

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE EFEDRINA Y CODEINA EN
TABLETAS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

281

T E S I S
Q U E P A R A O B T E N E R
E L T I T U L O D E :
Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O
P R E S E N T A
M A R G A R I T A L U N A R E Y E S



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis

FECH. 1976

RECOC. Mt

274



QUIMIA

PRESIDENTE : DRA. OFELIA ESPEJO DE OCHOA.
VOCAL : QFB. ANDRES ZUÑIGA PADILLA.
SECRETARIO : QFB. JOSE LUIS IBARMEA AVILA.
1er. SUPLENTE : QFB. HECTOR JARA FARJEAT. ✓
2do. SUPLENTE : QFB. ALFREDO GARZON SERRA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

LABORATORIO DE CONTROL DE
PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A. CHINOIN*

SUSTENTANTE : MARGARITA LUNA REYES. 

ASESOR DEL TEMA : QFB. JOSE LUIS IBARMEA AVILA 

SUPERVISOR TECNICO : IQ. MANUEL SANCHEZ RUBIO 

A la memoria de mi madre.

A mi padre.

con cariño y gratitud.

A mis hermanas y hermanos.

Con cariño y admiración a la Q. F. B.
Alicia Jiménez Hernández por su espíritu
de superación a la adversidad.

En reconocimiento a la responsabilidad y dedicación al trabajo de la QBP. Juliana Marquina Mercado que – con su estímulo contribuyó a la terminación de este es tudio.

Los conocimientos profesionales y científicos son como un paisaje maravilloso y para apreciar mejor su belleza es necesario de vez en cuando - subir a una montaña y contemplar todo cuanto - le rodea evocando el pasado y pensando en el futuro.

CAPITULOS

- I. INTRODUCCION.
- II. GENERALIDADES.
- III. PARTE EXPERIMENTAL.
- IV. RESULTADOS.
- V. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.
- VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

I. INTRODUCCION.

La elaboración de los medicamentos es un proceso constituido por diferentes etapas y cada una de ellas es importante porque el producto final debe reunir ciertas condiciones necesarias para obtener los efectos farmacológicos preventivos o curativos a que han sido destinados.

Una de las etapas que se lleva a cabo durante el proceso mencionado es el control de calidad de cada uno de los componentes, destacando entre ellos los principios activos que en las diversas formas farmacéuticas producirán determinado efecto, lo que hace necesario se encuentren dentro de límites que proporcionen las condiciones adecuadas para su administración y aprovechamiento.

El estudio que permite el uso de las sustancias consta de numerosas determinaciones que pueden reunirse en tres grupos que son los siguientes :

- a) Identificación
- b) Determinación de impurezas o contaminantes.
- c) Evaluación de la pureza

Cada uno de los componentes de un producto farmacéutico es sometido a éste proceso analítico de cuyos resultados dependerá su uso en la elaboración

ción de los medicamentos.

Un proceso semejante se efectúa cuando se encuentran los principios-activos en las diferentes formas farmacéuticas, esto es, deben cumplir normas — que aseguren la biodisponibilidad del fármaco después de su administración por la vía adecuada.

Dos determinaciones comunes a todos los productos, son la identificación y cuantificación de los principios activos por métodos analíticos muy diversos; uno de éstos es la Cromatografía de Gases o Cromatografía en Fase de Vapor por cuyo uso se incrementa constantemente en el análisis de productos farmacéuticos, porque permite la identificación y evaluación de las sustancias cuando éstas se encuentran mezcladas.

Teniendo como base las consideraciones anteriores se procedió a efectuar un estudio para establecer una técnica de análisis por Cromatografía de Gases de un producto farmacéutico en forma de tabletas que contienen como principios activos Clorhidrato de Efedrina y Clorhidrato de Codeína cuyo análisis una vez que se encuentran mezcladas es laborioso por otros procedimientos.

Hago patente mi agradecimiento al Dr. José Kuthy Porter, Gerente General de los LABORATORIOS PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A., CHINOIN*, así como al Ing. Eric Hagsater Gartenberg por las facilidades brindadas para llevar a cabo dentro del Departamento de Control de Calidad la parte experimental de esta tesis.

De la misma manera agradezco al QBF. José Luis Ibarnea Avila y -

al IQ. Manuel Sánchez Rubio, su acertada asesoría, al QBF. Héctor Jara Farjeat por su orientación, al QFB, Adolfo Galicia Anaya y a la QFB. Patricia - Lara Fersuli por el estímulo y apoyo y a todos aquellos quienes han hecho posible y contribuído de alguna manera a mi formación humana y profesional.

II. GENERALIDADES.

Las características o normas que hacen a un fármaco aceptable se encuentran en forma de monografía en las Farmacopeas de cada país, en donde se describen los métodos y límites de tolerancia, así como las condiciones en que se realizarán cada una de las pruebas tanto para las sustancias como para las formas farmacéuticas que deben encontrarse en condiciones de ser administradas.

Las determinaciones que permiten el uso de cada uno de los componentes de un producto farmacéutico pueden reunirse en los siguientes grupos : -

(1)

1.- Identificación, considerando sus propiedades.

- a) Organolépticas; estado físico, aspecto, color, sabor, olor.
- b) Físicoquímicas; Punto de fusión, punto de ebullición, grado de acidez, densidad, viscosidad, conductividad térmica, índice de rotación, índice de refracción, absorción de las radiaciones del espectro electromagnético (visible ultravioleta o infrarrojo), etc.
- c) Químicas; determinación de las sustancias inorgánicas por sus iones o de las sustancias orgánicas por los grupos funciona-

les que predominen.

- 2.- Determinación de impurezas o contaminantes por medio de pruebas cualitativas que permiten el uso de las sustancias sin que afecten la calidad del producto como son: la humedad, residuo fijo, sustancias solubles o alcalinas, metales pesados, y otros.
- 3.- Evaluación de la pureza por diversas técnicas cuantitativas determinando algún radical o grupo funcional característico.

De las determinaciones anteriores, se efectuarán las que se consideren suficientes para permitir el uso según su procedencia y el fin a que serán destinadas.

En el Control de Calidad de las formas farmacéuticas, una vez que han sido aprobados cada uno de sus componentes, dos determinaciones comunes a todas ellas son la identificación y cuantificación de las sustancias activas. Los métodos son numerosos, sencillos o complicados dependiendo de factores como son: la forma farmacéutica en que se encuentre, cantidad, número de principios activos, propiedades químicas o fisicoquímicas semejantes de los componentes de las mezclas, pureza de los reactivos así como de la sensibilidad de los instrumentos empleados.

Frecuentemente es necesario analizar un producto por dos o más métodos según el grado de dificultad que implique la separación y cuantificación para obtener resultados reproducibles en el menor tiempo posible y con el menor número de manipulaciones para evitar fuentes de error.

Los métodos empleados en la identificación de los principios activos son básicamente las que se efectúan para las materias primas, pero en las formas farmacéuticas es necesaria la separación previa de los vehículos o excipientes para evitar interferencia en los resultados.

En la evaluación del Clorhidrato de Efedrina y del Clorhidrato de Codeína en tabletas se han utilizado técnicas que son funcionales para cada una de dichas sustancias, pero mezcladas ofrecen dificultades para su cuantificación teniendo que recurrir a ciertos artificios matemáticos como en el método espectrofotométrico al ultravioleta, o bien por determinaciones espectrofotométricas de soluciones coloridas, producto de reacciones químicas que son estables por lapsos de tiempo muy pequeños.

También pueden determinarse valorando alguno de los grupos químicos característicos o bien por sus características fisicoquímicas como la solubilidad, que es semejante en ambas sustancias; éstas y otras propiedades afines hacen laborioso el control analítico de este producto.

Uno de los métodos que permiten la separación de los componentes de una mezcla, así como su identificación y evaluación a la vez, es la Cromatografía de Gases, que debido a las posibilidades de modificar uno o varios de los parámetros que constituyen el sistema se pueden establecer condiciones de análisis que sean reproducibles para las mezclas de componentes conocidos difíciles de separar por procedimientos diferentes.

Los métodos cromatográficos se han utilizado desde su inicio con pro-

pósitos analíticos al estudiar algunos complejos naturales y sustancias sintéticas que por otros procedimientos analíticos eran imposible determinar. Al mismo tiempo en los últimos años se ha aplicado en la preparación de sustancias puras, determinación de constantes físico-químicas, estudios de reacciones cinéticas, investigación de estructuras moleculares, etc. (2) (3) (4).

Un método esencialmente cromatográfico, a mediados del siglo pasado, era la clarificación de soluciones de azúcar, Day a fines del mismo siglo (2) efectuó los primeros experimentos pasando aceite crudo a través de una columna empacada con tierra de fuller finamente pulverizada y colectando fracciones de petróleo similares a las obtenidas por destilación. Tswett en el Instituto de Botánica de Varsovia, publicó un artículo en 1906, en donde describía la separación de los componentes coloridos de las hojas verdes sobre una columna absorbente de carbonato de calcio, después de lavar con éter de petróleo los componentes de la mezcla colorida se formaban zonas de colores diferentes en la columna, esta observación dió el nombre al método (chroma = color), (2) (3) (4).

Fué hasta 1930, siguiendo los trabajos de Kuhn y Lederer así como los del científico Zechmeister y de Cholkony, otros investigadores aplicaron la cromatografía a la separación de colorantes, azúcares, aminoácidos, etc., el descubrimiento de nuevas aplicaciones propiciaron el desarrollo de métodos, que en la actualidad se usan ampliamente en todas las ramas de la química y de las ciencias afines. (2)

La designación original de "Cromatografía" tiene solamente significado histórico ya que actualmente con ese término se designa a todos los procesos de separación de componentes que se efectúan por partición (absorción diferencial) entre una fase estacionaria (fija) con una gran superficie y una fase -- móvil, la cual fluye sobre la primera (2).

La cromatografía es esencialmente un método de separación que pertenece a la clase de operaciones de difusión y transferencia de masas en donde los componentes de una mezcla son separados como resultado de su partición — entre dos fases heterogéneas inmiscibles (2).

Los métodos cromatográficos se han agrupado considerando diversos aspectos, aceptándose generalmente la clasificación que se basa en los implementos utilizados; así se tiene la cromatografía en columna, cromatografía por intercambio iónico, cromatografía en papel, cromatografía en capa delgada y cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es básicamente una cromatografía en columna (2), en donde la fase móvil es un gas fluyendo a través del líquido. Se requiere de la vaporización de la muestra que es llevada a través de una columna preparada, a una temperatura adecuada por una corriente de gas transportador que es la fase móvil. Durante el paso del vapor de la columna la separación de la muestra se produce por efectos de adsorción si la columna es preparada solamente con material adsorbente, o por efectos de partición si las partículas de adsorbente están cubiertas con un líquido el cual constituye la fase es

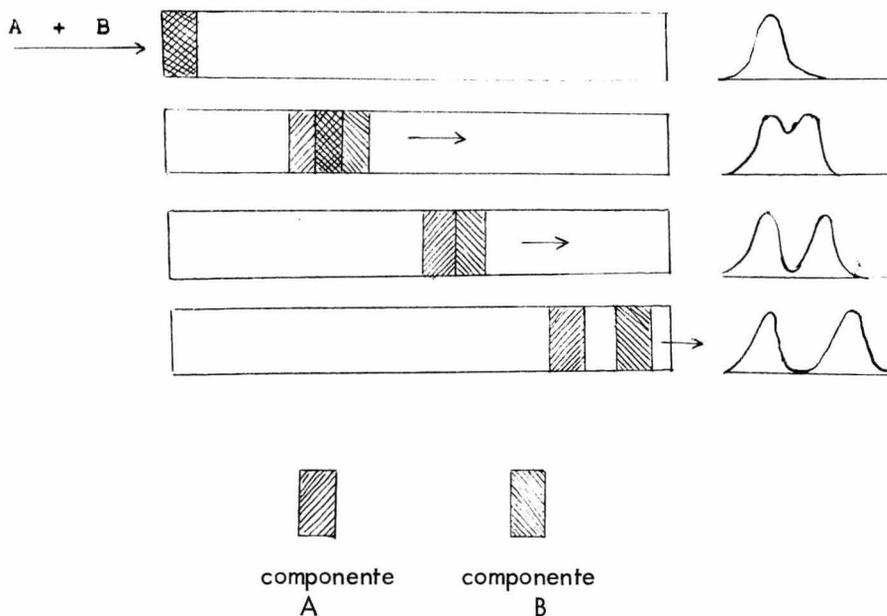
tacionaria, siendo más conveniente emplear el término soporte para la fase líquida que para el adsorbente. Como los efectos de adsorción no son aceptables en las columnas de partición, los soportes son tratados para eliminar hasta donde sea posible dichos efectos. Los tipos de cromatografía a que se hacen referencia son la cromatografía gas-sólido y la cromatografía gas-líquido respectivamente.

La cromatografía gas-líquido también denominada cromatografía por elución de gases o cromatografía en fase de vapor, fué sugerida por Martín y Syngé en 1941 (2) (3) (4), pero hasta 1941 se publicó su aplicación. Posteriormente James y Martín (2) (3), propusieron el método en el microanálisis de aminoácidos con lo que propagó grandemente su uso.

Se lograron mayores progresos al evolucionar la construcción de los instrumentos, modificándose en consecuencia los procedimientos de análisis.

El método como se mencionó anteriormente, tiene como base la separación de los componentes cuando una muestra vaporizada en un gas transportador, pasa a una presión constante a través de una fase líquida que está extendida sobre un sólido, de manera que se tenga una superficie líquida muy grande en un volumen pequeño. Dependiendo de la solubilidad selectiva en la fase líquida estacionaria los componentes de la mezcla se mueven a través de la columna por medio del gas transportador a diferentes velocidades, tendiendo a separarse en bandas distintas y si las propiedades de la fase estacionaria así como la longitud de la columna son las adecuadas se tendrá una separación completa emergiendo un componente a continuación de otro con el flujo del

gas transportador como se muestra en el siguiente diagrama (2) (5).

