



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

**"ESTUDIOS ANALÍTICOS DE QUIMIOTERÁPICOS.  
NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA  
DE PRINCIPIOS ACTIVOS COADMINISTRADOS, EN  
FÁRMACOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS"**

Florentina Cañada Cañada  
Badajoz, 2002



**"ESTUDIOS ANALÍTICOS DE QUIMIOTERÁPICOS. NUEVOS  
MÉTODOS DE DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE  
PRINCIPIOS ACTIVOS COADMINISTRADOS, EN FÁRMACOS Y  
FLUIDOS BIOLÓGICOS"**

por

**Florentina Cañada Cañada**

VISADO en Badajoz a 19 de diciembre de 2001



Fdo.- Dra. Dña Anunciación Espinosa Mansilla  
Profesora Titular del Departamento de Q<sup>ca</sup> Analítica  
Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura.



Fdo.- Dra. Dña. M<sup>a</sup> Isabel Acedo Valenzuela.  
Profesora Titular del Departamento de Q<sup>ca</sup> Analítica  
Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura.

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado "Análisis Químico y Control de Alimentos", bienio 1996-1998, impartido por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura.



Fdo.: Florentina Cañada Cañada



**DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA**

Campus Universitario  
Avda. de Elvas, s/n  
06071-BADAJOS  
Teléfono (924) 28.93.00  
Teléfono y FAX (924) 28.93.75

Badajoz, 19 de diciembre de 2001

FRANCISCO SALINAS LÓPEZ, Catedrático-Director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

**INFORMA:**

Que el Trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de **"ESTUDIOS ANALÍTICOS DE QUIMIOTERÁPICOS. NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE PRINCIPIOS ACTIVOS COADMINISTRADOS, EN FÁRMACOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS"** ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. Anunciación Espinosa Mansilla y la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Isabel Acedo Valenzuela, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección de Químicas.



Fdo.: D. Francisco Salinas López



A lo largo del tiempo que ha durado esta Tesis y que, por fin, ya se acaba, o mejor dicho se da por acabada, pues siempre se podrían hacer más cosas, han sido muchas las personas que, de una manera u otra, han contribuido a que siguiera adelante, sobre todo en aquellos momentos en los que todo sale mal y no se ve el fin por ninguna parte.

Sin lugar a dudas, las personas a los que más tengo que agradecer haber podido realizar este trabajo, apoyándome incondicionalmente y poniendo a mi alcance los medios necesarios, todo sin esperar nada a cambio, sólo mi felicidad, han sido mis padres.

A las Doctoras Anunciación Espinosa Mansilla y M<sup>o</sup> Isabel Acedo Valenzuela, Directora y co-Directora, respectivamente, de esta tesis, por las facilidades y accesibilidad que me han prestado en todo momento, siempre dispuestas a ayudarme y asesorarme en aquello que he necesitado. Para mí ha sido un placer ser dirigido por ellas.

Al Doctor Arsenio Muñoz de la Peña, porque gracias a sus esfuerzos y "dolores de cabeza" he podido disfrutar de una beca de 3 años, asociada al proyecto de la Comunidad Europea FISAC, la cual me ha permitido realizar esta tesis.

A todos los demás profesores del Departamento de Química Analítica: Dr. D. Francisco Salinas, director del mismo, Dra. Carmen Mahedero, Dra. Teresa Galeano, Dra. Agustina Guiberteau, Dra. Isabel Durán, Dra. M<sup>o</sup> Isabel Rodríguez y Dra. Nielen Mora, gracias por vuestra acogida y ayuda a lo largo de estos años.

A Manolo Caro, por el tiempo que le he hecho perder y por tanto que me ha hecho ganar, solucionándome todo tipo de contratiempos, sobre todo los relacionados con las averías de la furgoneta del proyecto.

A los compañeros del departamento, Toni, María, M<sup>o</sup> José, Lole, Belén, Corola, Raquel, Laura, Santos, Rafa, Manolo, Antonio, David y Diego, con los que todos los días estoy, codo con codo, compartiendo equipos, ordenadores, penas, alegrías... pero sobre todo muy buenos momentos de café que nos sirven de terapia antiestrés.

A Toni, porque además de compañera de carrera, de departamento... y, a pesar, de conocerme hace más de 10 años, sigues siendo mi AMIGA, en los buenos y, sobre todo, en los malos momentos.

A Amparo y Cristina, que más que mis compañeras de piso y amigas, son mi segunda familia, pues ellas son las que han tenido que convivir con mis malas rachas y me han apoyado cuando más lo he necesitado.

A todos los demás amigos, no pongo nombres por si se me olvida alguno, por la paciencia que han tenido conmigo.

**GRACIAS A TODOS**



*A mis padres*

*"La vida es aquello que te va sucediendo, mientras  
nosotros nos empeñamos en hacer otros planes"*

*(John Lennon)*



## **OBJETO DE LA TESIS DOCTORAL**

El objeto de esta Memoria de Investigación es el estudio analítico de quimioterápicos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis y la puesta a punto de nuevos métodos para su determinación, en presencia de otras sustancias de interés, tales como metabolitos o creatinina. Estos métodos se han aplicado a la determinación de los mismos en formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos.



## PRESENTACIÓN DE CAPÍTULOS

En el **capítulo 1**, se hace una introducción acerca de los analitos objeto de estudio y su aplicación en el campo de la medicina. También se describen los reactivos y aparatos empleados.

En el **capítulo 2**, se estudian las características de interés analítico de la rifamicina SV y se proponen dos métodos cinético-espectrofotométricos, uno manual y otro semiautomático, utilizando un mecanismo de flujo interrumpido (stopped-flow), para su determinación en formulaciones farmacéuticas. El método semiautomático se aplica a la determinación de rifampicina en una formulación farmacéutica y en muestras de orina.

En el **capítulo 3**, se aborda la determinación de isoniacida, piracinamida y rifampicina utilizando dos métodos de calibración multivariante, PLS y HLA. Ambos métodos se aplican a la determinación de los compuestos en formulaciones farmacéuticas.

En el **capítulo 4**, se propone un método cromatográfico para la determinación y resolución de muestras conteniendo los tres principios activos antes mencionados, así como acetilisoniacida (metabolito de isoniacida) y creatinina. El método se aplica al análisis de formulaciones farmacéuticas y muestras de orina.

Finalmente, en el **capítulo 5**, se establece un método electroforético para la separación y determinación de los principios activos y acetilisoniacida. Dicho método se aplica a la determinación de los analitos en formulaciones farmacéuticas y suero sanguíneo.



## **CAPÍTULO 1**

**INTRODUCCIÓN. APARATOS Y REACTIVOS**



## INTRODUCCIÓN

La finalidad de los trabajos experimentales que se describen en la presente Memoria, ha sido el desarrollo de diferentes métodos instrumentales de análisis. Los métodos instrumentales de análisis se basan en la medición de propiedades físicas de los analitos tales como la conductividad, absorción o emisión de la luz, razón masa/carga, fluorescencia, etc. Además, existe un grupo de procedimientos instrumentales que se utilizan para separar y resolver compuestos estrechamente relacionados. La mayoría de estos procedimientos se basan en la cromatografía, aunque en la actualidad está teniendo un auge importante el uso de la electroforesis capilar (1).

Se han puesto a punto: un método cinético-espectrofotométrico; dos métodos de calibración multivariante aplicados a espectros de absorción UV-Vis de muestras multicomponente; un método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y otro de electroforesis capilar en medio micelar (MEKC). Todos ellos han sido aplicados a la determinación de los analitos objeto de estudio en formulaciones farmacéuticas y/o fluidos biológicos (orina y suero).

Los analitos estudiados han sido, cuatro sustancias utilizadas en la terapia de la tuberculosis (Rifamicina SV, Rifampicina, Isoniacida y Piracinamida), un metabolito de isoniacida (Acetilisoniacida) y un producto de degeneración de la creatina (creatinina).

Dado que las principales sustancias con las que hemos trabajado han sido quimioterápicos utilizados en la terapia de las infecciones producidas por el *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria ácido resistente, productor de la tuberculosis, resumiremos brevemente que es esta enfermedad, así como las vías de contagio.

## TUBERCULOSIS. Generalidades

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. Puede afectar a cualquier parte del cuerpo, pero usualmente ataca a los pulmones. En la mayoría de los casos, después de que las bacterias entran en el cuerpo, las defensas de éste las controlan creando una pared alrededor de ellas. Las bacterias pueden permanecer vivas dentro de estas paredes en un estado "inactivo" por años. Las personas infectadas con tuberculosis en esta etapa, no presentan síntomas y tampoco pueden contagiar la enfermedad. Pero pueden desarrollarla en un futuro, esta segunda fase (llamada enfermedad activa), se manifiesta por la destrucción de los tejidos finos del órgano afectado.

El contagio de la tuberculosis va a depender del tipo de órgano afectado. La tuberculosis pulmonar o de garganta, puede transmitirse al ser inhalado el aire infectado por bacterias arrojadas por una persona enferma, al toser, estornudar o hablar. No obstante debe haber un contacto cercano, diario, para contraer la enfermedad. La tuberculosis en riñones, huesos o cerebro es, normalmente, no contagiosa. La prueba inicial de diagnóstico para la tuberculosis es la prueba cutánea de la tuberculina, que es una proteína derivada del microorganismo que causa la tuberculosis y es absolutamente inofensiva al cuerpo. Si la prueba es positiva no significa que se tenga la enfermedad activa, para comprobarlo hay que hacer una radiografía del órgano.

El número de enfermos de tuberculosis en el mundo está relacionado con las condiciones económicas, la mayor incidencia aparece en países de África, Asia, y América Latina, los cuales tienen un producto nacional bruto muy bajo. La OMS (Organización Mundial de la Salud), estima que ocho millones de personas se contagian de tuberculosis cada año, de las cuales el 95% viven en países en vías de desarrollo (2).

Los tratamientos para eliminar la bacteria son largos, unos 6 ó 9 meses y nunca se prescribe una droga únicamente, ya que el microorganismo se hace resistente. Es necesario administrar combinaciones de diferentes drogas.

## ANALITOS OBJETO DE ESTUDIO

Las sustancias utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis pueden dividirse en fármacos de primera y de segunda línea. Los de primera línea son los más eficaces y se consideran esenciales para los tratamientos cortos. Los de segunda línea, en cambio, son mucho menos eficaces y producen más efectos secundarios.

Las sustancias antituberculosas estudiadas, y que se describen en esta Memoria (Rifampicina, isoniacida y piracinamida), pertenecen al primer grupo y suelen administrarse conjuntamente, bien en combinaciones de dos de ellas, o junto con etambutol. La Rifamicina SV no está englobada en las drogas de primera línea, ya que su potencia *in vivo* es menor que la de Rifampicina. La creatinina, sustancia producida por el cuerpo de forma natural y excretada por la orina, se ha incluido en este estudio por utilizarse en la normalización de la excreción de compuestos en muestras de orina.

## ★ RIFAMICINAS

Las rifamicinas son antibióticos semisintéticos de la familia de las ansamicinas, de estructura naftoquinónica y que presentan actividad primariamente bactericida de amplio espectro.

Las rifamicinas se obtuvieron por vez primera en 1957, a partir de caldos de cultivo de *Streptomyces mediterranei*, aislado de una muestra de tierra del sur de Francia. Se aislaron cinco rifamicinas (A, B, C, D y E), de las cuales, la rifamicina B era la más activa. Posteriormente por vía sintética, se procedió a la incorporación de diversos radicales en la rifamicina B, lo que ha dado origen a las rifamicinas semisintéticas que más se emplean en clínica: rifamicina SV, rifampicina, y rifamida.

Por su estructura química, la rifamicina B y sus tres derivados semisintéticos tienen cierta semejanza con los macrólidos. Es una molécula compleja integrada por dos partes, un anillo aromático de 1,4-dihidronaftaleno y una larga cadena alifática con cinco grupos metilo, que a modo de puente (y de aquí deriva el nombre de *ansamicinas*), une dos extremos del anillo aromático.

La estructura química general de las rifamicinas es (**figura 1.1**):

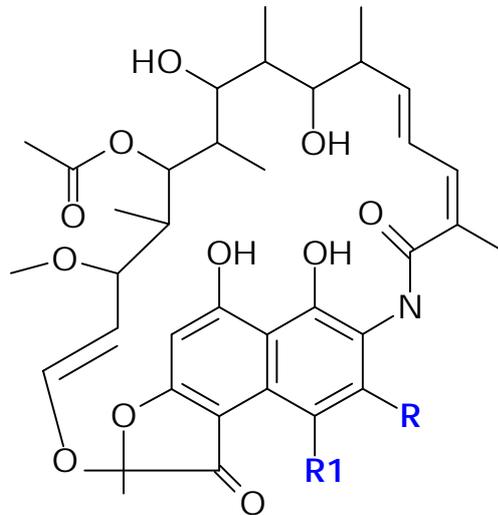
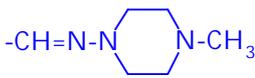


Figura 1.1. - Estructura general de las rifamicinas

PRINCIPIO ACTIVO	R	R <sub>1</sub>
Rifamicina B	H	O-CH <sub>2</sub> -COOH
Rifamicina SV	H	OH
Rifamida	H	OCH <sub>2</sub> -CO-N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Rifampicina	-CH=N-N  N-CH <sub>3</sub>	OH

Las tres últimas se obtienen por semisíntesis, a partir de la rifamicina B, siendo esta la más activa de las rifamicinas naturales.

Se presentan en forma de polvos cristalinos de color rojo o anaranjado, poco hidrosolubles, pero solubles en solventes orgánicos como acetona, metanol, etanol, N,N-dimetilformamida, etc. La rifampicina es liposoluble. Una de sus principales características es ser sensibles a la luz.

### Modo de acción

Las rifamicinas inhiben la síntesis del DNA. Su acción es de tipo bactericida y sólo se ejerce sobre los microorganismos sensibles que se encuentran en fase de crecimiento. Son de amplio espectro, siendo la rifampicina más activa que la rifamicina SV. Quizá la peculiaridad más importante de su espectro, es su actividad frente a mycobacterias incluyendo las variedades de *M. tuberculosis*, mycobacterias atípicas y *M. Leprae* (3).

### Metabolización y eliminación

La rifamicina SV tiene una absorción digestiva reducida e irregular en sujetos normales, sin embargo la rifampicina se absorbe de forma rápida y casi total, es estable al ácido y mejor absorbida en ayunas. Son biotransformadas en el hígado en un 25-40 %, principalmente a desacetilrifamicinas, que mantienen gran parte de su actividad antibacteriana. Debido a la inducción enzimática, repetidas administraciones de rifampicina conducen a una aceleración pronunciada de su propia eliminación lo cual requiere, a menudo, el ajuste de la dosis de administración y su monitorización (4).

La eliminación de las rifamicinas, se hace fundamentalmente por las vías biliar y urinarias. La ruta principal de excreción, la hepática y secundariamente la fecal, es más alta en la rifamicina SV (60-80 % de la dosis suministrada) que en la rifampicina (30-40%). La excreción urinaria es reducida y lenta, sólo de 1-10% en la rifamicina SV y 18-30 % en la rifampicina.

Durante el tratamiento con rifamicinas, la saliva, heces, esputos, lágrimas, leche y orina se pigmentan de un color rosa-anaranjado o rojizo.

En cuanto a la rifamicina SV la inyección intramuscular única de 500 mg en un adulto produce concentraciones séricas medias de  $3.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  la primera hora;  $1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  a las 2 horas y  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  a las 6-horas. La inyección intravenosa única de 500 mg en un adulto produce niveles sanguíneos medios de  $132 \mu\text{g mL}^{-1}$  a los 5 minutos;  $66 \mu\text{g mL}^{-1}$  a los 10 minutos; y  $13 \mu\text{g mL}^{-1}$  a las 2 horas. La rifampicina tiene un tiempo de permanencia mayor, encontrándose a las 12 horas concentraciones de aún  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **Aplicaciones clínicas e interacciones con otros fármacos.**

Están indicadas en la terapéutica de la tuberculosis pulmonar y urogenital, principalmente, administrándose junto a otros antituberculosos (isoniazida, etambutol, piracinamida, estreptomina, p-aminosalicílico, etc), ya que los microorganismos pueden presentar resistencia, y es por eso que nunca se trata la tuberculosis con este único antibiótico. También están indicadas para el tratamiento de la lepra e infecciones hepatobiliares. Tratamientos de portadores nasofaríngeos de meningococo así como para efectuar la quimiopprofilaxis de la infección meningocócica, especialmente en grupos reducidos de sujetos.

Están contraindicadas en la insuficiencia hepática, recién nacidos, embarazadas (la rifampicina es capaz de atravesar la barrera placentaria, habiéndose encontrado restos de la droga en la sangre del feto). No debe administrarse junto con fármacos potencialmente hepatotóxicos. Pueden producir efectos teratógenos en animales de experimentación (5). En lo que respecta a las interacciones farmacológicas, las rifamicinas parecen disminuir la eficacia de los anovulatorios orales, con el consiguiente riesgo de su efecto contraceptivo. El ácido p-aminosalicílico reduce los niveles séricos de rifampicina mientras que el probenecid los aumenta. La administración simultánea de rifamicina y anticoagulantes cumarínicos hace disminuir el efecto de estos últimos. Igualmente disminuye también el efecto de los glucocorticoides.

## ISONIACIDA y ACETILISONIACIDA

La isoniacida por su excelente actividad, bajo costo y relativa buena tolerancia, es considerada el mejor fármaco antituberculoso del que se dispone, por lo que siempre debería estar incluido en cualquier régimen terapéutico, si la cepa *M. Tuberculosis* es sensible. La isoniacida es la hidracina del ácido isonicotínico, una molécula pequeña e hidrosoluble que penetra fácilmente en las células.

### Modo de acción

La isoniacida posee acción bacteriostática sobre los bacilos en etapa de reposo, pero actúa como bactericida si aquellos están en fase de división rápida. La concentración bacteriostática mínima es de 0.025 a 0.05  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , mostrando una selectividad extraordinaria para las micobacterias (6).

Se desconoce el mecanismo de acción, pero se han planteado algunas hipótesis que sugieren una acción primaria en la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos (constituyentes importantes de la pared bacteriana).

### Metabolismo y eliminación

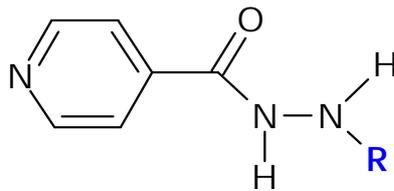
La isoniacida por vía bucal se absorbe totalmente en el tracto gastrointestinal y la concentración sanguínea máxima se consigue en una a dos horas; por vía intramuscular la absorción es más rápida y la concentración hemática ocurre a los 30 a 60 minutos; luego el nivel desciende hasta desaparecer prácticamente a las 24 horas.

En el organismo, especialmente en el hígado, la isoniacida: a) se acetila mediante la transacetilasa, con formación de acetilisoniacida, bacteriológicamente inactiva y menos tóxica, la velocidad de acetilación está controlada genéticamente;

b) se produce N-metilación en pequeña escala; c) también se forma ácido isonicotínico y pequeñas cantidades de su conjugado con glicina, la isonicotinilglicina o ácido isonicotinilúrico.

La isoniacida y sus metabolitos se excretan principalmente en la orina y una pequeña porción, 5 a 10%, se excreta en las heces. La vida media de la droga es de alrededor de 60 minutos en los inactivadores rápidos y de 160 minutos en los lentos (7).

En la **figura 1.2** se muestran las estructuras correspondientes a isoniacida y acetilisoniacida, que es su principal metabolito y el cual ha sido objeto de estudio en esta memoria.



**R= —H Isoniacida ; R= —Ac Acetilisoniacida**

*Figura 1.2 . - Estructura de isoniacida y acetilisoniacida*

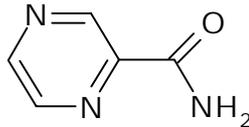
### Contraindicaciones

Entre los efectos adversos, los más notables son erupciones, fiebre, ictericia y neuritis periféricas, pero éstos se producen en un bajo porcentaje de los pacientes tratados si se lleva a cabo una vigilancia cuidadosa (6).

La isoniacida debe utilizarse con mucho cuidado en los pacientes con antecedentes epilépticos y en los sujetos que han padecido alguna enfermedad mental.

## PIRACINAMIDA

La piracinamida (piracinocarboxamida) es un compuesto sintético derivado del ácido nicotínico (**figura 1.3**)



*Figura 1.3. - Estructura de Piracinamida*

### Modo de acción

El mecanismo de acción de la piracinamida se cree que es similar al de la isoniacida. Se considera primariamente eficaz frente a las micobacterias localizadas dentro de los macrófagos, ya que es activa sólo a pH ácido. Su mecanismo íntimo de acción se desconoce. Si solamente se utiliza este medicamento, rápidamente surge resistencia (6).

### Metabolismo y eliminación

Esta droga tiene una absorción y distribución excelente por todo el organismo; con 1 g por vía bucal se obtiene en sangre  $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ . El fármaco se hidroliza en el hígado a ácido piracinoico, que se considera que es la forma activa del fármaco. La vida media de la piracinamida es de alrededor de 12 horas.

La piracinamida y sus metabolitos son eliminados por la orina: 4-14% como droga libre y el resto como metabolitos formados en el hígado (8).

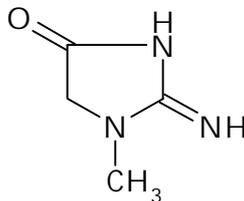
### Contraindicaciones

El efecto adverso más frecuente y grave es el daño hepático. Después de ingerir una dosis de 3g ( 40 a 50 mg kg<sup>-1</sup> de peso), surgen signos y síntomas de hepatopatía en aproximadamente 15% de los pacientes, ictericia en 2 a 3% de ellos y muerte por necrosis hepática en casos poco frecuentes. La piracinamida produce también hiperuricemia, artralgias, anorexia, náuseas, disuria, malestar general y fiebre (6).

### CREATININA

La creatinina es un producto residual de la digestión de proteínas y una medida de la función del riñón. Niveles altos son normalmente debidos a problemas nefríticos. Los médicos usan el nivel de creatinina como la señal directa de cómo los riñones desechan los productos residuales del cuerpo (13).

La estructura de creatinina se muestra en la **figura 1.4**.



*Figura 1.4. - Estructura de creatinina*

## OTROS ANTIBIÓTICOS ANTITUBERCULOSOS

Entre las drogas que pertenecen al primer grupo también se encuentran el **Etambutol**, que es un derivado de la etilendiamina, cuyo mecanismo de acción se desconoce. El fármaco es hidrosoluble y se absorbe bien por vía digestiva. Su efecto adverso más grave es el desarrollo de neuritis óptica. **Estreptomicina**. Es un aminoglucósido con capacidad bactericida frente a *M. tuberculosis* y barato, pero tiene el inconveniente que sólo puede emplearse por vía intramuscular y tiene una importante toxicidad. Sólo es eficaz frente a microorganismo extracelulares. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosómico.

Entre los fármacos de segunda línea se encuentran: ácido paraaminosalicílico, etionamida, protoniamida, cicloserina, capreomicina, kanamicina, amikacina y Tiacetazona (2).

En los últimos años se han empezado a utilizar nuevos fármacos en el tratamiento de la tuberculosis. Algunos de los más importantes son: **Rifabutina**. Es un derivado de las rifamicinas, al igual que rifampicina. Su acción frente a *M. Tuberculosis* es bactericida. Aunque alcanza concentraciones menores que la rifampicina, tiene una semivida mucho mayor. **Quinolonas**. Tanto el ciprofloxacino como el ofloxacino y el esparfloxacino han demostrado ser bactericidas in vitro frente a *M. Tuberculosis*. Las **fluoroquinolonas** son fármacos muy seguros que absorben y se distribuyen bien por el organismo. La experiencia clínica alienta el uso de estos antibióticos junto a otros fármacos en el tratamiento de la tuberculosis (9).

## PAUTAS TERAPÉUTICAS

La pauta terapéutica general recomendada es: isoniacida, rifampicina y piracinamida, diariamente durante los dos primeros meses; y después isoniacida más rifampicina durante los cuatro meses restantes (10, 11). De no poder utilizarse la asociación isoniacida, rifampicina y piracinamida por contraindicación o intolerancia a alguno de estos fármacos, es aconsejable reemplazar el fármaco implicado por etambutol. También pueden emplearse regímenes con dosis semanales o bisemanales usando dosis altas de fármacos (12).

Cómo hemos dicho anteriormente, en el trabajo de Tesis, se han puesto a punto diferentes métodos analíticos para la separación y/o determinación de los analitos antes citados. Para ello se han utilizado diversas técnicas instrumentales, que como se mencionó anteriormente han sido: espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis, cromatografía y electroforesis, además, dentro de la espectrofotometría se han hecho estudios de cinética de reacción y calibración multivariante. Por todo ello, por motivos de organización, hemos decidido abordar los fundamentos teóricos de cada técnica, así como los antecedentes bibliográficos más relevantes de los analitos en estudio, en los capítulos correspondientes a cada una de ellas.

## APARATOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE LA MEMORIA

### Aparatos

✓ pH-metro "Crison", modelo 501, provisto de electrodo combinado de vidrio y de calomelanos saturado Metrohm EA120 y de microelectrodo combinado Crison.

✓ Balanza Ohaus con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg.

✓ Baño de ultrasonido, P. Selecta.

✓ Sistema de obtención de agua ultrapura, Milli-Q, consta de dos aparatos, uno es el RI Os/elix y el otro un Milli-Q.

✓ Espectrofotómetro UV-visible Milton Roy, modelo Spectronic 3000. Se emplean cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor, posee un sistema de detección "Diode Array" microordenador PC 386 incorporado y software propio Rapidscan.

✓ Ultratermostato Selecta Mod. Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $100^{\circ}\text{C}$ , con una precisión de  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Este equipo se conectó al soporte de la cubeta en el espectrofotómetro Milton Roy para estudiar influencias de temperatura.

✓ Espectrofotómetro UV-visible Beckman, modelo DU-640, con computador incorporado y software propio.

✓ Accesorio para cinéticas rápidas RX-1000 de Applied Photophysics, con jeringas de 5 ml, que se acopló al espectrofotómetro Beckman

✓ Cromatógrafo Waters 600E, equipado con una bomba Waters 610 y dos detectores, UV-visible, Model 486 y fluorescente Model 474. El sistema está equipado con una válvula de 6 vías, Rheodyne, bucle de 20  $\mu$ l y columna Nova-Pak C-18 (15 cm x 3.9 mm).

✓ Cromatógrafo Hewlett-Packard HPLC Mod. 1100, equipado con desgasificador, bomba cuaternaria válvula de inyección de 6 vías, bucle de 20  $\mu$ l y detector "Diode Array". El equipo está provisto de un ordenador a través del cual se controlan todas las funciones del cromatógrafo así como la adquisición y el análisis de datos. La columna analítica utilizada fue una NOva-Pak C-18 (15 cm x 3.9 mm).

✓ Equipo de electroforesis capilar Hewlett-Packard Mod. <sup>3D</sup>CE, equipado con detector "Diode Array", sistema de refrigeración del capilar, carrusel de 48 muestras e inyector automático. El capilar utilizado ha sido un capilar de sílice (48,5 cm y 40 cm de longitud efectiva). El equipo es controlado desde un ordenador a través del cual se controla todas sus funciones y también se efectúa el tratamiento y adquisición de datos.

## Reactivos

### Disoluciones reguladoras o tampón

#### *Disoluciones reguladoras de amoníaco/cloruro amónico:*

- Disolución reguladora amoníaco/cloruro amónico, 0.5M en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y pH= 10.2.-  
Se partió de una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5M a la que se añadió  $\text{NH}_4\text{OH}$  del 25% (PANREAC, P.A.) hasta obtener el pH requerido.

- Disolución reguladora amoníaco/cloruro amónico, 0.1M en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{pH} = 9.48$ .- Se partió de una disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1 M a la que se añadió  $\text{NH}_4\text{OH}$  del 25% (PANREAC, P.A.) hasta obtener el  $\text{pH}$  requerido.

*Disoluciones reguladoras de fosfato de diferentes valores de pH:*

- Disoluciones de  $\text{pH}$  2.5, 4.5, 7.0.- Se partió de disoluciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MERCK) 20 mM a las que se añadió,  $\text{KOH}$  (SIGMA) ó  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (PANREAC, P.A.), según el  $\text{pH}$  requerido.

-Disolución de  $\text{pH}$  12.- Se partió de una disolución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (MERCK) 20 mM a la que se añadió  $\text{KOH}$  hasta  $\text{pH}$  12.

*Disoluciones reguladoras de borato de diferentes valores de pH:*

-Disoluciones de  $\text{pH}$  8.0, 9.2 y 10.0.- Se partió de disoluciones de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  20 mM a las que se añadió,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (MERCK) 100 mM ó  $\text{NaOH}$  (MERCK) 100 mM según el valor de  $\text{pH}$ .

-Disoluciones de  $\text{pH}$  8.5 de diferentes concentraciones de sal (10-40 mM), se partió de disoluciones de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  200 mM y por dilución se consiguió la concentración deseada, el  $\text{pH}$  8.5 se fijó añadiendo  $\text{H}_3\text{BO}_3$  100 mM.

**Disoluciones estándar**

Disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) (MERCK) de 150 mM, por pesada de 2.163 g de SDS y enrasado con agua desionizada a 50.0 ml.

Disolución de colato sódico (merck) de 150 mM, por pesada de 1.611 g del producto y enrasado con agua desionizada a 25.0 ml.

Disolución estándar de rifamicina SV (SIGMA) de 100 ppm, por pesada de 0.0100 g de rifamicina SV y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disoluciones estándar de rifampicina (SIGMA) de 100, 200 ppm, por pesada de 0.0100 ó 0.0200 g de rifampicina, respectivamente y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disoluciones estándar de isoniacida, piracinamida (SIGMA) de 100, 200 y 400 ppm, por pesada de 0.0100, 0.0200, 0.0400 g respectivamente de isoiacida o piracinamida y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disoluciones estándar de nabumetona, prednisona, indometacina, ibuprofeno, probenedid, trimetoprim, sulfanilamida, estreptomicina, fenilbutazona (SIGMA) de 300 ppm, por pesada de 0.0300g de producto y dilución hasta 100.0 ml con etanol 99.5% (PANREAC. P.A.) al 50%.

Disoluciones estándar de eritromicina (Baihringer Mannheim GmbH), sulfaquinoxalina, sulfametacina, neomicina, sulfametoxazol (SIGMA) de 300 ppm, por pesada de 0.0300 g de producto y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disoluciones estándar de ácido ascórbico (PANREAC, P.A.) de 300 y 500 ppm por pesada de 0.0300 ó 0.0500 g de ácido ascórbico y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disoluciones estándar de cloranfenicol (Fluka), tetraciclina (SIGMA) de 200 ppm, por pesada de 0.0200 g de producto y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Disolución estándar de etambutol (SI GMA) de 150 ppm, por pesada de 0.0150 g de producto y dilución hasta 100.0 ml con agua desionizada.

Las disoluciones estándar de acetilisoniacida se prepararon a partir de una disolución de isoniacida, siguiendo el procedimiento Eidus (14), que a continuación describimos:

Disolución estándar de acetilisoniacida 57 mM.- A 10 ml de isoniacida 60 mM se le añadieron 0.5 ml de anhídrido acético, la disolución resultante se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 6 h, después se guardó en la nevera.

*Disolventes orgánicos utilizados en HPLC Y MEKC:*

Acetonitrilo y metanol (MERKC, grado HPLC)

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- R. Keller, J.M. Merwell, M. Ottor y H.M. Widmer. Ed. Wiley-VCH (1998).
- 2.- <http://www.Umdnj.edu/ntbcweb/qaintro.html>
- 3.- D. Damaso, M. Moreno-López y R.M. Daza; *"Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico"*. Ed. Grutesa (1984).
- 4.- A. El-yagizi y D. A. Raines; *Pharm. Res.*, Vol 9, nº 6 (1992).
- 5.- A. Korolkovas, J.H. Burckhalter; *"Compendio esencial de Química farmacéutica"*. Ed. Reverté (1983).
- 6.- A. Goodman-Hilman, T. Rall, A. Nier y P. Tailar; *"Las bases farmacológicas de la terapéutica"*, 9ª ed., Ed. McGraw-Hill (1996).
- 7.- M. Litter; *"Compendio de farmacología"*, Ed. El Ateneo (1980).
- 8.- <http://www.Uct.ac.za/depts/mmi/jmoodie/j04html.html>
- 9.- <http://www.geocities.com>
- 10.- G. Acoccella; *"Comparative bioavailability of isoniazid, rifampicin and pirazinamide administered in free combination and in fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy"*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, (138), 882, (1988).
- 11.- Hong-Kong Chest Service. British Medical Research Council. *"Acceptability, compliance and adverse reaction when isoniazid, rifampicin and pyrazinamide are given as a combined formulation or separately during three times weekly antituberculosis chemotherapy"*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, (140), 1618, (1989).
- 12.- International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases. Committee of Treatment; *Bul Int Union Tuberc Lung Dis.*, (63), 64, (1988).
- 13.- <http://www.aidsinonet.org/107e-labs2.html>.
- 14.- L. Eidus, A. M. Harnanansingh y A.G. Jessamine; *Am. Rev. Dis.*, (91), 587, (1971).

## CAPÍTULO 2

ESTUDIOS ANALÍTICOS Y DETERMINACIÓN  
MEDIANTE MÉTODOS CINÉTICO-  
ESPECTROFOTOMÉTRICOS (MANUAL Y  
SEMIAUTOMÁTICO) DE ANSAMICINAS



## MÉTODOS CINÉTICOS EN QUÍMICA ANALÍTICA

En la bibliografía analítica son numerosos las referencias sobre métodos cinéticos catalíticos y no catalíticos, y su aplicación a diversos campos del análisis. Así, es frecuente encontrar dichas referencias sobre todo en análisis clínico, farmacológico y medioambiental. Las aplicaciones de señales cinéticas debidas a sistemas no catalizados, son considerablemente menores que aquellas debidas a sistemas catalizados. Sin embargo las innovaciones relacionadas con la manipulación de datos y los avances instrumentales, tales como las técnicas de flujo interrumpido, generan alternativas competitivas en la resolución de problemas analíticos basadas en este tipo de señales (1). La inmensa mayoría de los métodos catalíticos no enzimáticos están dirigidos a la determinación del catalizador; aunque no siempre, ya que en numerosos casos la acción catalizadora se emplea para aumentar la sensibilidad en la determinación del sustrato (2). Por contraste los métodos enzimáticos son generalmente utilizados en la determinación de uno de los reactivos. La tremenda importancia de los métodos catalíticos y sobre todo los enzimáticos en análisis se pone de manifiesto principalmente en análisis clínico.

Las características fundamentales que presentan los métodos cinéticos, con respecto a los métodos basados en medidas en el equilibrio, se pueden resumir en las siguientes:

1.- Posibilidad de determinar cantidades más pequeñas de analitos utilizando la misma tecnología que la desarrollada para los métodos termodinámicos.

2.- Numerosas reacciones pueden ser catalizadas, aumentando así notablemente la sensibilidad de los métodos cinéticos. La alta sensibilidad viene representada por la pendiente de la curva de calibración y, los bajos límites de detección vienen representados por la mínima cantidad de catalizador que puede detectarse con alta probabilidad.

3.- Posibilidad de semiautomatización, eliminando en parte la manipulación de las muestras y unificando las ventajas de sensibilidad, frecuencia de muestra y precisión, virtudes estas dos últimas difíciles de conseguir con los métodos cinéticos manuales.

Los métodos cinéticos en general son aplicados a sistemas químicos durante el transcurso de la reacción, y en muchas ocasiones solamente durante los momentos iniciales de la misma. Así una de las características propias es estar exentos de posibles interferencias, que sin embargo pueden afectar a la reacción en el estado de equilibrio. Permiten la utilización de reacciones denominadas lentas, que no pueden ser utilizadas en los métodos en equilibrio, ya que sólo requieren la medida de la variación de un parámetro en función del tiempo. Por otra parte, estos métodos se pueden basar en la aplicación de las denominadas reacciones no-estequiométricas que van acompañadas de reacciones secundarias o consecutivas, si aquello que se mide es la velocidad inicial.

Sin embargo, no todas las reacciones son susceptibles de utilización como base de un método cinético de análisis. Deben de ser lo bastante lentas para que su tiempo de semi-reacción supere el tiempo necesario para obtener la mezcla homogénea de los reaccionantes y permita realizar las lecturas con exactitud aceptable. Actualmente diversas modificaciones instrumentales (mezcla rápida, relajación, etc.) han introducido más facilidad en dichas medidas, posibilitando la utilización de reacciones, que con los métodos manuales tradicionales resultaban demasiado rápidas para su aplicación. Para diferentes técnicas, los tiempos de semi-reacción expresados en segundos son los siguientes (3):

Métodos convencionales	$10^1 - 10^4$
Métodos de flujo	$10^{-3} - 10^1$
Métodos de relajación	$10^{-9} - 10^{-1}$

La velocidad de reacción máxima posible, para la interacción en disolución, de dos partículas sin carga iónica viene determinada por el valor de la constante de reacción de segundo orden, definido por el límite de difusión con un valor aproximado de  $10^{-9} \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Por el contrario, las reacciones no pueden ser excesivamente lentas si tienen que tener valor práctico. Se suele tomar como límite de interés práctico, el de un tiempo de semi-reacción de unas dos horas. Pero la velocidad de las reacciones puede ser modificada y llevarla a los límites apropiados para los fines analíticos y el instrumental disponible de varias formas:

- modificando la temperatura
- modificando las concentraciones de los reactantes
- variando la fuerza iónica de la disolución del problema

Una característica de los métodos cinéticos es que la calidad de los resultados, puesto que se trata de un sistema dinámico, depende de la precisión en la determinación del tiempo. También es necesario controlar las demás variables que pueden afectar, tanto instrumentales como físico-químicas (temperatura, disolventes, pH, etc.). Actualmente, este hecho ha dejado de ser un problema importante gracias a la introducción y generalización de la instrumentación y las técnicas de control.

El control riguroso de las condiciones experimentales, en especial para evitar la presencia de impurezas, es una necesidad especialmente importante en los métodos cinéticos basados en reacciones catalizadas.

### Fundamentos básicos de medidas de velocidad

Cuando una sustancia A reacciona con un reactivo R para generar un producto P según la reacción de primer orden,  $A \rightarrow P$  y lo hace en presencia de R, en exceso suficientemente grande según la ecuación de pseudo-primer orden,  $A + R \rightarrow P$ , la velocidad de reacción viene dada por :

$$v = -d [A]_t / dt = k_A [A]_t$$

indicando el subíndice t, que las concentraciones son las presentes después de un tiempo de reacción t. La integración de esta ecuación entre el tiempo  $t = 0$  y un tiempo t cualquiera da:

$$\ln [A]_t = \ln [A]_0 - k_A t$$

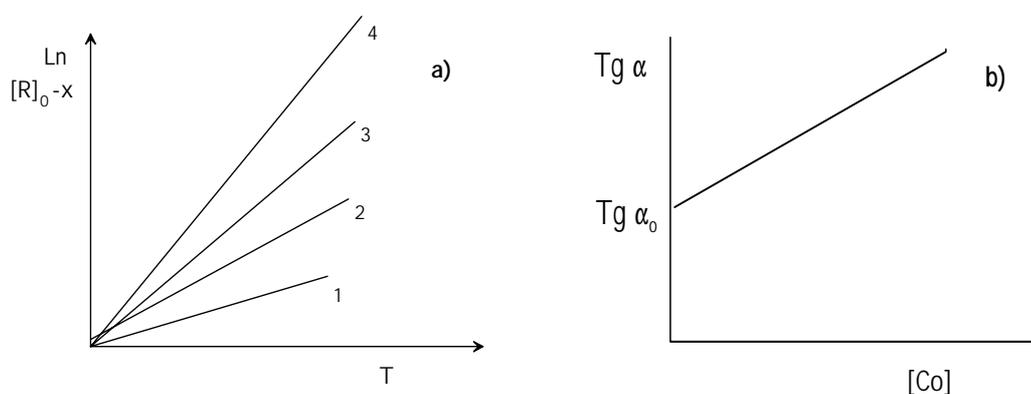
y expresado en forma exponencial :

$$[A]_0 = [A]_t \exp (k_A t)$$

En la práctica se suele medir la variación con el tiempo de la concentración de la sustancia reaccionante A, o mejor dicho, la variación con el tiempo del valor de alguna propiedad física o química que dependa de aquella concentración. Sin embargo, en muchos casos, se emplea la medida de una propiedad que es función de la concentración del producto P. Cuando es necesario basar el análisis en reacciones de orden superior al primero se suelen adaptar las condiciones experimentales de modo que la reacción se reduzca a un comportamiento de primer orden, se convierte en una reacción de *pseudo-primer* orden con respecto al constituyente que se mide.

Las formas integrales de las ecuaciones cinéticas de diversos tipos de reacciones químicas, pueden dar lugar a representaciones gráficas que son líneas rectas. Según cuál sea el orden de reacción con respecto a la especie química cuya

concentración se sigue instrumentalmente, será distinto el tipo de gráfico que se deberá usar. Si la reacción es de primer orden o pseudo primer orden con respecto a la especie R, la representación de  $\ln [R]_t$  en función del tiempo da una recta cuya pendiente es proporcional a la constante de velocidad. En el caso de reacciones catalizadas, lógicamente se obtendrá una familia de rectas, cuyas pendientes están relacionadas linealmente con la concentración de catalizador presente en cada una de las disoluciones patrón empleadas (**figura 2.1a**). Se toma experimentalmente la tangente del ángulo formado por cada una de aquellas rectas con la recta correspondiente al blanco (**figura 2.1b**). Este método recibe el nombre de método de las tangentes.



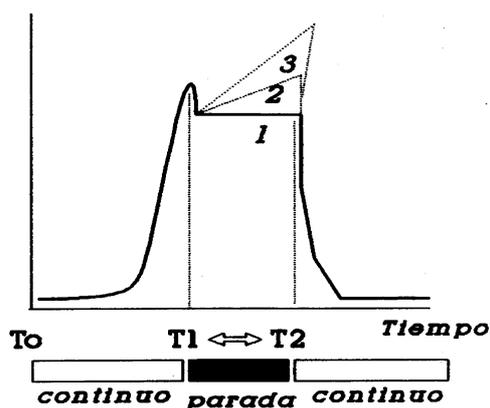
**Figura 2.1.** - Método de las tangentes: **a)** Variación de la  $[R]_0 - x$  en función del tiempo a varias concentraciones. **b)** Curvas de calibrado.

Dado que para poder medir estos ángulos basta con obtener un segmento pequeño de cada curva cinética, éste método de las pendientes se emplea también según una modificación diferencial según la cual  $\Delta x$  depende linealmente del tiempo ( $t$ ), y la pendiente de la recta  $\Delta x$  vs.  $t$  es función lineal de  $[C_0]$ . La necesidad de tomar medidas que sean lo más próximas posibles al instante inicial de la reacción exige que el periodo de mezcla de los reactantes sea suficientemente corto. Puede aplicarse cuando la reacción posee un periodo de inducción, basta con realizar las

mediciones necesarias para la construcción del calibrado una vez transcurrido el periodo de inducción (3).

## SEMI AUTOMATIZACIÓN. APLICACIÓN AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO

En el estudio y aplicación de la cinética de reacciones rápidas, el control estricto de la mezcla y del tiempo de operación constituyen los aspectos esenciales para conseguir resultados reproducibles y fiables. La incorporación de los denominados sistemas de flujo interrumpido ha venido a facilitar la realización de las medidas. En la **figura 2.2** que acompañamos se puede observar el esquema de flujo y el tipo de señal obtenida en un sistema de flujo interrumpido. Si en un sistema de flujo continuo en el cual se está registrando la señal de forma continua, a un predeterminado tiempo  $T_1$ , se para el flujo, estamos eliminando la componente cinética debida al transporte. Luego, todo cambio de la señal es debida exclusivamente a la componente cinética química.



*Figura 2.2. - Esquema de flujo y señal obtenida en un sistema de flujo interrumpido.*

El periodo  $T_1$ ,  $T_2$ , es el tiempo de parada del fluido y durante el cual en el caso de que haya reacción química (curvas 2 y 3) estaremos obteniendo las correspondientes curvas cinéticas de reacción. En el caso de que no se produjera reacción química se obtendría una curva de tipo 1.

Se denomina tiempo muerto al que transcurre desde que un elemento del fluido alcanza al mezclador hasta que llega al punto de observación. Evidentemente este tiempo debe ser lo menor posible con objeto de acercarnos lo más posible a esa velocidad inicial teórica. Los sistemas empleados para obtener sistemas de flujo interrumpido han sido diversos. Así, como podemos observar en la **figura 2.3** se puede obtener flujo interrumpido mediante un sistema de bombeo intermitente, o bien mediante un sistema de doble válvula sincronizadas (**figura 2.4**). En el primer caso, debe existir una sincronización entre la inyección de la muestra y el tiempo transcurrido hasta que se para la bomba. Esto se puede llevar a cabo de diversas maneras, por ejemplo mediante un controlador de tiempo, una bomba peristáltica controlada por ordenador y una apropiada interfase con la válvula de inyección. En el segundo caso, la sincronización debe producirse entre la inyección de la muestra y el giro de la segunda válvula, cuyo cierre inmoviliza a la muestra dentro del sistema de detección.

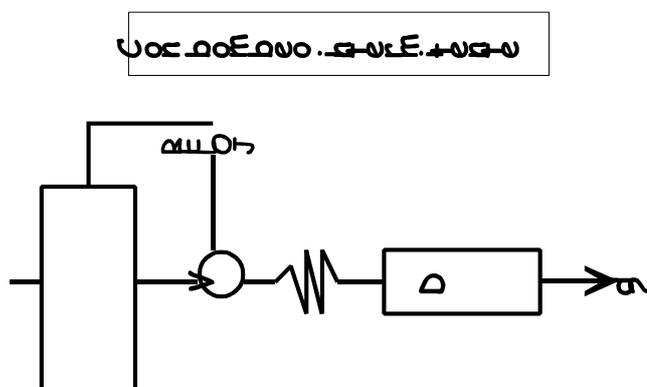
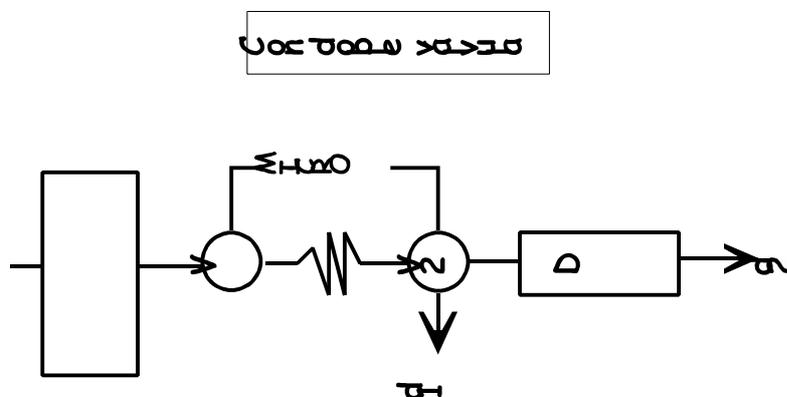


Figura 2.3. - Sistema de flujo interrumpido con sistema de bombeo intermitente



*Figura 2.4. - Sistema de flujo interrumpido con doble válvula sincronizada.*

Con objeto de minimizar los tiempos muertos en reacciones rápidas se emplean un segundo tipo de sistemas basados en la introducción de los reactivos a presión y parada inmediata en el sistema de detección. El sistema está compuesto por jeringas, dos de las cuales son impulsadas a presión controlada y una tercera actúa como jeringa de parada mecánicamente. En el momento de la parada se inicia la medición de la señal en función del tiempo.

Se han desarrollado instrumentos basados en estas técnicas. En la **figura 2.5** se ha representado una visión lateral y superior del sistema utilizado por nosotros (4) en esta memoria.

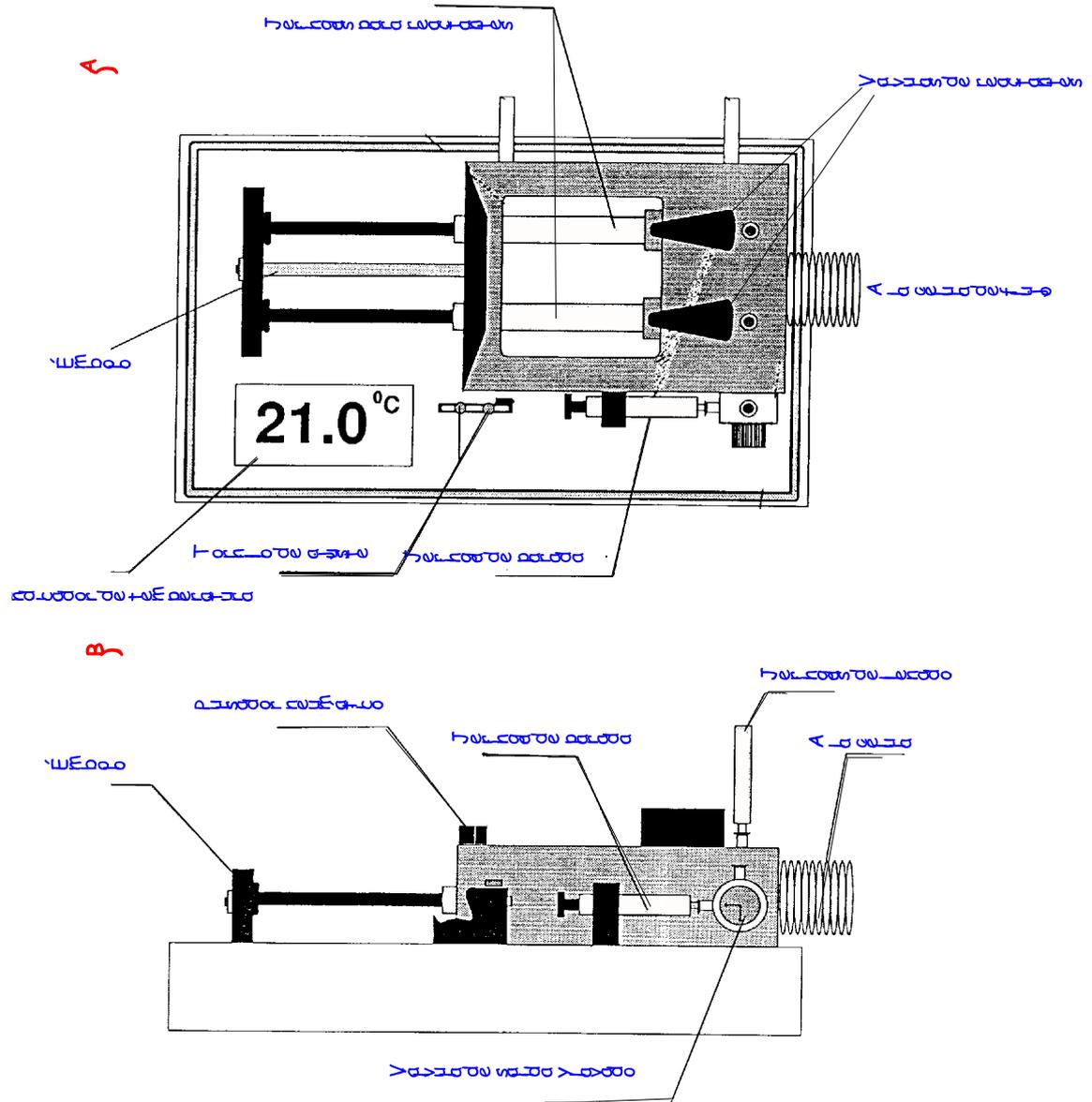


Figura 2.5. -A) Vista superior ; B) vista lateral del sistema de flujo interrumpido

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los métodos de flujo interrumpido pueden eliminar señales de fondo, incrementar la sensibilidad y permiten en muchos casos la discriminación cinética entre analitos.

En los últimos años, se ha publicado una revisión sobre métodos cinéticos semiautomáticos para la determinación de diversas drogas (5) en el cuál se incluyen 57 referencias bibliográficas. Podemos destacar como más significativas aquellos trabajos referidos a la determinación de opiáceos en orina, las que se basan en la conjunción de técnicas de flujo interrumpido y fosforescencia a temperatura ambiente en medio micelar para la determinación de naproxen, y la determinación de tetraciclinas mediante detección luminiscente. También tiene un interés especial el trabajo referido a la determinación de metotrimeprazina, tioridazina y sus mezclas mediante un sistema de flujo interrumpido acoplado a detección de diodo array (6). El método propuesto se aplicó a la determinación en medicamentos. Se han encontradas otras referencias diversas respecto a la utilización de la técnica de flujo interrumpido para la determinación de diversos principios activos, así se han determinado acetaminofen en tabletas y suero (7); isoniazida, dihidralazina, levodopa y aspartamo en preparados farmacéuticoa (8); aminoglicósidos como amicacina, canamicina y trobamicina en fármacos (9); imipramina y desipramina en suero (10); analgésicos clásicos como paracetamol y oxifenbutazona (11); determinación de ácido clavulánico en plasma utilizando una reacción de derivatización con imidazol (12); determinación de pesticidas como fosalón en formulaciones comerciales (13); dinoseb y dinobuton en productos agroquímicos (14); determinación de nitritos en agua y alimentos, mediante reacción con azul de timol en medio ácido sulfúrico (15); determinación de hemoglobina basándose en su actividad enzimática para la oxidación de o-fenilendiamina con agua oxigenada (16).

Últimamente se están resolviendo mezclas de analitos mediante sistemas de calibración multivariante (PCR, PLS, MLR) utilizando la totalidad de la curva cinética o las velocidades iniciales de la reacción, en todos los casos el sistema utilizado lleva un dispositivo de stopped-flow para la inyección de muestras y reactivos necesarios, de esta manera se han determinado mezclas de metales: hierro, cobalto y níquel (17); cobalto, níquel y galio (18); y antibióticos como amoxicilina y ácido clavulánico (19).

En revisiones bibliográficas más generales, sobre la aplicación del análisis por inyección en el campo del análisis de productos farmacéuticos y drogas relacionadas (20), ponen de manifiesto que más de la mitad de los trabajos publicados en la última década utilizan detección basada en interacciones de tipo fotométrico, y dentro de estas es la absorción UV-Visible la más empleada. Las técnicas electroquímicas en general, presentan un notable menor número de aplicaciones, siendo las técnicas amperométricas las de mayor difusión. Es de destacar, el gran desarrollo que están teniendo los denominados sensores electroquímicos. Un significativo número de trabajos se refieren a la utilización de reactores enzimáticos y electrodos enzimáticos.

### **Análisis de rifamicinas**

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en el estudio cinético de la oxidación de ansamicinas, concretamente rifamicina SV y rifampicina, en presencia de trazas de cobre (II). Se proponen métodos manual y semiautomático, y se aplican al análisis de estos principios activos en fármacos y en orina.

En la bibliografía se encuentran numerosos métodos de determinación de rifamicinas. Las más estudiadas, analíticamente hablando, son la rifamicina B, S, O, SV y la rifampicina, siendo ésta la más estudiada de todas, probablemente debido a su mayor uso clínico. Las técnicas más utilizadas en estas determinaciones son HPLC,

HPTLC y espectrofotometría UV-Vis.

Son numerosos los trabajos donde se determinan rifamicinas mediante métodos espectrofotométricos. En la **tabla 2.1** se dan algunos parámetros de los mismos. La rifampicina es la droga más estudiada espectrofotométricamente. Tanto la rifampicina como la rifamicina SV presentan absorción en el visible, y la determinación puede ser mediante la absorción de la misma droga (22) o formando complejo con un ligando como azul de metileno (21), ión cobre o quinona halogenada (25). Se han determinado mezclas binarias de rifamicina y otras drogas (28), o de rifamicina con algunos de sus metabolitos o impurezas, mediante espectrofotometría derivada (26, 27) o métodos quimiométricos (26). Estos métodos se han aplicado a muestras de fluidos biológicos (23-25) , y preparaciones farmacéuticas (24-28).

Un método de análisis de rifamicinas muy utilizado es la cromatografía líquida en fase reversa. La rifamicina más analizada es la rifampicina, sola o acompañada por sus metabolitos u otros antibióticos. Debido a que en el capítulo 4 de esta memoria se propone un método cromatográfico para su determinación, junto con otros analitos (isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida), es en ese capítulo donde se desarrollará la revisión bibliográfica referente a su determinación mediante cromatografía líquida en fase reversa (HPLC).

En cuanto a la determinación de las otras rifamicinas mediante esta técnica, no hay muchos trabajos ya que, como hemos señalado anteriormente, la rifampicina es la rifamicina de mayor aplicación. Se han resuelto mezclas de rifampicina, rifamicina B y rifamicina SV, utilizando un detector de espectrometría de masas y una fase móvil acetato amónico/metanol (2:3) en modo isocrático (29); mezclas de cuatro rifamicinas: rifamicina B, O, S, SV utilizando una fase móvil en gradiente metanol/formiato amónico, pH 7.2 (30) o en modo isocrático acetonitrilo/acetato, pH 7 (1:1) (31), en ambos casos con detección fotométrica. También se han determinado

derivados de rifamicinas como el DL-473; [3-(4-ciclopentilpiperazin-1-yliminometil)rifamicin], en plasma (32). La columna utilizada en todos los casos fue de fase apolar C18.

Otra de las técnicas utilizadas para la separación y determinación de rifamicinas es la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). La rifamicina más estudiada es, nuevamente, la rifampicina. Se ha aplicado a la separación y determinación de rifampicina y productos de degradación en estudios de interacción de la droga con excipientes (33), a la determinación de rifampicina en formulaciones farmacéuticas (34, 35) o a la separación de rifampicina y tetraciclina (36, 37). El eluyente más utilizado es la mezcla cloroformo/metanol/agua. la detección puede ser UV-vis o fluorimétrica y pueden evaluarse densiométricamente.

Por otro lado, las rifamicinas pueden sufrir reacciones de oxidación con N-bromosucinamida, para dar productos quimioluminiscentes que pueden utilizarse para la determinación de las mismas por esta técnica. El método es muy sensible, pudiéndose determinar la rifampicina entre 0.02 a 1 ppm con límites de detección de 0.0017 ppm y rifamicina SV entre 0.005 a 1 ppm con un límite de detección de 0.0005 ppm. El método se ha aplicado al análisis de especialidades farmacéuticas (38).

Por último, las rifamicinas (en concreto la rifamicina B) y otros antibióticos macrocíclicos como la vancomicina pueden ser utilizadas como rellenos de columna en HPLC para la separación de compuestos quirales (39). La rifamicina B, se ha utilizado en la separación de aminoalcoholes racémicos en electroforesis capilar (40).

No se han encontrado referencias bibliográficas sobre la aplicación de métodos cinéticos a la determinación de rifamicinas.

Tabla 2.1. - Análisis espectrofotométrico de rifamicinas

Drogas objeto de estudio	Especie absorbente	$\lambda$ (nm) de medida	Calibración	Muestra	Observaciones	Ref
Rifamicina SV	Complejo Rf-azul de metileno en $Cl_3CH$	655	1.6-9.6 ppm	----	Formación del complejo en tampón fosfato, pH 6.8	21
Rifampicina	Complejo Rp-azul de metileno en $Cl_3CH$	474	----	Collirio	Determinación mediante adición estándar de la muestra diluida en metanol	22
Rifampicina I soniacida	- En fase acuosa el producto de reacción de la isoniacida. - En fase $Cl_3CH$ la rifampicina	- 400 - 400	----	Orina	Tratamientos de la muestra con $NH_4VO_3$ y $CHCl_3$	23
Rifampicina Tetraciclina	las mismas	300 y 470	3-20 ppm de tetraciclina 20 ppm de rifampicina	Fluidos biológicos Preparaciones farmacéuticas	Uso de una ecuación cuadrática derivada	2
Rifampicina	- Complejo Rp- $Cu^{2+}$ - Complejo Rp-quinona halogenada	- 562 - $\lambda$ depende de la quinona utilizada	40-100 ppm	Orina Preparaciones farmacéuticas	----	25
Rifampicina 3-formilrifampicina	Las mismas	450 y 475	----	Preparaciones farmacéuticas	Dos métodos: 1) Resolución de ecuaciones. 2) Espectrofotometría derivada	26

Rifampicina Rifampinquinona	Las mismas	330 y 475	----	Preparaciones farmacéuticas	Dos métodos: 1) Resolución de ecuaciones. 2) Espectrofotometría derivada	26
Rifaximina e impurezas	Las mismas	<sup>1</sup> D <sub>333</sub> para rifaximina. <sup>2</sup> D para impurezas	2-40 ppm para todos los compuestos	Preparaciones farmacéuticas	En control de calidad	27
Rifampicina I soniacida	Las mismas	475 y 257	-----	Preparaciones farmacéuticas	I soniacida es determinada aplicando espectrofotometría derivada.	28



## ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS ANALÍTICO DE LA RIFAMICINA SV

Como ya hemos descrito en la Introducción de esta Memoria, la familia de las ansamicinas, está formada por diversos compuestos con actividad antibiótica, entre los cuáles se encuentran las rifamicinas, rifampicina, etc. Abordamos en primer lugar el estudio de las principales características de interés desde el punto de vista analítico de la rifamicina SV.

La rifamicina SV, cuya estructura ha sido expuesta anteriormente, es soluble en agua y sus disoluciones, tanto en medio ácido como básico, presentan coloración anaranjada apreciable, absorbiendo en la zona ultravioleta-visible. Se ha observado en los estudios previos que las disoluciones en medio básico cambian de coloración en función del tiempo y que por otra parte, dicha evolución parece ser mucho más rápida en presencia de determinados iones, por ejemplo  $\text{Cu}^{2+}$ , generando disoluciones rojizas. Debido a estos hechos, se aborda inicialmente el estudio de las disoluciones acuosas de rifamicina SV (Rf), para posteriormente llevar a cabo el estudio de las reacciones que tiene lugar en presencia de cobre (II).

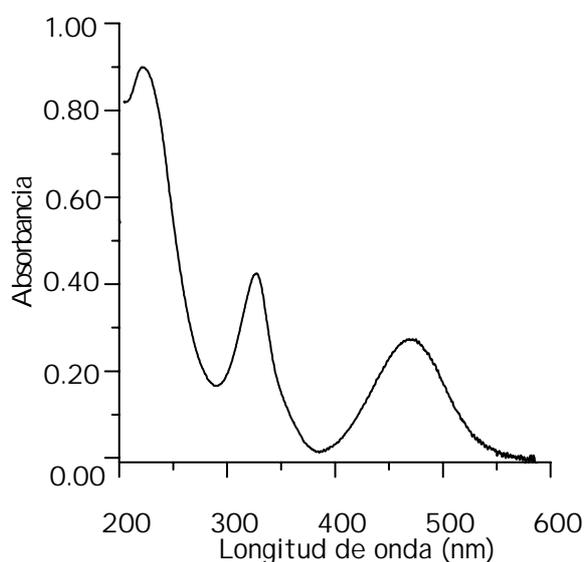
### Estudio de las disoluciones acuosas de rifamicina SV

#### Estabilidad en agua

Para los estudios iniciales se prepara una disolución madre de rifamicina SV (Rf) de 100 ppm ( $1.39 \times 10^{-4}$  M), a partir de esta y por dilución en agua desionizada, una de 10 ppm. Se registraron los espectros UV-visible de dicha disolución recién preparada y cada cinco minutos, durante un periodo de 60 minutos.

En la **figura 2.6** aparece representado el espectro de absorción. Dicho espectro presenta tres máximos de absorción localizados a 215, 316 y 445 nm. Se puede constatar que las disoluciones diluidas de Rf en medio acuoso son totalmente estables al menos durante una hora.

Por otra parte, y a partir de la disolución madre antes indicada, se prepararon diariamente muestras de Rf 10 ppm en medio acuoso, y se registraron sus espectros de absorción. Durante al menos un período de 4 días, la disolución madre de rifamicina SV es también estable.



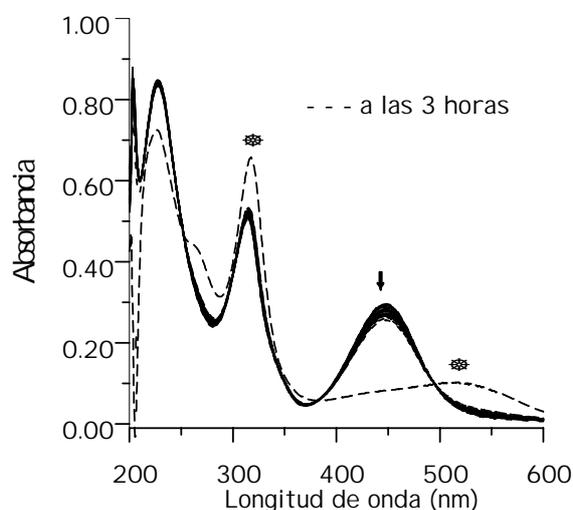
**Figura 2.6.** - Espectro de absorción de rifamicina SV. [Rf] = 10 ppm; pH = 5.8; Tiempo de medida entre 0 y 60 minutos.

### Estabilidad en medio básico

En los estudios preliminares se observó como las disoluciones básicas de Rf cambian de coloración con el tiempo. Por ello, a continuación se estudió la estabilidad de las disoluciones diluidas del analito en medio básico a distintos pH. Para ello, se

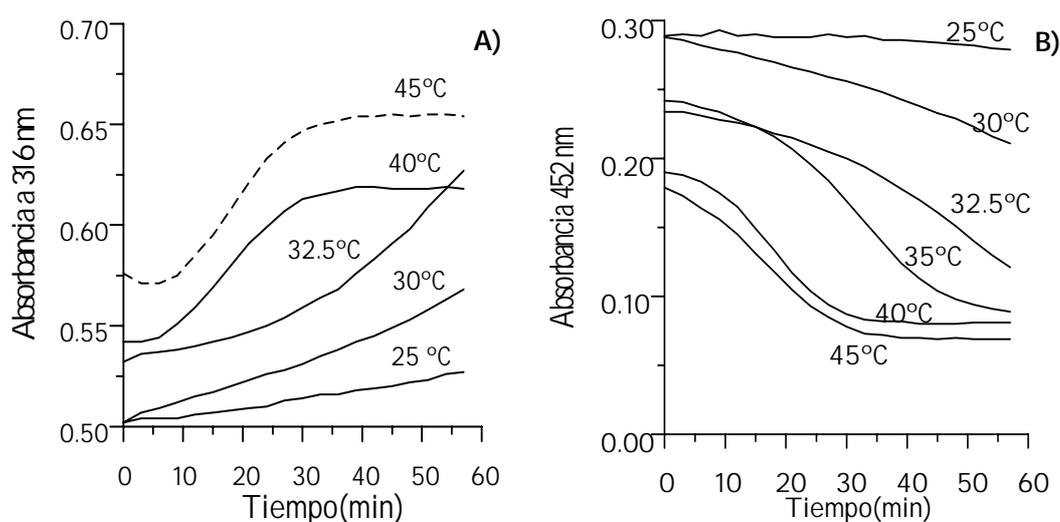
prepararon dos disoluciones de Rf de 10 ppm y a valores de pH de 9.48 y 10.2 (fijados por adición de tampón amoniaco/cloruro amónico). A cada muestra se le registró un espectro de absorción cada 3 minutos, durante un periodo de tiempo de 1 hora. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente.

El espectro de absorción de la muestra a pH=9.48, no presenta cambios apreciables durante el periodo de medida, sin embargo los de la muestra a pH=10.2 evolucionan paulatinamente a medida que transcurre el tiempo. En la **figura 2.7** podemos observar dichos espectros de absorción. Los máximos de absorción inicialmente situados a 316 y 445 nm sufren un lento efecto hipercrómico e hipocrómico, respectivamente, a medida que transcurre el tiempo. Simultáneamente se observa un efecto hipercrómico a longitudes de onda superiores a 500 nm, de manera que una vez transcurridas 3 horas se apunta un nuevo máximo situado a 523 nm, responsable de la coloración rojiza observada.



**Figura 2.7-** Evolución de los espectros de absorción de rifamicina SV (10 ppm) a pH=10.2 (tampón amoniaco/cloruro amónico). (SSS) Un espectro cada 3 minutos. (---) Espectro de absorción obtenido a las 3 horas.

Dado el efecto batocrómico observado y con el objeto de acelerar el proceso, se estudia la influencia que la temperatura ejerce sobre la evolución del espectro de absorción de rifamicina SV a pH= 10.2. Se prepararon muestras similares a las anteriormente descritas pero termostatazadas a diferentes temperaturas en el intervalo comprendido entre 25 y 45 °C. A cada una de ellas se les registraron los espectros de absorción cada 3 minutos durante 1 hora. En la **figura 2.8A** se ha representado la evolución de la absorbancia a 316 nm, correspondiente a la monitorización de la formación de un derivado de la Rf, mientras que en la **figura 2.8B** se representa la evolución de la absorbancia a 445 nm, es decir monitorización del proceso de desaparición de la Rf.



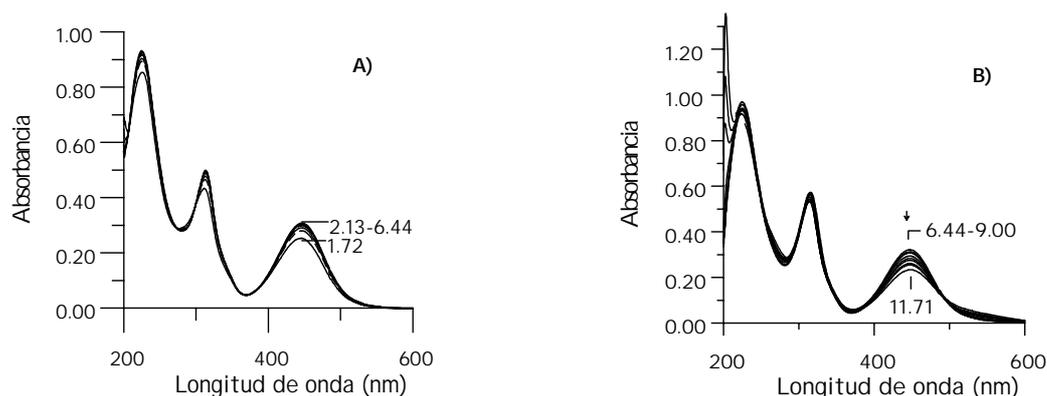
**Figura 2.8.** - Evolución de las absorbancias a 316 nm (A) y a 445 nm (B) de disoluciones de rifamicina SV a diversas temperaturas (pH =10.2).

Como se puede observar, la velocidad de la formación del derivado de la rifamicina SV aumenta a medida que aumenta la temperatura. Para temperaturas

superiores a 40 °C, el equilibrio parece alcanzarse aproximadamente a los 30 minutos. Teniendo en cuenta los datos bibliográficos, dicha reacción parece corresponder a la oxidación de la *rifamicina SV* (Rf) para dar la correspondiente *quinona* (QRf), dicha reacción tendría lugar en medio básico debido al propio oxígeno atmosférico disuelto en la disolución. Por tanto, las disoluciones básicas de Rf tendrán una estabilidad relativa en función de la temperatura, siendo recomendable su medida inmediatamente después de preparadas.

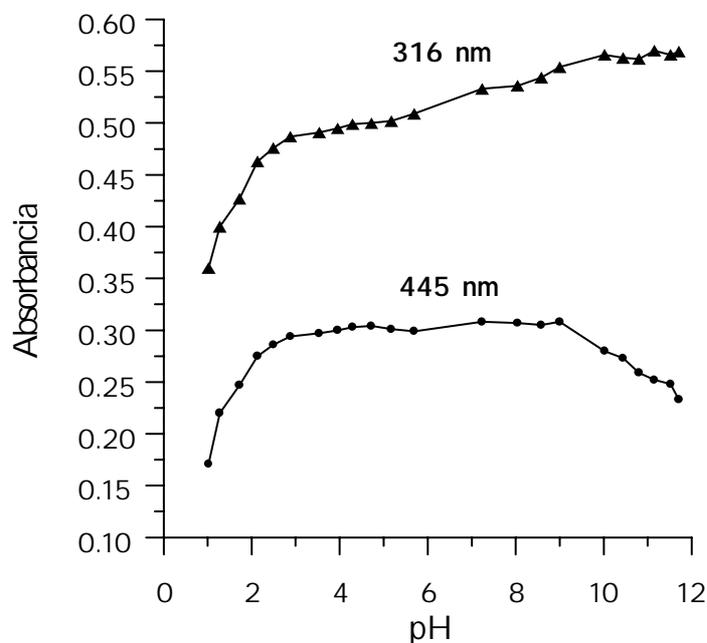
### Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de Rifamicina SV

Se prepararon muestras conteniendo una concentración de Rf 10 ppm, KCl 0.1 M y cantidades variables de ClH y NaOH de diferentes concentraciones con objeto de variar el pH entre 1.5 y 12 aproximadamente. Se obtienen los espectros de absorción para las diferentes muestras frente a blancos, inmediatamente después de preparadas y a temperatura ambiente. En las **figuras 2.9A y 9B** aparecen representados los espectros de absorción a diferentes valores de pH.



**Figura 2.9.** - Espectros de absorción a diferentes valores de pH: A) pH= 1.72 - 6.44; B) pH = 6.44 - 11-71

Cuando se representan las variaciones de absorbancia con el pH a longitudes de onda seleccionadas, se observan los resultados de la **figura 2.10**.



**Figura 2.10.** - Variación de la absorbancia con el pH a 316 y 445 nm.

Entre pH 1 y 3 se observa un efecto hiperocrómico tanto a 316 como a 445 nm, así como un efecto batocrómico a 316 nm situándose al máximo a 321 nm para pH > 3, observándose un isobéstico a 305 nm. Para pH comprendidos entre 3 y 9 la absorbancia permanece constante a 445 nm y aumenta de forma muy ligera a 316 nm. Para pH > 9.5 se observa un efecto hipocrómico a 445 nm, así como un desplazamiento batocrómico, desplazándose el máximo que inicialmente se encontraba a 445 nm hasta 452 nm y un efecto hiperocrómico a longitudes de onda superiores a 500 nm. Se observan dos isobésticos a 485 y 222 nm. De todas maneras dada la inestabilidad de las disoluciones en medio básico y en presencia de oxígeno atmosférico, los cambios observados en los espectros a pH > 10, pueden ser poco reproducibles.

