continuación:
  - Significación de la regresión: se determina el coeficiente de correlación (debe ser  $\geq 0.990$ ) y el de determinación (valores superiores a 0.98).
  - Verificación de linealidad: se efectúa por determinación del CV de los factores de respuesta (cociente respuesta / concentración), el cual no puede ser superior al 5 %. También se evalúa la varianza de la pendiente de la línea de regresión.
  - Verificación de proporcionalidad: los resultados de este ensayo deben incluir el 0 para el grado de probabilidad definido.
  - Prueba de falta de ajuste: se implementa para demostrar que los valores se ajustan a una línea recta.

### **1.2.2 Determinación de la precisión**

En ensayos físico – químicos la evaluación de la precisión sigue los siguientes diseños experimentales:

## **1.2. Validación de métodos analíticos**

---

- Evaluación de la repetibilidad: realizar un mínimo de 6 determinaciones a la concentración del 100 %.
- Evaluación de la precisión intermedia: se implementará un diseño donde se evalúan 3 concentraciones de una muestra (como mínimo) en duplicado, por al menos 2 analistas en 3 días diferentes. Se recomienda, siempre que sea posible, que cada analista emplee instrumentos y materiales diferentes.

En cada caso se calcula la media, desviación estándar típica y el coeficiente de variación (CV). Se implementan pruebas de significación adecuadas para medias y varianzas, siempre que proceda. Los resultados de los estudios de precisión se expresan en términos de CV, el cual no puede exceder el 2 % de variabilidad total en ensayos físico – químicos para los métodos cromatográficos.

### **1.2.3 Determinación de la veracidad**

En ensayos físico – químicos para la evaluación de la veracidad se realizan análisis repetidos de muestras de concentraciones conocidas diferentes por adición de una concentración conocida de un analito o patrón a un placebo. Deberán implementarse entre 6 y 10 ensayos y se calcula el porcentaje de recuperación. Se utilizan 3 concentraciones como mínimo (intervalo alto, medio y bajo) y se realizan los análisis por triplicado. En este tipo de estudio, se evalúa la influencia del factor concentración.

Para que la evaluación de la veracidad se considere satisfactoria, no pueden existir diferencias significativas entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores verdaderos.

### **1.2.4 Determinación del límite de detección y cuantificación**

La determinación de estos límites en ensayos físico – químicos debe responder a los siguientes diseños:

1. Relación señal ruido: se compara la respuesta del blanco (matriz sin analito) con las muestras que contienen pequeñas cantidades de analito adicionadas al blanco. Debe obtenerse el nivel medio de ruido del blanco y se multiplica por 2 o 3 para el límite de detección o por 6 o 10 para el de cuantificación. Posteriormente se comparan estos valores con las respuestas de las series blanco + analito y se halla la concentración de analito que corresponda al valor de la señal.



## ***1.2. Validación de métodos analíticos***

---

2. Por estimación: el límite de detección y el de cuantificación se extrapolan del valor de la ordenada en el origen (en unidades de concentración), de la recta del ensayo de linealidad o por análisis repetido del blanco de la muestra. En todos los casos se aplican cálculos matemáticos para estimar ambos límites y estos son verificados mediante el análisis de muestras que contengan el analito en concentraciones iguales o aproximadas a los límites estimados.

### **1.2.5 Determinación de la especificidad**

La evaluación de la especificidad, en función de las características de los métodos de ensayo, debe estar dirigido a los siguientes aspectos:

1. Identidad: se demuestra que el método es capaz de identificar el principio activo en presencia de otras sustancias.
2. Pureza: se demuestra que el método permite una evaluación cualitativa o cuantitativa de las impurezas específicas.
3. Determinación cuantitativa de un componente: se asegura que la señal medida por el método analítico corresponde exclusivamente al analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

En el caso que los productos de descomposición sean desconocidos o no puedan aislarse se recomienda realizar los siguientes pasos:

- Termólisis: se coloca el analito en un horno a temperaturas entre 70 °C - 120 °C o a 20 °C por debajo del punto de fusión del principio activo.
- Hidrólisis alcalina: por calentamiento a reflujo con hidróxido de sodio (NaOH) durante una hora.
- Hidrólisis ácida: por calentamiento a reflujo con ácido clorhídrico (HCl) durante una hora.
- Fotólisis: someter el analito a degradación en una solución de la misma a la luz ultravioleta de onda corta y a la luz solar directa o indirectamente.

### 1.3. G-0

---

- Oxidación: por calentamiento en baño de María de una solución del analito con gotas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Se analiza además una muestra de: estándar interno en etanol, un lote del analito envejecido y una del analito recién preparada [12–19].

## 1.3 G-0

El 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0), constituye un ingrediente farmacéutico activo, sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas. Se presenta en forma de polvo cristalino de color amarillo con olor característico. Tiene una masa molecular de 139.1112 g/mol y su temperatura de fusión es de 73 °C - 75 °C. Es fácilmente soluble en dimetilsulfóxido, dimetilformamida, cloroformo, polietilenglicol 400, benceno, acetona; soluble en etanol absoluto, metanol absoluto, éter etílico, tetracloruro de carbono, etanol 90 %; poco soluble en etanol 80 %, etanol 70 %; difícilmente soluble en etanol 60 %, éter de petróleo (40 °C – 60 °C) y muy difícilmente soluble en agua.

El derivado furánico G-0 es una sustancia que tiene actividad frente a bacterias y hongos.

Se midió el efecto del G-0 frente a bacterias y hongos, y se demostró que las concentraciones mínimas inhibitorias para las bacterias estudiadas estuvieron entre 100 mg/mL y 200 mg/mL, dentro de las más sensibles están la *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae* y las de mayor resistencia *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; para el caso de los hongos, los mismos fueron sensibles a las diferentes concentraciones del producto, interfiriendo en la germinación de los conidios de todas las especies.

Se demostró la actividad coccidiostática del G-0, se trataron aves con soluciones de G-0 en concentraciones de 2 ppm, 4 ppm y 8 ppm, estos animales previamente fueron infectados con *Eimeria tenella*. El índice anticoccidiano fue elevado y las aves desarrollaron un elevado por ciento de ganancia en peso y un pequeño índice de lesiones.

También se realizaron varios ensayos en el estudio de estabilidad del G-0 y se demostró que almacenado en frascos de vidrio incoloro sufre cambios en sus características organolépticas y en la

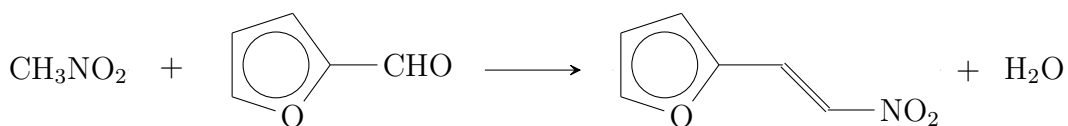
### 1.3. G-0

---

pureza y que por su parte en frascos de vidrio ámbar no se aprecia degradación alguna. Tampoco influyen en él la humedad, ni temperaturas de hasta cerca de 40 °C.

Actualmente, en el CBQ el G-0 se utiliza como un producto intermedio para la obtención de la Furvina<sup>®</sup> (G-1) que es un ingrediente farmacéutico activo de potente acción bactericida y fungicida utilizado en la producción de Dermofural, Furvinol y Vitrofurul.

El G-0 se obtiene mediante la reacción entre el nitrometano y el furfural en presencia de isobutilamina como catalizador, sin el empleo de solventes. La ecuación química que representa la reacción que tiene lugar es la siguiente:



Esta reacción ocurre en fase homogénea y a temperaturas cercanas a 85 °C, al cabo de este tiempo se elimina el calentamiento y al enfriarse la masa reaccionante comienza a cristalizar el G-0 impuro como cristales pardos, que luego se purifican por recristalización en un solvente adecuado [20–22].

# 2 MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Equipos

- Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies 6890N Network Gc System (Estados Unidos), con inyector split/splitless, detector de ionización por llama y columna capilar HP-5 (5 % fenilmetilpolisiloxano), de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 0.50 micras de espesor de película de fase estacionaria.
- Generador de Nitrógeno Peak Scientific (Estados Unidos).
- Generador de hidrógeno CFH200 (Estados Unidos).

## 2.2 Materiales

- Cristalería de uso habitual en el laboratorio.

## 2.3 Reactivos

- Alcohol etílico fino (etanol), AZCUBA.
- G-0 material de referencia, lote 03-1-19 ( 99.95 %).
- G-0, lote 10-1-12.
- Benzoato de etilo para análisis, Panreac (España).
- Hidróxido de sodio para análisis, Merck (Alemania).
- Ácido clorhídrico para análisis, Merck (Alemania).
- Peróxido de hidrógeno, USP35 (Estados Unidos).

### 2.4 Disoluciones

**2.4.1** Disolución de estándar interno: se transfirieron 0.25 mL de benzoato de etilo a un matraz de 100 mL y se enrasó con etanol (disolución 0.013 mol/L) y de esa disolución se tomaron 10 mL y se completó el volumen hasta 100 mL con etanol (disolución 0.0013 mol/L).

**2.4.2** Disolución de G-0 material de referencia: se pesaron con exactitud alrededor de 10 mg de G-0, se transfirieron a un matraz de 10 mL, se añadieron 5 mL de la disolución de estándar interno y se enrasó con etanol (disolución 1 000 mg/L de G-0).

### 2.5 Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Se tomó como referencia una técnica por cromatografía de gases para el estudio de la cinética de la reacción de obtención del bioactivo G-0, desarrollada en el CBQ y publicada en la década del 90. En esta técnica se empleó detector de ionización por llama (FID) y columna empacada de vidrio rellena con SE-30 al 6 % sobre Chromosorb W. Se utilizó el método del patrón interno (benzoato de etilo) y como modo de operación la temperatura programada [23].