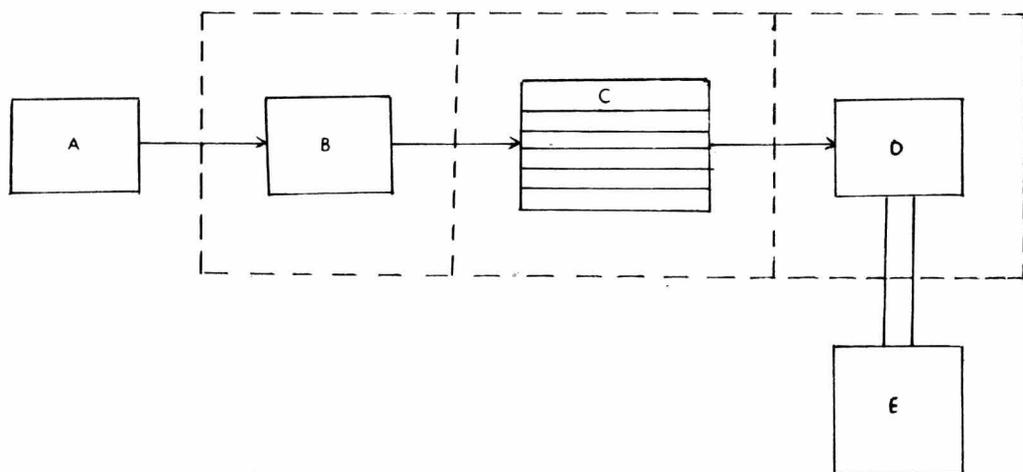


Esto es, cuando se introduce la muestra en la columna, los componentes se separan gradualmente hasta que emergen totalmente separados unos de otros. El gas transportador que emerge de la columna pasa a través del detector o detectores produciendo señales proporcionales a la cantidad de componentes introducidos (2). El registro electrónico de las señales del detector producen un "cromatograma" que es característico de la separación obtenida. La posición de los picos en el cromatograma determinan la identificación cualitativa en tanto que la altura de los mismos o las áreas bajo de las bases determinan la evaluación cuantitativa (4) (8) (9).

Una representación diagramática de un cromatógrafo de gases así co-

mo las partes esenciales del sistema se describen de la siguiente manera (2).

- a) Sistema de gas transportador.
- b) Bloque de inyección de muestras.
- c) Columnas.
- d) Detectores.
- e) Registrador y sistemas de evaluación.



La descripción y características que corresponden a cada una de las partes esenciales del sistema cromatográfico se tratarán a continuación en términos generales.

GAS TRANSPORTADOR. (4) (7) (9).

Constituye la fase móvil del sistema y debe reunir un conjunto de características que permitan el transporte de la muestra a través de la columna has

ta los detectores sin que interfiera con los componentes. Los factores considerados son los siguientes :

a).- El gas no debe interaccionar con la fase estacionaria o con los componentes de la muestra; esto es que debe ser inerte.

b).- La pureza del gas debe ser máxima ya que algunas impurezas pueden alterar la fase líquida disminuyendo la sensibilidad del detector.

c).- Puesto que el gas está fluyendo continuamente a través del sistema, este representa el fondo sobre el cual el detector medirá las fracciones que se introducen, la "selección del gas" también dependerá del tipo de detector que se usará.

Los gases usados comunmente y en el grado de pureza necesaria son los siguientes :

Helio, alta pureza (99.99% como mínimo).

Hidrógeno, grado prepurificado.

Nitrógeno, grado prepurificado.

Argón, grado prepurificado.

En algunos casos también se utilizan mezclas de gases, por ejemplo: Helio/Hidrógeno o bien Argón/Metano, también de pureza equivalente a las mencionadas anteriormente. (9) (10)

Los cambios en el flujo del gas transportador pueden producir alteraciones en la línea base de los cromatogramas dificultando tanto la evaluación cualitativa como la cuantitativa, esto es, los cambios en la velocidad alteran-

los datos de retención afectando la identificación de los componentes, mientras al disminuir el área de los picos se disminuye la exactitud cuantitativa. Aún cuando es difícil determinar un grado constante de flujo porque la resistencia al paso del mismo a través de la columna cambia con las condiciones de análisis y con el estado físico del empaque (tamaño de las partículas), es necesario controlar el volumen de gas antes de entrar a las columnas ajustando la presión y el flujo por medio de aditamentos adecuados. (4) (9).

BLOQUE DE INYECCION.

La eficiencia de la separación y la exactitud de los resultados también está condicionada por la manera de introducir la muestra en la columna.- El sistema inyector debe estar construido de manera que permita :

a).- Introducir la muestra a la columna como un pequeño tapón gaseificado en el menor tiempo posible.

b).- Evitar variaciones en el flujo y en las condiciones térmicas del sistema durante la inyección de la muestra.

c).- La cantidad de muestra aplicada variará según se trate de columnas empacadas o de columnas tubulares, en las primeras se introducen muestras de uno a diez microlitros y en las otras las cantidades van de centésimas a milésimas de microlitro mediante inyectores apropiados.

Las muestras que se analizarán pueden ser gaseosas, líquidas o sólidas disueltas en disolventes adecuados o bien sólidos aplicados con pipetas capi

lares, válvulas o jeringas especiales calibradas en volúmenes de microlitros.

El bloque de inyección debe mantener una temperatura uniforme durante el análisis, esto se consigue mediante un sistema de termostato independiente del sistema de las columnas y de los detectores. La temperatura se encontrará arriba de la que sea necesaria para la separación de los componentes con lo que se asegurara la vaporización de la muestra antes de entrar a las columnas (11).

COLUMNAS.

Desde el punto de vista de la función que desempeñan, así como del material de que están constituidas se tienen las columnas analíticas en las que se introducen muestras de microlitros o menos y las columnas preparativas cuando las muestras que se introducen son de volúmenes mayores de 0.5 mililitros, en este último caso los componentes separados pueden ser colectados fuera del detector en forma pura en cantidades variables. El tamaño de las primeras columnas varía de 1 a 10 metros de longitud y de los 2 a 4 milímetros de diámetro interno en tanto que en las columnas preparativas varían de 2 a 6 metros de longitud y de 2 a 5 milímetros de diámetro interno (12).

Las primeras columnas empacadas se fabricaron de vidrio (2) (10) (13) posteriormente se hicieron de aluminio, cobre o de acero inoxidable. El manejo y ensamble de las columnas metálicas es más conveniente sobre todo cuando se emplean altas temperaturas y presiones. Se considera que con las columnas de acero inoxidable se obtienen resultados más satisfactorios ya --

que las de cobre o aluminio pueden reaccionar o producir efectos catalíticos — con las muestras alterando en consecuencia los resultados. En el análisis de — sustancias de alto peso molecular que se descompongan fácilmente como los es teroides, aminoácidos y otros se prefiere el uso de columnas de vidrio. Para — las columnas capilares se sugiere el uso de acero inoxidable como el material — adecuado, aunque también el uso de vidrio y plásticos como la poliamida pro— ducen buenos resultados (2) (13).

La forma de las columnas es diversa bien sea en U, en W o en espi ral de acuerdo al aparato y al tamaño de la columna (3).

Además de las características físicas de las columnas los otros consti— tuyentes de las mismas y que son los que en sí producen la separación de los — componentes tienen una gran importancia dadas las funciones que desempeñan — en el proceso analítico, son la fase estacionaria o líquida y el soporte sobre — el que se encuentra depositado la fase líquida.

SOPORTE SOLIDO (2).

La selección del soporte sólido y la preparación de la columna empa cada son tan importantes como la selección de la fase estacionaria o líquida. — la eficiencia de la columna depende del tamaño de la partícula, el rango de — los tamaños y de las características físicas de su superficie. Cualquier activi dad química del soporte puede alterar el comportamiento de la columna, aún ■ cuando algunas veces ésta particularidad puede ser un recurso en separaciones — difíciles. Un soporte sólido ideal debe reunir las siguientes condiciones :

a).- Ser químicamente inerte.

b).- Tener una gran área de superficie de manera que la fase líquida se distribuya en ella como una película fina.

c).- La superficie tendrá una estructura con la habilidad de retener la capa líquida en su lugar de manera que toda su área pueda ser utilizada.

d).- El material será de fácil manejo, esto es, suficientemente duro para no romperse durante las operaciones de cubrimiento y empaque uniforme.

Los materiales que se encuentran comúnmente poseen alguna o algunas de las características anteriores pero no todas ellas, por lo tanto se encuentran una gran variedad de soportes que se utilizan según las necesidades específicas, entre estas se encuentran las diatomáceas (tierra de diatomáceas, sílica de diatomáceas o kieselgur) que son los esqueletos de algas unicelulares o diatomas que se encuentran acumuladas en diferentes partes del mundo. Son numerosas las especies pero su estructura básica es similar. Debido a que dichas estructuras poseen numerosos poros o agujeros en sus paredes forma una estructura que presenta una área de superficie extremadamente grande. Los esqueletos consisten principalmente de gel de sílica microamorfo hidratado y pequeñas cantidades de impurezas principalmente de óxidos metálicos. Se les somete a diferentes tratamientos con lo que adquieren o se acentúan algunas de las características mencionadas, permitiendo su uso según las necesidades en los diversos procesos cromatográficos. Los nombres comerciales con los que se encuentran comunmente son Cromosorb en sus diferentes tipos (P, W, G), Celite 545, Sil-O-Cel C-22, -

Anakrom y otros.

Estos soportes como se indicó anteriormente no son completamente inertes y presentan alguna interacción que en algunos casos es ligeramente perceptible y en otros es muy notable pudiendo alterarse los tiempos de retención sobre todo al disminuir la cantidad de fase estacionaria. El comportamiento puede mejorarse cubriendo la superficie de los poros de las diatomáceas con grupos a base de derivados de silicio (silanol, Si-OH ; siloxano, Si-O-Si), al calinizando los soportes, desactivando los sitios activos por lavados ácidos, cubriendo el soporte con materiales inertes o bien saturando los sitios con una segunda fase estacionaria (3) (4) (12) (13).

Otros materiales que se emplean como soporte en las columnas por ser inertes son los polímeros del tetrafluoro etileno o teflón que se manufactura aglomerando emulsiones del mismo, por ejemplo el Teflón 6, en el cual las partículas individuales se componen de agregados frágiles que fácilmente producen cargas estáticas que tienen numerosos poros pequeños lo que contribuye a una gran área de superficie (4).

El Fluoropak-80 es una resina de fluorocarbono de aspecto granular y estructura esponjosa de pequeña área de superficie. Las partículas son bastones irregulares, no son agregados y tampoco tienden a producir fácilmente cargas estáticas (13).

El Kel-F es un polvo moldeado en forma granular de clorofluorocarbono cuyas partículas parecen ser agregados de pequeñas unidades, duras que pueden ser manejados de manera semejante a las diatomáceas.

Las perlas de vidrio tienen la propiedad de ser inertes con gran capacidad de cubrimiento de la fase líquida y eficiencia de las columnas por lo que su uso también está muy generalizado. En residuo inorgánico del detergente — Tide sometido a diferentes tratamientos especiales permite su uso como soporte — con ciertas ventajas. En menor escala se han usado sustancias como cloruro — de sodio, hélices de nicromo, carbón negro grafitizado, Sephadex, polímeros — de dextrana y polietilén microporoso para temperaturas bajas (13).

Soportes más recientes son los tamices moleculares, espigas esponjo--sas y vermiculita que son materiales relativamente inertes utilizándose en un — número reducido de procesos (4).

FASE LIQUIDA (14).

El requisito principal para una fase líquida o estacionaria es que deberá ser selectiva para los componentes de la mezcla con la cual se usará, basándose en el principio "sustancias semejantes se disuelven en semejantes", es to es, fases líquidas no polares son las mejores para componentes no polares y son las mejores para componentes no polares y contrariamente las fases líquidas polares son las mejores para las sustancias polares. Las fases líquidas o estacionarias que son semejantes a los componentes retendrán a esos componentes — comparándolas con fases que sean disímiles. Por ejemplo los compuestos aromá--ticos (inducen la polaridad) son retenidos por el Carbowax (polar) mientras — que las parafinas (no polares) son eluidas rápidamente. Contrariamente, los — alcoholes (polares) son eluidos rápidamente sobre el escualeno (no polar) en —

relación a las parafinas. Esta propiedad permite formar grupos de separaciones ya sea acelerando o retardando la salida de un componente con respecto a los otros en una muestra.

Requisitos importantes para la selección de la fase estacionaria son: - la fase debe permanecer líquida bajo las condiciones de operación, ya que las separaciones serán deficientes al disminuir la solubilidad de los componentes, - así como variación en el tiempo de retención y picos deformados. La cantidad de fase líquida que se volatiliza tanto con una excesiva presión de vapor como en su descomposición no sobrepasará ciertos límites a lo que se le conoce como "sangrado" que acorta la vida de la columna disminuyendo posiblemente la sensibilidad de los detectores. No debe reaccionar tampoco con los solutos que se separarán teniendo en cuenta los límites para la actividad óptima de cada una de las fases. (15)

La polaridad de las fases estacionarias puede definirse como la relación que se tiene cuando se compara una fase líquida de gran polaridad con un soluto altamente polar retenido y un soluto no polar como un hidrocarburo. Aún cuando no puede emplearse un solo parámetro para determinar la polaridad de las fases líquidas se dice que estas son polares, no polares, más polares y moderadamente polares. (4)

La cantidad de fase líquida en las columnas empacadas se expresa como "carga de la fase estacionaria" y es el peso en por ciento en peso de fase líquida presente en la columna empacada, por ejemplo una carga de quince

por ciento indica que en cien gramos de empaque se encuentran quince gramos de dicha fase. Esta cantidad influye en eficiencia de la columna, esto es, -- una carga grande indica que puede introducirse una cantidad de muestra grande con lo que se tiene una transferencia de masa mayor disminuyendo la eficiencia de la columna (4).

Comercialmente se encuentran cientos de fases estacionarias, algunas de ellas tienen un uso específico pero también se encuentran algunas que pueden usarse para la determinación de numerosos componentes. Algunas de las fases usadas con más frecuencia son: escualano, Apiezon - L, Carbowax 20 M, DC 550 QF-1, SE-30, Ucon LB 550 X, poliéster del succinato de dietilenglicol, poliéster del succinato de butanediol, parafina líquida, dodeciltalato y otros más (15).

DETECTORES (15).