### Influencia de la concentración de tampón en la reacción de oxidación de la Rifamicina SV

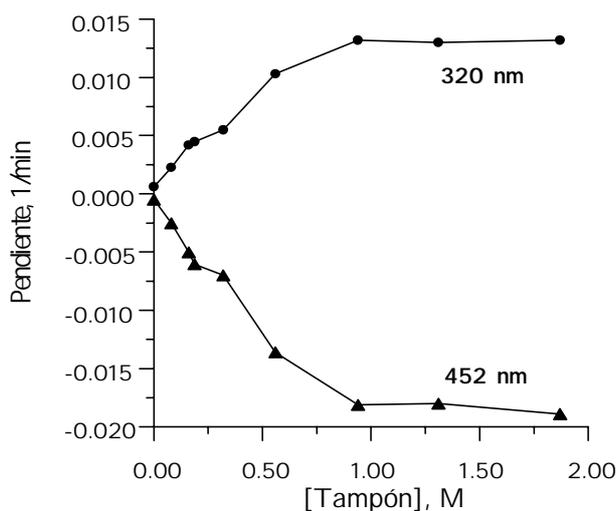
Como es general en los procesos oxidativos, la velocidad de los mismos se puede ver influenciada por diversos parámetros tanto químicos (especies presentes, pH ...), como físico-químicos (temperatura, etc), por ello se proponen una serie de experimentos encaminados a determinar que influencia tiene la naturaleza del medio sobre la velocidad de transformación de la Rf.

Para muestras conteniendo una cantidad constante de Rf 10 ppm y cantidades variables de tampón amoniacal/cloruro amónico (0.5 M en cloruro amónico) a pH 10.2, se registran las curvas cinéticas, *absorbancia - tiempo*, en el periodo comprendido entre 0 y 600 segundos. Se monitoriza al igual que la experiencia anterior, tanto la desaparición de Rf ( $\lambda = 452 \text{ nm}$ ) como la aparición del producto quinónico, QRf ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ). Como señal analítica se utiliza la tangente a la curva en la zona lineal (150 - 540 s) y se estudia su evolución en función de la concentración de tampón (pH=10.2) en el intervalo comprendido entre 0.16 y 1.87 M. Las muestras se mantienen a una temperatura constante de 40 °C. En la **tabla 2.2**, aparecen los resultados obtenidos.

**Tabla 2.2.** - Influencia de la concentración de tampón

[Tampón], M	Pendiente( $\text{min}^{-1}$ )		[Tampón], M	Pendiente ( $\text{min}^{-1}$ )	
	320 nm	452 nm		320 nm	452 nm
0.16	$4.19 \times 10^{-3}$	$-5.02 \times 10^{-3}$	0.56	$1.03 \times 10^{-2}$	$-1.36 \times 10^{-2}$
0.19	$4.48 \times 10^{-3}$	$-6.05 \times 10^{-3}$	0.94	$1.31 \times 10^{-2}$	$-1.81 \times 10^{-2}$
0.24	$4.08 \times 10^{-3}$	$-4.73 \times 10^{-3}$	1.31	$1.30 \times 10^{-2}$	$-1.80 \times 10^{-2}$
0.32	$5.46 \times 10^{-3}$	$-6.98 \times 10^{-3}$	1.87	$1.32 \times 10^{-2}$	$-1.89 \times 10^{-2}$

Como se puede observar en la **figura 2.11**, la pendiente aumenta a medida que aumenta la concentración de tampón hasta una concentración de aproximadamente 1 M, permaneciendo constante para valores superiores.



**Figura 2.11.** - Variación de la pendiente a las curvas cinéticas obtenidas a 320 y 452 nm en función de la concentración de tampón amoníaco/cloruro amónico (pH = 10.2).

### Cálculo de los órdenes parciales de reacción para las especies del tampón y protones.

Con objeto de dilucidar la influencia, de forma independiente, de las distintas especies que forman el tampón (amoníaco e ión amonio) en la cinética de la reacción, se llevaron a cabo dos series de experimentos sobre muestras conteniendo una concentración fija de Rf (10 ppm) y mantenidas a temperatura ambiente:

**Serie 1.** - Se mantiene constante una concentración de amonio (0.1 M) y se varía la concentración de amoníaco de manera que el pH varíe entre 9.0 y 10.5, aproximadamente.

**Serie 2.** - Se mantiene constante una concentración de amoníaco (0.02 M) y se varía la concentración de amonio, de manera que el pH se sitúe entre límites similares a obtenidos en la serie 1. Para ambas series se obtiene las curvas cinéticas a 320 nm.

En las condiciones experimentales de las dos series la concentración de la Rf permanece constante, por tanto, no interviene en la ecuación general de la velocidad:

$$v = k[\text{NH}_3]^a [\text{NH}_4^+]^b [\text{H}^+]^c$$

que puede ser simplificada para las distintas series como:

$$\text{Serie 1: } v = k' [\text{NH}_3]^a [\text{H}^+]^c \quad \text{para } [\text{NH}_4^+] = \text{constante}$$

$$\text{Serie 2: } v = k'' [\text{NH}_4^+]^b [\text{H}^+]^c \quad \text{para } [\text{NH}_3] = \text{constante}$$

tomando logaritmos en ambas ecuaciones y reorganizándolas, se pueden expresar como:

$$\log \frac{v}{[\text{NH}_3]^a} = k' - c pH$$

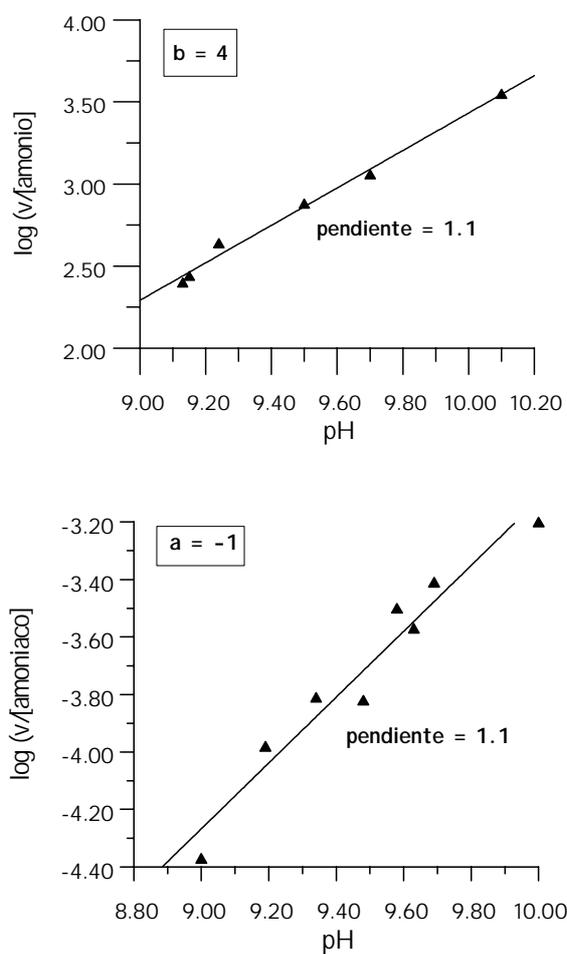
$$\log \frac{v}{[\text{NH}_4^+]^b} = k'' - c pH$$

Los coeficientes a, b, y c son ordenes parciales de reacción correspondientes a  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}^+$ . Se calcularon como valores que satisfacen el sistema de ecuaciones:  $a = -1$ ,  $b = 4$  y  $c = 1$

La ecuación cinética, en las condiciones experimentales, se puede resumir como:

$$\text{para } \text{pH} > 9.0: v = K [\text{NH}_4^+]^4 [\text{H}]^+ / [\text{NH}_3]$$

En la **figura 2.12** aparecen representadas las funciones logarítmicas para las series 1 y 2 en función del pH.



**Figura 2.12.** -Determinación de los ordenes parciales de reacción de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ .

Como se puede concluir de los estudios realizados, la velocidad de oxidación de la rifamicina SV en medio básico depende fundamentalmente de las concentraciones de las especies involucradas en el tampón y se ve favorecida por la concentración de sales amónicas, haciéndose independiente de las mismas cuando la concentración total del tampón es superior a 1 M (figura 2.11). Además, la velocidad es baja y la evolución de la señal a las distintas longitudes de onda ensayadas no nos proporciona una adecuada sensibilidad con fines analíticos.

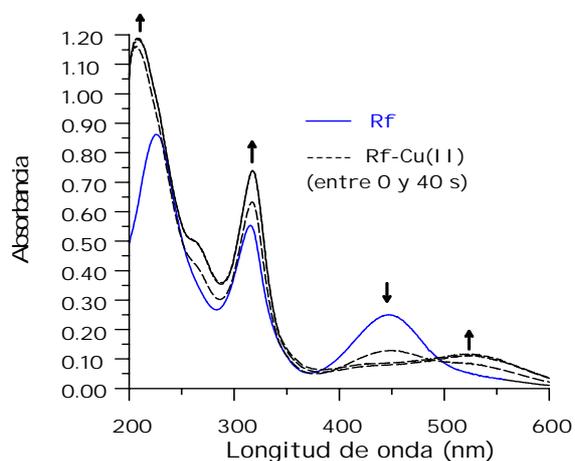
### **Estudio de la reaccionabilidad de rifamicina SV con metales de transición. Procedimiento manual**

Una vez puesta de manifiesto la posible inestabilidad de las disoluciones de rifamicina SV en medio básico y estudiada la cinética de la misma, se estudia la influencia que diversos iones metálicos ejercen sobre la cinética de la reacción y sobre la forma de los espectros. Se ensayan metales que tradicionalmente actúan como catalizadores de la oxidación aérea, fundamentalmente en medio amoniacal como son: cobre (II), cobalto (II) y cinc (II). También se ensayan diferentes medios de acidez, aproximadamente neutro, pH=6.5 (tampón fosfato), ácido, pH=2.9 (tampón cloroacético/cloroacetato) y básico, pH=10.2 (tampón amoníaco/amonio).

Para ello se preparan muestras conteniendo una concentración fija de Rf (10 ppm), 2.0 ml de disolución del catión en estudio  $1 \times 10^{-4}$  M, 3.0 ml de disolución tampón, y agua desionizada hasta completar 10.0 ml. Se registraron los espectros de absorción de estas muestras cada 60 segundos durante 10 minutos y posteriormente se realizó una medida a las cuatro horas de su preparación. Las muestras se mantuvieron termostalizadas durante el registro a una temperatura de 40°C.

En medio ácido y neutro no se observan cambios en los espectros de absorción con ninguno de los iones ensayados, incluso una vez transcurridas cuatro horas. Sin embargo en medio básico y en presencia de cobre (II), instantáneamente, se observa una coloración roja en las disoluciones de rifamicina SV.

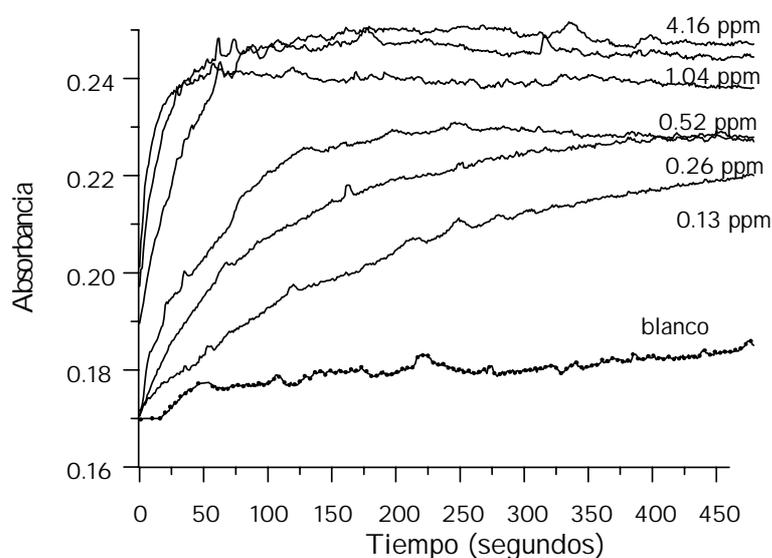
En la **figura 2.13** se ha representado los espectros de Rf obtenidos inicialmente, a los 20 y 40 segundos, en presencia y en ausencia de cobre. A los 20 segundos, en presencia de Cu la transformación del espectro es total, pudiéndose observar los siguientes cambios: se produce un efecto hipocrómico a 452 nm junto a un desplazamiento batocrómico situándose el máximo a 523 nm y un efecto hipercrómico a 320, 265 y para longitudes de onda menores a 220 nm. Cuando se superponen los espectros de absorción originados instantáneamente en presencia de cobre y los correspondientes a las disoluciones de Rf una vez transcurridas varias horas, resultan ser idénticos. Es decir, la presencia de cobre parece acelerar la reacción de oxidación de la rifamicina SV dando lugar a evoluciones rápidas del espectro tanto a 320 como a 452 nm. También se comprobó que en presencia de ácido ascórbico no se observaba la evolución del espectro de la Rf.



**Figura 2.13.** - Espectros de absorción de la rifamicina SV en ausencia (—) y en presencia de Cu (II) (---).

### Influencia de la concentración de Cu (II) sobre la cinética de la oxidación de la *Rifamicina SV*.

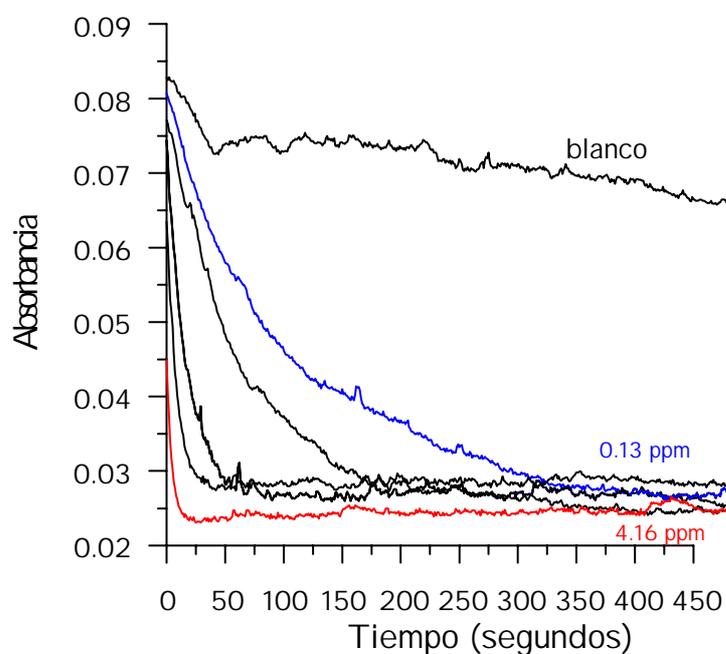
Se preparan muestras conteniendo una concentración fija de Rf 7 ppm, 0.6 ml de tampón  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  de pH 10.2 ( $C_T = 1.08\text{ M}$ ), 2.2 ml de agua y 50  $\mu\text{l}$  de disolución de Cu (II) de diversas concentraciones de manera que la concentración de Cu (II) varíe entre 0.10 y 4.1 ppm. Las muestras se prepararon en la propia célula fotométrica con objeto de minimizar el tiempo transcurrido entre la adición del catalizador (Cu (II)) y el comienzo del registro. Se registraron las curvas cinéticas a 320 y 452 nm. La temperatura se mantuvo a 25 °C. En la **figura 2.14** aparecen representadas dichas curvas.



**Figura 2.14.** - Curvas cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de Cu (II) a 320 nm.

Como se puede observar la velocidad inicial aumenta al aumentar la concentración de Cu (II). Para concentraciones del orden de 1 ppm el equilibrio se alcanza aproximadamente a los 60 segundos. Para medida de la velocidad inicial de la reacción se emplean la tangente a la curva cinética durante los primeros 20 segundos de reacción.

En la **figura 2.15** se han representado las curvas cinéticas obtenidas para la desaparición de la Rf mediante medidas de absorbancia a 452 nm.



**Figura 2.15.** - Curvas cinéticas obtenidas para diferentes concentraciones de Cu (II) a 452 nm.

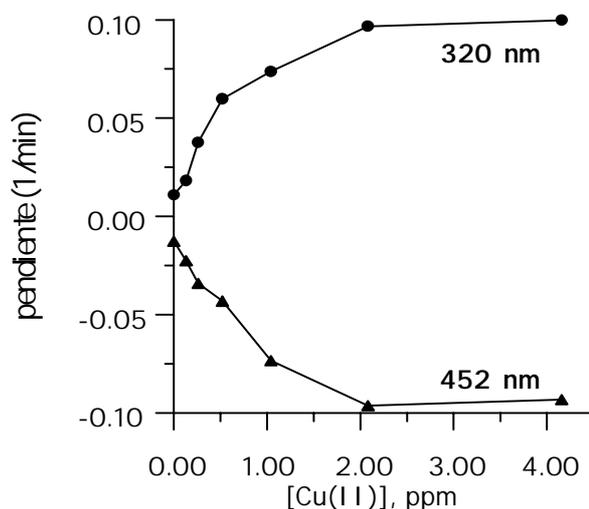
La velocidad de reacción aumenta a medida que aumenta la concentración de Cu (II), obteniéndose un valor final de absorbancia similar para todas las muestras. Es decir, la concentración final de producto generado es independiente de la concentración de Cu (II), solo se ve afectada la velocidad de la reacción. De las

curvas descritas anteriormente se deduce la elevada sensibilidad obtenida incluso para concentraciones de Cu (II) relativamente bajas (2 ppm). También se puede observar como a medida que aumenta la velocidad inicial, disminuye la zona lineal de la curva, dificultándose por tanto el cálculo de la pendiente.

Aunque continuaremos utilizando la metodología ya descrita, es decir, medidas realizadas directamente en la célula fotométrica y premezcla de los reactivos, evidentemente el método podría mejorarse mediante la utilización de un mezclador neumático que permitiría una medida más exacta de la velocidad inicial. Dichos estudios se llevarán a cabo con posterioridad con el objeto de comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

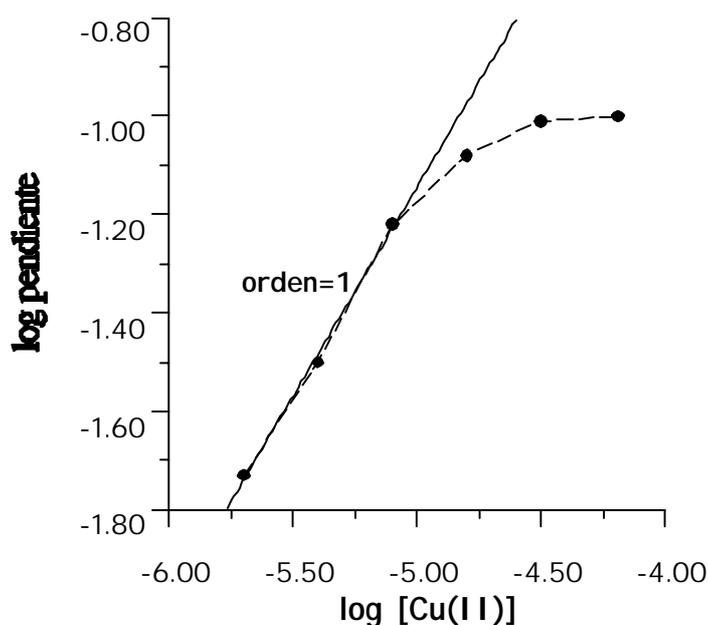
Al representar los valores de la velocidad obtenidos a ambas longitudes de onda para las diferentes concentraciones de Cu (II), se obtiene la gráfica de la **figura 2.16**.

La velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de Cu (II) para  $[Cu(II)] > 2$  ppm.



**Figura 2.16.** - Influencia de la  $[Cu(II)]$  en la velocidad de reacción: a) formación de la quinona (Qrf) ( $\lambda = 320$  nm) y b) oxidación de Rf ( $\lambda = 452$  nm).

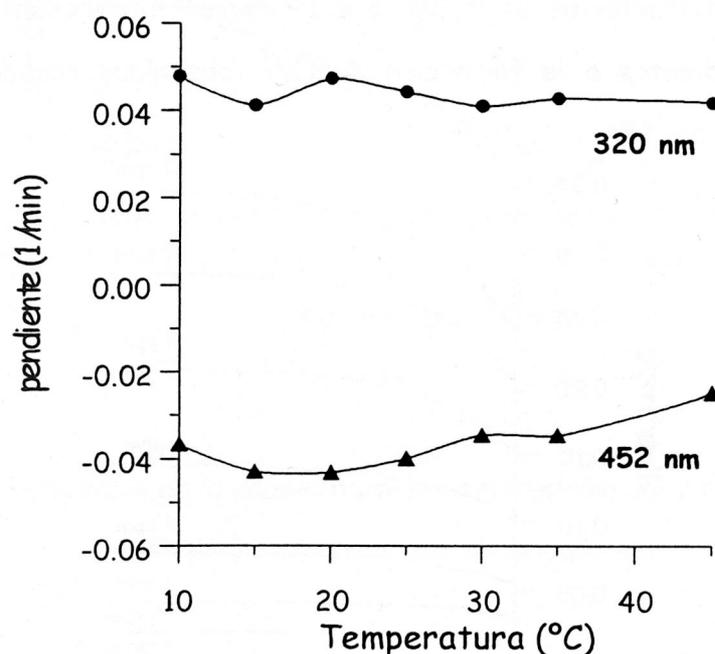
Como puede observarse en la figura, los valores de velocidad obtenidos en presencia de Cu (II) son más elevados que cuando este ión no está presente, y esta catálisis hace útil la reacción de oxidación de Rf, desde el punto de vista analítico, pudiéndose medir tanto la desaparición de Rf como la aparición de QRf. En presencia de 1.0 ppm de Cu (II) la relación “**velocidad reacción catalizada / velocidad reacción no catalizada**”, es del orden de 7 veces. Se determinó el orden parcial de reacción mediante análisis logarítmico (log velocidad vs log [Cu (II)]) encontrándose que para [Cu (II)] < 1.0 ppm, es uno el orden más probable, siendo cero para valores superiores. En la **figura 2.17** se puede observar la representación de dicho análisis logarítmico.



**Figura 2.17.** - Representación logarítmica de la influencia de la [Cu (II)] en la velocidad de reacción.

### Influencia de la temperatura en la reacción catalizada..

Se ha estudiado la influencia que la temperatura ejerce sobre la velocidad de reacción. Para ello se obtuvieron las correspondientes curvas cinéticas a 320 y 452 nm para muestras conteniendo concentraciones constantes de Rf (7 ppm) y Cu (II) (0.58ppm), 0,6 ml de tampón  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  de pH=10.2 y agua hasta completar el volumen final de 3.0 ml. La temperatura se varió entre 15 y 45 °C. Se emplearon los 20 primeros segundos de reacción como periodo de medida de la tangente a la curva. Como se puede ver en la **figura 2.18**, la velocidad de la reacción catalizada resulta ser prácticamente independiente de la temperatura. Para los estudios posteriores se fijó 25°C como temperatura de trabajo.

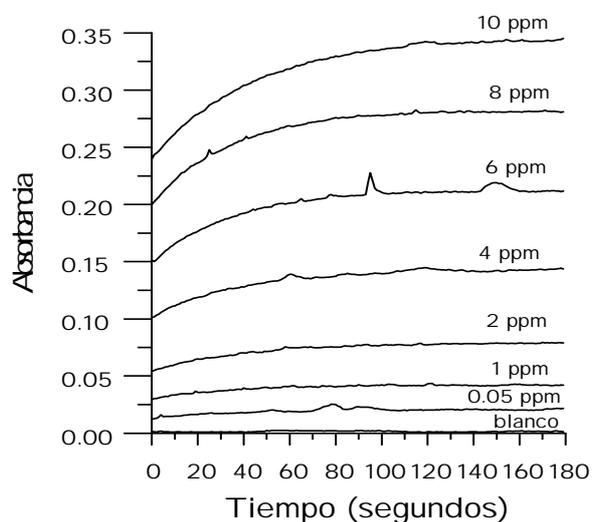


*Figura 2.18. - Influencia de la temperatura en la velocidad de la reacción catalizada.*

### Influencia de la concentración de *rifamicina SV* en la velocidad de reacción. Recta de calibrado.

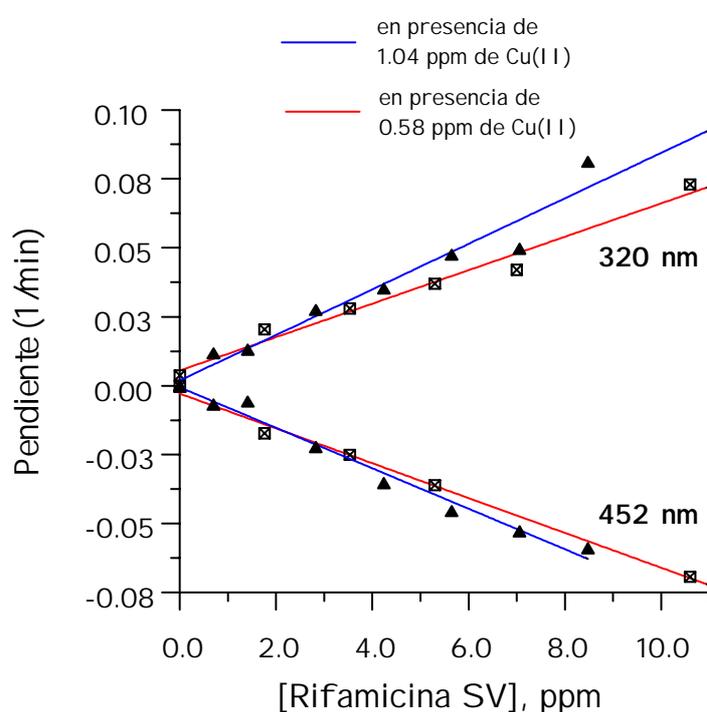
A continuación y siguiendo la sistemática clásica de medida de la velocidad inicial con premezcla manual de los reactivos, se estudia la influencia que la concentración de Rf tiene sobre la velocidad de reacción. Esta experiencia se realizó sobre series de muestras que contenían diferentes concentraciones de Cu (II): 4.2 ppm, valor para el cuál la velocidad es independiente de la variable [Cu (II)] y dos valores situados en la zona de mayor influencia de Cu (II), 0.58 y 1.04 ppm.

La serie de muestras que contenían 4.2 ppm de Cu (II), no dieron resultados satisfactorios debido a la imprecisión en la medida de la velocidad inicial sobre todo a medida que aumenta la concentración de Rf, sin embargo las otras dos series de muestras dieron resultados satisfactorios. En la **figura 2.19** aparecen representadas las curvas cinéticas correspondientes a la formación de Qrf obtenidas cuando se emplea una [Cu (II)] = 1.04 ppm.



**Figura 2.19.** - Curvas cinéticas obtenidas a 320 nm para diferentes concentraciones de rifamicina SV (Rf) comprendidas entre 0 y 10 ppm.

Como se puede observar, la velocidad inicial aumenta a medida que aumenta la concentración de Rf habiéndose completado la reacción en aproximadamente 100 segundos en todos los casos. En la **figura 2.20** se han representado las rectas de calibrado a 320 y 452 nm para dos series de muestras de diferentes concentraciones de Rf, utilizando en cada serie diferente concentración de Cu (II): 0.58 y 1.04 ppm, respectivamente.



**Figura 2.20.** - Influencia de la concentración de rifamicina SV y de la concentración de Cu (II) en la velocidad de la reacción.

Se observa que al aumentar la concentración de Cu (II) aumenta el valor de la pendiente, como era de esperar. Se calculó el orden parcial de reacción con respecto a la concentración de rifamicina SV, en ambas condiciones, determinándose que la relación más próxima a la unidad es la obtenida con 1.04 ppm.

### Tratamiento estadístico de los datos de calibración.

A continuación se llevó a cabo un tratamiento estadístico con objeto de poner de manifiesto, si tanto las medidas de velocidad obtenidas a 320 nm como las obtenidas a 445 nm, se pueden utilizar como señales analíticas para proponer un nuevo método cinético de determinación de rifamicina SV (Rf) utilizando 1.04 ppm como concentración de catalizador.

**Tratamiento teórico.** La calibración lineal es el medio más utilizado, desde el punto de vista analítico, para determinar la relación entre la concentración de analito presente en una muestra, a partir de un valor obtenido para una determinada variable instrumental. Esto es debido fundamentalmente a que existe una ley teórica sobre la cuál se soporta la experimentación en un determinado intervalo de concentraciones, de manera que si se supera dicho intervalo, nos podemos encontrar con modelos que incluyan términos en segundo grado. A pesar de la popularidad de dicho modelo hay conceptos de aplicación confusa, que vamos a tratar a continuación. La calibración tiene normalmente como finalidad la predicción de un valor de concentración a partir de un determinado valor experimental del instrumento. Esta etapa final, denominada de *predicción*, se puede llevar a cabo si previamente se ha establecido una relación matemática válida o modelo matemático, entre la respuesta  $y$  y la concentración de analito,  $x$ . Por lo tanto, las etapas fundamentales se podrían resumir en:

- 1.- *Establecimiento del modelo de línea recta;*
- 2.- *Validación del modelo establecido y*
- 3.- *Predicción mediante interpolación inversa.*

1. - *Establecimiento del modelo lineal.* - La relación existente entre la variable independiente  $x$  y la dependiente  $y$ , se expresa mediante la ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + e$$

donde  $\beta_0$  y  $\beta_1$  representan los valores verdaderos de los parámetros denominados ordenada en el origen y pendiente, respectivamente, y  $e$  es el valor del error aleatorio asociado a la respuesta  $y$ . Dado que  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  y  $e$  representan valores verdaderos, teóricamente nunca podrían saberse con certeza. Sin embargo, en la práctica se podrán realizar estimaciones de estos valores. A estas estimaciones les vamos a denominar  $b_0$ ,  $b_1$  y  $e$ , así, para  $n$  pares de valores concretos  $x_i$ ,  $y_i$ , se puede escribir la relación:

$$y_i = b_0 + b_1 x_i + e_i$$

La dificultad estriba, por tanto, en hallar las estimaciones  $b_0$  y  $b_1$ . Todo proceso de calibración conlleva errores  $e_i$  en las respuestas  $y_i$  observadas. Los valores  $e_i$  reciben el nombre de residuos y representan las diferencias entre los valores  $y_i$  observados y los valores de  $\hat{y}_i$  predichos por el método. Por el contrario, se considera que las variables independientes utilizadas en el establecimiento del modelo,  $x_i$ , en análisis denominados patrones de calibración están libres de errores o éste es muy pequeño comparado con los  $e_i$ . Para llevar a cabo la estimación normalmente se emplea el que minimiza la suma de los cuadrados de los residuos, conocido como método de mínimos cuadrados.

Se minimiza:

$$\sum e_i^2 = \sum [y_i - (b_0 + b_1 x_i)]^2$$

derivando parcialmente con respecto a  $b_0$  y  $b_1$  se obtienen expresiones de  $b_0$  y  $b_1$  en los que sólo intervienen los valores experimentales  $(x_i, y_i)$ . Por lo tanto teniendo en cuenta esto, los valores de la ordenada en el origen y la pendiente no son valores únicos sino que son los valores más probables dentro de un intervalo. Podemos utilizar varios parámetros estadísticos para poner de manifiesto la magnitud de los errores:

1) Desviación estándar de la ordenada en el origen, que viene dada por la expresión:

$$\sigma_{b_0} = \left[ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2} \sigma$$

siendo  $\sigma$  la desviación estándar de los errores de las respuestas o residuos, algunas veces denominada también  $s_{y/x}$ :

$$\sigma = s_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)} \right]^{1/2}$$

donde  $\bar{x}$  es la media aritmética de los valores en el eje de abscisa, normalmente valores de concentración, e  $\hat{y}_i$  son los valores de las respuestas, calculado de acuerdo con el modelo:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x$$

2) Desviación estándar de la pendiente, viene dada por la expresión:

$$\sigma_{b_1} = \left[ \frac{1}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2} \sigma$$

Los parámetros estadísticos mencionados sólo podrán ser utilizados si se asumen las siguientes hipótesis: los errores responden a una distribución Gaussiana de probabilidad, siendo su media cero y su varianza  $\sigma^2$ ; son independientes; y su varianza  $\sigma^2$  es constante en todo el intervalo de concentraciones, es decir, cumple la condición de homocedasticidad.

**2. - Validación del modelo lineal.** - El proceso de validación tiene como fin la verificación experimental de que el modelo matemático establecido es una simplificación correcta de la serie de puntos experimentales de que se dispone. Como consecuencia sería un modelo válido para predecir muestras de concentraciones desconocidas.

Los pasos a seguir serían los siguientes:

- 1) Comprobación de las hipótesis matemáticas asumidas,
- 2) comprobación de que el modelo lineal se adapta a los puntos experimentales y que los valores de la ordenada y la pendiente en el origen son adecuados, y
- 3) determinación del límite de concentración inferior, denominado límite de detección, hasta el cuál el modelo se cumple.

1) La forma de comprobar que las hipótesis expuestas son correctas, desde un punto de vista práctico, consiste en realizar los denominados "*gráficos de residuos*". Consisten en representar los valores de estos residuos frente a los valores

experimentales de  $y_i$  o  $x_i$ . Es decir,  $y_i - \hat{y}_i$  frente a  $x_i$ . Si se cumplen las hipótesis previas se debería observar que los valores negativos y positivos están distribuidos en aproximadamente igual número, de manera que además los residuos estarán distribuidos aleatoriamente y siendo todos del mismo orden de valor.

Si la varianza no se distribuye de forma homogénea a lo largo del intervalo de concentraciones, habrá que pensar que se trata de un fenómeno de heterocedasticidad. Para ello habrá que tener varias réplicas de cada muestra, ya que este fenómeno se observa en aquellos métodos analíticos donde la respuesta presenta fluctuaciones que son función de la propia magnitud de la señal (41). En este caso, habría que aplicar el método de *mínimos cuadrados ponderados*, calculando una nueva recta que de más importancia a los datos que se hayan medido con mayor precisión. Cada patrón de calibración se corrige mediante un factor de ponderación inversamente proporcional a la varianza de las respuestas para dicho patrón,  $w_i = 1/s_{y_i}$ , posteriormente, se lleva a cabo, la minimización de los residuos ponderados:  $\sum w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 = \text{mínimo}$ , con lo cual se obtienen los valores de  $b_0$  y  $b_1$  (41).

Pese a no ser riguroso, la observación de dichas gráficas nos permitiría observar la presencia de puntos discrepantes, que posteriormente, y con el adecuado tratamiento estadístico se podría decidir si son o no desechables.

2) Aunque el coeficiente de correlación,  $r$ , es ampliamente utilizado como parámetro informativo de la calidad del ajuste de los puntos experimentales a un modelo lineal, no es sin embargo un test estadístico. La comprobación del grado de acoplamiento del modelo propuesto a los puntos experimentales se lleva a cabo mediante la utilización del *test del análisis de la varianza* (ANOVA). Una vez que se tiene una serie de  $n_i$  repeticiones para cada valor  $x_i$ , se utiliza la relación  $F$  según:

$$F_{cal} = \frac{\sigma^2_{acoplamiento}}{\sigma_e^2}$$

donde  $\sigma_e^2$  es la varianza asociada al error puro;  $\sigma^2_{acoplamiento}$  es la varianza asociada con el grado de acoplamiento.  $F$  tabulado para un determinado nivel de significancia  $\alpha$ , con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad, donde  $k$  es el número de patrones de calibración diferentes y  $n$  el número total de observaciones (42).

La *varianza asociada con el grado de acoplamiento* viene dada por :

$$\sigma^2_{acoplamiento} = \frac{(\sum n_i(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2)}{k-2}$$

donde  $\bar{y}_i$  es el valor medio de las  $n_i$  repeticiones  $y_{ij}$  para  $x_i$ , e  $\hat{y}_i$  es el valor de  $y$  estimado por el modelo lineal para un cierto  $x_i$ .

La *varianza asociada con el error puro* viene dada por:

$$\sigma_e^2 = \frac{\sum \sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n-k}$$

En cuanto a la comprobación de los valores de la pendiente y ordenada en el origen, hay que tener en cuenta que existen unos intervalos de confianza, alrededor de los valores verdaderos, debido a la presencia de errores aleatorios que dan lugar a dispersión de los puntos alrededor de la línea de mínimos cuadrados. Dichos intervalos de confianza se podrían expresar como:

$$\beta_0 : b_0 \pm t_{\alpha, n-2} \sigma_{b_0}$$

$$\beta_1 : b_1 \pm t_{\alpha, n-2} \sigma_{b_1}$$

donde  $t_{\alpha, n-2}$  es el valor de  $t$  tabulado para un nivel de significancia determinado,  $\alpha$  y  $n-2$  grados de libertad. El test consiste en calcular el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen. Sin embargo la pendiente y la ordenada están correlacionadas y por tanto test independientes pueden dar lugar a resultados erróneos.

La región de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada en el origen para un nivel de significancia dado  $\alpha$ , está dentro de la elipse dibujada en el plano delimitado por los ejes coordenados donde se representan los valores  $b_0$  y  $b_1$  correspondientes a la representación de la ecuación:

$$n(b_{ord} - b_0)^2 + 2(\sum x_i)(b_{ord} - b_0)(b_{pend} - b_1) + (\sum x_i^2)(b_{pend} - b_1)^2 = 2\sigma^2 F_{2, n-2, \alpha}$$

donde  $F_{2, n-2, \alpha}$  es el valor tabulado para 2 y  $n-2$  grados de libertad para un nivel de significación dado  $\alpha$ ,  $b_0$  y  $b_1$  representan los valores de ordenada y pendiente obtenidos mediante los mínimos cuadrados. Cuando un determinado punto cae fuera de la elipse existe una diferencia significativa para un determinado nivel de confianza entre los coeficientes de regresión estimados y los que corresponden a dicho punto.

3) Límites de detección y determinación.- Quizás se pueda considerar el punto más conflictivo dentro de estos parámetros. Según la IUPAC (43, 44) el límite de detección es aquella concentración mínima que nos da una señal que es diferenciable estadísticamente de la que da el propio blanco y recomienda, como señal a aquella que sea al menos tres veces la desviación estándar del blanco. Pero nos interesa tener el valor límite de detección en unidades de concentración por lo que:

$$y_{LOD} = \bar{y}_B + 3 S_B$$

y como :

$$y = b x + a$$

entonces:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

y en consecuencia:

$$x_{LOD} = \frac{y_{LOD} - a}{b}$$

$$x_{LOD} = \frac{(\bar{y}_B + 3S_B) - \bar{y}_B}{b}$$

$$x_{LOD} = \frac{3S_B}{b}$$

LOD : límite de detección;  $y_{LOD}$  : límite de detección en unidades de señal analítica;  $\bar{y}_B$ : señal promedio del blanco;  $S_B$ : desviación estándar del blanco;  $x_{LOD}$ : límite de detección en unidades de concentración.

En la definición propuesta por la IUPAC, en realidad se está calculando la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco, y no se toma en consideración la imprecisión del valor de la pendiente. Es una definición completamente arbitraria, de manera que cuando se citan límites de detección en un trabajo es necesario añadir con que criterio se han determinado con el objeto de comparar. Este criterio ha sido discutido ampliamente por Long y Winefordner (45), en el que se propone un modelo de cálculo basado en la propagación de los errores, a utilizar cuando la imprecisión de la pendiente y del término independiente son del mismo orden de magnitud que la correspondiente a la señal analítica.

$$x_{LOD} = \frac{3 \sqrt{S_b^2 + S_a^2 + \left(\frac{a}{b}\right)^2 S_b^2}}{b}$$

si  $S_a$  y  $S_b$  fueran despreciables, se obtendría la expresión que propone la IUPAC.

Otros autores proponen utilizar el valor de  $S_x$  calculado a partir de los valores de la señal del blanco medidos para establecer la recta de calibrado. Así se obtendría el valor de la desviación estándar del blanco en unidades de concentración ( $S_{x_0}$ ) trabajando como si el blanco fuera una muestra desconocida.

$$x_{LOD} = 3S_{x_0}$$

#### Cuando el blanco no da señal

El problema surge, en aquellas técnicas donde no se pueden realizar determinaciones del blanco.

Miller indica que si unos datos cumplen la homocedasticidad,  $S_{y/x}$  se puede emplear en lugar de  $S_B$ . Se puede por tanto aproximar:

$$x_{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b}$$

Otra forma es similar a la anterior, pero más correcta estadísticamente, donde  $n$  es el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

$$x_{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}}$$

Calculando un valor extrapolado de la desviación estándar a concentración cero a partir de la desviación estándar de la señal en ese punto,  $y_0$ , calculada para un valor de  $x=0$  por la ecuación general.

Para  $x = 0$  queda:

$$S_{y_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(-\bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

y calculando se expresa como:

$$x_{LOD} = \frac{3S_{y_0}}{b}$$

Actualización de los criterios

Clayton y col. (46) exponen su desacuerdo con el criterio de  $k = 3$ . Se fundamentan en el hecho de que estos criterios sólo tienen en cuenta los errores tipo  $\alpha$  (que son aquellos errores que se cometen cuando se rechaza una hipótesis cierta), pero no los tipo  $\beta$  (errores que se cometen cuando se acepta una hipótesis falsa). Es decir, implica una protección contra los falsos positivos del 95%, sin embargo implica también solo un 50% de protección contra los falsos negativos. Clayton propone la utilización de un parámetro  $\Delta(\alpha, \beta)$ , que depende de  $\alpha$  y de  $\beta$  y de los grados de libertad  $(n-2)$ , siendo  $n$  el número total de parejas de valores utilizados para calcular la ecuación de la recta de calibrado. Considerando  $\alpha = \beta = 0.05$ , tenemos:

$$x_{LOD} = \Delta(\alpha, \beta) S_{x_0}$$

y se calcula  $S_{y_0}$  según la ecuación general.

Podemos observar como, el límite de detección depende de:

- Las probabilidades de falso positivo y de falso negativo, a través de  $\Delta(\alpha, \beta)$ ,
- el diseño experimental seguido para el calibrado mediante  $n$ ,  $m$  y  $x_i$  (que están dentro de  $S_{x_0}$ ),
- la sensibilidad del calibrado debido a  $b$ ,
- la calidad de la regresión dada por  $S_{y/x}$  (que se encuentra contemplada en  $S_{x_0}$ ).

Es la propuesta mejor aceptada actualmente.

En el caso que no tengamos señal debida al blanco:

$$x_{LOD} = \Delta(\alpha, \beta) \frac{S_{yo}}{b}$$

El límite de determinación o cuantificación (LOQ) se calcula (43, 47):

$$X_{LOQ} = 10S_B$$

En técnicas donde no se dispone de señal del blanco como cromatografía y electroforesis capilar, la expresión que se emplea para la obtención de este límite viene dada por:

$$X_{LOQ} = \frac{10S_{yo}}{b}$$

**3.- Predicción mediante interpolación inversa.** - En el apartado correspondiente al establecimiento del modelo matemático de línea recta que relaciona concentraciones de analito con respuestas instrumentales se ha indicado en la idea de que debido a la presencia de errores aleatorios, siempre presentes en la etapa de calibración, la recta de calibrado calculada lleva implícita estos errores aleatorios. Como consecuencia, se ha observado en la etapa de validación que existen intervalos de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen. Es lógico pensar entonces que un futuro valor de la respuesta,  $\hat{y}$ , calculado mediante el modelo

$\hat{y}_o = b_o + b_1 x_o$ , para un valor de concentración  $x_o$ , no es un valor único sino que tiene asignado un intervalo de confianza que viene dado por la expresión:

$$y_o \pm t_{n-2,\alpha} \left[ \left( \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right)^{1/2} s \right]$$

Siendo N el número de mediciones que se realizan de  $x_o$ .

El intervalo de confianza alrededor del verdadero valor medio de  $y_o$  para un valor de concentración  $x_o$  se calcula mediante la expresión:

$$b_o + b_1 x_o \pm t_{n-2,\alpha} \left[ \left( \frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \right)^{1/2} s \right]$$

puesto que significa que se habrían realizado infinitas mediciones de  $x_o$ , con lo que N tiende a infinito y  $1/N$  tiende a cero.

Para un analista, es más interesante conocer que el valor de la concentración desconocido,  $x_u$ , se calcula a partir de una respuesta instrumental,  $y_u$ , mediante interpolación inversa en el modelo matemático establecido:

$$x_u = \frac{y_u - b_o}{b_1}$$

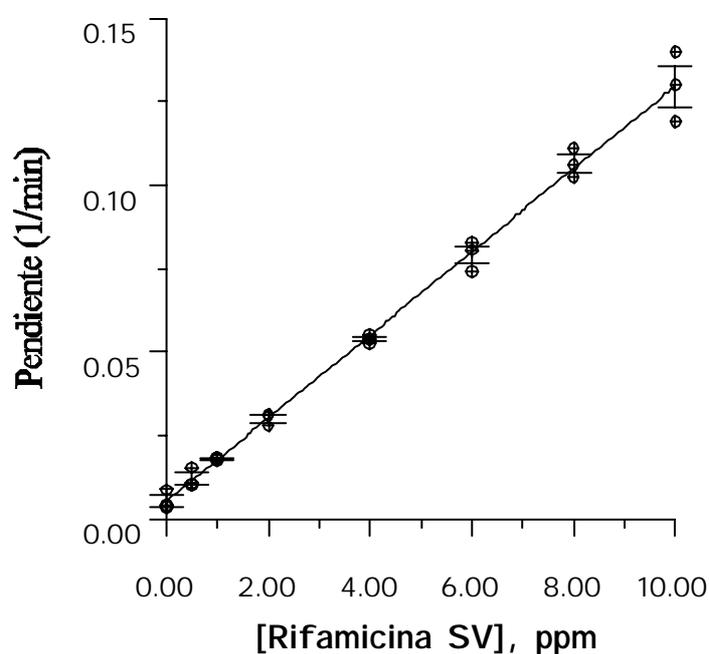
El intervalo de confianza alrededor del valor predicho de concentración,  $x_u$ , calculado a partir de una respuesta  $y_u$ , de una muestra desconocida, sigue la expresión:

$$x_u \pm t_{n-2,\alpha} \left[ \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_u - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2} \frac{s}{b_1}$$

siendo N el número de medidas repetidas de la respuesta de  $y_u$  para la misma muestra de concentración desconocida  $x_u$ .

El intervalo de confianza calculado mediante esta última expresión corresponde a la etapa de calibrada. Esta es una más de las diversas etapas del proceso de medida químico y, como en cada una de ellas se generan errores aleatorios que no están contemplados en el intervalo aquí descrito, el intervalo de confianza del resultado analítico final es ciertamente un poco más complejo (48).

**Tratamiento experimental. Rectas de calibrado.-** Se prepararon, por triplicado, una serie de muestras conteniendo entre 0.0 y 10.0 ppm de rifamicina SV, 0.6 ml de tampón amonio/amoniaco de pH = 10.2, 50  $\mu$ l de disolución de Cu (II) de 62.5 ppm y agua desionizada hasta completar 3 ml de disolución. Se midieron las tangentes a las curvas cinéticas durante los primeros 20 segundos. En la **figura 2.21** se muestra la recta de calibrado obtenida a 320 nm.



*Figura 2.21. - Recta de calibrado obtenida para rifamicina SV ( $\lambda = 320$  nm).*

Asimismo, en la **tabla 2.3** se han resumido los parámetros estadísticos más relevantes obtenidos mediante el programa Quimio (49) a las dos longitudes de onda seleccionadas.

Tabla 2.3. - Parámetros estadísticos.

Modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x + \epsilon$ ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ )	
Pendiente ( $\beta_1$ )	$1.24 \times 10^{-2}$
Ordenada en el origen ( $\beta_0$ )	$5.37 \times 10^{-3}$
Desviación típica de la pendiente ( $\sigma_{\beta_1}$ )	$2.34 \times 10^{-4}$
Desviación típica de la ordenada en el origen ( $\sigma_{\beta_0}$ )	$1.23 \times 10^{-3}$
Desviación típica estimada ( $\sigma$ )	$4.00 \times 10^{-3}$
Coefficiente de correlación (r)	0.9961

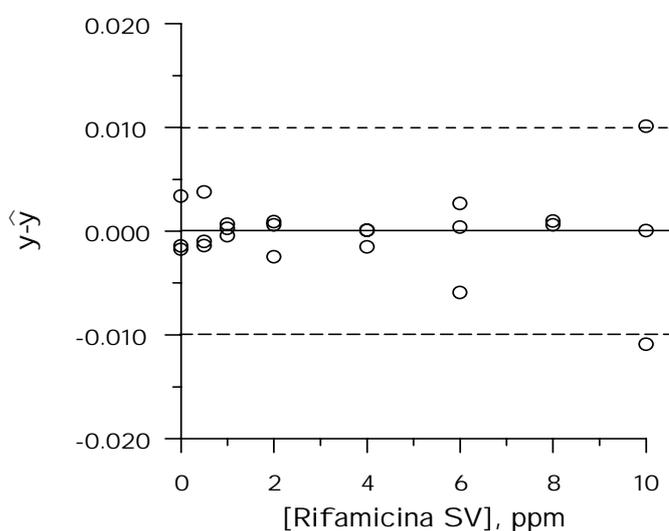
Modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x + \epsilon$ ( $\lambda = 452 \text{ nm}$ )	
Pendiente ( $\beta_1$ )	$-1.30 \times 10^{-2}$
Ordenada en el origen ( $\beta_0$ )	$6.75 \times 10^{-4}$
Desviación típica de la pendiente ( $\sigma_{\beta_1}$ )	$2.55 \times 10^{-4}$
Desviación típica de la ordenada en el origen ( $\sigma_{\beta_0}$ )	$1.34 \times 10^{-3}$
Desviación típica estimada ( $\sigma$ )	$4.35 \times 10^{-3}$
Coefficiente de correlación (r)	0.9958

A continuación, se realiza la validación del modelo lineal, y exponemos los resultados a 320 nm.

1) **Comprobación de las hipótesis matemáticas asumidas.** - Como se ha indicado anteriormente, una manera de realizarlo desde el punto de vista práctico es mediante los denominados gráficos de residuos. Como paso previo se calculan los valores de los residuos y se representan en función de la concentración de Rf (**figura 2.22**). Se puede observar una distribución uniforme de los residuos para cada muestra alrededor del valor central, y un aumento de los valores absolutos de los mismos para los patrones más concentrados. Por esta razón, se lleva a cabo una calibración ponderada obteniéndose los siguientes resultados:

Valor de la pendiente =  $1.20 \times 10^{-2}$  ; Valor de la ordenada =  $5.76 \times 10^{-2}$ .

Se concluye que no existe diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos y los inicialmente calculados para los datos experimentales, y que por tanto, se cumple el principio de homocedasticidad.



**Figura 2.22.** - Representación de los valores de residuos del modelo.

2) **Análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar el grado de acoplamiento del modelo propuesto a los puntos experimentales.** - Considerando una serie de  $n_i = 3$  repeticiones para cada valor de  $x_i$ , se calcula el valor de  $F$  definida anteriormente como relación entre la varianza debida al acoplamiento y la debida al error puro. En la **tabla 2.4**, se han recogido los parámetros estadísticos calculados. El valor de  $F_{\text{tab}} > F_{\text{cal}}$  para los datos experimentales y como consecuencia podemos decir que el modelo lineal es válido a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

*Tabla 2.4. - ANOVA aplicado al modelo lineal*

<b>x</b>	<b><math>\hat{y}</math></b>
0	$5.27 \times 10^{-3}$
0.5	$1.15 \times 10^{-2}$
1	$1.77 \times 10^{-2}$
2	$3.02 \times 10^{-2}$
4	$5.51 \times 10^{-2}$
6	$8.00 \times 10^{-2}$
8	$1.05 \times 10^{-1}$
10	$1.30 \times 10^{-1}$

Grados de libertad del acoplamiento (k-2): 6

Grados de libertad del error puro (n-k): 16

Media cuadrática debida a la falta de acoplamiento =  $2.35 \times 10^{-6}$

Media cuadrática debida al error =  $2.16 \times 10^{-5}$

Para  $\alpha = 0.05$  con 6 y 16 grados de libertad,

$F_{\text{cal}} = 0.11$  y  $F_{\text{tab}} = 2.74$

3) El límite de detección, calculado mediante los dos criterios mencionados anteriormente, Winefordner y Clayton. - Aplicando el criterio de Winefordner ( $k = 3$ ) se obtuvo un valor de 0.30 ppm. Para la aplicación del criterio de Clayton se ha empleado un valor de  $\alpha = \beta = 0.05$  y se han efectuado 24 medidas para calcular la recta de calibrado, luego  $n = 24$ , resultando ser 0.89 ppm.

Similares resultados se obtuvieron a 445 nm siendo el límite de detección por el criterio de Clayton de 0.74 ppm.

### Repetitividad

Para evaluar la precisión del método se prepararon una serie de 11 muestras conteniendo una concentración fija de Rf de 4 ppm y los demás reactivos en las concentraciones anteriormente descritas en la calibración. Los resultados de las medidas cinéticas obtenidas, y las concentraciones halladas mediante las rectas de calibrado aparecen en la **tabla 2.5**. Aunque los valores medios obtenidos a ambas longitudes de onda son idénticos, los valores de desviación estándar relativa son sustancialmente menores a 320 nm. Por ello y para posteriores estudios se propone como más adecuado medir la curva cinética a 320 nm. Se observa una mayor precisión a 320 nm eligiéndose esta longitud de onda como la más apropiada para el procedimiento recomendado.

### Procedimiento recomendado

En una célula fotométrica con camino óptico de 1 cm, adicionar: 600  $\mu$ l de disolución tampón amoniacal/cloruro amónico de pH =10.2, volúmenes variables de

disolución problema o patrón de rifamicina SV hasta un contenido máximo de 30.0  $\mu\text{g}$  volúmenes adecuados de agua desionizada para obtener un volumen final de 3 ml y 50  $\mu\text{l}$  de disolución de Cu (II) de 62.5 ppm. Una vez adicionado el catalizador, comenzar a registrar la curva cinética monitorizando la evolución de la absorbancia a 320 nm, durante aproximadamente 50 segundos. Medir la pendiente de dichas curvas en los primeros 20 segundos de reacción.

*Tabla 2.5. - Resultados de repetitividad para muestras conteniendo Rf (4 ppm).*

320 nm		452 nm	
Pendiente (1/min)	[Rifamicina] calculada, (ppm)	Pendiente (1/min)	[Rifamicina] calculada, (ppm)
$5.24 \times 10^{-2}$	3.81	$-4.28 \times 10^{-2}$	3.33
$5.69 \times 10^{-2}$	4.17	$-5.27 \times 10^{-2}$	4.12
$5.31 \times 10^{-2}$	3.87	$-4.95 \times 10^{-2}$	3.87
$5.28 \times 10^{-2}$	3.84	$-6.04 \times 10^{-2}$	4.73
$5.76 \times 10^{-2}$	4.23	$-5.11 \times 10^{-2}$	3.99
$5.62 \times 10^{-2}$	4.12	$-4.86 \times 10^{-2}$	3.79
$5.49 \times 10^{-2}$	4.01	$-5.32 \times 10^{-2}$	4.16
$5.48 \times 10^{-2}$	4.01	$-4.94 \times 10^{-2}$	3.86
$5.10 \times 10^{-2}$	3.70	$-5.54 \times 10^{-2}$	4.34
$5.31 \times 10^{-2}$	3.88	$-4.60 \times 10^{-2}$	3.59
$5.53 \times 10^{-2}$	4.05	$-4.494 \times 10^{-2}$	3.86
	$\bar{x} = 3.97, \sigma_{n-1} = 0.165$ RSD (%) = 4.15		$\bar{x} = 3.97, \sigma_{n-1} = 0.373$ RDS (%) = 9.40

### **Influencia de la concentración de etanol en la reacción catalizada.**

Teniendo en cuenta la posibilidad de tener que utilizar mezclas etanol- agua en el tratamiento de muestras reales, como fármacos, nos proponemos estudiar la influencia que ejerce la presencia de etanol sobre la velocidad de reacción catalizada. Para ello se preparan muestras conteniendo una cantidad constante de rifamicina SV (4 ppm) y Cu (II) (1.04 ppm) y cantidades variables de etanol de manera que la proporción se varió entre 0 y 23%. Una vez registradas las curvas cinéticas, se miden las pendientes en los 20 primeros segundos, manteniendo las muestras a temperatura ambiente (25°C). Se observa que los valores obtenidos son prácticamente independientes del contenido de etanol. También se observa que las señales correspondientes a muestras con contenidos de 12 y 23 %, presentan mayor ruido debido a la formación de burbujas. Para posteriores estudios se podría emplear hasta aproximadamente un 10% de etanol sin que se afecte notablemente la señal.

### **Influencia de otros principios activos en la determinación de *rifamicina SV*.**

Se han ensayado la influencia que otros principios activos pertenecientes a diversas familias de fármacos ejercen en la determinación cinética de Rf. Estos principios activos han sido seleccionados entre aquellos que o bien se formulan conjuntamente con la rifamicina o se administran de forma simultánea con este antibiótico. Podemos clasificarlos en varios grupos, que están indicados en la **tabla 2.6**.

*Tabla 2.6. - Principios activos formulados conjuntamente a rifamicina SV.*

<i>Agentes antituberculosos</i>	Isoniacida, etambutol, piracinamida, estreptomina
<i>Antibióticos generales</i>	Eritromicina, cloranfenicol, neomicina, tetraciclina,
<i>Antibióticos de la misma familia-ansamicinas</i>	Rifampicina
<i>Antiinflamatorios</i>	Fenilbutazona, nabumetona, prednisona, indometacina, ibuprofeno.
<i>Sulfamidas</i>	sulfametoxazol, sulfametacina, sulfaquinoxalina, sulfanilamida.
<i>Coadyuvantes</i>	Probenecid, trimetoprim
<i>Otras especies de interés farmacológico</i>	Ácido ascórbico

Para ello se prepararon muestras conteniendo 4 ppm en las condiciones experimentales optimizadas y cantidades variables de los principios activos a ensayar. En la **tabla 2.7** se han indicado las relaciones de tolerancia obtenidas tomando como criterio de error el 5 %.

*Tabla 2.7. - Relaciones de tolerancia de principios activos en la determinación de rifamicina SV.*

Relación (Rf:In)*	PRINCIPIO ACTIVO
1:1	Fenilbutazona, nabumetona, sulfametoxazol, cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, tetraciclina, sulfaquinoxalina, ácido ascórbico, ibuprofeno.
1:0.5	Isoniacida, probenecid, sulfanilamida
<1:0.5	Piracinamida, etambutol, prednisona, indometacina, trimetoprim, neomicina, sulfametacina, rifampicina

\* en relación molar.

#### **Aplicación del método propuesto al análisis farmacéutico. Determinación de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio".**

Se ha elegido como producto farmacéutico para la aplicación del método propuesto el denominado "Rifamicina colirio" comercializado por Merck Sharp Dohme de España S.A. Dicho producto tiene la siguiente composición por ml: Rifamicina SV(sódica), 10 mg; Vitamina C, 5 mg; excipientes: metabisulfito potásico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, edetato disódico, mercurotiolato sódico y agua.

Para realizar la determinación se han aplicado el método del patrón externo para tres diluciones diferentes, así como el método de la adición patrón. Los resultados se han comparado con los obtenidos por aplicación de un método cromatográfico (7) establecido en la bibliografía para la determinación de rifamicina SV. Las muestras se prepararon siempre por triplicado.

*Método operatorio.*- Se pipetea 1.00 ml del producto comercial y se diluye hasta 500 ml con agua desionizada. A partir de esta disolución madre se llevan a cabo dos series de muestras:

a) Patrón externo. Se prepararon muestras correspondientes a las diluciones 1/7, 1/4 y 1/2, por triplicado, y se analizaron según el método propuesto.

b) Adición patrón . Se adicionaron diferentes volúmenes de una disolución patrón de rifamicina SV a una cantidad de problema fijo correspondiente a la dilución de 1/4. Las concentraciones adicionadas resultaron ser: 2, 4 y 6 ppm respectivamente.

En ambos casos, los resultados obtenidos se analizaron con respecto a una recta de calibrado preparada simultáneamente. Se obtuvieron los resultados que aparecen resumidos en la **tabla 2.8**, por aplicación del patrón externo. Por aplicación de la adición patrón, se determinaron los valores correspondientes a las recuperaciones individuales para cada adición, así como la concentración de Rf en el colirio original (**tabla 2.9**).

**Tabla 2.8.** - Analisis de "Rifamicina colirio" por el método propuesto y la metodología del patrón externo.

Factor de dilución	[Rifamicina SV]*, (mg/ml)	$\sigma_{n-1}$	[ Rifamicina SV]**, (mg/ml)
1/7	13.3	0.93	10 mg/ml
1/4	11.2	1.50	
1/2	11.1	0.10	
Valor medio : 11.85			

\* concentración referida a colirio original como valor medio de tres determinaciones independientes.

\*\* Valor indicado en etiqueta;  $\sigma$ : desviación standard, n = 3.

*Tabla 2.9. - Resultados obtenidos por aplicación del método propuesto y la metodología de la adición patrón.*

[Rifamicina ] adicionada* (ppm)	[Rifamicina] encontrada (ppm)	Recuperación (%)
0	3.88	----
2.00	6.12	101
4.00	8.11	100
6.00	9.38	88

[Rifamicina]<sub>adición patrón</sub> = 4.10 ppm  
[Rifamicina]<sub>en colirio original</sub> = 13.6 ppm  
Pendiente<sub>adición patrón</sub> = 0.0131 min<sup>-1</sup> ppm<sup>-1</sup>  
Pendiente<sub>referencia</sub> = 0.0142 min<sup>-1</sup> ppm<sup>-1</sup>

\* a disolución madre de colirio. Dilución 1/20.

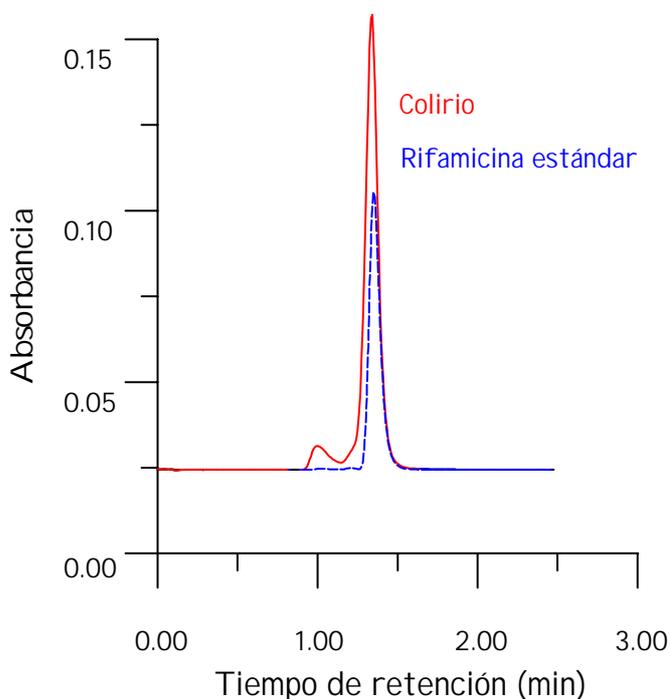
#### Determinación cromatográfica de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio".

Se ha aplicado un método cromatográfico descrito en la bibliografía (31) con objeto de validar los resultados obtenidos en el análisis del producto farmacéutico "Rifamicina Colirio".

Se trata de un método de HPLC en fase reversa (columna C<sub>18</sub>) con detección fotométrica ( $\lambda = 340$  nm) que emplea como fase móvil una mezcla acetato sódico (0.01 M): acetonitrilo (1:1) y un flujo de 1 ml/min. Se ha aplicado a la determinación de diversas rifamicinas en sus mezclas.

Como paso previo al análisis del fármaco se procedió a estudiar los cromatogramas obtenidos para el mismo y compararlos con los de muestras estándar de rifamicina SV.

En la **figura 2.23** se han representado los cromatogramas correspondientes a una muestra patrón de rifamicina SV (32.2 ppm) y a una muestra de colirio.



**Figura 2.23.** - Cromatogramas de disolución de rifamicina SV ( 32.2 ppm) y de colirio (dilución 1/300).

Como se puede observar, el pico correspondiente a rifamicina SV ( $t_R = 1.30$  minutos) se encuentra suficientemente resuelto con respecto a un pico que aparece a tiempos menores (debido a otra especie presente en el colirio y que no hemos

procedido a identificar). Se ha procedido a establecer la recta de calibrado, así como a realizar la determinación en el colirio para tres diluciones distintas (las disoluciones se prepararon por triplicado). Las muestras se diluyeron con la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica. En la **tabla 2.10** se han resumido los resultados obtenidos, así como las características de la calibración mencionada.

*Tabla 2.10. - Resultados obtenidos mediante análisis cromatográfico en "Rifamicina Colirio".*

Dilución	Altura de pico (mV)	Área (mV s)	Tiempo de retención (min)	[Rifamicina] a/b * (mg/ml)	$\sigma_{n-1}$
1/500	58.9	309.7	1.32	12.70/13.51	0.11/0.40
	58.4	303.6	1.32	12.59/13.23	
	59.4	320.7	1.34	12.82/14.00	
1/300	86.9	475.1	1.32	12.56/13.96	0.03/0.51
	87.2	475.3	1.32	12.60/13.07	
	87.3	470.5	1.32	12.61/13.96	
1/150	100.8	647.0	1.35	11.00/14.33	0.18/0.13
	103.0	647.4	1.35	11.18/14.34	
	104.6	637.2	1.32	11.36/14.11	
Ecuaciones de calibración :				contenido	0.75/0.35
h ( $\mu$ V) = $9.71 \times 10^2 + 2.28 \times 10^3$ [Rf]; R = 0.9999				medio	
A ( $\mu$ V s) = $9.13 \times 10^3 + 1.11 \times 10^4$ [Rf]; R = 0.9995				12.15/13.94	

\* a: calculada por medida de altura ; b:calculada por medida de área de pico.

Por último, en la **tabla 2.11** se han resumido los valores obtenidos por el método propuesto y los obtenidos por el método cromatográfico comparativo.

**Tabla 2.11.** - Determinación del contenido de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio".

Método	[Rifamicina], (mg/ml)	$\sigma_{n-1}$ (n = 9)	
Propuesto (patrón externo)	11.9	1.4	
	13.6	-----	
Valor medio:	12.7		
Cromatográfico (patrón externo)			
	Por altura de pico:	12.2	0.7
	Por área de pico:	13.9	0.3
Valor medio:	13.0		

Con objeto de saber si los valores medios obtenidos por aplicación del método propuesto (método del patrón externo) y el cromatográfico son comparables, procedimos a realizar el apropiado estudio estadístico (50). Se realizaron dos comparaciones, una con el valor medio obtenido por aplicación de la altura de pico como señal analítica y la segunda con el obtenido por aplicación del área de pico.

**Paso a)** Aplicación del **test de Fisher** para comparación de las varianzas de dos conjuntos:

$$F = \sigma_a^2 / \sigma_b^2$$

Se calculan valores de:

$$F_a = (1.4)^2 / (0.7)^2 = 1.96 / 0.49 = 4.00$$

$$F_b = (1.4)^2 / (0.3)^2 = 1.96 / 0.09 = 21.78$$

El valor de F tabulado para  $n_a - 1$  y  $n_b - 1$  grados de libertad (g.d.l.) es 4.43 luego, podemos decir que existe una diferencia estadística significativa en la precisión entre el método propuesto y el método cromatográfico por medidas de área de pico.

**Paso b)** Comparación entre los valores medios de aquellos métodos con precisión semejante. En este caso podemos calcular una varianza conjunta según:

$$\sigma^2 = \frac{(n_a - 1)\sigma_a^2 + (n_b - 1)\sigma_b^2}{n_a + n_b - 2}$$

en nuestro caso  $\sigma^2 = 1.23$ .

Posteriormente, se calcula el valor de la t de Student teniendo en cuenta la varianza conjunta  $\sigma^2$  según la expresión:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{[\sigma^2(1/n_a + 1/n_b)]^{1/2}}$$

se calcula un valor de  $t = 0.57$ , siendo el valor tabulado 2.12 para el 95 % de probabilidad y  $n_a+n_b-2$  grados de libertad. Luego, los valores medios obtenidos por el método propuesto y el cromatográfico por medida de alturas son estadísticamente comparables y podemos obtener un valor medio entre ambos siendo éste:

Contenido de rifamicina SV en "Rifamicina colirio" = 12.00 mg /ml ( $\sigma^2 = 1.23$ ).

**Paso c)** Puesto que las desviaciones del método propuesto con respecto al método cromatográfico por medidas de áreas no son comparables, es necesario aplicar el **Criterio de Cochran** para determinar la  $t$  de Student para ambos valores medios. Así:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_a - \bar{X}_b}{[(\sigma_a^2/n_a + \sigma_b^2/n_b)]^{1/2}}$$

y los grados de libertad vienen dados por:

$$grados\ de\ libertad = \frac{(\sigma_a^2/n_a + \sigma_b^2/n_b)^2}{\frac{(\sigma_a^2/n_a)^2}{n_a + 1} + \frac{(\sigma_b^2/n_b)^2}{n_b + 1}}$$

En nuestro caso los valores obtenidos son:  $t_{cal} = 1.33$  y g.d.l. = 15.2 = 15, como  $t_{tab} = 2.13$  para un 95 % de probabilidad resulta que  $t_{cal} < t_{tab}$ . Luego, no existe diferencia significativa entre los valores medios obtenidos por ambos métodos.

Podemos concluir que el valor medio obtenido por el método propuesto y por aplicación del patrón externo es estadísticamente indistinguible de los obtenidos mediante el método cromatográfico de validación.

### Estudio cromatográfico de la reacción de oxidación de rifamicina SV

A partir de los estudios preliminares llevados a cabo en presencia y en ausencia de cobre, y basándose fundamentalmente en las características espectrales del producto generado durante la reacción, se llegó a la conclusión de que la reacción que tiene lugar es una oxidación aérea catalizada por el ión cobre. Sin embargo, en la bibliografía (19) se describe una reacción similar, pero de formación de complejo, entre el ión Cu (II) y la rifampicina. Por ello, y a fin de recoger datos concluyentes sobre la naturaleza de la reacción que tiene lugar, procedimos a llevar a cabo una serie de experiencias mediante separación cromatográfica con detección UV-visible.

Se utilizó como fase móvil la empleada anteriormente en el contraste de nuestro método, con detección a 340 nm. Se llevaron a cabo las siguientes experiencias:

*Experiencia A.- Influencia del tiempo y la luz en la evolución de las señales correspondientes a patrones de rifamicina.*

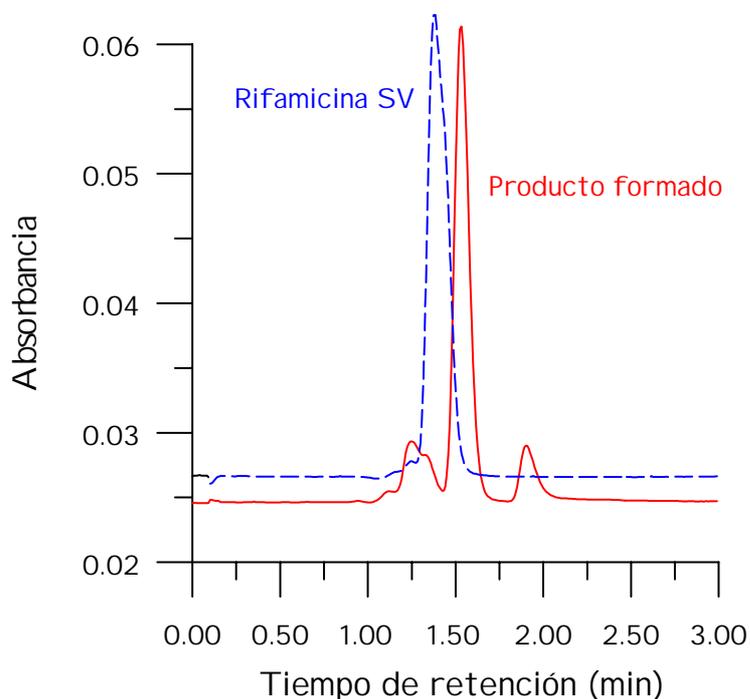
Se prepararon tres muestras exactamente iguales de *rifamicina SV* ( 30 ppm, medio amoniacal pH = 10.2 ), en las condiciones óptimas de reacción establecidas previamente. Una de ellas se inyecta inmediatamente en el sistema cromatográfico, y las otras dos se dejan en reposo durante hora y media, en la oscuridad y expuesta a luz natural, respectivamente, inyectándose posteriormente en el sistema cromatográfico. En la **tabla 2.12** se han recogido los datos de los cromatogramas obtenidos.

Se obtuvieron las siguientes conclusiones: tanto en presencia de la luz como en ausencia, las disoluciones de rifamicina SV en medio amoniacal cambian lentamente de aspecto, originando una coloración rojiza. Cromatográficamente, dicho cambio se traduce en desaparición del pico original de la rifamicina SV situado a 1.37 minutos y aparición de tres nuevos picos. Dos de muy escasa intensidad situados a 1.27 y 1.90 minutos, y uno de intensidad similar al original de la rifamicina situado a 1.58 minutos. Los cromatogramas obtenidos son similares, tanto en presencia como en ausencia de luz. En la **figura 2.24** se pueden observar los cromatogramas obtenidos inicialmente y en presencia de luz.

**Tabla 2.12.** - Influencia del tiempo y de la luz en los cromatogramas de rifamicina SV.

Tiempo de reacción	Tiempos de retención (min)				Altura de pico* (mV)	Área de pico* (mV s)
0 (referencia)	-----	1.37*	-----	-----	35.7	292.4
1 hora 30 min (a la luz)	1.25	-----	1.52*	1.90	35.9	210.0
1 hora 30 min (en la oscuridad)	1.27	----- -	1.58*	1.91	39.4	225.2

\* pico de máxima intensidad.



*Figura 2.24.* - Cromatogramas obtenidos inicialmente y a 1 hora 30 minutos de exposición a la luz natural ( 30 ppm).

***Experiencia B.- Influencia de la presencia de oxígeno en las disoluciones de rifamicina SV.***

Una vez comprobado que la variable luz no parece afectar a los resultados comatográficos, procedimos a estudiar la influencia de la presencia de oxígeno disuelto en las muestras. Así, se prepararon tres muestras idénticas conteniendo 21.5 ppm de Rf en medio tampón  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Una de ellas se inyectó inmediatamente en el sistema cromatográfico para utilizarla como referencia; las otras dos fueron guardadas durante 30 minutos, una de ellas en corriente de nitrógeno durante todo

el tiempo de espera. Se observó que la disolución expuesta a la luz y sin paso de nitrógeno, cambiaba lentamente de color hasta adquirir el tono rojizo ya repetidamente observado; pero sin embargo, la disolución sometida al paso de nitrógeno iba paulatinamente decolorándose. Al cabo de los 30 minutos, ambas muestras fueron inyectadas en el sistema cromatográfico y simultáneamente se le registraron los espectros de absorción UV-visible.