#### Condiciones cromatográficas:

##### 1. Temperatura:

- Horno: 120 °C (5.5 min) con una razón de incremento de 20 °C/min hasta llegar a 165 °C (3.5 min).
- Inyector: 230 °C.
- Detector: 280 °C.

##### 2. Gases:

- Flujo de nitrógeno: 40 mL/min.
- Flujo de hidrógeno: 40 mL/min.
- Flujo de aire: 450 mL/min.

## ***2.5. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

### **2.5.1 Establecimiento de los parámetros cromatográficos**

Para el establecimiento de los parámetros cromatográficos se utilizaron siempre inyecciones de las disoluciones descritas en los acápites 2.4.1 y 2.4.2.

#### **2.5.1.1 Selección de la fase estacionaria**

Se utilizó una fase estacionaria de baja polaridad, la HP-5 (5 % fenilmetilpolisiloxano).

#### **2.5.1.2 Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector**

Para el inyector y el detector se mantuvieron las temperaturas descritas en el trabajo de referencia desarrollado en el CBQ: 230 °C y 280 °C, respectivamente [23].

Atendiendo a las características de volatilidad de la muestra, para la temperatura del horno (columna) se probaron las temperaturas siguientes: un gradiente (120 °C, 5 °C/min hasta 240 °C, 5 min) y en modo isotérmico a 120 °C, 130 °C, 140 °C y 150 °C con un tiempo de corrida de 7 min.

#### **2.5.1.3 Selección del flujo de fase móvil**

Se probaron seis flujos de fase móvil (nitrógeno): 0.4 mL/min, 0.5 mL/min, 0.6 mL/min, 0.7 mL/min, 0.8 mL/min y 1.0 mL/min.

#### **2.5.1.4 Volumen de inyección**

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

#### **2.5.1.5 Selección del estándar interno**

Se utilizó como estándar interno el benzoato de etilo que es el mismo de la técnica de referencia dado que tiene propiedades semejantes a las del G-0 (temperatura de volatilización y solubilidad) que le confieren un comportamiento similar al del analito en las condiciones cromatográficas descritas [23].

## ***2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

### **2.5.1.6 Selección del disolvente para la muestra**

En este trabajo se mantuvo el disolvente utilizado en el trabajo de referencia desarrollado en el CBQ: etanol [23].

### **2.5.1.7 Concentración de la muestra**

Se mantuvo la concentración utilizada en el trabajo de referencia desarrollado en el CBQ: 1 000 mg/L [23].

## **2.6 Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0**

### **2.6.1 Pruebas de adecuación del sistema**

#### **2.6.1.1 Repetibilidad de los tiempos de retención**

Se preparó una disolución de G-0 en etanol a 1 000 mg/L de concentración según acápite 2.4.2 y se realizaron 6 inyecciones en el sistema cromatográfico. Se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación del tiempo de retención del pico cromatográfico correspondiente al G-0. La repetibilidad de los tiempos de retención debe ser menor que 1 %.

#### **2.6.1.2 Eficacia de la columna o número de platos teóricos**

Se realizaron 6 inyecciones de la disolución de G-0 con benzoato de etilo en etanol preparada según el acápite 2.4.2 en el sistema cromatográfico. Se calculó el número de platos teóricos a través de la siguiente fórmula:

$$N = 16 \cdot \left[ \frac{t_r}{w} \right]^2 \quad (2.6.1)$$

Donde:

$N$  = número de platos teóricos.

$t_r$  = tiempo de retención del pico en minutos.

$w$  = anchura del pico a media altura en minutos.

## 2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

La eficacia de la columna se recomienda que sea superior a 5 000.

### 2.6.1.3 Simetría del pico de G-0

Se realizaron 3 inyecciones de la disolución de G-0 con benzoato de etilo en etanol preparada según el acápite 2.4.2 en el sistema cromatográfico. El dato del factor de simetría es brindado por el software del cromatógrafo de gases. La simetría del pico debe estar entre 0.8 y 1.5.

### 2.6.2 Linealidad

Para realizar la evaluación de la linealidad se prepararon 3 curvas de calibración en tres días diferentes, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 80 % y 120 % de la concentración teórica, es decir, desde 800 mg/L hasta 1 200 mg/L de G-0. Las disoluciones se prepararon como se describe a continuación:

- Disolución de estándar interno: se preparó como se describe en el acápite 2.4.1.
- Disolución de G-0: se preparó una disolución de G-0 de concentración 10 000 mg/L en etanol, de esta disolución se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL, se le añadió 5 mL de la disolución del estándar interno a cada uno y se enrasó con etanol (Tabla I). Se inyectaron 2 veces en el sistema cromatográfico.

Tabla I: Curva de calibración de la linealidad para G-0.

<i>Alícuota de disolución de G-0 de concentración 10 000 mg/L (mL)</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
0.8	800
0.9	900
1.0	1 000
1.1	1 100
1.2	1 200

Para evaluar la linealidad se consideraron los criterios siguientes:



## ***2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ( $\geq 0.990$ ) y el coeficiente de determinación ( $\geq 0.98$ ), el coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $CV_f$ ) (cociente de respuesta (R) / concentración), el cual no debe ser superior al 5 %. Se evaluó además, la varianza de la pendiente de la línea de regresión, desviación estándar, desviación estándar relativa, límites de confianza de la pendiente y el grado de significación; y se verificó la proporcionalidad (los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para un nivel de confianza de 95 %). También se calculó el coeficiente de calidad, se realizó un análisis de varianza y se obtuvo el gráfico de los residuales.

### **2.6.3 Precisión**

La precisión del método se obtuvo mediante el análisis de la repetibilidad y la precisión intermedia. En todos los casos debe cumplirse que los coeficientes de variación deben ser menores o iguales que el 2 %.

#### **2.6.3.1 Repetibilidad instrumental**

Para G-0 se preparó una disolución de 1 000 mg/L como se describe en 2.4.2. Se inyectó 6 veces en el sistema cromatográfico y se calculó la media de los cocientes de respuesta, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV %).

#### **2.6.3.2 Repetibilidad del método**

Se realizó a tres niveles de concentraciones (nivel bajo, medio y alto de la curva de calibración, 800 mg/L, 1 000 mg/L y 1 200 mg/L) que se obtuvieron a partir de una disolución de G-0 de 10 000 mg/L de concentración en etanol, de la cual se tomaron alícuotas que se transfirieron a matraces de 10 mL, se les adicionó 5 mL de estándar interno y se enrasaron con etanol, se realizó un mínimo de tres determinaciones para cada una. Se calculó la concentración media de los resultados, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la repetibilidad (CV %).

## ***2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

### **2.6.3.3 Precisión intermedia**

Se prepararon 3 concentraciones diferentes de G-0 en etanol (baja, intermedia y alta) con estándar interno, que fueron inyectados en el sistema cromatográfico por duplicado. Este procedimiento se realizó durante 3 días por dos analistas, en el mismo equipo y el mismo laboratorio. Las disoluciones de trabajo se prepararon como se describe en 2.6.3.2.

Se calculó la media de las concentraciones ( $X_m$ ), la desviación estándar ( $S$ ) y el coeficiente de variación ( $CV \%$ ) para cada grupo de análisis y para el total.

Además, se realizó un análisis de varianza multifactorial para analizar la influencia de los factores concentración, analista, réplica y día en la variabilidad de los resultados, para ello se utilizó un estimador que es el  $\ln R^2$  (logaritmo de los residuales al cuadrado), con un nivel de confianza de 95 %.

### **2.6.4 Veracidad**

Para realizar la evaluación de la veracidad se prepararon disoluciones de G-0 en etanol con estándar interno de 800, 1 000 y 1 200 mg/mL (según acápite 2.6.3.2) que posteriormente se inyectaron por triplicado en el sistema cromatográfico.

Se efectuó un test de t-Student para determinar si los valores medios hallados a cada nivel de concentración y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un nivel de confianza de 95 %.

Se calcularon los por cientos de recuperación, los cuales deben estar entre 98 % y 102 %. Se evaluó la influencia del factor concentración mediante un análisis de varianza unifactorial con un nivel de confianza de 95 %.

### **2.6.5 Determinación de los límites de detección y cuantificación**

El procedimiento utilizado para la determinación de los límites de detección y cuantificación fue la extrapolación de la concentración cero a muestras que contienen bajas concentraciones de analito, que se emplea en métodos instrumentales cuando no se utiliza un “blanco” de la muestra. El cálculo se realiza según la ecuación siguiente:

## 2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

---

$$LD \text{ o } LC = \frac{\bar{y}_{bl} + K \cdot S_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2.6.2)$$

Donde:

$LD$ : límite de detección.

$LC$ : límite de cuantificación.

$K$ : constante  $\geq 3$  ( $K = 3$  para límite de detección y  $K = 10$  para límite de cuantificación).

$n$ : número de réplicas.

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

$b$ : pendiente de la recta de calibración.

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

Para hallar los límites de detección y cuantificación se utilizaron 3 muestras de concentraciones bajas (200 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L) las cuales se analizan por triplicado.

En primer lugar y partiendo de las respuestas de cada concentración, se extrapolará gráficamente la respuesta para concentración cero, la cual se tomará como estimación de la respuesta de un blanco hipotético  $\bar{y}_{bl}$ .

A continuación, se determinará la desviación estándar de la respuesta a concentración cero por extrapolación gráfica, la cual se tomará como estimación de la desviación estándar de la respuesta de un blanco hipotético  $S_{bl}$ .

### 2.6.6 Especificidad

Se registraron los cromatogramas de diferentes disoluciones de G-0 en etanol, todas a 1 000 mg/L y en presencia del estándar interno.

- Disolución del estándar interno, se preparó según acápite 2.4.1, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.
- Disolución de G-0 material de referencia recién preparada según acápite 2.4.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.