Para obtener resultados válidos, la sensibilidad y la seguridad del detector debe ser comparativamente igual al poder de resolución de la columna y adecuado al nivel de concentración de la muestra que será detectada; esto es que el detector registre los cambios en una cierta propiedad física o química de la corriente del gas efluente con la aparición de los componentes. Con -- una fuente de corriente apropiada y un transmisor de señales, el detector dará una señal directa que puede ser convertida en una señal eléctrica por medio del sistema electrónico apropiado. Esta señal es un voltaje que llevado directamente a través de un amplificador será registrada o procesada electrónicamen

te para obtener los cromatogramas correspondientes. Las características de un detector eficiente se tienen a continuación :

- a) Alta sensibilidad (en algunos casos selectividad) hacia diversos componentes.
- b) La respuesta será inmediata a cualquier cambio.
- c) Las señales producidas se encontrarán en un rango amplio de concentraciones proporcionales a la cantidad de componente (linealidad).
- d) Poca sensibilidad a fluctuaciones en las condiciones de operación (del gas transportador, presión y temperatura).
- e) Las señales deberán ser de fácil registro.

Estas condiciones son comunes a los diversos detectores los cuales se han clasificado teniendo como base su funcionamiento en los siguientes grupos (2):

1.- Detectores de conductividad térmica: tienen como principio la alteración de la conductividad térmica del gas transportador con la presencia de los compuestos orgánicos.

Consta de dos alambres de platino que se calientan eléctricamente alcanzando su equilibrio de temperatura y resistencia cuando pasa únicamente el gas transportador sobre ellos, parte del sistema es un puente de Wheatstone y al emerger un componente se altera la conductividad térmica del gas que lo rodea cambiando la resistencia del alambre con la consiguiente señal de desba

lance que es amplificada y registrada. La sensibilidad es afectada por las fluctuaciones de temperatura y flujo de gas, dependiendo también de la diferencia de conductividad entre el gas transportador y la muestra que eluye de la columna.

2.- Detector de flama: Al emerger un componente de la columna se produce una alteración de la flama que es fácilmente detectada por un termopar colocado sobre la flama, este detector es sensible pero los resultados no son buenos debido a las fluctuaciones en el flujo del gas transportador.

3.- Detector de ionización de flama: este detector funciona al cambiar la conductividad de la flama cuando se quema una substancia. El cambio en la conductividad no es producida sólomente por la simple ionización de los compuestos que emergen del detector, sino que se considera que es parte de un mecanismo que no se conoce exactamente. La resistencia eléctrica y en consecuencia la conductividad de la flama se altera marcadamente al emerger el gas y la muestra de la columna. El gas transportador empleado generalmente es nitrógeno o bien argón que se mezcla con hidrógeno antes de pasar a un encendedor que consiste de un electrodo de platino y una gasa de plata colocados aproximadamente a un centímetro de la flama, variando la sensibilidad según los diversos fabricantes al paso de los compuestos orgánicos, poco a los cambios del flujo de gas y al vapor de agua y con poca señal de ruido.

REGISTRADORES (4).

El sistema de registro en cromatografía de gases está constituido por -

un cambiador de rangos o atenuador, un dispositivo de registro y si es posible un integrador electrónico.

El atenuador es un divisor de voltaje, en trabajos de exactitud las resistencias empleadas son de alta precisión. El número de valores de las resistencias son determinadas por el número de cambios de rangos necesarios. En circuitos electrométricos, el electrómetro de cambios puede estar conectado con el atenuador. Se ha encontrado que los factores de atenuación son múltiplos de dos (4), esto es que la señal se reduce a la mitad en cada cambio de rango.

Generalmente en cromatografía de gases, un registrador en el rango de 0-1 a 0-10 milivolts con un tiempo de respuesta de un segundo para una deflexión en una escala amplia es de gran utilidad. Para trabajos de alta velocidad es necesaria una respuesta de décimas de segundo.

La velocidad del papel dependerá del proceso de análisis. Actualmente la tendencia es el registro de datos por medio de computadoras, los datos pueden ser tomados directamente del detector o bien de un integrador electrónico.

Las características de un sistema de integración que es operado mecánicamente fuera del servosistema del registrador son aquellas en que los dispositivos cuentan el área directamente del cromatograma en el margen del papel en donde se registran los cromatogramas. El área del pico se obtiene contando el número de oscilaciones completas además de las oscilaciones parciales al

comienzo y al final del cromatograma. Se encuentran integradores más automatizados que corrigen los cambios de sensibilidad, así como la desviación de la línea base cuando ésta causa errores registrando el área verdadera de los picos, por lo tanto los datos obtenidos son de mayor precisión aunque tienen el inconveniente el alto costo de estos últimos instrumentos. (15).

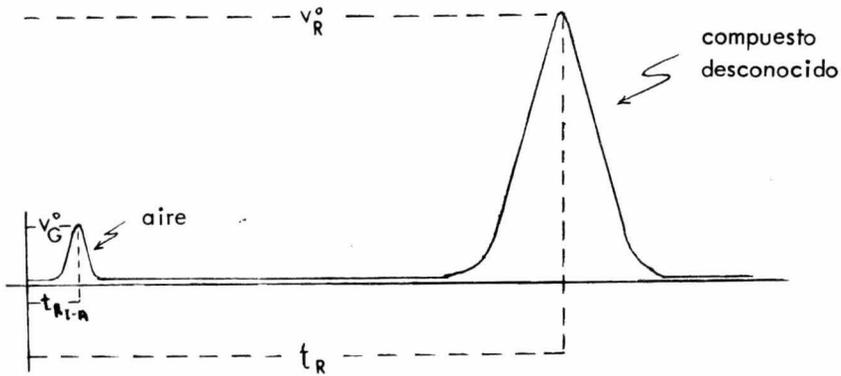
La magnitud de la señal que se obtiene cuando un soluto pasa de la columna a través del detector es proporcional a la cantidad de substancia presente. Esta señal es registrada continuamente como una función de tiempo sobre un papel en el registrador en forma de un cromatograma. En condiciones establecidas en cada proceso analítico la determinación cuantitativa se lleva a cabo sobre el cromatograma obtenido calculando el área de los picos obtenidos.

Las técnicas empleadas para la cuantificación de los componentes son numerosas pudiendo clasificarse principalmente como manuales y automáticas. — Las primeras comprenden a las evaluaciones por altura de pico, triangulación, planimetría así como el corte y pesada del triángulo obtenido. Dentro de los métodos automáticos se encuentran el integrador de disco, integrador electrónico, computadoras y sistema de resultados de computación e impresión de resultados. Según estudios estadísticos los resultados más precisos se obtienen por métodos automáticos en donde los sistemas de integrador de disco son los menos costosos (15).

RELACIONES BASICAS Y SIMBOLOS.

Son numerosos los términos que se emplean en los procesos de cromatografía de gases siendo de uso más frecuente los que se definen a continuación para describir el comportamiento de las condiciones de análisis en las que obtendrán los resultados más precisos.

Tiempo de retención: Es el tiempo de salida de un pico máximo después de la introducción de un componente como se representa en el siguiente diagrama:



Volumen de retención (V_R): es el producto del flujo medido a la salida de la columna por el tiempo de retención (t_R)

$$V_R = F \cdot t_R$$

que corresponde al volumen de retención no corregido.

Flujo de la columna (F_c): es el flujo de la salida de la columna -

(F_a) multiplicado por el cociente de la temperatura de la columna (T_c) entre la temperatura ambiente (T_a)

$$F_c = F_a \cdot \frac{T_c}{T_a}$$

Volumen de retención corregido (V_R^o): se obtiene al introducir el factor f (de presión) o gradiente de presión, esto se indica de la manera siguiente :

$$f = \frac{3}{2} \frac{(P_1 / P_2)^2 - 1}{(P_1 / P_2)^3 - 1}; \quad V_R^o = f \cdot V_R$$

de donde :

$$V_R^o = F_c \cdot f \cdot t_R$$

observarse esas etapas, en este caso los platos teóricos en la columna se calculan del grado de separación de los componentes. La longitud de la columna para calcular los platos teóricos se conoce como "altura equivalente a un plato teórico", las ecuaciones que representan a estos términos son las siguientes:

$$n = 16 \frac{d^2}{w^2}$$

en donde d es la distancia del punto de inyección hasta donde aparece el componente y puede darse en tiempo o volumen de retención corregido y w es la anchura del pico en su base.

$$\text{HETP} = \frac{L}{n}$$

en donde L es la longitud de la columna (en centímetros, pies o metros) y n es el número de platos teóricos.

Resolución (4) : Es la distancia entre el máximo de 2 picos y la amplitud de los dos picos determinada por la extrapolación de las tangentes a los puntos de inflexión de la línea base y es proporcional a la raíz cuadrada del número de platos teóricos.

Temperatura programada (11) : Es el aumento gradual de la temperatura durante un proceso analítico cuando los componentes se separan a temperaturas diferentes reduciendo el tiempo de elución para los componentes que requieren de una mayor temperatura en procesos isotérmicos.

Una línea base estable sin desviaciones se obtiene en el proceso de temperatura programada con dos columnas, una de ellas sirve como columna de referencia para compensar el efecto de los siguientes factores :

a) Alteración de la viscosidad de la fase móvil al alterarse la temperatura.

b) Alteración del flujo del gas con la misma variación de la temperatura.

c) Aumento en el "sangrado" de la fase líquida, esto es la elución de huellas de la fase estacionaria con el aumento de la temperatura, teóricamente esto último se reduce si se operan las columnas abajo del límite fijado para la fase estacionaria.

DETERMINACION DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases como método analítico en productos farmacéuticos adquirió gran importancia a partir de que se demostró que los compuestos de alto peso molecular pueden ser analizados sin aparente descomposición.

Lloyd y sus colaboradores (13), aplicaron la cromatografía de gases en la separación e identificación de alcaloides, posteriormente se determinaron residuos de fármacos y sus metabolitos en toxicología forense por diversos investigadores como Parker, Fontan, Kirk, Kazyak y Knoblock (13).

Los fármacos abarcan una amplia variedad de compuestos químicos -- siendo en consecuencia sus características y comportamiento muy variado, esto es demostrable en sustancias que pueden ser analizadas sin ningún tratamiento previo a su determinación y en otros casos es necesario transformar las sustancias en derivados estables y volátiles que permitan su análisis.

El proceso analítico puede ser complicado si en una misma muestra -- se encuentran mezcladas sustancias de diferente naturaleza o composición química, así como la proporción en que se encuentren los componentes relacionados entre sí, lo que frecuentemente hace necesario el uso de métodos de extracción fraccionada para interpretar correctamente los resultados.

La determinación cualitativa de los componentes de una mezcla de fármacos se basa en el procedimiento general en cromatografía de gases partiendo de la separación del componente o componentes de interés particular y pos-

teriormente la identificación de los mismos una vez que se han separado.

El tiempo de retención es la **propiedad** cualitativa constante para cada compuesto bajo ciertas condiciones **establecidas**, aún cuando no puede considerarse como prueba suficiente de **identidad** es frecuente comparar el tiempo de retención de un componente desconocido con el de uno ya determinado bajo -- las mismas condiciones de análisis. También pueden identificarse los componentes mediante la formación de derivados por métodos específicos, determinación de sus grupos funcionales y por **pirólisis**, complementando la identidad con otros métodos analíticos como espectrofotometría ultravioleta, infrarrojo, de masas o más sofisticadamente por resonancia magnética nuclear (13).

El aspecto cuantitativo es la **determinación** de las cantidades de un componente o componentes de una **muestra** y es la aplicación más importante de la cromatografía de gases de donde es el **paso final** y cuyos resultados dependerán de la separación lograda en las **condiciones** que se consideren óptimas durante el proceso.

Independientemente de la **naturaleza** química de los componentes de las muestras puede establecerse una **secuencia** en determinación cuantitativa como sigue (13):

a) La muestra debe encontrarse en estado uniforme (disolviendo los sólidos) para aplicar muestras alícuotas de una misma solución.

b) En los procesos de extracción de principios activos de las formas farmacéuticas debe verificarse la **eficiencia** del procedimiento.

c) En el análisis cromatográfico de fármacos es conveniente adicionar un estandar interno o referencia, que es una substancia conocida en cantidades conocidas con la que se relacionan los resultados obtenidos. Este estandar interno debe separarse bajo las mismas condiciones que él o los componentes que se analizan y se adicionará previamente al proceso de extracción (si éste se efectúa) para compensar la posible pérdida de otras substancias si las hubieran durante el procedimiento.

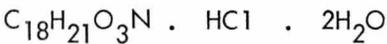
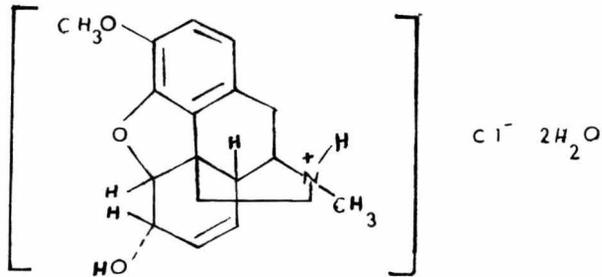
En las formas farmacéuticas de tabletas los principios activos se encuentran contenidos en cantidades pequeñas mezcladas con substancias como almidón, estearato de magnesio, lactosa, talco y otros componentes; en el caso de las grageas de los componentes anteriores se cubren con jarabe, goma arábiga, grenetina y algún colorante para hacer agradable su presentación. Estos componentes no activos, en la mayoría de los casos no son solubles en solventes orgánicos lo que permite la separación de los principios activos para su identificación y evaluación cuantitativa.

El método de cromatografía de gases ha permitido la determinación de numerosos principios activos en diferentes formas farmacéuticas que hace necesario un proceso que permitirá una evaluación correcta de dichos componentes y como se menciona anteriormente no todos los componentes de un producto farmacéutico al ser analizados tienen la importancia de los principios activos que son los que producen los efectos farmacológicos y que deben encontrarse dentro de los límites que establecen su actividad óptima, aún cuando el producto en sí debe reunir las condiciones que permitan su biodisponibilidad.

Como resultado de un estudio efectuado para el control analítico de Clorhidrato de Codeína y Clorhidrato de Efedrina en un producto farmacéutico en forma de tabletas se propone el método de Cromatografía de gases debido a las propiedades semejantes que comparten estas sustancias por otros métodos se requiere de consumo de reactivos y tiempo.

Los límites farmacéuticos que permiten el uso del Clorhidrato de Codeína y Clorhidrato de Efedrina se encuentran establecidos en las monografías respectivas en donde se describen las condiciones bajo las que deben efectuarse cada una de las pruebas. Estas monografías se presentan como complemento al estudio efectuado con las sustancias objeto del presente trabajo.

CODEINA, CLORHIDRATO. (16)



P.M. = 371.85

Propiedades físicas: (8)

Es un polvo microcristalino, blanco, ligero, inodoro, de sabor amargo, soluble en 25 partes de agua, en 90 partes de alcohol, en 1100 partes de cloroformo, prácticamente insoluble en éter.