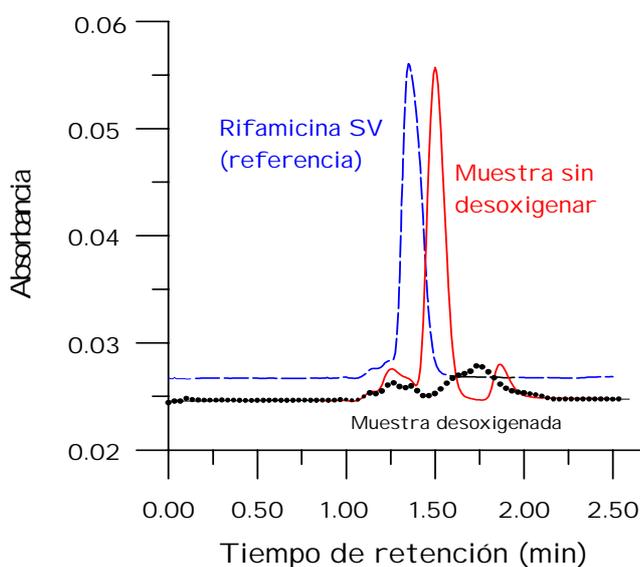
En la **tabla 2.13** se han resumido las características cromatográficas de las señales correspondientes a esta experiencia.

*Tabla 2.13. - Características cromatográficas obtenidas para rifamicina SV en función del tiempo de reacción para muestras desoxigenadas y sin desoxigenar.*

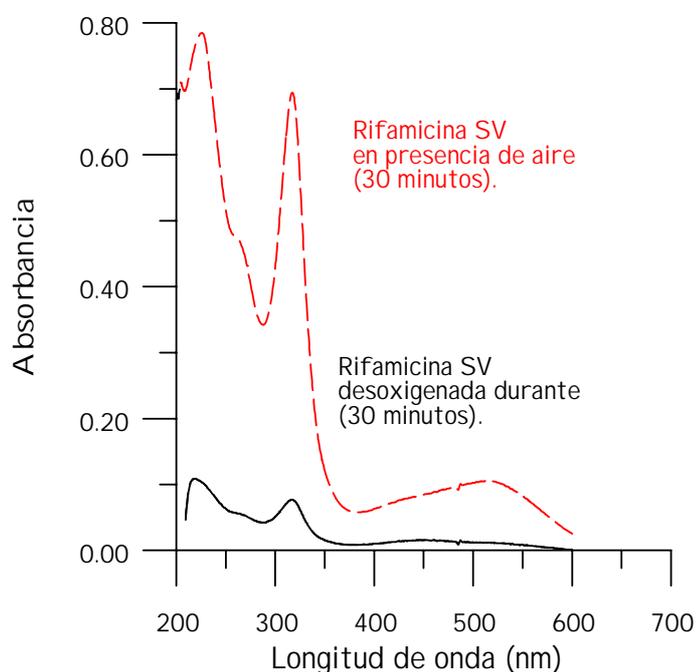
Tiempo de reacción	Tiempo de retención (min)				Altura de pico* (mV)	Área de pico* (mV s)
0 (referencia)	---	1.35*	---	---	29.3	232.4
30 min (con paso de nitrógeno)	1.25	1.36	----	1.74	-----	-----
30 min (sin paso de nitrógeno)	1.24	----	1.50*	1.87	30.1	200.0

\* pico de máxima intensidad.

El pico cromatográfico correspondiente al producto observado en presencia de oxígeno ( $t_R = 1.50$  minutos), no se observa en las muestras desoxigenadas (**figura 2.25**). Se observa un pico de baja intensidad a tiempo similar al de la rifamicina original, y otros a 1.25 y 1.74 minutos que se podrían asignar a los del producto obtenido en presencia de oxígeno, pero que debido a su pequeña intensidad e inadecuada resolución no pueden ser claramente asignados. El hecho de que, en cierta magnitud, la reacción pueda ocurrir no es descartable, debido a que la desoxigenación total es prácticamente imposible en las condiciones operativas empleadas. Cuando se observan los espectros de absorción obtenidos para ambas muestras (desoxigenadas y sin desoxigenar) (**figura 2.26**), se puede constatar que los espectros obtenidos son similares en cuanto a su forma pero de intensidades muy diferentes. Luego, se puede concluir que, en ausencia de aire, el producto responsable de la coloración rojiza no se genera.



**Figura 2.25.** - Cromatogramas correspondientes a muestras de rifamicina SV a los 30 minutos de preparadas en presencia de aire, y de muestras similares desoxigenadas durante 30 minutos.



*Figura 2.26.- Espectros de absorción de muestras de rifamicina SV a los 30 minutos de preparadas en presencia de aire y desoxigenadas durante 30 minutos.*

**Experiencia C. - Influencia de la presencia de Cu (II).**

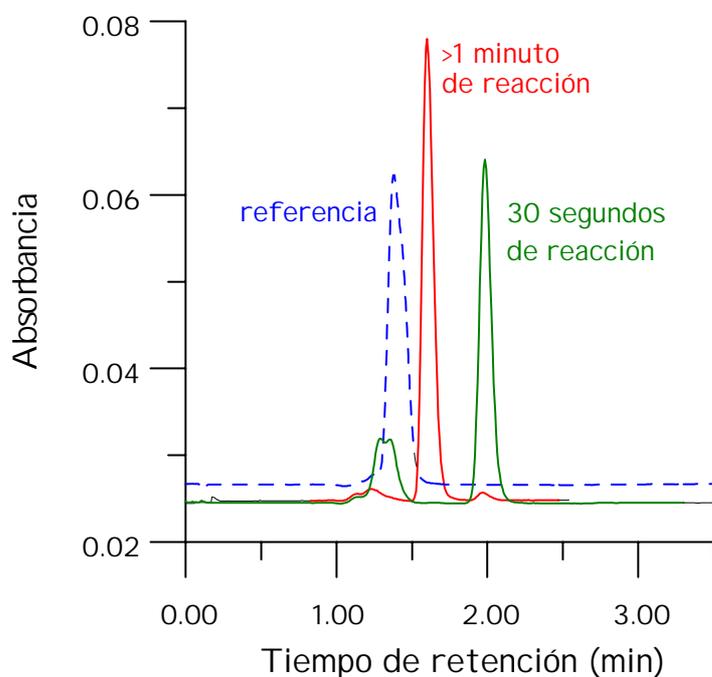
Puesto que la presencia de oxígeno es necesario para la formación del compuesto rojizo, parece cierta la afirmación realizada en este capítulo acerca de la naturaleza oxidativa de la reacción que tiene lugar. Pero con objeto de completar este estudio, nos propusimos estudiar la influencia que la presencia de trazas de Cu (II) ejerce sobre las características de los picos cromatográficos obtenidos. Para ello, se prepararon muestras en presencia de Cu (II), en el medio amoniacal establecido y en presencia de aire, y se inyectaron en el sistema cromatográfico a diferentes tiempos de reacción. Se obtuvieron los resultados que a continuación se exponen en la **tabla 2.14**.

**Tabla 2.14.**-Características de los cromatogramas obtenidos en presencia de Cu (II) de disoluciones de rifamicina SV en medio amoniacal.

Tiempo de reacción	Tiempo de retención (min)			Altura de pico* (mV)	Área de pico* (mV s)
0 (referencia)	---	1.37*	---	35.4	281.1
1 min	1.30	---	1.97*	38.6	225.3
8 min ( $\lambda=340$ nm)	1.22	1.59*	1.97	40.3	278.4
8 min ( $\lambda= 523$ nm)	1.22	1.50*	1.84	39.2	273.2

\* pico de máxima intensidad.

Como se puede observar en la tabla 2.14, las muestras en presencia de Cu (II) evolucionan rápidamente, dando lugar a un pico de intensidad similar al original de la rifamicina SV situado a 1.97 minutos. Inmediatamente después evolucionan a la coloración rojiza con la aparición de los picos cromatográficos idénticos a aquellos obtenidos en ausencia de Cu (II) para tiempos mayores de reacción. En la **figura 2.27** se pueden observar los cromatogramas obtenidos en cada caso.



*Figura 2.27. - Cromatogramas de muestras de rifamicina SV en presencia de Cu (II) a diferentes tiempos de reacción.*

Por tanto, podemos concluir que aunque no se puede descartar la formación momentánea de una especie intermedia entre la rifamicina SV y el Cu (II), esta evoluciona de forma inmediata, siendo la acción más probable del Cu (II), la catálisis de la oxidación de la rifamicina SV por el oxígeno atmosférico.

### Determinación semiautomática de rifamicina SV

Por último y a continuación, se procedió a la puesta a punto de un método semiautomático para la determinación de Rifamicina SV mediante la utilización del sistema indicado en la Introducción de este capítulo (Pag. 33). La utilización de este sistema tiene como finalidad el aumento en la precisión y exactitud de la medida de la velocidad inicial.

Para ello, se parte de las condiciones físico-químicas establecidas en el método manual y se optimizan una serie de variables químicas como son: concentración de tampón, de Cu (II) y de rifamicina SV. También se comprueba si en las mismas condiciones se cumple linealidad entre concentración de rifampicina y la velocidad de reacción.

#### Influencia de la concentración de tampón

Para la realización de esta experiencia se prepararon dos disoluciones compuestas por:

**Jeringa I.** - Disolución de rifamicina SV de 20 ppm

**Jeringa II.** - Disolución formada por 2 ppm de Cu (II), tampón amoniacal/cloruro amónico de pH 10.2 y concentraciones variables entre 0.2 y 4 M.

Dichas disoluciones son impulsadas y mezcladas en la célula de flujo del sistema neumático, en volúmenes iguales. Simultáneamente, se registran las curvas cinéticas a 320 y 452 nm. Se miden las pendientes obtenidas en los 20 primeros segundos.

Los valores de las pendientes permanecen prácticamente constantes hasta concentraciones de tampón 2 M, disminuyendo ligeramente para valores superiores. Se elige una concentración de 1.95 M como adecuada para los posteriores estudios

También se observa como las curvas a 452 nm presentan menor ruido que las registradas a 320 nm. Teniendo en cuenta por los estudios anteriores que a ambas longitudes de onda la sensibilidad resulta ser prácticamente la misma, elegimos la  $\lambda$  de 452 nm para llevar a cabo la semiautomatización del método.

**Influencia de la concentración de cobre (II).**

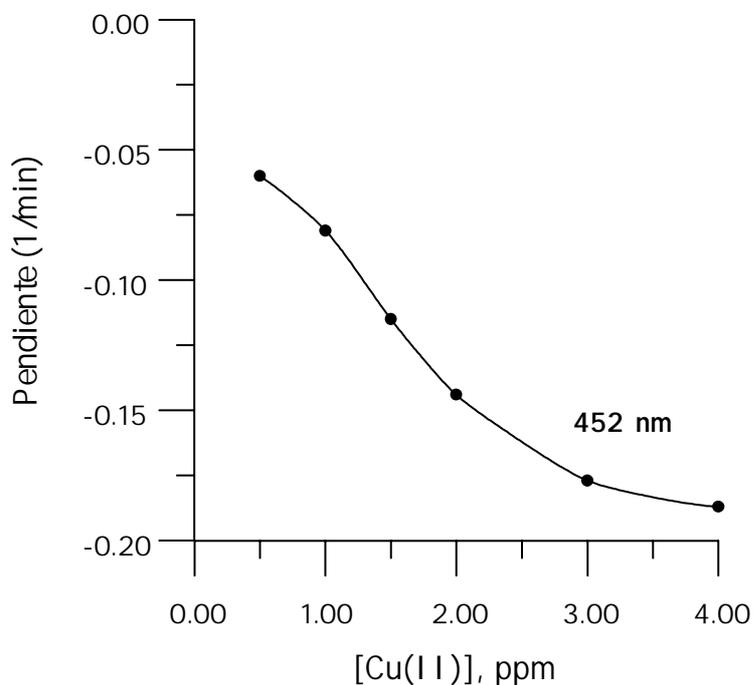
Cuando se llevó a cabo el estudio mediante premezcla manual de los reactivos, se observó como el aumento de la concentración de Cu (II) favorecía la velocidad de la reacción, hasta una concentración del orden de 2 ppm, valor a partir del cuál, la velocidad se hace independiente. Sin embargo, el aumento de la velocidad inicial que suponía la utilización de concentraciones de cobre elevadas impedía la medida de la velocidad inicial de forma apropiada (debido a las limitaciones de la manipulación de la muestra) obligándonos a trabajar con concentraciones de cobre menores. Ahora, sin embargo, el sistema semiautomático, permitirá la adición de cantidades mayores de cobre con el consiguiente aumento de sensibilidad sin pérdida de seguridad en los resultados.

Se prepararon las siguientes disoluciones de reactantes:

**Jeringa I.** - Disolución de rifamicina SV de 20 ppm

**Jeringa II.** - Disolución compuesta por: Disolución tampón 1.95 M (pH=10.2) y concentraciones variables de Cu (II) comprendidas entre 0 y 8 ppm.

En la **figura 2.28** se han representado los resultados obtenidos a 452 nm, estando representadas en abscisas las concentraciones correspondientes en la mezcla de reacción. Como se puede observar la pendiente aumenta hasta concentraciones de aproximadamente 6 ppm (correspondientes a 3 ppm en la mezcla de reacción) haciéndose independiente para valores superiores. Resultados estos que concuerdan con los obtenidos por el método manual. Se elige una concentración de 6 ppm para el establecimiento del método semiautomático.



*Figura 2.28.- Influencia de la concentración de Cu (II) obtenida mediante el sistema de flujo interrumpido.*

#### **Influencia de la concentración de Rifamicina SV. Recta de calibrado**

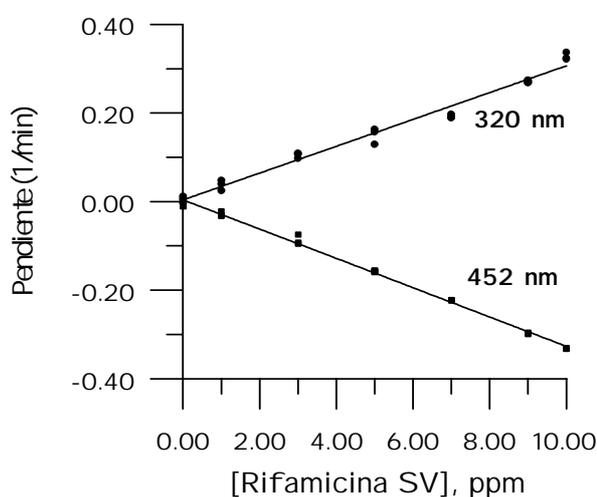
De forma similar a la anteriormente descrita, se preparan dos disoluciones de reactantes de la siguiente forma:

**Jeringa I.-** Disolución de Rifamicina SV de diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 20 ppm.

**Jeringa II.-** Disolución compuesta por Cu (II) (6 ppm) y tampón amoniaco/cloruro amónico 1.95 M (pH = 10.2).

Las muestras se inyectaron por triplicado y se midieron las pendientes en los 20 primeros segundos de reacción.

En la **figura 2.29** se han representado las rectas de calibrado obtenidas en función de las concentraciones finales de rifamicina SV en la mezcla de reacción a 320 y 452 nm. Se observa una mejor linealidad a 452 nm, así como una menor dispersión de los resultados. También se aprecia un notable incremento de la sensibilidad del método, respecto del manual.



**Figura 2.29.** - Rectas de calibrado obtenidas para Rifamicina SV con el sistema semiautomático. [Cu (II)] = 6 ppm

En la **tabla 2.15** se han resumido los parámetros estadísticos más sobresalientes obtenidos a 452 nm. También se ha llevado a cabo una experiencia similar utilizando **rifampicina**, que como se indicó en la Introducción de la Memoria, es un principio activo de la familia de las *Ansamicinas* y estructura muy similar. La evolución del espectro de la rifampicina en presencia de Cu (II) es similar a la observada con la rifamicina, y sólo se aprecia, como diferencia fundamental, un

desplazamiento batocrómico situándose el máximo a 475 nm.

*Tabla 2.15. - Parámetros estadísticos obtenidos en la calibración de Rifamicina SV (452 nm) y Rifampicina (475 nm).*

Parámetro de calibración	Rifamicina	Rifampicina
Pendiente ( $\text{min}^{-1} \text{ppm}^{-1}$ )	$-3.30 \times 10^{-2}$	$-2.76 \times 10^{-2}$
Ordenada	$3.96 \times 10^{-3}$	$4.90 \times 10^{-3}$
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0.9963	0.9979

Para ambas Ansamicinas ensayadas se cumple la linealidad entre la velocidad de la reacción y la concentración.

Con el fin de aplicar dicha calibración a muestras reales de fármacos, se comprobó como afectaba la presencia de diversas concentraciones. Así, se vio que concentraciones de etanol inferiores a un 10% en la disolución correspondiente a la Jeringa I no afectan a los resultados obtenidos.

Se estudió la repetitividad del método preparando 11 muestras de forma similar conteniendo:

**Jeringa I.** - Disolución de rifamicina SV de 8 ppm.

**Jeringa II.** - Disolución conteniendo Cu (II) (6 ppm) y tampón 1.95 M (pH = 10.2).

Estas condiciones suponen que en la mezcla de reacción la rifamicina SV tendrá una concentración de 4 ppm.

Se obtiene una desviación estándar de  $2.54 \times 10^{-3}$  siendo la desviación estándar relativa (DER) de 2.0 %. Valor notablemente inferior al obtenido por el método manual para la misma concentración (9.40 %), utilizando las curvas cinéticas obtenidas a 445 nm.

#### **Método semiautomático propuesto para la determinación de *Rifamicina*.**

Se preparan dos disoluciones de reactantes según se indica:

**Jeringa I:** Disoluciones acuosas de patrón o problema conteniendo menos de 20ppm de rifamicina SV y hasta un 10 % de etanol si fuera necesario.

**Jeringa II:** Disolución compuesta por Cu (II) (6 ppm) y tampón amoniaco / cloruro amónico (1.95 M) de pH = 10.2.

Se inyecta un volumen de muestra de 0.5 ml y se registran las curvas cinéticas a 452 nm. Se miden las pendientes en los primeros 20 segundos de reacción. Dicho procedimiento podría ser aplicado también a la determinación de rifampicina utilizándose como longitud de onda de medida 475 nm.

#### **Influencia de la presencia de diversos principios activos en la determinación de Rifamicina.**

Se ha estudiado el efecto que ejerce la presencia de otros principios activos en la determinación de rifamicina SV. Para ello se han elegido los mismos compuestos que en el método manual con objeto de comparar los resultados obtenidos.

En la **tabla 2.16**, se han resumido los límites de tolerancia determinados.

**Tabla 2.16.** - Límites de tolerancia de otros principios activos en la determinación de *Rifamicina SV*.

Relación (Rf: Interferente)*	Principio activo
1:40	Piracinamida
1:10	Tetraciclina, isoniacida, eritromicina, neomicina, fenilbutazona, nabumetona, prednisona, indometacina, ibuprofeno, probenecid, trimetoprim, ácido ascórbico
1:1	Etambutol, sulfanilamida, estreptomina, cloranfenicol
< 1	Sulfametoxazol, sulfametazina, sulfaquinoxalina,

Podemos observar como se reduce drásticamente la magnitud de las interferencias, y es de destacar la eliminación de la interferencia debida a otros antibióticos que se formulan conjuntamente con las ansamicinas, como son piracinamida e isoniacida. La reacción en estudio presenta una favorable cinética en competición con la mayoría de las especies estudiadas. Siguen persistiendo las interferencias debidas a la familia de principios activos de las sulfamidas, que sin embargo no se suelen administrar de forma concomitante con las ansamicinas.

**Aplicación del método semiautomático propuesto al análisis farmacológico.  
Determinación de Rifampicina en "Rifater".**

Se ha elegido como producto farmacéutico para la aplicación del método propuesto, el denominado "Rifater" comercializado por Marion Merrell Dow, S.A. y ampliamente utilizado para la profilaxis de la meningitis. Dicho producto tiene la siguiente composición por gragea: rifampicina, 120 mg; isoniacida, 50 mg; piracinamida, 300 mg; sacarosa, 104.9 mg; y excipientes. La elección se ha realizado en función de la complejidad del mismo, ya que permitirá comprobar la eficacia del método semiautomático en la eliminación de las interferencias, antes descritas, en la determinación de rifampicina. Dicho producto no se podría analizar mediante el método manual debido a esas interferencias.

Para realizar la determinación se ha aplicado el método del patrón externo para cuatro diferentes diluciones (por triplicado) así como el método de la adición patrón.

*Método operatorio:* Para preparar una disolución madre del medicamento se trituran 9 grageas del producto comercial y se pesan con exactitud aproximadamente 0.05 g. Posteriormente se adicionan 50 ml de etanol del 99 % enrasando a 100 ml con agua desionizada. A partir de dicha disolución se preparan dos series de muestras:

a) Patrón externo.- Se prepararon muestras correspondientes a las diluciones 1/10, 1/7 y 1/5 (por triplicado) y se analizaron según el método propuesto.

b) Adición patrón.- Se adicionaron diferentes volúmenes de una disolución patrón de rifampicina, a una cantidad de problema constante correspondiente a la dilución 1/17. Las adiciones fueron de 2, 4 y 6 ppm de rifampicina respectivamente.

En ambos casos, los resultados obtenidos se compararon con una recta de calibrado preparada de forma simultánea para minimizar la posible variabilidad instrumental.

Por aplicación del patrón externo, se obtuvieron los resultados que aparecen resumidos en la **tabla 2.17**.

**Tabla 2.17.** - *Análisis de "Rifater" por el método semiautomático y la metodología del patrón externo.*

Dilución	[Rifampicina]* (mg/gragea)	$\sigma_{n-1}$	[Rifampicina]** (mg/gragea)
1/10	114.1	2.0	120
1/7	114.2	3.4	
1/5	109.0	1.5	
<i>Valor medio: 112.4 mg/gragea</i>			

\* calculada para Rifater original como media de tres determinaciones individuales para cada dilución.

\*\* valor indicado en etiqueta del medicamento.

$\sigma_{n-1}$ : desviación estándar para n =3.

Se obtiene un valor medio muy concordante con el facilitado por la casa comercial.

Por aplicación de la adición patrón, se determinaron los valores correspondientes a las recuperaciones individuales para cada adición. Se calculó la pendiente de la recta correspondiente a la adición patrón y se comparó con la pendiente de la recta patrón de referencia, con objeto de ver si hay efecto de interferencia debida a la matriz del medicamento. También, se calculó la concentración de rifampicina en el producto original.

En la **tabla 2.18** se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 2.18.** - *Análisis de "Rifater" mediante el método semiautomático propuesto y la metodología de la adición patrón.*

[Rifampicina] adicionada* (ppm)	[Rifampicina] encontrada (ppm)	Recuperación (%)
0	2.95	-----
2.00	5.08	106
4.00	6.58	91
6.00	9.15	103

[Rifampicina]<sub>adición patrón</sub> = 2.95 ppm  
[Rifampicina]<sub>producto original</sub> = 119.4 mg/gragea  
Pendiente adición patrón = -0.0261 min<sup>-1</sup> ppm<sup>-1</sup>  
Pendiente de referencia = -0.0272 min<sup>-1</sup> ppm<sup>-1</sup>

\* a la disolución madre de rifater de dilución 1/17.

Se ha comprobado que las pendientes indicadas en la tabla 2.19 son estadísticamente indistinguibles, lo cuál indica que no hay interferencia de los compuestos presentes en la matriz, tales como isoniacida y piracinamida, en la determinación de rifampicina en Rifater, mediante el método propuesto. Tampoco hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores del contenido de rifampicina calculado por el método de la adición patrón, el patrón externo y el valor indicado en la etiqueta.

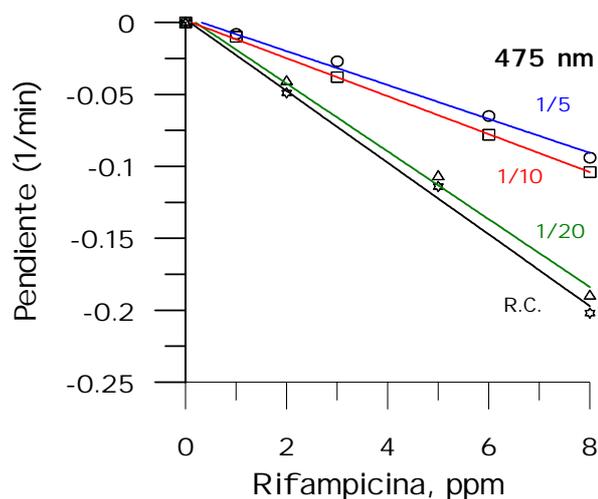
Se obtiene un valor medio de : **115.9 mg de rifampicina /gragea de Rifater.**

**Determinación de rifampicina en orina mediante el método semiautomático**

El método semiautomático propuesto ha sido, también, aplicado a la determinación de rifampicina en muestras de orina, previamente contaminadas.

Primeramente se intentó la determinación de rifampicina sin tratamiento previo, sólo dilución de la orina y en las condiciones químicas optimizadas. Se probaron 3 diluciones: 1/5, 1/10 y 1/20. Para llevar a cabo la determinación de rifampicina en las diferentes diluciones de orina, se empleó el método de adición patrón. Se prepararon muestras conteniendo cantidades de rifampicina comprendidas entre 1 y 8 ppm, en cada una de las diluciones. Paralelamente, se realizó una recta de calibrado con patrones de rifampicina en medio acuoso, abarcando las mismas concentraciones. Se registraron las curvas cinéticas a la longitud de onda de 475 nm, obteniéndose las rectas de calibrado correspondientes a cada dilución y comparándolas con la recta de calibrado de rifampicina en medio acuoso. Las rectas de calibrado obtenidas se muestran en la **figura 2.30**.

Podemos observar que existe un efecto de matriz negativo, y que disminuye al aumentar la dilución de la orina.



**Figura 2.30.** -Rectas de calibrado para diluciones (1/5, 1/10 y 1/20) y recta de calibrado de rifampicina en medio acuoso.

Seguidamente, una vez comprobado la existencia de interferencias entre la matriz de orina y el analito a determinar (rifampicina), se procedió a la realización de un tratamiento a la orina, el cual consistió en:

*Tratamiento:* acidificar la orina, contaminada con rifampicina, hasta obtener un medio a pH 2 (para ello añadir HCl). Mantener este pH durante 10 minutos y volver al pH inicial mediante la adición de NaOH. Las muestras de orina tratada presentaban una dilución de 1/20 en la cubeta de medida.

Se aplicó, nuevamente, el método de la adición patrón en disoluciones de orina tratada, que contenían cantidades de rifampicina entre 4 y 10 ppm, y asimismo, se hizo una recta de calibrado de patrón con concentraciones de rifampicina entre 2 y 10 ppm. El tratamiento estadístico aplicado (48) indica que la pendiente de la recta calculada por el método del patrón externo ( $-2.58 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ ), es similar a la pendiente de la recta de referencia ( $-2.49 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ ppm}^{-1}$ ).

Utilizando la recta de calibrado patrón, una vez comprobado que la matriz de orina no interfiere, calculamos las recuperaciones de rifampicina en las muestras de orina tratada previamente y las recuperaciones en una muestra de orina sin tratamiento previo, sólo dilución 1/20. En la **tabla 2.19** se recogen los resultados obtenidos.

*Tabla 2.19. - Recuperación de rifampicina en orina.*

	Rifampicina añadida (ppm)	Rifampicina encontrada (ppm)	Recuperación (%)
Rifampicina sin tratamiento previo	5.00	3.69	73.9
	5.00	3.87	77.4
	5.00	3.68	73.7
Rifampicina pretratada	4.00	4.01	100.4
	7.00	7.40	106.7
	10.00	10.20	102.0

Se puede observar como las recuperaciones obtenidas para la orina pretratada son mayores y satisfactorias que las obtenidas para la orina sin tratamiento previo, en la cual, parte de rifampicina se queda coordinada con algún compuesto de la orina.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis, Techniques and instrumentation in Analytical Chemistry*, Vol. 9, Edit. Elsevier.
- 2.- H.A. Mottola; *Anal. Chim. Acta*, (280), 279, (1993).
- 3.- M.D. Pérez Bendito y col., *Métodos Cinéticos de Análisis*, Publicaciones de la Universidad de Córdoba, (1984).
- 4.- Applied Photophysics Limited, Leatherhead, U.K.
- 5.- D. Pérez-Bendito, A. Gómez-Hens y M. Silva; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (14), 917, (1996).
- 6.- L. De la Peña, A. Gómez-Hens y D. Pérez-Bendito; *Talanta*, (41), 1895, (1994).
- 7.- M.A. Koupparis, K.E. Evagorou y T.P. Hasjiioannou; *Anal. Chim. Acta*, (224), 339, (1989)
- 8.- C.A. Georgiou, M.A. Koupparis y T.P. Hasjiioannou; *Talanta*, (38), 689, (1991).
- 9.- P. Izquierdo, P. Pavón, A. Gómez-Hens y D. Pérez-Bendito; *Fresenius-J-Anal-Chem* 349(12), 829 (1994).
- 10.- L. De la Peña, A. Gómez-Hens y M.D. Pérez-Bendito; *Anal. Chim. Acta*, (283), 471, (1993).
- 11.- M. Carmona, M. Silva y D. Pérez-Bendito; *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, (334), 261, (1989).
- 12.- H. Ellis, H.K.L. Hundt, K.J. Swart, A.F. Hundt, A.L. Joubert, G.H. Van-Essen y J.B. du-Plessis; *J.Pharm-Biomed-Anal*, (22), 933 (2000).
- 13.- A. Espinosa-Mansilla, A. Guiberteau-Cabanillas, F. Salinas, N. Mora y A. Zamoro; *J-AOAC-Int*, (83), 1 (2000).
- 14.- A. Espinosa-Mansilla, A.Z. Madera y F. Salinas; *J. Agric. Food. Chem*, (47), 1976 (1999).

- 15.- I.A. Pettas, S.I. Lafis y M.I. Karayannis; *Anal. Chim. Acta*, (376), 331 (1998).
- 16.- K. Znang, R.X. Cai, D.H. Chen y L.Y. Mao; *Anal. Chim. Acta*, (413), 109 (2000).
- 17.- M.I. Karayannis y I.A. Pettas; *Anal. Chim. Acta*, (423), 277 (2000).
- 18.- S.R. Crouch, J. Coello, S. MasPOCH y M. Parcel; *Anal. Chim. Acta*, (424), 115 (2000).
- 19.- M.I. Acedo-Valenzuela, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, R. Sánchez-Maqueda; Trabajo aceptado en *Talanta* (2001).
- 20.- J. Martínez Calatayud, S. Sagrado Vives y F. Sanmiguel Roche; *Química Analítica*, (9) 1, (1990).
- 21.- N. Bergisadi; *Eczacilik. Bul.*, (21), 40, (1979).
- 22.- H. Wang, L. Zhang y S. Bai; *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, (9), 314, (1989).
- 23.- V.S. Svinchuk; *Farm. Zh. (Kiev)*, (2), 54, (1990).
- 24.- S.V. Efimovskikh, T.A. Anokhina y L.V. Podlepich; *Khim. Farm. Zh.*, (25), 79, (1991).
- 25.- S.M. Galal, S.M. Blaih y M.E. Abdel-Hamid; *Anal. Lett.*, (25), 725, (1992).
- 26.- M.I. Walash, F. Belal, M.E. Metwally y M.M. Hefnawy; *Anal. Lett.*, (26), 1905, (1993).
- 27.- P. Corti, L. Savini, L. Celesti, G. Ceramelli y L. Montecchi; *Pharm. Acta. Helv.*, (67), 76, (1992).
- 28.- S.A. Benetton, E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro y V.M. Borges; *Talanta*, (47), 639, (1998).
- 29.- W.A. Korfmacher, J. Bloom, M.I. Churchwell, T.A. Getek, E.B. Hansen y C.L. Holder; *J. Chromatogr. Sci.*, (31), 498, (1993).
- 30.- R.M. Vohra y S. Dube; *J. Chromatogr.*, (477), 463, (1989).
- 31.- M.M. Issar, G. Kanjilal, S. Bhattacharya, M.P. Uniyal y S.S. Yadav; *East. Pharm.*, (34), 123, (1991).

- 32.- J. Zeng, Z. Chen, M. Liang y Y. Huang; *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, (7), 195, (1987).
- 33.- K.C. Jindal, R.S. Chaudhary, S.S. Gangwal, A.K. Singla y S. Khanna; *J. Chromatogr. A*, (685), 195, (1994).
- 34.- J. Ge y X. Zhang; *Zhongguo. Yaoxue. Zazhi*, (27), 668, (1992).
- 35.- F.R. Wang y J. Gao; *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, (15), 47, (1995).
- 36.- T.A. Anokhina, L.V. Podlepich, S.V. Efimovskikh y O.A. Serdyukova.; *Zh. Anal. Khim.*, (46), 1436, (1991).
- 37.- P.K. Shrivastava y R. Prakash; *Chim. Oggi*, (7), 23, (1989).
- 38.- S.A. Halvatzis, M.M. Timotheou-Potamia y T.P. Hadjiioannou; *Anal. Chim. Acta.*, (272), 251, (1993).
- 39.- D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill y J.R. Chen; *Anal. Chem.*, (66), 1473, (1994).
- 40.- D.W. Armstrong, K. Rundlett y G.L. Reid; *Anal. Chem.*, (66), 1690, (1994).
41. R. De Levi, *J. Chem. Educ.*, (63), 10, (1986).
- 42.- N. Draper y H. Smith; *Applied Regression Analysis*, 2 edic. Wiley New York, (1981).
- 43.- "Nomenclature, Symbols, Units and their usage in Spectrochemical Analisis I I "; *Spectrochim. Acta*, (33B), 242, (1978).
- 44.- "Guidelines for Data Adquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry"; *Anal. Chem*, (52), 2242, (1983).
- 45.- G.L. Long y J.D. Winefordner; *Anal. Chem.*, (55A), 712 (1983).
- 46.- C.A. Clayton, J.W. Hines y P.D. Elkins; *Anal Chem.*, (59), 2506, (1987).
- 47.- "Analytical Methods Committee"; *Analyst*, (113), 1469, (1988).
- 48.- F.X. Rius, " *Determinación de la incertidumbre en el análisis químico*". Ponencia integrada en los cursos RELE (Red Española de Laboratorios de Análisis). Madrid, (1993).

49.- R. Cela; *Quimiometría avanzada*, y Programa: *Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de publicaciones (1994).

50.- M. Valcárcel y A. Rios, *La calidad en los laboratorios analíticos*, Edit. Reverté, (1992).

## CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE RIFAMPICINA, ISONIACIDA Y  
PIRACINAMIDA MEDIANTE MÉTODOS DE  
CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE (PLS1 Y HLA)



## INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se denominan *señales univariantes* a aquellas señales analíticas que se miden en un determinado método instrumental en función de una única variable controlada. Se denomina calibración univariante a aquella que se basa en la construcción de una relación entre dos variables  $x$  é  $y$  de manera que  $x$  se emplea para predecir  $y$ . Reciben el nombre de *señales multivariantes* aquellas que se miden en función de dos o más variables controladas. Por ello, la información que puede obtenerse de las señales univariantes resulta bastante limitada en comparación con las posibilidades más extensas que poseen las señales multivariantes.

Mediante los métodos de calibración multivariante (1-3) es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas (4-9). Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, determina tiempo de análisis más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas. Además, la calibración multivariante ha permitido el desarrollo de nuevos instrumentos analíticos (10).

El gran número de monografías y trabajos sobre el tema pone de manifiesto el especial interés que los métodos de calibración multivariante han suscitado en las épocas más recientes. El desarrollo de instrumentos analíticos que permiten adquirir un gran conjunto de señales en periodos cortos de tiempo, así como la popularización de la utilización de ordenadores y potentes paquetes de software han permitido el gran auge de dichos métodos de calibración.

Una de las principales ventajas de la calibración multivariante es la minimización de la manipulación de las muestras. Los métodos univariantes requieren en la mayoría de los casos complejos procesos previos a la adquisición de la señal que generalmente conllevan procesos de separación, con el consiguiente consumo de tiempo, posible contaminación de las muestras y en muchos casos pérdida de sensibilidad, posibilitando en la mayoría de los casos la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja. Sin embargo, la utilización de métodos de calibración multivariante posibilita el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales de forma más directa.

Los métodos de calibración multivariante actualmente de mayor implantación en el análisis, son los siguientes:

**Aplicables a sistemas lineales:** a) Regresión lineal múltiple (**MLR**); b) Análisis multicomponente clásico (Classical Least Squares, **CLS**); c) Regresión inversa por mínimos cuadrados (Inverse Least Squares, **ILS**); d) Análisis híbrido lineal (**HLA**).

**Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales (11-13) :** a) Regresión por componentes principales (Principal Component Regression, **PCR**); b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, **PLS**). Otros de más reciente incorporación son: a) ACE ( Alternating Conditional Expectations); b) LWR ( Locally Weighted Regression); c) MARS ( Multivariante Adaptive Regression Splines); d) PPR ( Projection Pursuit Regression); e) NN ( Neural Networks) de aplicación a sistemas no lineales.

En esta Memoria se ha aplicado la calibración PLS y HLA a sistemas químicos complejos, formados por tres compuestos, rifampicina, isoniacida y piracinamida.

Los procedimientos utilizados se basan en la obtención y almacenamiento de las señales correspondientes a un grupo de muestras patrón, compuestas por mezclas de los componentes a determinar; optimización del modelo de cálculo mediante el uso de las variables apropiadas que afectan al sistema y posterior predicción de las muestras problemas de concentración desconocida.

Las señales analíticas utilizadas pueden ser de diversos tipos tales como: espectros de absorción, emisión o excitación molecular, señales voltamperométricas, señales cromatográficas, etc... e incluso señales de tipo cinético. Dichas señales se manipulan matemáticamente con el objeto de obtener la información necesaria acerca de la concentración de los componentes. Este proceso se conoce con el nombre de *calibración*.

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir y la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe elegir la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez creado el modelo (o matriz) de calibración, se pueden resolver muestras de concentración desconocida. No es necesario especificar el contenido, ni la naturaleza, de aquellas sustancias que acompañando a los componentes en estudio pudieran estar presentes como potenciales interferencias, aunque su influencia sobre las correspondientes señales analíticas quedarán implícitamente recogida en el modelo de cálculo, siendo posible por tanto la modulación de las mismas si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar.

Durante la etapa de calibración se busca en primer lugar un modelo de comportamiento entre dos grupos de variables,  $y = f(x)$ , con objeto de obtener la relación entre ellas, mediante un modelo matemático que se debe ajustar al conjunto de muestras patrón que recibe el nombre de *set de calibración*. Dicho set de calibración debe generar resultados fiables y para ello debe contener al menos tantas muestras como componentes queremos determinar y normalmente muchas más. El

hecho de emplear mezclas de componentes para la construcción del set de calibración hace que determinadas interacciones en disolución se puedan modular mediante modelo PLS y similares.

Para que un modelo de cálculo cubra las expectativas de predicción esperada sobre muestras reales, debe apoyarse sobre un adecuado set de calibración, es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender en gran manera del diseño del set de calibración. Dicho set de calibración debe estar compuesto por muestras patrón de mezclas de componentes en concentraciones tales que engloben a los posibles problemas y por otra parte, distribuidas de forma estadísticamente correcta. Se emplean diversos procedimientos de diseño experimentales con este objeto. Diseños tales como los denominados central, central compuesto, factorial etc...son ampliamente utilizados. La colinealidad es un hecho no deseable dentro de un modelo, ya que complica el sistema de cálculo sin aportar información útil. También es necesario recordar la necesidad de que la información analítica referente a posibles interferencias este recogida en el modelo, con objeto de su modulación en muestras reales, generando así un procedimiento robusto. La etapa de *predicción*, consiste en predecir el valor de las variables independientes de un conjunto de muestras (set de predicción), tras obtener las correspondientes variables dependientes.

Podemos hacer un tratamiento matemático que nos permita visualizar los diferentes métodos de calibración que actualmente tienen una aplicación más extendida. Considerando un método espectroscópico molecular tal como absorción o fluorescencia, la notación matemática utilizada es la siguiente: las matrices se expresan en mayúsculas y negrilla; los vectores en minúsculas y negrilla, y los escalares en minúscula; para la traspuesta de una matriz se emplea el exponente T, y para la inversa el -1. Así: N es el número de patrones; M es el número de analitos; P es el número de canales de medida, por ejemplo número de  $\lambda$  (potenciales en el caso de voltamperometría, tiempo en técnicas cromatográficas, etc.);  $\mathbf{A}(N,P)$  es la matriz

espectral de las disoluciones patrón, es decir los espectros de los patrones (voltamperogramas en electroquímica, cromatogramas etc.);  $C(N, M)$  es la matriz de concentraciones de los componentes en los patrones;  $c(N,1)$  es el vector de concentraciones del analito de interés en  $N$ ;  $K(M, P)$  es la matriz espectral de los componentes puros;  $P(P, M)$  es la matriz de coeficientes de calibración;  $p(P,1)$  es el vector de coeficientes de calibración.

Partimos de considerar los datos como formando parte de dos grupos diferentes:

a) Grupo de las respuestas instrumentales correspondientes a  $P$  diferentes canales de medida o longitudes de onda sobre las  $N$  soluciones patrón, que se reúnen dando lugar a la matriz de datos  $A$ , de dimensiones  $N \times P$ , en donde cada fila corresponde al espectro de cada una de las soluciones patrón.

b) Grupo formado por las concentraciones conocidas de los  $M$  componentes en las  $N$  soluciones patrón, agrupadas en una matriz  $C$ , de dimensiones  $N \times M$ , en la que las filas son las concentraciones de los diferentes componentes en el set de calibración. En la etapa de calibración se pretende llegar a conocer la relación entre  $A$  y  $C$ , para poder aplicarla al análisis de muestras desconocidas en la etapa de predicción.

### **Regresión lineal múltiple ( Multiple Linear Regression, MLR)**

Se basa en la aplicación del método de mínimos cuadrados a la relación entre la señal y la concentración. La aditividad entre las señales, por ejemplo absorbancias, es un requisito básico para su aplicación.

Si tenemos una mezcla con  $m$  componentes absorbentes que cumplen la ley de Beer, siendo su absorbancia,  $A_j$ , medida a la longitud de onda  $j$ , se puede describir la absorbancia de la mezcla como:

$$A_j = E_{j1} I C_1 + E_{j2} I C_2 + E_{j3} I C_3 + \dots + E_{jn} I C_n$$

donde  $I$  es el camino óptico, constante para todas las longitudes de onda,  $E_{ji}$  es la absorptividad molar del componente  $i$  a la longitud de onda  $j$ .

Agrupando los términos de absorptividad molar y camino óptico en las constantes  $K_{ji}$ , tenemos:

$$A_j = K_{j1} C_1 + K_{j2} C_2 + K_{j3} C_3 + \dots + K_{jn} C_n$$

Si se realiza la medida a  $p$  longitudes de onda, siendo que  $p \geq n$ , se obtienen  $p$  ecuaciones:

$$A_1 = K_{11} C_1 + K_{12} C_2 + K_{13} C_3 + \dots + K_{1n} C_n$$

.....

$$A_j = K_{j1} C_1 + K_{j2} C_2 + K_{j3} C_3 + \dots + K_{jn} C_n$$

.....

$$A_p = K_{p1} C_1 + K_{p2} C_2 + K_{p3} C_3 + \dots + K_{pn} C_n ;$$

que expresado en forma matricial:  $\mathbf{A} = \mathbf{K}\mathbf{C}$ ; donde  $\mathbf{A}$  es la matriz de absorbancias, de dimensiones  $(p \times 1)$ ,  $\mathbf{K}$  es la matriz de las constantes, de dimensiones  $(p \times n)$ , y  $\mathbf{C}$  la matriz de concentraciones, de dimensiones  $(n \times 1)$ .

Si se quiere considerar una ordenada en el origen para el ajuste, se puede aumentar la dimensión de las matrices y añadir a la matriz  $K$  una columna de unos y considerar una concentración  $C_0$  que dé una medida de la desviación respecto al cero. De esta forma, las matrices quedan:

$$A = \begin{pmatrix} A_0 \\ A_i \\ A_p \end{pmatrix} \quad K = \begin{pmatrix} 1K_{11}K_{12}K_{13}\dots K_{1n} \\ 1K_{j1}K_{j2}K_{j3}\dots K_{jn} \\ 1kp_1kp_2kp_3\dots kp_n \end{pmatrix} \quad C = (c_0c_ic_n)$$

Los valores de la matriz  $K$  se pueden calcular a partir de los espectros de los componentes puros presentes en la mezcla, de manera que, si el camino óptico es constante, cada columna de la matriz es el espectro del componente puro patrón, dividido por su concentración.

La suma de los cuadrados de los residuales (SCR) vale:

$$SCR = \sum_{i=1}^p (A_i - \hat{A}_i)^2 = \sum_{j=1}^p \left( A_i - \sum_{j=0}^n K_{ij} \hat{C}_j \right)^2$$

donde  $\hat{A}_i$  y  $\hat{C}_j$  indican, respectivamente, absorbancia y concentraciones calculadas.

Las concentraciones de los analitos presentes en la mezcla se calculan mediante Regresión por Mínimos Cuadrados que minimiza SCR. Expresando la regresión en forma matricial, las concentraciones calculadas valen:  $c = (K^T K)^{-1} K^T A$

**Método CLS** (Análisis multicomponente clásico)

Si tenemos dos componentes A y B, siendo ambas especies absorbentes, la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda determinada, y considerando las señales aditivas de acuerdo a un buen cumplimiento de la Ley de Beer vendrá dada por:

$$A_{\lambda_i} = K_{A,\lambda_i} C_A + K_{B,\lambda_i} C_B + E_{\lambda_i}$$

siendo:  $A_{\lambda_i}$ , la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda  $\lambda_i$ ;  $K_{A,\lambda_i}$  y  $K_{B,\lambda_i}$ , los coeficientes de absorptividad para los componentes A y B a  $\lambda_i$ ; y  $E_{\lambda_i}$ , el error residual entre la absorbancia correspondiente a la línea de mínimos cuadrados y la absorbancia real. La aproximación más sencilla consistiría en utilizar tantas ecuaciones como componentes, sin embargo se suelen emplear más longitudes de onda con objeto de minimizar el ruido, obteniendo un valor promedio de varias señales. Se suele emplear el espectro completo (full spectrum) o cualquier otro tipo de señal analítica total, o al menos toda aquella parte de la señal que proporcione información diferencial entre los componentes a determinar.

Como consecuencia de lo anterior, el elevado número de ecuaciones aconseja el tratamiento matricial de las mismas. Las ecuaciones empleadas se pueden expresar como:

$$A(p,n) = K(p,m) c(m,n) + E(p,n)$$

donde  $p$  es el número de canales usados;  $m$  es el número de componentes de las mezclas y  $n$  es el número de espectros del set de calibración. Por tanto, las columnas de la matriz  $\mathbf{A}$  son las señales para cada canal (por ejemplo, absorbancias a las longitudes de onda seleccionadas para cada espectro) del set de calibración, las columnas de  $\mathbf{K}$  son los coeficientes de proporcionalidad (por ejemplo, coeficientes de

absortividad) para cada uno de los componentes a cada canal (a cada longitud de onda) y las columnas de  $c$  son las concentraciones de los componentes de la mezcla para cada una de las muestras empleadas en el set de calibración.

Mediante álgebra matricial, se resuelven los sistemas de ecuaciones, obteniéndose así la matriz estimada de los coeficientes de absorptividad,  $K$ , (**Matriz K**) la cual se utilizará para la predicción. Es necesario incluir la información referente a cualquier causa de interferencia tanto química como instrumental, siendo esta la mayor limitación del método. La omisión de la concentración de cualquier componente o interferencia hará que el modelo realice una modulación incorrecta y como consecuencia las predicciones serán a su vez incorrectas. Este tipo de modelo recibe el nombre de modelos rígidos.

#### **Método ILS** ( Regresión inversa por mínimos cuadrados).

Cuando se analizan muestras reales, en muchas ocasiones no es posible conocer la composición completa de las mismas, y aunque se conozca la información referente a determinados componentes puede no tener interés, por lo cuál su inclusión en el modelo solo logra complicar el cálculo sin aportar datos analíticos relevantes. Entonces, considerando el caso de componentes absorbentes, nos podemos plantear la ley de Beer en su denominada forma invertida donde :  $C = A.P + E$ ; siendo  $C$  y  $A$  los parámetros anteriormente mencionados, mientras que  $P$  es una matriz de los coeficientes de calibración desconocidos de los  $r$  componentes de las mezclas a las  $p$  longitudes de onda utilizadas y  $E$  es una matriz de errores aleatorios de concentración o residuales que no se ajustan al modelo. La concentración es función de la absorbancia a las longitudes de onda establecidas, y como consecuencia, este modelo resulta invariante respecto al número de componentes que se incluyan. Se puede calcular la matriz de coeficientes  $P$ , incluso sin conocer las concentraciones de todos los componentes.

Este tipo de proceso de calibración, es denominado **ILS** (o de **Matriz P**). Sus limitaciones fundamentales derivan del hecho de tener que usar un número de canales igual que el número de patrones usados en el set de calibración con objeto de mantener la dimensionalidad de la matriz y por otra parte evitar la colinealidad.

### Descomposición espectral

La necesidad de obtener una representación simplificada de los datos que sea representativa de la información englobada en ellos, se puede llevar a cabo mediante un proceso denominado *descomposición espectral*, aunque de forma general dicho procedimiento pueda ser aplicado a cualquier tipo de señal, y pudieramos denominarlo descomposición voltamperométrica, descomposición cromatográfica, etc...

**Análisis por Componentes Principales (PCA).**- De entre los métodos más utilizados, quizás sea el más popular y el algoritmo de descomposición espectral, más ampliamente utilizado para llevarlo a cabo, es el algoritmo NIPALS (non linear iterative partial least-squares).

El proceso de descomposición se puede esquematizar indicando los pasos que el algoritmo matemático realiza sobre el set de calibración creado en la forma ya descrita. En primer lugar, calcula el espectro medio, con los espectros de las muestras que componen el set de calibración, a continuación lo compara con cada uno de los espectros individuales del set de calibración y crea un espectro nuevo que es la diferencia entre el espectro medio y el individual a cada longitud de onda, este espectro diferencia recibe el nombre de *vector loading*. Posteriormente, calcula la cantidad de vector loading que le corresponde a cada espectro individual en la calibración y al valor resultante se le denomina *score*. Calcula la contribución del loading a cada espectro de la calibración y la sustrae de cada espectro individual. Los

espectros obtenidos los sustituye en los datos originales, y a continuación vuelve al paso primero y repite el proceso.

Así, cualquier espectro de una mezcla se puede reconstruir a partir de un mismo número de *loadings* y se diferencian unos de otros en las cantidades de los mismos que se adicionan, es decir, en los *scores*, y en definitiva, en lugar de los datos de absorbancia, los espectros pueden representarse mediante sus respectivos *scores*.

El método PCA o Análisis de Componentes Principales ( Principle Component Analysis) (14-16) se puede matemáticamente desglosar como una descomposición de la matriz **A** de rango **m**, en una suma de matrices de rango **1** según:

$$\mathbf{A} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \mathbf{M}_3 + \dots + \mathbf{E}_A$$

de modo que cada una se pueda escribir como producto de dos vectores: un vector *score*  $\mathbf{t}_1$  y un vector *loading*  $\mathbf{p}_1$ :  $\mathbf{A} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \mathbf{t}_3\mathbf{p}_3^T + \mathbf{E}_A$  o bien en la forma equivalente:  $\mathbf{A} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E}_A$

Es decir, la matriz **A** se expresa en un nuevo sistema ortogonal de variables en el que los *scores* representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema, y los *loadings*, los cosenos directores de los nuevos ejes respecto a los anteriores. Así, se pueden relacionar con las concentraciones y con los espectros de los compuestos respectivamente.

**Método PLS o mínimos cuadrados parciales** es parecido a PCA, pero se diferencia en que mientras que este último sólo utiliza la información contenida en la matriz de señales a cada canal, el algoritmo de PLS utiliza además la información contenida en la matriz de concentraciones, contribuyendo en mayor cuantía los espectros que corresponden a mayores concentraciones. Se consigue con ello, concentrar la mayor información posible en los primeros *loadings*.

*Optimización del número de loading*

El número de loading que debemos emplear para optimizar un modelo, debe ser tal que garantice la adecuada resolución del problema con la menor complejidad matemática (menor tiempo de cálculo). Si se emplean un número inferior al óptimo se obtendría un empobrecimiento de las predicciones, y si por otra parte se incluyen demasiados, se podría estar modelando el denominado ruido del sistema, lo que conllevaría a un *sobreajuste* y la consiguiente pérdida de exactitud en los resultados.

Se emplean diversos criterios estadísticos con el objeto de evitar los inconvenientes mencionados. La utilización del denominado parámetro **PRESS** (Prediction Residual Error Sum of Squares), suele estar recomendado en la bibliografía especializada.

Podemos considerar que para cada modelo generado con un determinado número de *loadings*, el PRESS se puede expresar como:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left( \hat{C}_i - C_i \right)^2$$

siendo  $n \equiv$  número total de muestras empleadas en la calibración;  $m \equiv$  número total de compuestos,  $\hat{C}_i \equiv$  concentración calculada, y  $C_i \equiv$  concentración de referencia.

Como alternativa, en lugar del PRESS, puede utilizarse el denominado **SEP** (Standard Error of Prediction), que para un componente viene dado por la expresión:

$$\text{SEP} = [ \text{PRESS}/m ]^{1/2}$$

Experimentalmente el PRESS se obtiene mediante el siguiente procedimiento:

1.- De todos los patrones del set de calibración, se prescinde de un cierto número, generalmente solo uno, y con los restantes se realiza la descomposición espectral con un solo factor. Se calcula la matriz de calibración mediante regresión.

2.- Con dicha matriz, se determina la concentración de la muestra (o las muestras) anteriormente desechadas.

3.- Se calcula la diferencia entre la concentración predicha con dicha matriz, y la que teóricamente tiene la muestra (concentración actual), y se obtiene la raíz cuadrada de esta diferencia (residuo sin modular).

4.- A continuación deja fuera otra muestra distinta y repite el proceso. Así, sobre cada una de las muestras que constituyen el set de calibración.

5.- Como cada muestra es dejada fuera, se añade la raíz cuadrada del error residual calculado a todos los errores previos.

6.- Se repite el mismo proceso tantas veces como factores se ensayan.

El valor de PRESS nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) está determinando la concentración para cada número de factores tenidos en cuenta. Cuanto más factores se tienen en cuenta, el error de predicción disminuye. En principio el número de factores óptimo debería ser aquel que proporciona el mínimo valor de PRESS. En algunos casos se producen mínimos para volver a aumentar ligeramente después. En esta situación, se considera que el modelo comienza a añadir *vectores de ruido*.

Incluir demasiados vectores o vectores de ruido se denomina "sobreajuste". Incluso se produce sobreajuste cuando se optimiza el número de factores para el mínimo PRESS, ya que el número de factores óptimos deberá ser realmente aquel que introduce en el sistema un aumento de la capacidad predictiva estadísticamente mejor

que cuando se emplea un número inferior. Por lo tanto se debe recurrir a un tratamiento estadístico de los resultados que ponga este hecho de manifiesto.

Una propuesta de solución a este problema ha sido propuesta por Haaland y Thomas (17), de manera que los valores mínimos de PRESS se comparan con aquellos obtenidos con un número de factores menor que el que produce el mínimo de PRESS haciendo uso del parámetro estadístico F. La estadística F realmente se emplea para comparar dos series de concentraciones, las calculadas mediante la aplicación del número de factores que generan el mínimo PRESS denominado  $h^*$ , y las concentraciones calculadas usando un número inferior de factores denominado  $h$ . Según disminuyen las diferencias entre el mínimo valor de PRESS y los otros valores, también disminuye la probabilidad de que cada nuevo factor añadido sea significativo.

Todos los modelos con un número de factores  $h < h^*$  se comparan con el de referencia,  $h^*$  con ello se pretende encontrar el modelo más simple (de menor número de factores) que genere un valor de PRESS estadísticamente indistinguible del generado por el modelo que emplea  $h^*$ .

Se expresa  $F(h)$  como  $\text{PRESS}(\text{modelo con } h \text{ factores}) / \text{PRESS}(\text{modelo con } h^* \text{ factores})$ , siendo  $h = 1, 2, 3, \dots, h^*$ . Se elige como número óptimo de factores el menor  $h$  que cumple  $F(h) < F_{\alpha, rr}$ , siendo  $F_{\alpha, rr}$  el  $(1-\alpha)$  por ciento de la probabilidad F de Snedecor con  $r$  y  $r$  grados de libertad, siendo  $r$  el número de muestras del set de calibración.

Haaland y Thomas (18) determinaron empíricamente que un valor de  $(1-\alpha)$  de 0.75 es una buena elección como criterio de significación, de manera que se selecciona como óptimo el número de factores correspondientes al primer valor del PRESS cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75.

La determinación del número de factores óptimos es la etapa más importante del análisis la que requiere mayor atención. En muchos casos no es posible la asignación de la naturaleza de dichos factores, sin embargo si pueden ser atribuidos aquellos que tienen una relación directa con la concentración de los componentes e incluso aquellos debidos a interacciones entre los componentes que afectan a sus concentraciones (17, 19). También factores de tipo instrumental, tales como, deriva de la línea base, de la respuesta del detector y de la fuente a lo largo del tiempo, ya que el proceso de ajuste a cero, en muchas ocasiones, sólo se realiza al inicio del análisis. Para asignar la naturaleza de dichos factores se recurre a un profundo examen del perfil de los loading obtenidos y comparación con los espectros de los componentes puros y sus mezclas, así como, con la evaluación del valor de los scores y su relación con las concentraciones (o relaciones entre las concentraciones) de los componentes del set de calibración (análisis cluster).

El grado de ajuste entre los valores calculados y los teóricos de un modelo se expresa a través de diferentes parámetros estadísticos. Así, si consideramos  $x_i = \hat{x}_i + e_i$ , donde  $x_i$  es el valor teórico;  $\hat{x}_i$ , el calculado, y  $e_i$  error cometido en el cálculo, podemos expresar:

$$\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = \sum_i (\hat{x}_i - \bar{x})^2 + \sum_i e_i^2$$

siendo  $\bar{x}$  el valor medio de los valores teóricos.

Así pues, la suma de los cuadrados totales (SCT) es igual a la suma de los cuadrados de la regresión (SCR) más la suma de los cuadrados de los errores (SCE):

$$SCT = SCR + SCE$$

Teniendo en cuenta que:

$$SCE = \sum_i (x_i - \hat{x}_i)^2$$

Se define el coeficiente de determinación o de correlación como:

$$R^2 = \frac{SCR}{SCT} = 1 - \frac{SCE}{SCT} = 1 - \frac{\sum_i (x_i - \hat{x}_i)^2}{\sum_i (x_i - \bar{x}_i)^2}$$

Un segundo parámetro estadístico también empleado, y que se denomina desviación estándar media residual, RMSD (*Residual mean standard deviation*) que es la raíz cuadrada de las desviaciones medias,

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \hat{x}_i)^2}{n}}$$

que constituye una medida del error medio cometido en el análisis.

Hay que hacer notar que dicho RMSD es igual al SEP cuando este último se calcula para un componente individual (por ejemplo, mediante PLS-1).

Una vez optimizada la matriz de cálculo teniendo en cuenta el número óptimo de factores, se pueden predecir las muestras desconocidas.

*Selección de la región espectral*

Aunque, PLS y PCR son métodos diseñados para usar el espectro completo, sin embargo, nos podemos encontrar con circunstancias o técnicas instrumentales donde elegir la región del espectro esta sobradamente justificada. Por ejemplo, en aquellos casos donde se pueda mejorar la resolución, eliminando zonas de extremadamente alto solapamiento de las señales, zonas de ruido, zonas de no linealidad, o bien con el objeto de disminuir el tiempo de procesamiento de datos. Hay técnicas, por ejemplo IR, donde amplias zonas del espectro pueden no estar aportando información espectral útil y como consecuencia se deben eliminar. Los métodos matemáticos que posibilitan una elección razonada de la región del espectro adecuado, consisten en calcular la correlación entre la señal analítica con las concentraciones de cada componente en los espectros de la matriz de calibración y se elige las regiones que tienen valores de  $R^2$  igual o próximos a 1. En técnicas de absorción y fluorescencia molecular al ser bandas anchas poco estructuradas se suele trabajar con el espectro total.

*Detección de muestras discrepantes o outliers*

Además del número de factores, es igualmente importante la detección de muestras que, por algún tipo de errores, deban ser eliminadas en la matriz de calibración.

En un grupo de patrones de calibración pueden existir muestras que se aparten del modelo establecido y que, por consiguiente, puedan ser el origen de errores indeseables. El hecho de que el comportamiento de una muestra difiera en mayor o menor grado del conjunto puede deberse a errores en las concentraciones (muestras discrepantes en la concentración), o a errores espectrales debidos a problemas instrumentales o de manipulación (muestras espectralmente discrepantes) o a ambas causas.

Una poderosa herramienta para la detección de muestras erróneas nos la proporciona la misma manera de calcular el PRESS, dejando sucesivamente y cada vez, y con todas y cada una de las muestras, una fuera de la calibración. La diferencia entre la concentración puesta y la obtenida puede compararse y servir para detectar las muestras erróneas.

Otros métodos se basan en tratamientos matemáticos más complejos y conducen también a resultados válidos; por ejemplo, el análisis cluster o el análisis de residuos.

1.- ANÁLISIS CLUSTER: Puede emplearse el valor de *score* para detectar una muestra errónea. Si todos los valores de *scores* para las muestras de una calibración, empleando factor 1, se representan frente a los valores de *scores* obtenidos para otro factor, los valores se deben encontrar agrupados alrededor de un valor medio (grupo  $\equiv$  cluster). De hecho, se puede medir la distancia estadística entre una muestra sospechosa y el valor medio obtenido para el cluster, que se conoce con el nombre de *distancia de Mahalanobis*, que asigna una probabilidad ponderada a la muestra en términos de desviación estándar. Cualquier muestra que se encuentre a una distancia superior a  $\pm 3$  desviaciones estándar sobre el valor medio, se puede considerar sospechosa, siendo común un aumento en los valores para aquellas muestras que se encuentren en el extremo más alto ó más bajo del rango de concentraciones elegido para la calibración.

2.- ANÁLISIS DE RESIDUOS: Los residuos constituyen otro camino para identificar muestras sospechosas. Cuando una muestra se predice, el dato es el mejor ajuste obtenido con una combinación lineal de vectores *loading*. Después de ajustar el espectro queda siempre una información residual. El valor de este residuo es un indicador de cómo parte de la información puede no haber sido modelada. Si el residuo para una determinada muestra es excepcionalmente elevado comparado con el resto, resulta sospechoso.

**Método PCR** (regresión por componentes principales)

Tomando como ejemplo la técnica de absorción molecular y un set de calibración formado, al igual que en los ejemplos anteriores, por  $n$  patrones, constituidos por  $r$  componentes, podemos registrar sus espectros utilizando  $p$  longitudes de onda y como consecuencia obtener los correspondientes valores de absorbancias. Cada espectro queda representado por  $p$  variables independientes  $a_1, a_2, \dots, a_p$ . En notación matricial correspondería a un vector columna  $\mathbf{a}$  de dimensiones  $p \times 1$  y cada una de las muestras se puede describir o mediante un conjunto de variables dependientes que corresponden a las concentraciones de los componentes (variables del bloque de concentraciones,  $\mathbf{C}$ ) o mediante las variables del bloque  $\mathbf{A}$  (absorbancias a las  $p$  longitudes de onda). Si consideramos simultáneamente los  $r$  patrones, la descripción del conjunto se puede hacer agrupando los vectores en matrices y así, la matriz  $\mathbf{A}$  contendrá todos los vectores  $\mathbf{a}^T$  (sus dimensiones serán  $r \times p$ ) y  $\mathbf{c}^T$ . Las filas de la matriz están formadas o bien por las concentraciones de cada uno de los patrones o por las respectivas absorbancias, y las columnas recogen la información de una variable concreta para todas las muestras.

La primera etapa del método consiste en la descomposición mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA), de la matriz  $\mathbf{A}$  en una suma de  $a$  factores o componentes significativos del sistema:  $\mathbf{A} = \sum t_i \mathbf{P}_i^T + \mathbf{E} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$ ; donde  $\mathbf{T}$  es la matriz de *scores* de  $\mathbf{A}$ , de dimensiones  $n \times a$ ,  $\mathbf{P}$  es la matriz de *loadings* de  $\mathbf{A}$  de dimensiones  $a \times p$  y  $\mathbf{E}$  la matriz de residuales, cuando se utilizan  $a$  factores, del bloque  $\mathbf{A}$ .

La segunda etapa del método consiste en el proceso de regresión de los componentes principales. La matriz de *scores* se determina por:  $\mathbf{T} = \mathbf{A} \mathbf{X} \mathbf{P}$  y la matriz  $\mathbf{C}$  se calcula como:  $\mathbf{C} = \mathbf{T} \mathbf{X} \mathbf{B} + \mathbf{E}$ .

Los valores de la matriz **B**, denominada matriz de regresores, se calculan por mínimos cuadrados:  $\mathbf{B} = (\mathbf{T}^T \mathbf{T})^{-1} \mathbf{T}^T \mathbf{C}$ . La operación indicada con  $(\mathbf{T}^T \mathbf{T})^{-1}$  se puede realizar sin problema habida cuenta de que los *scores* son ortogonales.

La tercera etapa la constituye la predicción. Este proceso es parecido al utilizado en la etapa de predicción del modelo, considerando ahora la matriz de datos de las muestras de predicción, que designaremos como **C\***. Los pasos son los siguientes:

1.- Cálculo de los *scores* :  $\mathbf{T}^* = \mathbf{A}^* \mathbf{P}$

2.- Cálculo de la concentración de las muestras:  $\mathbf{C} = \mathbf{T}^* \mathbf{B}$

Aquí los valores de **P** y **B** son los calculados en la etapa de predicción propiamente dicha. Los valores de **C** están centrados o autoescalados y se requiere la correspondiente transformación para convertirlos en valores originales.

### Método PLS

Durante la etapa de calibración el método de regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS), utiliza no sólo la información contenida en la matriz **A**, sino también la contenida en la matriz de concentraciones (matriz **C**) de manera que, al mismo tiempo, se utilizan las columnas de **C** para estimar los *loadings* de **A** y las columnas de **A** para estimar los *loadings* de **C**.

$$\mathbf{A} = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E}_A$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}_C \mathbf{P}_C^T + \mathbf{E}_C$$

donde  $\mathbf{T}_A$  y  $\mathbf{T}_C$  son las matrices de los *scores* de la matriz de medida **A** y de la matriz de concentraciones **C**, respectivamente,  $\mathbf{P}_A$  y  $\mathbf{P}_C$  son las respectivas matrices de *loadings*, y  $\mathbf{E}_A$  y  $\mathbf{E}_C$  representan los errores de **A** y de **C** del modelo.

En un modelo simplificado, los *scores* de cada matriz se calculan por separado y si las fuentes de variación de **A** y de **C** fuesen idénticas, también lo serían las correspondientes matrices de *scores*, pero en la mayoría de los casos se encuentra que los *scores* de ambas matrices están relacionados por la llamada relación interna (**r**):  $t_C = r t_A + e$ .

Esto indica que los *scores*  $t_A$  no son los óptimos para estimar **A** al haber sufrido cierta rotación para describir simultáneamente la matriz **C**.

La descomposición y regresión se puede realizar de forma conjunta para todos los componentes, optimizándose lo que se podría considerar como un valor medio del número de factores, mediante la aplicación de la modalidad **PLS2**. Sin embargo, en el caso de que la optimización y descomposición se haga para cada componente individualmente el método se designa **PLS1**. Teniendo en cuenta la rapidez de cálculo actual mediante los ordenadores habituales la aplicación de **PLS2** no tiene grandes ventajas frente a la aplicación de **PLS1**. Por otra parte, hay que tener en cuenta que cuando el número de factores optimizado para los distintos componentes es el mismo, ambos tratamientos son idénticos y arrojan los mismos resultados. **PLS2** se puede considerar como un algoritmo global cuya aplicación más interesante puede ser el reconocimiento de modelos, mientras **PLS1** resulta más adecuado para análisis cuantitativo.

Los algoritmos correspondientes a los métodos PCR y PLS (20-31) pueden modificarse para conseguir que ambos métodos, que asumen un modelo lineal, puedan aplicarse al análisis multivariante no lineal (32).

### Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR y PLS

Se pueden establecer las siguientes conclusiones en cuanto a los métodos multivariantes más comunes citados en esta Introducción.

1.- CLS, PCR y PLS pueden utilizar la información espectral completa y presentan una elevada precisión. Sin embargo, ILS precisa de una selección previa de las longitudes de onda y necesita un gran número de muestras patrón.

2.- CLS necesita toda la información referente a las muestras, causas de interferencias e incluso variables instrumentales. ILS, PCR y PLS no necesitan de un modelo químico explícito de la matriz de respuesta, y permiten la evaluación de las concentraciones de los componentes de interés aún en presencia de otras causas de variación no explicitadas en el modelo.

3.- Así, PCR y PLS, son modelos que no sólo gozan de las ventajas de CLS al ser métodos de espectro completo, sino también de las de ILS en cuanto son capaces de desarrollar el análisis para un componente cada vez, evitando los problemas de la selección de un número limitado de longitudes de onda.

4.- PLS y PCR son aplicables en algunos casos donde se producen interacciones de tipo químico entre los componentes analizados, son capaces de modelar comportamientos no estrictamente lineales.

## HLA (Hybrid Linear Analysis) como un nuevo algoritmo en análisis multivariante

Como ya hemos comentado, un objetivo común en Química Analítica es calcular la concentración de especies presentes de interés en muestras complejas formadas por diversos componentes. Generalmente estos componentes dificultan y a veces impiden la determinación utilizando métodos univariantes. La utilización de los métodos multivariantes, como los indicados en esta Introducción, en muchos casos permiten realizar el análisis de interés modulando las interferencias de los otros componentes presentes, pero a veces no. Los resultados obtenidos dependen del algoritmo utilizado, y la elección de este algoritmo, depende de muchos factores, tales como, el número de medidas que pueden llevarse a cabo y de la naturaleza de dichas medidas.

Recientemente, se dispone de un nuevo algoritmo denominado "Análisis Lineal Híbrido (HLA)" que aporta diferencias sustanciales en cuanto al tratamiento de las señales globales proporcionadas por una muestra compleja. Este método combina las ventajas de los ya discutidos métodos que utilizan el espectro del componente puro, tal como CLS, con las ventajas de los modelos que ignoran todas las especies presentes sin interés para el análisis. De ahí el nombre de "híbrido". Dicho método, trata de sacar de toda la señal aquella parte que aporta información concreta con respecto al componente de interés diferenciándolo del resto.

Se trata de un método basado en análisis factorial, que elimina la necesidad de elegir un número de factores óptimo durante la calibración. Este método está basado en el concepto de señal del analito neto (net analyte signal, NAS) descrito por Lorber y col (33).

### Concepto de señal de analito neto (NAS)

Se considera la señal del analito neto, la parte de su espectro ortogonal al subespacio formado por los espectros de los demás componentes, y solamente el NAS de un componente conlleva la información necesaria para su cuantificación. El subespacio obtenido de esta manera contiene la información espectral que no esta relacionada con el componente de interés. La parte ortogonal del espectro del componente se calcula como su proyección ortogonal (33). El NAS del componente en cada muestra esta relacionado con la concentración a través de un modelo de calibración basado en mínimos cuadrados. En el trabajo de Xu y col. (34) se destaca el hecho de que se puede llevar a cabo un modelo de calibración adecuado para un determinado componente, sin necesidad de elegir un número de factores óptimo. Esta característica abriría un campo amplio en cuanto a la posibilidad de automatizar los procedimientos.

**Fundamento teórico.-** Empleamos la siguiente notación para realizar la discusión teórica del algoritmo. Las letras mayúsculas en negrilla se emplean para definir las matrices, las minúsculas para las columnas del vector, y las normales en itálica para los escalares. El superíndice T indica la traspuesta del vector o matriz y el superíndice + la pseudoinversa de una matriz no cuadrada de un sistema sobreajustado. El espectro digitalizado se considera como un "vector espectral o simplemente como un vector", mientras que el vector espectral de un componente puro se denomina "vector componente". El número de componentes de una mezcla se denomina  $n$ ; el tamaño del set de calibración, es decir el número de muestras de calibración diseñado es  $I$  y la dimensión del vector espectral, es decir el número de elementos del vector espectral se denomina  $J$ .

En regresión de componentes principales, la predicción de la concentración de  $k$  componentes en una mezcla desconocida se puede llevar a cabo mediante la ecuación:

$$C_{\text{desconocida}} = \mathbf{d}_{\text{desconocido}}^T \mathbf{D}^+ \mathbf{c}$$

donde  $\mathbf{d}_{\text{desconocido}}$  es el vector de respuesta de la muestra desconocida, la matriz  $\mathbf{D}^+$  es la pseudoinversa de la matriz de calibración  $\mathbf{D}$  ( $I \times J$ ), y  $\mathbf{c}$  es el vector de la concentración del componente  $k$  en el set de calibración (35,36). De acuerdo con PCR, el término  $\mathbf{D}^+ \mathbf{c}$  de la ecuación anterior es normalmente conocido como el "vector de regresión" y nombrado por  $\mathbf{b}_k$  para el componente  $k$ .

$$\mathbf{b}_k = \mathbf{D}^+ \mathbf{c}$$

La señal del analito neto de un componente  $k$ ,  $\mathbf{r}_{\text{NAS}}$  se puede determinar como la proyección ortogonal siguiente :

$$\mathbf{r}_k^* = [\mathbf{I} - (\mathbf{R}_{-k})^+(\mathbf{R}_{-k})] \mathbf{r} = \mathbf{P} \mathbf{r} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector componente de un componente  $k$  de concentración unidad;  $\mathbf{I}$  es una matriz unitaria  $J \times J$ ;  $\mathbf{R}_{-k}$  es una matriz,  $J \times A$ , que contiene las sensibilidades para todos los componentes excepto la del componente  $k$ , siendo  $A$  el número de factores usados para construir el modelo,  $\mathbf{P}$  es la matriz de proyección  $J \times J$  la cuál proyecta un vector dado en el espacio NAS. El NAS del componente  $k$  se puede usar para predecir la concentración de muestras desconocidas.