## ***2.6. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

- c) Disolución de G-0 material de referencia fundido a 70 °C, durante 1 h y posteriormente solidificado, se preparó según acápite 2.4.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.
- d) Disolución de G-0 envejecido (producido en el año 2010), se preparó según acápite 2.4.2, se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.
- e) Disolución de G-0, se preparó según acápite 2.4.2 y después de 24 horas expuesta a la luz del laboratorio se inyectó 3 veces en el sistema cromatográfico.
- f) Hidrólisis ácida, se partió de una disolución de G-0 en etanol 10 000 mg/L. Se tomó 1 mL de esta disolución, 3 mL de etanol y 5 gotas de una disolución de ácido clorhídrico (HCl) 0.2 mol/L en un matraz de 10 mL y se esperaron 4 h protegida de la luz. Pasado ese tiempo se añadieron 5 mL de estándar interno y se enrasó con etanol, se inyectó inmediatamente en el sistema cromatográfico por triplicado.
- g) Hidrólisis básica, se partió de una disolución de G-0 en etanol 10 000 mg/L. Se tomó 1 mL de esta disolución, 3 mL de etanol y 2 gotas de una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1 % en un matraz de 10 mL y se esperaron 4 h protegida de la luz. Pasado ese tiempo se añadieron 5 mL de estándar interno y se enrasó con etanol, se inyectó inmediatamente en el sistema cromatográfico por triplicado.
- h) Oxidación, se partió de una disolución de G-0 en etanol 10 000 mg/L. Se tomó 1 mL de esta disolución, 3 mL de etanol y 2 gotas de una disolución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3 % en un matraz de 10 mL y se esperaron 4 h protegida de la luz. Pasado ese tiempo se añadieron 5 mL de estándar interno y se enrasó con etanol, se inyectó inmediatamente en el sistema cromatográfico por triplicado.

En todos los casos se observó si aparecía algún pico adicional, no suficientemente resuelto, del pico correspondiente al G-0 y el comportamiento del área del pico correspondiente al G-0.

# 3 RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

## 3.1 Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Al cambiar de cromatografía de gases utilizando columna empacada a columna capilar se tiene la ventaja de que estas proporcionan una mayor eficacia, ya que es mucho mayor el número de platos teóricos por metro, por lo que se obtienen separaciones de mayor calidad [24, 25].

### 3.1.1 Selección de la fase estacionaria

Se escogió una fase estacionaria de baja polaridad, 5 % fenilmetilpolisiloxano, ya que es la fase estacionaria más universal y versátil que existe en el campo del análisis por cromatografía de gases. Esta fase es la que más se utiliza para compuestos de baja y mediana polaridad. El pequeño porcentaje de fenilo introducido en la estructura del polímero de dimetilsiloxano (Figura 3) le confiere una afinidad característica hacia los compuestos con anillos aromáticos, como es el caso del G-0 (Figura 4).

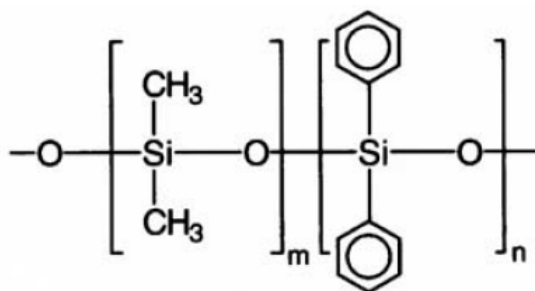


Figura 3: Estructura del poli(dimetildifenil)siloxano.

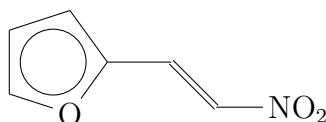


Figura 4: Estructura del G-0.

### ***3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

El G-0 es una sustancia relativamente volátil que experimenta una retención adecuada en este tipo de fase estacionaria.

#### **3.1.2 Selección de las temperaturas del inyector, horno y detector**

Para muestras de poca complejidad, el uso de gradientes de temperatura es un método exploratorio tradicional con vistas a determinar la temperatura óptima del horno para un ensayo isotérmico [2].

Se inyectaron muestras de G-0 disueltas en etanol con estándar interno bajo un gradiente de temperatura (120 °C, 5 °C/min hasta 240 °C, 5 min) y se observó que tanto el G-0 como el estándar interno eluían entre los 3.0 min y los 4.0 min, lo que significa, que eluían encontrándose el horno a 140 °C, por lo que se escogió esta temperatura para trabajar en modo isotérmico.

Además, se inyectaron (en modo isotérmico) muestras de G-0 disueltas en etanol con estándar interno a temperaturas del horno de 120 °C, 130 °C, 140 °C y 150 °C. En todos los casos se mantuvo la simetría del pico, por lo que se corroboró que el pico observado corresponde al G-0 y que no hay coelución de otros analitos.

La temperatura de trabajo del inyector fue de 230 °C, esta temperatura es la adecuada para lograr la volatilización instantánea de la muestra.

La temperatura de trabajo del detector fue de 280 °C para evitar la condensación de componentes de la muestra que pueden afectar su funcionamiento.

#### **3.1.3 Selección del flujo de fase móvil**

La ecuación de Van Deemter relaciona la altura equivalente de plato teórico (H) con la velocidad lineal media de caudal de la fase móvil (v):

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (3.1.1)$$

Donde:

$A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes características de cada columna.

Los datos para obtener el gráfico de la ecuación de Van Deemter se determinaron experimentalmente usando valores de tiempos de retención y anchuras de pico, con el objeto de obtener N (número

### 3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

de platos teóricos) y  $H$ , a distintos flujos de fase móvil. Existe un caudal óptimo para cada columna, correspondiente al mínimo de la curva representativa de esta ecuación.

Según se observa en la [Figura 5](#), flujos de fase móvil entre 0,5 mL/min y 0,7 mL/min proporcionan similar eficacia ( $H$  mínima) por lo que se escoge el valor de 0,7 con vistas a minimizar el tiempo análisis.

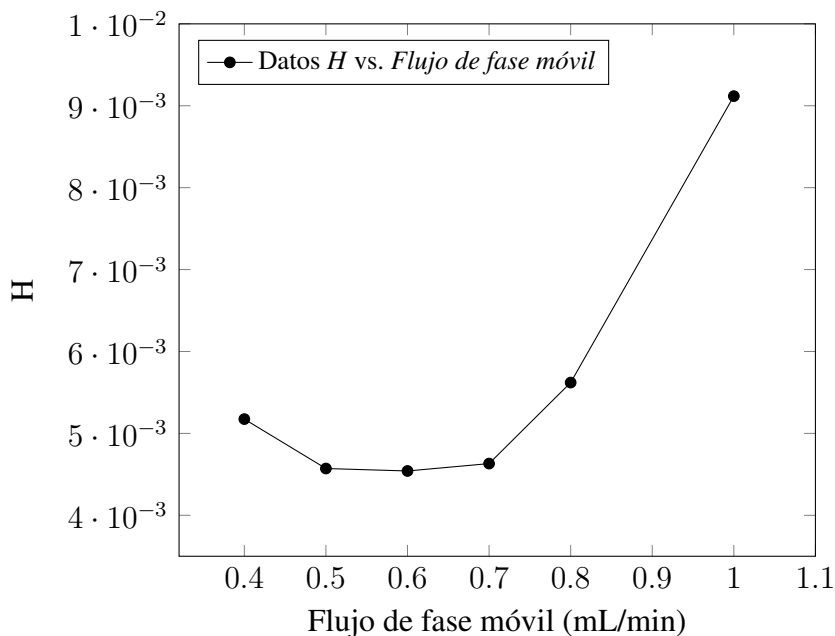


Figura 5: Curva de flujo de fase móvil con respecto a  $H$ .

#### 3.1.4 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 evitar las incertidumbre asociadas al volumen de inyección de la muestra.

Para que una sustancia pueda ser usada como estándar interno debe cumplir los siguientes requisitos:

- 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.

### 3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

- Resultar retenida en el sistema de manera similar a las especies con respecto a las cuales será utilizada como estándar interno.
- No contener impurezas.
- No reaccionar con ninguno de los componentes de la muestra ni alterarse por la matriz de las mismas [2,26,27].

Todas estas condiciones las cumple el estándar interno utilizado en el trabajo desarrollado en el CBQ: benzoato de etilo (Figura 6), cuya temperatura de ebullición es de 211 °C - 213 °C.

En una columna de baja polaridad el benzoato de etilo tendrá un tiempo de retención cercano al del G-0, ya que en columnas de este tipo, el orden de elución se corresponde con el de las temperaturas de ebullición de los analitos [28].

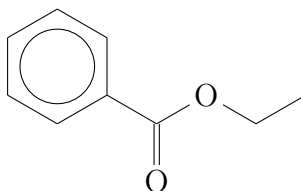


Figura 6: Estructura del benzoato de etilo

En la Figura 7 se observa un cromatograma correspondiente al benzoato de etilo en las condiciones descritas.

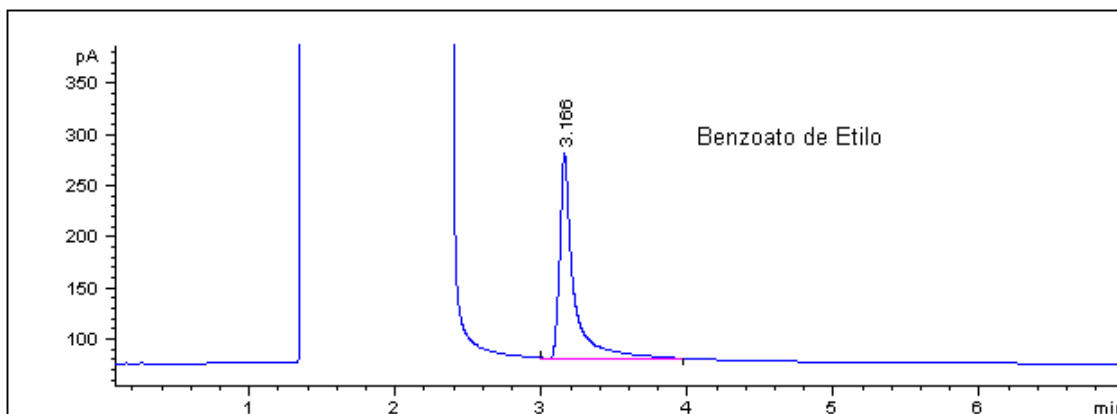


Figura 7: Cromatograma del benzoato de etilo en etanol.