Disuelta en agua fría, recientemente hervida (1 + 49) tiene reacción ligeramente ácida.

Rotación específica: Es de 106° a 109° en una solución de 1 g en 50 ml de agua destilada, fría recientemente hervida.

Identificación : (16)

a) Codeína: disolver 10 mg en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, adicionar una gota de S.R. de cloruro férrico y calentar, la solución adquiere un color violeta-azul, que cambia al adicionar unas gotas de ácido nítrico concentrado.

b) Codeína: disolver 100 mg en 5 ml de agua destilada, adicionar 5 gotas de S.R. de hidróxido de sodio, la solución no debe enturbiarse. Agitar la solución con 2 ml de cloroformo y filtrar la fase orgánica a través de una capa de algodón y una capa de sulfato de sodio anhidro. Evaporar el solvente a sequedad y llevar el residuo a 105°C (codeína base), el rango de fusión es de 155° a 159°C .

c) Cloruros: disolver 10 mg en 5 ml de agua acidulada con unas gotas de ácido nítrico concentrado, adicionar unas gotas de S.R. de nitrato de plata, se produce un precipitado blanco soluble en un exceso de S.R. de hidróxido de amonio.

Pruebas cualitativas (16):

a) Substancias insolubles y coloridas: la solución empleada para la

determinación de la rotación específica debe ser incolora y sin ningún residuo.

b) Acidez: el pH de la solución anterior no debe ser inferior a --
4.7.

c) Sulfatos: medir 10 ml de la solución que se preparó para la deter-
minación de la rotación específica, acidular con ácido clorhídrico diluido, --
adicionar unas gotas de S.R. de cloruro de bario. No debe formarse ningún --
precipitado.

d) Substancias fácilmente carbonizables: una solución de 200 mg -
en 5 ml de ácido sulfúrico concentrado debe ser ligeramente rosa o amarillen--
ta.

Pruebas cuantitativas (16):

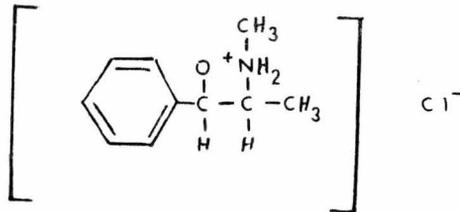
a) Pérdida al secado: secar 200 mg a 105°C, a peso constante. --
La pérdida del peso no debe ser mayor al 10% del peso tomado.

b) Cenizas sulfatadas: incinerar 500 mg. El residuo después del --
tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, incinerando la muestra y llevarla-
a mufla a 800°C, no debe ser mayor a 0.2% del peso inicial.

c) Valoración: disolver alrededor de 180 mg de Clorhidrato de Co_o
deina pesados con exactitud, en 5 ml de ácido acético glacial, adicionar 10 -
ml de solución de acetato mercuríco en ácido acético glacial. Valorar la so-
lución con ácido perclórico 0.1 N en ácido acético glacial, usando como indi-
cador 1 gota de violeta de genciana, el punto de equivalencia es el vire de -
violeta azulado o verde azulado.

Un ml de ácido perclórico 0.1 N equivale a 33.58 mg de clorhidrato de codeína ($C_{18}H_{21}N_3O \cdot HCl$)

EFEDRINA, CLORHIDRATO.



$C_{10}H_{15}ON \cdot HCl$

P.M. : 201.69

Propiedades físicas : (16) es un polvo cristalino blanco, o cristales en forma de agujas. De sabor amargo, se oscurece por exposición a la luz, soluble en 2 partes de agua, en 40 partes de alcohol, prácticamente insoluble en éter y en cloroformo. Disuelta en agua fría, recientemente hervida (1 + 19) es neutra o ligeramente ácida.

Rango de fusión: es de 188° a 190°C. Rotación específica: es -- una solución al 5% (peso/volumen) es de -33.5° a -35.5°.

Identificación : (16)

a) Efedrina: disolver 50 mg en un ml de agua destilada, adicionar tres gotas de S.R. de sulfato de cobre seguida de un ml de S.R. de hidróxido de sodio, se produce un color violeta. Se adiciona un volumen de butanol y se agita, la capa de butanol se vuelve color violeta rojizo.

b) Disolver 50 mg en 5 ml de agua destilada, adicionar unas gotas

de S.R. de hidróxido de potasio y 2 ml de S.R. de hexocianoferrato de potasio y calentar, se desprende olor a **benzaldehído**.

c) Cloruros: disolver 50 mg en 2 ml de agua destilada, adicionar - unas gotas de ácido nítrico concentrado y un ml de S.R. de nitrato de plata, - se forma un precipitado blanco, soluble en un exceso de solución de hidróxido de amonio.

Pruebas cualitativas (16) :

a) Substancias insolubles y coloridas: una solución de un gramo en 5 ml de agua debe ser clara, incolora y sin ningún residuo. Esta solución se diluye a 50 ml con agua destilada y se usa para las siguientes determinaciones:

b) Metales pesados: Una muestra de 10 ml se alcaliniza con S.R. - de hidróxido de sodio, se adicionan 2 gotas de S.R. de sulfuro de sodio, mezclar, no debe presentarse ningún cambio en la solución.

c) Alcaloides extraños: a 5 ml de la solución en a, adicionar 5 - gotas de S.R. de hidróxido de sodio, la solución no debe enturbiarse en un -- lapso de 5 minutos.

d) Substancias fácilmente carbonizables: disolver 100 mg de substan_ cias en 2 ml de ácido sulfúrico concentrado, la solución permanece clara y ca_ si incolora por no menos de 5 minutos.

Pruebas cuantitativas (16) :

H/NO₃

a) Pérdida al secado: secar 1.00 g de substancia a 105°C, a peso_

constante. La pérdida del peso no debe exceder de 0.5%.

b) Cenizas sulfatadas: Incinerar 0.5 g, después de tratar el residuo con unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y unas gotas de ácido nítrico -- concentrado, hasta eliminación de los humos, llevar a la mufla a 800°C, el re siduo no debe exceder al 0.2%.

c) Valoración, efedrina: disolver aproximadamente 100 mg de Clor-- hidrato de Efedrina, exactamente pesado, en 5 ml de ácido acético anhidro, - adicionar 10 ml de solución de acetato mercúrico en ácido acético anhidro y - una gota de violeta de genciana como solución indicadora. Valorar con solu-- ción volumétrica de ácido perclórico 0.1 N al vire verde azuloso del indica-- dor.

Un ml de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 0.02017 g_ de clorhidrato de efedrina ($C_{10}H_{15}ON \cdot HCl$).

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

El presente trabajo se inició estableciendo las condiciones adecuadas para obtener los mejores resultados con el aparato PERKIN ELMER modelo 900 - que tiene columnas en forma de espiral, detectores de ionización de flama y - el registrador Leeds Nortrup con integrador de áreas como parte del sistema.

Teniendo como base los datos bibliográficos así como los demás componentes del sistema cromatográfico con que se cuenta en el Laboratorio se procedió a proponer el método analítico en las siguientes condiciones instrumentales :

Columnas : de acero inoxidable con diámetro interno de 1/8".

Soporte : Anakrom 80; tamaño de partícula 80/90 mallas.

Fase estacionaria: SE - 30, a una concentración de 4%.

Gas transportador: nitrógeno (altísima pureza) a un flujo de 66 --
ml/minuto.

Temperatura del bloque de inyección : 290°C

Temperatura de los detectores: 310°C

Temperatura de las columnas : Programada

Temperatura inicial : 170°C

Temperatura final: 250°C

Variación de temperatura: 10°C/mi-
nuto.

Atenuación : 2 x 1000

Volumen de muestra introducido: 1.0 ml

Los fármacos Clorhidrato de Codeína y Clorhidrato de Efedrina cumplen con los requisitos farmacopéicos según las monografías respectivas que se han descrito con anterioridad. Para determinar su identidad y su respuesta cuantitativa por el método de Cromatografía de gases se purificaron ambas sustancias por recristalización en etanol.

Las pruebas cualitativas se iniciaron con soluciones en agua de cada una de las sustancias debido a que se encuentran como clorhidratos, se facilita su solubilidad en este disolvente.

Los resultados indican que no es la forma adecuada para el análisis de la mezcla de ámbos componentes; como se observa en la secuencia de cromatogramas en las siguientes páginas.

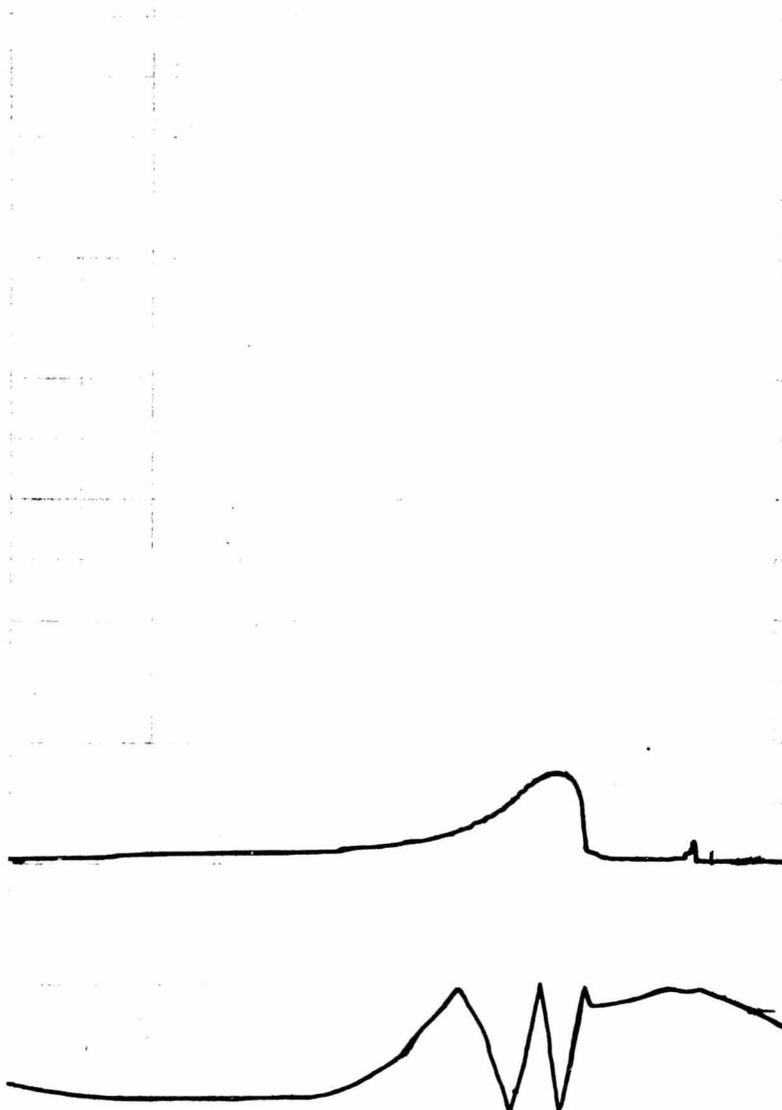
Para lograr resultados confiables se hizo necesaria la extracción de la efedrina y de la codeína como bases en un disolvente orgánico después de alcalinizar las soluciones acuosas. Se aplicaron muestras en el cromatógrafo con las condiciones descritas anteriormente. Los resultados con temperatura isotérmica para los componentes por separado son de aspecto cualitativo. Para la evaluación cuantitativa de la mezcla de componentes es conveniente programar la temperatura, elevándola paulatinamente para separar a los componentes así como al estándar interno.

MUESTRA :

Solución acuosa de clorhidrato
de efedrina

COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 170°C
Tiempo de retención: 1 min. 58 seg.

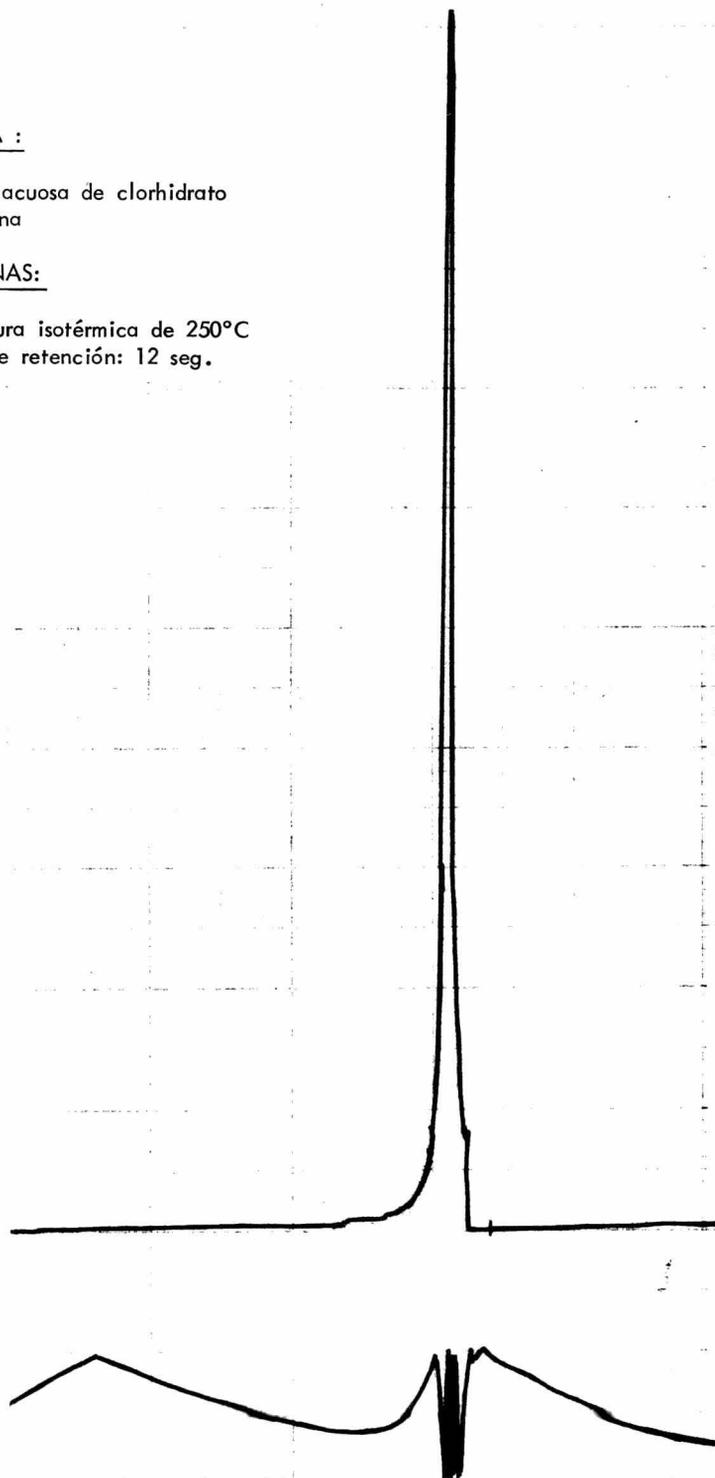


MUESTRA :

Solución acuosa de clorhidrato
de efedrina

COLUMNAS:

Temperatura isotérmica de 250°C
Tiempo de retención: 12 seg.