Muy recientemente, el cálculo de  $\mathbf{R}_{-k}$  se ha definido por la siguiente expresión:

$$\mathbf{R}_{-k} = \hat{\mathbf{R}} - \alpha \hat{\mathbf{c}}_k \hat{\mathbf{r}}^T \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $\hat{\mathbf{R}}$  es la matriz de respuesta reconstruida usando el primer factor de  $\mathbf{R}$ ,  $\hat{\mathbf{c}}$  es la proyección del vector concentración de la calibración en el espacio de dimensión  $A$ ,

$\hat{r}$  es una combinación lineal de las líneas de  $\hat{R}$  que contienen una contribución del espectro del componente  $k$ , y  $\alpha$ , es un escalar definido como:

$$\alpha = 1 / \hat{r}^T \hat{R} \hat{c}_k \quad \text{Ecuación 3}$$

el cual puede ser entendido como la inversa de la concentración estimada para  $k$  en  $\hat{r}$ . Un espectro  $\hat{r}$ , se puede usar para calcular  $R_{-k}$  usando las ecuaciones 2 y 3 y no necesariamente el espectro puro  $s_k$ . Sin embargo, es admisible usar un espectro que contenga la máxima información en cuanto a los analitos de interés. Una buena elección es utilizar un espectro medio de los de la calibración, donde ninguno sea 0 de concentración. Por otra parte, en el algoritmo HLA la contribución del analito puro  $k$  se elimina de la matriz de respuesta antes del cálculo de los factores. Este hecho genera que se trabaje con un número menor de factores que PCR o PLS. (34, 37).

El método HLA necesita construir una matriz de datos  $R_{-k} = [R - c_k s_k^T]$  y usando el primer factor de  $(R_{-k}^T R_{-k})$  definir la matriz de proyección  $P$ . La concentración del componente  $k$  en una muestra desconocida se obtiene a partir de su espectro  $r$  como:

$$c_k = \frac{s_k^T P r}{s_k^T P s_k} = \frac{s_k^T P P r}{s_k^T P P s_k} = \frac{(s_k^*)^T r_k^*}{\|s_k^*\|^2}$$

La ecuación anterior es la base de la capacidad de predicción de los métodos basados en NAS.

Recientemente, Xu y Schechter han descrito un procedimiento similar al HLA (34) el cual no necesita el conocimiento del espectro del componente puro  $s_k$ . Para obtener la matriz  $R_{-k}$ , se obtiene el espectro medio de la matriz de calibración :

$$\bar{r} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I r_{i,cal}$$

donde  $r_{i,cal}$  es el espectro para una muestra  $i$  de la calibración. Entonces, la contribución del analito  $k$  es sustraída de la matriz de datos  $R$  de la siguiente manera:

$$R_{-k} = R - \frac{c_k \bar{r}_{cal}^T}{\bar{c}_{k,cal}}$$

donde  $\bar{c}_{k,cal}$  es la media de las concentraciones de calibración del analito  $k$ . La aproximación por mínimos cuadrados a  $s_k$  es a continuación aplicada para calcular  $s_k^*$ :

$$s_k^* = P s_{k,MC} = P \frac{R^T c_k}{c_k^T c_k} \quad \text{Ecuación 4}$$

Xu y Schechter sugieren usar todos los  $I$  factores de  $R_{-k}$  para la predicción, para construir un método libre de la necesidad de optimizar el número de factores. Later, Goicoechea y Olivieri (38) proponen el denominado HLA/XS donde si realizan una selección del número óptimo de factores mediante una validación cruzada (cross-validation). Este procedimiento trabaja de una forma similar a HLA, siendo una variante del original, y puede ser usado cuando el número de muestras excede el límite recomendado de una tercera parte del número de sensores.

Hay que destacar cuando pequeñas no linealidades tienen lugar en el set de calibración, solamente la parte lineal será utilizada para generar la  $R_{-k}$ . Un número de factores extra serán necesarios para poder realizar esta transformación. Aunque realmente no hay datos que lo apoyen, la capacidad para modular no linealidades se espera que sea similar a la mostrada por PLS (18).

### Selectividad, sensibilidad y límites de detección

La determinación de los parámetros de calidad de un método multivariante han sido una de las lagunas más importantes a la hora de la aplicación y comparación de los resultados obtenidos entre varias técnicas. En la literatura existen varios intentos para determinarlos en análisis multivariante, la denominación de figuras de mérito se ha impuesto en la bibliografía actual para denominar estos parámetros de calidad. (39,40). Existe un método basado en NAS de forma similar a la propuesta por Boqué y Rius para CLS y que fue extendido posteriormente a regresión inversa por Lorber (41). Se define un límite de decisión con respecto a la señal como:

$LOD = \Delta(\alpha, \beta) \bar{\sigma}_r$ , donde  $\Delta(\alpha, \beta)$  es el parámetro no centralizado de una distribución t no-central, el cual puede ser calculado numéricamente (39,40) o tomado de tablas (42) y  $\bar{\sigma}_r$  es una estimación de la desviación estándar de las medidas.

El cálculo del NAS también permite estimar otras figuras de mérito tales como la selectividad y la sensibilidad.

La selectividad (40) se puede expresar como 
$$SEL = \frac{\|s_k^*\|}{\|s_k\|},$$
 donde  $\|s_k^*\|$

es la norma del espectro del componente puro y  $\|s_k\|$  la norma del espectro total de la muestra. La sensibilidad (40) se puede calcular como 
$$SEN = \frac{1}{\|b\|}$$
 siendo  $\mathbf{b}$  el vector del coeficiente de regresión que se puede calcular mediante los métodos multivariante.

Quizás el término más controvertido en análisis multivariante sea el límite de detección. Se puede definir como  $LOD = 3 \|e\| \|b\|$ , donde  $\|e\|$  es una medida del ruido instrumental y  $\mathbf{b}$  es la norma del vector coeficiente de regresión. Existe una amplia polémica en cuanto a la aplicación de esta ecuación, ya que la cantidad de analito que puede ser detectada depende de las concentraciones presentes de cada interferente (40). En principio una posibilidad es calcular el valor de  $\|e\|$  mediante el registro de varios espectros de las muestras usadas como blanco, calcular la norma del NAS para cada una de ellas y la correspondiente desviación estándar.

Como una alternativa para obviar la influencia de la presencia de otras especies interferentes en la señal del blanco se puede construir un set de predicción del blanco, de manera que, siendo blanco en el componente de interés, contenga a las otras especies presentes en un intervalo de concentraciones similares a las incluidas en la matriz, de esta manera la predicción del cero y su correspondiente desviación estándar, englobaría a todas las posibles muestras problemas (43).

La sensibilidad analítica,  $\gamma$  se considera como un parámetro más útil a la hora de comparar resultados. Aquí se define de forma similar a la realizada en análisis univariante como:  $\gamma = \text{SEN} / \delta_r$ , donde  $\delta_r$  es una estimación de la desviación estándar de la medida. El valor de  $\delta_r$  se calcula como el vector NAS obtenido a partir de numerosos blancos para la muestra en estudio, o como ya hemos indicado antes blancos para el componente de interés.

### Antecedentes bibliográficos

El trabajo pionero, introducido en el campo de la Química, fue realizado por Herman Wold. Desarrolló el algoritmo NIPALS (*non-linear iterative partial least squares*) que fue publicado en 1966 (44). Este algoritmo es usado hoy día en PCA y PCR y puede considerarse como un predecesor de PLS.

PLS ha sido muy aplicado en química desde los años ochenta, especialmente en química orgánica y analítica (45). En 1982, Martens y Jensen (46) estudian las ventajas de la regresión por PLS en espectroscopía usando el espectro completo e introducen, a la vez, dos algoritmos que crean las bases para el posterior uso de la regresión por PLS en análisis químico. Este, puede señalarse como el principio de una intensa actividad creciente de la aplicación de la regresión de PLS en química.

Se han realizado otros trabajos para generar algoritmos de PLS más eficientes que el original (47-56), pero es a partir de la década de los 80 cuando aparecen el mayor número de trabajos que aplican calibración multivariante a diversas técnicas (espectrofotometría, cromatografía, espectroscopía de infrarrojo, FIA y polarografía).

Jones, Orchard y Hall (53) utilizan dos métodos de calibración multivariante, PLS1 y PLS2, en combinación con la espectrofotometría derivada, para el análisis multicomponente de tabletas que contienen clorhidrato de pseudoefedrina, clorhidrato de tripolidina y bromohidrato de dextrometorfan.

Tauler y col. (26) comparan la capacidad predictiva de cuatro métodos de calibración multivariante (CLS, ILS, PCR y PLS) en el análisis espectrofotométrico de mezclas de bases púricas y pirimidínicas no encontrando diferencias entre los cuatro métodos estudiados.

Existen otros trabajos acerca de esto (54-55) pero si hacemos referencia a los realizados en nuestro departamento nos encontramos con:

Espinosa Mansilla y col (56) realizan un estudio comparativo entre los resultados obtenidos en la determinación simultánea, previa derivatización con ácido tiobarbitúrico, de 2-furfuraldehído, 5-hidroximetilfurfuraldehído y malonaldehído, mediante técnicas de derivadas y PLS, obteniéndose resultados significativamente mejores mediante el uso de mínimos cuadrados parciales.

Los mismos autores (57) llevan a cabo la determinación simultánea de malonaldehído, 2-furfuraldehído y 5-hidroximetilfurfuraldehído, en presencia de glioxal y biliverdina, mediante PLS-1 y PLS-2.

Durán-Merás y col (58) aplican tres métodos de calibración multivariante, PLS1, PLS2 y PCR, a la determinación simultánea de mezclas de tres saborizantes.

Espinosa Mansilla y col. (59) aplican PLS2 y derivadas a la determinación de los pesticidas clorpirifos y carbaril en una formulación comercial.

Otros trabajos recientemente publicados, utilizando técnicas de calibración multivariante, desarrollados por nuestro grupo de investigación, se refieren al análisis de mezclas de clorpirifos y carbaril en sus formulaciones (60,61), mezclas de hierro, vanadio y molibdeno, previa complejación con un ácido hidroxámico cíclico (62-63), mezclas de hierro y manganeso, previa complejación con el ácido 3-indolacetohidroxámico (64), nitrofurantoína, furazolidona y furaltadona (65, 66) y de sulfadiacina, sulfameracina y sulfametacina (67) mediante detección electroquímica, mezclas de sulfadiacina, furaltadona, doxiciclina y trimetoprim (68), mezclas cuaternarias de sulfamidas (69), mezclas de 2-furfuraldehído y 5-hidroximetilfurfuraldehído (70), mezclas de antioxidantes sintéticos (71), carbaril, carbofurano y phenamifos (72, 73) y del pesticida naptalam y sus metabolitos (74). También recientemente y mediante la utilización de espectrofotometría y PLS se propone la determinación simultánea de los marcadores cancerígenos denominados pteridinas (75). Es de destacar los trabajos relacionados con la aplicación de técnicas fluorescentes en conjunción con análisis multivariante, así se propone la determinación simultánea de ácido salicílico, salicilúrico y gentísico por PLS usando las matrices de excitación- emisión (76), de acetilsalicílico y sus metabolitos en orina (77), la determinación simultánea de ácido salicílico y diflunisal en suero humano (78), de los ácidos nalidíxico y 7-hidroxináldíxico (79), nafticilina y meticilina (80) y de diversas pteridinas utilizando PLS tanto a señales fluorescentes convencionales como a señales sincrónica (81). Por último comentar que la técnica PLS ha sido propuesta para la resolución de picos solapados en HPLC (82).

En cuanto a las aplicaciones del algoritmo HLA al análisis, hemos de destacar que actualmente los trabajos realizados son muy escasos dado lo novedoso del mismo. La mayoría de las citas relacionadas han sido ya recogidas en la discusión teórica de

dicho procedimiento ya que se refieren fundamentalmente a tratamiento matemático y descripción de los diversos parámetros del citado algoritmo. Desde el punto de vista de la aplicación analítica cabe destacar los trabajos publicados por Olivieri y col referidos al análisis de tetraciclinas en suero (38) y del análisis de fenazon, cloranfenicol, ácido benzoico, fenilefrina y tiomersal, en soluciones oftalmológicas (83) en ambos trabajos, se llevan a cabo la optimización mediante HLA, con aportación de cuantiosa y calificada información teórica y comparación con PLS. También queremos destacar el publicado por estos mismos autores (84) donde utiliza el compuesto denominado bromhexina para llevar a cabo un estudio de optimización de la selección de longitudes de onda mediante la utilización del mínimo error indicador (EI). Recientemente, Espinosa Mansilla y col han resuelto mezclas binarias de derivados de pteridinas (xantopterín-isoxantopterín y xantopterín-biopterín) mediante aplicación de PLS-1 y HLA/XS, utilizando detección fluorimétrica (85). Los resultados obtenidos se estudian comparativamente sobre muestras reales y simuladas por aplicación de HLA y PLS.

Como conclusión podemos decir que dentro de los que podíamos ya denominar métodos multivariantes clásico, el método de regresión dominante en los últimos años, es la regresión por PLS, debido probablemente a su robusticidad, simplicidad de uso y a que se trata de una herramienta de diagnóstico bien desarrollada. Actualmente la investigación en análisis multivariante va encaminada a la aplicación de métodos de análisis para sistemas no lineales, o sistemas lineales en los cuáles se generen interacciones de diversa naturaleza entre los componentes de las mezclas. Se emplean dos herramientas básicas, optimización de modelos PLS, HLA, así como diseño y aplicación de redes neuronales.

## PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo hemos abordado la determinación simultánea de tres principios activos con actividad antituberculosa, concretamente aquellos que responden a las denominaciones comunes de: rifampicina (Rif), isoniacida (Iso) y piracinamida (Pir), los cuáles se administran de forma conjunta en formulaciones farmacéuticas, con el objeto de incrementar la actividad del mismo y por otra parte, disminuir el riesgo de fomentar el crecimiento de cepas resistentes a un determinado principio activo. Dichos compuestos presentan las estructuras indicadas en el capítulo 1.

En la parte experimental de este capítulo, se exponen los resultados obtenidos en la optimización de los modelos de cálculo basado en la aplicación de los algoritmos de mínimos cuadrados parciales (PLS) y lineal híbrido (HLA), así como el análisis de las variables que le afectan.

Los modelos optimizados se aplican a la determinación simultánea de los tres principios activos en diversas formulaciones comerciales. Como paso previo se han estudiado algunas características de interés analítico de dichos compuestos.

## Estudio de las características fotométricas de interés analítico de rifampicina, isoniacida y piracinamida.

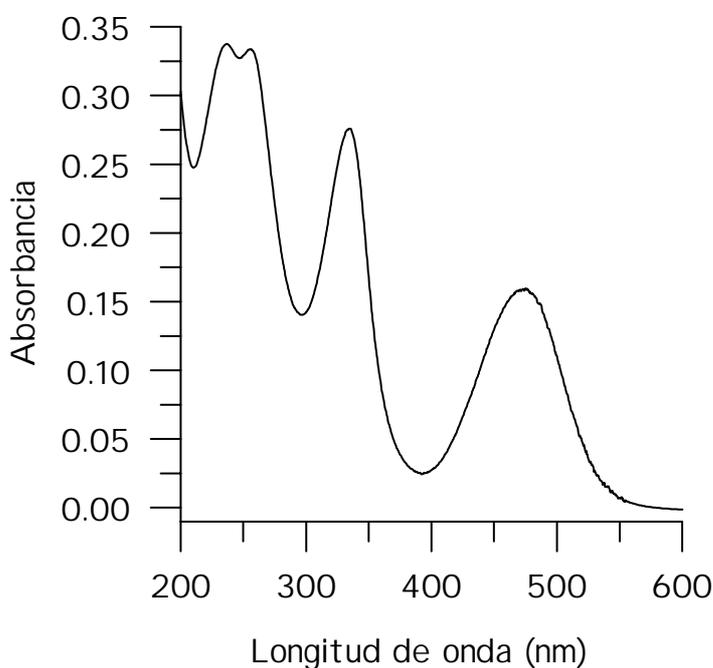
### Estudio de las disoluciones acuosas de rifampicina.

#### Estabilidad en agua.

Se estudia la estabilidad de las disoluciones acuosas de rifampicina mediante el seguimiento de los espectros de absorción molecular. Para ello se prepara una disolución madre de rifampicina de 100 ppm, ( $1.29 \cdot 10^{-4}$  M), y a partir de esta, por dilución en agua desionizada, se prepara una de 10 ppm. Se registran los espectros UV-Visible de dicha disolución, recién preparada, cada cinco minutos durante un periodo de 60 minutos.

Se puede observar que las disoluciones diluidas de rifampicina, en medio acuoso, son totalmente estables al menos durante una hora. Por otra parte, y a partir de la disolución madre indicada, se preparan diariamente muestras de 10 ppm en medio acuoso, y se registran sus espectros de absorción. Durante al menos, un periodo de 4 días. La disolución madre de rifampicina es también estable.

En la **figura 3.1** aparece representado el espectro de absorción de las disoluciones de rifampicina. Dicho espectro presenta cuatro máximos de absorción localizados a 237, 256, 335 y 475 nm.

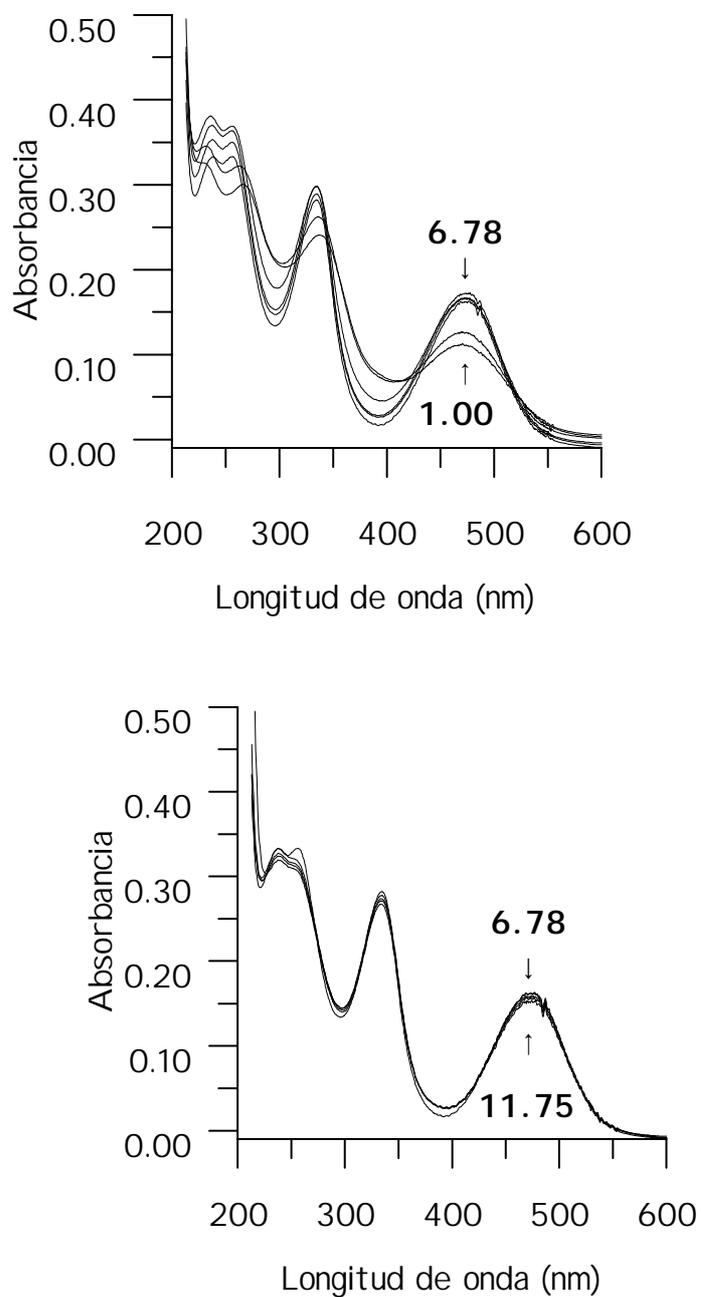


*Figura 3.1. - Espectro de absorción de una disolución acuosa de rifampicina (10 ppm; pH = 5.75] recién preparada y a los 60 minutos.*

### **Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de rifampicina.**

Se preparan muestras conteniendo una concentración de rifampicina 10 ppm, KCl 0.1 M y cantidades variables de HCl y NaOH de diferentes concentraciones, con objeto de variar el pH entre 0.5 y 12 aproximadamente. Se registran los espectros de absorción para las diferentes muestras, frente a sus correspondientes blancos, inmediatamente después de preparadas y a temperatura ambiente.

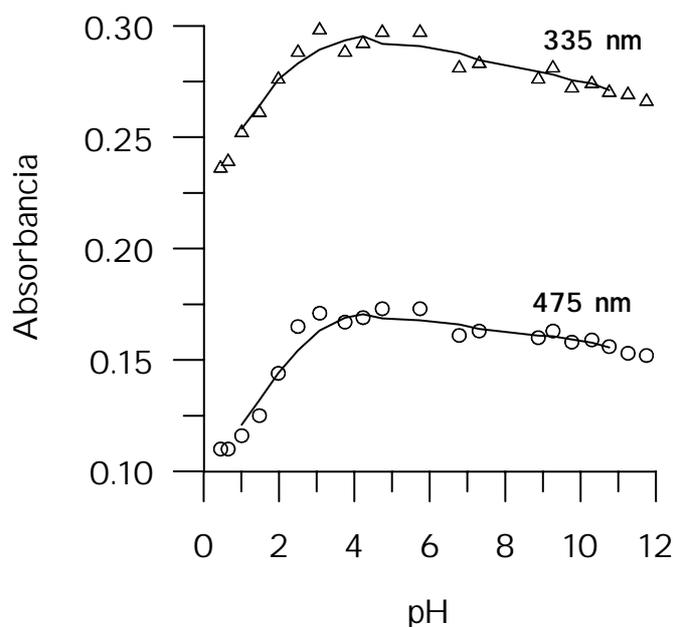
En la **figura 3.2** se han representado los espectros de absorción obtenidos a los diferentes valores de pH ensayados.



*Figura 3.2.* - Espectros de absorción de disoluciones de  $1.29 \times 10^{-5}$  M de rifampicina para diferentes valores de acidez: a) pH comprendido entre 1.00 y 6.78; b) pH comprendido entre 6.78 y 11.75.

Entre pH 1 y 3 se observa un efecto hipercrómico tanto a 338 como a 475 nm, así como un desplazamiento hipsocrómico a 338 nm, situándose el máximo a 335 nm para  $\text{pH} > 3$ , observándose isobésticos a 425 y 520 nm. Para pH comprendidos entre 3 y 10 observamos un ligero efecto hipocrómico a ambas longitudes de onda, permaneciendo constante la absorbancia a partir de  $\text{pH} = 10$ .

Cuando se representan las variaciones de absorbancia con el pH, a las longitudes de onda de 335 nm y 475 nm correspondientes a los máximos de absorción se obtiene la **figura 3.3**.



**Figura 3.3.** - Variación de la absorbancia con el pH a 335 y 475 nm.

Como podemos apreciar en la gráfica, a pH ácidos es probable la existencia de un pK, de valor próximo a 2. Para comprobar que la reacción corresponde a un equilibrio ácido-base, se acidifica por adición de HCl, una muestra que inicialmente tiene un  $\text{pH} = 11.75$ , hasta conseguir un  $\text{pH} = 1$ , se registra el espectro, y a

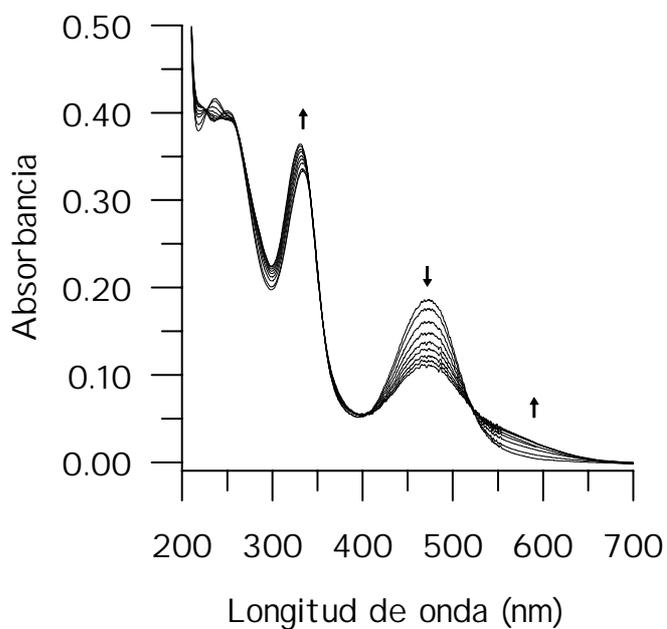
continuación, se vuelve el pH hasta el valor inicial por adición de NaOH, se registra de nuevo el espectro y se compara con el inicialmente registrado, se comprueba que ambos son iguales, luego se reproducen las especies en disolución y como consecuencia podemos considerar la pérdida de absorbancia en medio ácido debida a un equilibrio reversible. Se calcula el valor del pK mediante el cálculo de la primera y segunda derivada, siendo este de 2.05.

### Estabilidad en medio básico

En estudios preliminares se observó que las disoluciones amoniacaes de rifampicina cambian de coloración con el tiempo, inicialmente presentan coloración amarilla que se transforma en rojiza. Por ello, se ha estudiado la influencia de la acidez del medio en la estabilidad de las disoluciones acuosas de rifampicina.

Se preparó una disolución de 10 ppm de rifampicina en medio básico, ( pH= 11.75), fijado por adición de NaOH 2 M, que contenía KCl 0.1 M. A continuación se registraron espectros de absorción cada 3 minutos durante un periodo de 60 minutos. No se observó cambio apreciable en la forma de los espectros por lo que podemos afirmar que las disoluciones diluidas de rifampicina en medio básico, fijado con NaOH, son estables al menos durante una hora.

Sin embargo, cuando se prepara una disolución de forma similar a la anterior pero fijando el pH por adición de tampón amónico/cloruro amónico (pH= 10.18), se observa una evolución paulatina con el tiempo del espectro de la rifampicina. En la **figura 3.4** se muestra dicha evolución. Los máximos de absorción inicialmente situados a 335 y 475 nm, sufren un efecto hipercrómico e hipocrómico respectivamente, mientras que se observa un efecto hipercrómico a 575 nm, no llegando a marcar máximo, responsable del color rojizo de las disoluciones.



**Figura 3.4.** - Evolución con el tiempo de los espectros de absorción de rifampicina en medio amoniacal ( $pH = 10.18$  ; tampón amoniaco/cloruro amónico)

También se ha estudiado la influencia de la presencia de agua oxigenada en ambos medios básicos, observándose una decoloración rápida de las disoluciones de rifampicina, deduciendo de ello la destrucción del grupo cromóforo en presencia de este agente oxidante.

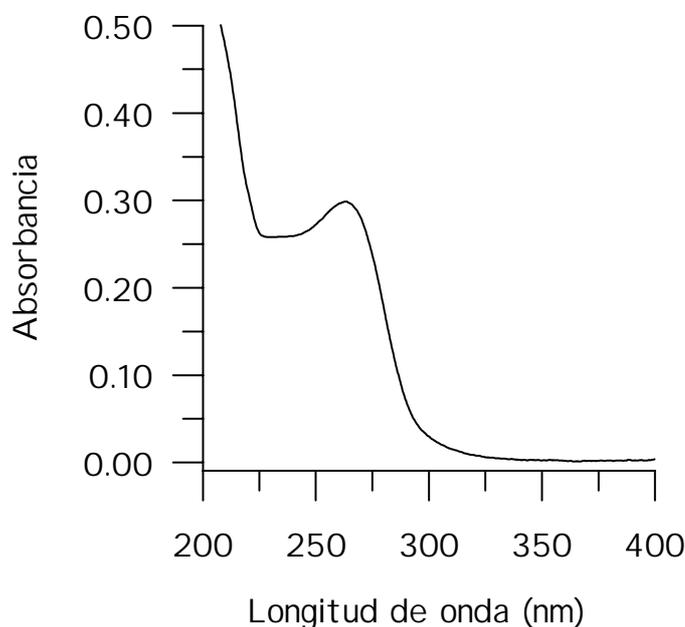
### Estudio de las disoluciones acuosas de isoniacida.

Siguiendo una sistemática similar a la descrita anteriormente se estudian las disoluciones de isoniacida.

#### Estabilidad en agua

Para los estudios iniciales se prepara una disolución madre de isoniacida de 100 ppm ( $7.29 \times 10^{-4}$  M). A partir de esta y por dilución en agua desionizada, una de 10 ppm ( $7.29 \times 10^{-5}$  M). Se registran los espectros UV-Visible de dicha disolución, recién preparada, cada cinco minutos, durante un periodo de 60 minutos.

En la **figura 3.5** se muestra el espectro de absorción. Dicho espectro presenta un máximo de absorción situado a 263 nm.

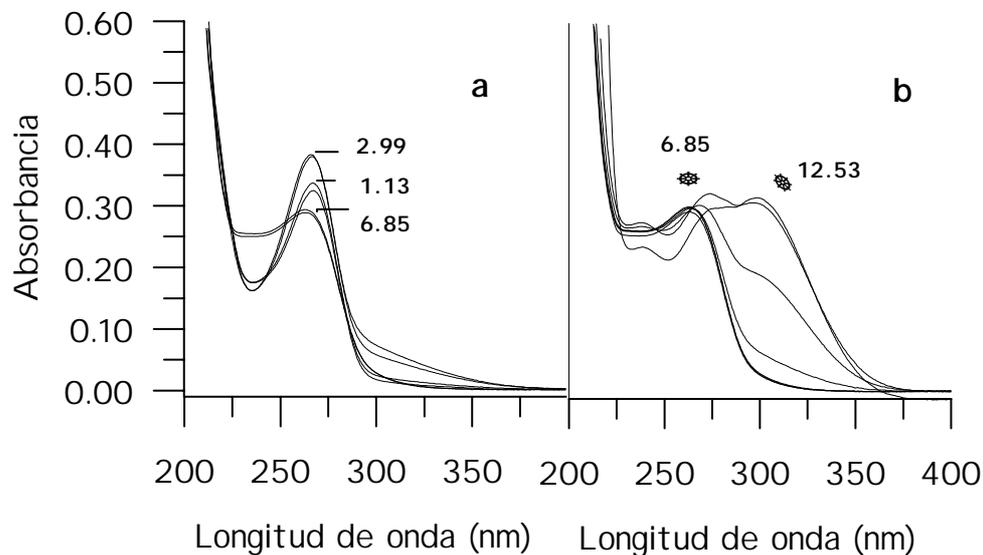


*Figura 3.5. -Espectro de absorción de una disolución acuosa de isoniacida de 10 ppm, pH = 5.91; recién preparada y a los 60 minutos.*

Se puede observar que las disoluciones diluidas de isoniacida, en medio acuoso, son totalmente estables durante al menos una hora. Por otra parte, y a partir de la disolución madre, se prepararon diariamente muestras de 10 ppm en medio acuoso, y se registraron los espectros de absorción. Se deduce de los resultados obtenidos que las disolución concentradas de isoniacida son también estables durante al menos cuatro días.

### Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de isoniacida

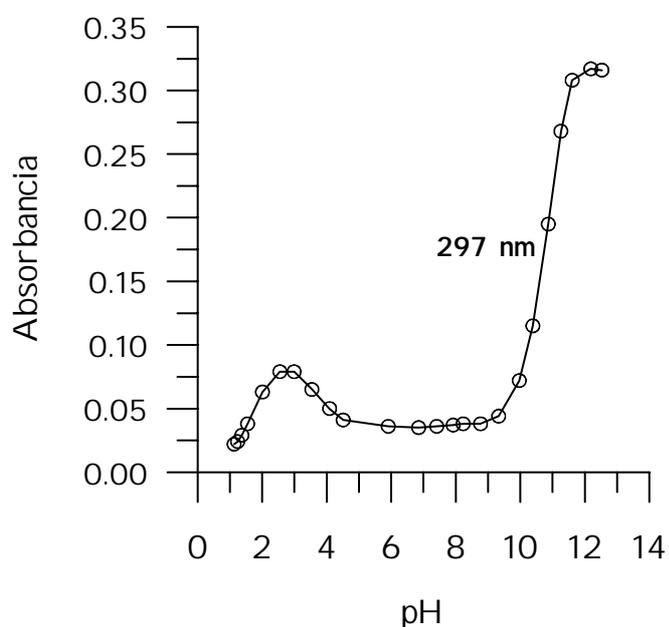
Se preparan muestras de concentración 10 ppm en isoniacida, 0.1 M en KCl y cantidades variables de HCl y NaOH de diferentes concentraciones con objeto de variar el pH entre 1 y 12, aproximadamente. Se registran los espectros de absorción para las diferentes muestras, frente a blancos adecuados, inmediatamente después de preparadas y a temperatura ambiente. En la **figura 3. 6** aparecen representados los espectros de absorción a diferentes valores de pH.



**Figura 3.6 . -** Espectros de absorción de disoluciones acuosas de isoniacida para diferentes valores de acidez : a) intervalo de pH entre 1.13 y 6.85; b) intervalo de pH entre 6.85 y 12.53.

Entre pH 1-3 se observa un efecto hipercrómico a 267 nm, que partir de pH =3, se invierte observándose un efecto hipocrómico a esa misma longitud de onda, y acompañado de un desplazamiento batocrómico situándose el máximo a 274 nm. Para pH comprendidos entre 2 y 12, observamos un efecto hipercrómico a longitudes de onda superiores a 300 nm, con la aparición de un nuevo máximo a 297 nm.

Cuando se representan los valores de absorbancias a 297 nm en función del pH se obtiene la representación de la **figura 3. 7**.



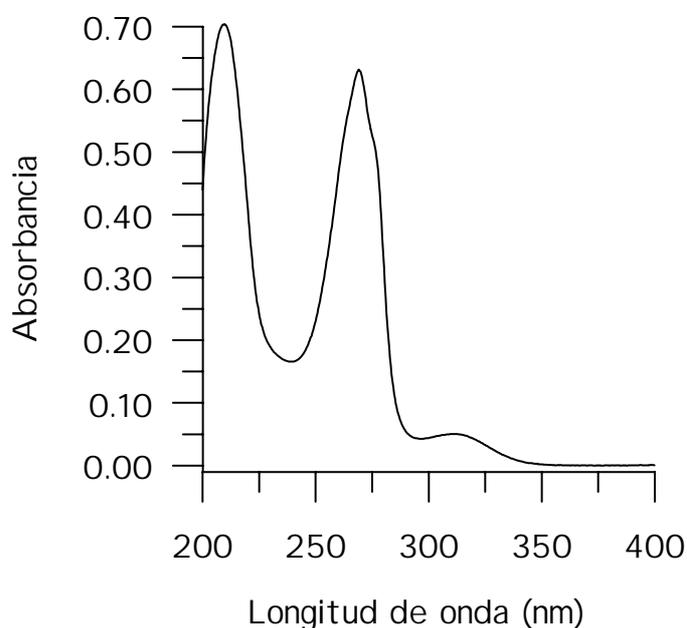
**Figura 3. 7.** - Variación de la absorbancia a 297 nm con el valor de pH en la disolución de isoniácida.

Parece probable la existencia de al menos tres equilibrios ácido- base, presentando un primer pK de valor próximo a 2, un segundo pK próximo a 3.5, y un tercer pK en la zona básica de valor próximo a 11. Se comprueba la reversibilidad de los procesos.

## Estudio de las disoluciones acuosas de piracinamida

### Estabilidad en agua

Se prepara una disolución madre de piracinamida de 100 ppm ( $8.12 \cdot 10^{-4}$ ), a partir de esta y por dilución en agua desionizada, una de 10 ppm ( $8.12 \cdot 10^{-5}$  M). Se registran los espectro UV-Visible de dicha disolución, recién preparada y cada cinco minutos, durante un periodo de 60 minutos. Se puede constatar que las disoluciones diluidas de piracinamida, en medio acuoso, son totalmente estables durante al menos una hora. Por otra parte, y a partir de la disolución madre indicada, se preparan diariamente muestras de 10 ppm en medio acuoso, y se registran los espectros de absorción. Durante, al menos un periodo de 4 días, la disolución concentrada de piracinamida es también estable. En la **figura 3.8** aparece representado el espectro de absorción. Dicho espectro presenta un máximo a 269 nm y otro a 314 nm.



**Figura 3.8.** - Espectro de absorción de una disolución acuosa de piracinamida (10 ppm; pH = 5.53) recién preparada y los 60 minutos.

### **Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de piracinamida**

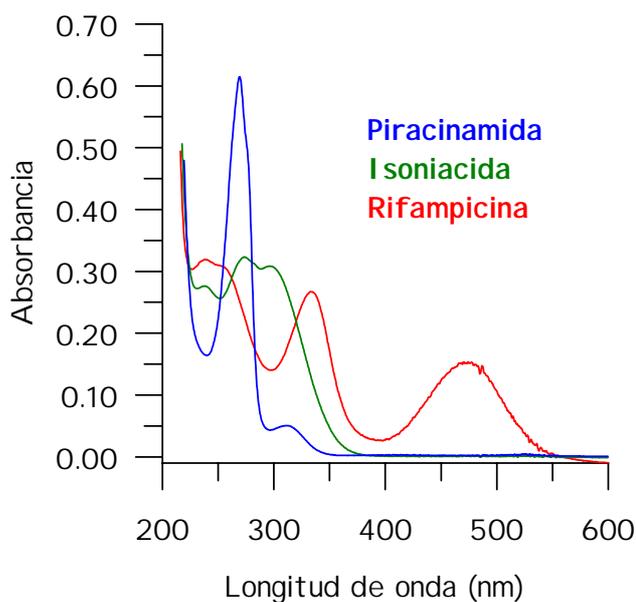
Se estudia la influencia de la acidez del medio sobre la estabilidad de disoluciones acuosas de piracinamida 10 ppm ( KCl 0.1 M) y diferentes valores de acidez fijados por adición de HCl y NaOH de manera que el valor de pH varía entre 1 y 12 aproximadamente. Los espectros de absorción, frente a blancos adecuados, se registran inmediatamente después de preparadas las muestras a temperatura ambiente.

Podemos observar que el valor de la acidez del medio no afecta a las propiedades absorptivas de las disoluciones acuosas de piracinamida, mostrando en todos los casos un espectro idéntico al de la figura anterior.

### **Comparación de espectros de absorción de rifampicina, isoniacida y piracinamida para diferentes valores de pH del medio**

Una vez finalizado el estudio de las disoluciones acuosas de rifampicina, isoniacida y piracinamida, pasamos a comparar los espectros obtenidos para cada uno de ellos en distintos medios de acidez, medio ácido, medio neutro y medio básico, con objeto de determinar en cual de ellos se da una mejor separación de los máximos de absorbancia de cada analito. En estudios posteriores se abordará la resolución de mezclas de estas tres sustancias sin separación previa por aplicación de calibración multivariante, utilizando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) y el basado en análisis lineal híbrido (HLA).

En la **figura 3.9** están representados los espectros de absorción de los tres analitos en medio básico (pH > 11), ya que es en estas condiciones donde muestran un menor solapamiento.



**Figura 3.9.** - Espectros de absorción de disoluciones acuosas conteniendo 10 ppm de rifampicina, isoniacida y piracinamida, en medio básico a pH 11.

Piracinamida e isoniacida solapan fuertemente en todo su espectro, sin embargo rifampicina es la única especie absorbente presente en las mezclas para  $\lambda > 400$  nm.

### **Determinación simultánea de rifampicina, isoniacida y piracinamida mediante calibración multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS) y análisis lineal híbrido (HLA)**

Se ha estudiado la posibilidad de determinar conjuntamente estos tres antibióticos ya que, como se ha indicado, absorben en una amplia zona común de longitudes de onda, interfiriendo por tanto en la determinación individual directa de uno en presencia de los otros.

Para llevar a cabo esta determinación, nos proponemos utilizar métodos de espectro completos basados en calibración multivariante de mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, PLS) y el más novedoso análisis lineal híbrido (HLA), llevando a cabo un estudio comparativo de sus capacidades para la resolución de los antibióticos propuestos en formulaciones farmacéuticas.

#### **Condiciones generales para la obtención de la matriz de calibración**

En primer lugar se procede a diseñar un set de calibración conteniendo los principios activos en estudio. El diseño de dicho set es el paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es fundamental evitar la colinealidad empleando un número suficientemente bajo de patrones y abarcando, por otra parte, todo el rango de concentraciones, así como las relaciones entre las concentraciones de los componentes en los problemas reales.

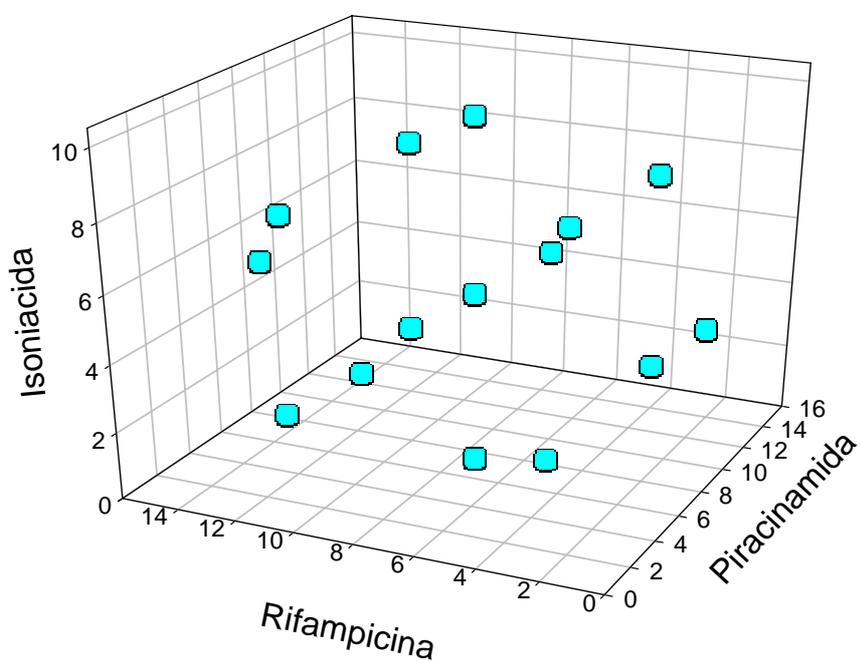
El set de calibración fue diseñado mediante la aplicación de un diseño central compuesto. Consta de 15 muestras formadas por mezclas patrón de los diferentes componentes. Se preparan en matraces de 25 ml, conteniendo cada una de ellas 3,5

ml de NaOH 0.1M, 0.5 ml de ácido ascórbico  $2.84 \cdot 10^{-3}$  M (para prevenir la posible oxidación de la rifampicina en medio básico ) y diferentes cantidades de RIF, PIR e ISO. Las concentraciones usadas se resumen en la **tabla 3.1**.

*Tabla 3. 1. - Composición de las muestras patrón del set de calibración*

Muestra	Concentración, ppm		
	RIF	PIR	ISO
M1	3.24	3.24	2.16
M2	3.24	3.24	7.92
M3	3.24	11.88	2.16
M4	3.24	11.88	7.92
M5	11.88	3.24	2.16
M6	11.88	3.24	7.92
M7	11.88	11.88	2.16
M8	11.88	11.88	7.92
M9	0.0	7.56	5.04
M10	15.12	7.56	5.04
M11	7.56	0.0	5.04
M12	7.56	15.12	5.04
M13	7.56	7.56	0.0
M14	7.56	7.56	10.08
M15	7.56	7.56	5.04

Se registraron los espectros de absorción de las muestras utilizando las condiciones habituales de registro, entre 200 y 600 nm. Los espectros obtenidos fueron utilizados en las matrices de calibrado. En la **figura 3.10**, se ha representado una proyección tridimensional de la composición de la matriz.



*Figura 3.10. - Proyección tridimensional del diseño del experimento (central compuesto)*

La zona de análisis espectral se estableció entre 202 y 550 nm que comprenden un total de 966 puntos. Para la determinación del número de factores hemos utilizado un método de validación cruzada (cross-validation). La suma de los cuadrados de los errores residuales (PRESS), se ha calculado para diferente número de factores mediante ambos algoritmos. Hemos seleccionado como óptimo el número de factores para el primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas (18). En la **tabla 3.2**, se recogen los valores obtenidos para el PRESS y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) mediante PLS y HLA/XS.

*Tabla 3.2. - Comparación entre los parámetros estadísticos obtenidos por aplicación de calibración PLS1 y HLA/XS.*

	PLS1			HLA/XS		
	Factores	PRESS	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	Factores	PRESS	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )
<b>RIF</b>	6	0.2690	0.9990	6	0.2405	0.9991
<b>PIR</b>	7	0.2794	0.9989	3	0.2471	0.9991
<b>ISO</b>	8	0.2121	0.9982	8	0.5706	0.9951

Como se puede observar el número óptimo de factores es similar para RIF e ISO por ambas calibraciones, sin embargo, se obtiene un número notablemente inferior de factores por aplicación de HLA/XS (3 factores) con respecto a los obtenidos por aplicación de PLS1. Aunque es frecuente este efecto mediante HLA/XS, el valor extremadamente menor, resulta sorprendente bajo. Cuando se comparan las concentraciones conocidas del set de calibración con aquellas predichas mediante ambos métodos y se calcula el valor para el coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ), no se observan diferencias estadísticamente significativas. Las mayores diferencias corresponden a la determinación de ISO, para el cual aparece como

mejor la calibración mediante PLS1, dado el mejor valor de  $R^2$  y el menor valor del PRESS.

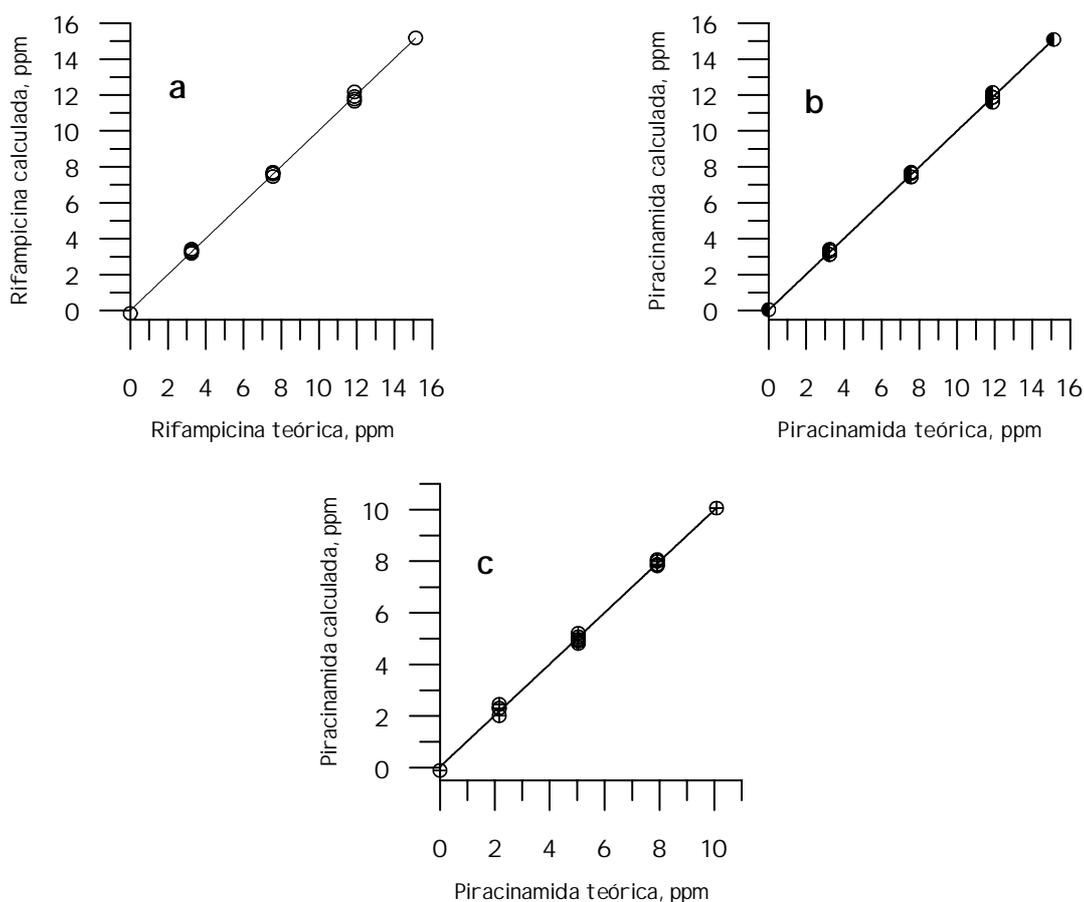
Mediante el cálculo del SEP y el REP como una medida del error absoluto y relativo de la predicción mediante validación cruzada para cada componente se obtienen los resultados que podemos observar en la **tabla 3. 3**.

*Tabla 3.3. - Parámetros estadísticos obtenidos para las matriz de calibración optimizadas mediante PLS1 y HLA.*

	Modelo PLS1	
Componente	SEP	REP (%)
RIF	0.133	1.76
PIR	0.140	1.85
ISO	0.117	2.31
	Modelo HLA/XS	
Componente	SEP	REP (%)
RIF	0.127	1.68
PIR	0.128	1.70
ISO	0.195	3.87

Valores de error ligeramente inferiores se obtienen para RIF y PIR mediante HLA/XS en comparación con PLS1, pero sin embargo, la determinación de ISO se ve desfavorecida, presentando errores ligeramente más altos mediante el modelo HLS/XS. Como conclusión podemos destacar que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos modelos de calibración en cuanto a la capacidad de predicción.

La **figura 3.11** se representan los valores calculados para las concentraciones de los analitos (concentraciones encontradas) frente a los valores teóricos (concentraciones actuales) en las muestras patrón mediante PLS1. La linealidad conseguida entre ambas variables es adecuada como se pone de manifiesto por los respectivos coeficientes de regresión indicados anteriormente.



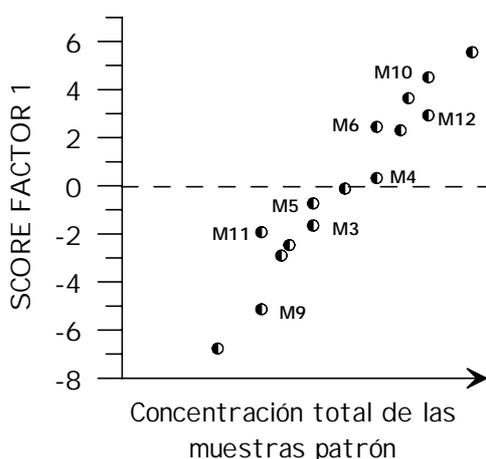
**Figura 3.11.** Representación de concentraciones calculadas vs. teóricas mediante el modelo optimizado para la resolución de las mezclas RIF, PIR e ISO<sub>2</sub>.

En vista de los resultados, ninguna de las muestras usadas en el set de calibración se puede considerar una muestra desechable (outlier).

## Estudio de scores

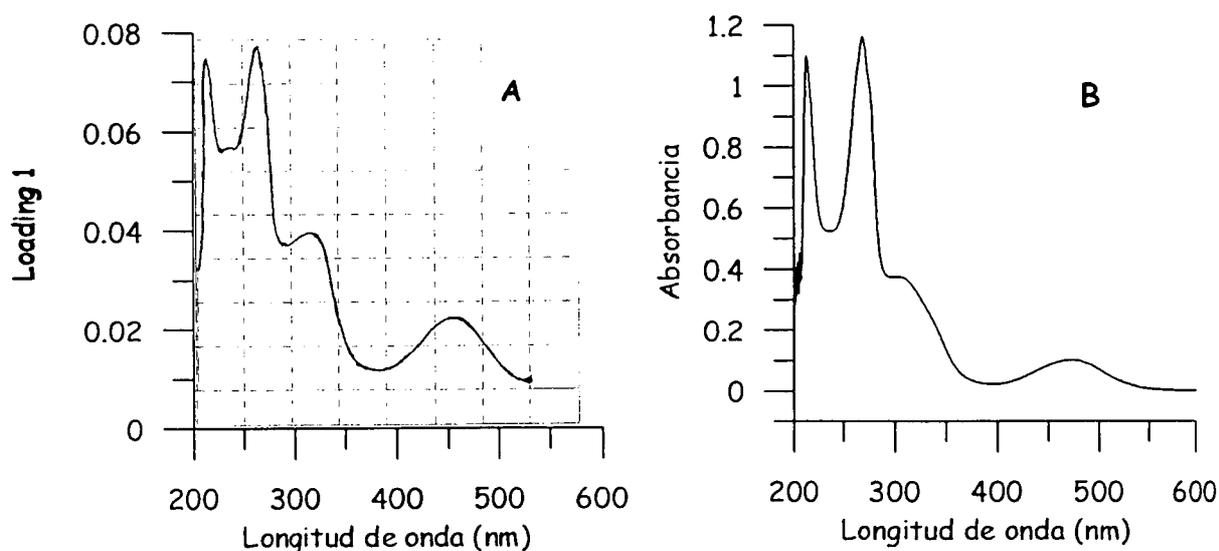
Se ha realizado un estudio encaminado a la posible asignación de la naturaleza de los factores involucrados en el modelo. Para ello se ha llevado a cabo un análisis de la evolución del valor de los scores 1, 2 y 3 con respecto a la concentración y relación de concentraciones de los diversos componentes de las muestras. De los anteriores estudios se deducen los siguientes resultados.

Al representar los valores de score factor1 (score 1) frente a la concentración total de las muestras utilizadas en el calibrado de la matriz, **figura 3.12**, podemos comprobar que el valor del score 1 aumenta al hacerlo la concentración total de la muestra, y que para muestras con igual concentración total, presentan mayor valor de score 1 aquellas que tienen mayor concentración de rifampicina. El score 1 es aproximadamente cero para las muestras cuya concentración total es similar a la concentración total media de las muestras de calibración.



**Figura 3.12.** - Evolución del valor del score 1 con la concentración total de las muestras del set de calibrado.

En la **figura 3.13**, aparecen representados el vector loading correspondiente al factor 1 (gráfica A) y el espectro suma resultante de los componentes puros (gráfica B). Como podemos apreciar ambas representaciones presentan una forma similar, siendo totalmente coincidentes los puntos significativos, es decir máximos y mínimos del espectro.

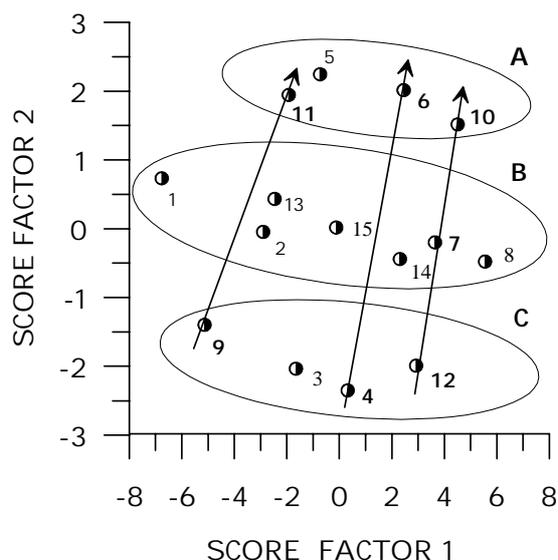


**Figura 3.13.** - A) Representación del vector loading 1, B) Representación del espectro suma.

En la **figura 3.14**, se muestra la representación del score 2 frente al score 1. El score 1, como hemos indicado, está relacionado con la concentración total de los tres antibióticos, rifampicina, piracinamida e isoniacida. El incremento del primer score esta relacionado con el incremento en la concentración total. También se puede observar, que para muestras con la misma concentración total, presentan mayor score las que tienen mayor concentración de rifampicina.

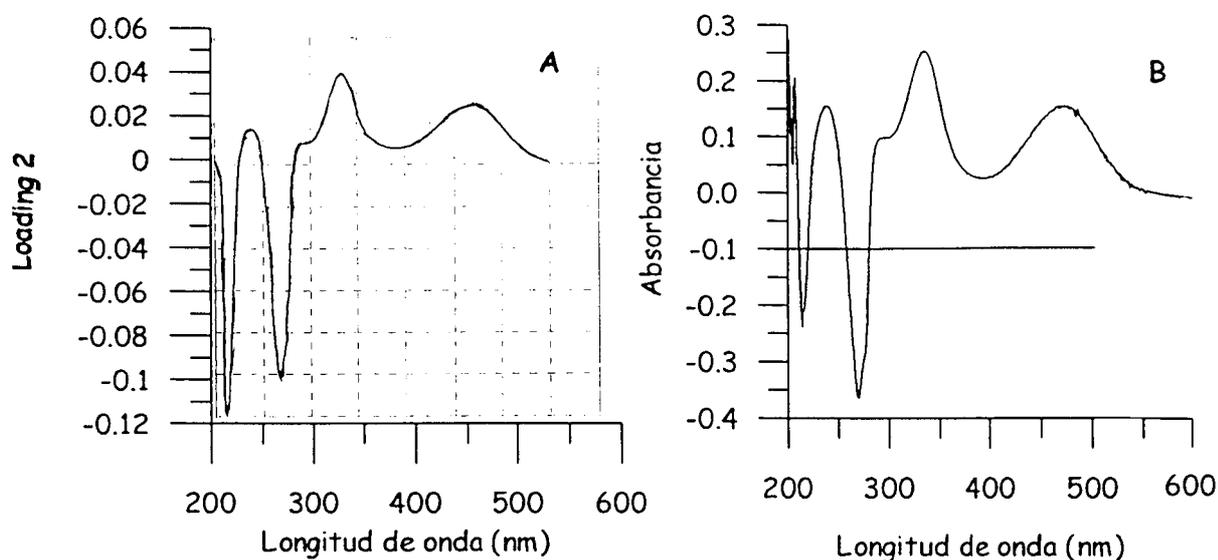
El factor dominante para la distribución de muestras para el score 2 parece estar relacionado con la relación de concentraciones entre rifampicina / piracinamida. Podemos diferenciar 3 grupos de muestras A, B y C. En el grupo A se

encuadran las muestras con una relación de concentración entre rifampicina / piracinamida  $> 1$ , son las muestras que presentan mayores valores de score 2; en el grupo B están aquellas muestras donde la relación anterior es igual a 1, y los valores de score que presentan están alrededor de 0; en el grupo C son muestras donde la relación, antes citada, es  $< 1$  y presentan los valores más bajos de score 2.



*Figura 3.14. - Evolución del score 2 frente al score 1 en las muestras del set de calibración.*

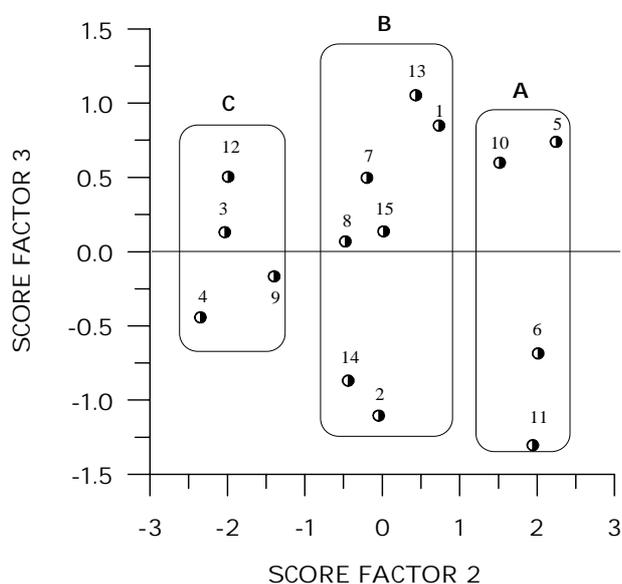
Dicho comportamiento concuerda con la forma del vector loading 2, ya que podemos comprobar en la **figura 3.15** como dicho vector modula la diferencia de señal entre rifampicina y piracinamida coincidiendo con el espectro diferencia obtenido por sustracción entre los espectros puros de los componentes rifampicina y piracinamida.



*Figura 3.15. - A) Gráfica del vector loading correspondiente al factor 2. B) espectro diferencia obtenido de los espectros de los componentes puros rifampicina y piracinamida.*

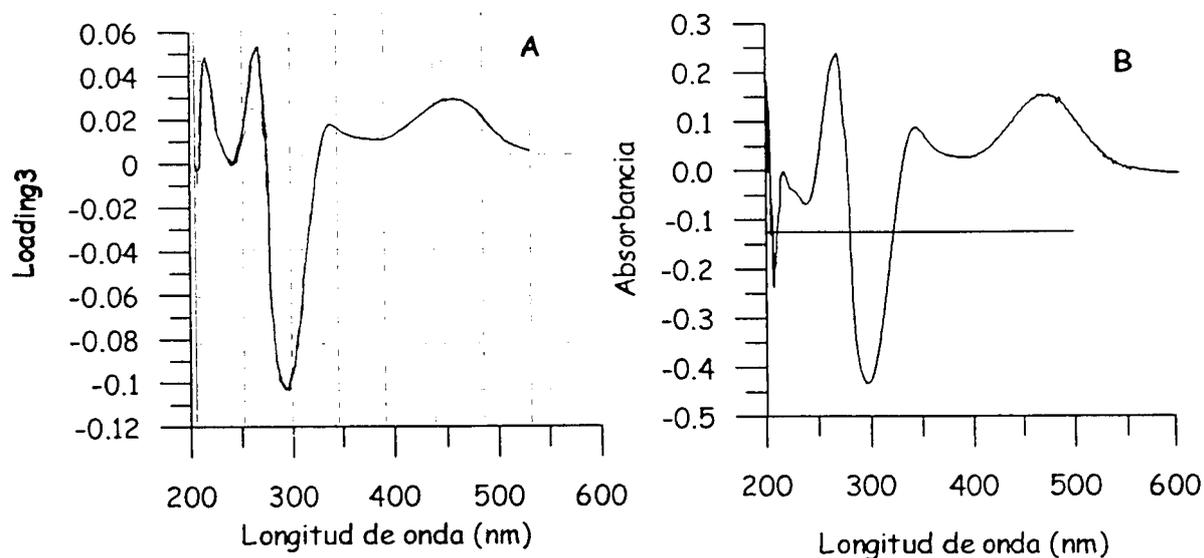
La **figura 3.16** muestra la evolución del score 3 frente al score 2. En el score 2, aparecen diferenciados los tres grupos antes mencionados, que se corresponden con la relación de concentración rifampicina / piracinamida y que guardan la misma relación vista en el estudio de la figura 3.14.

En el score 3 el factor dominante para la distribución de las muestras de calibración es la relación de concentraciones siguiente:  $[(\text{rifampicina} + \text{piracinamida}) / 2 \text{ isoniacida}]$ , aquellas muestras en las que esta relación es  $> 1$  presentan un valor de score 3 positivo y para las muestras cuya relación anterior es  $< 1$  el score 3 es negativo.



*Figura 3.16. - Evolución del score 3 frente a score 2 para las muestras del set de calibración*

Al igual que para el vector loading 2, para el vector loading 3, también hemos encontrado una posible relación de espectros ( **figura 3.17**), es este caso es: rifampicina + piracinamida - 2 isoniacida. Totalmente de acuerdo con la relación entontrada entre el valor de score 3 y las muestras de calibración.



*Figura 3.17. - A) gráfica del vector loading 3, B) gráfica correspondiente a la relación de espectros rifampicina + piracinamida - 2 isoniacida.*

Por tanto, podemos resumir que los tres factores principales que afectan a la determinación simultánea están relacionados con los siguientes parámetros: factor 1, con la concentración total de los componentes; factor 2, con la relación entre las concentraciones de rifampicina/piracinamida y factor 3, con la relación entre las concentraciones de rifampicina+piracinamida/isoniacida.

### Determinación simultánea de rifampicina, piracinamida e isoniacida en muestras problemas y formulaciones farmacéuticas.

Las matrices optimizadas mediante PLS1 y HLA/XS, han sido aplicadas a la determinación de muestras binarias y ternarias artificiales, así como al análisis de formulaciones farmacéuticas sin separaciones previas.

#### Determinación en muestras binarias y ternarias artificiales.

En la **tabla 3.14** se reflejan las composiciones de las muestras problemas. Los valores de recuperación obtenidos mediante calibración PLS1 y HLA/XS se representan en el diagrama de barras mostrado en la **figura 3.15**.

*Tabla 3.14. - Composición de las muestras artificiales empleadas como test de predicción.*

Muestra	[Rif] <sub>, ppm</sub>	[Pir] <sub>, ppm</sub>	[Iso] <sub>, ppm</sub>
p1	4.800	12.00	2.00
p2	10.00	0	5.00
p3	15.00	4.32	2.88
p4	2.160	4.32	10.00
p5	7.50	7.50	0
p6	7.50	7.50	2.88
p7	7.50	7.50	7.20
p8	7.50	7.50	10.00
p9	0	12.00	2.00
p10	17.28	21.60	2.88
p11	21.60	12.96	5.76

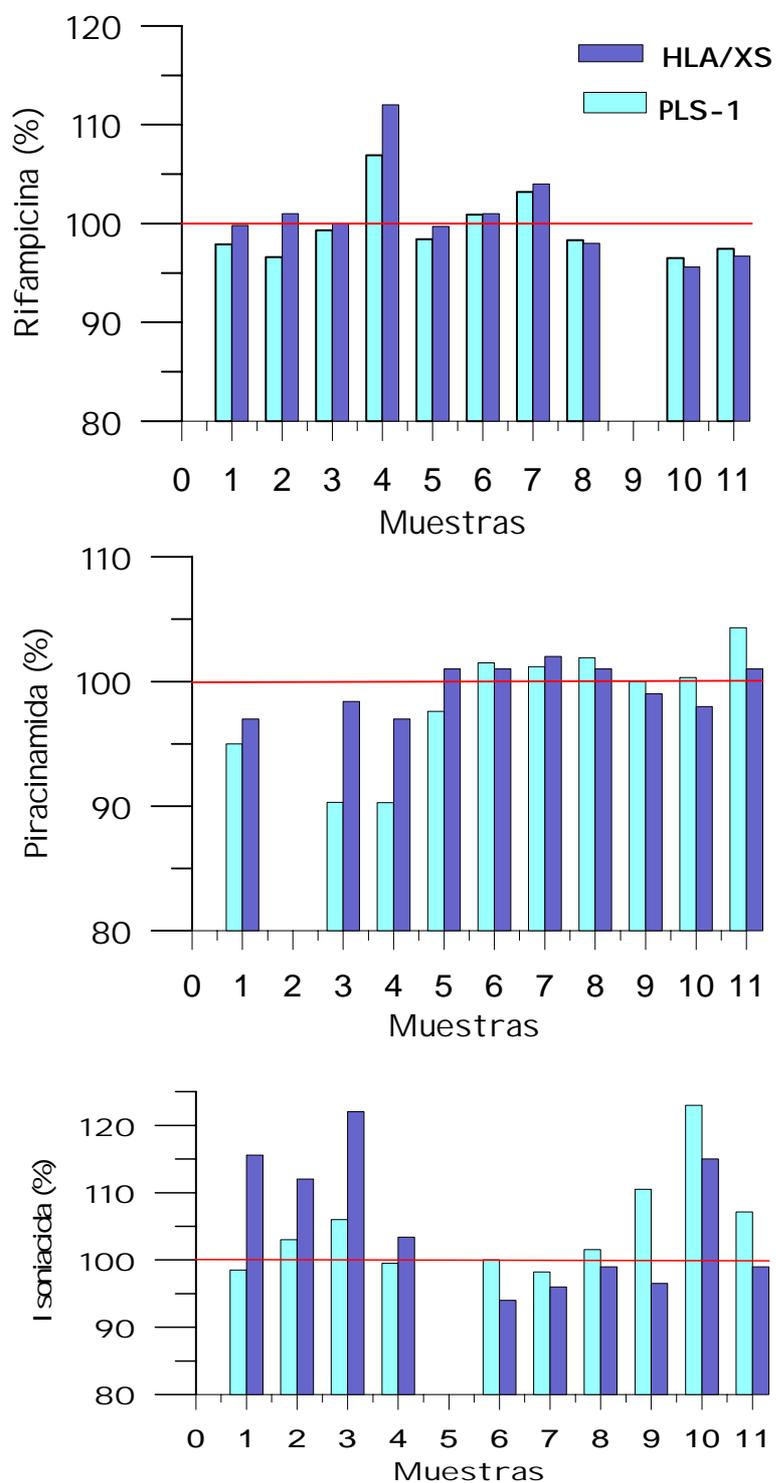


Figura 3.18.- Representación de los valores de recuperación (%) obtenidos para las muestras del set de predicción mediante PLS1 y HLA.

Se obtienen valores similares en la determinación de RIF y PIR por ambos métodos, sin embargo valores ligeramente mejores se obtienen para ISO usando el modelo PLS-1. Cuando se calcula la repetitividad ( $n=9$ ) para muestras conteniendo 12.6 ppm de RIF, 16.0 ppm de PIR y 8.40 ppm de ISO se obtienen valores de RSD (%) de 1.44; 0.76 y 0.90 para RIF, PIR e ISO respectivamente por aplicación de PLS1 y 2.25, 1.27 y 3.97 para RIF, PIR e ISO por aplicación de HLA/XS. Los resultados obtenidos para este caso parecen indicar una mayor precisión mediante la aplicación de la calibración PLS1.

### Cálculo de las figuras de mérito

Se han utilizado los distintos criterios indicados en la introducción de este capítulo para llevar a cabo la evaluación de los parámetros de calidad basados en la utilización del NAS. En primer lugar se procedió al registro de los espectros correspondientes a 9 muestras de blanco idénticas, para posteriormente y mediante un programa de cálculo en QBasic (86) estimar el valor de  $\|\epsilon\|$  según se ha explicado en la introducción del presente capítulo. Así se calcularon los parámetros de sensibilidad (SEN), selectividad (SEL), límite de detección y sensibilidad analítica ( $\gamma$ ). En la **tabla 3.15** se resumen los valores obtenidos por aplicación del modelo HLA/XS.

**Tabla 3.15** .- Figuras de mérito obtenidas mediante el modelo HLS/XS.

Componente	SEL	SEN	Sensibilidad analítica (ppm)	Límite de detección (ppm)
RIF	0.384	0.244	2.50	0.40
PIR	0.557	0.323	2.20	0.45
ISO	0.174	0.097	1.11	0.91

### Determinación en composiciones farmacéuticas.

A continuación se procedió a la determinación de estos antibióticos en composiciones farmacéuticas, sin llevar a cabo separaciones previas. Los fármacos elegidos representan todos los encontrados en el mercado que llevan en su composición los tres antibióticos o al menos uno de ellos, además se ha estudiado cada fármaco en todas sus posibles formulaciones.

#### Rifater, grageas

El primer fármaco en estudio ha sido "Rifater", comercializado por Marion Merrell Dow, S.A, y ampliamente utilizado para la profilaxis de la meningitis. Dicho producto tiene la siguiente composición por gragea: Rifampicina, 120 mg; Isoniacida, 50 mg; Piracinamida, 300mg; Sacarosa, 104,9 mg y excipiente.

Método operatorio: para preparar una disolución madre del medicamento se trituran 9 grageas del producto comercial y se pesan con exactitud 0.0250 g, posteriormente se disuelven en 250 ml de agua desionizada. Una vez disuelto se filtra una porción de disolución, suficiente para preparar las muestras problemas.

Se preparan muestras correspondientes a las diluciones 1:3.33, 1:2.50, 1:1.66, cada una por triplicado, en las condiciones anteriormente establecidas y se procedió al registro de los espectros.

#### Rifinah, grageas

Fármaco comercializado por Marriol Merrell, S.A, que presenta la siguiente composición por gragea: Rifampicina 300 mg; Isoniacida 150 mg; Sacarosa 181 mg; excipientes.

Método operatorio: para preparar una disolución madre del medicamento trituramos 9 grageas del producto comercial, a continuación se pesan, con exactitud, 0.0250 g que se disuelven en 250 ml de agua desionizada. Una vez disuelto se filtra una porción de disolución suficiente para preparar las muestras.

Se prepararon muestras correspondientes a las diluciones 1:5.00, 1:3.33, 1:2.50, cada una de ellas por triplicado y en las condiciones anteriores.

### **Rifaldin, cápsulas**

Fármaco comercializado por Marion Merrell, S.A., que presenta la siguiente composición por cápsula: Rifampicina, 300 mg; Excipientes.

Método operatorio: para la preparación de una disolución madre del medicamento, se vierte el contenido de una cápsula en un litro de agua desionizada, se disuelve y se filtra, esta operación se realizó por triplicado. De cada disolución madre se prepara una muestra diluida, también por triplicado. Las muestras preparadas corresponden a una dilución de 1:25.

### **Rifaldin, suspensión**

Fármaco comercializado por Marion Merrell, S.A., y cuya composición por 100 ml de suspensión es: Rifampicina, 2 g; Sacarina, 0.1 g; Sacarosa, 40g; Sulfitos y otros excipientes.

Método operatorio: para preparar una disolución madre del medicamento, se toma un volumen de 1 ml de la suspensión y se lleva hasta un volumen de 1 litro, con agua desionizada. Se disuelve y se preparan muestras con distintas diluciones, cada una por triplicado.

Por último se incluye una tabla resumen (tabla 3. 16) donde se muestran los valores medios calculados para cada componente, así como los valores de la composición facilitados por la casa comercial y los límites aceptados por la Pharmacopeia (87).