### 3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

#### 3.1.5 Selección del disolvente para la muestra

El disolvente utilizado en cromatografía de gases, además de disolver completamente a la muestra, debe poseer elevada pureza y volatilidad para garantizar que eluya antes de la muestra y que no interfiera con los picos cromatográficos correspondientes a los analitos, por lo que, al igual que en el trabajo de referencia desarrollado en el CBQ, se empleó etanol. Además, el etanol es muy económico (1 L cuesta 0,59 MN), tiene una baja toxicidad y no es necesario importarlo, ya que se obtiene con elevada calidad en el territorio nacional [23].

En la [Figura 8](#) se encuentra un cromatograma del etanol en las condiciones descritas.

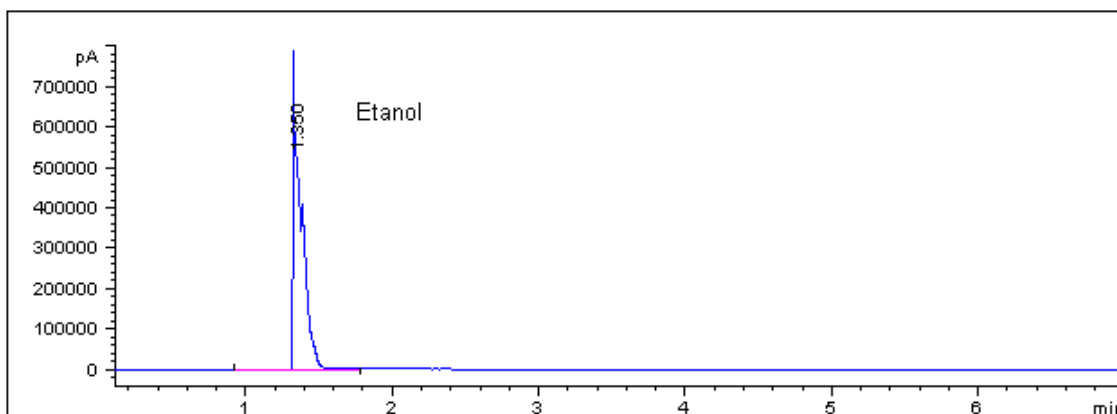


Figura 8: Cromatograma del etanol.

#### 3.1.6 Concentración de la muestra

Aunque la capacidad de carga de las columnas capilares es aproximadamente 100 veces menor que la de las columnas empacadas, se utilizó la misma concentración descrita en el trabajo de referencia desarrollado en el CBQ sin que aparecieran evidencias de sobrecarga de la columna capilar en inyección modo splitless.

#### 3.1.7 Condiciones cromatográficas para el análisis de G-0

Después de evaluar la forma y simetría de los picos y la resolución de cada uno de ellos en los cromatogramas obtenidos con diferentes flujos y temperaturas se seleccionaron las siguientes

### *3.1. Desarrollo de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0*

---

condiciones cromatográficas:

1. Temperatura:
  - Horno: 140 °C.
  - Inyector: 230 °C.
  - Detector: 280 °C.
2. Gases:
  - Flujo de nitrógeno: 0.7 mL/min.
  - Flujo de hidrógeno: 40 mL/min.
  - Flujo de aire: 450 mL/min.
3. Volumen de inyección: 1  $\mu$ L.
4. Modo de inyección: splitless.
5. Tiempo de corrida: 7 min.
6. Disolvente: etanol.
7. Concentración de benzoato de etilo: 0.0013 mol/L.
8. Concentración de G-0: 1 000 mg/L.

En la [Figura 9](#) se observa el cromatograma obtenido para el G-0 bajo estas condiciones cromatográficas. El pico cromatográfico correspondiente al G-0 tiene un tiempo de retención de 3.829 min y el correspondiente al benzoato de etilo de 3.171 min, ambos picos se encuentran bien resueltos y en el caso del benzoato de etilo, el pico tiene una adecuada simetría; sin embargo, en el cromatograma se observa un pico con cola que es el correspondiente al G-0. Es posible que dicha cola se deba a la presencia de compuestos activos que están interviniendo con sitios activos en el inyector o la columna, esto se debe a que en el cromatógrafo en el que se desarrolló el presente trabajo se inyecta una gran variedad de compuestos. Para resolver este problema usualmente se cambia la columna o se le

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

corta una pequeña sección a la que está en uso, pero lamentablemente por razones económicas no fue posible darle solución [29].

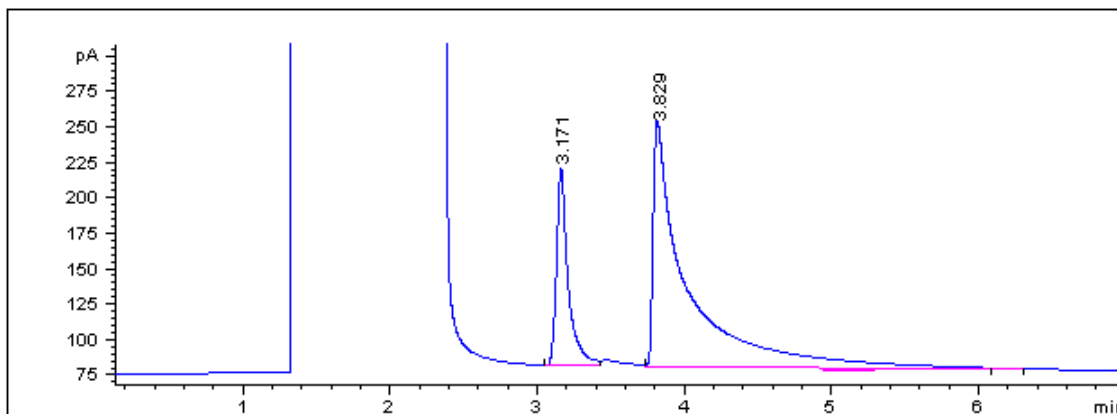


Figura 9: Cromatograma de G-0 disuelto en etanol a 1 000 mg/L con benzoato de etilo como estándar interno.

## 3.2 Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

### 3.2.1 Pruebas de adecuación del sistema

1. La repetibilidad de los tiempos de retención de 6 inyecciones repetidas de una disolución de G-0 de 1 000 mg/L de concentración tiene un coeficiente de variación de 0.36 %, menor que 1 %.
2. El número de platos teóricos de la columna utilizada es de 8 335; mucho mayor que 5 000.
3. La simetría del pico de G-0 no se encuentra en el intervalo entre 0.8 y 1.5.

La asimetría de los picos puede ser debida a un buen número de factores, tanto instrumentales como cromatográficos, entre ellos, resolución incompleta de dos bandas, presencia de puntos de gran actividad en las fases estacionarias, reacciones químicas del compuesto en la columna, volúmenes muertos en el sistema cromatográfico, técnicas de inyección incorrectas, etc [29].

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

---

Aunque prácticamente todos los picos cromatográficos son ligeramente asimétricos, los factores de asimetría exagerados deben ser evitados, tanto por la posibilidad de que se originen errores en la cuantificación, como por la pérdida de resolución que pudiera tener lugar. Para minimizar la influencia de estos factores, a todos los cromatogramas obtenidos se le hizo una revisión exhaustiva de la integración automática que proporciona el software, corrigiendo manualmente la línea base en caso necesario. Respecto a la resolución, en ningún caso aparecen en los cromatogramas picos parcialmente resueltos.

#### 3.2.2 Linealidad

Los valores experimentales que corresponden a la curva de calibración del G-0 se muestran en la [Tabla I](#) donde R es el cociente de respuesta (área del pico cromatográfico correspondiente al G-0 entre el área del pico cromatográfico correspondiente al estándar interno).

Tabla I: Valores experimentales obtenidos para la curva de calibración del G-0.

<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>R<sub>1</sub></i>	<i>R<sub>2</sub></i>	<i>R<sub>3</sub></i>
800	2.332	2.264	2.270
900	2.871	2.767	2.791
1 000	3.211	3.247	3.275
1 100	3.705	3.780	3.730
1 200	4.226	4.178	4.242

---

En la [Figura 10](#) se aprecia la curva de calibración para los valores antes mencionados.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

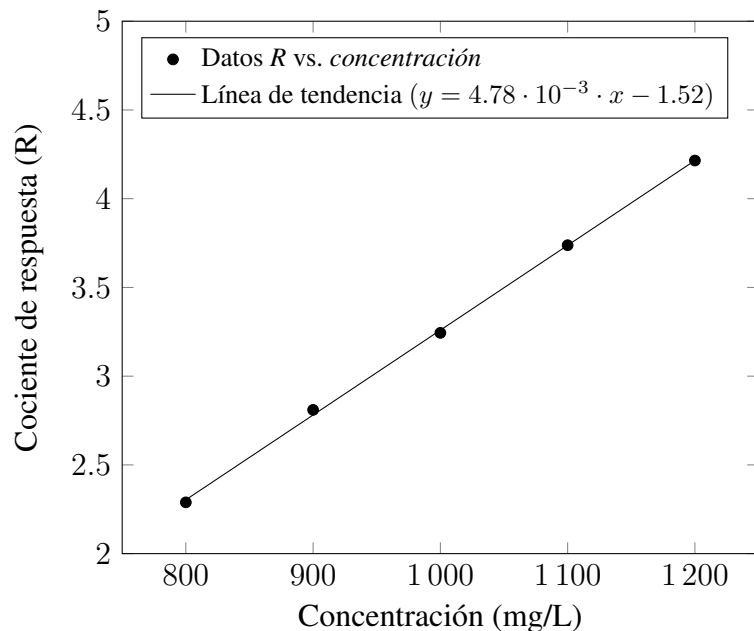


Figura 10: Curva de calibración del G-0.