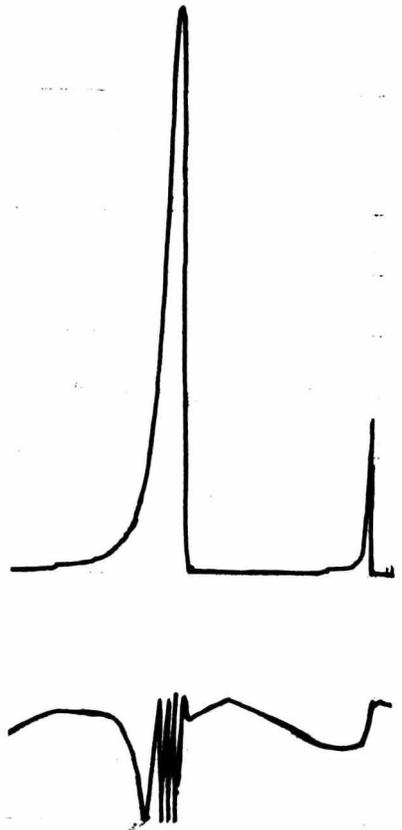


MUESTRA :

Solución acuosa de clorhidrato
de codeína.

COLUMNAS:

Temperatura isotérmica de 250°C
Tiempo de retención: 2 min. 48 seg.



MUESTRA :

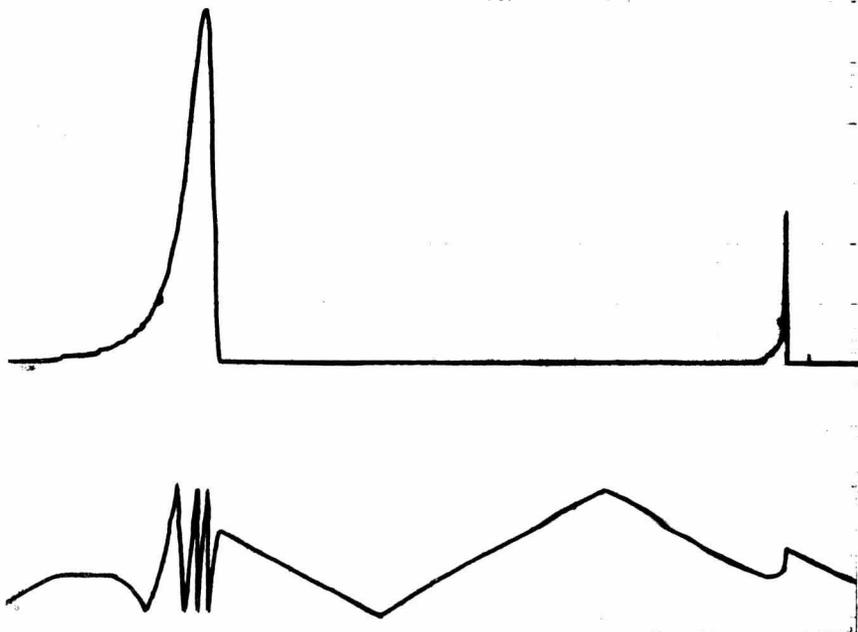
Solución acuosa de clorhidrato
de codeína.

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C

Variación de temperatura: 10°/min.

Tiempo de retención: 7 min. 12 seg.



MUESTRA :

Solución acuosa de clorhidrato de efedrina y clorhidrato de codeína.

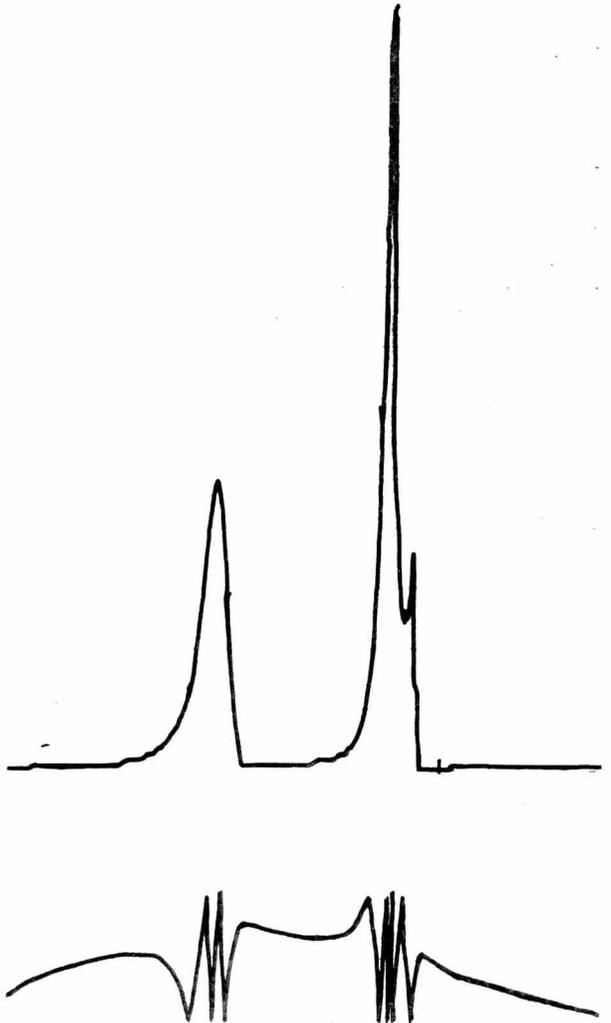
COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 250°C

Tiempo de retención:

Clorhidrato de Efedrina: 18 seg.

Clorhidrato de Codeína: 2 min. 20 seg.



MUESTRA :

Solución acuosa de clorhidrato de efedrina y clorhidrato de codeína

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C

Variación de temperatura: 10°/min.

Tiempo de retención:

Clorhidrato de efedrina: 1 min. 54 seg.

Clorhidrato de codeína: 8 min. 29 seg.

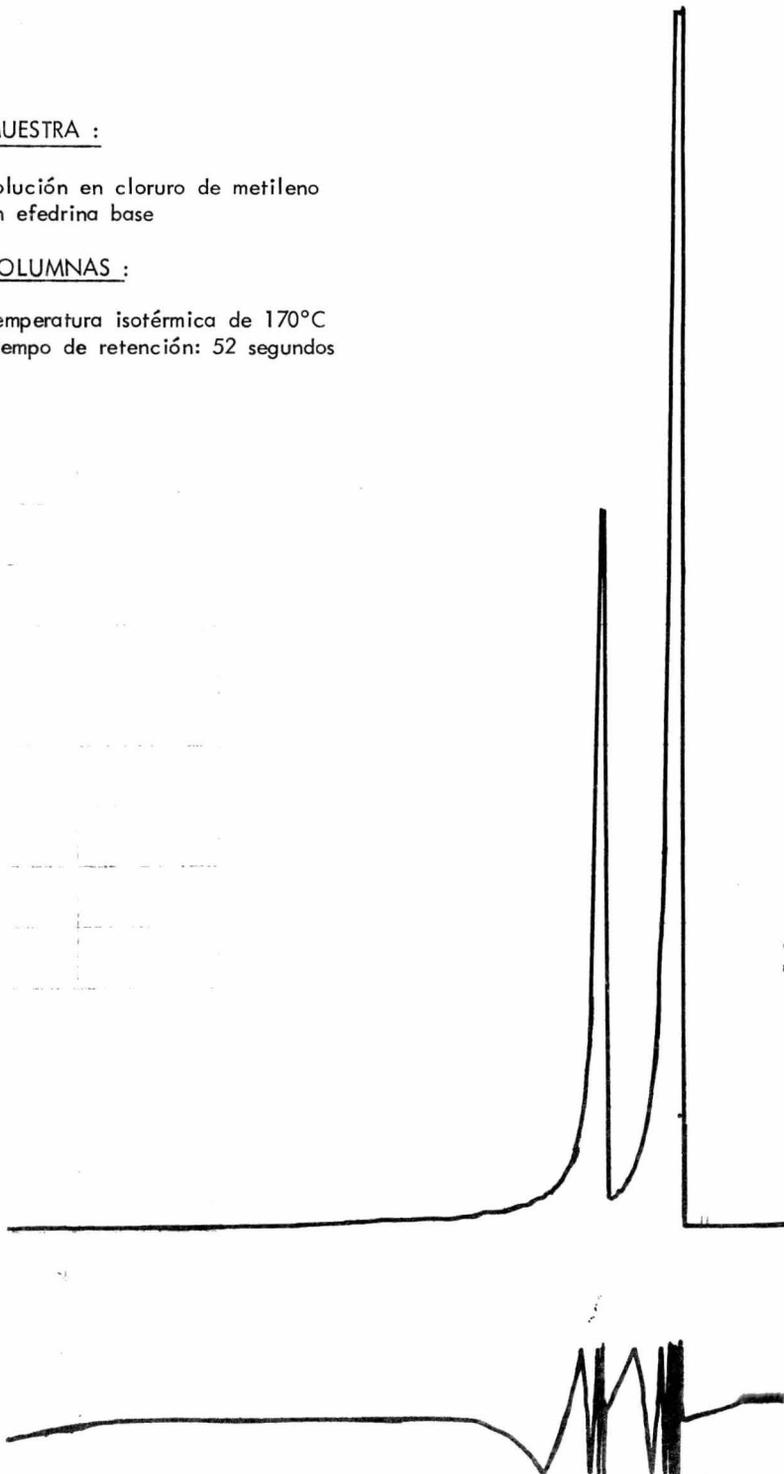


MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
en efedrina base

COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 170°C
Tiempo de retención: 52 segundos

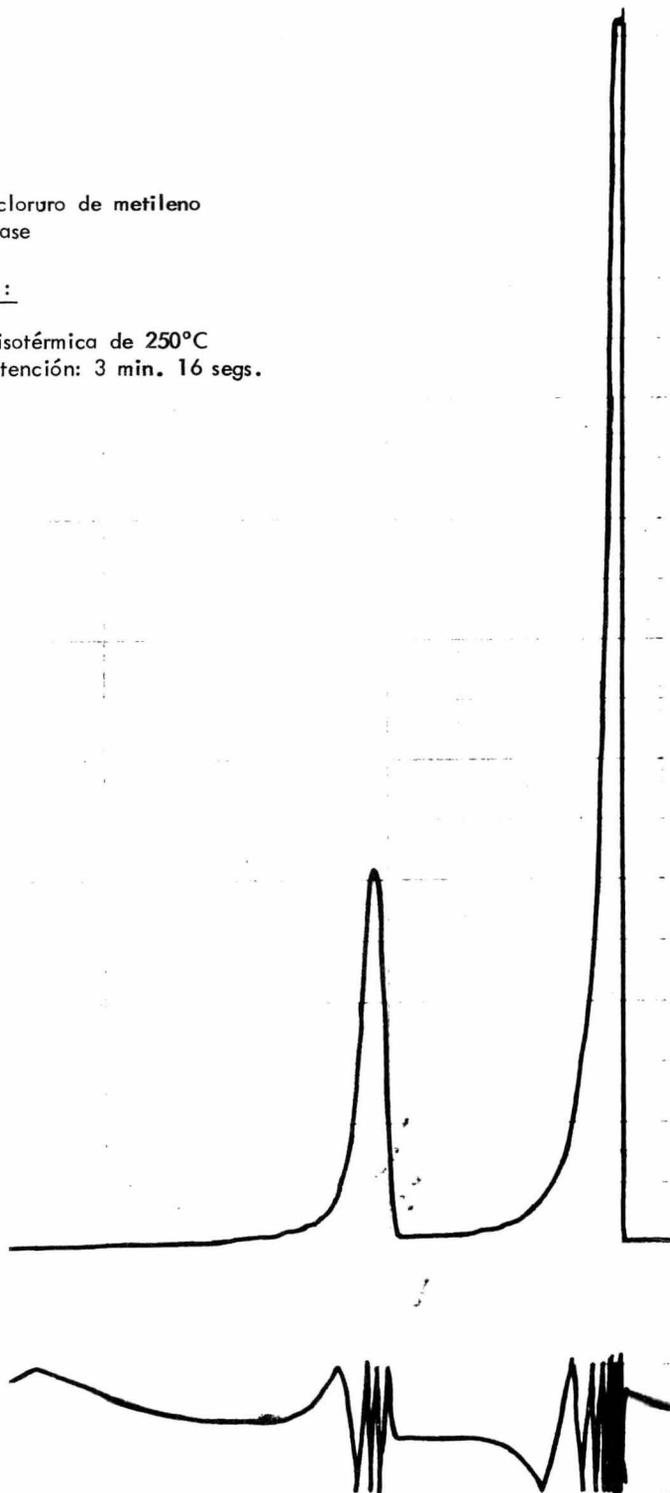


MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
de codeína base

COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 250°C
Tiempo de retención: 3 min. 16 segs.