*Tabla 3.16. - Comparación entre la composición calculada mediante el modelo PLS1 y HLA en el análisis de las diversas formulaciones farmacéuticas estudiadas .*

Nombre comercial	Composición etiquetada	PLS1		HLA/XS	
		Valor calculado (% RSD)	% con respecto al contenido certificado	Valor calculado (% RSD)	% con respecto al contenido certificado
Rifater, grageas	mg/gragea : RIF 120	mg/gragea : RIF 117.7(4)	97.5	117 (2)	97.2
	ISO 50	ISO 50(5)	94.3	43 (13)	86.5
	PIR 300	PIR 283(1)	102.0	285 (4)	95.1
Rifinah, grageas	mg/gragea: RIF 300	mg/gragea: RIF 303(6)	101.0	307 (9)	102.3
	ISO 150	ISO 143(9)	95.0	126(5)	84.3
Rifaldin, cápsulas	mg/cápsula: RIF 300	mg/cápsula: RIF 293(5)	97.7	295(3)	98.5
Rifaldin, suspensión	g/100 mL: RIF 2.0	g/100 mL: RIF 2.1(0.2)	105.0	2.02(6)	100.9

\* Intervalo de error aceptado por Pharmacopeia : RIF 90-130 %; PIR: 93-107%; ISO: 90-110 %.

Los contenidos de RI F y PI R obtenidos están en concordancia con los valores certificados por la casa comercial Marion Merrel Dow Laboratory y no hay diferencias significativas entre los dos métodos empleados, sin embargo, los valores obtenidos para ISO usando HLA/XS están fuera del intervalo aceptado en la bibliografía.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- H. Martens y T. Naes ; "Multivariate calibration"; John Wiley and Sons. Chichester, (1989).
- 2.- K.R. Beebe y B.R. Kowalski; *Anal. Chem.*, (59), 1007A, (1989).
- 3.- E.V. Thomas y D.M. Haaland; *Anal. Chem.*, (62), 1091, (1990).
- 4.- M.E. Ketterer, J.J. Rescht y M.J. Peters; *Anal. Chem.*, (61), 2031, (1989).
- 5.- G. Janatch, J.D. Kruse-Jarres, R. Marbach y H.M. Heise; *Anal. Chem.*, (61), 2016, (1989).
- 6.- M. Otto y J.D.R.Thomas; *Anal. Chem.*, (57), 2647, (1985).
- 7.- W. Lindberg, J. Ohman, S. Wold y H. Martens; *Anal. Chim. Acta*, (174), 41, (1985).
- 8.- W.P. Carey, L.E. Wangen, y J.T. Dyke ; *Anal. Chem.*, (61), 1667, (1989).
- 9.- M. Otto y W. Wegscheider; *Anal. Chem.*, (57), 63, (1985).
- 10.- E. Stark, K. Luchter y M. Margoshes; *Appl. Spectrosc. Rev.*, (22), 335 (1986).
- 11.- R. Tauler y E. Casassas; *Anal. Chem. Acta*, (223), 257 (1989).
- 12.- D.M. Haaland y E.V. Thomas; *Anal. Chem.*, (60), 1193 (1988).
- 13.- S. Wold; *Technometrics*, (20), 397 (1978).
- 14.- R. Manne; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, (2), 187 (1987).
- 15.- A. Lorber, L. Wangen y B.R. Kowalski; *J. Chemom.*, (1), 19 (1987).
- 16.- H. Martens, T. Karstang y T. Naes; *J. Chemom.*, (1), 201 (1987).
- 17.- D.M. Haaland y E.V. Thomas; *Anal. Chem.*, (60), 1202 (1988).
- 18.- D.M. Haaland y E.V.Thomas; *Anal. Chem.*, (60), 1193 (1988).
- 19.- S. Sekulic, M.B. Seasholtz, Z. Wang, B.R. Kowalsky, S.E. Lee y B.R. Holt; *Anal. Chem.*, (65), 835A (1993)
- 20.- S. Wold, N. Kettaneh-Wold, B. Skagerberg; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, (7), 53 (1989).
- 21.- E.R. Malinowski y D.G. Howery; "Factor Analysis in Chemistry"; John Wiley and Sons. New York, (1980).

- 22.- B.R. Kowalski y M.B. Seasholtz; *J. Chemom.*, (5), 129 (1991).
- 23.- P. Geladi y B.R. Kowalski; *Anal. Chem. Acta*, (185), 1 (1986).
- 24.- I. Frank; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, (8), 108 (1990).
- 25.- S. Wold; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, (14), 71 (1992).
- 26.- R. Tauler, A. Izquierdo- Ridorsa y E. Casassas; *Anales de Química*, (87), 571 (1991).
- 27.- R.E. Walpole y R.H. Myers; " *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*", 3ª ed. Interamericana. México. (1990).
- 28.- G.C. Barker y A.W. Gardner; *At. Energy Res. Establ. (GB). AERE Harwell C/R*, 2297 (1958).
- 30.- G.C. Barker y A.W. Gardner; *Z. Anal. Chem.*, (173), 79 (1960).
- 31.- E.P. Parry y R.A. Osteryoung; *Anal. Chem.*, (36), 1366 (1964).
- 32.- T. Naes, T. Isaksson y B.R. Kowalski; *Anal. Chem.*, (62), 664 (1990).
- 33.- A. Lorber; *Anal. Chem.*, (58), 1167 (1986)
- 34.- L. Xu, I. Schechter; *Anal. Chem.*, (69), 3722 (1997)
- 35.- A. Lorber, B. R. Kowalski; *J. Chemom.*, (2), 93 (1988)
- 36.- A. Lorber, B. R. Kowalski; *J. Chemom.*, (2), 67 (1988)
- 37.- A. J. Berger, T. Koo, I. Itzkan, M. S. Feld; *Anal. Chem.*, (71), 623 (1998)
- 38.- H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri; *Anal. Chem.*, (71), 4361 (1999)
- 39.- R. Boqué, F. X. Rius; *Chemom. Intell. Lab., Syst.*, (32), 11, (1996)
- 40.- K. S. Booksh, B. R. Kowalski; *Anal. Chem.*, (66), 782 A (1994)
- 41.- A. Lorber, K. Faber, B. R. Kowalski; *Anal. Chem.*, (69), 1620 (1997)
- 42.- C. A. Clayton, J. W. Hines, P. D. Elkins; *Anal. Chem.*, (59), 2506 (1987)
- 43.- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas, I. De Orbe Paya; *Anal. Chim. Acta*, (313), 103 (1995)
- 44.- H. Wold, "Non-linear estimation by iterative least squares procedures", In *Research Papers in Statistics*, F. David, Ed., Wiley, New York, 411 (1966).

- 45.- K. Jöreskog y H. Wold, Eds. "Causality, Structure, Prediction", North-Holand, Amsterdam, NI (1982).
- 46.- H. Martens y S.A. Jensen, "Partial Least Squares: A new two-stage NIR calibration method in progress in cereal chemistry and technology", *Proceedings from 7th world cereal and bread congress*, Prague, Eds. Elsevier, Amsterdam, (1982).
- 47.- E. Marengo y R. Todeschini; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, (12), 117 (1991).
- 48.- K. Helland, H. E. Berntsen, O.S. Borgen y H. Martens; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, (14), 129 (1992).
- 49.- I.N. Wakeling y H.J.H Macfie; *J. Chemom*, 6, 189 (1992).
- 50.- S. De Jong; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, (18), 251 (1993).
- 51.- F. Lindgren, P. Geladi y S. Wold; *J. Chem.*, (7), 45 (1993).
- 52.- K. Helland, "On-line near-infrared spectroscopy for hydrocarbon gas analysis", Ph. D. Thesis, The Norwegian Institute of Technology, Department of Physical Chemistry (1993).
- 53.- R. Jones, M.J. Orchard y K. Hall; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (3), 335 (1985).
- 54.- W. P. Carey y L. E. Wangen; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, (10), 245 (1991).
- 55.- P. MacLaurin, P.J. Worsfold, M. Crane y P. Norman; *Anal. Proc.*, (29), 65 (1992).
- 56.- A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas y M. Martínez Galera; *Fresenius J. Anal. Chem.*, (347), 371 (1993).
- 57.- A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas y M. Martínez Galera; *Anal. Chim. Acta*, (347), 371 (1993).
- 58.- I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla y F. Salinas; *Analyst*, (118), 807 (1993).
- 59.- A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas y A. Zamoro; *Anal. Chim. Acta*, (258), 807 (1992).
- 60.- A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas y A. Zamoro; *Quim. Anal.*, (13), 106 (1994).
- 61.- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas y A. Zamoro; *Analyst*, (119), 1183 (1994).

- 62.- F. Salinas, A. Espinosa-Mansilla y P.L. López de Alba; *Anal. Letters*, (28), 193 (1995).
- 63.- F. Salinas, A. Espinosa-Mansilla y P.L. López de Alba; *Analisis*, (22), 188 (1994).
- 64.- M. Jiménez Arrabal, P. Valiente González, A. Muñoz de la Peña, C. Caro Gámez y A. Sánchez Misiego; *Analyst*, (119), 1537 (1994).
- 65.- A. Guiberteau Cabanillas, T. Galeano Díaz, A. Espinosa-Mansilla y F. Salinas López; *Talanta*, (41), 1821 (1994).
- 66.- A. Guiberteau Cabanillas, T. Galeano Díaz, A. Espinosa-Mansilla, P.L. López de Alba y F. Salinas López; *Anal. Chim. Acta*, (302), 9 (1995).
- 67.- T. Galeano Díaz, A. Guiberteau Cabanillas, M.I. Acedo Valenzuela y F. Salinas; *Analyst*, (121), 547 (1996)
- 68.- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas e I. de Orbe Payá; *Anal. Chim. Acta*, 313, 103 (1995).
- 69.- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas e I. de Orbe Payá; *Fresenius J. Anal. Chem.*, (354), 245 (1996).
- 70.- I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla y F. Salinas; *The Analyst*, (120), 2567 (1995)
- 71.- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas, M. del Olmo e I. de Orbe Payá; *Appl. Spectrosc.*, (50), 449 (1996).
- 72.- A. Guiberteau, T. Galeano Díaz, F. Salinas y J.M. Ortiz; *Anal. Chim. Acta*, (305), 219 (1995)
- 73.- T. Galeano, A. Guiberteau, J.M. Ortiz Burguillos y F. Salinas; *The Analyst*, (122), 513 (1997).
- 74.- T. Galeano Díaz, M.I. Ácedo Valenzuela y F. Salinas; *Fresenius J. Anal. Chem.*, (350), 692, (1994).
- 75.- A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás y F. Salinas; *J. of Pharm. Biomed. Anal.*, (17), 1325 (1998).

- 76.-A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, M.D. Moreno, F. Salinas y M Martínez Galera; *Fresenius J. Anal. Chem.*, (351), 571 (1995).
- 77.- A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, M. D. Moreno, F. Salinas y M. Martínez Galera; *Fresenius J. Anal. Chem.*, (353), 211 (1995).
- 78.- A. Muñoz de la Peña, M. D. Moreno, I. Durán-Merás y F. Salinas; *Talanta*, (43), 1349 (1996).
- 79.- I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, M. I. Rodríguez Cáceres y F. Salinas; *Talanta*, (45), 899 (1998).
- 80.- J. A. Murillo, A. Alañón, P. Fernández, A. Muñoz de la Peña y A. Espinosa-Mansilla; *The Analyst*, (123), 1073 (1998).
- 81.- A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, R. Galian; Comunicación a la XI Reunión de Química Analítica. Valencia, (1999).
- 82.- M. D. Gil García, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, M. Martínez Galera, A. Muñoz de la Peña y F. Salinas; *Anal. Chim. Acta*, (348), 177 (1997).
- 83.- A.C. Olivieri, M.S. Collado, V.E. Montovani y H.C. Goicoechea; *Talanta*, (52), 909 (2000).
- 84.-H.C. Goicoechea y A.C. Olivieri; *Analyst*, (124), 725 (1999)
- 85.- A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás y R. Galian; *Applied Spectroscopy* (55), 701 (2001).
- 86.- A. Muñoz de la Peña. Programa desarrollado en el Departamento de Química Analítica. Qbasic 4.5.
- 87.- United States Pharmacopeia XXI I. United States Pharmacopeial Covention, D. M. Rockville, pp. 729-730, 1192 and 1227-1228, (1999).

## CAPÍTULO 4

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE RIFAMPICINA,  
ISONIACIDA, ACETILISONIACIDA, PIRACINAMIDA Y  
CREATININA, MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICACIA (HPLC)



## INTRODUCCIÓN

La cromatografía es, probablemente, la técnica más versátil de separación, aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. De hecho las técnicas de separación suelen dividirse en dos grandes grupos: cromatográficas y no cromatográficas. La elección de una técnica cromatográfica concreta dependerá de la naturaleza y cantidad de muestra, del objetivo de la separación, de las limitaciones del tiempo y equipo asequible.

Puede hacerse una primera distinción entre las técnicas cromatográficas atendiendo a la integración, continua o no, del sistema de detección. Así, la cromatografía plana no conlleva un sistema de detección, mientras que cualquier cromatógrafo de líquidos o gases lleva incorporado dicho sistema siendo, por tanto, auténticos instrumentos.

Las dificultades de la modalidad clásica, a baja presión, de la cromatografía líquida en columna (lentitud, poca eficacia en la capacidad de discriminación y número de solutos que pueden separarse, necesidad de la intervención casi constante del operador e imposibilidad de aplicar detección continua) motivaron que las aplicaciones de esta técnica fueran restringidas en contraste con el espectacular desarrollo de la cromatografía de gases.

Para que la cromatografía líquida en columna sea competitiva con la cromatografía de gases es preciso, dada la diferencia en la viscosidad de la fase móvil y su capacidad para atravesar lechos empaquetados, trabajar a presiones elevadas en lugar de utilizar sólo la fuerza de la gravedad.

La elevada eficiencia analítica de esta técnica se ha conseguido merced al empleo de columnas con un reducido tamaño de partícula y muy compactas (1-5).

La cromatografía, que es hoy la principal técnica analítica de separación, se encuentra regida por factores termodinámicos y cinéticos. Los **aspectos termodinámicos** son los que determinan las características de retención y selectividad del sistema cromatográfico y corresponden a los equilibrios de distribución de los solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria. En cuanto a los **aspectos cinéticos**, consideran el tiempo para el que se alcanzan los sucesivos equilibrios entre las fases, en el tiempo de contacto, y la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico.

Aunque tanto los aspectos termodinámicos como los cinéticos influyen en todo el proceso cromatográfico, son los termodinámicos los que determinan básicamente la situación del pico, mientras que los cinéticos influyen decisivamente en el ensanchamiento de los mismos.

Cuando se desarrolla un método en HPLC, se busca una separación adecuada entre los componentes de la mezcla, en un tiempo aceptable. Para conseguir esto, se opera variando la columna, la temperatura, el caudal, pero el factor decisivo que controla la separación de los compuestos, es la composición de la fase móvil, es decir, encontrar la composición adecuada para que la separación tenga lugar en el menor tiempo posible.

### Elección de la fase móvil

La naturaleza de la fase móvil es el factor clave para la discriminación entre solutos en HPLC, como ocurre con la temperatura en cromatografía de gases.

En la cromatografía líquida en "fase invertida" o "fase reversa", que es nuestro caso, la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar. Es la que actualmente tiene

mayor importancia pues más del 85% de las aplicaciones de la CLAR se basan en esta alternativa.

La fase estacionaria está constituida por sílice, como material de base, sometida a la incorporación química, o silanización, de una cadena hidrocarbonada larga (C-18). La retención en cromatografía de fases ligadas no polares, se debe, de manera casi exclusiva, a las interacciones hidrofóbicas no específicas soluto-fase estacionaria, es decir, al carácter hidrofóbico o hidrocarbonado del soluto. Su casi universalidad en relación con el tipo de soluto se fundamenta, por lo tanto, en el hecho de que todas las moléculas orgánicas tienen regiones hidrofóbicas más o menos amplias en su estructura y son capaces de interactuar con la fase estacionaria.

La selectividad, en cambio, se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil, ya sean de tipo polar, de formación de enlaces de hidrógeno, o mediante equilibrios secundarios provocados al variar la composición de la fase móvil (ácido-base, formación de complejos o pares iónicos, adición de complejos metal-ligando o reactivos quirales para separar isómeros ópticos, etc.).

Las propiedades básicas que nos interesan de la fase móvil son la fuerza o capacidad de desplazamiento de los solutos que posea y su selectividad. En cromatografía en fase invertida, dado que la retención de los solutos en la fase estacionaria ocurre fundamentalmente a través de la zona no polar de los solutos, la relación entre fuerza y capacidad de desplazamiento y polaridad de la fase móvil es inversa; así el agua es un eluyente con mínimo poder de elución y debe mezclarse con disolventes menos polares para eluir solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria no polar. En general, la estrategia en las separaciones cromatográficas consiste en:

✎ Ajustar la fuerza de la fase móvil a un nivel constante para que la retención de los solutos en la fase estacionaria y su tiempo de permanencia en la columna sea el adecuado para no alargar excesivamente el cromatograma y evitar la dispersión de los solutos.

✎ Modificar la composición de la fase móvil hasta conseguir la selectividad necesaria para lograr la discriminación requerida entre solutos.

Después de pasar a través de la columna, los analitos separados llegan al detector que proporciona los datos de los compuestos en forma de señal eléctrica. Hasta el momento no hay ningún detector universal para HPLC.

### Parámetros cromatográficos

**Tiempo de retención ( $t_R$ ).** - Es el tiempo que tarda el analito en pasar a través del sistema bajo unas determinadas condiciones cromatográficas. La retención puede medirse en tiempos, volúmenes o distancias.

**Factor de capacidad ( $k'$ ).** - Es el parámetro más comúnmente usado para caracterizar el comportamiento de un soluto en un sistema cromatográfico, y su retención. Se define como:

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} = \frac{t'_R}{t_o}$$

donde  $t_R$  es el tiempo de retención del compuesto y  $t_o$  es el tiempo muerto o tiempo transcurrido desde la inserción de un trazador, no retenido en el sistema, hasta su salida. En un sistema multicomponente, se intenta mantener el valor de  $k'$  entre 1 y 10 (6).

**Factor de separación ( $\alpha$ ).**- Está relacionado con la separación o discriminación entre solutos, es un parámetro definitorio de la selectividad cromatográfica entre dos analitos y se define como:

$$\alpha_{1/2} = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Sin embargo, este factor no es decisivo para asegurar la separación completa de los picos ya que no tiene en cuenta el ensanchamiento de banda y, por tanto, los posibles solapamientos. Estos aspectos si son tenidos en cuenta por otro factor más utilizado para definir la capacidad de un sistema cromatográfico para separar dos sustancias y que es la resolución cromatográfica.

**Resolución cromatográfica ( $R_s$ ).**- Nos da el grado de separación de un componente con respecto a otro, se define como:

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{1}{2}(w_{b_1} + w_{b_2})}$$

donde  $w_{b_1}$  y  $w_{b_2}$  son los anchos de banda de ambos picos a línea base. En una separación considerada satisfactoria es normalmente aceptado un valor de  $R_s$  de 1, correspondiente a una separación entre picos del orden del 94% (7) aunque para que exista una resolución prácticamente total (resolución a línea base),  $R_s$  debe ser igual o superior a 1.5.

Así pues, el objetivo que perseguimos con la elección de la fase móvil adecuada, es conseguir que los factores de capacidad de los cinco analitos tengan valores adecuados, comprendidos entre 1 y 10, y que la resolución entre los diferentes picos sea igual o superior a 1.

### Selección del caudal de fase móvil

Como hemos comentado, la cromatografía es una técnica analítica de separación con un doble fundamento termodinámico y cinético. Los aspectos termodinámicos son los que rigen el equilibrio de distribución o reparto de los solutos-analitos entre las dos fases, móvil y estacionaria y, por tanto, son los responsables de características tan importantes como la retención y la selectividad. Los aspectos cinéticos juegan en cromatografía un doble papel: por una parte debe considerarse el tiempo en que se alcanza el equilibrio de distribución en cada porción del sistema y, por otra parte, la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico es la responsable última en la separación. Sobre ella influyen aspectos termodinámicos y aspectos físicos relacionados con la dispersión axial, flujo a través del medio poroso, etc.

Las características cinéticas del proceso son claves para definir el ensanchamiento de banda o ancho de pico que es el que determina, en definitiva, la eficacia del sistema cromatográfico. En general los términos que contribuyen a ésta corresponden a la difusión por remolino, difusión longitudinal y a la resistencia a la transferencia de materia en la fase móvil y estacionaria que, a su vez, van a depender de la velocidad de flujo o del caudal de fase móvil a través de la fase estacionaria.

**Número de platos teóricos (N).** - La eficacia de una columna se mide por el número de platos teóricos, y es un valor adimensional.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

donde  $w_b$  es la anchura del pico cromatográfico a línea base y  $t_R$  es el tiempo de retención del soluto. Tanto el  $t_R$  como la anchura se miden en las mismas unidades. En un cromatograma, la anchura del pico usualmente se expresa en unidades de tiempo debido a que la abscisa del mismo representa unidades de tiempo. Sin embargo, también se puede expresar en unidades de volumen multiplicando por el valor del flujo de fase móvil (F):

$$w_{vol} = w_{tiempo} F$$

Otro método de estimación de N, es determinar  $w_{1/2}$ , la anchura de pico a mitad de su altura máxima. El número de platos teóricos viene dado, entonces, por la expresión:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Con objeto de elegir el caudal más apropiado se ha estudiado la influencia de éste en el ancho de pico y en el número de platos teóricos, o lo que es lo mismo, en la eficacia del sistema cromatográfico. Un plato teórico es un segmento microscópico de columna donde tiene lugar el equilibrio de distanciaci3n entre el soluto en las fases móvil y estacionaria.

Generalmente, la eficacia de una columna en HPLC aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas dentro de la columna. Así, las columnas comerciales de fase reversa de sílica ligada tienen alrededor de 50.000 platos  $m^{-1}$  con partículas de 5  $\mu m$  y la mitad de platos para partículas de 10  $\mu m$ . El número de platos necesario depende del tipo de trabajo a realizar; muchos análisis de rutina en HPLC son suficientemente eficaces aún cuando el número de platos teóricos es bastante más bajo que los citados anteriormente.

En este capítulo se explica el estudio llevado a cabo para la separación y determinación de la mezcla de cinco compuestos, tres de los cuales son antibióticos, estudiados en capítulos anteriores (rifampicina, isoniacida y piracinamida), a los que se han sumado **acetilisoniacida**, que es un metabolito de la isoniacida y **creatinina**, que es una sustancia presente en la orina de forma natural. Se ha encontrado interesante su inclusión ya que se pretende aplicar el método cromatográfico al análisis de estos antituberculosos en fluidos biológicos, en este caso orina.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cromatografía líquida con detección fotométrica, es la técnica más utilizada para la separación y determinación de mezclas de rifampicina, isoniacida, piracinamida y los principales metabolitos de estos (25-desacetilrifampicina y acetilisoniacida), según la revisión bibliográfica realizada. En este apartado comentaremos algunos de los trabajos encontrados en esta búsqueda. La determinación simultánea de rifampicina, isoniacida y piracinamida sólo se ha llevado a cabo en especialidades farmacéuticas y utilizando columnas C-18 modificadas con grupos CN, o de fase normal microporasil y elución en modo isocrático (7-9). En fluidos biológicos (orina, suero, plasma) no se ha llevado a cabo la determinación simultánea de estos tres compuestos.

Solamente se ha encontrado un trabajo en el cual se determinan isoniacida, piracinamida y rifampicina, en fluidos biológicos, plasma en este caso. Aunque se determinan los tres analitos, no lo hacen simultáneamente, ya que el procedimiento que utilizan está dividido en dos fases. En la primera se lleva a cabo la extracción de rifampicina y piracinamida con éter etílico /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 : 1) y se eluye en modo gradiente utilizando una columna C-8 (25 cm x 4,6 mm). En la segunda fase, la isoniacida y sus derivados son hidrolizados a 60° C y eluidos, también utilizando gradiente, en una columna C-18 (25 cm x 4,6 mm), (10).

Se han determinado multitud de mezclas en las que están presentes dos de los analitos en estudio, analitos junto con sus metabolitos u otros antibióticos como las cefalosporinas y mezclas de un único analito, de los estudiados, junto a sus metabolitos.

Se describen diferentes métodos para la separación y determinación de rifampicina e isoniacida en fármacos (11, 12) y en fluidos biológicos (13). En los tres casos se empleó una columna C-18 y detección fotométrica. Determinación de rifampicina e isoniacida junto a sus metabolitos, deacetilrifampicina y acetilisoniacida, en plasma (14). En este procedimiento emplearon una columna de tipo Fenil y elución en gradiente, con doble detección fotométrica y electroquímica.

Para la determinación de rifampicina y piracinamida en suero, los analitos fueron extraídos del suero con una mezcla de éter etílico/metanol (2:3) y eluidos en modo gradiente en una columna C-8 (15).

La determinación de isoniacida y piracinamida en plasma y orina, donde se lleva a cabo una extracción en fase sólida y elución isocrática en columna C-18-CN (16). También se encuentran descritos métodos de cromatografía de par iónico para la determinación de estos dos antibióticos junto con cefalosporinas en compuestos farmacéuticos (17, 18) y junto con etianoamina y metabolitos (morfacinamida, ácido

isonicotínico, ácido nicotínico y ácido p-aminosalicílico) en plasma y suero (19). De nuevo la columna utilizada en los tres métodos, fue una C-18 y detección fotométrica.

Se han encontrado varios procedimientos cromatográficos para la determinación de rifampicina y su principal metabolito 25-desacetilrifampicina (20-23), en ellos se utiliza para la separación columna C-18 (20-22), o C-8 (23), siempre con elución isocrática y detección fotométrica, sólo en un caso (21) se combinan detección fotométrica y electroquímica. Estos métodos se han aplicado a la determinación de rifampicina y sus metabolitos en plasma, orina o fluido cerebroespinal.

Determinación de isoniacida junto con algunos de sus metabolitos como: acetilisoniacida e hidracina en suero, (24); con hidrazina en plasma y fluido cerebroespinal (25), en ambos casos con detección fotométrica. También se han encontrado métodos en los cuales se emplea detección fluorimétrica post-columna, para la determinación de estas mezclas; isoniacida, acetilisoniacida y ácido isonicotínico, en orina (26); e isoniacida, acetilisoniacida, ácido isonicotínico e isonicotinilglicina (27) también en muestras de orina. También se ha determinado junto a otros antituberculosos como aconiacida, en muestras de plasma, combinando detección fotométrica y electroquímica (28).

Determinación de piracinamida y sus metabolitos (ácido piracinoico, ácido 5-hidroxi piracinoico y 5-hidroxi piracinamida) en plasma (29, 30); en orina y fármacos (31).

Por último, también se describen métodos para la determinación de los analitos por separado, así, por ejemplo se determina rifampicina en plasma, fluido

broncoalveolar y células alveolares (32); estudios de estabilidad de rifampicina en plasma con objeto de estudiar las consecuencias sobre estudios de monitorización y farmacocinética (33). Determinación de isoniacida en leche utilizando extracción en fase sólida (34); en células alveolares, fluido brocoalveolar y plasma en pacientes infectados por VIH (35); en fármacos utilizando detección electroquímica (36). Determinación de piracinamida en plasma, fluido broncoalveolar y células alveolares (37).

A continuación, en la **tabla 4.1** se muestra un resumen donde se señalan el procedimiento cromatográfico utilizado, así como el sistema de detección empleado y los tratamientos a los que son sometidos las muestras antes de llevar a cabo la inyección en el sistema cromatográfico.

Tabla 4.1.- PROCEDIMIENTOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ANALITOS EN ESTUDIO

ANALITOS	Condiciones de separación	Detección	Muestras	Comentarios	Ref
Rifampicina Isoniacida Piracinamida	Columna: C-18-CN(25cmx4.6mm) Fase móvil: (isocrático), acetónitrilo/1-heptanosulfonato de sodio, 10mM, pH2 (14:1), (1 ml/min)	UV- 254 nm	Formulaciones farmacéuticas	Muestras disueltas en metanol, filtran 2ml y los diluyen hasta 50 ml con fase móvil.	7
Rifampicina Isoniacida Piracinamida	Columna: C-18-CN(25cmx4.6mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/hidróxido de tetrabutilamonio, 5mN, pH 3 (4:1), (1.5ml/min)	UV- 265 nm	Formulaciones farmacéuticas	Muestras disueltas en fase móvil y filtradas.	8
Rifampicina Isoniacida Piracinamida	Columna: micro porasil (30cmx3.9mm) Fase móvil: (isocrático), 2propanol/ metanol/tampón fosfato, pH 5 (56:42:2), (0.7 ml/min)	UV- 245 nm	Formulaciones farmacéuticas		9
Rifampicina Piracinamida	Columna: C-8 (25cmx4.6mm) Fase móvil: (gradiente lineal), acetónitrilo/tampón fosfato, 5mM, pH 3.5 (3:47) en 5 min a (9:1), (2 ml/min)	UV- 248 nm	Plasma	Rifampicina y piracinamida extraídos del plasma con éter etílico/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2:1)	10
Isoniacida y sus metabolitos de hidracina	Columna: C-18 (25cmx4.6mm) Fase móvil: (gradiente en 2 etapas), A(0.4% trietilamina y ácido heptanosulfónico, 5mM en 70% acetónitrilo)/agua (3:1) durante 5 min y luego A/acetónitrilo (17:3) durante 12 min, (1 ml/min)	UV- 280 nm	Plasma	Acetil derivados de isoniacida y metabolitos son hidrolizados a 60°C (45 min), después son derivatizados con 0.1% de salicilaldehído en etanol, acidificación hasta pH 3.2 con ácido acético, los derivados fueron extraídos con éter etílico.	

Rifampicina Isoniacida	Columna: C-18 (30cmx3.9mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/tampón fosfato, 10mM, pH 7.3 (7:3), (1.2 ml/min)	UV- 254 nm	Formulaciones farmacéuticas	Muestras fueron disueltas en HCl, 0.1M y 0.4% de SDS a 37°C.	11
Rifampicina Isoniacida	Columna: C-18 (15cmx3.9 mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/ tampón fosfato, 20mM, pH 4.5 (3:1), (1 ml/min)	UV- 254 nm	Formulaciones farmacéuticas		12
Rifampicina Isoniacida	Columna: C-18 Fase móvil: (isocrático), metanol/ trietanolamina, pH 4	UV- 260 nm	Formulaciones farmacéuticas	Extracción en fase sólida y elución con metanol	13
Rifampicina Isoniacida Deacetilrifampicin Acetilisoniacida	Columna: Fenil (10cmx8mm) Fase móvil: (Gradiente),	UV- 334 nm y Electroquímica a +800 mV	Plasma	600 µl de plasma fueron mezclados con 15µl de difenilcarbocida (estándar interno) y 300µl de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 75 mM, pH 3, la mezcla fue centrifugada durante 30 min y filtrada.	14
Rifampicina Piracinamida	Columna: C-8 (25cmx4.6mm) Fase móvil: (gradiente lineal), 6 a 48% acetoneitrilo/tampón fosfato, 10mM, pH 3.5. (1.5 ml/min)	UV-215 nm	Plasma	Rifampicina y piracinamida fueron extraídas del suero con CHCl <sub>3</sub> /éter etílico (2:3), el extracto fue evaporado hasta sequedad y el residuo disuelto en metanol	15
Isoniacida Piracinamida	Columna: C-18-CN (25cmx4.6mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/ hidróxido de tetrabutilamonio, 5 mM, pH 3 (4:1), (1.5 ml/min).	UV-265 nm	Plasma y orina	Plasma y orina fueron mezclados con 2propanol/CHCl <sub>3</sub> (1:1) aplicando extracción en fase sólida.	16

<p>Isoniacida Piracinamida Cefadroxil cefalexin cefactor</p>	<p>Columna: C-18 (25cmx4mm) Fase móvil:(isocrático), tetrabutilamonio, 25mM/metanol/acetoniitrilo(32:1:1), pH 3 ajustado con trietilamina, (1.5 ml/min)</p>	<p>UV- 248 nm</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>Modalidad cromatográfica de par iónico. Las muestras son disueltas en la fase móvil</p>	<p>17</p>
<p>Isoniacida Piracinamida Cefaclor cefalexin Minociclina</p>	<p>Columna: C-18 (25cmx4mm) Fase móvil:(isocrático), sulfato de tetrabutilamonio, 25mM/metanol/acetoniitrilo (48:1:1), (1.5 ml/min)</p>	<p>UV-248 nm</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>Modalidad cromatográfica de par iónico. Las muestras son disueltas en la fase móvil.</p>	<p>18</p>
<p>Isoniacida Piracinamida Etionamida morfazinamida Ác. p-aminosalicílico Ác. nicotínico Ác. isonicotínico</p>	<p>Fase móvil: (isocrático), A) octilamina, 5 mM, pH 3 ajustado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. B) octilamina, 5 mM, pH 8 ajustado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. C) 1,6-diaminohexano, 5mM, pH 6 ajustado con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.</p>	<p>UV</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas Plasma Suero</p>	<p>Son comparadas diferentes fases móviles con distintos reactivos de interacción iónica. En las muestras de suero y plasma la matriz no interfiere. Se obtienen buenas recuperaciones en los 3 casos &gt; 96%.</p>	<p>19</p>
<p>Rifampicina 25-deacetilrifampicina</p>	<p>Columna: C-18 (25cmx4mm) Fase móvil: metanol/tampón fosfato, 10mM, pH 5.2 (13:7), (1ml/min).</p>	<p>UV-254</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas Plasma Orina</p>	<p>Análitos disueltos en 5µl de metanol y añadidos a 90µl de suero u orina. Se determinan en presencia de isoniacida y piracinamida</p>	<p>20</p>
<p>Rifampicina 25-deacetilrifampicina</p>	<p>Columna: C-18 (15 cmx4.6 mm) Fase móvil:(isocrático), metanol/KNO<sub>3</sub>, 50mM</p>	<p>UV- 334 nm y electroquímica, 450 mV</p>	<p>Suero y orina</p>		<p>21</p>

Rifampicina 25-deacetilrifampicina	Columna: C-18 (25cmx4mm) Fase móvil: (isocrático), acetónitrilo/ tampón fosfato 0.1M, pH 4 (19:31), (1.2 ml/min)	UV- 340 nm	Plasma	0.5 ml de plasma se mezclaron con 2 ml de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . La mezcla fue extrahida con cloroformo, el extracto fue evaporado hasta sequedad y el residuo disuelto en 300 µl de acetónitrilo/2-propanol (1:1).	22
Rifampicina 25-deacetilrifampicina	Columna: C-8 Fase móvil: (isocrático), acetónitrilo/tampón fosfato, 10mM, pH 3.5	UV- 254 nm	Plasma y fluido cerebroespinal	A las muestras se les añade ácido ascórbico como antioxidante. Se hace una doble extracción con éter etílico/diclorometano (3:2). El extracto se evapora y el residuo es disuelto en metanol	23
Isoniacida Acetilisoniacida Hidracina	Columna: C-8 (25 cmx4.6 mm) Fase móvil: (gradiente en etapas), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM/ B[acetónitrilo/metanol (4:1)]: 40% B durante 1 min y 70% B durante 4.5 min, (1 ml/min)	UV- 340 nm	Fluidos biológicos	Muestras fueron hidrolizadas con 20 µl de HCl, 6M durante 1 h a 80°C.	24
Isoniacida Hidracina	Columna: C-18 (30cmx3.9 mm) Fase móvil: (isocrático), acetónitrilo/ác. Heptanosulfónico, 5 mM, pH 6/trietanolamina (175:75:1), (1 ml/min).	UV- 320 nm	Plasma y fluido cerebroespinal	Se ajustó el pH de las muestras a 4 con ácido acético. Las impurezas fueron extraídas con hexano. Los derivados se prepararon en fase acuosa que contenía 0.1% de etanol, salicilaldehído y 10% de ácido acético, la mezcla se calentó a 60°C durante 30 min. Tras enfriarse se añadió tampón fosfato, 1M, pH 6.5 y los derivados se extrajeron con dietiléter seguido de centrifugación y evaporación hasta sequedad. El residuo fue disuelto en fase móvil	25
Isoniacida Hidracina Ácido isonicotínico	Columna: C-18 (25 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), tampón fosfato 70 mM, pH 6.8 y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.1 M, (0.8 ml/min)	Fluorimétrica- 418 nm (excitación a 316 nm)	Orina	El método puede ser aplicado para el fenotipo acetilador. El equipo está dotado de un simple reactor fotoquímico.	26

<p><b>Isoniacida</b> <b>Hidracina</b> <b>Ácido isonicotínico</b> <b>isonicotinilglicina</b></p>	<p>Columna: C-18 (15 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), tampón fosfato, 10mM, pH 3 y propanosulfonato de sodio 5 mM</p>	<p>Fluorimétrica- 410 nm (excitación a 320 nm)</p>	<p>Orina</p>	<p>La detección fue mediante reacción post-columna en una bovina (15 mx0.5mm) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40mM en tampón fosfato, pH 7 a 150°C.</p>	<p>27</p>
<p><b>Isoniacida</b></p>	<p>Columna: C-18-CN (25 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/ formiato amónico, 5 g/l (40:60), (1 ml/min)</p>	<p>Electroquímica, +800 mV</p>	<p>Plasma</p>	<p>El plasma fue vigorosamente agitado con 150 µl de disolución acuosa con 10% ZnSO<sub>4</sub></p>	<p>28</p>
<p><b>Aconiacida</b></p>	<p>Columna: C-18 (25 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/ formiato amónico, 5 g/l (40:60), (1 ml/min)</p>	<p>UV- 313 nm</p>	<p>Plasma</p>	<p>El plasma fue inyectado directamente</p>	<p>28</p>
<p><b>Piracinamida</b> Ác. piracinoico Ác. 5-hidroxi piracinoico 5-hidroxi piracinoico N-metilpiracinoico</p>	<p>Columna: C-18 (15 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), tampón fosfato, 20mM, pH 6, 4% metanol y bromuro de tetrapentilamonio, 6 µM, (0.8 ml/min)</p>	<p>UV- 268 nm</p>	<p>Plasma</p>	<p>A 0.5 ml de plasma fueron se le aplicaron extracción en fase sólida. Los analitos fueron eluidos con 4x400 µl de metanol y 30µl de tampón fosfato, 1M, pH 5.5. El extracto se evaporó hasta sequedad y fue disuelto en fase móvil.</p>	<p>29</p>
<p><b>Piracinamida</b> <b>Metabolitos</b></p>	<p>Columna: C-18-CN (25 cmx4.6 mm) Fase móvil: (isocrático), metanol/ hidróxido de tetrapentilamonio, 5 mM, pH 3 (4:1), (1 ml/min)</p>	<p>UV- 265 nm</p>	<p>Plasma</p>	<p>eluyendola con fase móvil 500 µl de plasma se extrajeron con 1 ml de 2-propanol/cloroformo (1:1), la mezcla se agitó durante 30 s y extraída en fase sólida</p>	<p>30</p>
<p><b>Piracinamida</b> Ác. piracinoico Ác. 5-hidroxi piracinoico 5-hidroxi piracinoico</p>	<p>Columna: C-18 (25 cmx4 mm) Fase móvil: (isocrático) Tampón fosfato, 10mM, pH 5.2, (0.9 ml/min)</p>	<p>UV</p>	<p>Orina</p>	<p>Orina ultrafiltrada</p>	<p>31</p>

## COMPORTAMIENTO DE CREATININA, ISONIACIDA, PIRACINAMIDA Y RIFAMPICINA EN DIFERENTES FASES MÓVILES.

Los estudios cromatográficos se han llevado a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, equipado con:

- 1.- Desgasificador.
- 2.- Bomba cuaternaria, que nos permite trabajar en modo gradiente.
- 3.- Válvula de inyección manual con bucle de muestra variable. Para los estudios se ha seleccionado un volumen de inyección de 20  $\mu$ l.

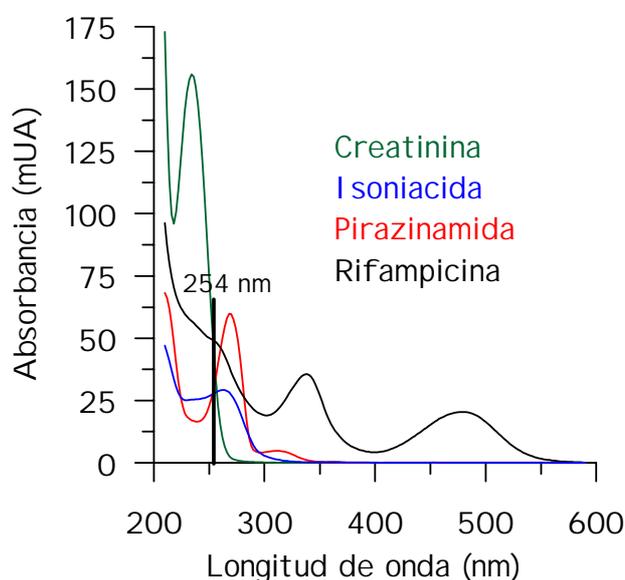
4.- Detector fotométrico de diodos, este detector permite cubrir un intervalo de longitudes de onda entre 190 y 600 nm. Una de las ventajas, es la rapidez en la adquisición de las medidas, ya que se pueden obtener los espectros de absorción de los picos, o, simultáneamente diversos cromatogramas a distintas longitudes de onda, esto permite trabajar a valores de máxima absorbancia. También nos permite obtener un diagrama en tres dimensiones (absorbancia, tiempo, longitud de onda), y además, por medio de este sistema, podemos verificar la homogeneidad o pureza de un pico cromatográfico.

El equipo está dotado de un ordenador a través del cual y mediante el programa HPChem, controlamos el sistema cromatográfico. Para la separación de los analitos se ha utilizado una columna analítica C-18 (150 mm x 3.9 mm), el relleno de la columna está formado por cadenas de 18 átomos de carbono [octodecil-silano (ODS)]. A la columna se le acopló una precolumna del mismo material (40 mm x 3.9 mm).

Se prepararon disoluciones patrón que contenían 100 ppm de isoniacida (ISO) y piracinamida (PIR) y 400 ppm de creatinina (CRE). La disolución patrón de rifampicina (RIF) se preparó en una concentración de 100 ppm en presencia de 500

ppm de ácido ascórbico, para evitar la autoxidación de este analito. Las cuatro disoluciones patrones se prepararon en agua purificada (agua suministrada por un sistema que combina la destilación con la purificación por ósmosis inversa, de manera que se obtiene agua de calidad suficiente para cromatografía) y estuvieron durante cinco minutos en un baño de ultra sonido para su correcta disolución.

Para comenzar se registraron los espectros de absorción de cada analito, con el fin de seleccionar la longitud de onda más apropiada para llevar a cabo el estudio cromatográfico. En la **figura 4.1** se muestran los espectros de absorción obtenidos para cada compuesto en un medio tampón fosfato (20mM) y pH 7. Se observa que la creatinina presenta un máximo de absorción localizado a 234 nm. Isoniacida y pirazinamida muestran características espectrales similares con máximos de absorción a 263 nm para isoniacida y a 269 y 314 nm para pirazinamida. Rifampicina exhibe dos máximos de absorción a 340 y 475 nm, y un hombro poco definido sobre 250 nm.



**Figura 4.1.** - Espectros de absorción de los antibióticos y creatinina, en concentración de 5 ppm cada uno, en medio tampón fosfato (20mM) y pH 7.

La longitud de onda elegida para realizar los estudios posteriores fue 254 nm, ya que a esta longitud de onda tanto isoniacida, piracinamida como creatinina presentan una buena absorción. Si elegimos una longitud de onda mayor, se aumentaría la absorción en piracinamida e isoniacida, pero creatinina no se podría determinar, mientras que si elegimos una menor, perdemos sensibilidad en isoniacida y piracinamida. Aunque rifampicina presenta una buena absorción a 254 nm, para su determinación se eligió la longitud de onda de 475 nm, a la cual presenta un máximo, ya que sólo este analito, de los estudiados, absorbe en esta zona y se pueden evitar posibles interferencias de otros compuestos, en la aplicación a muestras de orina.

Se estudian diferentes variables químicas e instrumentales, con el fin de optimizar la fase móvil, tales como, la influencia del pH, cantidad de metanol en la fase móvil y velocidad del flujo. En todos los casos, los factores de capacidad y los valores de resolución se calcularon para establecer la mejor separación en el menor tiempo posible.

## **ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL**

Debido a la diferente polaridad de los analitos en estudio, así como a sus diferentes características espectrales, ha sido necesario el uso de un gradiente en conjunción con un detector fotométrico de diodos, programado para cambiar la longitud de onda de detección automáticamente.

Primeramente se optimizó la composición de la fase móvil para la separación de aquellos analitos que presentan polaridad más elevada y próxima entre sí: creatinina, isoniacida y piracinamida. Estas pruebas se hicieron en presencia de ácido ascórbico. Esta sustancia va a estar presente en las determinaciones conjuntas de los cuatro analitos, ya que se añade para evitar la auto-oxidación de rifampicina.

En este caso, al igual que en todas las experiencias posteriores, el metanol utilizado para preparar la fase móvil es de calidad "metanol para cromatografía en gradiente". Las fases son filtradas a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y desgasificadas cuidadosamente en un baño de ultrasonido, antes de ser utilizadas. Las disoluciones patrón de los analitos también se filtran a través de filtros intercambiables de celulosa regenerada de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, utilizados en un portafiltro adaptable a una jeringa.

### Influencia del pH

Elegimos como fase móvil inicial la mezcla *metanol : tampón fosfato (20mM) de pH 2.46 (10:90)* y un caudal de 1 ml/min. En estas condiciones se obtiene la separación de isoniacida y piracinamida, sin embargo creatinina sale junto al frente.

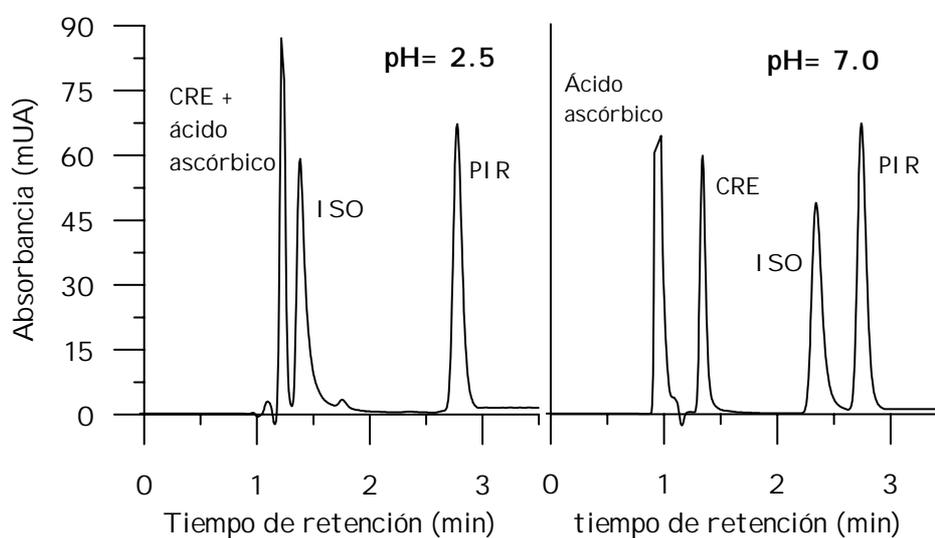
Llevamos a cabo la influencia del pH de la fase acuosa, manteniendo constante la proporción del metanol en la fase móvil [metanol:fase acuosa (10:90)]. La fase acuosa fue preparada a partir de sales de fosfato en concentración 20 mM. A partir de los tiempos de retención obtenidos en cada cromatograma y el tiempo de retención obtenido para el  $\text{NaNO}_3$  ( $t_0 = 0.94$  min), (sustancia iónica utilizada frecuentemente como trazador en cromatografía en fase invertida), se calculan los valores de  $k'$  para cada componente. Para el cálculo de la resolución entre los picos es necesario, así mismo, la obtención de la anchura de los mismos, la cual la calculamos por triangulación directamente en el programa de control del cromatógrafo descrito anteriormente. La resolución de cada pico se calcula respecto al pico anterior, en el caso de creatinina se calcula respecto al pico del ácido ascórbico.

En la **tabla 4.2** se representan los resultados correspondientes a los tiempos de retención, factor de capacidad y resolución de las analitos en estudio, obtenidos

para los distintos medios de acidez probados. En la **figura 4.2** se compara el cromatograma obtenido con la fase móvil elegida inicialmente, metanol:tampón fosfato (20mM y pH2.46) (10:90) y el obtenido con la misma fase móvil pero con un tampón de pH 7.

*Tabla 4.2. - Influencia del pH de la fase acuosa en la retención de los diferentes analitos.*

pH tampón fosfato	Creatinina			Isoniacida			Piracinamida		
	t <sub>R</sub> (min)	k'	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	k'	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	k'	R <sub>s</sub>
2.5	1.23	0.31	----	2.38	1.53	7.2	2.77	1.94	1.7
4.5	1.30	0.38	1.6	2.22	1.36	5.8	2.65	1.82	1.9
7.0	1.34	0.42	3.77	2.34	1.48	6.3	2.74	1.91	1.75



*Figura 4.2. - Cromatogramas obtenidos a diferentes valores de pH del tampón fosfato 20 mM*

Los resultados obtenidos ajustando el pH de la fase móvil acuosa a un valor de 8, no aportaron ninguna ventaja (no se mejoraron los valores de  $k'$  y  $R_s$ ) respecto a los obtenidos a pH 7, por lo que se decidió elegir éste como pH óptimo para continuar los estudios. No se probaron valores de pH superiores ya que en columnas C-18, que es la que nosotros empleamos, se aconseja trabajar en un rango de pH entre 2 y 8, para no acelerar el deterioro de las cadenas de hidrocarburos.

### Influencia del porcentaje de metanol en la fase móvil

A continuación variamos la proporción de metanol en la fase móvil con objeto de mejorar la retención de creatinina. En la **tabla 4.3** se muestran los tiempos de retención, los factores de capacidad y la resolución, obtenidos para cada analito en cada una de las fases ensayadas.

**Tabla 4.3.** - Influencia del porcentaje de disolvente orgánico presente en la fase móvil metanol/tampón fosfato (20mM y pH 7), en la retención de los analitos.

% Metanol	Creatinina			Isoniacida			Piracinamida		
	$t_R$ (min)	$k'$	$R_s$	$t_R$ (min)	$k'$	$R_s$	$t_R$ (min)	$k'$	$R_s$
10	1.34	0.42	3.77	2.34	1.48	7.2	2.74	1.91	1.75
8	1.42	0.51	4.53	2.39	1.54	6.1	3.10	2.30	3.1
5	1.53	0.63	5.6	2.94	2.13	8.9	3.94	3.19	4.4

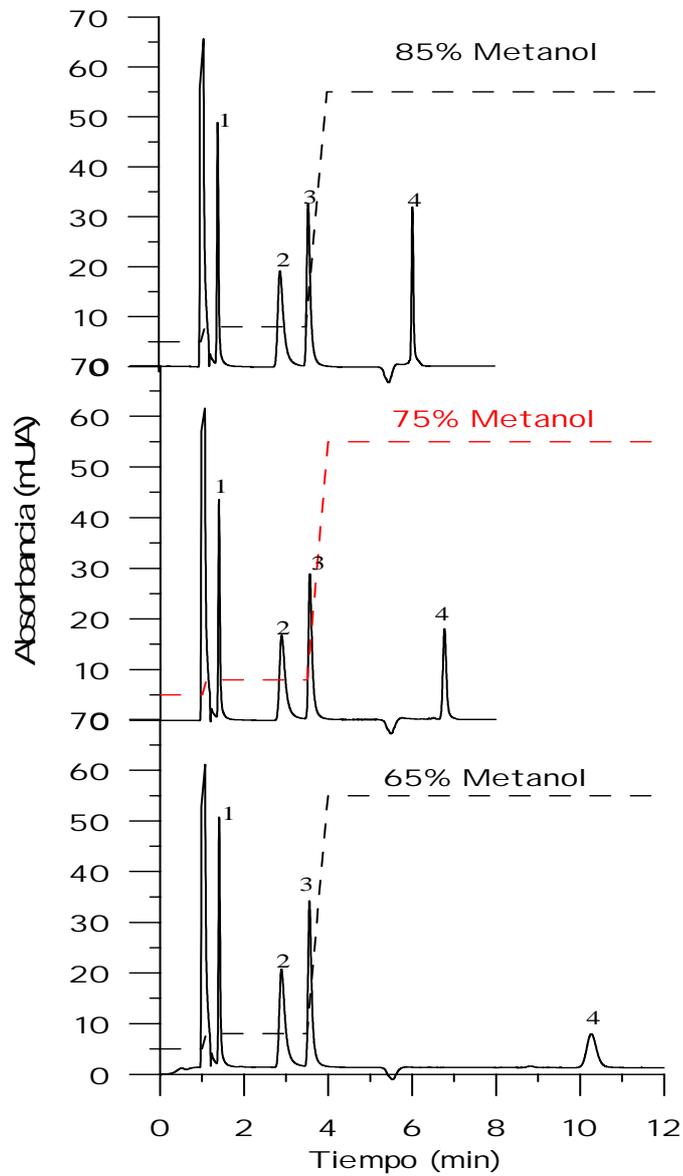
Los mejores factores de capacidad, así como de resoluciones se obtienen para una fase que contiene el 5 % de metanol, no así los tiempos de retención, ya que estos son algo mayores. Por lo tanto la fase elegida ha sido un gradiente, en el cual durante 1 min se pasa una fase móvil con un 5 % de metanol y a partir de ahí se cambia a otra

con un 8 % de metanol, con esto intentamos obtener la mejor retención de creatinina y no aumentar mucho los tiempos de retención de isoniacida y piracinamida. A pesar de que el valor de  $k'$  para creatinina es algo bajo, sin embargo el pico está perfectamente definido, separado del frente y resuelto a línea base.

Posteriormente, una vez elegidas las condiciones óptimas para la separación de creatinina, isoniacida y piracinamida, se incorporó rifampicina a la mezcla patrón. Previamente se realizaron ensayos con rifampicina y ácido ascórbico en medio isocrático, con el fin de conocer el comportamiento de rifampicina a distintas proporciones de fase móvil metanol / tampón fosfato (20mM y pH 7), comprobando que el tiempo de retención de rifampicina aumentaba al disminuir la proporción de metanol, siendo superior a 5 min con una proporción del 65 % de metanol en la fase móvil.

Después de estos estudios preliminares, se analizó una muestra con los cuatro analitos, creatinina, isoniacida, piracinamida y rifampicina, en presencia de ácido ascórbico. Para la determinación de los tres primeros utilizamos el gradiente optimizado primeramente y para la determinación de rifampicina, una vez hubo salido el pico de piracinamida a los 4 minutos, se probaron gradientes con diferentes proporciones de metanol: 65 %, 75 % y 85 %.

En la **figura 4.3** se muestran los cromatogramas obtenidos para cada proporción, obteniéndose los mejores resultados para una fase móvil con un 75 % de metanol ya que, como podemos observar, el pico de rifampicina sale más alejado de la depresión debida al cambio de gradiente, y el tiempo de retención no se ve muy incrementado respecto a la proporción del 85 % de metanol. Como se dijo en un principio, la rifampicina se determina a una longitud de onda de 475 nm, por lo que a los 4.5 min se cambia la longitud de onda del detector.



*Figura 4.3.* - Cromatogramas correspondientes a las distintas proporciones de metanol ensayadas para la separación de rifampicina (85, 75 y 65 %), en muestras que contenían 5 ppm de cada analito. Los picos corresponden a: 1, creatinina; 2, isoniacida; 3, piracinamida; 4, rifampicina. (----) Evolución de la proporción de metanol en la fase móvil utilizada, metanol:tampón fosfato (0.02 M) a pH 7.

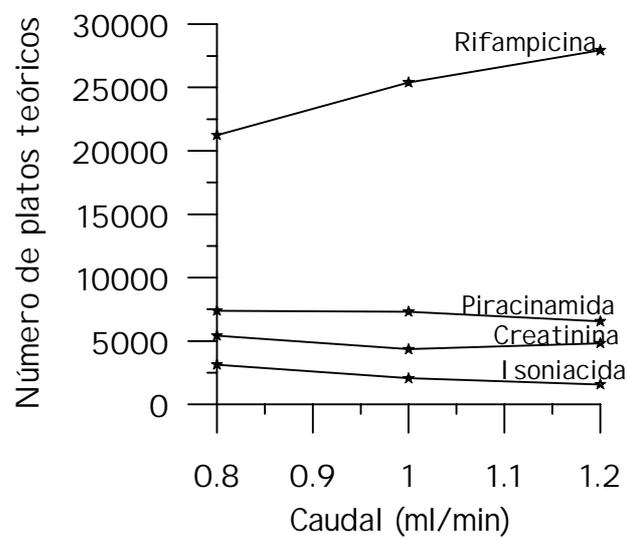
Por lo tanto, la fase móvil óptima para la separación de estos cuatro analitos es un gradiente que consta de tres etapas: ❶ la primera etapa comienza con una fase que contiene un 5 % de metanol en tampón fosfato 20 mM y pH 7 y se mantiene 1 min. ❷ En la segunda etapa se cambia a un 8 % el contenido de metanol de la fase móvil, manteniéndolo durante 3 min. ❸ Por último, se cambia a un 75 % el contenido de metanol y se mantiene hasta completar los 8 minutos que dura el tiempo total de elución. De esta forma, creatinina eluye en la primera etapa ( $t_R = 1.51$  min); isoniacida ( $t_R = 2.86$  min) y piracinamida ( $t_R = 3.53$  min) lo hacen en la segunda etapa y rifampicina ( $t_R = 7.01$  min) lo hace en la última.

El acondicionamiento de la columna, para volver a las condiciones de la fase móvil inicial (primera etapa), requiere un tiempo de 15 minutos. Durante los primeros 10 minutos se pasa agua ultrapura para eliminar el metanol y en los 5 minutos restantes se hace pasar fase móvil, en las proporciones indicadas en la primera etapa. Por lo tanto, el tiempo transcurrido entre dos inyecciones es de 23 minutos.

### Selección del caudal de la fase móvil.

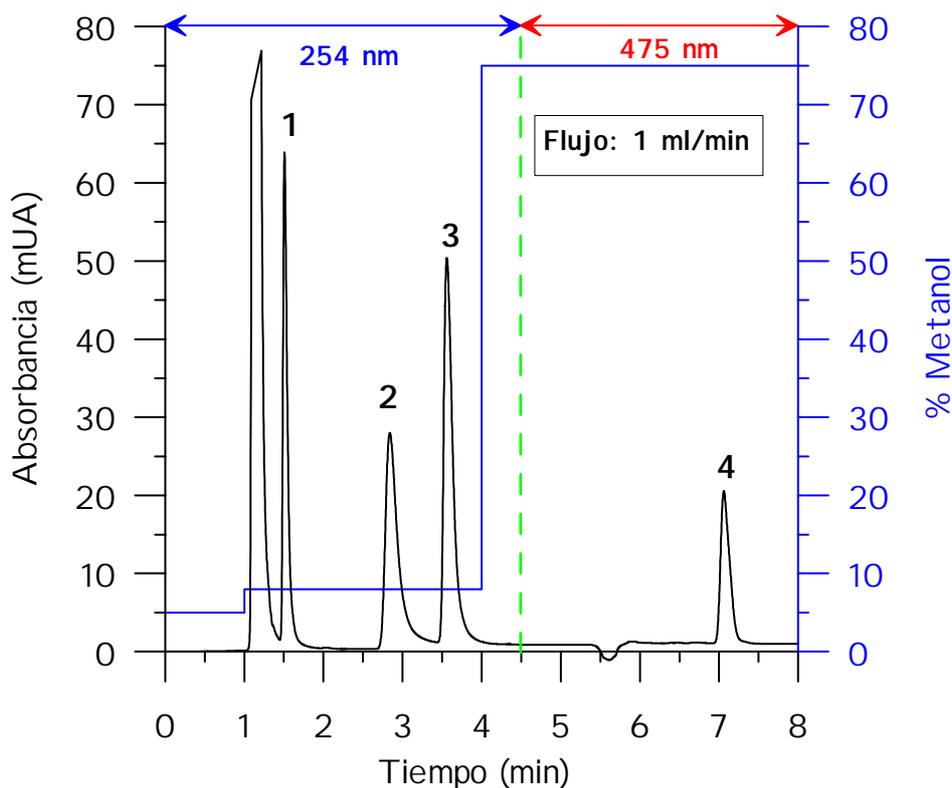
Los estudios anteriores se han efectuado usando un caudal de 1 ml/min de fase móvil. Con objeto de elegir el caudal más apropiado, se ha estudiado como influye éste en la eficacia del sistema cromatográfico. Para ello se preparan muestras que contienen 5 ppm de cada analito y se inyectan en el sistema, utilizando la elución en gradiente optimizada anteriormente, variando el caudal entre 0.8 ml/min y 1.2 ml/min.

En la **figura 4.4**, en la cual se representan el número de platos teóricos para cada analito en los diferentes caudales ensayados. Se puede apreciar que el número de platos teóricos no varía sustancialmente para ninguno de los analitos, por lo que hemos optado por seguir utilizando un caudal de 1 ml/min.



*Figura 4.4. - Número de platos teóricos para cada analito en cada uno de los caudales ensayados.*

En la **figura 4.5** se representa el cromatograma obtenido una vez optimizadas todas las variables, así como la evolución del % de metanol en la fase móvil. A los 4.5 min de análisis, se cambia la longitud de onda de detección de 245 nm a 475 nm, longitud de onda a la cual, como hemos dicho anteriormente, sólo absorbe rifampicina.



**Figura 4.5.** - Cromatograma de una disolución estándar que contiene los tres antibióticos y creatinina en concentración de 5 ppm, en presencia de ácido ascórbico (25 µg/ml). Picos: 1, creatinina, 2 isoniácida, 3 piracinamida, 4 rifampicina. Evolución del metanol en la fase móvil (—).

**ESTUDIO DEL METABOLITO DE ISONIACIDA: ACETILISONIACIDA**

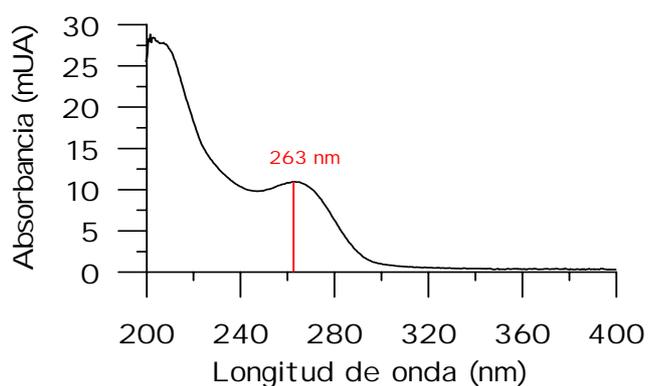
En este punto de la investigación nos resultó interesante la incorporación de un nuevo analito, acetilisoniacida (AI SO), el cual es el metabolito más importante de isoniacida y que es metabolizado en el hígado.

Isoniacida y sus metabolitos son excretados principalmente por la orina, como ya se comentó en la introducción de esta tesis, y como nuestro interés es la aplicación del método cromatográfico a la determinación de estos antibióticos en fluidos biológicos, orina concretamente, resultaría muy interesante poder tener algún metabolito ya que estos están presentes en la orina de los pacientes sometidos a tratamiento.

Acetilisoniacida fue sintetizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Eidus y col. (38) que consiste en:

A 10 ml de una disolución patrón de isoniacida 60 mM, se le adicionan 0.5 ml de anhídrido acético, se agita la disolución resultante y se deja a temperatura ambiente durante 6 h, así obtenemos una disolución patrón de acetilisoniacida 57 mM.

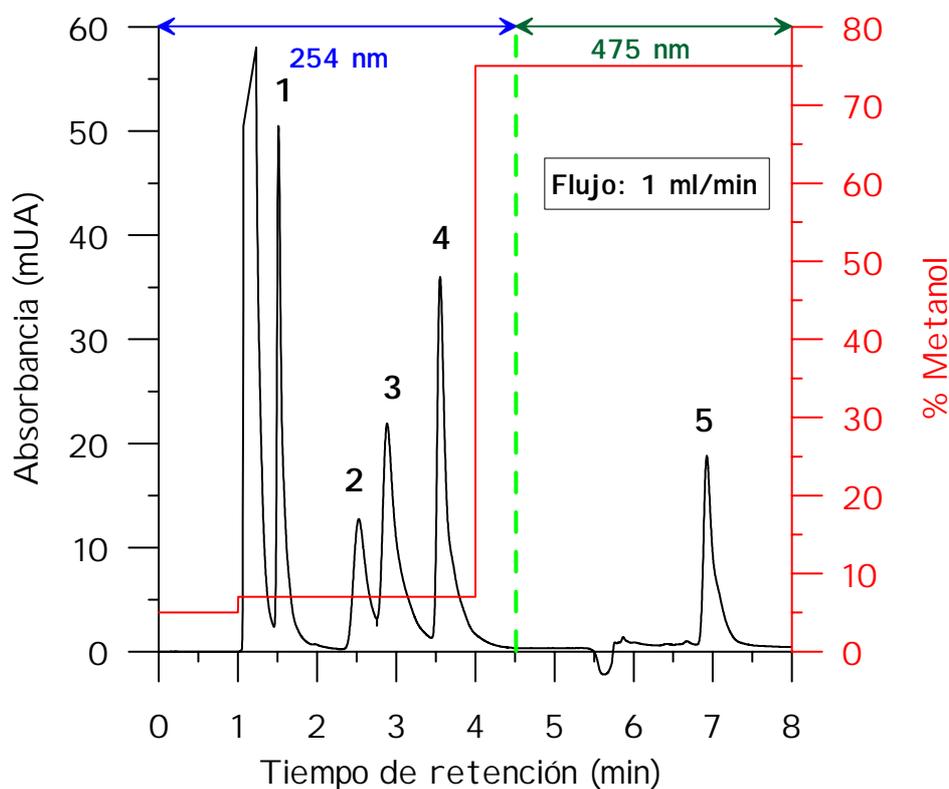
En la **figura 4.6** se representa el espectro de una disolución patrón de acetilisoniacida de 5 ppm, sintetizada mediante el método anteriormente descrito.



**Figura 4.6.** - Espectro de absorción de una disolución patrón de 5 ppm de acetilisoniacida, en medio tampón fosfato 20 mM y pH 7.

El espectro de acetilisoniacida, en el medio utilizado para la separación de los otros metabolitos, presenta un espectro similar al de isoniacida, con un máximo a la misma longitud de onda, 263 nm.

Una vez introducido el nuevo metabolito, el cromatograma estándar de una disolución patrón conteniendo todos los analitos y mediante la aplicación del método cromatográfico optimizado, se representa en la **figura 4.7**. En la figura también se representa la elución en gradiente utilizado, así como las longitudes de onda a las cuales se llevan a cabo la detección de los picos de los analitos.



**Figura 4.7.** - Cromatograma de disolución patrón de: 1, creatinina; 2, acetilisoniacida; 3, isoniacida; 4, piracinamida y 5, rifampicina; en concentración de 5 ppm cada uno y en presencia de ácido ascórbico, 25 ppm. Evolución del metanol en la fase móvil (—).

En la **tabla 4.4** se muestran los valores de los tiempos de retención, factores de capacidad y de resolución calculados para el cromatograma estándar obtenido por la aplicación del método cromatográfico propuesto a una disolución patrón de los cinco analitos en concentración de 5 ppm cada uno, dicha disolución se inyectó 9 veces en el sistema cromatográfico con objeto de obtener los valores de repetitividad, de los parámetros en estudio.

Se comprueba que el peor valor de resolución se obtienen para isoniacida ( $R=1.01$ ), aunque con este valor se obtiene una resolución de pico del 95 %.

*Tabla 4.4. - Tiempos de retención, resolución y factores de capacidad.*

Analitos	Tiempo de retención $t_r(\pm \sigma)$ , min, n=9	Factor de capacidad $k'(\pm \sigma)$ , n=9	Resolución $R_s(\pm \sigma)$ , n=9
Creatinina	1.52 (0.01)	0.61 (0.01)	3.75 (0.03)
Acetilisoniacida	2.53 (0.02)	1.69 (0.02)	4.01 (0.04)
Isoniacida	2.89 (0.03)	2.08 (0.03)	1.01 (0.01)
Piracinamida	3.57 (0.03)	2.79 (0.03)	2.02 (0.02)
Rifampicina	6.94 (0.03)	6.37 (0.02)	11.41 (0.03)

## PROCEDIMIENTO OPERATORIO. RECTAS DE CALIBRADO.

Se ha estudiado la variación que experimentan los picos de los distintos analitos al variar la concentración de los mismos presente en las muestras, con el objeto de establecer la relación existente entre las posibles señales analíticas a utilizar, altura o área de pico, y la concentración de los analitos. También se compara los resultados obtenidos mediante la calibración lineal univariante cuando se utilizan áreas o alturas como señal analítica. Para llevar a cabo este estudio se prepararon diferentes muestras, a partir de las disoluciones patrón de cada analito, que contenían entre 1 y 12 ppm de isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y rifampicina, y entre 1 y 80 ppm de creatinina. Las disoluciones se diluían con tampón fosfato 20m M de pH 7. De cada nivel de concentración se efectuaron tres inyecciones en el sistema cromatográfico. En las **figuras 4.8-12** se muestran las rectas de calibrado de la influencia de la concentración de cada compuesto, sobre la altura y el área de pico.

### Parámetros estadísticos y de fiabilidad

Los parámetros estadísticos y de fiabilidad que se derivan del análisis de las rectas obtenidas se recogen en las **tablas 4.4-8**. En ellas, además de los resultados de la calibración lineal univariante, están recogidos los valores de desviación estándar relativa obtenidos al realizar la repetitividad del método cromatográfico con una serie de 9 muestras iguales, cuya concentración para cada analito se especifica en las tablas. Asimismo se recogen los límites de detección encontrados por diferentes métodos y el límite de determinación calculado como se explicó en capítulos anteriores.

Como puede ser apreciado, en todos los casos, los mejores valores se obtuvieron para el área. En consecuencia, este parámetro ha sido elegido para la determinación de los analitos en compuestos farmacéuticos y muestras de orina.

CREATININA

Figura 4.8. - Rectas de calibrado de creatinina sobre la altura y el área de pico.

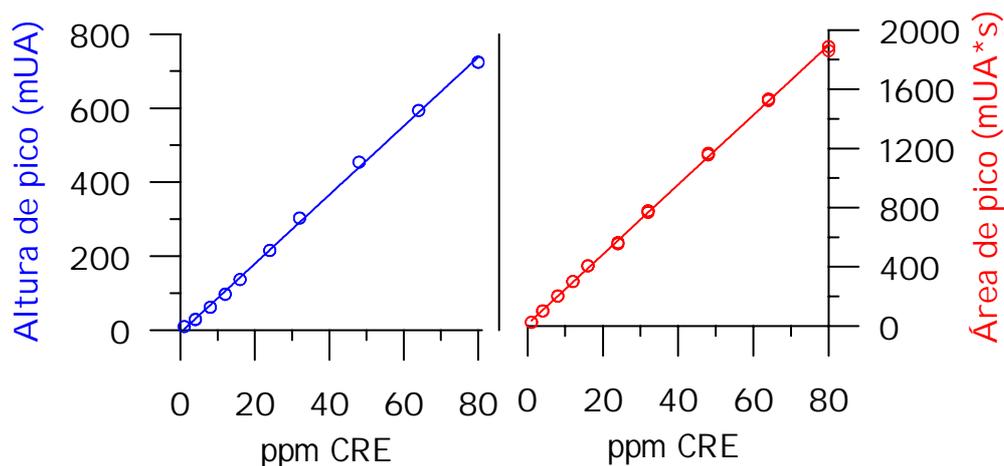


Tabla 4.5. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de creatinina.

Señal Analítica	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*s)
Ecuación de la recta	$H = 9.30*[CRE] - 6.19$	$A = 23.54*[CRE] + 13.57$
$\sigma_{pendiente}$	0.08	0.11
$\sigma_{ordenada}$	3.03	3.92
$\sigma_{tipica\ estimada}$	8.99	14.2
Coefficiente de correlación (R)	0.9994	0.9997
DER (%)	1.8 (5 ppm)	1.6 (5 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.98	0.49
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	2.5	1.3
Límite de determinación, ppm	6.8	4.24

**ACETILISONIACIDA**

Figura 4.9. - Rectas de calibrado de acetilisoniacida sobre la altura y el área de pico

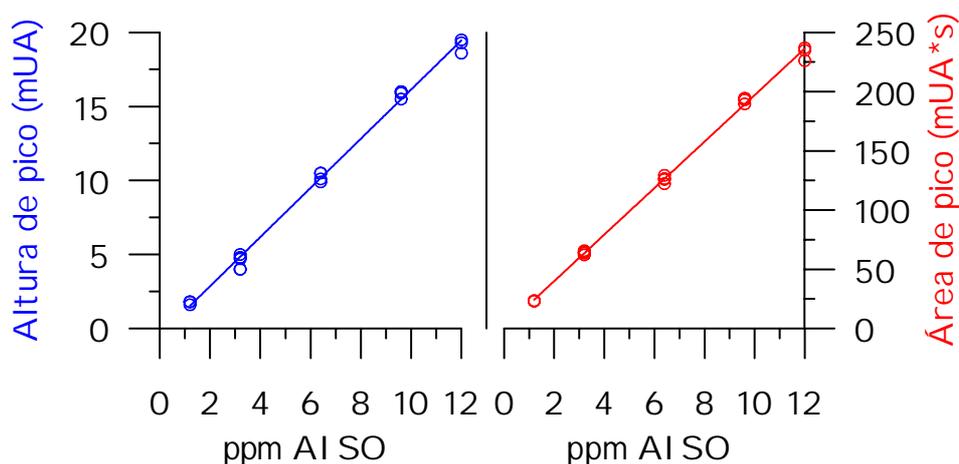
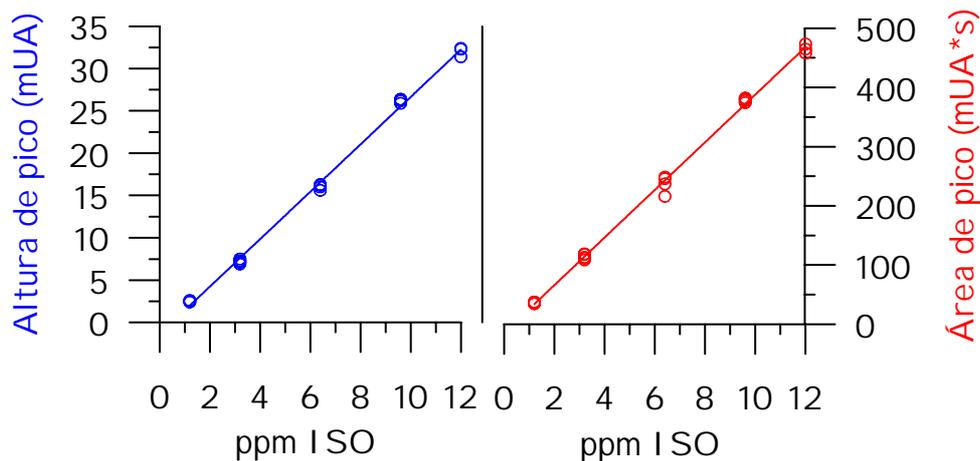


Tabla 4.6. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de acetilisoniacida.