Del análisis de la regresión y la linealidad, para G-0, se obtiene que:

- El coeficiente de correlación es de 0.9997 con un coeficiente de determinación igual a 0.9994, por lo que existe una correlación positiva entre la concentración y el cociente de respuesta determinado superior al 99.9 %.
- La pendiente (b) es de 0.0048 y la varianza de la pendiente ( $S_b^2$ ) es de  $4.57466 \cdot 10^{-7}$ , por lo que el método posee una buena sensibilidad.
- La desviación estándar de la pendiente ( $S_b$ ) es de  $6.76362 \cdot 10^{-5}$  y la desviación estándar relativa ( $S_b$  rel. %) es igual a 1.41 % ( $\leq 2$  %).
- Los límites de confianza para  $t_{tab} = 3.182$ , con n-2 grados de libertad y  $\alpha = 0.05$ , están entre 0.0046 y 0.0050.
- Para determinar el grado de significación la  $t_{exp} = 70.97$ , de esta manera se acepta  $H_1 : b \neq 0$ , por lo que existe regresión, la probabilidad de que  $b \neq 0$  es superior al 95 %.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

- Al realizar el Test de Cochran  $G_{exp} = 0.24$  y  $G_{tab} = 0.68$  ( $G_{exp} < G_{tab}$ ), o sea, que la varianza de las concentraciones es homogénea, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.
- El coeficiente de calidad tiene un valor de  $0.846 \leq 5\%$ .

Del análisis de la proporcionalidad se obtiene que:

- Los límites de confianza del intercepto (a) para  $t_{tab} = 3.182$  ( $n-2$ ;  $\alpha = 0.05$ ), se encuentran entre -1.305 y -1.739. El Test de t de Student señala que la recta no pasa por el origen de coordenadas, o sea, se rechaza  $H_0 : a = 0$  porque  $t_{exp} > t_{tab}$  ( $t_{exp} = 22.281$ ). Esto significa que durante la determinación hubo un error sistemático por defecto.

Los resultados del análisis de varianza realizado se encuentran en la [Tabla II](#) y muestran que dado que el valor de p es mayor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre el cociente de respuesta (R) y la concentración (Conc) al nivel de confianza del 95 %.

En la [Figura 11](#) se muestra que los residuos se distribuyen como una nube alrededor de cero, dentro de una barra horizontal y no hay ninguna observación anómala.

Tabla II: Análisis de varianza.

<i>Source</i>	<i>Sum Of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Model	6.86026	1	6.86026	4529.43	0.0000
Residual	0.0196897	13	0.00151459		
Lack-of-Fit	0.0037304	3	0.00124347	0.78	0.5320
Pure Error	0.0159593	10	0.00159593		
Total (Corr.)	6.87995	14			

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

---

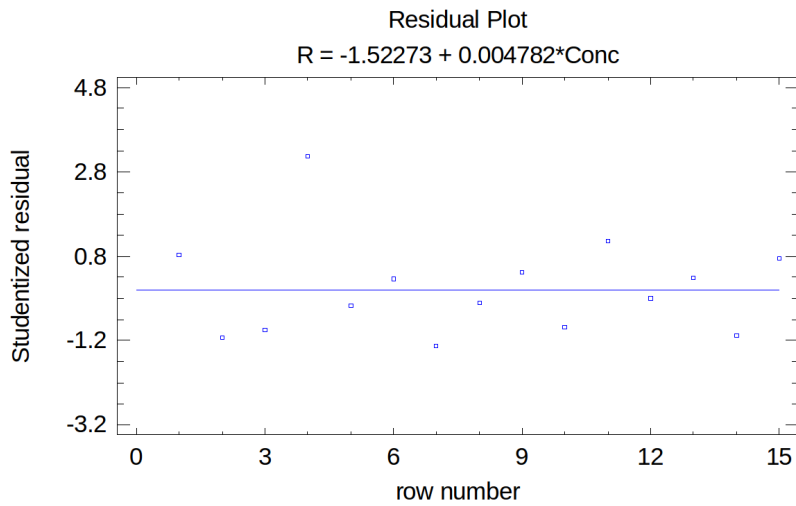


Figura 11: Residuales con respecto al número de réplicas.

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 para el G-0.

### 3.2.3 Precisión

#### 3.2.3.1 Repetibilidad instrumental

Los resultados obtenidos al inyectar 6 veces de manera consecutiva la disolución de concentración 1 000 mg/L de G-0 se encuentra en la [Tabla III](#).

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

---

Tabla III: Resultados de la repetibilidad instrumental para G-0.

<i>Inyecciones</i>	<i>Cociente de respuesta</i>	<i>Parámetros estadísticos</i>
1	3.241	Xm = 3.326
2	3.313	
3	3.312	S = 0.05
4	3.364	
5	3.388	CV (%) = 1.54
6	3.340	

---

La variabilidad de la respuesta, expresada como coeficiente de variación es menor del 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 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.

#### 3.2.3.2 Repetibilidad del método

Los valores experimentales obtenidos en el estudio de repetibilidad del método para G-0 se muestran en [Tabla IV](#).



### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Tabla IV: Resultados de la repetibilidad del método para G-0.

<i>Concentración: 800 mg/L</i>		
<b>R</b>	<b>Concentración de G-0 (X)</b>	<b>Parámetros estadísticos (X)</b>
2.381	813.10	Xm = 818.33
2.415	820.20	S = 4.60
2.422	821.70	CV (%) = 0.56
<i>Concentración: 1 000 mg/L</i>		
<b>R</b>	<b>Concentración de G-0 (X)</b>	<b>Parámetros estadísticos (X)</b>
3.351	1015.20	Xm = 1016.76
3.361	1017.19	S = 1.39
3.364	1017.89	CV (%) = 0.14
<i>Concentración: 1 200 mg/L</i>		
<b>R</b>	<b>Concentración de G-0 (X)</b>	<b>Parámetros estadísticos (X)</b>
4.157	1183.18	Xm = 1185.67
4.173	1186.38	S = 2.22
4.178	1187.45	CV (%) = 0.19

El valor del coeficiente de variación es menor que 2 %, lo cual evidencia que el método de ensayo es repetible.

#### 3.2.3.3 Precisión intermedia

Los valores experimentales obtenidos en el estudio de precisión intermedia para analizar la influencia de los factores concentración, analista y día en la variabilidad de los resultados para G-0 se muestra en [Tabla V](#).

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Tabla V: Resultados de la precisión intermedia para el G-0.

Concentraciones mg/L		Analista I			Analista II		
		800	1 000	1 200	800	1 000	1 200
Día	Réplica	R					
1	1	2.332	3.330	4.155	2.415	3.388	4.242
	2	2.353	3.340	4.157	2.422	3.399	4.243
<b>Xm</b>		<b>2.343</b>	<b>3.335</b>	<b>4.156</b>	<b>2.419</b>	<b>3.394</b>	<b>4.243</b>
<b>S</b>		$1.48 \cdot 10^{-3}$	$7.52 \cdot 10^{-3}$	$1.34 \cdot 10^{-3}$	$5.10 \cdot 10^{-3}$	$7.40 \cdot 10^{-3}$	$9.93 \cdot 10^{-4}$
<b>CV (%)</b>		<b>0.63</b>	<b>0.23</b>	<b>0.03</b>	<b>0.21</b>	<b>0.22</b>	<b>0.02</b>
Día	Réplica	R					
2	1	2.358	3.351	4.173	2.467	3.403	4.262
	2	2.370	3.361	4.178	2.468	3.407	4.266
<b>Xm</b>		<b>2.364</b>	<b>3.356</b>	<b>4.175</b>	<b>2.467</b>	<b>3.405</b>	<b>4.264</b>
<b>S</b>		$8.23 \cdot 10^{-3}$	$6.75 \cdot 10^{-3}$	$3.63 \cdot 10^{-3}$	$3.64 \cdot 10^{-4}$	$2.74 \cdot 10^{-3}$	$2.92 \cdot 10^{-3}$
<b>CV (%)</b>		<b>0.35</b>	<b>0.20</b>	<b>0.09</b>	<b>0.01</b>	<b>0.08</b>	<b>0.07</b>
Día	Réplica	R					
3	1	2.381	3.364	4.217	2.497	3.418	4.293
	2	2.384	3.365	4.226	2.510	3.421	4.314
<b>Xm</b>		<b>2.382</b>	<b>3.364</b>	<b>4.222</b>	<b>2.503</b>	<b>3.420</b>	<b>4.304</b>
<b>S</b>		$2.09 \cdot 10^{-3}$	$6.12 \cdot 10^{-4}$	$6.29 \cdot 10^{-3}$	$9.29 \cdot 10^{-3}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$	$1.51 \cdot 10^{-2}$
<b>CV (%)</b>		<b>0.09</b>	<b>0.02</b>	<b>0.15</b>	<b>0.37</b>	<b>0.07</b>	<b>0.35</b>
<b>TOTAL</b>							
<b>Xm</b>		<b>2.363</b>	<b>3.352</b>	<b>4.184</b>	<b>2.463</b>	<b>3.406</b>	<b>4.270</b>
<b>S</b>		$1.93 \cdot 10^{-2}$	$1.42 \cdot 10^{-2}$	$3.04 \cdot 10^{-2}$	$3.84 \cdot 10^{-2}$	$1.23 \cdot 10^{-2}$	$2.85 \cdot 10^{-2}$
<b>CV (%)</b>		<b>0.82</b>	<b>0.42</b>	<b>0.73</b>	<b>1.56</b>	<b>0.36</b>	<b>0.67</b>

En todos los casos, tanto en los diferentes días, como a las diferentes concentraciones y en los diferentes analistas se obtienen valores de coeficiente de variación menores de 2 %.