MUESTRA :

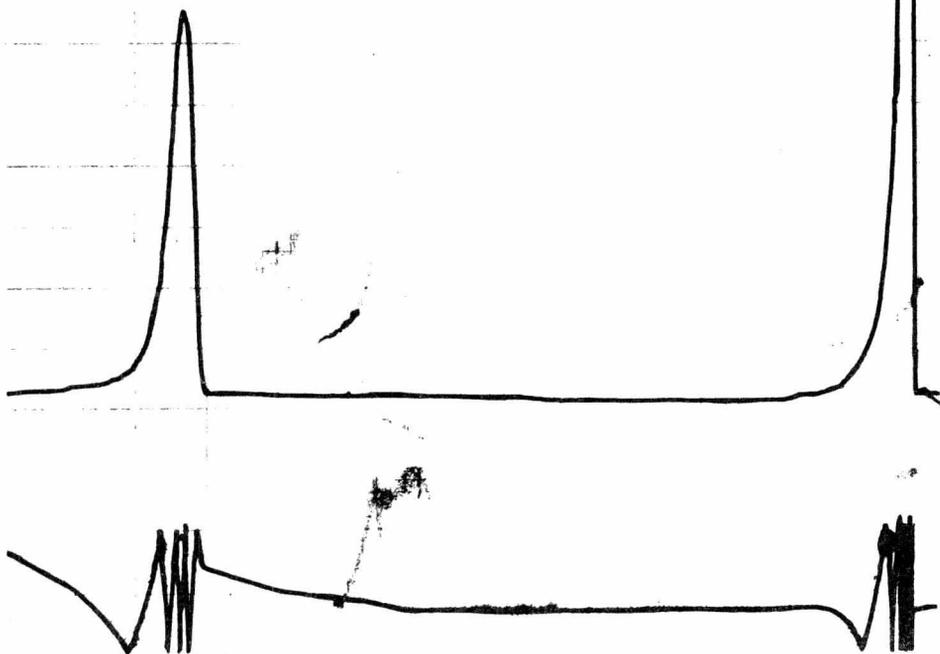
Solución en cloruro de metileno
de codeína base

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 270°C

Variación de temperatura : 50°C/min.

Tiempo de retención: 10 min. 18 segs.

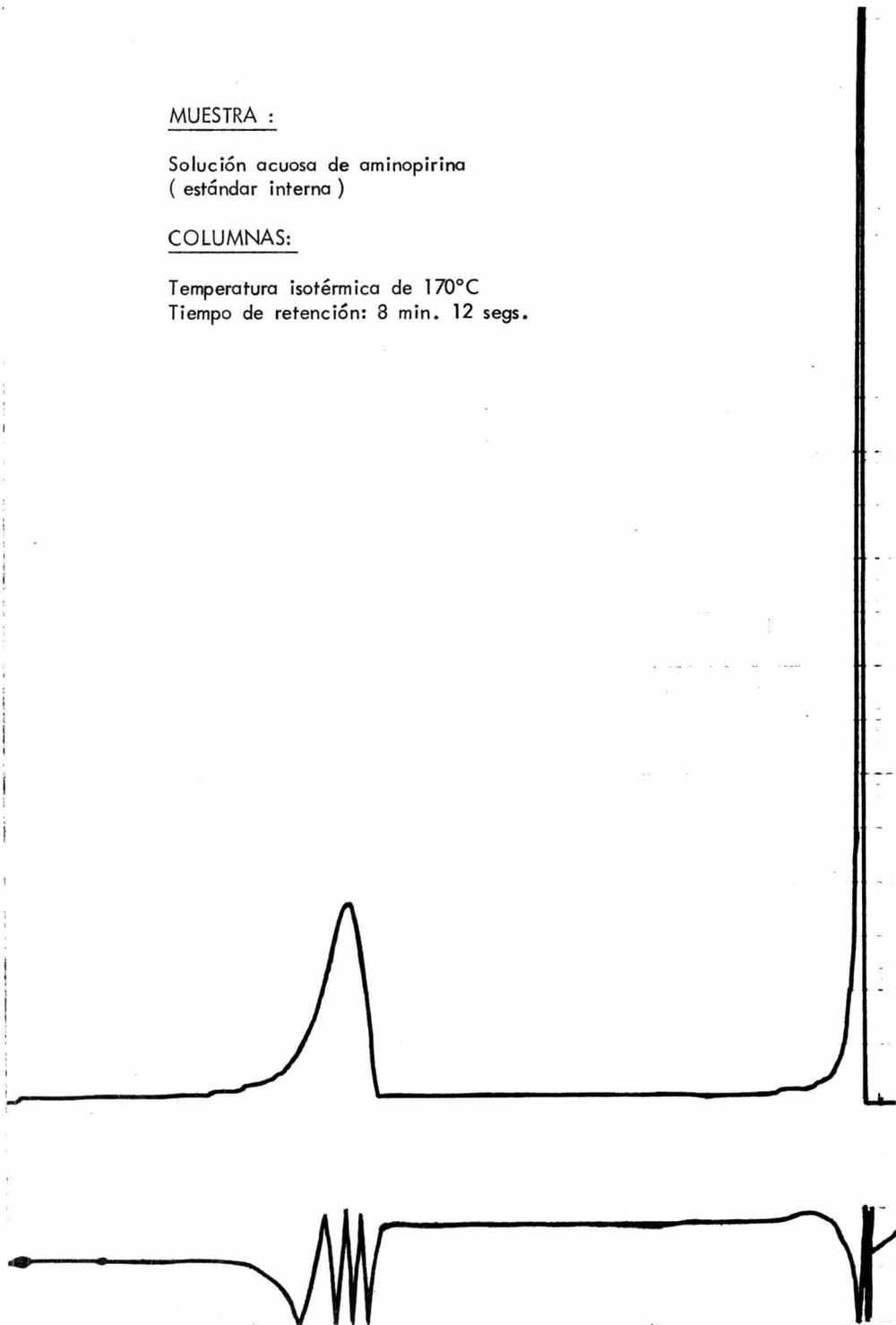


MUESTRA :

Solución acuosa de aminopirina
(estándar interna)

COLUMNAS:

Temperatura isotérmica de 170°C
Tiempo de retención: 8 min. 12 segs.

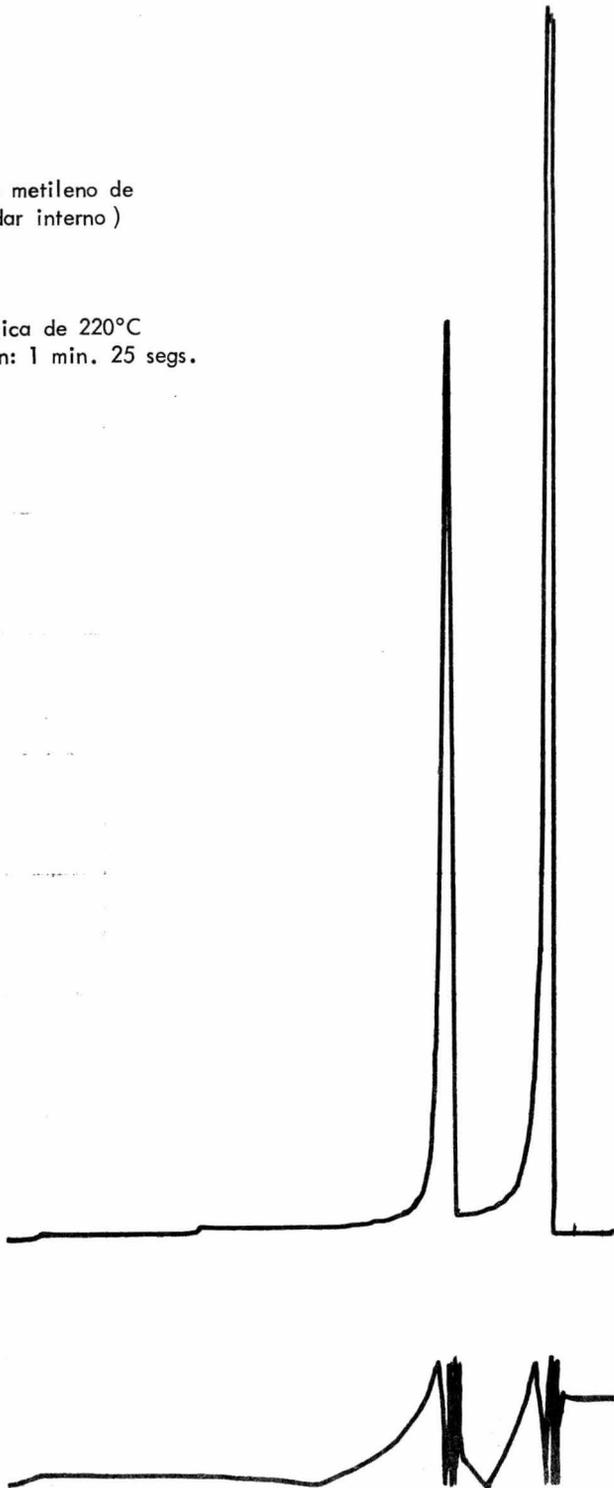


MUESTRA :

Solución cloruro de metileno de
aminopirina (estándar interno)

COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 220°C
Tiempo de retención: 1 min. 25 segs.

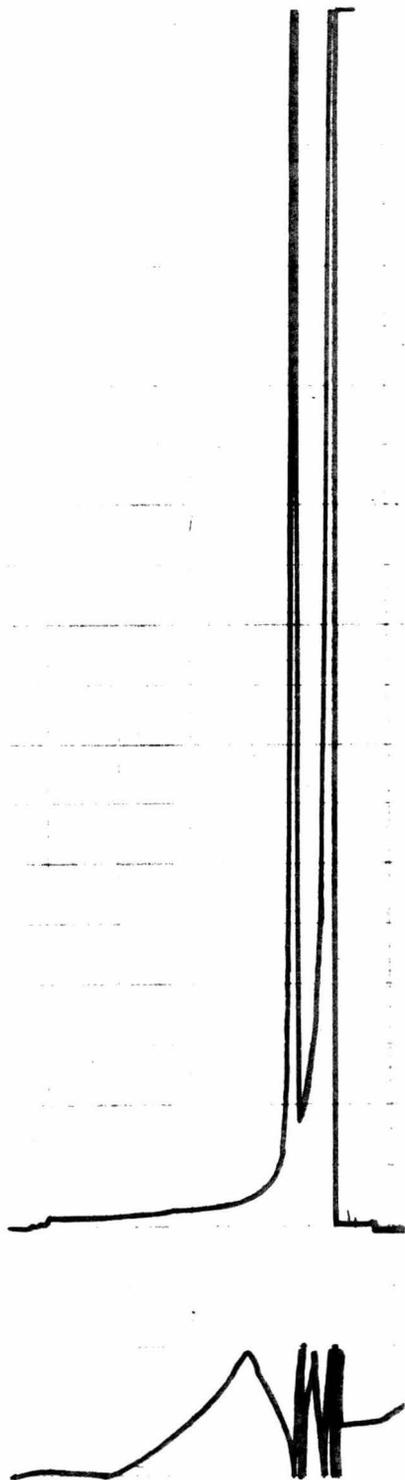


MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
de aminopirina (estándar interno)

COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 250°C
Tiempo de retención:
Aminopirina : 32 segundos.



MUESTRA :

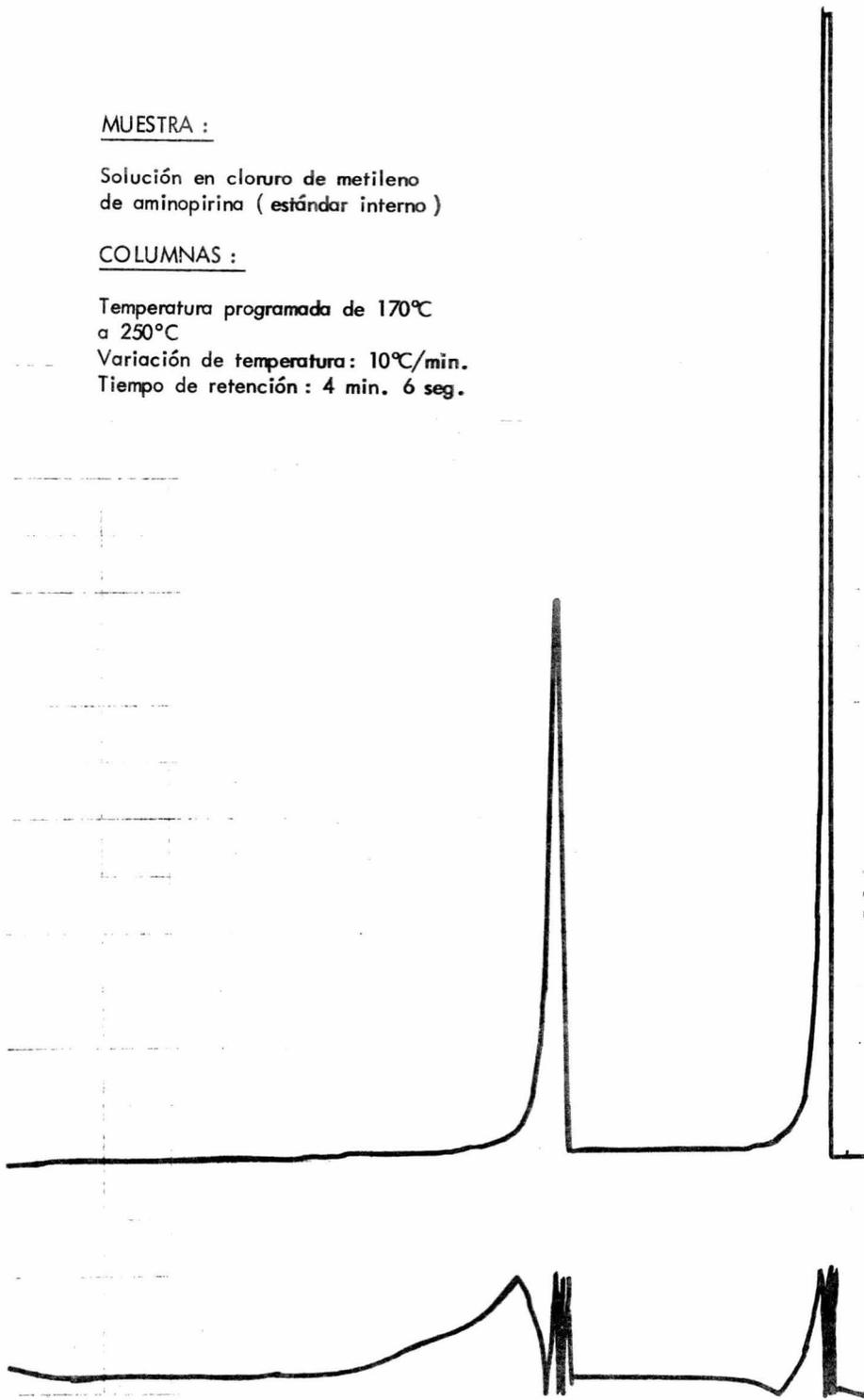
Solución en cloruro de metileno
de aminopirina (estándar interno)

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C

Variación de temperatura: 10°C/min.

Tiempo de retención : 4 min. 6 seg.



MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
de efedrina base y codeína base

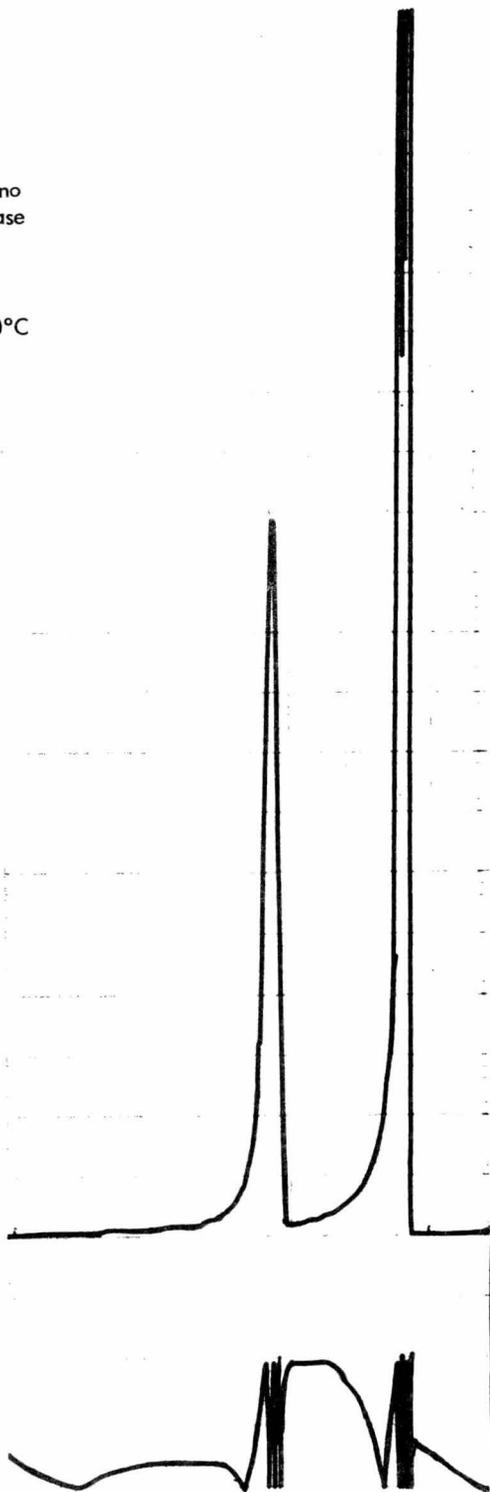
COLUMNAS :

Temperatura isotérmica de 250°C

Tiempo de retención :

Efedrina base : 6 segundos.

Codeína base : 2 minutos.



MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
de efedrina base y codeína base

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C

Tiempo de retención:

Efedrina base : 1 minuto

Codeína base : 8 minutos.



El método cuantitativo que se propone es el siguiente :

Se pesa la cantidad necesaria de cada uno de los clorhidratos que — equivalen a 40 miligramos de codeína base y a 40 miligramos de efedrina base, se disuelven en 10 mililitros de agua destilada, se pasa la solución a un embudo de separación, se alcaliniza la solución con un mililitro de solución acuosa al diez por ciento de hidróxido de sodio, se mezcla, se adicionan 40 miligramos de aminopirina, se disuelven en la solución, se deja en reposo durante 5 minutos, se adicionan 3 mililitros de cloruro de metileno, se separa la fase orgánica de la acuosa y se hacen otras dos extracciones de igual volumen de cloruro de metileno; se reúnen los extractos orgánicos y se reduce el volumen a 5 mililitros evaporando suavemente.

De esta solución se aplicaron muestras de un microlitro.

Las condiciones del cromatógrafo se encuentran descritas anteriormente.

Un cromatograma representativo de esta separación se tiene en el cromatograma número 15.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla No. 1 y el estudio estadístico correspondiente en la Tabla No. 2.

MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno
de efedrina base, aminopirina
(estándar interno) y codeína base

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C
Variación de temperatura: 10°/min.
Tiempo de retención:
Efedrina base : 48 segs.
Aminopirina : 4 min., 12 seg.
Codeína base : 8 min., 12 seg.



CALCULOS :

$$A_2 \quad \text{---} \quad 40.0 \text{ mg}$$

$$A_1 \quad \text{---} \quad x$$

$$x = \text{mg. de Efedrina}$$

$$A_2 \quad \text{---} \quad 40.0 \text{ mg}$$

$$A_3 \quad \text{---} \quad x$$

$$x = \text{mg. de Codeina}$$

en donde A_1 corresponde al área obtenida para Efedrina

A_2 corresponde al área obtenida para Aminopirina

(estándar interno)

A_3 corresponde al área obtenida para Codeina

Los resultados en porciento se obtuvieron de la siguiente manera :

$$A_2 \quad \text{---} \quad 100\%$$

$$A_1 \quad \text{---} \quad x$$

$$x = \% \text{ de Efedrina en la muestra}$$

$$A_2 \quad \text{---} \quad 100\%$$

$$A_3 \quad \text{---} \quad x$$

$$x = \% \text{ de Codeina en la muestra}$$

en donde los símbolos de A tienen el mismo significado que para la relación —
en miligramos de Efedrina y miligramos de Codeina.

TABLA No. 1

EFEDRINA					CODEINA	
A ₁	A ₂	A ₃	mg	%	mg	%
56	59	37.96	94.91	37.29	37.29	93.22
47	50	49	37.60	94.00	39.20	98.00
52	57	53	36.49	91.22	37.19	92.98
65	70	63.5	37.14	92.85	36.28	90.71
74	74	72	40.00	100.00	38.92	97.29
58	61	58	38.02	95.08	38.03	95.08
65	67	64	38.80	97.01	38.21	95.52
83	86	93	38.60	96.51	43.25	108.13
100	106	106	37.73	94.33	40.00	100.00
110	116	109	37.93	94.82	37.59	93.93
69	69	65	40.00	100.00	37.68	94.20
59	59	56	40.00	100.00	37.96	94.91
61	58	60	42.07	105.17	41.38	103.44
59	60	57	39.33	98.33	38.00	95.00
58	61	58	30.03	95.08	38.03	95.08
74	74	72	40.00	100.00	38.92	97.29
65	67	64	38.80	97.01	38.21	95.52
98	99	87	39.59	98.98	35.15	87.77
67	71	68	37.74	94.36	38.31	95.77
90	93	90	38.71	96.77	38.71	96.77
83	86	93	38.60	96.51	53.25	108.13
100	106	106	37.73	94.33	40.00	100.00
110	116	107	37.93	94.82	36.90	92.40
69	69	65	40.00	100.00	37.68	94.20
59	59	56	40.00	100.00	37.96	94.91
61	58	61	42.07	105.17	41.38	103.44
59	60	57	39.33	98.33	38.00	95.00
58	61	58	38.03	95.08	38.03	95.08
74	74	72	40.00	100.00	38.92	97.29
65	67	64	38.80	97.01	38.21	95.52
98	99	93	39.59	98.98	37.57	93.93
67	71	68	37.74	94.36	38.31	95.77
90	93	90	38.71	96.77	38.71	96.77
64	65	60	39.38	98.46	36.92	92.30

A₁ = áreas obtenidas para Efedrina,

A₂ = áreas obtenidas para Aminopirina (estándar interno ó referencia).

A₃ = áreas obtenidas para Codeina.

TABLA No. 2
RESULTADOS ESTADISTICOS

EFEDRINA			CODEINA		
X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
94.91	-2.25	5.0625	93.22	3.04	9.2416
94.00	-3.16	9.9856	98.00	1.74	3.0276
91.22	-5.94	35.2836	92.98	- 3.28	10.7584
92.85	-4.31	18.5761	90.71	- 5.55	30.8025
100.00	2.84	8.0656	97.29	1.03	1.0609
95.08	-2.08	4.3264	95.08	- 1.18	1.3924
97.01	-0.15	0.0225	95.52	- 0.74	0.5476
96.51	-0.65	0.4225	108.13	11.87	140.8969
94.33	-2.83	8.0089	100.00	3.74	13.9876
94.82	-2.34	5.4756	93.93	- 2.33	5.4282
100.00	2.84	8.0656	94.20	- 2.06	4.2436
100.00	2.84	8.0656	94.91	- 1.35	1.8225
105.17	8.01	64.1601	103.44	7.18	51.5529
98.33	1.17	1.3689	95.00	- 1.26	1.7876
95.08	-2.08	4.3264	95.08	- 1.38	1.9044
100.00	2.84	8.0656	97.29	1.03	1.0609
97.01	-0.15	0.0225	95.52	- 0.74	0.5476
98.98	1.82	3.3124	87.87	- 9.26	85.7476
94.36	-2.08	7.8400	85.77	- 0.49	0.2401
96.77	-0.39	0.1521	96.77	0.51	0.2601
96.51	-0.65	0.4225	108.13	11.87	140.8969
94.33	-2.83	8.0089	100.00	3.74	13.9876
94.82	-2.34	5.4756	92.24	- 4.02	16.1604
100.00	2.84	8.0656	94.20	- 2.02	4.0804
100.00	2.84	8.0656	94.91	- 1.35	4.0804
105.17	8.01	64.1601	103.44	7.18	51.5524
98.33	1.17	1.3689	95.00	- 1.26	1.5876
95.08	-1.78	3.1684	95.08	- 1.18	1.3924
100.00	2.84	8.0656	97.29	1.03	1.0609
97.01	0.15	0.0225	95.52	- 0.74	0.5476
98.98	1.82	3.3124	93.93	- 2.23	5.4289
94.36	-2.81	7.8961	95.77	- 0.49	0.2401
96.77	-0.39	0.1521	96.77	0.51	0.2601
98.46	1.48	2.1904	92.30	- 3.96	15.6816
$\bar{X} = 97.16$		$= 320.9831$	$\bar{X} = 96.26$		$= 621.01046$

EFEDRINA

$$\bar{X} = 97.16\%$$

$$S^2 = \frac{(X_1 - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{320.9831}{33} = 9.6999$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{9.6999} = 3.1145$$

$$S_m = \frac{S}{n} = \frac{3.1145}{34} = 0.5341$$

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{3.1145 \times 100}{97.16} = 3.02055$$

Límites de confianza $\bar{X} \pm t_{.95} \times S_m$

Límite superior $97.16 + (2.042 \times 0.5341) = 98.26\%$

Límite inferior $97.16 - (2.042 \times 0.5341) = 96.07\%$

CODEINA

$$\bar{X} = 96.26\%$$

$$s^2 = \frac{(X_1 - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{621.0105}{33} = 18.818$$

$$S = \sqrt{s^2} = \sqrt{18.818} = 4.3379$$

$$S_m = \frac{S}{n} = \frac{4.3379}{34} = 0.7439$$

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{4.3379 \times 100}{96.26} = 4.5064$$

$$\text{Límites de confianza } \bar{X} \pm T_{.95} \times S_m$$

$$\text{Límite Superior } 96.26 + (2.042 \times 0.7439) = 97.78\%$$

$$\text{Límite Inferior } 96.26 - (2.042 \times 0.7439) = 97.94\%$$

Evaluación en Tabletas :

La evaluación en tabletas se hizo en un lote del fármaco elaborado en producción. El proceso analítico se modificó en algunos aspectos porque es necesario separar a los principios activos del excipiente de las tabletas previamente al proceso analítico de los mismos.

En la fórmula del producto farmacéutico los principios activos se encuentran en una tableta en las siguientes cantidades :

Clorhidrato de Efedrina	0.020 g.
Clorhidrato de Codeína	0.020 g.
Excipiente c.b.p.	0.200 g.

El procedimiento analítico se efectúa de la siguiente manera :

Se pesan muestras de 500 miligramos del polvo proveniente de las tabletas, se adiciona 15 mililitros de agua destilada, se agita durante 15 minutos, se filtra con papel Whatman # 40, el filtrado se recoge en un embudo de separación, el residuo se lava con otras dos porciones de 10 mililitros cada una de agua destilada, se alcaliniza la solución con un mililitro de solución acuosa al 10% de hidróxido de sodio, se adicionan 40 miligramos de aminopirina, se dejan en reposo durante 5 minutos, se adicionan 4 mililitros de cloruro de metileno, se mezcla se separa la fase orgánica, se hacen dos extracciones más de igual volumen de cloruro de metileno, se reúnen los extractos orgánicos, se homogeneizan y se reduce el volumen a 5 mililitros calentando suavemente. La solución contiene 38.1 mg de Efedrina base y 37.44 mg de Codeína Base.

Se aplican muestras de un microlitro en el cromatógrafo que se encuentra en las condiciones de operación ya descritas.

Un cromatograma representativo se tiene en la siguiente página.