Señal Analítica	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*s)
Ecuación de la recta	$H = 1.64*[AI SO] - 0.18$	$A = 19.60*[AI SO] + 1.45$
$\sigma_{pendiente}$	0.02	0.23
$\sigma_{ordenada}$	0.17	1.79
$\sigma_{típica\ estimada}$	0.35	3.62
Coefficiente de correlación (R)	0.9987	0.9991
DER (%)	4.3 (5 ppm)	3.2 (5 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.31	0.27
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	0.56	0.48
Límite de determinación, ppm	2.1	1.7

**ISONIACIDA**

*Figura 4. 10. - Rectas de calibrado de isoniacida sobre la altura y el área de pico*



*Tabla 4. 7. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de isoniacida.*

Señal Analítica	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*s)
<i>Ecuación de la recta</i>	$H = 2.80*[ISO] - 1.36$	$A = 40.20*[ISO] - 12.87$
$\sigma_{pendiente}$	0.03	0.36
$\sigma_{ordenada}$	0.24	2.77
$\sigma_{tipica\ estimada}$	0.57	5.61
Coefficiente de correlación (R)	0.9989	0.9995
DER (%)	2.1 (5 ppm)	0.9 (5 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.30	0.21
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	0.53	0.36
Límite de determinación, ppm	1.9	1.3

PIRACINAMIDA

Figura 4.11. - Rectas de calibrado de piracinamida sobre la altura y el área de pico

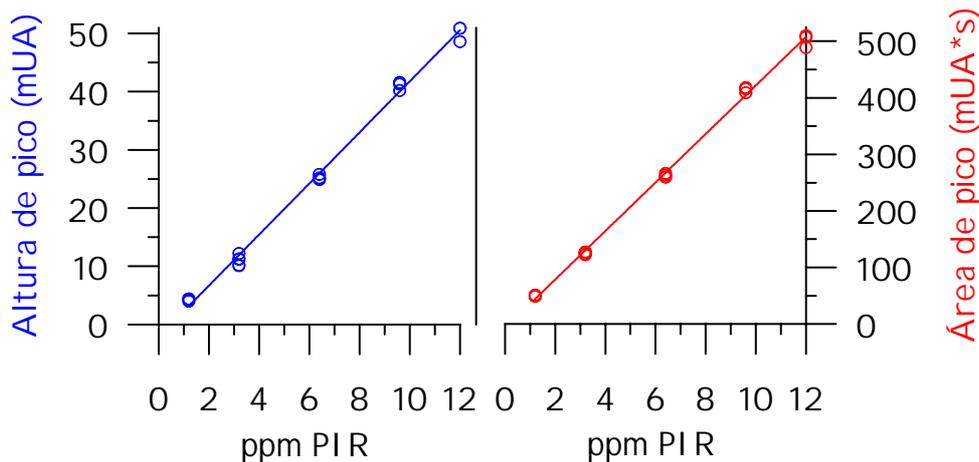


Tabla 4.8. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de piracinamida.

Señal Analítica	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*s)
<i>Ecuación de la recta</i>	$H = 4.37*[PIR] - 1.77$	$A = 42.83*[PIR] - 5.99$
$\sigma_{pendiente}$	0.07	0.56
$\sigma_{ordenada}$	0.49	4.24
$\sigma_{típica\ estimada}$	1.11	8.58
Coefficiente de correlación (R)	0.9982	0.9989
DER (%)	2.1 (5 ppm)	0.9 (5 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.37	0.29
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	0.67	0.52
Límite de determinación, ppm	2.4	1.9

RIFAMPICINA

Figura 4. 12. - Rectas de calibrado de rifampicina sobre la altura y el área de pico

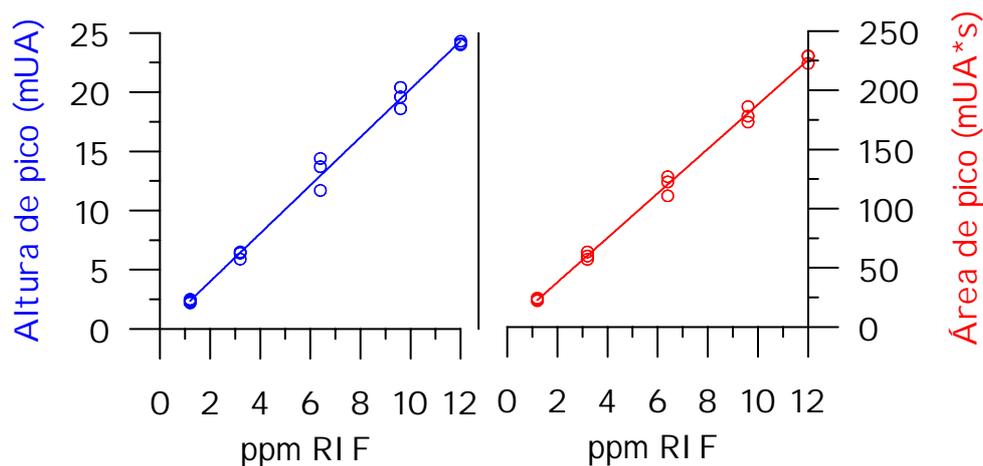


Tabla 4. 9. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de rifampicina.

Señal Analítica	Altura de pico (mUA)	Área de pico (mUA*s)
Ecuación de la recta	$H = 2.02*[RIF] + 0.03$	$A = 18.82*[RIF] - 0.10$
$\sigma$ pendiente	0.04	0.30
$\sigma$ ordenada	0.32	2.28
$\sigma$ típica estimada	0.65	4.62
Coefficiente de correlación (R)	0.9971	0.9983
DER (%)	8.0 (5 ppm)	6.0 (5 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.48	0.36
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	0.85	0.64
Límite de determinación, ppm	3.1	2.3

**APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO A LA DETERMINACIÓN  
DE LOS ANTIBIÓTICOS EN FORMULACIONES  
FARMACÉUTICAS Y MUESTRAS DE ORINA.**

**Determinación en formulaciones farmacéuticas.**

El método propuesto se aplicó a la determinación de los antibióticos en estudio en compuestos farmacéuticos. Los fármacos analizados y la composición detallada en el envase de cada uno, se muestran en la **tabla 4.9**.

*Tabla 4.9. - Formulaciones farmacéuticas analizadas.*

Formulación farmacéutica	Composición etiquetada
<i>Rifater</i>	<i>Por gragea:</i> 120 mg rifampicina; 50 mg isoniacida; 300 mg piracinamida; 104,9 mg de sacarosa y excipientes.
<i>Rifinah</i>	<i>Por gragea:</i> 300 mg rifampicina, 150 mg isoniacida; 181 mg de sacarosa y excipientes.
<i>Rifaldin</i>	<i>Por cápsula:</i> 300 mg rifampicina y excipientes.
<i>Rifaldin (en solución)</i>	<i>Por 100 ml:</i> 2 g rifampicina, 40 g de sacarosa; sulfitos y excipientes.

Para llevar a cabo la cuantificación de cada fármaco, mediante el método cromatográfico propuesto, se procedió de la siguiente manera:

Una gragea o cápsula fue transferida a un matraz de 1000 ml y diluida con agua purificada; el matraz fue llevado a un baño de ultrasonido para la correcta disolución del fármaco y diluido hasta la marca con agua purificada. De esta disolución, tomamos un volumen, de tal forma que la concentración del analito o analitos a determinar no exceda de 12 ppm, y lo llevamos a un matraz de 10 ml, enrasando con tampón fosfato.

Este procedimiento fue realizado en tres grageas o cápsulas por cada fármaco, y cada muestra fue inyectada tres veces. La disolución problema de *Rifaldin solución* fue preparada añadiendo 1 ml del fármaco a un matraz de 1000 ml y diluido hasta la marca con agua purificada. Al igual que con las otras preparaciones, se realizaron tres muestras y cada una fue inyectada tres veces.

En todos los casos, además de inyectarse las disoluciones problemas, también se inyectaron patrones de los analitos correspondientes en concentraciones conocidas.

La señal utilizada para el cálculo de la concentración de cada analito en las muestras problema, fue el área de pico.

En la **tabla 4.10** se muestran los resultados obtenidos por la aplicación del método cromatográfico. Las cantidades de rifampicina, isoniacida y piracinamida encontradas, están en concordancia con los valores etiquetados por los laboratorios *Marion Merrel Dow*, que comercializa dichos fármacos.

*Tabla 4.10. - Determinación simultánea de rifampicina, isoniacida y rifampicina en fármacos.*

Formulación comercial	Composición etiquetada	Composición encontrada	% Recuperación (%DER), (n=9)
Rifater, mg	Rifampicina 120	Rifampicina 126.1	105.1 (2.4)
	Piracinamida	Piracinamida	100.2 (1.8)
	300	300.7	95.2 (2.6)
	I soniacida 50	I soniacida 47.6	
Rifinah, mg	Rifampicina 300	Rifampicina 304.2	101.4 (5.3)
	I soniacida 150	I soniacida 147.9	98.6 (3.2)
Rilfaldín, mg cápsulas	Rifampicina 300	Rifampicina 321.0	107.0 (4.8)
Rifaldín solución, g/100 ml	Rifampicina 2.0	Rifampicina 2.1	108.0 (1.5)

## ESTUDIOS DE PUREZA DE PICO

Para completar los resultados obtenidos mediante la aplicación del método propuesto se muestran los cromatogramas correspondientes a los cuatro fármacos estudiados, así como los espectros correspondientes a los estudios de pureza de pico realizados en cada producto farmacéutico **figuras 4.13-23**

Los estudios de pureza de pico se realizan con el fin de comprobar la ausencia de interferencias de otros componentes en los productos farmacéuticos. El método utilizado para evaluar la pureza de pico de cada componente, consiste en el registro de varios espectros durante la elución del pico, uno en la parte ascendente (espectro 1), otro en el máximo (espectro 2) y otro en la parte descendente (espectro 3). Una vez superpuestos y normalizados deben coincidir en todas las longitudes de onda para que el pico se considere puro.

Este método tan sencillo fue posible aplicarlo, por poseer el equipo de cromatografía un detector de diodos en línea y un programa informático que hacen posible el registro de espectros.

Como podemos observar, en todos los casos se da una coincidencia espectral, por lo que podemos concluir que todos los picos son puros.

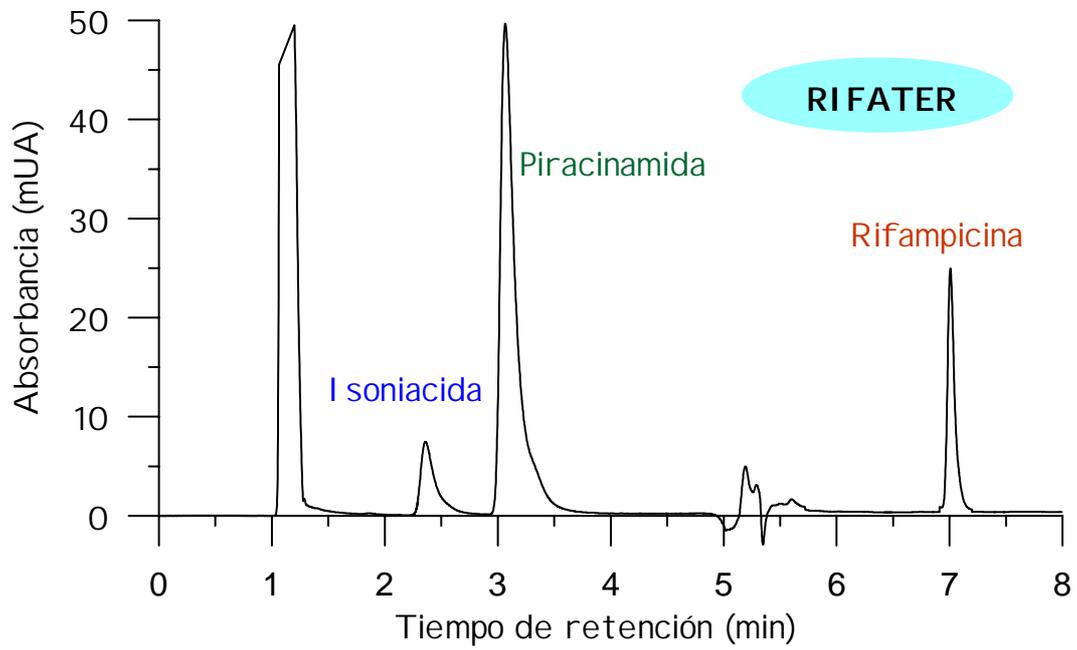


Figura 4.13. - Cromatograma de una disolución problema de Rifater

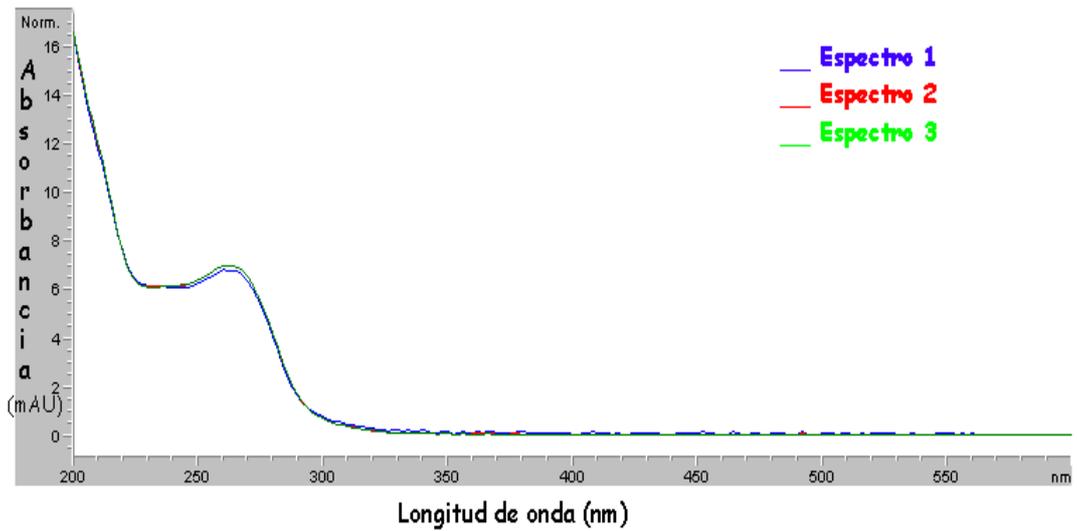


Figura 4.14. - Pureza de pico correspondiente a isoniacida en Rifater.

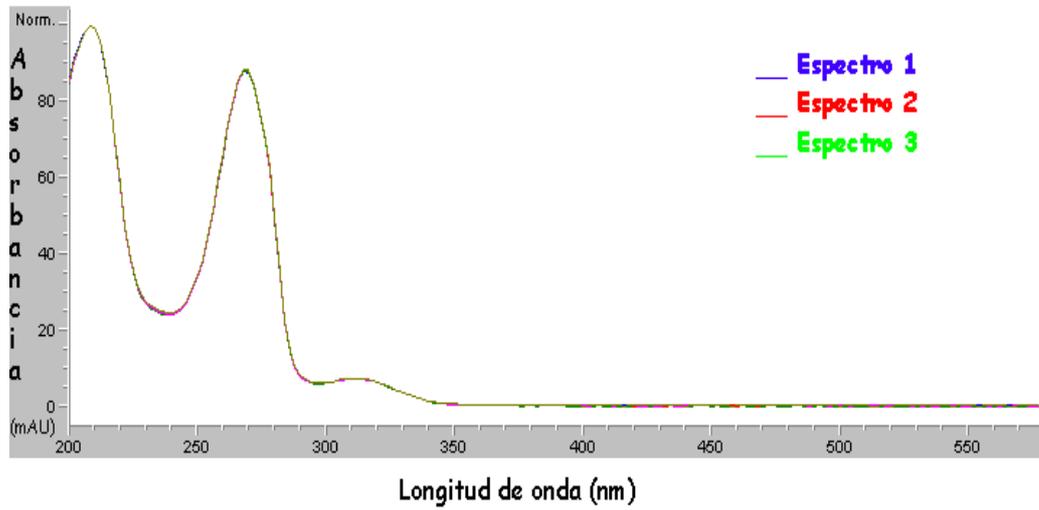


Figura 4.15. - Pureza de pico correspondiente a piracinamida en Rifater

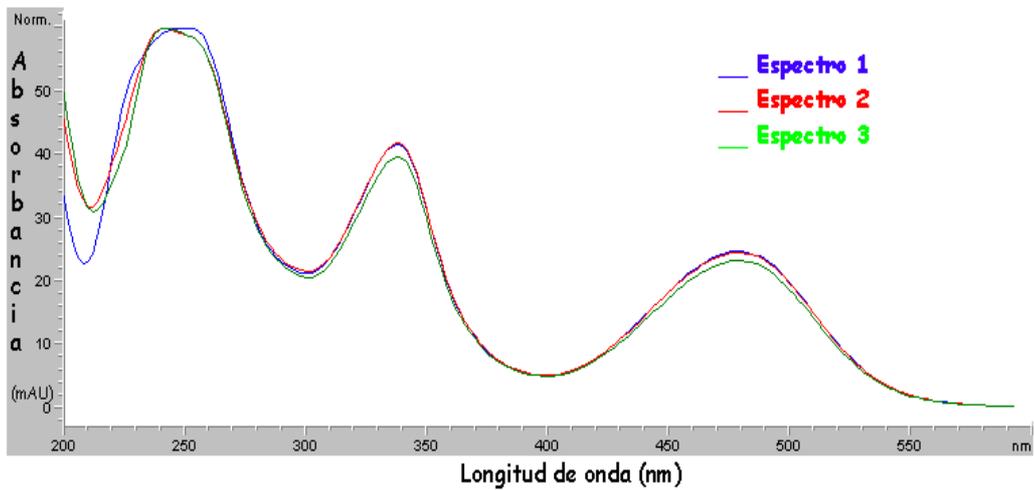
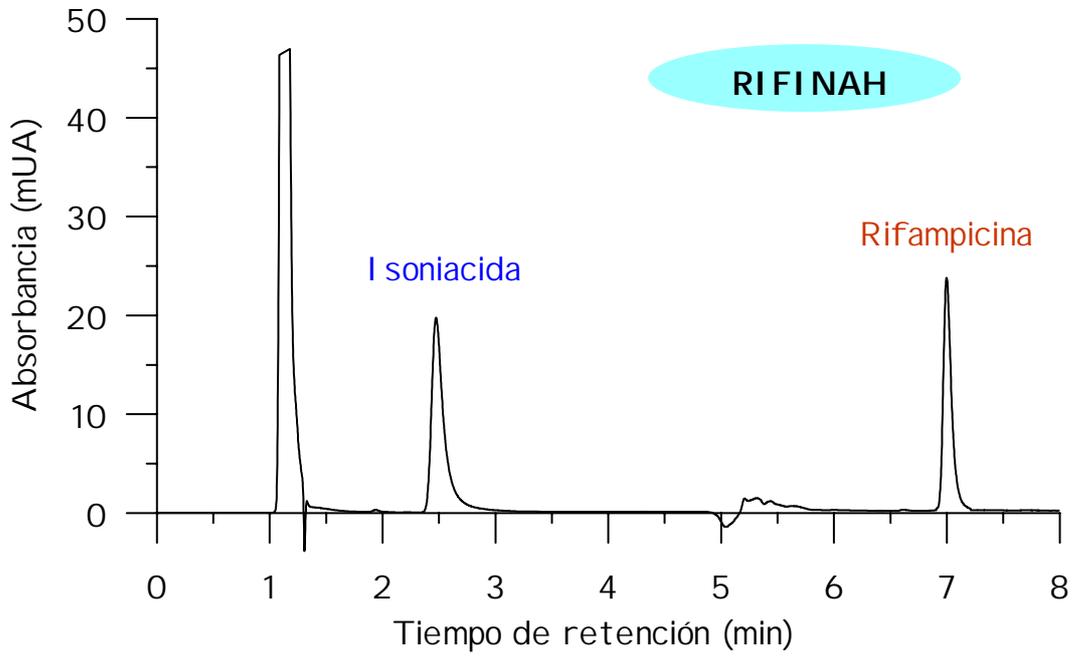


Figura 4.16. - Pureza de pico de rifampicina en Rifater



Figura

4.17. - Cromatograma de una disolución problema de Rifinah

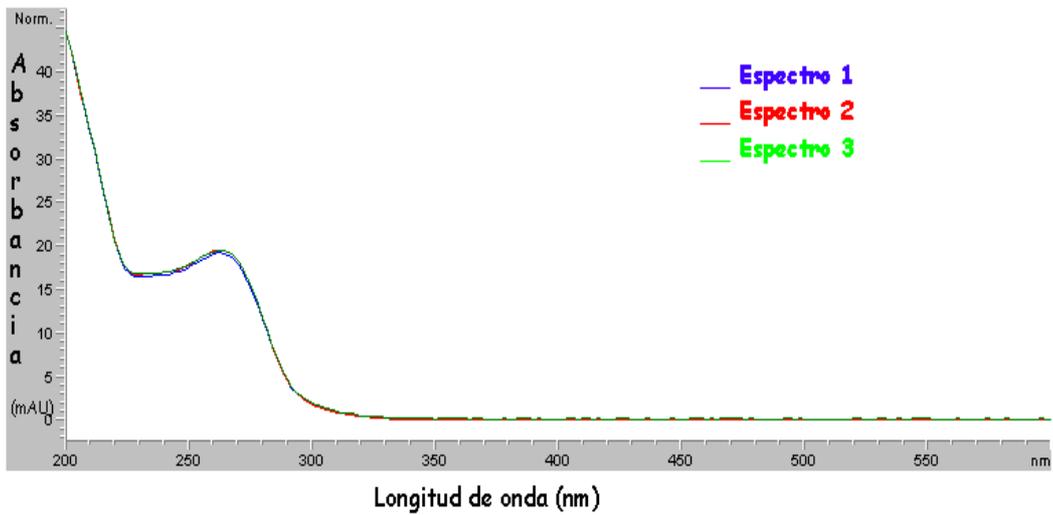


Figura 4.18. - Pureza de pico de isoniacida en Rifinah

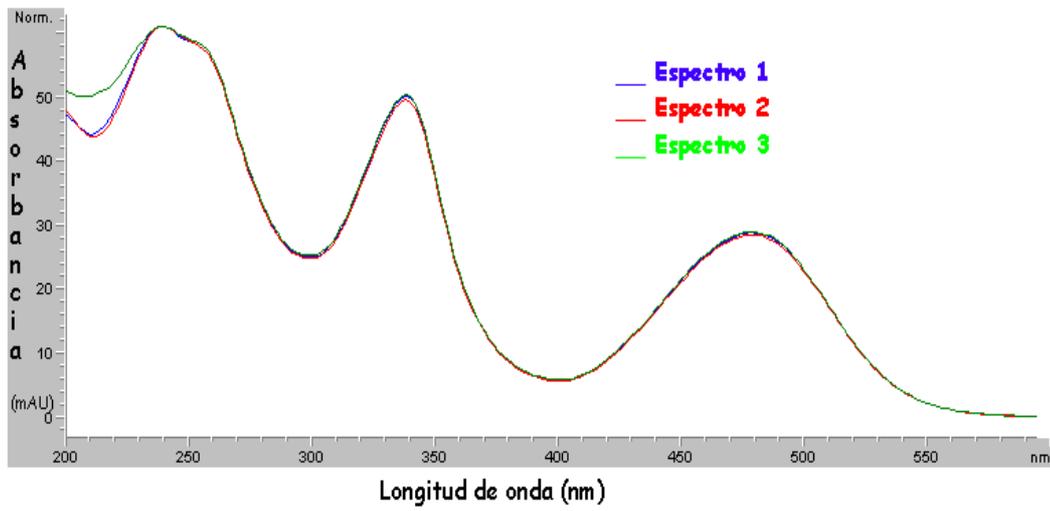


Figura 4.19. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rifinah

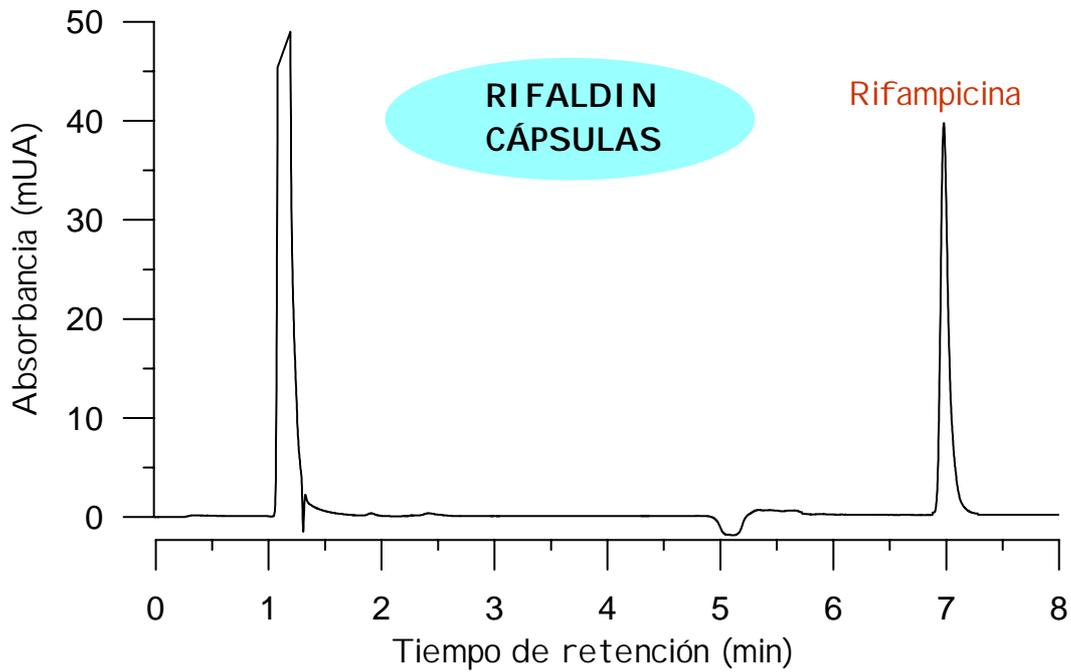


Figura 4.20. - Cromatograma de una disolución problema de Rifaldín cápsulas

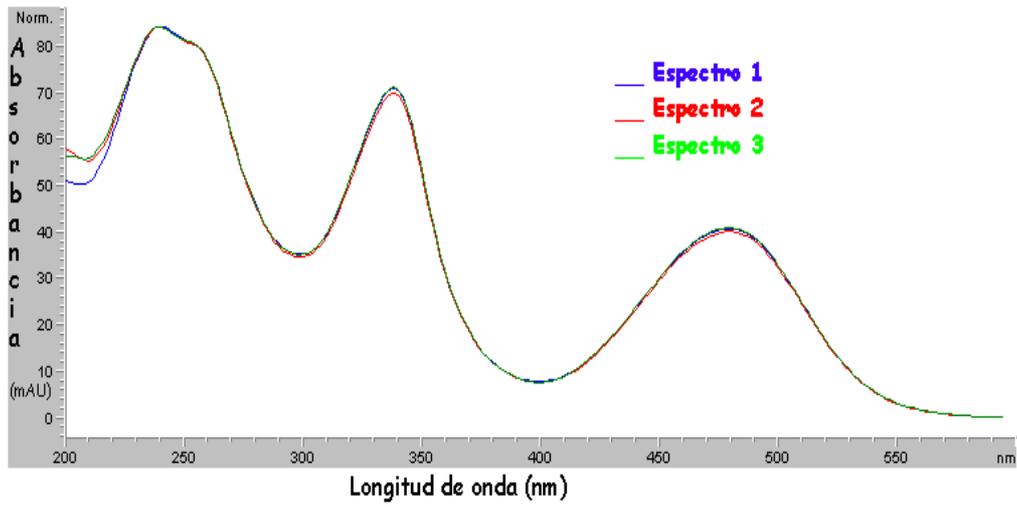


Figura 4.21. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rofaldín cápsulas.

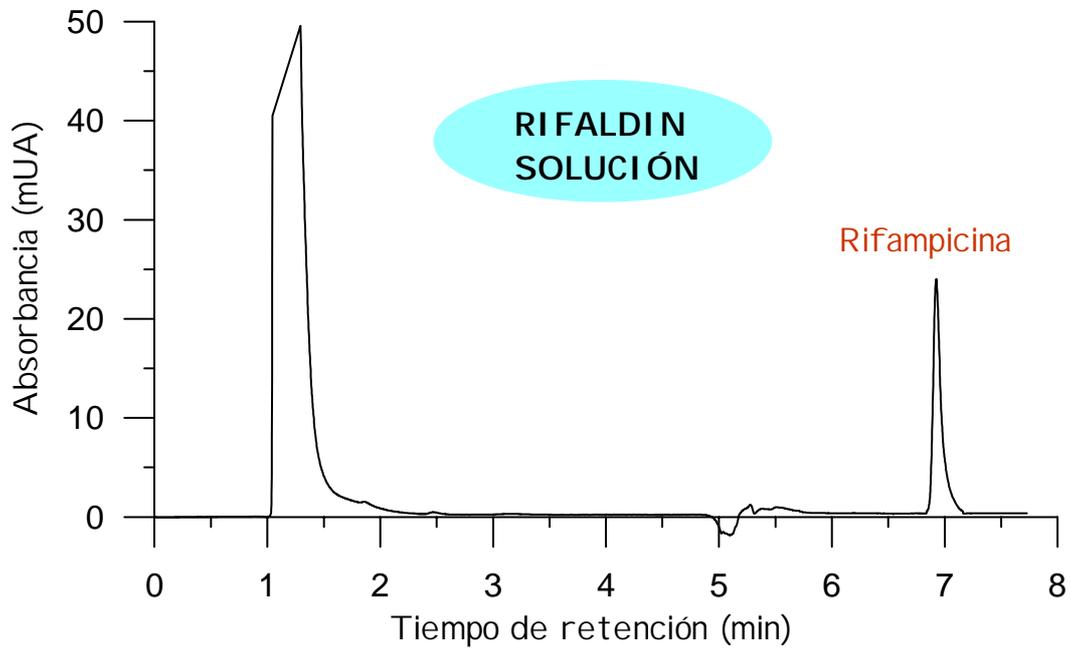
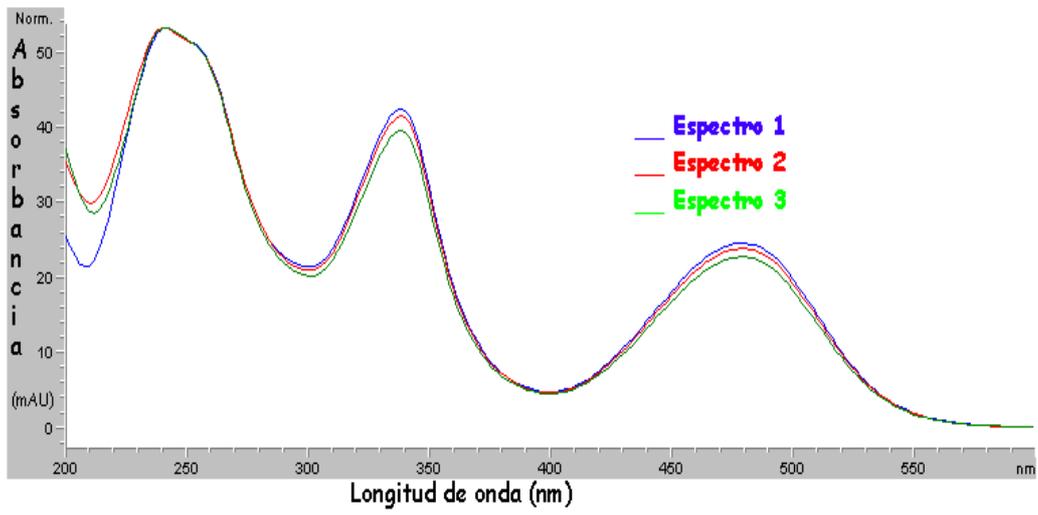


Figura 4.22. - Cromatograma de una disolución problema de Rifaldín solución.



*Figura 4.23. - Pureza del pico correspondiente a Rifampicina en Rifaldín solución.*

### **Análisis de muestras de orina patológica, procedente de un paciente bajo tratamiento**

El procedimiento cromatográfico ha sido aplicado a la determinación de rifampicina, en muestras de orina procedentes de un paciente voluntario, el cual seguía el tratamiento: *rifampicina, 600 mg en una toma diaria, preferiblemente por la mañana; etambutol, 400 mg tres veces al día; y otras formulaciones farmacéuticas que contenían ofloxacino, claritomicina, omeprazol y diflunisal.*

Las muestras de orina fueron recogidas en vasos de polietileno, a intervalos apropiados a lo largo de 24 horas y congeladas hasta su utilización, para impedir que los analitos sufrieran cambios.

En este caso sólo podremos aplicar el método a la determinación de rifampicina, ya que es sólo este antibiótico, de los tres estudiados en este trabajo, el que está presente en el tratamiento.

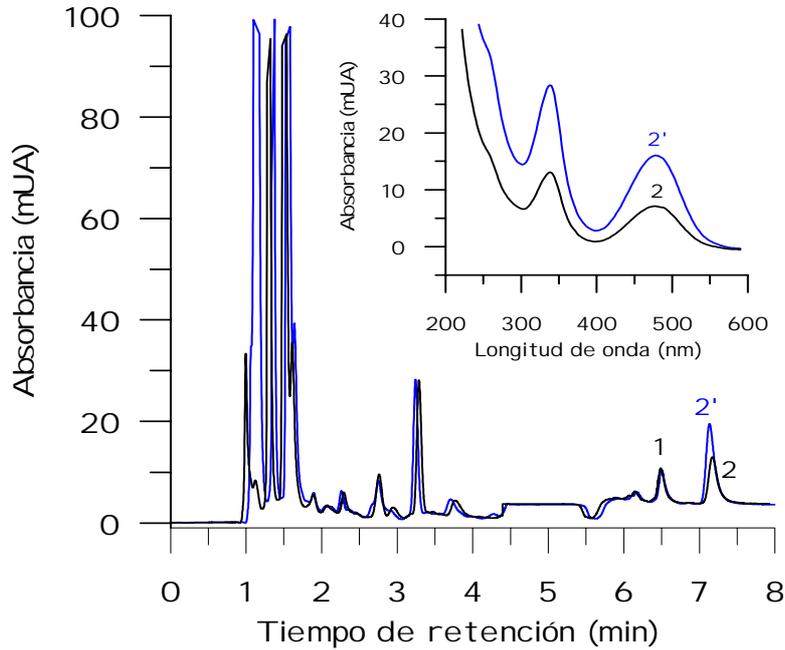
A simple vista se pudo observar que las muestras con mayor cantidad de rifampicina se correspondían con las orinas recogidas entre 3 y 7 horas después de la toma del antibiótico, ya que estas muestras presentaban una fuerte coloración anaranjada, en contraste con las otras que tenían color amarillo.

Todas las muestras fueron inyectadas en el sistema cromatográfico y, mediante la aplicación del método optimizado, se identificó el pico correspondiente a rifampicina en todas ellas, pudiéndose comprobar que la máxima eliminación se produce a las 6 horas de la toma del antibiótico.

En la **figura 4.24**, está representado el cromatograma correspondiente a una muestra de orina recogida a las 6 horas de la toma del fármaco (dilución 1:25), en comparación con el cromatograma de la misma muestra de orina fortificada con 4 ppm de rifampicina, con objeto de identificar el pico perteneciente a rifampicina, pudiendo observar que el pico a 7.1 minutos (pico 2), aumenta con la adición del patrón de rifampicina (pico 2'). Los espectros de absorción del pico a 7.1 minutos, en ambas muestras de orina, fueron comparados, no apreciándose ninguna diferencia entre ellos, como se puede apreciar en la figura (espectros 2 y 2').

En el cromatograma aparece otro pico a 6.5 minutos (pico 1), el cual pensamos que pueda ser un metabolito de rifampicina por las siguientes razones:

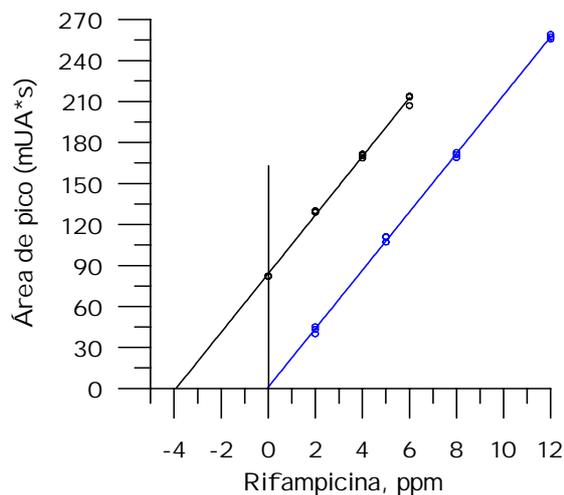
- ✓ El pico 1 presenta un espectro de absorción similar al de rifampicina.
  
- ✓ Cuando comparamos los cromatogramas correspondientes a muestras de orina de sucesivas excreciones, el área del pico 1 (supuesto metabolito de rifampicina), aumenta al aumentar el área del pico correspondiente a rifampicina, hasta finalmente desaparecer con él.



*Figura 4.24. - Cromatogramas de una muestra de orina (dilución 1:25), de un paciente voluntario, excretada a las 6 horas de la toma del medicamento, en comparación con la misma muestra fortificada con 4 ppm de rifampicina (—).*

Debido a la complejidad de la matriz de las muestras de orina, para llevar a cabo la determinación de rifampicina en dichas muestras, se empleó el método de adición patrón en la muestra que presentaba mayor excreción de rifampicina, con el objeto de comprobar la existencia de interferencias entre la matriz de orina y el analito en estudio.

Se prepararon muestras tomando 4 ml de orina, de la muestra correspondiente a la excreción de rifampicina a las 6 horas de la toma del antibiótico, y añadiendo diferentes cantidades de rifampicina patrón. Las disoluciones se enrasaron con tampón fosfato 20mM y pH 7 hasta un volumen de 100 ml, cada muestra se inyectó en el sistema cromatográfico por triplicado. Paralelamente se inyectaron patrones conteniendo concentraciones similares de rifampicina y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas en las condiciones ya fijadas como óptimas. En la **figura 4.25** se representan la recta de calibrado obtenida por el método de adición patrón y la recta de calibrado de los patrones de rifampicina. La señal analítica utilizada en ambos casos fue el área de pico.



**Figura 4.25.** - Recta de calibrado(—) y adición de patrón de rifampicina en orina (—)

Para comprobar que las pendientes de la recta de calibrado patrón y de la recta de adición de patrón no son significativamente diferentes, se llevó a cabo el estudio de validación mediante el Test de Fisher para la varianza (F), según el cual, el valor de F calculado para las varianzas de ambas rectas, debe ser menor que el valor de F tabulado [utilizando una probabilidad del 95% ( $P=0.05$ ) y con 11 grados de libertad en cada caso ( $F_{11,11}$ )], para que los resultados obtenidos por ambas rectas sean

comparables. Si las varianzas son comparables, mediante la aplicación del test-T se verifica si también lo son las pendientes de las rectas, para esto se tiene que cumplir que el valor de  $t_{cal}$  tiene que ser menor que el de  $t_{tab}$ , para un nivel de significación de 0.05 y 22 grados de libertad (39).

En la **tabla 4. 12** se muestran las ecuaciones de las dos rectas así como otros parámetros estadísticos derivados de la calibración univariante. También se muestran los valores de la  $F_{cal}$  tras la aplicación del Test de Fisher, así como los valores de  $t_{cal}$  y  $t_{tab}$ , obtenidos al aplicar el test-T para la comparación de las pendientes.

*Tabla 4. 12. - Rectas de calibrado del patrón externo y adición patrón.*

Recta de la adición patrón	Recta del patrón externo
$Y = 21.46 \cdot [RIF] + 83.97$ $\sigma_{pendiente} = 0.32$ $\sigma_{ordenada} = 1.20$ $\sigma_{estimada} = 2.49$ $R = 0.9989$	$Y = 21.36 \cdot [RIF] + 1.03$ $\sigma_{pendiente} = 0.18$ $\sigma_{ordenada} = 1.37$ $\sigma_{estimada} = 2.28$ $R = 0.9997$
<b>Aplicación Test de Fisher</b> $F_{cal} = 2.98; F_{tab} = 3.52$ $F_{tab} > F_{cal}$	<b>Aplicación del Test-T</b> $t_{cal} = 0.26; t_{tab} = 2.04$ $t_{tab} > t_{cal}$
<b>[RIF] adición patrón = 3.9 ppm</b>	<b>[RIF] patrón externo = 3.9 ppm</b>

A la vista de los resultado, se concluye que tanto las varianzas como las pendientes de las rectas no son significativamente distintas, ya que se cumple que:  $F_{tab} > F_{cal}$ , y  $t_{tab} > t_{cal}$  podremos utilizar el método del patrón externo para el cálculo de la cantidad de rifampicina excretada en las muestras de orina recogidas.

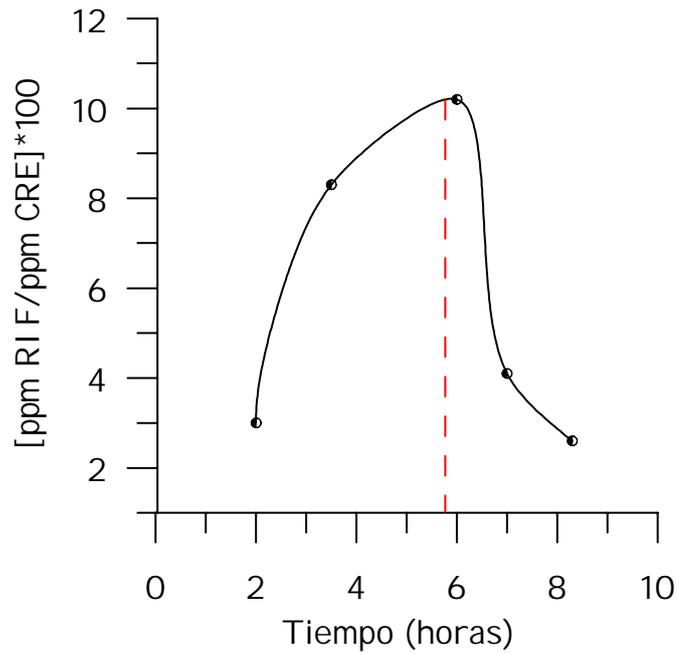
En la **tabla 4.13** se muestran las recuperaciones obtenidas, mediante la aplicación del método de la adición patrón, en la determinación de rifampicina en la muestra de orina recogida a las 6 horas de la toma del antibiótico.

*Tabla 4.13. - Resultados obtenidos en la determinación de rifampicina en una muestra de orina de un paciente voluntario, a las 6 horas de la toma del antibiótico, mediante el método de adición patrón.*

Rifampicina añadida (ppm)	Rifampicina encontrada (ppm)	% Recuperación $\pm$ DER, (n=3)
0.0	3.9	-----
2.0	6.0	102.0 $\pm$ 3.0
4.0	7.9	100.0 $\pm$ 2.0
6.0	9.9	99.0 $\pm$ 3.0

Haciendo uso de la recta de calibrado, una vez comprobado que la matriz de orina no interfiere, calculamos la concentración de rifampicina, así como la concentración de creatinina, utilizando en este caso la recta de calibrado que se obtuvo para este analito, en todas las muestras de orina, obteniendo el cromatograma correspondiente a cada una y por medida del área de pico. Con estos datos hemos elaborado la curva de eliminación de rifampicina en orina representada en la **figura 4.26**. Los resultados están expresados como relación de la concentración de rifampicina y la concentración de creatinina por 100,  $[\text{rifampicina}/\text{creatinina}] \times 100$ , con el fin de normalizar la eliminación de rifampicina.

En la gráfica se observa, que la mayor eliminación de rifampicina ocurre sobre las 6 horas de la toma de la droga.



*Figura 4.26- Eliminación de rifampicina en orina.*

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- L.R. Snyder, J.J. Kirkland; "An introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, (1979).
- 2.- W.R. Melander, C. Horvat; "High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives", Vol 2. Cs. Horvath, ed., Academic Press, New York, (1980).
- 3.- L.R. Snyder; "High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives". Vol 2. Cs. Horvath, ed., Academic Press, New York, (1983).
- 4.- J.C. Berridge; "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations". Ed. Elsevier, (1984).
- 5.- C.F. Poole y S.A. Schuette; "Contemporary practice of chromatography". Ed. Elsevier, (1984).
- 6.- I.B. Murphy y C.A. Stutte; *Anal. Biochem.*, (86), 220, (1978).
- 7.- Q.Y. Pang, Y.Lu, L. Yu, H. Dai y H.Z. Tian; *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, (18), 259, (1998).
- 8.- C.D. Gitonde y P.V. Pathak; *Drug Dev. Ind. Pharm.*, (17), 1201, (1991).
- 9.- B.E. Rao, S. Raghuvier y C.M.R. Srivastava; *Indian Drugs*, (29), 412, (1992).
- 10.- A. Walubo, P. Smith y P.I. Folb; *J. Chromatogr. B*, (658), 391, (1994).
- 11.- K.C. Kindal, R.S. Chaudhary, A.K. Singla, S.S. Gangwal y S. Khanna; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (12), 493, (1994).
- 12.- Y. Shah, S. Khanna, K.C. Jindal y V.S. Dighe; *Drug. Dev. Ind. Pharm*, (18), 1589, (1992).
- 13.- R. Codony y M. Marti; *Cienc. Ind. Pharm.*, (2), 183, (1983).
- 14.- A. El-Yazigi y D.A. Raines; *Pharmaceutial Research*, (9), 812, (1992).
- 15.- J. Woo, C.L. Wong, R. Teoh y K. Chan; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, (64), 73, (1987).
- 16.- C.D. Gaitonde, y P.V. Pathak; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, (97), 418, (1990).

- 17.- Y.P. Patel, U.J. Dhorda, M. Sundaresan y A.M. Bhagwat; *Indian Drugs*, (34), 43, (1997).
- 18.- Y.P. Patel, N. Shah, I.C. Bhoir y M. Sundaresan; *J. Chromatogr. A*, (828), 287, (1998).
- 19.- M.C. Gennaro, R. Calvino y C. Abrigo; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, (754), 477, (2001).
- 20.- R. Panchagnula, A. Sood, N. Sharda, K.Kaur y C.L. Kaul; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (18), 1013 (1999).
- 21.- S. Oldfield, L.D. Berg, H.J. Stiles y B.M. Buckley; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, (50), 423 (1986).
- 22.- M. Ishii y H. Ogata; *Journal of Chromatography*, (426), 412, (1988).
- 23.- K. Chan; *Zhongguo Yaoli Xuebao*, (8), 555, (1987).
- 24.- H.I. Seifart, W.L. Gent, D.P. Parkin, P.P. Van-Jaarsveld y P.R. Donald; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, (674), 269, (1995).
- 25.- A. Walubo, K. Chan y C.L. Wong; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 105, (*J. Chromatogr.*, (567), 261, (1991).
- 26.- K. Mawatari, F. Iinuma y M. Watanabe; *Anal. Sci.*, (6), 515, (1990).
- 27.- H. Kubo, T. Kinoshita, K. Matsumoto y T. Nishikawa; *Chromatographia*, (30), 69, (1990).
- 28.- E.B. Hansen, K.L. Dooley y H.C. Thompson; *J. Chromatogr.B: Biomed. Appl.*, (670), 259, (1995).
- 29.- H.J. Kraemer, U. Feltkamp y H. Breithaupt; *J. Chromatogr.B: Biomed. Appl.*, (706), 319, (1998).
- 30.- C.D. Gaitonde y P.V. Pathak; *Indian Drugs*, (27), 436, (1990).
- 31.- A. Mehmedagic, P. Verite, S. Menager, C. Tharasse, C. Chabenat, D. Andre y O. Lafout; *J. Chromatogr.B: Biomed. Appl.*, (695), 365, (1997).

- 32.- J.E. Conte, E. Lin y E. Zurlinde; *J. Chromatogr. Sci.*, (38), 72, (2000).
- 33.- C. Le-Guellec, M.L. Gaudet, S. Lamanetre y M. Breteau; *Ther. Drug. Monit.*, (19), 669, (1997).
- 34.- L. Grasso, G. Scanaro, E. Imparato, O. Arace y G. Oliviero; *Food. Addit. Contam.*, (17), 749, (2000).
- 35.- T. Delahunty, B. Lee y J.E. Conte; *J. Chromatogr.B: Biomed. Appl.*, (705), 323, (1998).
- 36.- H.M. Li y E. K. Wang; *Fenxi-Huaxue*, (21), 550, (1993).
- 37.- J.E. Conte, E. Lin y E. Zurlinde; *J. Chromatogr. Sci.*, (38), 33, (2000).
- 38.- L. Eidus, A. M. Harnanansingh, A.G. Jessamine; *Am. Rev. Respir. Dis.*, (91), 587 (1971)
- 39.- R. Cela; *Quimiometría avanzada, y Programa : Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de publicaciones (1994).

## CAPÍTULO 5

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE RIFAMPICINA,  
ISONIACIDA, ACETILISONIACIDA Y PIRACINAMIDA  
MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR  
ELECTROKINETICA MICELAR (MEKC)



## INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar de alta eficacia (HPCE), o simplemente "electroforesis capilar" (CE), es una técnica que ha surgido de la unión entre los poderosos mecanismos de separación de la electroforesis convencional en gel, con la instrumentación y los conceptos de automatización de la cromatografía de alta eficacia.

La electroforesis capilar, es una técnica analítica que tiene por objeto separar los diferentes componentes de una mezcla, basándose en la distinta movilidad que experimentan las especies cuando son sometidas a un campo eléctrico muy intenso (300-400V/cm) en el interior de un tubo capilar. Es una técnica que puede ser aplicada a la separación de una gran variedad de especies iónicas y neutras:

- Aniones y cationes inorgánicos
- Ácidos y bases orgánicos
- Productos farmacéuticos ( iónicos y neutros)
- Compuestos quirales
- Péptidos y proteínas
- Ácidos nucleicos

**Las principales aportaciones de esta técnica son:**

**Extraordinario poder de separación.**- con capilares de tan sólo 40 a 70 cm, se suelen obtener eficacias entre 100.000 y 200.000 platos teóricos.

**Gran versatilidad** tanto desde el punto de vista de las aplicaciones, como desde el punto de vista de ajuste del rango de concentraciones de trabajo (sensibilidad), o de flexibilidad operatoria (secuencia de análisis con analitos muy diversos).

**Gran economía.** - tanto desde el punto de vista de reactivos como de capilares.

**Rapidez.** - en muchas ocasiones los tiempos de análisis por electroforesis capilar son muy cortos ( menor a 5 o 10 min), lo que permite conseguir una gran productividad de los equipos.

### De la electroforesis clásica a la electroforesis capilar

Los principios de la electroforesis fueron enunciados hacia finales del siglo XIX, cuando Kohlrausch obtuvo las ecuaciones básicas de la migración de un ión en disolución de electrolito (1), antes incluso que los de la cromatografía. En 1937, Tiselius la introdujo como técnica de separación. Encontró que los componentes iónicos de una muestra emigraban bajo la influencia de un campo eléctrico con velocidad y dirección determinadas por la carga y tamaño de éstos (2). Tiselius recibió el premio Nobel por sus trabajos en separación. La electroforesis en solución libre, tal y como la desarrolló Tiselius, produce bajas eficacias en la separación. Ello era debido, principalmente a la existencia de mecanismos de transporte no deseables como convección, consecuencia de los gradientes de temperatura creados por el calor generado por efecto Joule. Por esta razón, el desarrollo de la electroforesis impuso la utilización de un medio estabilizante o anticonvectivo como pale, celulosa o geles (agarosa o poliacrilamida). Pero la acción de estos estabilizadores, no era lo bastante eficaz para lograr la separación de moléculas pequeñas cargadas. Por esto, la técnica interesó principalmente a los bioquímicos para la separación de moléculas de elevado peso molecular. Pese a su gran poder de resolución, la electroforesis clásica presenta inconvenientes, es lenta, laboriosa, de escasa reproducibilidad y de capacidad cuantitativa limitada.

El primer intento de realización de separación electroforética en ausencia de un agente estabilizante (es decir, en medio libre), fue descrito por Hjerten en 1967 (3). En estos trabajos utilizaba tubos abiertos de cristal de cuarzo con un diámetro interno de 1-3 mm y los hacía girar alrededor del eje longitudinal con objeto de suprimir los efectos de la convección. Fue hacia 1970 cuando Everaerts y colaboradores (4) desarrollaron la isotacoforesis capilar en tubos abiertos de diámetro inferiores a 1 mm. Para ello se basaron en lo que se ha llamado efecto anticonvectivo de la pared que aparece como resultado de la alta capacidad de disipación de calor que se obtienen en los tubos de pequeño diámetro interno del capilar. Además, estos autores utilizaron tubos de teflón en lugar de los de vidrio. Este cambio suponía una ventaja importante ya que eliminaba el fenómeno de electroósmosis que podía perturbar la separación por isotacoforesis capilar.

En 1979, Mikkers y colaboradores (5) propusieron la terminología "electroforesis de elevada eficacia" para la técnica de separación electroforética en medio libre. Estos investigadores conseguían realizar la primera separación con elevada resolución en tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, utilizando la instrumentación desarrollada hasta entonces para la isotacoforesis.

En 1981, Jorgerson (6) abrió una nueva etapa en el desarrollo de la técnica al introducir la utilización, por vez primera, de capilares de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno de sílice fundida, para el desarrollo de la electroforesis en medio libre, y de detección en línea sobre el mismo capilar, mediante fluorescencia. Jorgerson contribuyó a aclarar los conceptos teóricos y describió las relaciones entre la eficacia de la separación y los parámetros operacionales. Es entonces cuando la técnica de electroforesis capilar en medio libre se convirtió en un verdadero método analítico instrumental.

En la década de los 80, el desarrollo tecnológico de la electroforesis de alta eficacia continuó, por un lado hacia la investigación de una instrumentación compatible con las técnicas de isotacoforesis y de isoelectroenfoque y por otro, hacia la miniaturización. Esto último, se desarrolló de forma paralela a la microcromatografía en fase líquida, lo que contribuyó a aproximar ambas técnicas. De hecho, ambas líneas de investigación estaban en manos de los mismos grupos de investigadores. Surgieron así métodos híbridos. Así en 1984, Terabe y col. (7-9) demostraron que podían separarse, a la vez, especies cargadas y especies neutras. Esto era posible cuando se adicionaba al medio de separación surfactantes, en concentración por encima de la concentración crítica micelar (c.m.c.). El mecanismo de separación de las especies neutras se basa en un equilibrio de reparto entre el interior de la micela (hidrofóbico) y el exterior de la micela (hidrofílico). De ahí que se propusiera el nombre de **electroforesis capilar electrocinética micelar** (MEKC) para esta técnica.

En los últimos años se está desarrollando la técnica de electrocromatografía micelar (CEC), en la que el capilar se rellena de fase estacionaria, de forma similar a las columnas de cromatografía. La separación se lleva a cabo por aplicación, simultánea, de campo eléctrico y presión

A continuación, veremos los principios en los cuales está basado la separación en la técnica electroforética en capilares, cuando el medio de separación está constituido por un electrolito, es decir en la técnica de electroforesis capilar en zona libre (CZE).

### Fundamentos que rigen la separación en electroforesis capilar

Cómo se dijo anteriormente, la CE se basa en el movimiento de especies cargadas, sometidas a un campo eléctrico de alto voltaje, dentro de una capilar de diámetro interno inferior a 100  $\mu\text{m}$  que se encuentra lleno de una disolución electrolítica. La separación de especies diferentes se basa en la diferencia de velocidad que presentan bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado. El movimiento de las moléculas dentro del capilar, cuando se está aplicando el campo eléctrico, depende del tamaño y de la carga que tengan, es decir de su **movilidad electroforética**, además la migración de especies dentro del capilar depende de otro fenómeno que ocurre en el interior del capilar cuando se aplica un campo eléctrico **flujo electrostático**. Estos fenómenos dependen de otros factores como las dimensiones del capilar, voltaje aplicado, temperatura, la viscosidad de la disolución y el pH del electrolito.

✓ **Movilidad electroforética:** cualquier especie cargada  $i$  en solución, sometida a un campo eléctrico  $E$ , se desplaza con una velocidad lineal  $v_i$  (también denominada velocidad electroforética,  $v_{ep}$ ), dada por la relación:

$$V_i = m_i \times E \quad (1)$$

donde  $m_i$  es la movilidad efectiva (también denominada movilidad electroforética  $m_{ep}$  de la especie  $i$  en el medio considerado).

Este transporte se denomina electromigración. Se efectúa en el sentido del vector campo eléctrico  $E$  para los cationes ( $m_i$  positivo) o en el sentido opuesto para los aniones ( $m_i$  negativo).

Puesto que la especie  $i$  puede existir en solución bajo varias formas iónicas en equilibrio, la movilidad efectiva se deduce de las movilidades absolutas de sus diferentes formas iónicas,  $j$ , según:

$$m_i = \sum_j \alpha_{ij} m_j^0 \quad (2)$$

donde  $\alpha_{ij}$  es el coeficiente de disociación de la especie  $i$  bajo la forma iónica  $j$ , que puede calcularse a partir de las constantes de equilibrio y de la composición del medio.

Las movilidades absolutas dependen de la fuerza iónica,  $\mu$ , del medio. Para un electrólito  $Z/Z$ , se tiene según la teoría de Debye-Hückel.

$$m_j^0 = m_j^\infty - (0.23 Z_j^2 m_j^\infty + 31.4E^{-5} Z_j) (\mu)^{1/2} \quad (3)$$

donde  $Z_j$ : es el número de cargas de la especie  $j$ .

$m_j^\infty$ : es la movilidad absoluta a dilución infinita (cuyos valores se encuentran tabulados).

Si suponemos que sólo las fuerzas de Coulomb y las fuerzas de Stokes se ejercen sobre la partícula  $j$ ,  $m_j^\infty$  puede evaluarse de la forma siguiente:

$$m_j^\infty = \frac{Z_j e}{6\pi\eta r_j} \quad (4)$$

donde  $e$ : carga del electrón.

$\eta$ : viscosidad del medio.

$r_j$ : radio iónico ( o de Stokes) de la especie solvatada.

Por otro lado, la movilidad del ión,  $m_j^\infty$ , se relaciona con su conductividad iónica  $\lambda_j^\infty$ , a través de la ecuación de Nerns-Einstein:

$$\lambda_j^\infty = F m_j^\infty \quad (5)$$

donde F: es la constante de Faraday (96480 C).

Es decir, la movilidad electroforética de una especie dependerá del **pH y agentes complejantes** (ecuación 2), **de la fuerza iónica** (ecuación 3) y **de la naturaleza del disolvente** (viscosidad, solvatación) (ecuación 4). Además, la movilidad aumenta con **la temperatura** alrededor del 2 % por grado centígrado. Por otro lado, de la ecuación (4) se deduce que cuanto más pequeño y mayor carga posea el ión, tanto mayor será su movilidad y viceversa.

Si sólo se considerase la movilidad electroforética, no se explicaría completamente el comportamiento migratorio de las especies dentro del capilar, ya que dicho comportamiento depende también del flujo electroosmótico (FEO) (10-12).

✓ **Flujo electroosmótico:** es el fenómeno de transporte de moléculas de disolvente como resultado de la existencia de una doble capa eléctrica en una interfase sólido-líquido. Al aplicar un campo eléctrico tangencial a esta interfase, las cargas netas de la región difusa en el seno del líquido, comenzarán a moverse arrastrando consigo moléculas del solvente, dándole, por tanto, un movimiento de velocidad lineal  $v_{eo}$  (denominada velocidad electroosmótica), que será proporcional al campo eléctrico aplicado.

$$V_{eo} = -\frac{\epsilon\zeta}{\eta} E = m_{eo}E \quad (6)$$

donde  $m_{eo}$ : es la movilidad electroosmótica.

$\epsilon$ : es la constante dieléctrica.

$\eta$ : viscosidad del disolvente.

$\zeta$ : es el potencial de la superficie del sólido llamado también **potencial zeta** o potencial electrocinético.

E: campo eléctrico aplicado.

El potencial zeta es proporcional a la densidad de carga de la superficie ( $\sigma$ ) y al espesor de la capa eléctrica ( $\delta$ ), por lo tanto al aumentar la concentración del electrolito resulta una compresión de la doble capa disminuyendo su espesor y, como consecuencia, el potencial y el FEO (13).

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\epsilon} \quad (7)$$

Combinando las ecuaciones 6 y 7, se obtiene:

$$V_{eo} = -\frac{\delta\sigma}{\eta} E \quad (8)$$

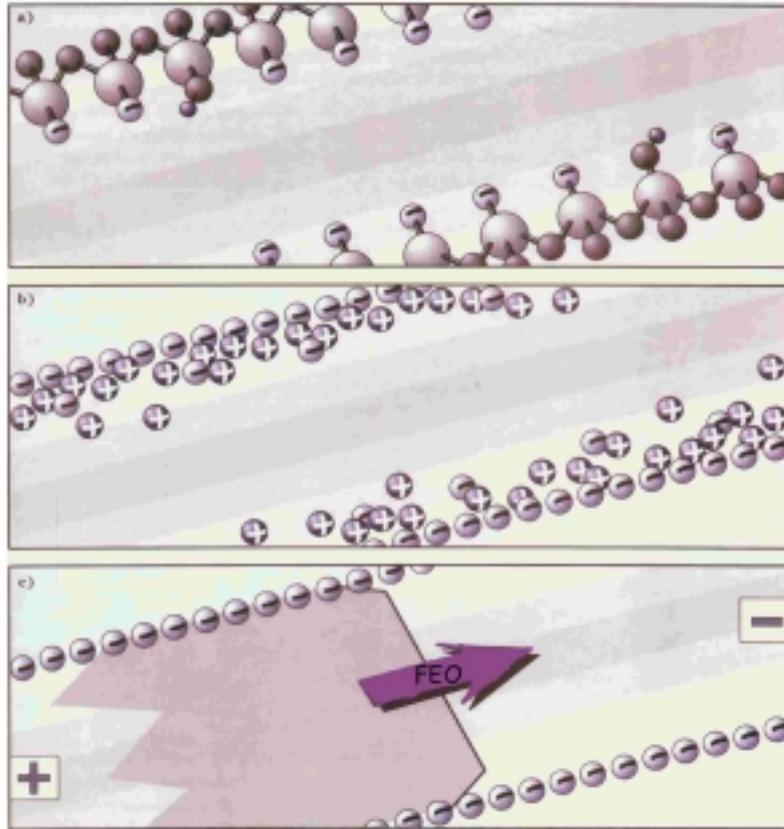
Resulta por tanto, que el flujo electroosmótico es proporcional a la densidad de carga. El sentido de dicho flujo es hacia el electrodo negativo si la superficie del capilar es portadora de cargas negativas ( $\sigma < 0$ ) y por lo tanto la carga neta en el interior del líquido es positiva. Y al contrario cuando la carga de la superficie es positiva ( $\sigma > 0$ ).

La mayoría de las superficies sólidas utilizadas para la fabricación de capilares (vidrio, sílice, sílice fundida, sílice enlazada a octadecilos, PTFE, polifluoroetilenpropileno o grafito) poseen cargas superficiales negativas en disolución acuosa. Estas cargas proceden de la ionización de grupos ácido de la superficie (grupos silanoles de la sílice) y/o de la adsorción de especies iónicas en la superficie.

#### **Desarrollo del flujo electroosmótico:**

Cuando la sílice está en contacto con una disolución acuosa, su superficie se hidroliza para dar lugar a grupos silanol. Estos grupos pueden estar cargados positivamente, neutros o tener carga negativa, dependiendo del pH de la disolución acuosa.

Los contraiones tienden a ser adsorbidos en la pared por atracciones de tipo electrostático para compensar el defecto de carga, formándose así una doble capa rígida de iones a la que se superpone una doble capa difusa de iones (modelo de Stern). Cuando se aplica una diferencia de potencial a lo largo del capilar, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos hacia el cátodo y como estos están solvatados, arrastran en su movimiento al resto de la disolución que hay en el capilar, constituyendo el flujo electroosmótico (FEO). Aunque el punto exacto de ionización de la sílice es difícil de determinar, el FEO comienza a tener un valor significativo a partir de pH 4. La **figura 5.1** representa la formación del FEO en las etapas descritas:

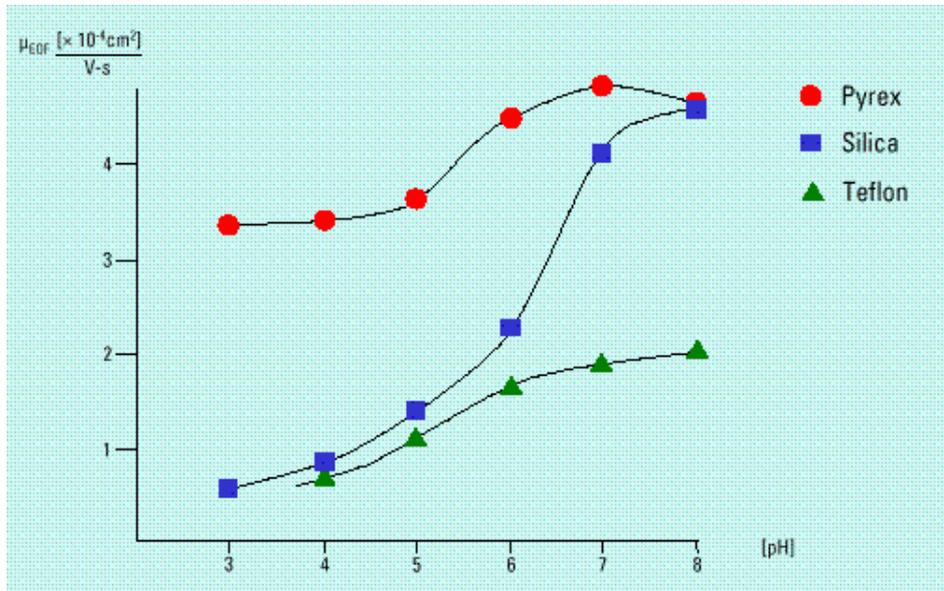


- a) Superficie de sílice fundida cargada negativamente ( $\text{SiO}^-$ ).
- b) Acumulación de cationes hidratados cerca de la superficie.
- c) Flujo de disolvente hacia el cátodo después de la aplicación del campo eléctrico

*Figura 5.1. - Desarrollo del flujo electroosmótico (FEO)*

El potencial zeta está determinado esencialmente por la carga de la superficie de la pared del capilar. Ya que esta carga depende principalmente del pH, el valor del FEO varía con el pH. A valores de pH altos, donde los grupos silanol están predominantemente desprotonados, el FEO es significativamente más alto que a pH bajos donde estos grupos llegan a estar protonados. Dependiendo de las condiciones, el FEO puede variar más que otra magnitud entre pH 2 y 12.

En la **figura 5.2** se muestra el efecto del pH para capilares de sílice fundida y otros materiales.

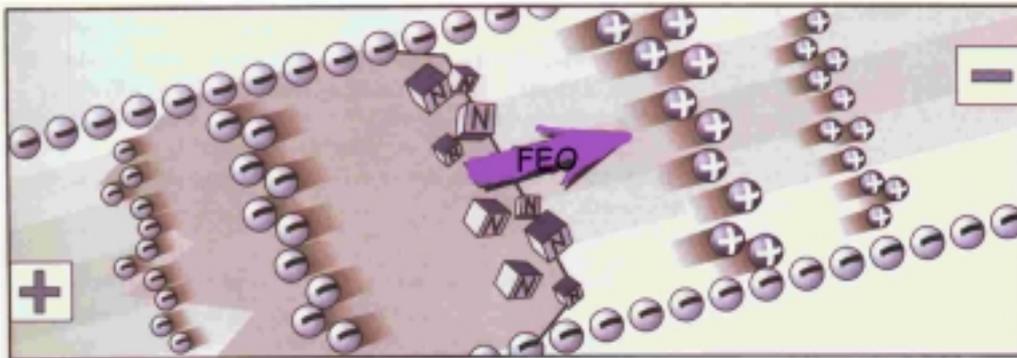


*Figura 5.2. - Efecto del pH sobre la movilidad del flujo electroosmótico en capilares de varios materiales.*

El fenómeno de la electroósmosis proporciona un perfil de flujo casi plano como el que se muestra en la figura 5.1. Se observa que decae rápidamente al aproximarse a las paredes del capilar, como consecuencia de la capa rígida de la doble capa eléctrica, pero se ha comprobado que esta caída no afecta al proceso de separación. Un flujo plano no contribuye a la dispersión de la zona de soluto, contrariamente a lo que ocurre en el caso de un flujo de perfil parabólico como el que se tiene en cromatografía.

La velocidad del flujo y el perfil son independientes del diámetro interno del capilar, salvo para capilares excesivamente anchos ( $> 200 \mu\text{m}$ ).

La existencia de un flujo electroosmótico en el proceso de separación electroforético, proporciona la ventaja, en adecuadas condiciones de trabajo, de que todas las especies (cationes, aniones y neutras) emigren hacia el mismo electrodo. Por tanto, si la inyección de la muestra se realiza en el extremo del capilar, situada junto al electrodo positivo (ánodo), toda la muestra viajará hacia el cátodo, ya que, generalmente en las condiciones usuales de trabajo, la magnitud del flujo electroosmótico es mayor que las movilidades de los iones. Este proceso se representa en la **figura 5.3**.



*Figura 5.3. - Migración de los solutos en CZE dependiendo de su carga y tamaño.*

Los cationes migran más rápido ya que se ven impulsados por el flujo electroosmótico, los de menor tamaño son los que tienen mayor velocidad electroforética y serán los primeros en salir y los de mayor tamaño los últimos; las especies neutras avanzan juntas a la misma velocidad que el FEO; por último saldrán los aniones ya que estos están atraídos por el ánodo y oponen resistencia al FEO. En todos casos, la velocidad resultante de cada especie, será la suma algebraica de la velocidad electroforética de la especie y velocidad electroosmótica. Por tanto, el tiempo necesario para que un ión eluya vendrá determinado por su movilidad y la del FEO.

### Parámetros analíticos

Entre los parámetros que definen el proceso de separación electroforético están el tiempo de migración  $t_m$ , la dispersión, la eficacia y la resolución. Las expresiones que definen estos parámetros se obtienen para el modo de separación electroforético más simple, que es la electroforesis capilar de zona (CZE), en la cual el capilar se llena de tampón solamente.

#### Tiempo de migración y movilidad electroforética aparente

El tiempo de migración  $t_m$ , es el tiempo necesario para que un soluto emigre desde el punto de inyección hasta el punto de detección:

$$t = \frac{l}{v} = \frac{l}{m_a E} = \frac{lL}{m_a V} \quad (9)$$

donde  $l$  es la distancia efectiva del capilar, es decir, distancia desde el punto de inyección hasta el punto de detección y  $L$  es la longitud total del capilar (14).

Cuando existe flujo electroosmótico, la movilidad electroforética medida a través de la ecuación (9):

$$m_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV}$$

se denomina movilidad aparente y es igual a:

$$m_a = m_i + m_{eo} \quad (10)$$

Como podemos observar, de la ecuación (9) se deduce que podemos obtener tiempos de migración cortos utilizando voltajes elevados, valores altos de FEO y capilares de corta longitud. Sin embargo, los tiempos de análisis excesivamente cortos presentan el inconveniente de conducir a resoluciones bajas, por lo que todos estos parámetros deben ser optimizados.

### Dispersión y eficacia

La separación en la técnica electroforética, se basa en las diferencias de movilidades de los solutos. La diferencia necesaria para resolver dos zonas consecutivas dependerá de la longitud de dichas zonas, y por lo tanto de los fenómenos de dispersión dentro de cada una. La dispersión debe ser controlada ya que un aumento de la misma hará aumentar las diferencias de movilidades necesarias para llevar a cabo la separación.

La dispersión o ensanchamiento de la zona de soluto, es el resultado de las diferencias de velocidad de las moléculas del soluto, y puede definirse como el ancho de pico a nivel de línea base,  $\omega_b$ . Para un pico Gaussiano, al igual que en cromatografía:

$$\omega_b = 4\sigma \quad (11)$$

donde  $\sigma$ : es la desviación estándar (en unidades de tiempo, volumen o longitud).

La eficacia de la separación, se expresa, al igual que en cromatografía, por el número de platos teóricos:

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \quad (12)$$

Los valores de N obtenidos en esta técnica oscilan entre  $10^5$  y  $5 \cdot 10^5$ .

La altura equivalente de un plato teórico, H viene dado por

$$H = \left( \frac{l}{N} \right) \quad (13)$$

En condiciones ideales, la única contribución al ensanchamiento de banda es la difusión longitudinal ya que la dispersión radial es poco importante debido al perfil de flujo plano, y el ensanchamiento por convección no influye debido a las propiedades anticonvectivas del capilar, por tanto, la eficacia se puede relacionar con el término de difusión molecular cromatográfico:

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DlV}{m_a V} \quad (14)$$

donde D: es el coeficiente de difusión del soluto.

Sustituyendo la ecuación 14 en la ecuación 12, tenemos:

$$N = \frac{m_a V l}{2DL} \quad (15)$$

que es la expresión electroforética fundamental de la eficacia.

Sobre un electroferograma puede determinarse directamente el número de platos teóricos, mediante:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_m}{\omega_{1/2}} \right)^2 \quad (16)$$

donde  $t_m$ : es el tiempo de migración, y

$\omega_{1/2}$ : es el ancho de pico a media altura.

En general, la eficacia medida de esta forma resultará menor que la obtenida a través de la ecuación 15 ya que existen otros procesos de dispersión, además del considerado, que contribuyen al ensanchamiento de banda. En la **tabla 5.1**, se muestran algunas fuentes de ensanchamiento de banda.