Los resultados del análisis de varianza multifactorial para analizar la influencia de los factores concentración, día, analista y réplica en la variabilidad de los resultados se presentan en la [Tabla VI](#) y en la [Figura 12](#).

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Tabla VI: Análisis de varianza multifactorial.

Source	Sum Of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Conc	3.21596	2	1.60798	0.28	0.7601
B:Día	13.8219	2	6.91093	1.19	0.3186
C:Analista	19.1907	1	19.1907	3.30	0.0794
D:Réplica	19.2949	1	19.2949	3.32	0.0786
RESIDUAL	168.394	29	5.8067		
TOTAL (CORRECTED)	223.918	35			

Como se observa en la [Tabla VI](#) al analizar la influencia de los factores concentración, analista, réplica y día en la desviación estándar de los resultados se obtuvo que al analizar cada uno de los factores no existen diferencias significativas dado que el valor de p es mayor que 0.05.

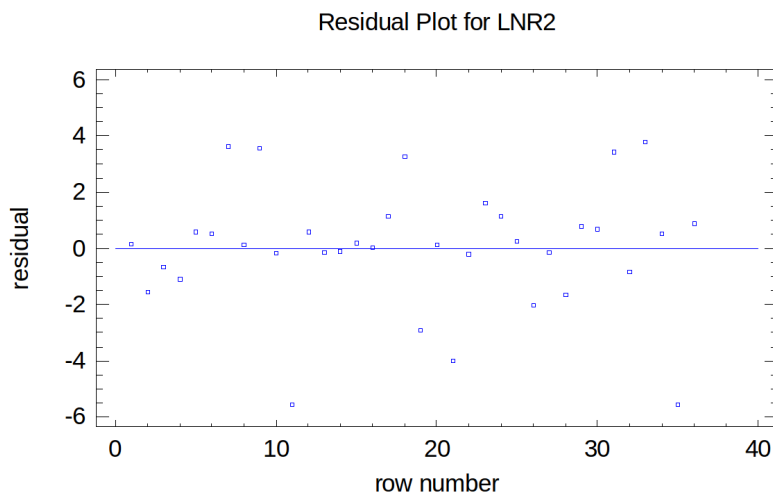


Figura 12: Residuales con respecto al logaritmo de los residuales al cuadrado (LNR2).

La [Figura 12](#) muestra que los logaritmos de los residuales al cuadrado se distribuyen como una nube alrededor de cero, dentro de una barra horizontal y no hay ninguna observación anómala.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

Los parámetros calculados para evaluar la precisión cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es precisa en el intervalo de concentraciones estudiado para el G-0.

#### 3.2.4 Veracidad

Los resultados de la determinación de la exactitud en base al % de Recuperación de G-0 se encuentran en la [Tabla VII](#) y la [Tabla VIII](#).

Tabla VII: Resultados de la exactitud para G-0, a tres niveles de concentración.

Concentración (mg/L)	R	Concentración real (mg/L)	CV (%)	% de Recuperación
800	2.332	802.96	0.63	100.37
	2.358	808.42		101.05
	2.381	813.10		101.64
1 000	3.313	1007.31	0.52	100.73
	3.364	1017.92		101.79
	3.340	1012.98		101.30
1 200	4.266	1205.91	0.35	100.49
	4.242	1 200.82		100.26
	4.226	1197.57		100.26

Tabla VIII: Resultados de la evaluación de la veracidad del método.

Parámetro	Valor	Criterio de comparación
	2.787	
$t_{exp}$	4.156	$t_{tab} = 4.303$
	0.590	

A los tres niveles de concentración se obtuvieron por cientos de recuperación entre 98 % y 102 % (criterio aceptado para métodos cromatográficos) y en los tres casos las  $t_{exp}$  son menores que la

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

$t_{tab}$  para  $n-1$  grados de libertad y  $p = 0.05$ , lo cual significa que los valores obtenidos a las tres concentraciones no son estadísticamente diferente de los valores teóricos.

Los resultados del análisis de varianza realizado se encuentran en la [Tabla IX](#), la [Figura 13](#) y la [Figura 14](#).

Tabla IX: Análisis de varianza.

Source	Sum Of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.40847	2	0.704233	3.01	0.1247
Within groups	1.40593	6	0.234322		
Total (Corr.)	2.8144	8			

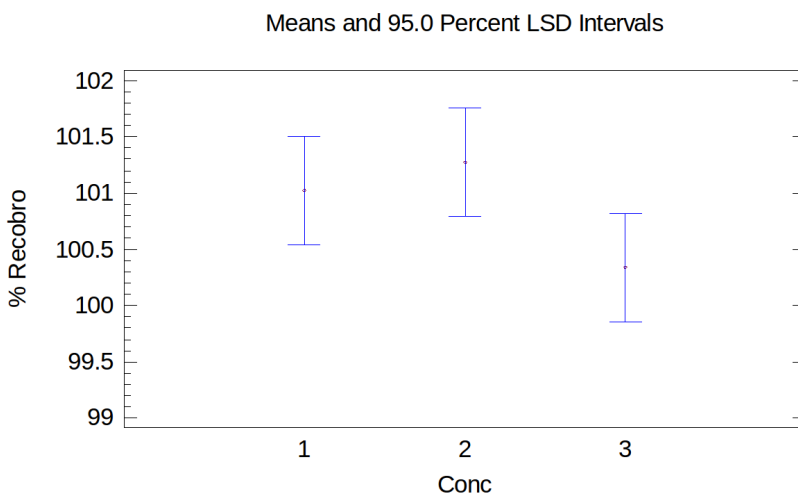


Figura 13: Ploteo de las concentraciones contra los % de Recuperación.

Como bien se observa en la [Tabla IX](#) el valor de  $p$  es mayor que  $0.05$  por lo que no existe influencia del factor concentración en los valores de % de Recuperación, lo cual se considera en la [Figura 13](#) donde el intervalo para el nivel de concentración está incluido dentro de los otros dos.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

---

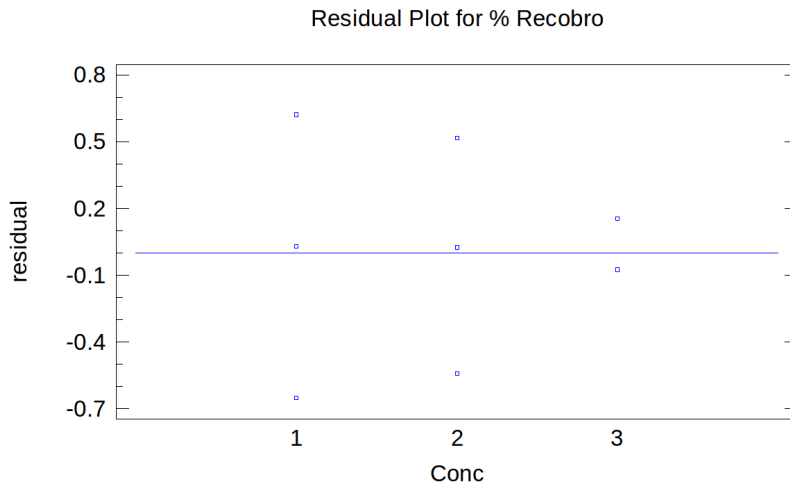


Figura 14: Residuales con respecto a los % de Recuperación.

La Figura 14 muestra que los residuales del % de Recuperación de G-0 se distribuyen como una nube alrededor de cero, dentro de una barra horizontal y no hay ninguna observación anómala.

Los parámetros calculados para evaluar la veracidad cumplen con los criterios de aceptación correspondientes, lo que indica que la técnica es veraz (exacta) en el intervalo de concentraciones estudiado para el G-0.

#### 3.2.5 Límites de detección y cuantificación

El resultado para la determinación del límite de detección y límite de cuantificación es el siguiente:

- El límite de detección es 83 mg/L.
- El límite de cuantificación es 99 mg/L.

#### 3.2.6 Especificidad

A continuación se exponen los cromatogramas registrados durante el estudio de la especificidad de diferentes disoluciones de G-0, todas a 1 000 mg/L y en presencia del estándar interno.

- En la Figura 15 se observa el cromatograma del estándar interno en etanol.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

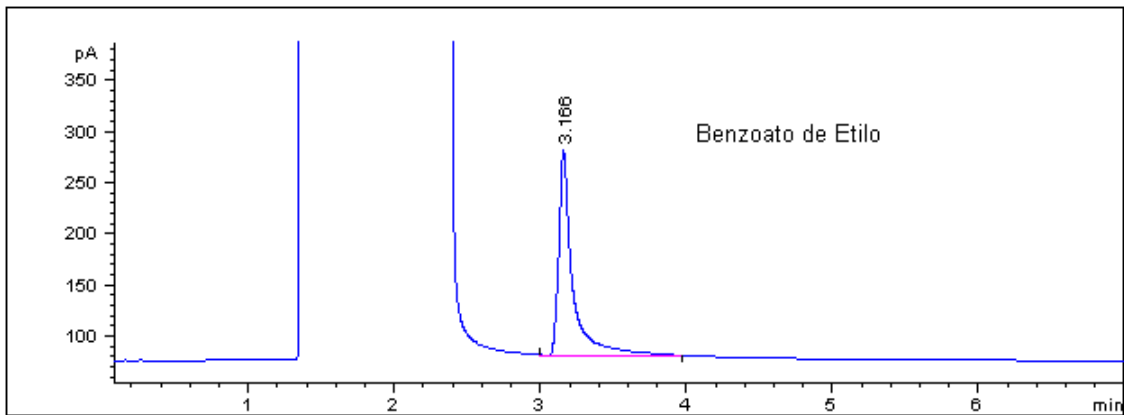


Figura 15: Cromatograma del benzoato de etilo en etanol.

b) En la [Figura 16](#) se observa el cromatograma del G-0 con estándar interno en etanol.