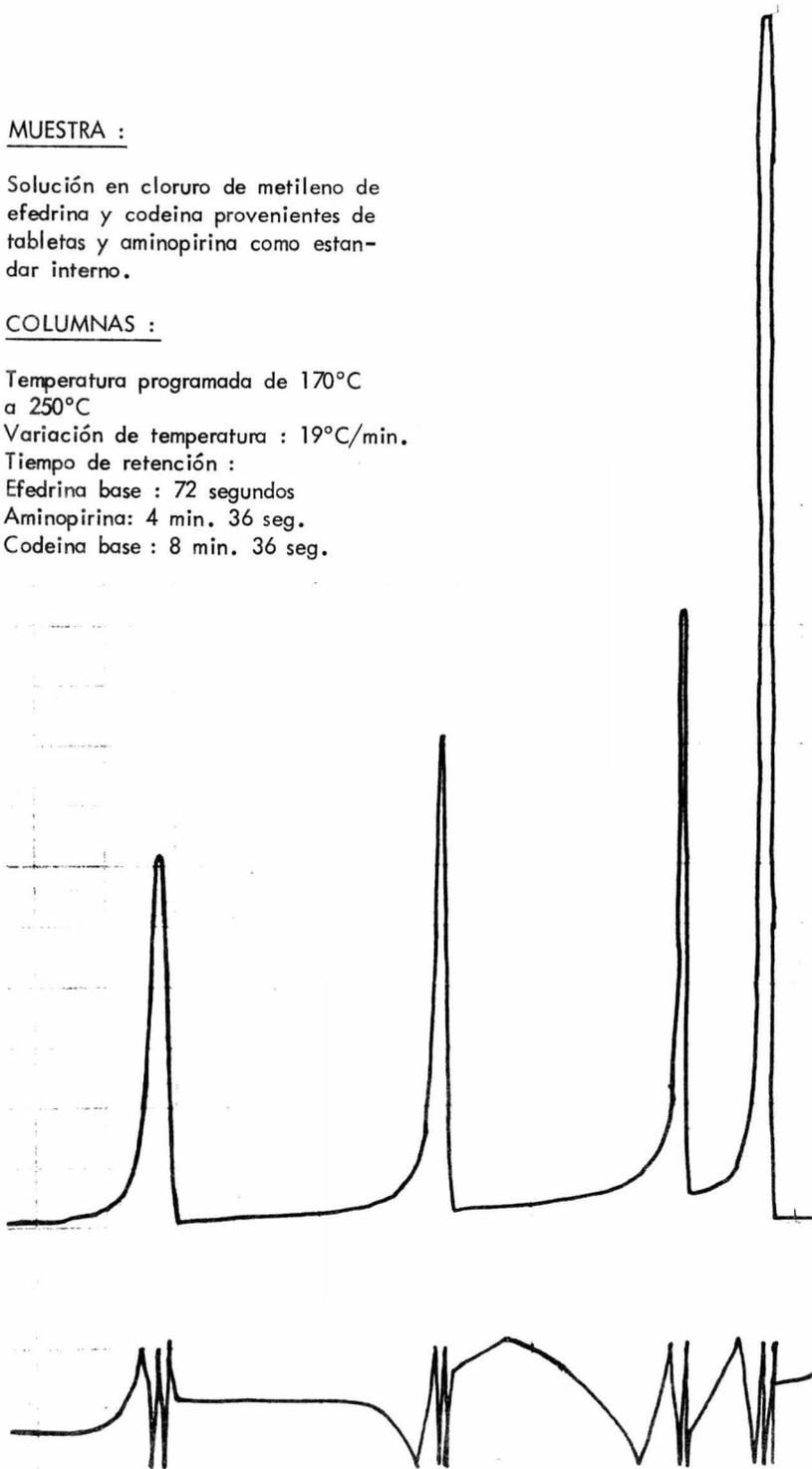
Los resultados se encuentran en la Tabla No. 3. El estudio estadístico correspondiente a las determinaciones se tiene en la Tabla No. 4.

MUESTRA :

Solución en cloruro de metileno de efedrina y codeína provenientes de tabletas y aminopirina como estándar interno.

COLUMNAS :

Temperatura programada de 170°C
a 250°C
Variación de temperatura : 19°C/min.
Tiempo de retención :
Efedrina base : 72 segundos
Aminopirina : 4 min. 36 seg.
Codeína base : 8 min. 36 seg.



CALCULOS :

$$A_2 \text{ — } 40.0 \text{ mg}$$

$$A_1 \text{ — } x$$

$$x = \text{mg. de efedrina}$$

$$A_2 \text{ — } 40.0 \text{ mg}$$

$$A_3 \text{ — } x$$

$$x = \text{mg. de codeina.}$$

en donde A_1 corresponde al área obtenida para Efedrina.

A_2 corresponde al área obtenida para Aminopirina
(estándar interno)

A_3 corresponde al área obtenida para Codeina.

Los resultados en porciento se obtuvieron de la siguiente manera :

$$38.1 \text{ mg} \text{ — } 100$$

$$\text{mg obtenidos} \text{ — } x$$

$$x = \% \text{ porciento de efedrina en la muestra.}$$

$$37.44 \text{ mg} \text{ — } 100$$

$$\text{mg obtenidos} \text{ — } x$$

$$x = \% \text{ de codeina en la muestra.}$$

TABLA No. 3

EFEDRINA					COFEINA	
A ₁	A ₂	A ₃	38.1 mg	100.0 %	37.44 mg	100.0 %
48	48.5	45	39.59	103.9	37.11	99.12
54	55	50	39.27	103.07	36.36	97.12
53	56	51	37.86	99.37	36.43	97.30
59	59	55	40.00	104.99	37.28	99.57
55	56	51	39.29	103.11	36.43	97.30
52	54	48	38.42	101.10	36.56	94.98
47	51	46	36.96	96.67	36.08	96.36
52	54	49	38.51	101.08	36.29	96.95
44.5	45	41	39.56	103.83	36.44	97.34
47	47	44	40.00	104.99	37.44	100.02
47	49	46	38.37	100.71	37.55	100.30
47	48.5	42.5	38.76	101.74	35.05	93.62
59	60	57	39.33	103.24	38.00	101.50
55	57	53	38.60	101.30	37.19	99.33
49	54	51	36.30	95.28	37.78	100.91
53	53	56	40.00	104.99	37.74	100.80
58	61	57	38.03	99.82	37.38	99.84
46	49	45.5	37.55	98.56	37.18	99.31
53	55	49	38.54	101.17	35.64	95.19
55	57.5	51.5	38.26	100.42	35.83	95.70
38	39	36	39.97	102.30	36.92	98.61
34	36	35	37.78	99.15	38.89	103.87
37.5	41	37	36.59	96.02	36.10	96.42
46	48	44.5	38.33	100.61	37.08	99.04
40	43	38	37.21	97.66	37.20	99.36
43	45	42	38.22	100.32	37.33	99.71
40	41	39	39.02	102.43	38.04	101.60
43	45	42	38.22	100.32	37.33	99.71
31	33	29	37.58	98.62	35.15	93.88
36	36	33	40.00	104.99	36.67	97.94
45	46.5	43	38.71	101.60	36.99	98.80
40	42.5	40.5	37.05	98.81	38.12	101.82
45	48.5	43	37.11	97.41	35.46	94.71
42	45	41	37.33	97.99	36.44	97.33
39	43	40	36.27	95.2	37.21	99.39
41	45	41	36.44	95.65	36.44	97.33
46	49	45	37.55	98.56	36.73	98.11
55.5	56.5	52	39.29	103.12	36.81	92.32
43	44	42	39.09	102.60	38.18	101.98
52	54	48	38.51	101.10	35.56	94.98

TABLA No. 4

EFEDRINA			CODEINA		
$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$	X_i
3.33	11.0889	103.9	0.8815	0.7770	99.12
2.50	6.2500	103.07	-1.1185	2.0709	97.12
-1.15	1.3225	99.37	-0.9385	0.8808	97.30
4.42	19.5364	104.99	1.3415	1.7996	99.57
2.54	6.4516	103.11	-0.9385	0.8803	97.30
0.53	0.2809	101.10	-3.2587	10.6178	94.98
-5.90	34.8100	96.67	-1.8785	3.5288	96.36
0.51	0.2601	101.08	-1.2885	1.6602	96.95
3.26	10.6726	103.83	-0.8989	0.8073	97.34
4.42	19.5364	104.99	1.7915	3.2095	100.02
0.24	0.0576	100.71	2.0715	4.2911	100.30
1.27	1.6129	101.74	-9.6185	21.3305	93.62
2.67	7.1289	103.24	3.2615	10.6374	101.50
0.73	0.5329	101.30	0.6715	0.4509	99.33
-5.29	27.9841	95.28	1.0915	1.4194	100.91
4.42	19.5364	104.99	2.5615	6.5615	100.80
-0.75	0.5625	99.82	1.6015	2.5648	99.84
0.60	0.3500	98.56	1.1715	1.3724	99.31
-2.01	4.0401	101.17	-3.0485	9.2933	95.19
-0.15	0.0225	100.41	-2.5385	6.4440	95.70
1.73	2.9929	102.30	0.3715	0.1380	98.61
1.42	2.0164	99.15	5.6315	31.7137	103.87
-4.55	20.7025	96.02	-2.8185	7.9439	96.42
0.04	0.0016	100.61	0.8015	0.6424	99.04
-2.91	8.4681	97.66	1.1215	1.2578	99.36
-0.25	0.0625	100.32	1.4715	2.1653	99.71
1.86	3.4596	102.43	3.3615	11.2997	101.6
-0.25	0.0625	100.32	1.4715	2.4715	99.71
-1.95	3.8025	98.62	4.3585	18.9965	93.88
4.42	19.5364	104.99	-0.2985	0.0891	97.94
1.03	1.0609	101.60	0.5615	0.3153	98.80
-1.76	3.0976	98.81	3.5815	12.8271	101.82
-3.16	9.9856	97.41	-3.5285	12.4503	94.71
-2.58	6.6564	97.99	0.9085	0.8254	97.33
-5.37	28.8364	95.2	1.1515	1.3260	99.39
-4.92	24.2064	95.65	0.9085	0.8254	97.33
-2.01	4.0401	98.56	0.1285	0.0165	98.11
2.55	6.5025	103.12	-5.9185	35.0286	92.32
2.03	4.1209	102.60	3.7415	13.9988	101.98
1.17	1.3689	101.10	3.2585	10.6178	94.98
	=323.0274	$\bar{X} = 100.571$		=255.7217	$\bar{X} = 98.24$

EFEDRINA

$$\bar{X} = 100.57\%$$

$$\text{Varianza } S^2 = \frac{(X_1 - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{323.0274}{39} = 8.282971$$

$$\text{Desv. std. de datos : } S = \sqrt{S^2} = \sqrt{8.282971} = 2.878$$

$$\text{Error estandar } S_m = \frac{S}{n} = \frac{2.878}{40} = 0.4550$$

$$\text{Coef. de variación c.v.} = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{2.878 \times 100}{100.57} = 2.8671$$

$$\text{Límites de confianza } \bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$100.57 \pm (2.21 \times 0.4)$$

$$\text{Límite Superior} = 100.57\% + (2.021 \times 0.455) = 101.49\%$$

$$\text{Límite Inferior} = 100.57\% - (2.021 \times 0.455) = 99.65\%$$

CODEINA

$$\bar{X} = 98.24\%$$

$$S^2 = \frac{(X_1 - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{255.7217}{39} = 6.55697$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{6.55697} = 2.5607$$

$$S_m = \frac{S}{n} = \frac{2.5607}{40} = \frac{2.5607}{6.32455} = 0.4049$$

$$c.v. = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{2.5607}{98.24} \times 100 = 2.6066\%$$

$$\text{Límites de Confianza} \quad \bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$98.24 \pm (2.021 \times 0.4049)$$

$$\text{Límite Superior} \quad 98.24 + (2.021 \times 0.4049) = 99.0583$$

$$\text{Límite Inferior} \quad 98.24 - (2.021 \times 0.4049) = 97.4217$$

V. COMENTARIOS.

- 1.- El control analítico de Codeina y Efedrina cuando se encuentran mezcladas en un producto farmacéutico presenta dificultades porque ambas substancias tienen propiedades semejantes que hacen necesarios procedimientos laboriosos.
- 2.- En las determinaciones por métodos espectrofotométricos se requiere de numeroso material y reactivos, así como de manipulaciones necesarias para obtener resultados reproducibles.
- 3.- Se propone un método para el análisis cualitativo y cuantitativo de Codeina y Efedrina en un producto farmacéutico en forma de tabletas por Cromatografía de Gases.
- 4.- Las manipulaciones necesarias para efectuar las determinaciones de las substancias no son complicadas por lo que los resultados obtenidos tienen un número reducido de posibilidades de error.
- 5.- Las condiciones adecuadas para el análisis ya se han establecido lo que permite el uso del método en el control de calidad de las tabletas durante su elaboración.

CONCLUSIONES.

- 1.- Las condiciones instrumentales son reproducibles por lo tanto el uso de la Cromatografía de Gases o Cromatografía en fase de vapor es adecuado en el control de calidad de fármacos.
- 2.- El número de manipulaciones necesarias para efectuar el análisis de Codeína y Efedrina en tabletas permite que se obtengan resultados reproducibles en un tiempo razonable de análisis.
- 3.- El método propuesto es reproducible conforme a los datos estadísticos obtenidos con límites de confianza para efedrina de 99.65% a 101.49% y para codeína de 97.42% a 99.06%, lo que permite su uso como método analítico en el control de calidad de los principios activos mencionados en tabletas.

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Hidalgo y M.M. del C.; Farmacia Química, Editorial Alhambra; -- 1969, pág. 7-20.
- 2.- Szepesy, L., Gas Chromatography; english translation; London Ilife-Book LTD.; Inst. ed.; 1970; pág. 1-16-92-175.
- 3.- Knox, J. H.; Cromatografía de Gases; J. Wiley and Sons., N.Y.- 1962, págs. 1-7, 50-75.
- 4.- Schupp III, O.E.; Gas Chromatography; Interscience Publications, Lon- don, 1968; págs. 1-23, 39-44, 173-195.
- 5.- Buzon, J.N. Guichard, N. y colab.; Practical Manual of Gas Chro- matography; Elsevier Pub. Co.; London; 1969, pág. 91-135, 214, - 221-224.
- 6.- Clark, E.G.C.; Isolation and Identification of Drugs; The Pharma- - ceutical Press; London, 1969, pág. 82-83, 268, 327.
- 7.- Dabrio, M. V.; Cromatografía de Gases, Volumen I, 1a. edición, -- Editorial Alhambra, 1971, págs. 60-83.
- 8.- Jenkins, G. L.; Knevel, A. M.; Quantitative Pharmaceutical Che- mistry, 6th. Edition; Mc Grae Hill Book Co., London, 1967, págs.- 436-441.
- 9.- Perkin Elmer; Practical Gas Chromatography Manual; Perkin Elmer, - págs. 1-1 a 1-5, 2-9, 6-16 a 6-23.

- 10.- Storch de Gracia, J.M.; Fundamentos de la Cromatografía de Gases, 2a. Edición, Editorial Alhambra, 1975, págs. 79-81.
- 11.- Beckett, A.H., Stenlake, J.B. ; Practical Pharmaceutical Chemistry; Part. Two; 2nd. Edición; The Athlone Press; London; 1970 págs. - 84-94.
- 12.- Sunshine, I. ; Handbook of Analytical Toxicology; The Chemical Rubber Co., U.S.A., 1969, pág. 797-808, 990-1014.
- 13.- Kem, H. y colab.; Gas Chromatographic Analysis of Pharmaceutical and Drugs; Varian Aerograph; U.S.A., 1968, págs. 2,3,60-64.
- 14.- Dabrio, M.V.; Cromatografía de Gases, Volumen II, 1a. Edición, - Editorial Alhambra, 1973, págs. 39-60.
- 15.- Strobel, H.A.; Instrumentación Química, Editorial Limusa Wiley, S.-A., México, 1968, págs. 492-499.
- 16.- Hungarian Pharmacopoeia; VI Edition; Akademiai Kiadó, Budapest, - - 1972, págs. 251, 252, 278 - 279.