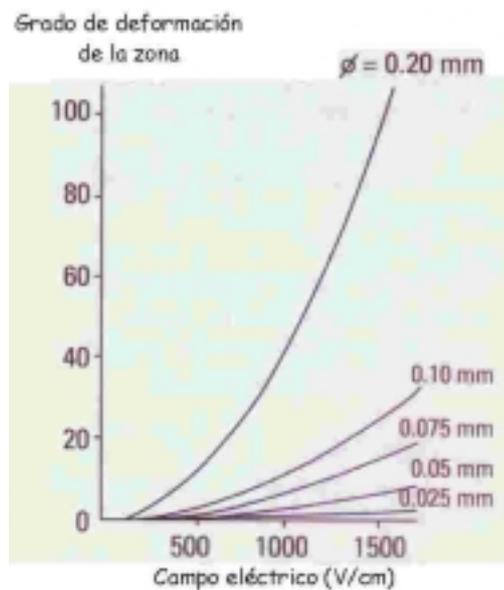
*Tabla 5.1. - Fuentes de ensanchamiento de banda.*

Fuente	Observaciones
Difusión longitudinal	Proporciona el límite teórico de la eficacia.
Calentamiento por efecto Joule	Conduce a los gradientes de temperatura y a flujos laminares.
Adsorción de la muestra a la pared del capilar	Las interacciones soluto-pared del capilar origina picos con colas.
Longitud del bolo de inyección	Debe ser menor que la longitud de la zona controlada por difusión. Mayores longitudes pueden conseguir una mejora en los límites de detección.
Diferencias entre las conductividades de la muestra y el electrolito que llena el capilar (electrodispersión)	Afecta a la forma de los picos.
Tamaño de la célula del detector.	Debe ser pequeña con respecto al ancho de pico.

A continuación comentaremos brevemente cada una de estas fuentes:

✓ **Efecto Joule:** el paso de la corriente eléctrica a través del medio de separación, origina la disipación de una cierta cantidad de calor (efecto Joule), determinado por las dimensiones del capilar, conductividad del tampón y del voltaje

aplicado. Un aumento de la temperatura del medio de separación no es problemático, excepto si causa degradación del soluto. Si lo es el gradiente de temperatura generado, sobre todo entre el centro del capilar y el exterior, originando gradientes de viscosidad en el líquido dentro del capilar deformando las zonas de separación. Si se desea que la dispersión de la banda electroforética debida al efecto térmico sea pequeña, hay que trabajar a campos eléctricos bajos o utilizar capilares de diámetro interno muy pequeño. La **figura 5.4** representa la influencia del efecto Joule y de los gradientes de temperatura sobre la deformación del soluto.



**Figura 5.4.** - Influencia del efecto Joule y de los gradientes de temperatura sobre la deformación del soluto.

El capilar es por sí mismo un medio anticonvectivo, por dos razones y es una de las mayores ventajas respecto a la electroforesis clásica:

① Los volúmenes tan pequeños utilizados para la separación limitan la cantidad de calor generado aún cuando se estén aplicando campos eléctricos muy elevados.

② La elevada proporción área/volumen en el capilar favorece la disipación del calor generado. Es conveniente, no obstante, utilizar un medio de refrigeración, así como también es aconsejable utilizar capilares de pequeño diámetro interno y radios externos elevados.

Para reducir el calor generado por efecto Joule, pueden así mismo utilizarse tampones que presenten baja movilidad, es decir que contengan iones poco cargados y grandes, como son el tris, borato, histidina, etc.

✓ **Las interacciones entre soluto y pared de capilar** son especialmente importantes en la separación de macromoléculas como proteínas, ya que poseen en sus estructuras grupos iónicos y zonas hidrofóbicas que pueden interactuar con la pared de sílice fundida principalmente. La extensión de esta interacción va desde obtener picos con colas a la adsorción total del soluto. Existen diferentes formas de eliminar esta adsorción, como puede ser aumento de la concentración del tampón, trabajar a valores de pH extremos, la adición al tampón de sustancias que se adsorben a la pared o tratar la pared de sílice mediante enlaces a grupos o moléculas.

✓ Idealmente, la **longitud del bolo de muestra** debe ser menor que la desviación estándar debida a la difusión molecular, es decir  $(2Dt_m)^{1/2}$ . De forma práctica se puede tomar como límite de longitud del bolo, aquella que es menor que el 1-2% de la longitud total del capilar.

✓ **La electrodispersión** aparece cuando las conductividades entre tampón y muestra son muy diferentes. Afectan a la forma de los picos. Su efecto sobre la dispersión es pequeño.

**Resolución**

La resolución de los componentes de una muestra, es el objetivo último en las técnicas separativas. Se puede calcular a partir del electroferograma mediante la ecuación:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (17)$$

donde  $t$ : es el tiempo de migración de dos solutos consecutivos.

$\omega$ : ancho de pico en unidades de tiempo y a nivel de la línea base.

El proceso de separación en electroforesis capilar es guiado primordialmente por la eficacia y no por la selectividad como en el caso de la cromatografía. Es posible la resolución total de dos solutos con diferencias muy pequeñas en la movilidad, debido a que se obtienen zonas o bandas de solutos muy estrechas.

En términos de eficacia la resolución se define como:

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left( \frac{\Delta m}{\bar{m}} \right) \quad (18)$$

donde:

$$\Delta m = m_2 - m_1 \quad \text{y} \quad \bar{m} = \frac{m_2 + m_1}{2}$$

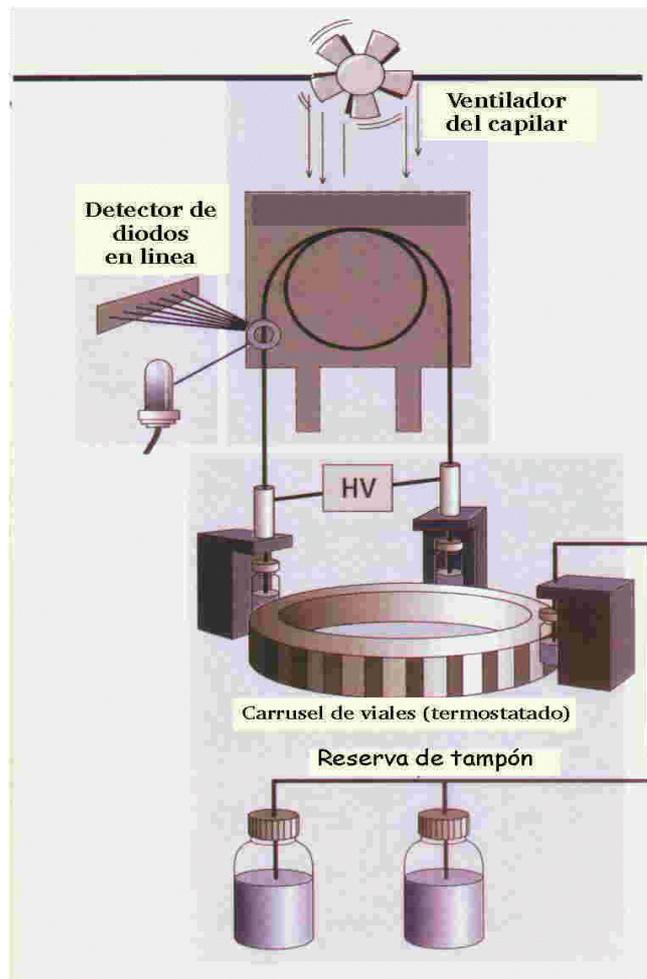
La ecuación que describe el efecto del flujo electroosmótico sobre la resolución es:

$$R = \left( \frac{1}{1\sqrt{2}} \right) (\Delta m) \left( \frac{V}{D(\bar{m} + m_{eo})} \right)^{1/2} \quad (19)$$

Se puede deducir que la resolución aumenta con el voltaje, pero no aumenta tanto como lo hace la eficacia que es directamente proporcional al voltaje. Por tanto, el empleo de un elevado voltaje será beneficioso para llevar a cabo la separación, ya que conduce a separaciones más rápidas, con altas eficiencias y buena resolución. En cuanto a la movilidad del FEO, cabe destacar que altas movilidades que antes producían altas eficiencias, ahora producen bajas resoluciones.

## ASPECTOS INSTRUMENTALES Y OPERACIONALES

En la **figura 5.5** se representa un esquema básico de un equipo de electroforesis capilar.



*Figura 5.5. - Esquema de un equipo de electroforesis*

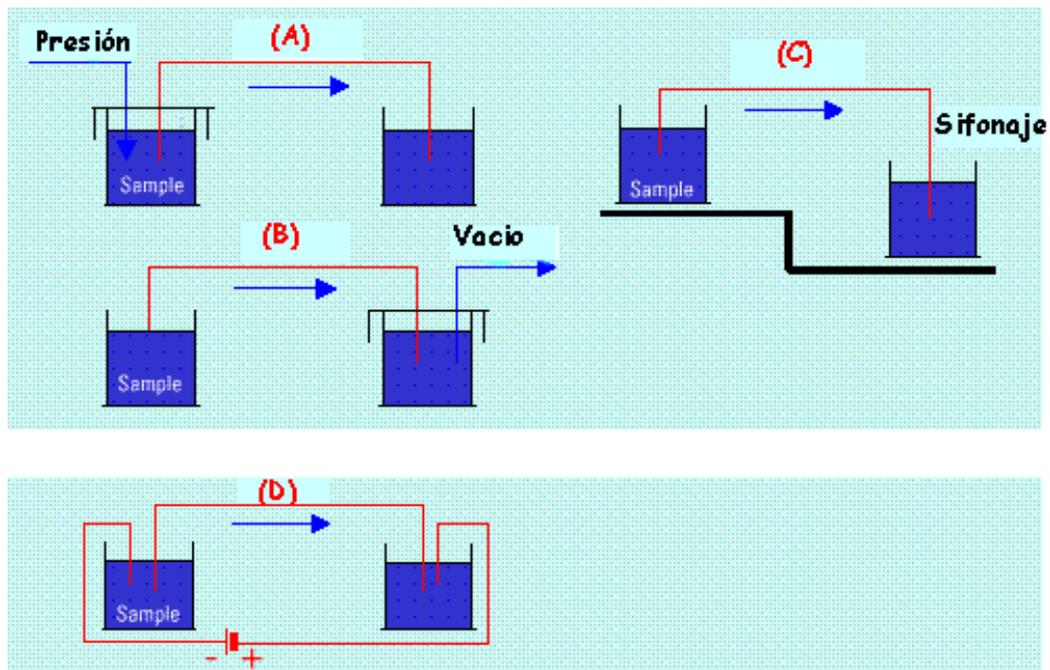
Entre los componentes principales del instrumento se encuentran: una fuente de alto voltaje, un capilar, un sistema de detección conectado a un sistema de adquisición y tratamientos de datos, un sistema de inyección, un sistema de termostatación o refrigeración del capilar, un sistema de muestreo automático, viales que contendrán las muestras y disoluciones de electrolitos. Todo ello es controlado por un ordenador.

Para comenzar cualquier separación el capilar se rellena con el tampón o electrolito de separación, a continuación se inyecta la muestra en el lado opuesto al detector y, seguidamente el capilar, a la vez que los electrodos, se sumergen en dos viales que contienen el electrolito de separación.

Al aplicar una diferencia de potencial entre ambos electrodos, se inicia la separación. Las especies, en función de su movilidad electroforética y del FEO, migrarán a lo largo del capilar de un extremo a otro y serán detectadas a su paso por el detector, el cual va suministrando al ordenador una serie de señales a partir de las cuales se podrá llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras.

### Sistemas de inyección

La introducción de la muestra dentro del sistema electroforético puede llevarse a cabo por diferentes métodos, los más usual son la inyección hidrodinámica y la inyección electrocinética. Ambas formas de inyección se muestran en la **figura 5.6**.



*Figura 5.6. - Diferentes tipos de inyección en electroforesis capilar*

El método más utilizado es la inyección hidrodinámica, que a su vez puede ser realizada de tres formas diferentes:

- ☞ Por aplicación de una presión sobre el vial de la muestra (**figura 5.6A**).
- ☞ Por aplicación de vacío en el extremo de salida del capilar cuando el extremo de entrada está sumergido en la muestra (**figura 5.6B**).
- ☞ Por elevación del vial donde se encuentra la muestra, lo que permite que ésta sea introducida (**figura 5.6C**). Este caso es el menos utilizado.

Mediante la inyección hidrodinámica, la composición de la muestra que se introduce en el interior del capilar es igual que la del vial de la muestra, y el volumen inyectado se puede obtener mediante la ecuación de Poiseuille:

$$V = \left( \frac{\Delta P r^4 \pi t}{8 \eta L} \right)$$

donde  $\Delta P$ : diferencia de presión (pa)

r: radio interno del capilar (m)

t: tiempo de inyección (s)

$\eta$ : viscosidad (Pa s)

L: longitud total del capilar (m)

El volumen de muestra introducido dependerá principalmente, de la presión que se aplique y el tiempo que dure su aplicación, la viscosidad de la disolución y de las dimensiones del capilar. Es preciso, además, un control riguroso de la temperatura del capilar  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ . Las presiones típicas de inyección suelen oscilar entre 0.05 y 0.5 bares y los tiempos de inyección pueden estar comprendidos entre 1 s y 10 s. Bajo estas condiciones se pueden inyectar volúmenes del orden de los nanolitros.

Cuando se utiliza la elevación del vial como modo de inyección, el volumen de muestra a inyectar estará dado por la constante de gravedad, la densidad del electrolito y la altura de elevación de la muestra. Por tanto, cuando la inyección se hace por gravedad o diferencia de altura, la  $\Delta P$  se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$\Delta P = \rho g \Delta h$$

donde  $\rho$ : densidad del tampón ( $\text{kg/m}^3$ )

$g$ : constante de gravedad ( $9.8 \text{ N/kg}$ )

$\Delta h$ : diferencia de altura entre los viales (m)

En este caso se suelen utilizar diferencias de altura entre 5 y 10 cm y tiempos de inyección comprendidos entre 10 y 30 s.

La longitud de la muestra inyectada se puede obtener fácilmente a partir del volumen inyectado según la ecuación:

$$L = \frac{V}{\pi r^2}$$

La inyección electrocinética (**figura 5.6D**) se lleva a cabo introduciendo el extremo del capilar en el recipiente de muestra y aplicando una diferencia de potencial en el extremo, que suele ser de 3 a 5 veces menor que la utilizada en la separación, durante cierto periodo de tiempo (unos segundos). Los analitos migrarán de acuerdo a sus movilidades y al FEO, también de acuerdo con el voltaje y el tiempo aplicados, la concentración de analitos presente y el radio del capilar. Por estas características, este tipo de inyección es mucho más discriminatoria y más selectiva que la inyección hidrodinámica y alcanza mayor sensibilidad.

El volumen inyectado en este caso viene dado por la siguiente expresión:

$$V = (V_i + V_{\text{FEO}})\pi r^2 t$$

La cantidad introducida de una determinada especie, puede ser controlada variando el voltaje, el tiempo, la concentración o el diámetro interno del capilar. Además, depende de la movilidad de un determinado ión y de la movilidad del FEO. Esto quiere decir que este tipo de inyección es selectiva para aquellos iones que poseen mayor velocidad electroforética frente a los de menor velocidad electroforética. Además los iones de movilidad contraria al FEO sólo entrarán en el capilar si el valor absoluto de ésta es inferior al del FEO.

Una variación en la conductividad de la muestra, debido a la composición de su matriz, puede suponer una alteración en la cantidad inyectada. Como consecuencia de este fenómeno, la inyección electrocinética no es tan reproducible como la inyección hidrodinámica.

Por último se puede decir, que a pesar de los inconvenientes, este método de inyección es muy simple y no requiere instrumentación adicional. En los casos en que se utilizan capilares rellenos de gel o medios viscosos, la inyección electrocinética proporciona mayores ventajas al igual que cuando se quiere discriminar la inyección de algunos compuestos frente a otros (10-12).

#### **Concentración de la muestra en el capilar**

Los límites de detección que suelen conseguirse en electroforesis capilar están en torno a las ppm, para determinaciones en fármacos estos límites pueden ser suficientes, pero cuando se trabaja con fluidos biológicos interesa detectar cantidades inferiores.

En la práctica se intenta solventar este inconveniente mediante el empleo de técnicas de preconcentración previas a las separaciones electroforéticas o bien, mediante preconcentraciones "en columna" previas a una separación por electroforesis capilar (15).

Aparte de estas técnicas existen otras propias de la electroforesis capilar:

*Técnicas de amplificación de campo.* - Se basan en el hecho de que la velocidad de un ión depende linealmente del campo eléctrico del medio en el que se encuentre. En función de esto se dispone la muestra en un medio de conductividad eléctrica distinta a la de la disolución electrolítica de separación.

Estas técnicas se pueden reunir en tres grupos:

**1) Stacking.** - partiendo de la base de que el analito se encuentra disuelto en una matriz que presenta una conductividad menor que el electrolito soporte del capilar, éste experimentará un aumento en la intensidad del campo eléctrico local. Como consecuencia, migrará a una velocidad más alta hasta que sobrepase la interfase entre la matriz de muestra y el electrolito soporte. En este momento su velocidad disminuirá porque se encuentra en un campo eléctrico de intensidad más baja. Por tanto, se puede concluir que el efecto final es que el analito se focaliza en una zona estrecha en la interfase señalada. Atendiendo a este fenómeno siempre interesa inyectar la muestra en un medio con una conductividad lo más baja posible. Además, si el tipo de inyección es electrocinética y se presenta la situación descrita, la cantidad de analito que se inyectará será mayor que si la muestra posee igual o mayor fuerza iónica que el medio de separación (16).

**2) Inyección de grandes volúmenes de muestra.** - aprovechando el fenómeno de la diferencia de campo eléctrico (17) entre la muestra y el medio de separación junto con el FEO, se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra en el interior del capilar para realizar separaciones en la modalidad de CZE.

**3) Técnicas de inyección de amplificación de campo para analitos neutros.** - las dos técnicas anteriores están diseñadas para focalizar analitos que presentan carga. Si la muestra está compuesta por analitos neutros existe la posibilidad de amplificación de campo en la modalidad de MEKC cuando se utilizan micelas de tipo aniónico. Esta forma de proceder ha sido descrita por Palmer y col. (18). En este caso la muestra de inyección debe tener una conductividad mucho mayor que el tampón de separación, es decir, lo contrario a los casos descritos para analitos iónicos.

***Isotacoforesis de transición en CZE.*** - Las técnicas de amplificación de campo parecen tener como regla general que la muestra sea lo más diluida posible en sales, pero esta regla tiene su excepción. La excepción aparece cuando la matriz de muestra tiene un exceso de un ión que presenta una movilidad electroforética mayor que cualquiera de los analitos presentes y el electrolito soporte posee un ión cuya movilidad es la más baja de los analitos presentes. En este punto, el ión de la matriz de muestra de mayor movilidad actúa como ión de cabeza y el de más baja del electrolito soporte como ión de cola. Como consecuencia se produce un efecto similar al que sucede en la isotacoforesis capilar, es decir, un enriquecimiento de cada analito en zonas.

El efecto mencionado es transitorio, porque el electrolito soporte es homogéneo, de forma que la zona de más alta movilidad comenzará a migrar siguiendo el mecanismo normal de la CZE.

## Capilar

Las propiedades deseables que debe poseer un capilar son:

Que el material del cual esté hecho sea química y eléctricamente inerte.

Que no interfiera en el sistema de detección.

Que sean robustos y a la vez flexibles.

Que no sean caros.

La mayor parte de estos requisitos los reúne la sílice fundida, por lo que son los capilares más utilizados. Se recubren de una capa protectora para hacerlos más resistentes y manejables. La ventana óptica se hace retirando una parte de la película protectora.

El teflón es otro material utilizado para la fabricación de capilares pero su mayor inconveniente es que son difíciles de obtener con diámetro interno homogéneo, no transfieren bien el calor y presentan problemas de adsorción al igual que la sílice fundida. Los capilares de sílice que se suelen usar en electroforesis, tienen un diámetro interno entre 25-75  $\mu\text{m}$  y 350 y 400  $\mu\text{m}$  de diámetro externo. Las longitudes efectivas varían entre 10 cm en capilares rellenos de gel, hasta 80 o 100 cm para los capilares que se utilizan para la separación de muestras complejas por CZE. La longitud total del capilar está comprendida entre 5 y 15 cm más que la longitud efectiva, dependiendo de las dimensiones del sistema.

Antes de comenzar a desarrollar una separación, es necesario un adecuado acondicionamiento del capilar, que suele darse empleando soluciones básicas o neutras en el caso de la sílice fundida, con las que se consigue equilibrar la superficie interna del capilar. Después de su utilización, los capilares deben lavarse con agua y secarse con aire para su posterior almacenaje y evitar así la cristalización del tampón dentro de éste.

### Sistemas de termostatación del capilar

La presencia de estos equipos es indispensable para mantener un control efectivo de la temperatura del capilar, puesto que ésta afecta a la viscosidad y, por lo tanto, a la movilidad de los iones y del FEO, así como a la cantidad de muestra inyectada. La reproducibilidad de las medidas también depende de la termostatación del capilar.

Existen sistemas de flujo de aire ( a una velocidad de 10 m/s) o bien de líquido. Aunque el sistema basado en el líquido suele ser algo mejor, también supone una instrumentación más complicada y de mayor coste, por lo que, en muchas ocasiones se prefiere la termostatación por flujo de aire que se muestra igual de eficiente, siempre y cuando se superen valores de 5 W/m durante la separación.

### Detección

La mayoría de los detectores utilizados en electroforesis capilar proceden del campo de la cromatografía líquida y han necesitado la adaptación a la detección de los componentes de una muestra de volumen lo suficientemente reducido para que se mantengan las condiciones electroforéticas. En la **tabla 5.2** se muestran los sistemas de detección más ampliamente utilizados. De forma general se pueden clasificar en métodos ópticos y eléctricos.

Tabla 5.2. - Sistemas de detección

Sistema	Límite de detección (moles)	Límite de detección (molar)*	Ventajas/inconvenientes
<i>Absorción UV-Vis</i>	$10^{-13}$ - $10^{-16}$	$10^{-5}$ - $10^{-8}$	- Universal. - El detector de diodos en fila ofrece información espectral
<i>Fluorescencia</i>	$10^{-15}$ - $10^{-17}$	$10^{-7}$ - $10^{-9}$	- Sensible. - Requiere, generalmente, derivatización.
<i>Fluorescencia inducida por láser</i>	$10^{-18}$ - $10^{-20}$	$10^{-14}$ - $10^{-16}$	- Muy sensible. - Requiere, generalmente, derivatización. - Caro.
<i>Amperometría</i>	$10^{-18}$ - $10^{-19}$	$10^{-10}$ - $10^{-11}$	- Sensible. - Selectiva pero sólo para especies electroactivas. - Requiere modificación del capilar y electrónica especial.
<i>Conductimetría</i>	$10^{-15}$ - $10^{-16}$	$10^{-7}$ - $10^{-8}$	- Universal. - Requiere modificación del capilar y electrónica especial.
<i>Espectrometría de masas</i>	$10^{-16}$ - $10^{-17}$	$10^{-8}$ - $10^{-9}$	- Sensible y ofrece información estructural. - Interfase complicada entre MS y CE.
<i>UV, Fluorescencia y amperometría indirectas</i>	10-100 veces menor que el método directo	----	- Universal. - Menor sensibilidad que el método directo.
<i>Otros</i>	Radioactividad, índice de refracción, dicroísmo circular, Raman, etc.		

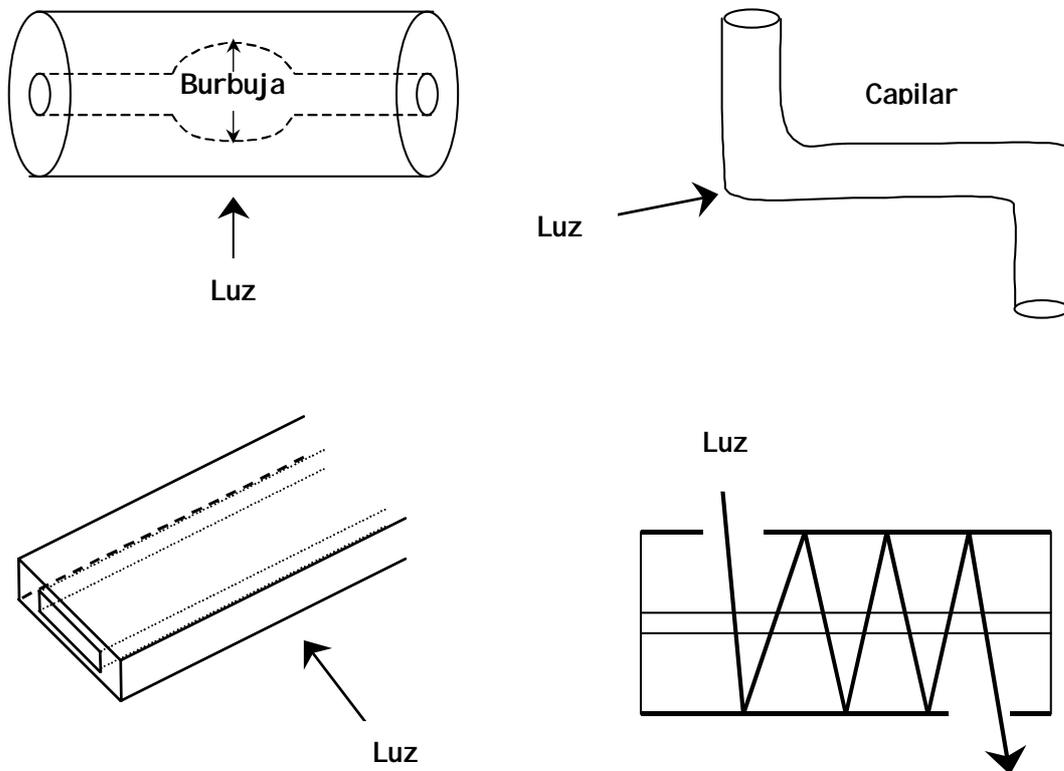
\* Calculado con 10 nl de volumen de inyección.

### Detectores ópticos

Los más utilizados están basados en absorción UV-Vis o en fenómenos de fluorescencia. En ambos casos la detección se hace sobre la columna, con objeto de reducir al mínimo los volúmenes muertos. El diseño del detector es muy crítico debido a las reducidas dimensiones del capilar. Sea cuál sea el tipo de diseño de la célula de detección en electroforesis capilar, es necesario un perfecto enfoque de la luz dentro del capilar y a través del camino óptico.

En absorción la sensibilidad está limitada por el pequeño camino óptico, que como máximo será el diámetro del capilar. Aumentar la sensibilidad a costa de aumentar el diámetro interno, conlleva un aumento de la corriente generada, y por tanto del calor desprendido por efecto Joule, lo que se traduce en pérdidas de eficacia.

Se han diseñado geometrías de capilar con objeto de aumentar la sensibilidad, con las cuales se consigue aumentar el camino óptico, sólo en la zona de la ventana de detección utilizando ventanas en forma de Z, de burbuja o bien utilizando una celda de multirreflexión donde el incremento de paso óptico es proporcional al número de reflexiones. En este último caso se pueden conseguir longitudes de paso óptico de hasta 1 cm (19). También se pueden utilizar capilares rectangulares (20) donde la absorbancia puede ser multiplicada por 20. Estos capilares son de cristal de borosilicato, el cual no es transparente a longitudes de onda bajas. Se suelen utilizar a longitudes de onda por encima de 310 nm. Las principales celdas de detección para aumentar la sensibilidad se muestran en la **figura 5.7**.



*Figura 5.7. - Diferentes tipos de capilares*

La detección fluorescente es en general, de 1 a 3 veces más sensible que la absorción. La eficacia de la detección va a depender de múltiples factores. Es el método de detección más utilizado después de la absorción. Ya que la mayoría de los analitos no son fluorescentes, exige una derivatización previa o la metodología indirecta, en la cual un fluoróforo es un componente mayoritario del electrolito fondo. La utilización de láseres como fuentes de excitación, permiten una mejora en la sensibilidad de la técnica. La principal desventaja es el costo del equipo.

### **Detectores electroquímicos**

Ofrecen una mejora de sensibilidad respecto a los métodos de absorción. Como la medida es independiente del camino óptico, permite el uso de capilares muy estrechos y su posibilidad de aplicación a sistemas miniaturizados. Las técnicas más utilizadas han sido la amperometría y la conductimetría. La detección es complicada debido a la necesidad de aislar los elevados potenciales utilizados en la separación (1 - 30 kV) de los potenciales electroquímicos (aproximadamente 1 V).

### **Acoplamiento en línea con un espectrómetro de masas**

Existe un interés creciente por el acoplamiento directo de un equipo de electroforesis capilar y un espectrómetro de masas, debido principalmente a dos razones: la necesidad de obtener un medio fiable de identificación de picos y la progresiva reducción del precio de los espectrómetros de masas. El acoplamiento más frecuente consiste en la introducción de la sílice del capilar en una interfase de electrospray acoplado a un analizador de cuadrupolo (CE-ESI/MS). En esta configuración no existe electrodo de salida y el mismo espectrómetro de masas va conectado a tierra. Los componentes separados en el capilar se transportan hacia la interfase por medio de un conductor líquido. La mayor limitación es que requiere el uso de tampones volátiles, por lo que restringe la versatilidad de la electroforesis capilar y su poder de resolución (21).

## MODOS DE SEPARACIÓN EN ELECTROFORESIS CAPILAR

La versatilidad de esta técnica, al igual que en cromatografía, se debe parcialmente a sus numerosos modos de separación. Los principales son los que se muestran en la **tabla 5.3** así como el fundamento de la separación. La mayor parte de ellos pueden obtenerse cambiando simplemente la composición de la solución que llena el capilar.

*Tabla 5.3. - Modos de operar en electroforesis capilar.*

Modo	Fundamento de la separación
Electroforesis capilar en zona (CZE)	Movilidad en solución libre
Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC)	Interacciones iónicas o hidrofóbicas con micelas
Electroforesis capilar en gel (CGE)	Tamaño y carga
Isoelectroenfoque capilar (CIEF)	Puntos isoeléctricos
Isoatacoforesis capilar (CITP)	Migración entre electrolitos limitantes, conductor y terminal
Electrocromatografía capilar (CEC)	Afinidad analito-fase estacionaria.

### Electroforesis capilar en zona (CZE).

La electroforesis capilar en zona, nombre bajo el cual es conocida en la bibliografía, también se llama electroforesis capilar en zona libre. La CZE es uno de los modos más utilizados debido a la simplicidad de operación y a su gran versatilidad. En esta técnica la separación de los solutos ocurre debido a que éstos emigran en zonas discretas a diferentes velocidades, en un capilar lleno de un electrolito

adecuado. Gracias al flujo electroosmótico, es posible llevar a cabo la separación de cationes y aniones. Las moléculas neutras no se separan y eluyen junto al disolvente. Anteriormente hemos comentado los aspectos teóricos de la separación, así pues no incidiremos sobre el tema.

### Selectividad y uso de aditivos

La selectividad en CZE puede alterarse fácilmente cambiando el pH del medio de separación, el cual una vez optimizado se controla por medio de tampones. Existen numerosas publicaciones donde se hace referencia a la influencia de la concentración de tampón sobre la movilidad electroforética y el FEO (22-23). Así, un buen tampón de separación deberá reunir los siguientes requisitos:

- ① Buena capacidad tamponante en el rango de pH elegido.
- ② El pH debe mostrar pequeñas variaciones con la temperatura
- ③ No presentar interferencias con el sistema de detección utilizado.
- ④ La movilidad del ión del tampón debe ser similar a las movilidades de los analitos para evitar la electrodispersión.
- ⑤ La movilidad de los contraiones del tampón debe ser lo menor posible para minimizar el calor generado por efecto Joule.

El pH del tampón de separación es un parámetro crítico a la hora de la separación, debido a la alta estabilidad de los capilares de sílice fundida puede estar comprendido entre 2 y 12. Se puede utilizar una extensa variedad de tampones, entre los que destacan tris, borato, histidina y CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propano sulfónico). Estos tampones se caracterizan por poseer iones voluminosos que hacen que puedan ser usados a elevadas concentraciones sin generar corrientes demasiado altas, la desventaja es que presentan fuerte absorción en la zona del UV.

Otra forma de alterar la selectividad es mediante la adición de sustancias al tampón de separación. Entre los más utilizados están: surfactantes, selectores quirales, disolventes orgánicos, urea e iones metálicos.

Las moléculas de surfactantes, en concentración por debajo de la concentración crítica micelar, pueden actuar como agentes solubilizadores para solutos hidrofóbicos, como reactivo formados de pares iónicos o como modificadores de la pared del capilar para conseguir alteraciones del flujo electroosmótico. Cuando el surfactante se utiliza por encima de la concentración crítica micelar, nos encontramos en otra modalidad de separación electroforética.

El disolvente orgánico altera la polaridad y la viscosidad del electrolito, modificando la movilidad electroosmótica de los iones y la movilidad del FEO. Mejora la solubilización de las moléculas y reduce la interacción de éstas con la pared del capilar.

Los selectores quirales se utilizan para llevar a cabo el análisis de compuestos quirales, el cual tiene importancia en las industrias alimentarias y farmacéuticas. Como aditivos se utilizan ciclodextrinas, éteres corona, sales biliares.

### **Electroforesis capilar en gel (CGE)**

En este modo de electroforesis, se combinan los principios de separación de la electroforesis en gel tradicional con la instrumentación y los pequeños diámetros de los capilares que eliminan y disipan mejor el calor, fue introducida por Cohen y Kerpen. El capilar se rellena con un gel que es puramente un polímero lineal de poliacrilamida o un polímero entrecruzado de poliacrilamida/bisacrilamida ( cuando se utilizan los geles de poliacrilamida la técnica se denomina electroforesis en gel de poliacrilamida). También se utilizan los de dextrano, óxido de polietileno, y los de agarosa.

En esta técnica no se suele trabajar con flujo electroosmótico, por tanto las paredes del capilar se recubren del mismo polímero utilizado en la separación, para eliminar la carga residual de la pared. Al no existir FEO, no permite la separación de moléculas neutras (10-12).

Su aplicación principal es en las ciencias biológicas, para la separación por tamaños de macromoléculas como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos.

### **Isoelectroenfoque capilar (CIEF).**

Este modo de electroforesis capilar no se basa en las diferencias de carga/radio de los analitos, sino en sus diferentes puntos isoeléctricos ( $pI$ ), es decir, el pH cuando los analitos se encuentran en forma de compuestos neutros. Se utiliza, especialmente, para separar compuestos de naturaleza anfótera, como son las proteínas y los péptidos, y se basa en la migración electroforética de las especies en un gradiente de pH. Fue desarrollada por primera vez por Hjerten y Zhu y se lleva a cabo en ausencia de FEO, por lo que el interior del capilar, normalmente, está recubierto por metilcelulosa o poliacrilamida.

Se aplica fundamentalmente a la separación de proteínas y péptidos en base a sus puntos isoeléctricos ( $pI$ ), es decir, el pH cuando los analitos se encuentran en forma de compuestos neutros (10-12).

### **Isotacoforesis capilar (CITP)**

La característica principal de este modo de electroforesis es que el medio electroforético está conformado por un electrolito de naturaleza heterogénea. Fue introducida por Evaraest en 1976, y es el único modo de EC que supone un sistema discontinuo, por lo que la forma de operar es diferente a la descrita para las otras modalidades.

En el desarrollo de un único análisis, mediante isotacoforesis, pueden analizarse o bien aniones o bien cationes pero no los dos al mismo tiempo. El electrolito conductor debe contener iones de mayor movilidad que los iones de la muestra, y ésta a su vez, debe contener iones más móviles que el electrolito terminal. Al aplicar el campo eléctrico, los iones serán atraídos y comenzarán a moverse con una velocidad dependiendo de su movilidad electroforética. Al final se alcanza el estado estacionario, en el que las distintas zonas constituidas por los mismos iones se mueven a igual velocidad, para lo cual el campo eléctrico tendrá un valor distinto en cada una de ellas. En esta técnica se obtienen zonas de solutos muy bien definidas.

Normalmente, se desarrolla en la modalidad de flujo de corriente eléctrica constante lo que implica que debe existir una proporción constante entre la concentración iónica de cada zona de soluto y su movilidad, determinadas por el electrolito conductor. Así, las zonas de soluto menos concentradas (o más concentradas) que el electrolito conductor se estrecharán (o ensancharán) para adaptarse a la concentración adecuada. Esta propiedad se aprovecha como etapa previa de preconcentración de muestras, antes de ser separadas por las otras técnicas electroforéticas.

Los tiempos de migración no tienen ningún significado pues pueden variar al cambiar el número de los componentes o la concentración de los mismos. Otra característica es que sólo con la inyección de un patrón interno se puede llevar a cabo la cuantificación sin necesidad de obtener curvas de calibración para cada uno de los picos (10-12).

### Electrocromatografía capilar (CEC)

Esta técnica se ha desarrollado como respuesta a los problemas que plantea la CZE entre los que se encuentran:

- ☞ Sólo se pueden separar analitos con carga ( a no ser que se utilice la MEKC).
- ☞ Algunas especies con estructuras muy similares (tales como un compuesto con actividad farmacológica y sus compuestos de degradación) presenten diferencias en sus movilidades que son mucho menos importantes a la hora de la separación que sus diferencias en los factores de capacidad en HPLC.

Los principios de la CEC son similares a los de la cromatografía líquida ya que utiliza capilares relleno con los mismos materiales y principios de separación que en esta técnica. Sin embargo, se han de resaltar diferencias en cuanto al movimiento de la fase móvil, la selectividad, el diámetro interno de la columna o el tamaño de partícula del empacado.

Uno de los problemas que presenta esta técnica es que para rellenar el capilar con el electrolito de separación hay que utilizar altas presiones, algo para lo que muchos de los instrumentos actuales no están preparados.

Esta técnica es muy reciente, por tanto, aún está en expansión. Se ha utilizado sobretodo en la industria farmacéutica para estudiar los productos de degradación de los principios activos del fármaco. Actualmente, se piensa que esta técnica tendrá una gran expansión cuando exista una buena instrumentación y material de separación disponible a escala comercial (10-12).

### Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC).

Este modo de electroforesis es el que hemos utilizado para llevar a cabo la separación y determinación de isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y rifampicina, por lo cual haremos un estudio algo más amplio.

La electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC), fue introducida en el año 1984 por Terabe y col. (7-9) y supuso un gran avance en la electroforesis capilar. Es una técnica muy utilizada ya que en una sola operación es posible llevar a cabo la separación de moléculas neutras y cargadas. Este método combina el mecanismo de separación de la cromatografía con el movimiento electroforético y electroosmótico de los analitos y de la disolución.

Se utiliza la misma instrumentación que para el desarrollo de CZE, pero en MEKC se añaden tensioactivos, también llamados agentes micelares o surfactantes, al electrolito de separación, en concentraciones superiores a un valor característico denominado **concentración crítica micelar (c.m.c)**, formando unos agregados ordenados de moléculas de surfactantes (monómeros) con estructuras moleculares. Estos monómeros poseen una estructura de tipo R-X, donde R es una cadena hidrocarbonada, normalmente lineal, de 8 a 18 átomos de carbono que forma la cola hidrofóbica, y X es un grupo polar o iónico denominado cabeza. Las moléculas se unen libremente en una forma aproximadamente esférica con las cabezas hacia el exterior y las cadenas orgánicas juntas hacia el interior.

En la **tabla 5.4** se hace una clasificación, dependiendo de la naturaleza del grupo de cabeza polar, de los principales surfactantes, también se aportan datos de la concentración crítica micelar y del **número de agregación (NA)**, que es el número de moléculas que conforman la micela en cada caso.

Tabla 5.4. - Principales surfactantes

SURFANTANTES	c.m.c (mM)	NA
<b>ANIÓNICOS</b>		
Dodecil sulfato sódico (SDS)	82	62
<b>CATIÓNICOS</b>		
Bromuro de cetiltrimetilamonio	13	78
Bromuro de dodecil amonio	14	50
<b>ANFÓTEROS</b>		
CHAPS*	8	10
<b>NO IÓNICOS</b>		
Tritón X-100	24	140
n-dodecil- $\beta$ -D-maltósida	16	
<b>SALES BILIARES</b>		
Colato sódico	14	36925
Desoxicolato sódico	5	36990
Taurocolato sódico	37178	4

\*CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

La concentración de monómeros del agente micelar en equilibrio con las micelas es, aproximadamente, constante e igual a la c.m.c. (24). Así, un aumento de la concentración de surfactante por encima de c.m.c. conduce a un aumento en el número de micelas en disolución sin modificar sustancialmente la concentración de monómeros libres. La concentración de micelas en disolución acuosa puede calcularse a partir de la concentración total del agente micelar ( $C_T$ ), la m.c.m. y el NA:

$$\text{Micelas} = (C_T - \text{c.m.c}) / \text{NA}$$

La propiedad más importante de las micelas es su poder solubilizante sobre hidrocarburos, reactivos neutros, etc., es decir, sobre especies poco solubles o insolubles en fase acuosa. El proceso de solubilización micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa (25).

Otra propiedad importante de los medios micelares es su capacidad para concentrar o separar reactivos. La solubilización selectiva de reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa y se ven favorecidas reacciones que en fase acuosa eran lentas.

La tercera propiedad de las micelas es su capacidad para alterar el microentorno del soluto que se ha solubilizado. Se producen cambios sustanciales de la fase acosa al interior de la micela en propiedades tales como la acidez, la viscosidad, la constante dieléctrica o la polaridad. La consecuencia inmediata son los cambios en los equilibrios, en las propiedades espectrales y en la reactividad del soluto solubilizado (26).

La elección del surfactante, por lo tanto, es importante y debe reunir las siguientes características:

- ① Debe presentar suficiente solubilidad en la solución tampón para que pueda estar en forma de micelas.
- ② La solución micelar debe ser homogénea y transparente al ultravioleta.
- ③ La solución micelar debe presentar baja viscosidad.

El surfactante, y por tanto las micelas están normalmente cargados, por lo que al aplicar el campo eléctrico emigran hacia un electrodo u otro, dependiendo de la carga. Surfactantes aniónicos, como el SDS migrarían hacia el ánodo, es decir en

dirección opuesta al FEO. En las condiciones de trabajo (pH neutros o básicos) el FEO es más rápido que la movilidad de las micelas y por tanto el movimiento neto es en la dirección del FEO.

Al inyectar una muestra en el interior del capilar que contiene la fase micelar, los solutos neutros se separarán debido a sus diferencias en la constante de reparto entre la fase acuosa y el interior micelar (hidrofóbico), las moléculas muy hidrofóbicas entrarán en las micelas y no tendrán ninguna tendencia a salir de las mismas, por lo que saldrán con las micelas. Los solutos cargados pueden asimismo interaccionar con las micelas cargadas por fuerzas electrostáticas o formar pares iónicos con las moléculas libres de surfactante. Cuando el soluto no interacciona con la micela migrará a la velocidad del FEO.

En la *figura 5.8* se presenta un esquema de la separación mediante MEKC.



*Figura 5.8. - Separación en MEKC*

La forma usual de trabajar en esta técnica es utilizar surfactantes aniónicos, si el flujo electrostático se dirige al cátodo y, viceversa. Por lo que las velocidades de migración de los solutos neutros estarán comprendidas entre la velocidad del FEO y la velocidad de las micelas, por tanto los tiempos de migración de los solutos neutros

están comprendidos entre el tiempo de migración de un soluto que viaja a la velocidad del FEO,  $t_0$ , y el tiempo de migración micelar,  $t_{mc}$ , esto se conoce como ventana de tiempos (figura 5.9)

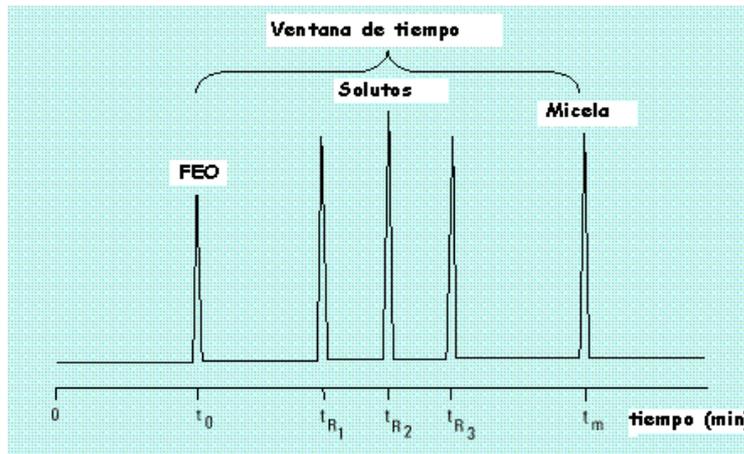


Figura 5.9. - Electroferograma de analitos separados mediante MEKC

Para determinar el tiempo micelar se utiliza una sustancia altamente hidrófoba como el Sudan III o el Sudan IV y, para determinar el tiempo del FEO se suele utilizar una sustancia hidrofílica que no se introduce en la micela como es el metanol.

El tiempo de migración de un compuesto neutro,  $t_R$ , viene determinado por su factor de capacidad,  $k'$ , que se define como el número de moles de soluto dentro de la micela y el número de moles en la fase acuosa, relacionado asimismo con el tiempo de migración y con el coeficiente de partición del soluto:

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{ac}} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_m}\right)} = K \left(\frac{V_{mc}}{V_{ac}}\right)$$

donde  $t_R$ : tiempo de retención del soluto.

$t_0$ : tiempo de migración de un soluto no retenido y que se mueve a la velocidad del FEO

$t_{mc}$ : tiempo de retención de la micela.

$K$ : coeficiente de partición.

$V_{mc}$ : volumen de la fase micelar.

$V_{mc}$ : volumen de la fase acuosa

De la ecuación anterior se deduce que:

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)k'} t_0$$

Es decir:

- Cuando el  $t_R = t_0$ ,  $k' = 0$  y el analito no interacciona con la micela.
- Cuando  $t_R = t_{mc}$ ,  $k' = \infty$  y el analito se incorpora totalmente al interior de la micela.

De forma general, el factor de capacidad de un soluto aumentará linealmente con la concentración del surfactante. Esto está limitado por la corriente generada que incluso trabajando con capilares muy estrechos (25 a 50  $\mu\text{m}$ ) se requiere una eficaz termostatación del mismo. Los valores óptimos para este parámetro están entre 0.5 y 10.

Por otro lado la resolución entre dos especies viene dada por la ecuación:

$$R = \left( \frac{N^{1/2}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \left( \frac{1 - \left( \frac{t_0}{t_m} \right)}{1 - \left( \frac{t_0}{t_m} \right) R_1} \right)$$

Donde  $N$ : es la eficacia expresada como el número de platos teóricos, los valores oscilan entre  $2 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^5$ .

$\alpha$ : es la selectividad ( $\alpha = k'_2/k'_1$ ) y los subíndices 1 y 2 son los referentes al primer y al segundo soluto, es el parámetro que más afecta a la resolución ya que representa las diferencias relativas entre los coeficientes de distribución de dos analitos. Se puede modificar cambiando la naturaleza de las micelas o la composición de la fase acuosa. En MEKC es posible separar analitos con  $\alpha = 1.02$ .

Además de la concentración de tampón, existen otros efectos que ejercen una influencia importante sobre la separación en MEKC: naturaleza del surfactante, temperatura del tampón, utilización de aditivos como los modificadores orgánicos.

### Efecto de la temperatura

La temperatura tiene un efecto importante en la separación en MEKC debido a varios factores:

① Las micelas sólo se forman cuando se sobrepasa una temperatura crítica micelar denominada punto de Kraft, independiente de la concentración del surfactante.

② Influye en el coeficiente de partición del soluto de forma que un aumento de la temperatura provoca una disminución del coeficiente de partición.

③ Influye sobre el factor de capacidad,  $k'$ , y en la eficiencia, observándose una disminución en estos factores con el aumento de la temperatura (27).

④ Disminuye el tiempo de análisis y, normalmente, disminuye la resolución.

### Separaciones quirales en electroforesis capilar

Los enantiómeros son formas isoméricas del mismo compuesto que únicamente se diferencian en su orientación espacial, ya que sus propiedades físicas son idénticas. Dos enantiómeros no son superponibles, sino que uno es la imagen especular del otro. Suelen denominarse uno como D y otro como L por su capacidad de desviar la luz polarizada.

El interés de las separaciones de enantiómeros mediante cualquier método deriva en que en muchas ocasiones, los enantiómeros tienen propiedades químicas distintas. En el caso de los fármacos, a veces, sólo uno de ellos posee la actividad farmacológica y la presencia del otro es innecesaria. Consiguiendo un método que los separe se podrían obtener medicamentos de una mayor pureza.

Los métodos cromatográficos típicamente utilizados para realizar separaciones quirales son cromatografía líquida, cromatografía líquida en capa fina y cromatografía de gases (28). El más utilizado es la cromatografía líquida (29) que se ha utilizado con fases estacionarias quirales conseguidas con unión de proteínas, aditivos en la fase móvil, etc. El inconveniente que presentan estos métodos son las bajas eficiencias de las separaciones que resultan en pérdida de resolución, a esto hay que sumar el elevado precio de las columnas quirales. De esta manera surge la electroforesis capilar como alternativa ofreciendo separaciones de alta resolución utilizando aditivos que se añadirán al electrolito y de los cuales se requerirán pequeños volúmenes.

En esta última década se han desarrollado muchos trabajos y libros que proporcionan más detalles acerca de estas separaciones y de sus campos de aplicación (30). La selectividad de las separaciones puede manipularse modificando las propiedades del electrolito, el pH, la fuerza iónica o la composición del electrolito. En el electrolito pueden añadirse surfactantes, solventes orgánicos o agentes capaces de formar complejos, como aditivos.

Para llevar a cabo las separaciones quirales, en principio podría utilizarse cualquier modalidad, pero las que mejores resultados dan son las CZE y MEKC. En CZE se ha comprobado que el empleo de ciclodextrinas, proteínas, carbohidrato o éteres corona en el electrolito resulta muy versátil y barato. También se ha utilizado la CEG para separar, fundamentalmente, los enantiómeros de aminoácidos (31-32). En cuanto a la MECK, las separaciones quirales pueden realizarse recurriendo a las ciclodextrinas, mezclas de surfactantes quirales y no quirales, metales quelantes enantioselectivos (33), sales biliares, etc.

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LAS MEDIDAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR

El control de ciertos parámetros es fundamental en electroforesis capilar para asegurar una buena repetitividad y reproducibilidad de las medidas, tanto a nivel de tiempos de migración como de áreas de pico corregidas (APC) que se utilizan para la cuantificación de los analitos. El tiempo de migración de un compuesto ya ha sido definido como el tiempo que transcurre entre la inyección de dicho compuesto y su detección.

Cómo se ha dicho con anterioridad, los solutos en CE son separados en base a sus diferentes movilidades (relación carga/masa). Las especies con mayor movilidad, migrarán más rápidamente a lo largo del capilar y por lo tanto atravesarán el detector en menos tiempo (tiempo de residencia) que las especies con menor movilidad. El área de pico es proporcional a la concentración del soluto, pero depende igualmente de la velocidad a la que se desplace el compuesto dentro del capilar. Los solutos con baja movilidad darán áreas más grandes ya que tardarán más tiempo en atravesar el detector.

En HPLC todos los solutos son arrastrados a través del detector con una velocidad de flujo constante, por lo que todos los compuestos tienen el mismo tiempo de residencia y es posible una comparación directa de las áreas de pico. Sin embargo en CE, como el tiempo de residencia de cada soluto es diferente es necesario una normalización para poder comparar estas áreas. La normalización simplemente consiste en la división del área de pico entre su correspondiente tiempo de migración, obteniendo así el área de pico corregida (APC) (34).

$$APC = \frac{A_p}{t_m}$$

$A_p$ : área de pico;  $t_m$ : tiempo de migración.

**Los principales factores que deben someterse a control son:**

✓ **Acondicionamiento del capilar.** - Antes de realizar cualquier separación es necesario, como ya se ha comentado, activar el capilar mediante una serie de lavados. Una vez activado se puede comenzar a utilizar. Entre inyecciones es aconsejable acondicionar el capilar haciendo pasar NaOH para restablecer la superficie del capilar o simplemente disolución de electrolito, pasando NaOH sólo cuando se pasa de una serie de medidas a otra.

✓ **Concentración de la muestra.** - La inyección de una muestra en concentración adecuada es esencial para obtener una buena repetitividad a nivel de áreas de pico, ya que disminuirán los errores de integración.

✓ **Mantenimiento del pH durante las separaciones.** - La aplicación de un potencial se traduce en una electrólisis de las disoluciones situadas en ánodo y cátodo. El resultado es una acidificación y una alcalinización progresivas de dichas disoluciones tampón, que afectará a los tiempos de migración y a la selectividad. El número de separaciones que podrán soportar los electrolitos vendrá determinado por la capacidad tamponadora y las condiciones de operación (voltaje aplicado y duración de las separaciones).

✓ **Regulación de la temperatura del capilar.** - Una variación en la temperatura implica variación en la viscosidad del electrolito, como consecuencia de ello se ven afectados los volúmenes de muestra inyectados y las movilidades de los compuestos. La regulación de la temperatura debe ser tan eficaz como para lograr que en todos los puntos del capilar se obtenga una temperatura idéntica y constante.

✓ **Tiempo de inyección.** - El volumen inyectado cuando se recurre a la inyección hidrodinámica es función de la presión aplicada y del tiempo de inyección. Un tiempo de inyección superior a 2 s asegura una buena repetitividad de los volúmenes inyectados.

✓ **Nivel de electrolito en los viales de separación.** - Es prácticamente imprescindible que los viales que contienen electrolito y que se van a utilizar para separar tengan el mismo volumen, es decir, que estén a un mismo nivel, para evitar un fenómeno de sifonaje. Si se van a realizar muchas separaciones habrá que restaurar el contenido de los viales para evitar esas diferencias de nivel.

✓ **Gradiente de potencial.** - El modo en que se aplique el potencial debe ser gradual y progresivo para evitar un calentamiento del medio que conduciría a la expansión del líquido y a la pérdida de una parte del volumen de la muestra inyectada que fluiría hacia el exterior del capilar.

## APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La versatilidad que ofrece la electroforesis capilar debido a la posibilidad de desarrollarla en sus diferentes tipos, permite su aplicación a la separación de moléculas muy diversas, desde iones inorgánicos y moléculas pequeñas hasta macromoléculas.

En la **tabla 5.5** se resumen algunas de las principales aplicaciones de las distintas modalidades de electroforesis capilar y el tipo de muestras a las que se ha aplicado la separación.

*Tabla 5.5. - Principales aplicaciones de la electroforesis capilar*

MODALIDAD	ANALITOS	MUESTRAS
CZE	Iones metálicos, moléculas orgánicas pequeñas, aminas, ácidos, carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc.	Aguas, fluidos biológicos, jugos, vinos, champú, productos de degradación, etc. (35-40)
MEKC	Fármacos, antibióticos, péptidos, drogas ilícitas, compuestos derivados del benceno, flavonoides, ácidos nucleicos, aminoácidos derivatizados, hormonas, vitaminas, etc	Productos farmacéuticos, fluidos biológicos, aguas, productos naturales, etc. (41-49)
CIEF, CITP	Proteínas, nucleósidos, etc.	Suero y tejidos humanos (50)
CGE, CEC	Aminas hidrofóbicas, etc	Medicamentos (51)

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la bibliografía sólo se han encontrado tres trabajos en los cuales se determine algunos de los analitos en estudio mediante electroforesis capilar, concretamente isoniacida junto a otras hidracinas.

✓ **Yang y col. (52)**, determinan isoniacida, fenilhidracina, semicarbacida e hidracina, mediante electroforesis capilar en zona (CZE), utilizando detección electroquímica con un electrodo microdisco de fibra de carbono modificado con ácido poli-glutamico, el cual presenta una alta actividad catalítica para hidracinas y tiene buena estabilidad.

✓ **You y col. (53)**, determinan isoniacida, hidracina y metilhidracina mediante CZE, la separación se lleva a cabo en un capilar de sílice fundida (37cmx25µm d.i), con un electrolito de separación compuesto por tampón fosfato 10mM y pH 7.02, en este caso también utilizan detección electroquímica en modo amperométrico utilizando un sistema de tres electrodos, un electrodo de microdisco de platino modificado con 4-piridil-hidroquinona, como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. Con el uso del electrodo modificado con 4-PHQ, las tres especies pueden ser detectadas incluso a potencial 0.0V debido a su alta actividad catalítica.

✓ Por último, **Liu y col (54)** logran la separación de isoniacida, hidracina y metilhidracina mediante MEKC, con un capilar de sílice fundida (52.2cmx50µm ó 60cmx75µm) y utilizando como electrolito de separación tampón fosfato 10mM/SDS-10mM, pH 5.52, para la detección se utilizó potencial de 0.5 V. Al igual que en los

casos anteriores la detección fue electroquímica, operando con dos electrodos, un electrodo de microdisco de fibra de carbono, modificado con paladio, como electrodo de trabajo y uno de Ag/AgCl como electrodo de referencia.

Se ha realizado una revisión bibliográfica sobre antibióticos en general, determinados mediante electroforesis capilar, haciendo distinción entre electroforesis capilar en zona (CZE) (55-75), y electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC) (76-86), ya que son en estas modalidades de electroforesis donde, normalmente, se determinan estas sustancias. En la mayoría de los casos la inyección de muestra utilizada fue hidrodinámica. Mediante CZE hay numerosos trabajos donde determinan diversas tetraciclinas (55-59), antibióticos aminoglicosídicos (61, 62), quinolonas (64-67), así como otros antibióticos como cefalosporinas (68), sulfonamidas (71) etc. Utilizando MEKC también se determinan tetraciclinas (81, 82), cefalosporinas (78, 79), quinolonas (80), así como aminoácidos enantioméricos (83). En las tablas 5.6-7, se aportan más detalles acerca de las condiciones de separación, detección y tratamientos de las muestras.

La separación de enantiómeros por electroforesis capilar es importante en análisis de sustancias farmacológicas, medioambientales y agrícolas. De los diferentes selectores quirales utilizados para la resolución de enantiómeros, los antibióticos macrocíclicos están considerados muy efectivos y está creciendo su utilización en los últimos años. Los antibióticos utilizados como selectores quirales incluyen diferentes grupos como ansamicinas (rifamicina B y SV), glicopéptidos (vancomicina, teicoplanin, ristocetin-A, avoparcin), polipéptidos (tiosstrepton) y aminoglicósidos (estreptomina y canamicina) (87, 88). De todos ellos los más utilizados son los glicopéptidos (89-94).

TABLA 5.6.- DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA (CZE)

Antibióticos	Condiciones de separación	Detección	Muestras	Comentarios	Ref
Tetraciclinas	capilar de sílice: (57 cmx50 $\mu$ m) Voltaje: +300 v/cm Electrolito de separación: tampón, 20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /10mM ácido cítrico, pH 3.2, conteniendo 4% N-metilmorfolina y 12% acetónitrilo.	UV- 270 nm	Miel	Detección de antibióticos residuales en muestras de miel.	55
Tetraciclinas	capilar de sílice: (80 cmx50 $\mu$ m) Voltaje: +20kV Electrolito de separación: tampón borato 0.1 M, pH 8.7 con 1mM-EDTA.	Voltametría cíclica	Formulaciones farmacéuticas	Se estudian distintos electrodos, obteniendo los mejores resultados para un electrodo de film de mercurio.	56
Tetraciclinas	Capilar de sílice: (87 cmx75 $\mu$ m) Voltaje: +30kV Electrolito de separación: 50mM-Tris (pH ajustado a 2.5 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	UV- 214 nm	Formulaciones farmacéuticas	Separación de tetraciclina y sus impurezas	57
Tetraciclinas	Capilar de sílice: (27 cmx75 $\mu$ m) Voltaje: +15kV Electrolito de separación: 0.5M de acetato de sodio en N-metilformamida.	Fluorescente inducida por láser a 514 nm (excitación 325 nm)	Plasma y formulaciones farmacéuticas	Tetraciclinas se disuelven en una disolución 50mM de acetato magnésico tetrahidratado en N-metilformamida.	58
Tetraciclinas	Capilar de sílice: (111.9cmx75 $\mu$ m) Electrolito de separación: 4.3mM fosfato sódico, pH 7.5	UV- 260 nm	Formulaciones farmacéuticas	Las muestras fueron preparadas en tampón fosfato pH 7.5.	59

<b>Rubicinas</b>	Capilar de sílice: (57cmx75µm) Voltaje: +15kV Electrolito de separación: tampón borato 0.1M, pH 9.5 y 30% de acetoniitrilo.	Fluorescente inducida por láser a 560 nm (excitación 488 nm)	Suero	Muestras de suero fueron mezcladas con acetoniitrilo y centrifugadas. El supernadante si inyectó en el sistema.	60
<b>Antibióticos aminoglicosídicos</b>	Capilar de sílice Voltaje: +6.2kV Electrolito de separación: disolución 125mM en NaOH.	Detección electroquímica	Orina	Para la detección se utiliza un microdisco de fibra de carbono, modificado con micropartículas de cobre.	61
<b>Antibióticos aminoglicosídicos</b>	Capilar de sílice: (30cmx15µm) Voltaje: +10kV Electrolito de separación: disolución 100mM en NaOH.	Detección electroquímica	Formulaciones farmacéuticas	Para la detección se utiliza un electrodo de Cu.	62
<b>Estreptomina y dihidro - estreptomina</b>	Capilar de sílice: (90cmx50µm) 1) Voltaje: +18kV Electrolito de separación: tampón borato 160mM. 2) Voltaje: -18kV Electrolito de separación: tampón borato 75mM y 0.5mM de miristiltrimetilamonio.	UV-195 nm	Formulaciones farmacéuticas	La separación se puede llevar a cabo en modo anódico o catódico.	63
<b>Tobramicina</b>	Capilar de sílice: (70cmx 50µm) Voltaje: +15kV Electrolito de separación: tampón borato 185 mM.	UV-195 nm	Formulaciones farmacéuticas		
<b>amicamicina becamicina canamicina</b>	Capilar de sílice: (70cmx 50µm) Voltaje: +15kV Electrolito de separación: tampón borato 175 mM.	UV-195 nm	Formulaciones farmacéuticas		

Quinolonas	Electrolitos de separación: THF- agua, en diferentes proporciones y pH.	UV		Propone un modelo matemático para predecir la composición óptima de la fase móvil, para la separación de quinolonas.	64
Quinolonas		UV		Propone un modelo matemático para el cálculo de las movilidades de cada sustancia en cada valor de pH y así calcular las resoluciones.	65
Quinolonas	Electrolito de separación: tampón tetraaborato sódico 40mM, pH 8.1 y 10% de metanol	UV	Plasma	Se utiliza extracción en fase sólida, usando cartuchos C-18 y eluyendo con una mezcla agua/metanol (3:7)	66
Quinolonas	Capilar de sílice: (57cmx 75µm) Voltaje: +10kV Electrolito de separación:tampón 100mM-HEPES/acetoniitrilo (9:1)	UV- 280 nm	Suero y orina		67
Cefalosporinas	Diferentes electrolitos de separación: 1)Tampón fosfato 2)Cittrato 3) MES	UV		La mejor separación se obtiene con tampón citrato o MES	68
Eritromicina espiramicina oleandomicina	Capilar de sílice: (80cmx 50µm) Voltaje:+12.5kV Electrolito de separación: tampón fosfato 200mM pH 7.5	Voltametría cíclica	Formulaciones farmacéuticas	Antibióticos fueron disueltos en metanol y diluidos con tampón fosfato. Electrodo de trabajo film de mercurio.	69
Eritromicina josamicina oleandomicina	Capilar de sílice: (81.6cmx 75µm) Voltaje:+25kV Electrolito de separación: tampón fosfato 75mM pH 7.5/metanol (1:1)	UV- 200 nm	Formulaciones farmacéuticas	Antibióticos inyectados en metanol.	70

<p><b>Sulfonamidas</b></p>	<p>Capilar de sílice: (50cmx 50µm)          Voltaje: +15kV          Electrolito de separación: tampón fosfato 50mM y tampón borato 50mM, pH 6.4, conteniendo 2mM de beta-ciclodextrina.</p>	<p>UV- 200 nm</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>71</p>
<p><b>Carbapenos Antibióticos beta-lactanos</b></p>	<p>Capilar de sílice: (47 cmx 25µm)          Voltaje: +30kV          Electrolito de separación: tampón fosfato 100mM, pH 8</p>	<p>UV- 210 nm</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>72</p>
<p><b>Antibióticos beta-lactanos</b></p>	<p>Capilar de sílice: (70cmx 50µm)</p>	<p>fluorescente</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>73</p>
<p><b>Antibióticos polihidroxi</b></p>	<p>Capilar de sílice: (80cmx 22µm)          Voltaje: +15kV          Electrolito de separación: disolución 100mM de NaOH.</p>	<p>Detección electroquímica</p>	<p>Formulaciones farmacéuticas</p>	<p>74</p>
<p><b>Prospidin</b></p>	<p>Capilar de sílice: (50cmx 70µm)          Voltaje: +14kV          Electrolito de separación: tampón borato 20mM, pH 11.2/metanol (1:1)</p>	<p>UV- 254 nm</p>	<p>Tejido de papiloma</p>	<p>75</p>

Determinación de beta-lactanos mediante formación de productos fluorescentes en presencia de iones Cd(II), Zn(II) y Co(II) en medio metanol.

Utiliza para la detección un electrodo de níquel.

Se utiliza inyección electroquímica.

**TABLA 5.7.- DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA ELECTROCINETICA MICELAR (MEKC)**

Antibióticos	Condiciones de separación	Detección	Muestras	Comentarios	Ref
Antraciclina		UV	Formulaciones farmacéuticas	Se utiliza preconcentración de la muestra para mejorar los límites de detección.	76
Cefalosporinas	Electrolito de separación: tampón de pH 6.5 y ácido pentanosulfónico (17.4g/l)	UV		Se estudian pH entre 5 y 8. Surfactantes estudiados: SDS y ácido pentanosulfónico.	77
Cefalosporinas	Capilar de sílice: (72cmx 50µm) Voltaje:306 V/cm Electrolito de separación: tampón borato 20 mM., 200mM SDS y 100mM ácido pentanosulfónico.	UV-210	Formulaciones farmacéuticas		78
Piperacilin	Capilar de sílice: (60cmx 75µm) Voltaje: -18kV Electrolito de separación: tampón borato/fosfato de pH 6.2 ó 8.7 conteniendo 0.7% SDS	UV-214 nm	Formulaciones farmacéuticas	Con el tampón de pH 8,7 se obtienen los mejores resultados.	79
Quinolonas	Capilar de sílice: (67cmx 50µm) Voltaje: +27kV Electrolito de separación: tampón borato 65mM/tampón fosfato 35mM, pH 7.3/60 mM de colato sódico, en acetoniitrilo (72:28)	UV- 275 nm	Formulaciones farmacéuticas		80
Tetraciclina	Capilar de sílice: (43cmx 75µm) Voltaje: +15kV Electrolito de separación: acetato amonio 15 mM, pH 6.5, conteniendo SDS-brij 35 (0.135%)	UV- 265 nm	Formulaciones farmacéuticas	Se estudian diferentes surfactantes (SDS, Brij 35, colato sódico. Sudan III) y mezclas de estos hasta obtener la mejor proporción para la separación.	81

<b>Tetraciclinas</b>	Capilar de sílice: (20cmx 50µm) Voltaje: +12kV Electrolito de separación: tampón fosfato 200mM, pH 2.2, 0.48% de Triton X-100.	UV- 265	Formulaciones farmacéuticas	También se puede utilizar Tween 20/tween 80 como surfactante.	82
<b>Aminoácidos enantioméricos</b>	Capilar de sílice: (50cmx 50µm) Voltaje: +10kV Electrolito de separación: tampón borato 20mM, fosfato 20 mM, 10mM-gamma-ciclodextrina y 50mM-SDS, pH 9.5	Fluorescente inducida por láser a 520 nm (excitación 488 nm)	Formulaciones farmacéuticas	Los analitos son hidrolizados en HCl 6M a 110°C y derivatizados con dansyl cloro durante 2 h en tampón borato de pH 9.08 durante 2 h en ausencia de luz.	83
<b>Sulfonamidas Antibióticos beta-lactanos</b>	Capilar de sílice: (60cmx 50µm) Voltaje: +22kV Electrolito de separación: tampón tetraborato sódico 20 mM/100mM-SDS, pH 8.5	UV- 205 nm	Formulaciones farmacéuticas		84
<b>Antibióticos beta-lactanos</b>	Capilar de sílice: (80cmx 50µm) Voltaje: +18kV Electrolito de separación: Tampón fosfato 100mM/borato 50mM/50mM-SDS, pH 8	UV- 205	Formulaciones farmacéuticas	El capilar está termostatzado a 34°C	85
<b>Antibióticos macrólidos</b>	Capilar de sílice: (68.5cmx 50µm) Voltaje: +20kV Electrolito de separación: tampón fosfato 80 mM/ 30 mM de colato sódico, 20% acetónitrilo y pH 6	UV- 205	Formulaciones farmacéuticas		86



## EXPERIMENTAL

En este último capítulo se aborda la separación y determinación de isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y rifampicina mediante la técnica de electroforesis capilar en medio micelar (MEKC).

El equipo de electroforesis capilar es un modelo de Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE, que consta de:

Muestreador automático

Cassette para el capilar

Sistema de refrigeración del capilar por aire forzado

Fuente de alto voltaje

Detector (Diode Array)

Ordenador para el manejo del equipo y tratamiento de datos

### **Muestreador automático**

El muestreador automático consta de un carro rotatorio con 48 posiciones para colocar los viales, tanto de disoluciones problemas como de electrolitos y demás disoluciones necesarias. El equipo tiene la posibilidad de acoplar un baño termostático para controlar la temperatura en el carro de muestras. Los viales que se utilizan tienen una capacidad de 1 ml y son de polipropileno.

### Cassette para el capilar

El cassette o carcasa es una pieza de plástico que se utiliza para contener el capilar, el cual se enrolla de tal forma que no se toque entre sí. Para que la ventana de detección en el capilar quede perfectamente alineada con el detector, al capilar se le acopla una pieza cilíndrica que hace que este quede ajustado en el cassette. El diseño del cassette hace que el cambio de capilar sea sencillo y rápido. Una vez que el capilar está montado dentro de este, la colocación en el equipo hace que cada extremo del capilar quede en el interior de los electrodos huecos, de tal forma que al aplicar la diferencia de potencial, tanto el capilar como el electrodo se encuentran dentro de la disolución de electrolito.

Por el interior del cassette se hace circular aire con el fin de disipar el calor generado con el paso de la corriente eléctrica y así mantener la temperatura constante en el interior del capilar.

En este estudio, se ha utilizado un capilar de sílice fundida de 48.5 cm de longitud y 40 cm de longitud efectiva, con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ . El capilar es de paso de luz extendido, tipo burbuja con una longitud de paso óptico de 150  $\mu\text{m}$ .

### Fuente de alto voltaje

La fuente de alto voltaje permite aplicar diferencias de potencial variables entre 1 y 30 kV y una intensidad de corriente variable entre 1 y 300  $\mu\text{A}$ . El equipo ofrece la posibilidad de trabajar a voltaje o a intensidad constante y cambio automático de polaridad. Además, permite seleccionar una rampa de potencial o tiempo que tardará el equipo en alcanzar el voltaje seleccionado.

### **Detector**

El detector UV-Vis, de filas de diodos con 410 fotodiodos, permite la detección de radiación UV-Vis en un rango de 190 y 600 nm y al igual que el detector utilizado en HPLC nos permite el registro de distintos electroferogramas a distintas longitudes de onda, así como los registro de los espectros de absorción en cada punto.

### **Acoplamiento del equipo a un ordenador**

El control del equipo de electroforesis se hace por un ordenador integrado en el equipo, a través de el se efectúan todas las variaciones referentes al sistema, como: encender y apagar la lámpara, programar tiempo de inyección, voltaje, intensidad, temperatura, mover muestreador, realizar lavados del capilar, etc. Por otro lado también nos permite establecer los métodos, las secuencias de medida y el tratamiento de los datos tras cada separación (integración, comparación de electroferogramas o de espectros...).

### Condiciones instrumentales

Los ensayos se realizaron empleando viales de polipropileno de 1 ml de capacidad. Los viales van tapados con un tapón de plástico, oradados en su parte superior para que pueda entrar electrodo y capilar.

Antes de iniciar las medidas, el capilar nuevo fue acondicionado haciendo pasar NaOH 0.1M durante 20 min y después agua durante 20 min para arrastrar el exceso de NaOH, después se pasó disolución tampón durante otros 20 min.

Entre medidas el capilar era acondicionado haciendo pasar disolución de electrolito durante 5 min. Después de cada serie de medidas, que implicaban un cambio en el electrolito de separación, el capilar era lavado con NaOH 0.1 M (5 min) y agua (5 min). En todos los casos las dos o tres primeras inyecciones daban valores poco reproducibles y no se tenían en cuenta para el estudio.

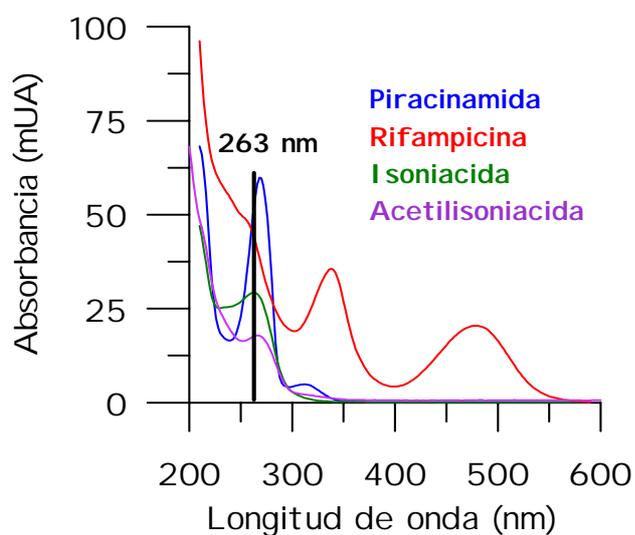
Los estudios preliminares se llevaron a cabo utilizando las siguientes condiciones instrumentales,  $\Delta V = 20$  KV constante, polaridad positiva, es decir inyección en el ánodo y detección en el cátodo, aplicando una rampa de potencial de 0.4 min, temperatura 25°C, inyección hidrodinámica de 4 s de duración (200 mbar s). La disolución inyectada contenía a la mezcla de los analitos en agua en concentración de 20 ppm más 100 ppm de ácido ascórbico para evitar la auto-oxidación de rifampicina, como ya se ha comentado en capítulos anteriores. La disolución de electrolito utilizada para llevar a cabo la separación estaba formada por iones del tampón adecuado para el estudio que queríamos desarrollar.