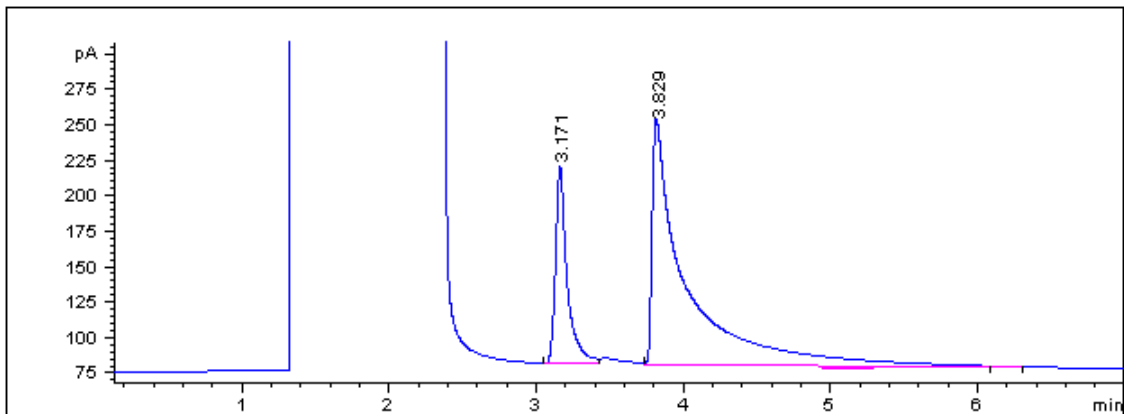


Figura 16: Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo (solución recién preparada).

c) En la [Figura 17](#) se observa el cromatograma del G-0 fundido a 70 °C con estándar interno en etanol.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

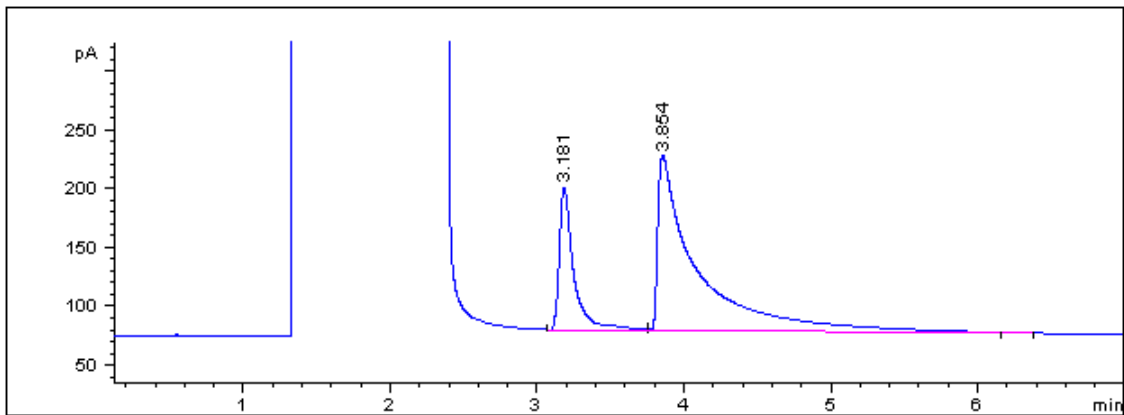


Figura 17: Cromatograma del G-0 fundido a 70 °C en etanol con benzoato de etilo.

d) En la [Figura 18](#) se observa el cromatograma del G-0 envejecido con estándar interno en etanol.

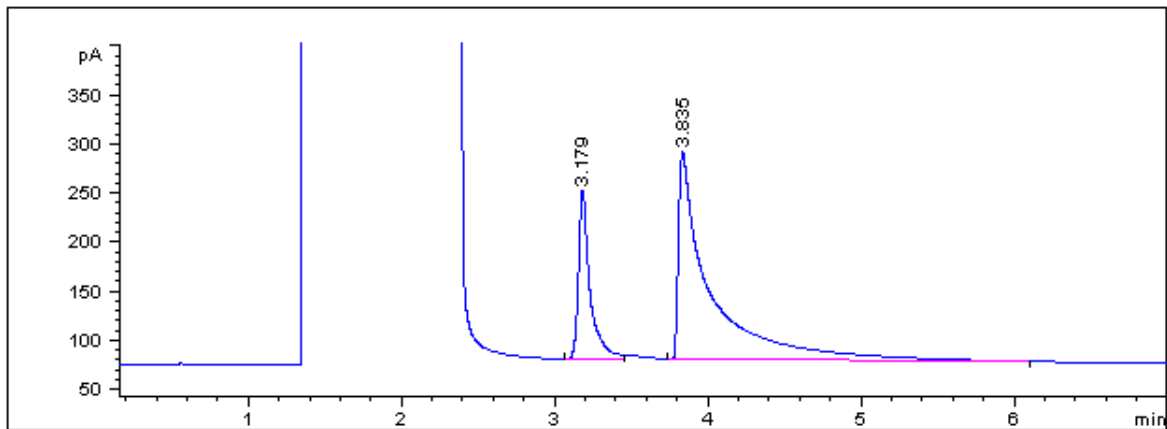


Figura 18: Cromatograma del G-0 envejecido en etanol con benzoato de etilo.

e) En la [Figura 19](#) se observa el cromatograma del G-0 con estándar interno en etanol y expuesto a la luz del laboratorio durante 24 h.



### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

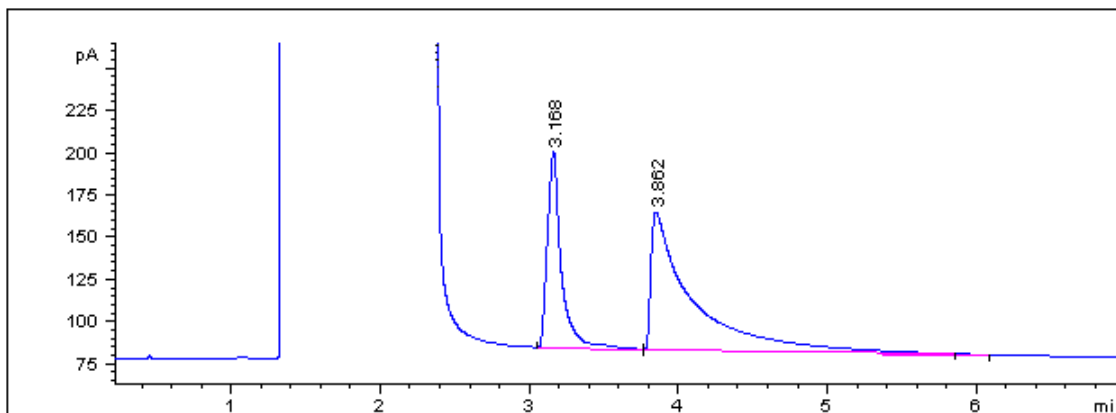


Figura 19: Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de 24 h de exposición a la luz del laboratorio.

- f) En la [Figura 20](#) se observa el cromatograma del G-0 con estándar interno en etanol después de una adición de 5 gotas de HCl 0.2 mol/L.

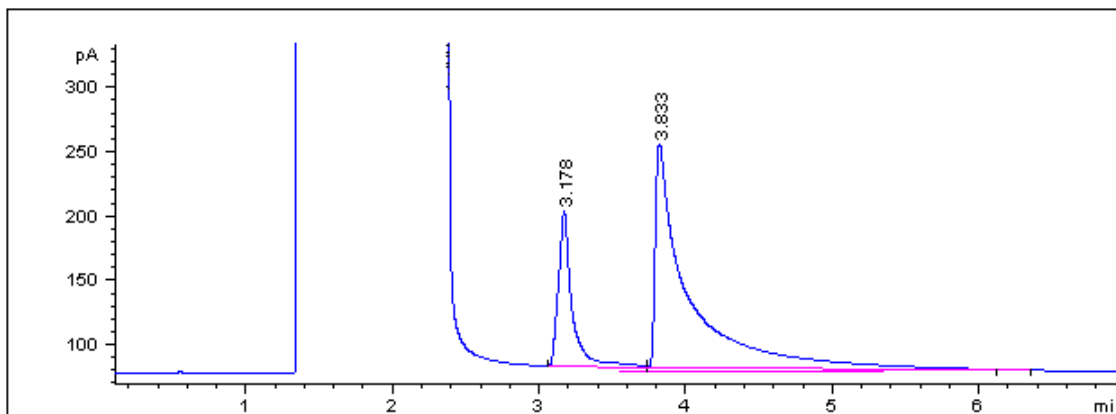


Figura 20: Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle HCl 0.2 mol/L.

- g) En la [Figura 21](#) se observa el cromatograma del G-0 con estándar interno en etanol después de una adición de 2 gotas de NaOH al 1 %.

### 3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0

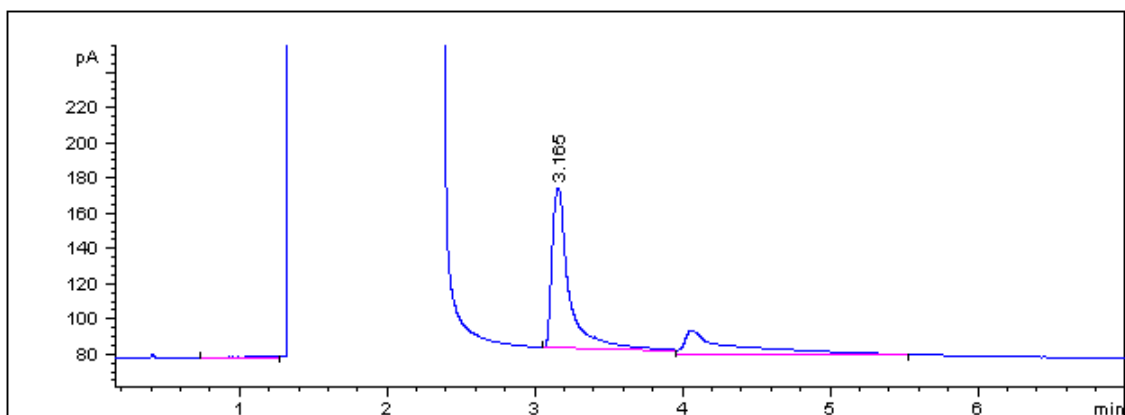


Figura 21: Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle NaOH al 1 %.

- h) En la [Figura 22](#) se observa el cromatograma del G-0 con estándar interno en etanol después de una adición de 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %.

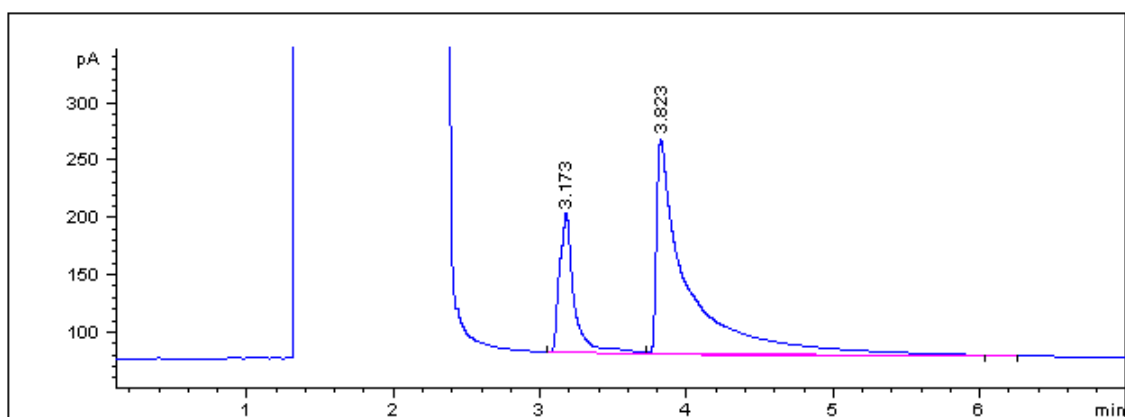


Figura 22: Cromatograma del G-0 en etanol con benzoato de etilo luego de añadirle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %.

Al observar los diferentes cromatogramas de las muestras de G-0: recién preparada ([Figura 16](#)), fundido ([Figura 17](#)), envejecido ([Figura 18](#)) y bajo la acción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % ([Figura 22](#)) y HCl 0.2 mol/L ([Figura 20](#)), respectivamente, se puede apreciar que en todos ellos no hay diferencias significativas en cuanto a sus cocientes de respuesta. Sin embargo, en la muestra expuesta a la luz del laboratorio ([Figura 19](#)) el área del pico del G-0 disminuyó en un 36.62 %, mientras que en la solución a la cual se le añadió NaOH al 1 % ([Figura 21](#)) disminuyó en un 91.35 % y se evidencia que hubo degradación del producto bajo análisis.

### ***3.2. Validación de la técnica por cromatografía de gases para determinar la pureza del G-0***

---

En todos los casos se observa que no hay ningún pico cromatográfico adicional no suficientemente resuelto del pico correspondiente al G-0, por lo que se concluye que el método en las condiciones estudiadas es específico.

## CONCLUSIONES

1. La utilización de cromatografía de gases con detector FID permitió establecer un procedimiento para la determinación del contenido de G-0 en lotes de producción.
2. El procedimiento desarrollado resultó ser específico, lineal en el intervalo de concentraciones de 800 mg/L a 1 200 mg/L, preciso, exacto; con límite de detección igual a 83 mg/L y límite de cuantificación igual a 99 mg/L.

## RECOMENDACIONES

- Aplicar el procedimiento por cromatografía de gases para la determinación del contenido de 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0) a muestras reales porque durante el período en el que se desarrolló este trabajo no se produjo un nuevo lote de producción.
- Repetir el procedimiento por cromatografía de gases para la determinación del contenido de 2-[(E)-2-nitroetenil]furano (G-0) utilizando una nueva columna cromatográfica con el objetivo de mejorar la simetría de los picos.

- [1] Olguín LP, Magadán H, Rodríguez M. Métodos en biotecnología. Instituto de biotecnología. 2004;p. 3–45. Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia%7B%7Dde%7B%7Dgases.pdf>.
- [2] Fleurence J. Cromatografía de gases; 2012. Available from: <http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es%7B%7DES/investigacion/cromatografia/cromatografia%7B%7Dde%7B%7Dgases.pdf>.
- [3] Chasteen TG. Split / Splitless Gas Chromatography Injection. Department of Chemistry, Sam Houston State University. 2010; Available from: <http://www.shsu.edu/chm%7B%7Dtgc/primers/pdf/GC.pdf>.
- [4] Hinshaw JV, Taylor T. Split / Splitless Injection for Capillary GC; 2009. Available from: <http://www.chromacademy.com/Essential%7B%7DGuide%7B%7DWebcast/Split%7B%7DSplitless%7B%7DInjection/Split%7B%7DSplitless%7B%7DInjection.pdf>.
- [5] Rather MA, Dar BA, Shah WA, Prabhakar A, Bindu K, Banday JA, et al. Comprehensive GC-FID, GC-MS and FT-IR spectroscopic analysis of the volatile aroma constituents of *Artemisia indica* and *Artemisia vestita* essential oils. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014 jun; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214000938><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535214000938>.
- [6] Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR, Rezaee Aghdam S, Nouri N, Bamorowat M. Application of elevated temperature-dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides residues in aqueous samples followed by gas chromatography-

## *Bibliografía*

---

- flame ionization detection. *Food Chemistry*. 2016 dec;212:198–204. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616308469>.
- [7] Colón LA, Baird LJ. Detectors in Modern Gas Chromatography. In: *Modern Practice of Gas Chromatography*; 2004. p. 275–337. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/0471651141.ch6>.
- [8] Blumberg LM. *Theory of Gas Chromatography*. Elsevier Inc.; 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>.
- [9] Dorman FL, Whiting JJ, Cochran JW, Gardea-Torresdey J. Gas chromatography. *Analytical Chemistry*. 2010;82(12):4775–4785.
- [10] Poole CF. *Gas Chromatography*. Handbooks in Separation Science Series. Elsevier; 2012.
- [11] Dettmer-Wilde K, Engewald W. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. Springer Berlin Heidelberg; 2014.
- [12] Anexo No I de las buenas prácticas para laboratorio de control de medicamentos Validación de métodos analíticos . *Validación de métodos analíticos*; 2012. Available from: [www.cecmmed.sld.cu](http://www.cecmmed.sld.cu).
- [13] *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*; 2015.
- [14] Armas MD, Oramas IH, Marcia Martínez de Santelices Cuervo. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Revista Cubana de Farmacia*. 1998;32(2):106–112.
- [15] Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2002;74(5):835–855.
- [16] Mendez ASL, Steppe M, Schapoval EES. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003;33(5):947–954.

## *Bibliografía*

---

- [17] ICH. Validation of a analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). Guidance. 2005;1994(November 1996):17.
- [18] Guidelines for Validation of Chemical Testing Methods for Foods. 2010;(261).
- [19] Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos; 2016.
- [20] Berges JC. Desarrollo de técnicas analíticas para el control del nitrometano y furfural en el LPBQ por polarografía diferencial de pulso. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 1998.
- [21] Negrín ZR, Montenegro ON, Placeres EG, Martínez BH, Meseguer GP, Paz UdP. Técnicas analíticas y estadísticas aplicadas al proceso de producción de G-0 y G-1 en el LPBQ; 2000.
- [22] Irina Márquez Gómez. Evaluación de la contaminación atmosférica generada por la emanación gaseosa durante reacción de síntesis del 2-(2-nitrovinil)furano. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2003.
- [23] Sánchez LRB, Toledo FB, Brito RA. Técnicas cromatográficas para el estudio de la cinética de la reacción de obtención del bioactivo 1-(fur-2-il)-2-nitroeteno. Afinidad; 1994.
- [24] Mendoza J. Cromatografía de gases; 2012. Available from: <https://www.u-cursos.cl/usuario/2775c7595e300ed228a801eb8341e457/mi{ }blog/r/GC{ }Clase{ }1{ }{ }QAI-2012.pdf>.
- [25] Tema 3. Cromatografía de gases; 2017. Available from: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>.
- [26] Tema 6: Técnicas cromatográficas; 2017. Available from: <http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia{ }archivos/Quimicaanaliticaambiental/Tema6.pdf>.
- [27] Conceptos fundamentales de cromatografía; 2017. Available from: <http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es{ }ES/investigacion/cromatografia/principios{ }de{ }cromatografia.pdf>.



## ***Bibliografía***

---

- [28] Técnicas Cromatográficas; 2007. Available from: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatogrficos{ }6700.pdf>.
- [29] Cudas A. Fundamentos de Cromatografía Gaseosa; 2016. Available from: <http://analitica.com.py/materiales/Curso-GC.ppt>.