El método seguido para llevar a cabo la separación de los analitos se muestra en la **tabla 5.8**.

*Tabla 5.8. - Secuencia del método de separación.*

ETAPA	FUNCIÓN	DURACIÓN	VIAL	COMENTARIO
1	Acondicionamiento	5 min	Electrolito separación	
2	Inyección	4 s	Disolución problema	Hidrodinámica (50 mbar)
3	Separación	20 min	Electrolitos separación	20 kV 25 °C
4	Autocero			
5	Final	25 min		

La longitud de onda de detección fue seleccionada previamente en base al espectro de absorción de estos analitos. En la **figura 5.10**, se representan los espectros de absorción de cada analito entre 200 y 600 nm.



*Figura 5.10. - Espectros de absorción de piracinamida, isoniacida, acetilisoniacida y rifampicina en concentración de 5 ppm cada uno.*

La longitud de onda seleccionada para llevar a cabo los estudios de electroforesis capilar fue de 263 nm, porque como podemos observar en la figura anterior, todos nuestros compuestos presentan una buena absorción en esa longitud de onda. Para el caso de rifampicina, si fuese necesario, podríamos seleccionar otra longitud de onda dado el amplio espectro de longitudes de onda que presenta.

### Influencia del pH en la separación

La elección del pH del electrolito es un parámetro fundamental, ya que de él dependerá el grado de disociación de los analitos a separar y también, el grado de disociación de la sílice. Se realizaron separaciones en un intervalo de pH entre 2.5 y 12.

En la **tabla 5.9**, se muestran los valores de pH ensayados así como los sistemas tampón utilizados para su obtención.

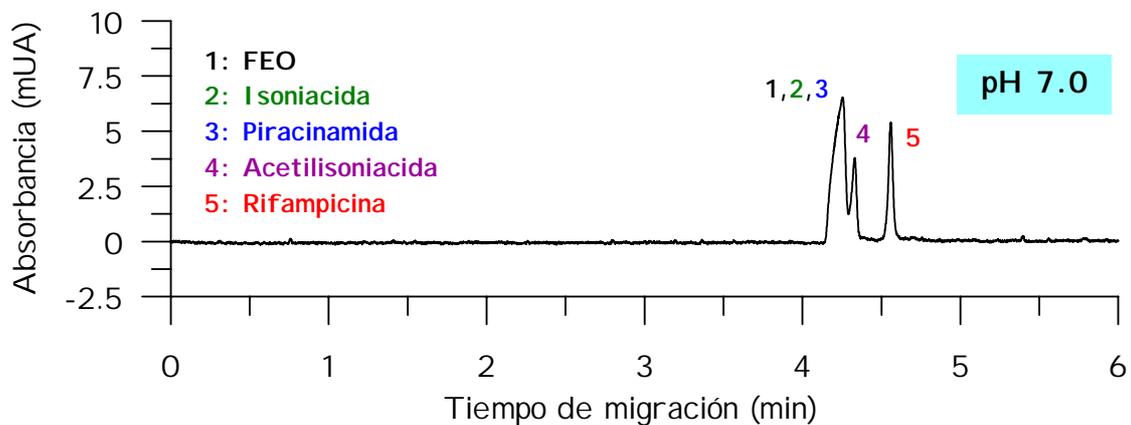
*Tabla 5.9. - Medios de pH estudiados.*

pH	Electrolito	pH	Electrolito
2.5	20 mM fosfato	9.2	20 mM borato
7.0	20 mM fosfato	10	20 mM borato
8.5	20 mM borato	12	20 mM fosfato

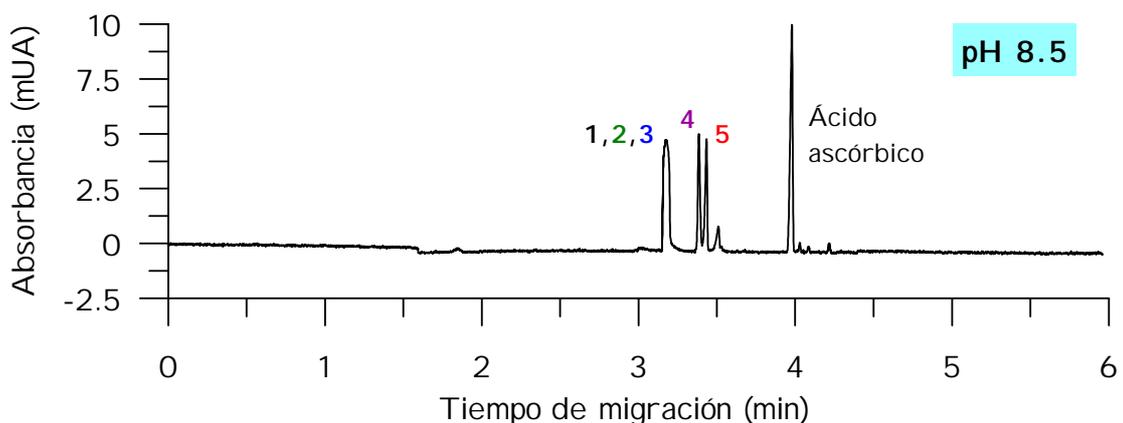
A pH 2.5, isoniacida sale a un tiempo de migración de aproximadamente de 4.0 min, acetilisoniacida a 5.6 min, piracinamida 13.5 el y flujo electroosmótico aparece a 12 min, rifampicina no aparece antes de los 30 min de análisis, además la línea base presenta mucho ruido y los tiempos de migración obtenidos no son reproducibles.

En las **figuras 5.11-15**, se observan los electroferogramas obtenidos para los demás medios de pH ensayados. Para pH 7, 8.5 y 9.2 todos los analitos aparecen antes de 6 min, aunque isoniacida y piracinamida no se separan y salen con el FEO. A partir de pH 10, la isoniacida se separa del FEO, no obstante piracinamida sigue saliendo con él.

Por otro lado, se observan como los valores de FEO van disminuyendo al aumentar el pH del electrolito de separación. A partir de pH 8.5 permanece prácticamente constante.



*Figura 5.11. - Electroferograma obtenido con tampón fosfato 20 mM y pH 7.*



*Figura 5.12. - Electroferograma obtenido con tampón borato 20 mM y pH 8.*

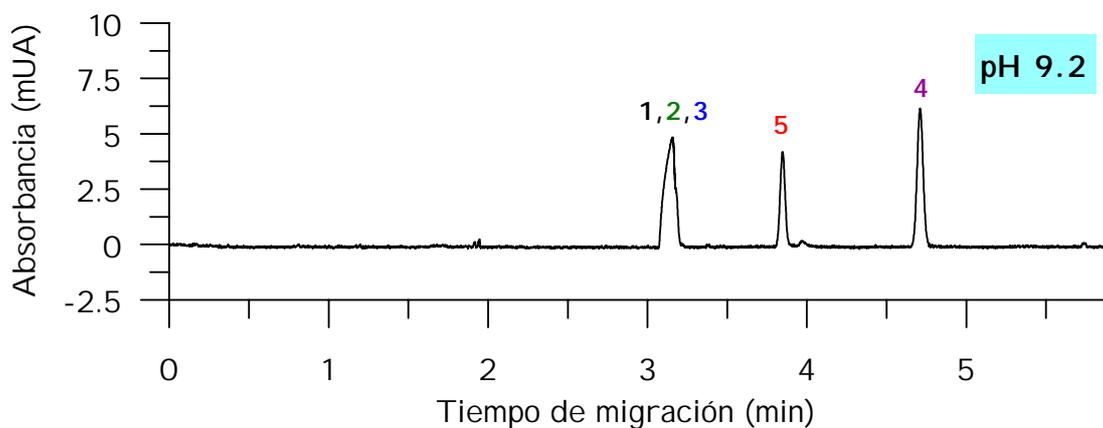


Figura 5.13. - Electroferograma obtenido con tampón borato 20 mM y pH 9.2

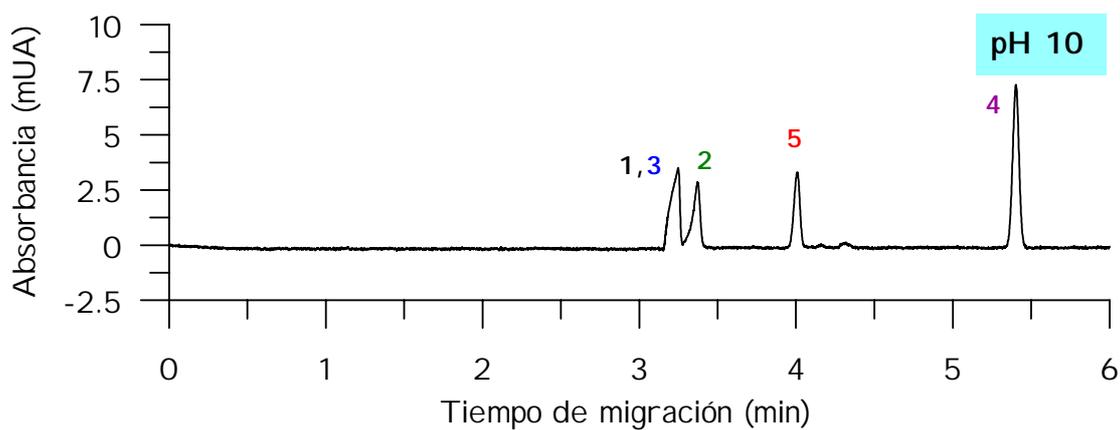


Figura 5.14. - Electroferograma obtenido con tampón borato 20 mM y pH 10

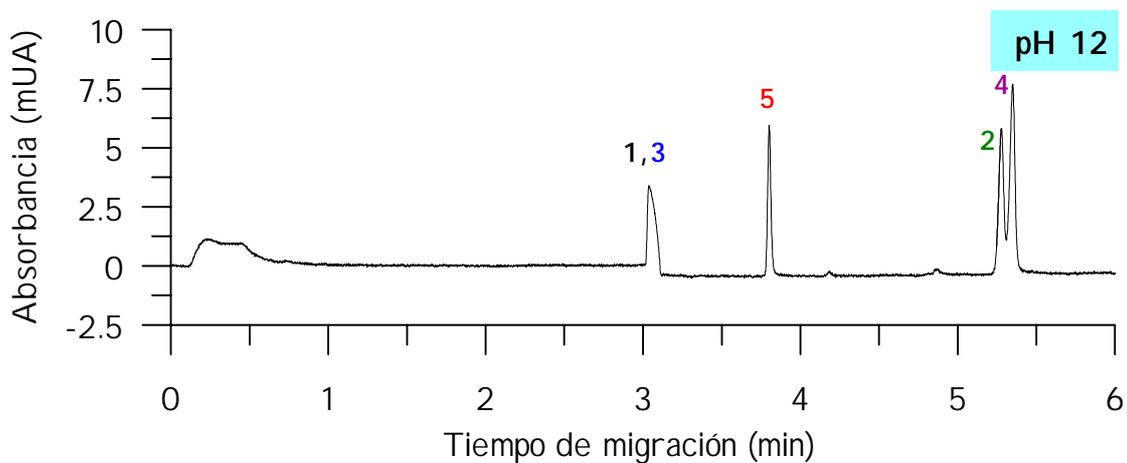


Figura 5.15. - Electroferograma obtenido con tampón fosfato 20 mM y pH 12

Atendiendo a los resultados obtenidos en los electroferogramas, podemos concluir, en cuanto a la ionización de los analitos que: piracinamida [3] se encuentra en estado neutro en el rango de pH entre 7 y 12, ya que en todos los casos eluye con el FEO. Isoniacida [2] está neutra entre pH 7 y 9.2, a partir de este pH se ioniza en un grado que parece ir aumentando hasta pH 12, concluyendo que entre pH 10 y 12 existe un pKa, como ya se estableció mediante espectrofotometría en el capítulo 3. Acetilisoniacida [4] se encuentra ionizada desde pH 7, aumentando la ionización hasta pH 10, por lo que podemos concluir que en ese intervalo de pH podría tener un pKa. Rifampicina [5] se encuentra ionizada en todo el rango de pH aumentando ligeramente la ionización al pasar de pH 8.5 a 9.2, siendo constante a partir de éste.

A la vista de los resultados, es difícil elegir un pH óptimo. Así, se seleccionó el rango de pH entre 8.5 y 10 para llevar a cabo el estudio de la influencia de surfactante ya que a estos valores de pH es donde mayor separación se produce entre los analitos, aunque a pH 12 también hay una buena separación, no se estudia este medio por ser demasiado básico y por consecuencia afectar al capilar de sílice.

### **Influencia de la concentración de surfactantes**

Como acabamos de comprobar, la variación del pH no es suficiente para la separación y resolución de los analitos en estudio, ya que en todos los casos piracinamida eluye con el FEO. Es por ello que se procedió a la adición de un surfactante al tampón de separación. Las micelas se forman cuando se añade el surfactante al tampón en una concentración superior a la **concentración crítica micelar** (CMC), y son determinantes para la separación, que dependerá del coeficiente de reparto del analito entre las micelas y la fase acuosa (22).

Los surfactantes elegidos para este estudio fueron SDS y el colato sódico, ambos son suficientemente solubles en tampón como para formar micelas y dan disoluciones homogéneas. Las disoluciones de SDS son transparentes al UV y de baja viscosidad, mientras que las de colato sódico presentan absorbancia en un rango de longitudes de onda comprendido entre 190-215 nm y viscosidad más elevada.

Se inició estudiando la influencia de la concentración de SDS en los tres medios de pH elegidos. La concentración de SDS se varió entre 20 y 110 mM (su CMC es de 8 mM a temperatura ambiente y su número de agregación es de 62), adicionándose sobre el electrolito del tampón correspondiente. En la **tabla 5.10** se resumen los resultados obtenidos detallando los tiempos de migración corregidos ( $t_m - t_{FEO}$ ). Los valores de resoluciones ( $R_s$ ) se dan en aquellos casos en que se han creído necesario. La resolución de cada pico se calcula respecto al pico anterior, en el caso de rifampicina la resolución se ha calculado respecto al pico del ácido ascórbico.

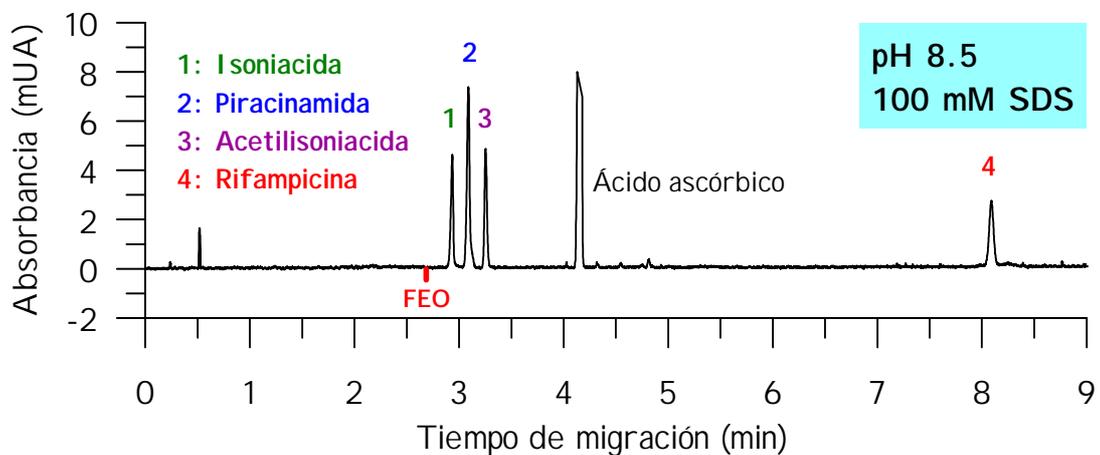
Tabla 5. 10. - Influencia de la concentración de SDS en diferentes medios de pH.

MEDIO TAMPÓN BORATO 20 Mm, pH 8.5								
[SDS]	60 mM, $t_{Feo} = 2.6$ min		80 mM $t_{Feo} = 2.75$ min		100 mM $t_{Feo} = 2.64$ min		110 mM $t_{Feo} = 2.64$ min	
	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$
ISO	0	---	0	---	0.25	---	0.35	---
PIR	0.10	1.4	0.15	1.5	0.45	2.7	0.45	3.3
AI SO*	0.30	3.9	0.45	3.5	0.55	2.9	0.55	0.9
RIF*	4.00	>10	4.75	>10	5.45	>10	5.65	>10
MEDIO TAMPÓN BORATO 20 Mm, pH 9.2								
[SDS]	60 mM $t_{Feo} = 3.2$ min		80 mM $t_{Feo} = 3.3$ min		100 mM $t_{Feo} = 3.5$ min			
	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$		
ISO	0	---	0.13	---	0.74	---		
PIR	0	---	0.24	1.5	0.99	3.4		
AI SO*	1.10	0.67	1.37	>10	2.65	>10		
RIF*	6.70	>10	8.90	>10	18.50	>10		
MEDIO TAMPÓN BORATO 20 mM, pH 10								
[SDS]	40 mM $t_{Feo} = 3.3$ min		60 mM $t_{Feo} = 3.5$		* El cálculo de la resolución de rifampicina se ha hecho respecto al pico del ácido ascórbico, en este estudio y en todos los sucesivos, aunque como podemos observar no son relevantes por ser valores >10 en todos los casos.			
	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$				
ISO	0.07	---	0.26	---				
PIR	0.13	0.82	0.37	1.5				
AI SO*	1.89	>10	2.45	>10				
RIF*	8.45	>10	15.17	>10				

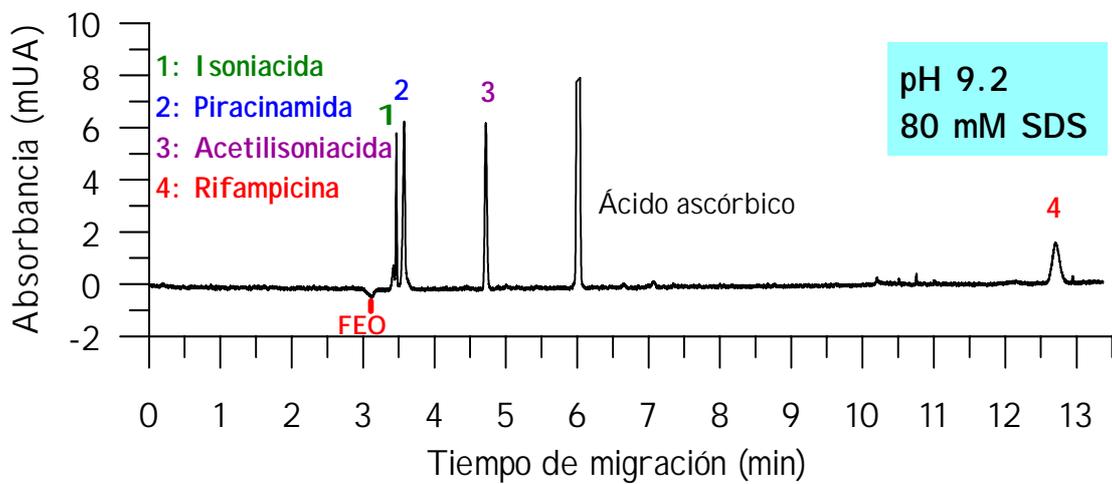
Los mejores resultados se obtuvieron para el medio tampón borato 20 mM , pH 8.5 y una concentración de SDS 100 mM, con estas condiciones se logró una buena resolución de todos los picos entre sí y con el FEO, a la vez que el último analito salía a un tiempo de migración de 8 minutos (**Figura 5.16**).

Con tampón borato 20 mM, pH 9.2 y concentración de SDS 80 mM, también se separan los picos de los analitos pero aumenta el tiempo de análisis hasta 12 min, no mejorando la resolución entre isoniacida y piracinamida (**Figura5.17**).

Por último, para el tampón borato 20 mM a pH 10, no se consigue la resolución de los picos de isoniacida y piracinamida en ninguna de las concentraciones de SDS estudiadas, además el tiempo de migración de rifampicina aumenta hasta 18 min con 60 mM de SDS.

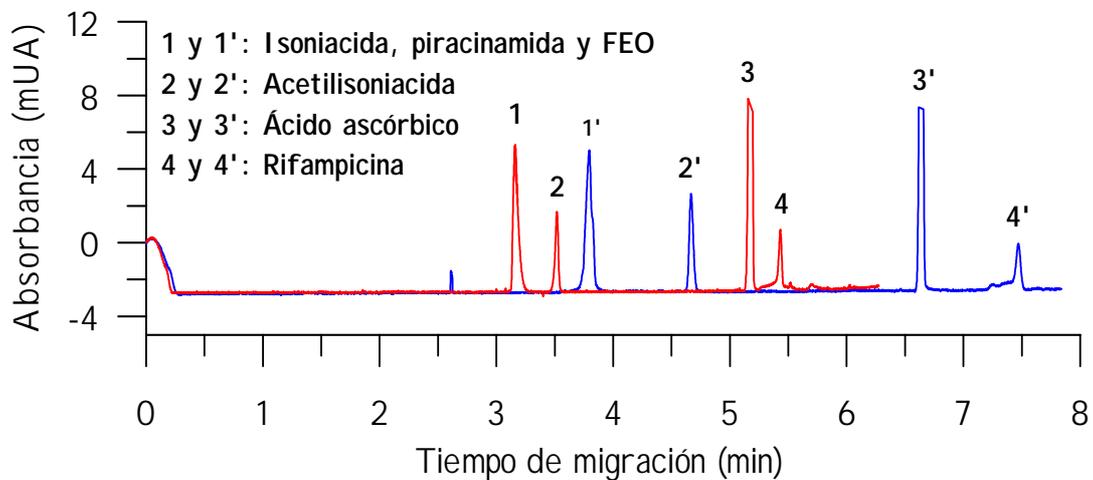


**Figura 5.16.** - Electroferograma obtenido con un electrolito compuesto por tampón borato 20 mM, pH 8.5 y 100 mM SDS



*Figura 5.17. - Electroferograma obtenido con un electrolito compuesto por tampón borato 20 mM, pH 9.2 y 80 mM SDS*

El otro surfactante estudiado fue el colato sódico. La influencia de la concentración de colato sólo fue estudiada en tampón borato 20 mM y pH 8.5 ya que en este medio se consiguieron resultados bastante buenos con la adición de SDS. La concentración de colato sódico se varió entre 60 y 100 mM, no obteniéndose la separación de los analitos en ningún caso, ya que isoniacida y piracinamida eluyeron junto al FEO en todas las concentraciones ensayadas. En la **figura 5.18** se muestran los electroferogramas correspondientes a 60 y 100 mM de colato sódico.



**Figura 5. 18.** - Electroferogramas obtenidos con un electrolito compuesto por tampón borato 20 mM, pH 9.2 y: 60 mM de colato(—), 100 mM de colato (—).

De los estudios anteriores se deduce que las mejores condiciones para la separación de los analitos, las proporciona un electrolito compuesto por tampón borato 20 mM, pH 8.5 y 100 mM SDS. No se estudió la mezcla de ambos surfactantes ya que, como se ha comprobado, el colato sódico no ofrece ninguna ventaja, además el SDS, por sí solo separa a todos los analitos obteniendo buenas resoluciones un tiempo de análisis de 8 minutos.

### Influencia de la concentración de tampón

La fuerza iónica del tampón afecta a la movilidad de los analitos y del FEO, por lo tanto es una herramienta importante para mejorar la eficiencia, resolución y selectividad de la separación. A temperatura constante, un aumento en la concentración del tampón, disminuye el tiempo del FEO, ya que se produce un fenómeno de compresión de la doble capa a nivel de la pared del capilar y una disminución del potencial zeta, con la consecuencia del aumento de los tiempos de

análisis (94). Si disminuye la concentración del tampón los tiempos de análisis se hacen más cortos, pero con el inconveniente de que los picos se pueden ensanchar y dejar de ser simétricos debido al fenómeno de electrodispersión (11).

El fin que se persigue a la hora de seleccionar una concentración de tampón, es la resolución, pero teniendo en cuenta el tiempo de análisis y la eficiencia de la separación. Considerando estas afirmaciones se realiza el estudio en un rango de concentraciones del tampón borato (pH 8.5 y 100 mM de SDS), comprendidas entre 10 y 40 mM, utilizando un potencial de +20 kV , temperatura de 25°C e inyección hidrodinámica 200 mbar s.

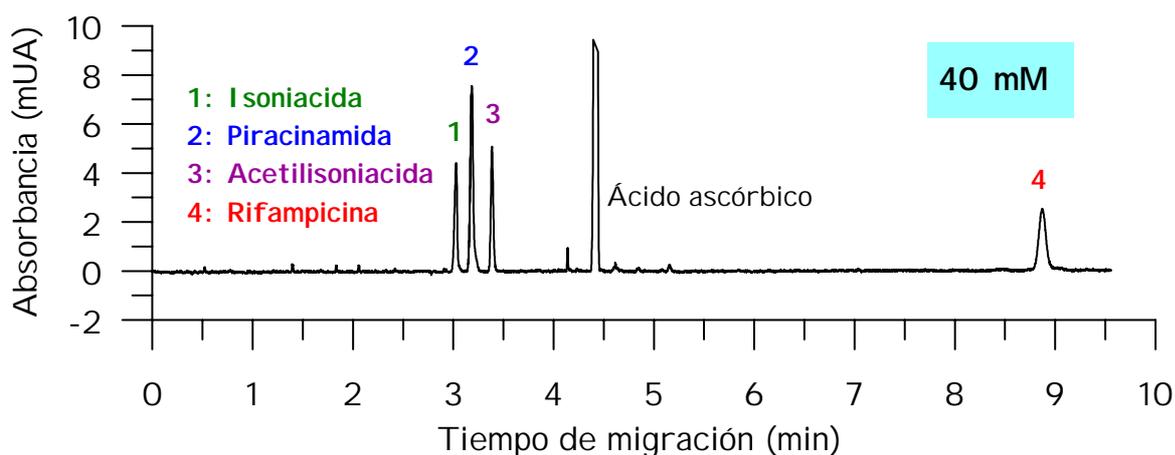
En la **tabla 5.11** se muestran los valores de los tiempos de migración corregidos y resolución de cada analito, para cada concentración de tampón, así como el valor de la intensidad de corriente obtenida en cada una de ellas.

*Tabla 5.11. - Influencia de la concentración de tampón*

Electrolito separación tampón borato pH 8.5 y 100 mM SDS								
[tampón]	10 mM ( $t_{\text{feo}}=2.7$ )		20 mM ( $t_{\text{feo}}=2.64$ )		30 mM ( $t_{\text{feo}}=2.7$ )		40 mM ( $t_{\text{feo}}=2.7$ )	
	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$
ISO	0.28	---	0.32	---	0.28	---	0.33	---
PIR	0.44	2.76	0.48	2.76	0.44	2.81	0.48	2.61
AISO	0.58	2.67	0.62	2.41	0.55	1.89	0.68	3.33
RIF	5.89	>10	5.63	>10	5.68	>10	6.17	>10
<b>I (µA)</b>	31.8		32.1		33.6		34.3	

Aunque a la vista de los resultados la concentración del tampón no afecta en gran medida ni a los tiempos de migración ni a los resoluciones, hemos seleccionado la concentración de tampón de 40 mM, ya que se consigue mejorar la resolución, sobre

todo entre piracinamida y acetilisoniacida. Aunque el tiempo de migración de rifampicina aumenta, sólo lo hace ligeramente respecto al menor tiempo de migración obtenido. La intensidad de corriente aumenta sólo ligeramente con la concentración de tampón. En la **figura 5.19** se muestra el electroferograma obtenido con la nueva concentración de tampón y en las condiciones seleccionadas.



*Figura 5.19. - Electroferograma obtenido con un electrolito compuesto por tampón borato 40 mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS.*

### Modificadores orgánicos

Con el objeto de mejorar las características de la separación se ha estudiado la adición de modificadores orgánicos sobre el electrolito de separación (tampón borato 40 mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS). La temperatura y el voltaje se mantuvieron constantes en +20 kV y 25°C, respectivamente y la inyección fue de 200 mbar s.

La adición de un disolvente orgánico sobre el tampón de separación altera su polaridad y viscosidad, y por lo tanto afecta a la movilidad del FEO y a la de los analitos. También mejoran la solubilización de las moléculas y reducen las

interacciones de éstas con la pared del capilar. La influencia sobre la separación depende del tipo de disolvente y de la cantidad que se añade (95). Los disolventes orgánicos probados fueron metanol y acetonitrilo, y se añadieron en porcentajes entre 5-15 %.

En la **tabla 5.12** se muestran los resultados obtenidos para cada disolvente. En ambos casos se observa que no mejora la separación entre los analitos, si bien a un porcentaje del 10 % tanto de metanol como de acetonitrilo, la resolución entre acetilisoniacida y piracinamida se ve incrementada, el tiempo de migración de rifampicina aumenta mucho, obteniéndose un pico muy ancho en ambos casos. En general los tiempos de análisis son más largos y las resoluciones no experimentan una mejora, por lo que continuamos el estudio sin estos modificadores orgánicos.

*Tabla 5.12. - Influencia de modificadores orgánicos*

MODIFICADORES ORGÁNICOS												
	METANOL						ACETONITRILO					
	5 %		10 %		15 %		5 %		10 %		15 %	
	$t_{Feo}=3.5$		$t_{Feo}=3.8$		$t_{Feo}=4.4$		$t_{Feo}=3.2$		$t_{Feo}=3.5$		$t_{Feo}=3.8$	
	$t'_m$	$R_s$										
ISO	0.2	---	0.3	---	0.4	---	0.2	---	0.3	---	0.3	---
PIR	0.4	3.5	0.5	2.7	0.6	2.6	0.4	2.8	0.4	2.1	0.4	1.3
AISO	0.6	1.9	0.9	5.7	0.8	3.3	0.6	2.8	0.8	5.9	1.5	>10
RIF	12.1	>10	16.6	>10	20.4	>10	10.9	>10	18.4	>10	---	
I ( $\mu A$ )	33.4		32.0		30.5		35.6		42.6		48.0	

## Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro cuyo control puede ser utilizado para la optimización de la separación, ya que afecta a la viscosidad, a la movilidad del FEO y por tanto al tiempo de análisis. Debemos tener en cuenta que trabajar con temperaturas superiores a 35 °C aumenta el calentamiento por efecto Joule, los gradientes de temperatura son más pronunciados y se produce ensanchamiento y pérdida de forma en los picos. Además, en nuestro caso que trabajamos con SDS, también influye sobre la selectividad que afecta al coeficiente de reparto de los solutos entre las micelas y la fase acuosa.

La influencia de la temperatura en la separación de los analitos, se llevó a cabo variándola entre 25 - 40 °C y manteniendo unas condiciones de operación de tampón borato 40 mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS; potencial de + 20 kV e inyección hidrodinámica de 200 mbar s.

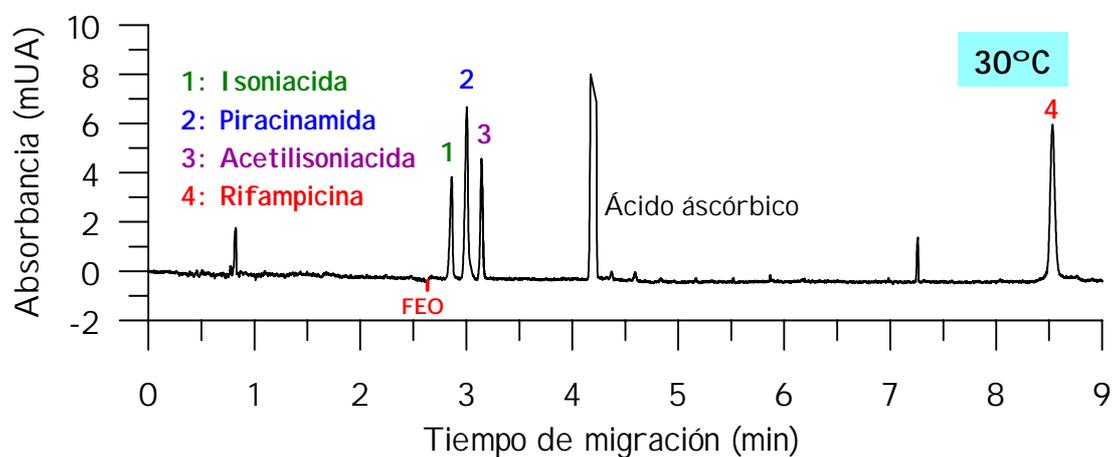
En la **tabla 5.13**, se muestran los tiempos de migración corregidos y resoluciones para cada analito en cada valor de temperatura ensayado, comprobando que se cumple que los tiempos de migración de los analitos van disminuyendo al aumentar la temperatura y que la intensidad de corriente aumenta con esta.

En cuanto a las resolución se observa una disminución progresiva, con el aumento de la temperatura, entre isoniacida y piracinamida que podría ser debido al aumento en el ancho de pico observado en piracinamida, mientras que la resolución entre piracinamida y acetilisoniacida sufre el efecto contrario, la resolución aumenta con la temperatura. Se observa que el  $t'_m$  de acetilisoniacida disminuye en menor magnitud que el  $t'_m$  de piracinamida, por lo que el aumento en el ancho de pico no resulta en pérdida de resolución entre ambos picos. Se seleccionó una temperatura de 30°C teniendo en cuenta la disminución en el tiempo de análisis, la mejora en la resolución y el valor de la intensidad de corriente. Además a partir de 35 °C

tendríamos problemas a causa del efecto Joule, cómo comentamos anteriormente. En la **figura 5.20** se representa el electroferograma obtenido con la temperatura seleccionada y las condiciones optimizadas hasta el momento.

*Tabla 5.13. - Influencia de la temperatura*

TEMPERATURA (°C)								
	25°C, $t_{FEO} = 2.8$		30°C, $t_{FEO} = 2.6$		35°C, $t_{FEO} = 2.4$		40°C, $t_{FEO} = 2.2$	
	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$	$t'_m$	$R_s$
ISO	0.35	---	0.26	---	0.28	---	0.26	---
PIR	0.52	2.8	0.40	2.4	0.36	1.9	0.36	1.7
AISO	0.65	2.3	0.55	2.6	0.52	2.9	0.54	3.6
RIF	8.91	>10	5.93	>10	5.45	>10	5.04	>10
<b>I (µA)</b>	33.5		36.4		39.5		43.8	



*Figura 5.20. - Electroferograma obtenido con un electrolito compuesto de tampón borato 40mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS; +20 kV y 30°C.*

## Influencia del potencial

Un aumento en el potencial de trabajo supone un aumento en la movilidad del FEO y una disminución de los tiempos de análisis. Normalmente suele trabajarse a potenciales elevados 20-30 kV. El inconveniente de trabajar a potenciales altos está en el calentamiento por efecto Joule y en el aumento de la intensidad de corriente. El máximo voltaje que puede aplicarse en una separación puede determinarse gráficamente, representando la intensidad de corriente generada, frente al voltaje aplicado (Ley de Ohm).

El potencial de trabajo se varió entre 5 - 30 kV, siendo las condiciones de operación utilizadas: tampón borato 40 mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS; temperatura 30°C y e inyección hidrodinámica de 200 mbar s.

En la **figura 5.21** se representa gráficamente la ley de Ohm, comprobando que se cumple hasta una diferencia de potencial de 20 kV, que se corresponde con una intensidad de corriente de 36.9  $\mu$ A. Por encima de este valor se producen desviaciones de la linealidad y aumento de la pendiente. En la **figura 5.22** comprobamos como el potencial afecta sobre todo a los tiempos de migración, estos disminuyen al aumentar el potencial aplicado.

El potencial seleccionado para continuar con los estudios de optimización fue de 20 kV ya que hasta este valor se cumple la ley de Ohm ( $I = \text{cte } xV$ ) y no tendríamos efectos de calentamiento por efecto Joule.

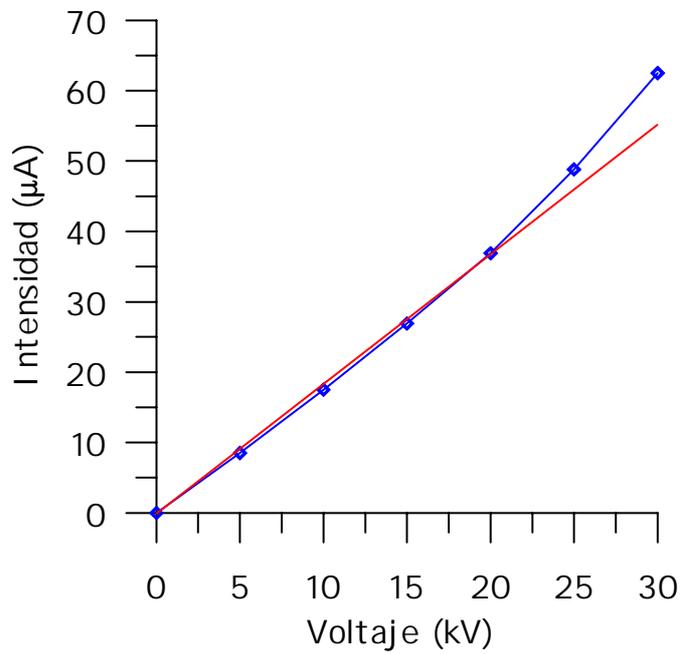


Figura 5.21. - Representación gráfica de la Ley de Ohm.

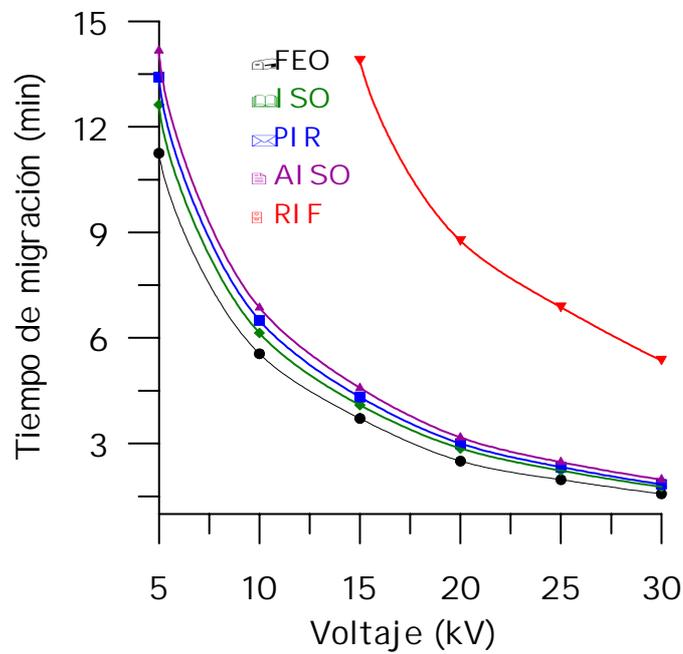
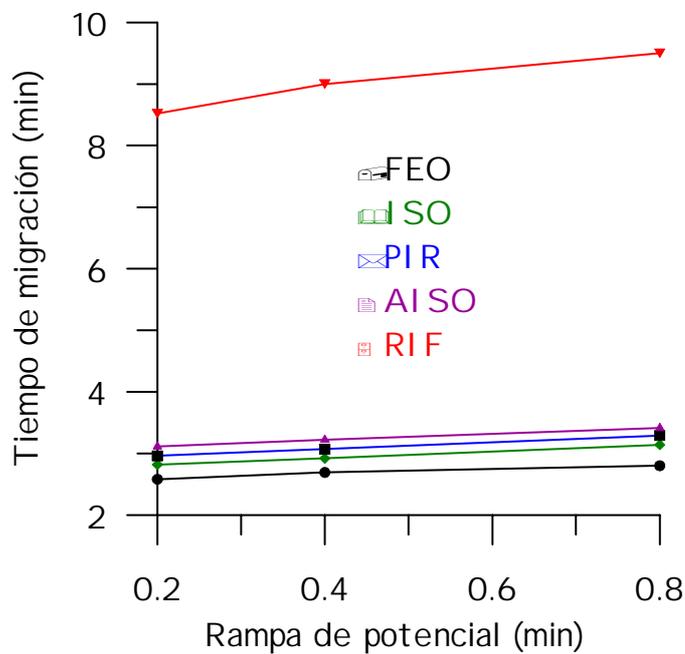


Figura 5.22. - Influencia del voltaje sobre los tiempos de migración.

Para evitar aplicar “de golpe”, entre los extremos del capilar, todo el voltaje de trabajo, se puede efectuar una rampa de voltaje desde 0 kV hasta el potencial de trabajo, por lo que se procedió a estudiar este parámetro variándolo entre 0.2 - 0.8 min. En la **figura 5.23** se representa como afecta el valor de la rampa de potencial a los tiempos de migración del FEO y analitos, comprobando que los mejores resultados se obtienen para una rampa de potencial de 0.2 minutos.



*Figura 5.23. - Influencia de las rampas de potencial sobre los tiempos de migración.*

## Influencia del tiempo de inyección

La inyección utilizada en todos los estudios llevados a cabo hasta ahora, ha sido la inyección hidrodinámica por presión, por lo que el tiempo que dure la inyección y la presión aplicada serán un parámetros importantes a optimizar, ya que determinará el volumen de disolución inyectada en el capilar y afectará a la sensibilidad de la técnica.

El tiempo de inyección de la muestra afecta principalmente al tamaño y forma de los picos. Para una presión determinada, al aumentar el tiempo de inyección aumenta el volumen de muestra inyectada y puede afectar a la dispersión en los picos, y por consecuencia disminuir la resolución, y por otra parte también obtendremos picos de áreas más grandes. Los tiempos de migración de los compuestos apenas se ven afectados, por lo que el aumento del volumen de muestra inyectado se traduce en áreas de pico más grandes. Para el estudio del tiempo de inyección se establece la correspondencia con las áreas de pico corregidas (APC).

Manteniéndola presión de inyección aplicada en un valor de 50 mbar, se estudia el tiempo de inyección en un rango de 4 - 8 segundos, teniendo como condiciones de operación: electrolito de tampón borato 40 mM, pH 8.5 y 100 mM de SDS; temperatura de 30°C; potencial aplicado + 20 kV (0.2 s rampa de potencial).

En las experiencias hemos observado que al aumentar el tiempo de inyección, y por tanto el volumen de muestra inyectada, se obtienen picos más anchos, afectando a la resolución de estos. **En la figura 5.24** se muestran las resoluciones entre piracinamida e isoniacida (—) y entre acetilisoniacida y piracinamida (—), comprobando que estas disminuyen al aumentar el tiempo de inyección.

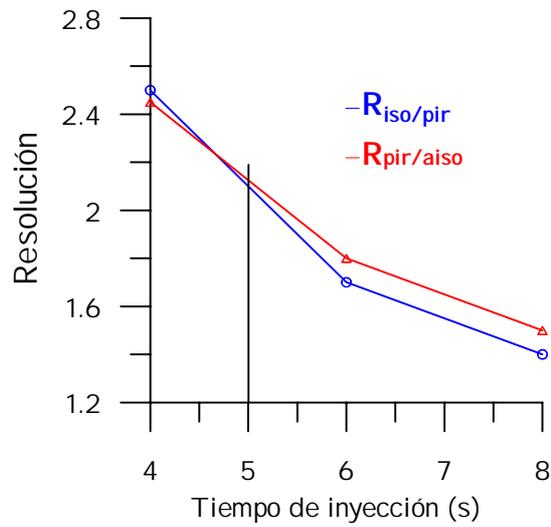


Figura 5.24. - Resoluciones obtenidas al variar el tiempo de inyección.

El tiempo de inyección elegido ha sido de 5 s y como podemos observar en la figura 5.25 con esto se aumenta un poco la sensibilidad, respecto al valor elegido inicialmente (4 s), sin que afecte a la resolución de los picos como podemos ver en la figura 5.24.

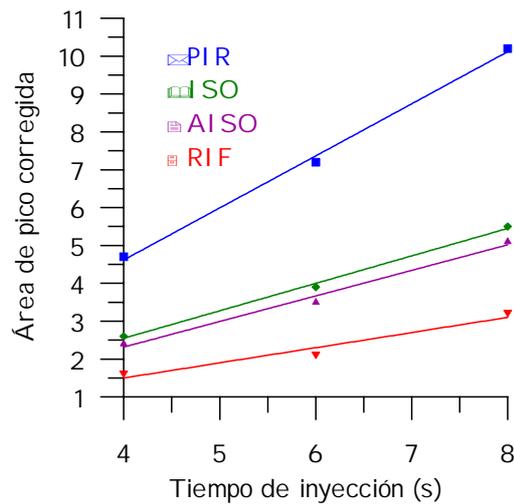


Figura 5.25. - Estudio de los tiempos de inyección en función de las APC

### Condiciones químicas e instrumentales finales

En la **tabla 5.14** se resumen las condiciones optimizadas en los estudios anteriores y que nos permiten establecer las condiciones óptimas para la calibración y posterior aplicación del método, a la determinación de estos principios activos en composiciones farmacéuticas y muestras de suero.

<i>Tabla 5.14. -CONDICIONES OPTIMIZADAS</i>	
LONGITUD DE ONDA DE DETECCIÓN	263 nm
ELECTROLITO	Tampón borato 40 mM, pH 8.5; 100mM de SDS
TEMPERATURA	30°C
VOLTAJE	+ 20 kV
RAMPA DE POTENCIAL	0.2 min
TIEMPO DE INYECCIÓN	5 s (250 mbar s)
<b>INTENSIDAD</b>	<b>37 <math>\mu</math>A</b>

En la **tabla 5.15** se muestran los valores de los tiempos de migración para el FEO y cada analito, así como la resolución y el área de pico corregida (APC) obtenidos bajo la aplicación del método electroforético optimizado, al aplicarlo a una disolución patrón de los 4 analitos en concentración de 25 ppm. Esta disolución se inyectó 9 veces en el sistema con objeto de obtener la desviación estándar ( $\sigma$ ), de los parámetros estudiados.

Tabla 5.15. - Tiempos de migración, resoluciones y áreas de pico corregidas

	Tiempo de migración $t_m (\pm \sigma), \text{min} (n = 9)$	Resolución $R_s (\pm \sigma), n = 9$	Área de pico corregida $\text{APC} (\pm \sigma), n = 9$
FEO	2.66 (0.02)	---	---
Isoniacida	2.88 (0.02)	---	3.23 (0.08)
Piracinamida	3.03 (0.02)	2.16 (0.06)	6.25 (0.08)
Acetilisoniacida	3.21 (0.03)	2.79 (0.07)	3.23 (0.05)
Rifampicina	9.37 (0.26)	46.81 (1.90)	2.14 (0.07)

La figura 5.26 muestra un electroferograma obtenido bajo las condiciones optimizadas y la intensidad proporcionada por el equipo.

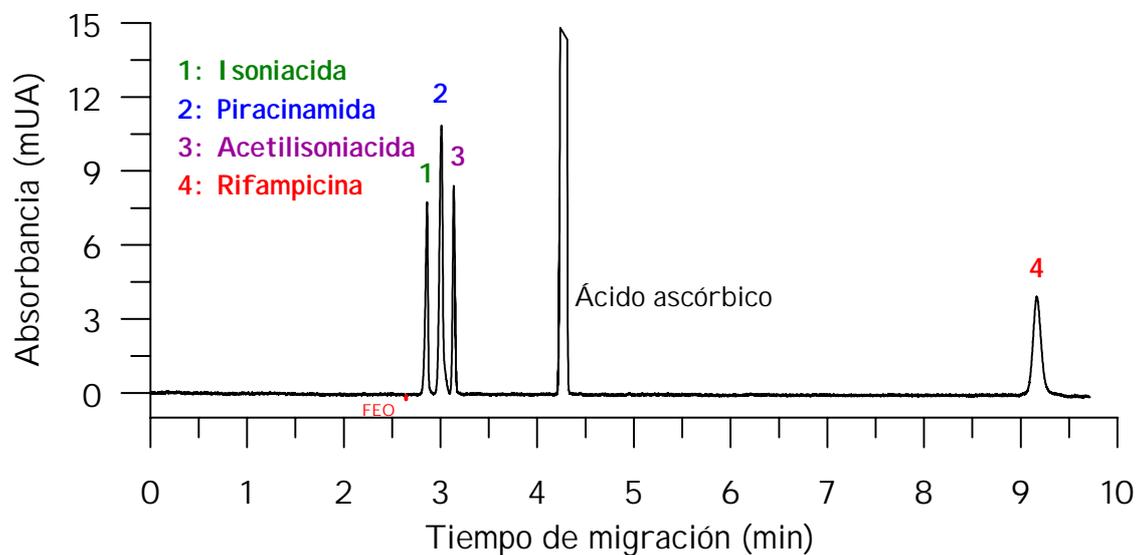


Figura 5.26. - Electroferograma obtenido bajo las condiciones optimizadas.

## RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

Una vez establecidas las variables experimentales e instrumentales óptimas para llevar a cabo la separación y determinación de los analitos en estudio en el sistema de electroforesis, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado, parámetros estadísticos y de fiabilidad para la determinación de cada analito. El parámetro elegido, para evaluar la señal de los analitos ha sido el área de pico corregida (APC), como en el caso del tiempo de inyección.

Las condiciones operatorias fueron las señaladas en la tabla 5.14 Las muestras patrón para la realización de las rectas de calibrado, contenían a los analitos en un rango de concentraciones comprendido entre 2 y 45 ppm, cada muestra se inyectó por triplicado en el sistema de electroforesis. En las **figuras 5.27-30** se muestran las rectas de calibrado de la influencia de la concentración sobre el APC.

Los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de las rectas se recogen en las **tablas 5.16-19**, además de los resultados de la calibración lineal univariante, también se muestran los valores de desviación estándar relativa obtenidos al realizar la repetitividad del método con una serie de 9 muestras iguales, con una concentración para cada analito de 25 ppm. Los límites de detección se han calculados por dos procedimientos, Clayton y Winedforner & Long; el límite de determinación se ha calculado de la forma expresada en otros capítulos.

ISONIACIDA

Figura 5.27. - Influencia de la concentración de isoniacida sobre el APC.

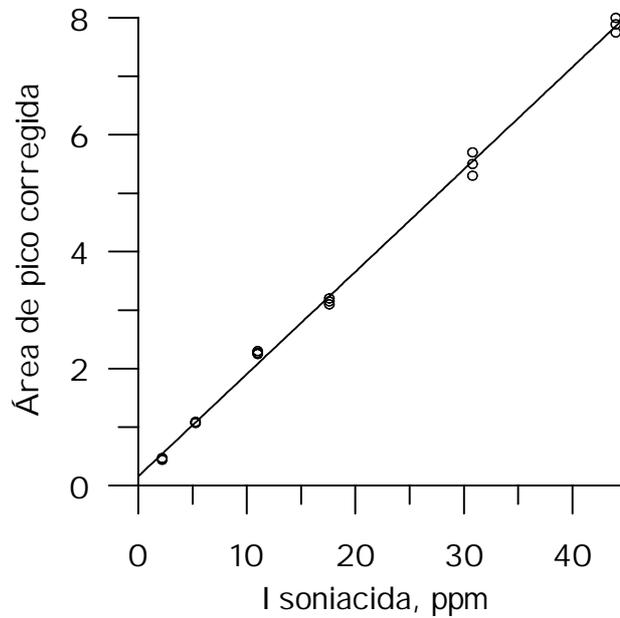


Tabla 5.16. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de isoniacida

Señal analítica	Área de pico corregida
Ecuación de la recta	$APC = 0.175 * [I SO] + 0.155$
$\sigma_{pendiente}$	0.002
$\sigma_{ordenada}$	0.005
$\sigma_{típica\ estimada}$	0.13
Coefficiente de correlación (R)	0.9988
DER (%)	2.39 ( 20 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.86
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	1.76
Límite de determinación, ppm	5.86

## PIRACINAMIDA

Figura 5.28. - Influencia de la concentración de piracinamida sobre el APC.

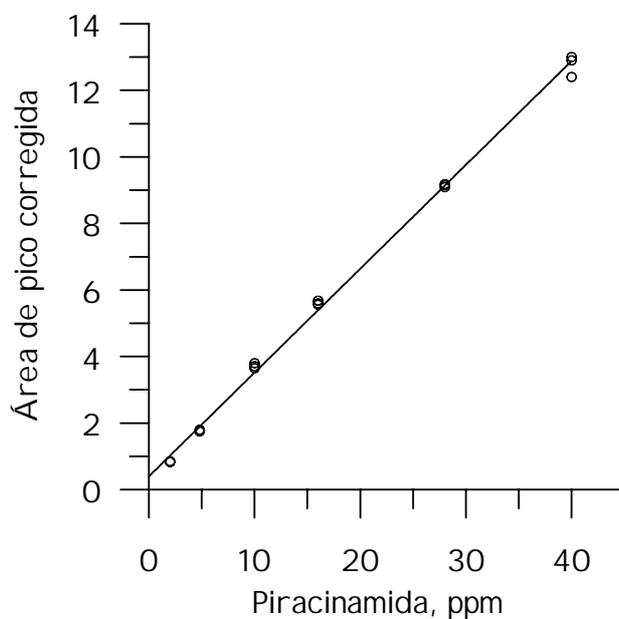


Tabla 5.17. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de piracinamida

Señal analítica	Área de pico corregida
Ecuación de la recta	$APC = 0.312 * [PIR] + 0.399$
$\sigma_{pendiente}$	0.003
$\sigma_{ordenada}$	0.078
$\sigma_{típica\ estimada}$	0.21
Coefficiente de correlación (R)	0.9989
DER (%)	1.39 ( 20 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.75
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	1.59
Límite de determinación, ppm	5.30

## ACETILISONIACIDA

Figura 5.29. - Influencia de la concentración de acetilisoniacida sobre el APC.

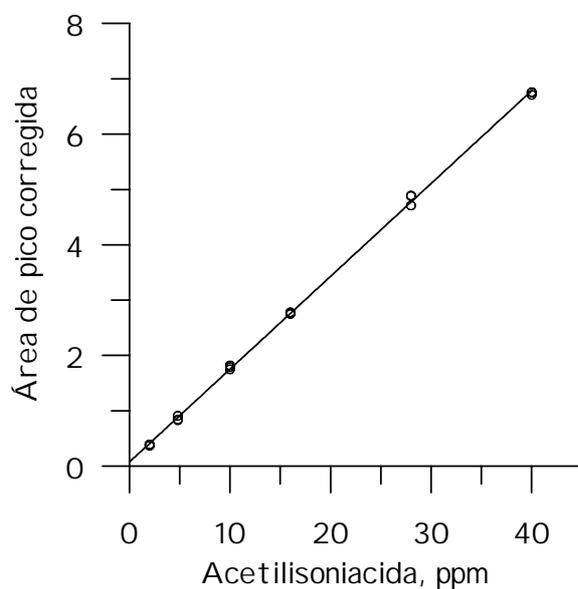


Tabla 5.18. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de acetilisoniacida

Señal analítica	Área de pico corregida
Ecuación de la recta	$APC = 0.167 * [AI SO] + 0.075$
$\sigma_{pendiente}$	0.001
$\sigma_{ordenada}$	0.021
$\sigma_{tipica\ estimada}$	0.056
Coefficiente de correlación (R)	0.9997
DER (%)	1.52 ( 20 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	0.38
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	0.79
Límite de determinación, ppm	2.63

RIFAMPICINA

Figura 5.30. - Influencia de la concentración de rifampicina sobre el APC.

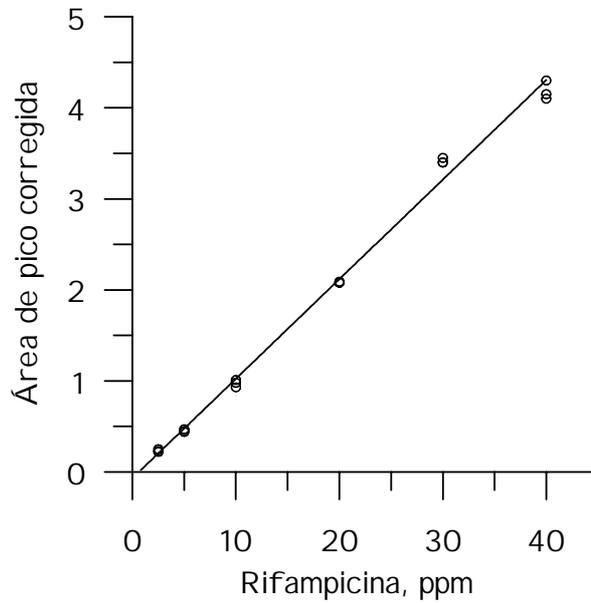


Tabla 5.19. - Resultados obtenidos en la calibración lineal univariante de rifampicina.

Señal analítica	Área de pico corregida
Ecuación de la recta	$APC = 0.109 * [RIF] - 0.068$
$\sigma_{pendiente}$	0.002
$\sigma_{ordenada}$	0.045
$\sigma_{típica\ estimada}$	0.11
Coefficiente de correlación (R)	0.9973
DER (%)	3.55 ( 20 ppm)
LD (Winefordner y Long), ppm	1.23
LD (Clayton) $\alpha = \beta = 0.05$ , ppm	2.41
Límite de determinación, ppm	8.03

Al cambiar el capilar por uno nuevo de las mismas características, los tiempos de migración de todos los analitos sufrieron un ligero descenso, más notable en el tiempo de migración de rifampicina, por lo que se establecieron nuevas rectas de calibrado, utilizando el área de pico corregida como señal analítica (**tabla 5.19**).

En la **tabla 5.20** se resumen los valores de tiempos de migración, resolución y APC para una disolución de 25 ppm de isoniacida, piracinamida, acetilisoniacida y rifampicina que se inyectó 9 veces en el sistema, se registraron los electroferogramas utilizando las condiciones optimizadas de la tabla 5.7.

Tabla 5.19. -RECTAS DE CALIBRADO	
ISONIACIDA	APC= 0.180*[I SO] ( $\pm 0.002$ ) - 0.006 ( $\pm 0.075$ ), R= 0.9978
PIRACINAMIDA	APC= 0.318*[PI R] ( $\pm 0.005$ ) + 0.328 ( $\pm 0.156$ ), R= 0.9997
ACETILISONIACIDA	APC= 0.167*[AI SO] ( $\pm 0.001$ ) + 0.028 ( $\pm 0.009$ ), R= 0.9998
RIFAMPICINA	APC= 0.103*[RI F] ( $\pm 0.002$ ) - 0.306 ( $\pm 0.073$ ), R= 0.9952

*Tabla 5.20. - Tiempos de migración, resoluciones y áreas de pico corregidas*

	Tiempo de migración $t_m$ ( $\pm \sigma$ ), min (n = 9)	Resolución $R_s$ ( $\pm \sigma$ ), n = 9	Área de pico corregida APC ( $\pm \sigma$ ), n = 9
FEO	2.54 (0.02)		
Isoniacida	2.71 (0.02)	---	3.32 (0.06)
Piracinamida	2.84 (0.02)	2.18 (0.06)	6.49 (0.02)
Acetilisoniacida	2.98 (0.03)	2.45 (0.03)	3.26 (0.02)
Rifampicina	7.19 (0.15)	44.51 (1.72)	2.09 (0.01)

Se ha comprobado que las pendientes de las rectas de calibrado anteriores, son comparables con las pendientes de las primeras rectas de calibrado realizadas. Asimismo, también son comparables la resolución y el área de pico corregida para cada analito, como se puede apreciar comparando los valores de la tabla 5.20 con los datos en la tabla 5.15.

Por último, comentar que en cuanto al acondicionamiento del capilar, no se han modificado las condiciones establecidas inicialmente (tabla 5.8), es decir antes de cada medida se hacía pasar, durante 5 minutos, disolución de electrolito de separación. Se han probado otros protocolos de acondicionamiento en los que se incluían NaOH 0.1 M, pero los mejores resultados en cuanto a repetitividad y reproducibilidad se obtuvieron con el acondicionamiento con electrolito de separación, solamente.

Teniendo en cuenta el tiempo de acondicionamiento del capilar (5 minutos) y el tiempo de análisis de los analitos (8 minutos), el tiempo transcurrido entre dos inyecciones es de 13 minutos.

También se comprobó que el número de inyecciones consecutivas, con las mismas disoluciones de electrolito de separación, sin cambios en cuanto a tiempo de migración y área de pico corregida de los diferentes analitos, oscilaban entre 6 y 8, a partir de las cuales se apreciaba una notable disminución en la altura y APC de los picos. Por lo tanto, sistemáticamente se cambiaron las disoluciones de electrolito de separación cada 6 inyecciones.

## APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE LOS ANALITOS EN FÁRMACOS Y MUESTRAS DE SUERO

### Determinación de isoniacida, piracinamida y rifampicina en fármacos

El método propuesto se aplicó a la determinación de los antibióticos en estudio (isoniacida, piracinamida y rifampicina) en compuestos farmacéuticos. Los fármacos analizados son los ya empleados para la determinación de los analitos anteriores, mediante otras técnicas (métodos cinéticos, calibración multivariante y HPLC).

Los compuestos farmacéuticos y su composición se detalla a continuación:

**RIFATER** (por gragea): 120 mg de rifampicina, 50 mg de isoniacida, 300 mg de piracinamida, 104.9mg de sacarosa y excipientes.

**RIFINAH** (por gragea): 300 mg de rifampicina, 150 mg de isoniacida, 181 mg de sacarosa y excipientes.

**RIFALDIN** ( por cápsula): 300 mg de rifampicina y excipientes.

**RIFALDIN SOLUCIÓN** (por 100 ml): 2g de rifampicina, 40 g de sacarosa, sulfitos y excipientes.

El procedimiento para llevar a cabo la determinación de los principios activos en los fármacos anteriores, se describe a continuación.

Una gragea o cápsula fue transferida a un matraz de 1000 ml y diluida con agua purificada, la disolución se introdujo en un baño de ultrasonido, para la correcta disolución de las sustancias presentes, durante 15 minutos. De esta disolución tomamos un volumen, de tal forma que la concentración del analito o analitos en la disolución diluida, se encuentre dentro de los límites de determinación calculados mediante la calibración univariante. Este procedimiento se realizó en tres cápsulas o grageas, y cada muestra fue inyectada 3 veces en el sistema electroforético, por lo que tendremos 9 medidas por cada fármaco analizado.

La disolución problema correspondiente al fármaco Rifaldin solución, fue preparada añadiendo 1 ml de la solución a un matraz de 1000 ml y diluido hasta la marca, al igual que con los otros fármacos, la disolución se introdujo en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, se realizaron tres muestras y cada una fue inyectada tres veces.

En todos los casos, también se inyectaron disoluciones patrones de los analitos correspondientes en concentraciones conocidas.

La señal analítica utilizada para la cuantificación de los analitos en los compuestos farmacéuticos, fue el área de pico corregida. La **tabla 5.20** muestra los resultados correspondientes a la composición encontrada de cada analito, así como las recuperaciones encontradas y la desviación estándar relativa para cada una de ellas.

Tabla 5.20. - Aplicación sobre formulaciones farmacéuticas

formulación comercial	Composición etiquetada	ÁREA DE PICO CORREGIDA	
		Composición encontrada	% Recuperación (%DER)
Rifater, mg	Rifampicina 120	Rifampicina 127.1	105.9 (6.1)
	Piracinamida	Piracinamida	97.6 (3.7)
	300	292.7	101.8 (1.5)
	I soniacida 50	I soniacida 50.9	
Rifinah, mg	Rifampicina 300	Rifampicina 321.0	107.0 (4.5)
	I soniacida 150	I soniacida 155.9	103.9 (3.7)
Rilfaldin, mg cápsulas	Rifampicina 300	Rifampicina 315.0	105.0 (5.5)
Rifaldin solución, g/100 ml	Rifampicina 2.0	Rifampicina 2.0	100.0 (2.5)

### Estudios sobre la pureza de pico

El estudio de los compuestos farmacéuticos se finalizó con la evaluación de la pureza de los picos electroforéticos de los analitos presentes en los fármacos. Para ello se procedió de manera similar al capítulo anterior es decir, se registraron tres espectros, uno en la parte ascendente del pico (espectro 1), otro en el máximo (espectro 2) y otro en la parte descendente (espectro 3). La normalización y superposición de los tres espectros nos permite la comparación, donde debe darse una coincidencia espectral en todo el rango de longitudes de onda, para que se pueda decir que el pico es puro.

En las figuras 5.31 -41 se muestran los electroferogramas correspondientes a los cuatro fármacos estudiados, así como los espectros correspondientes a los estudios de pureza de pico.

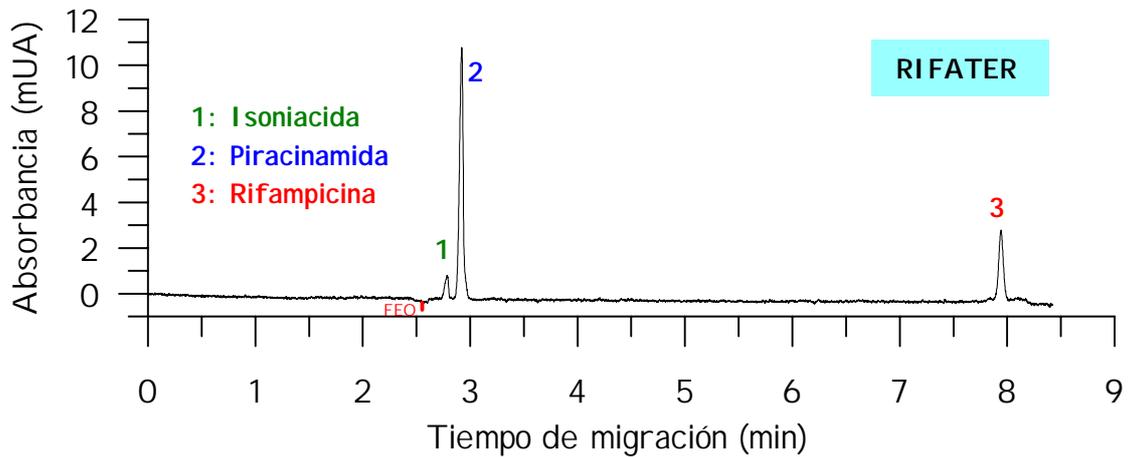


Figura 5.31. - Electroferograma obtenido por la aplicación del método optimizado a Rifater

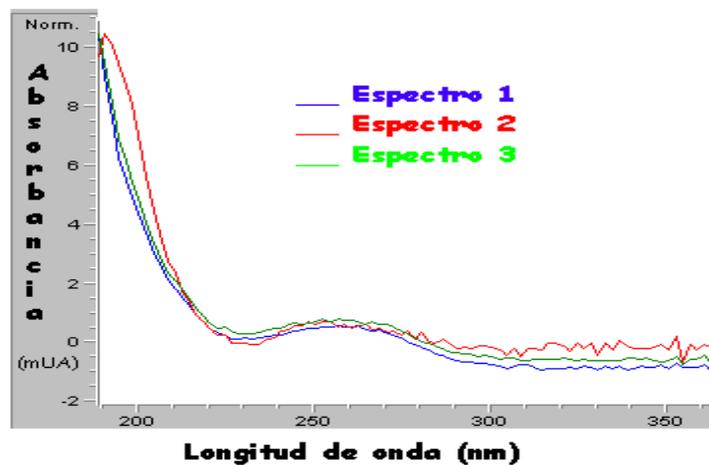


Figura 5.32. - Pureza de pico correspondiente a isoniacida en rifater

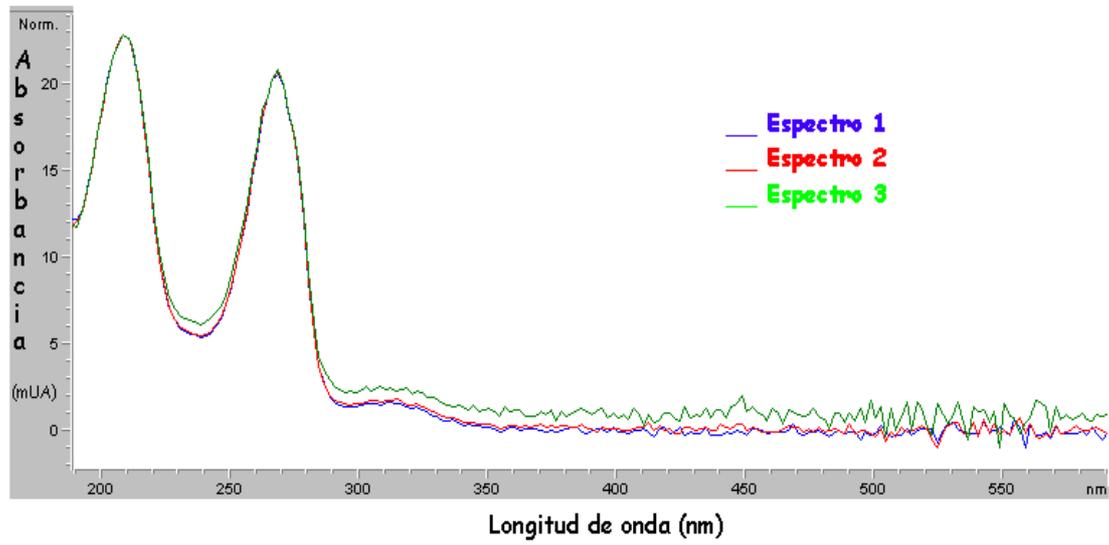


Figura 5.33. - Pureza de pico correspondiente a piracinamida en rifater

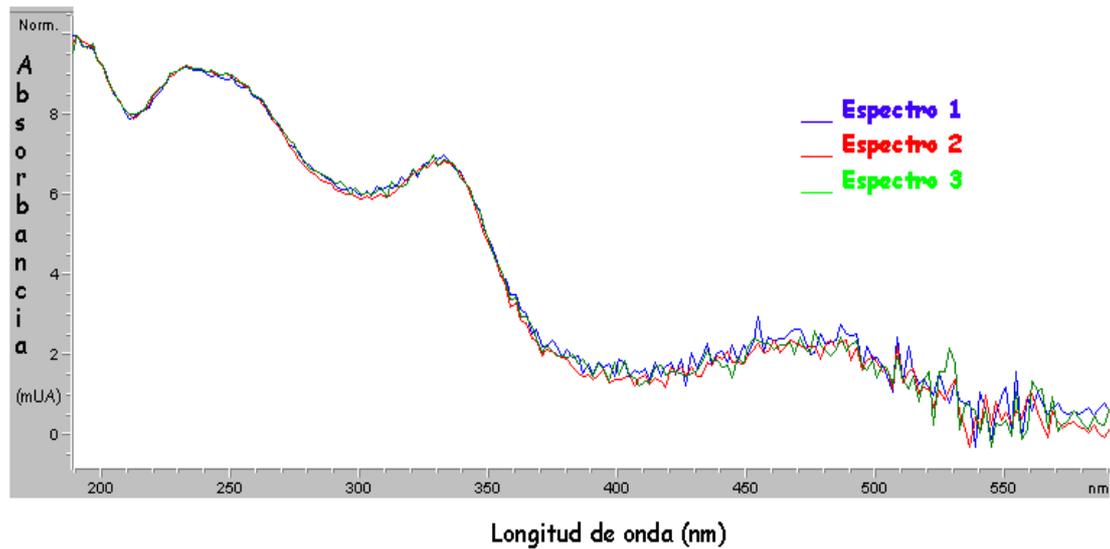


Figura 5.34. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rifater

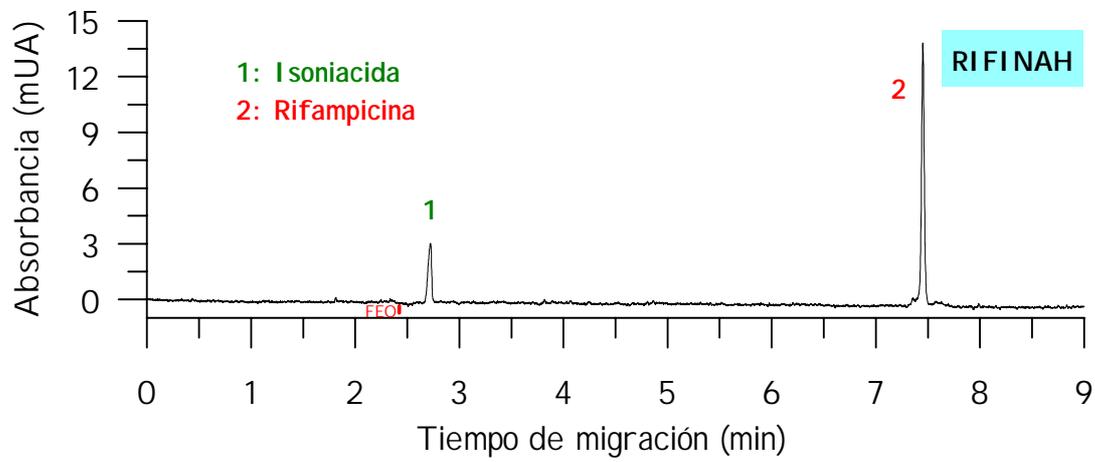


Figura 5.35. - Electroferograma obtenido por la aplicación del método optimizado a Rifinah

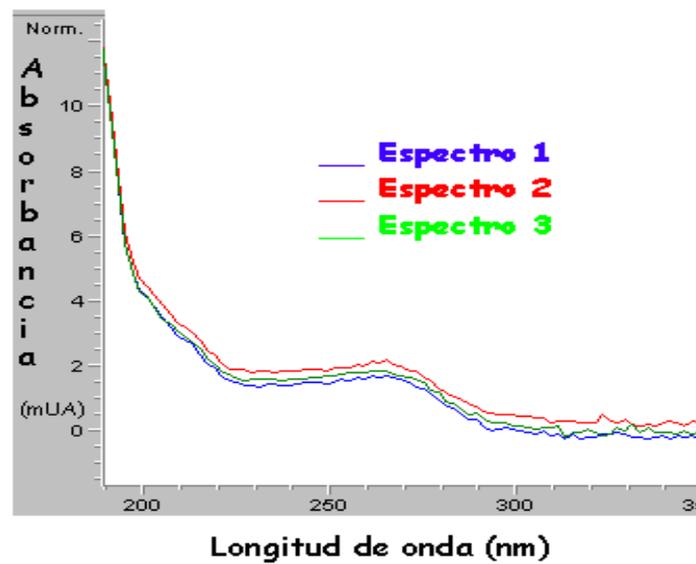


Figura 5.36. - Pureza de pico correspondiente a isoniacida en Rifinah.

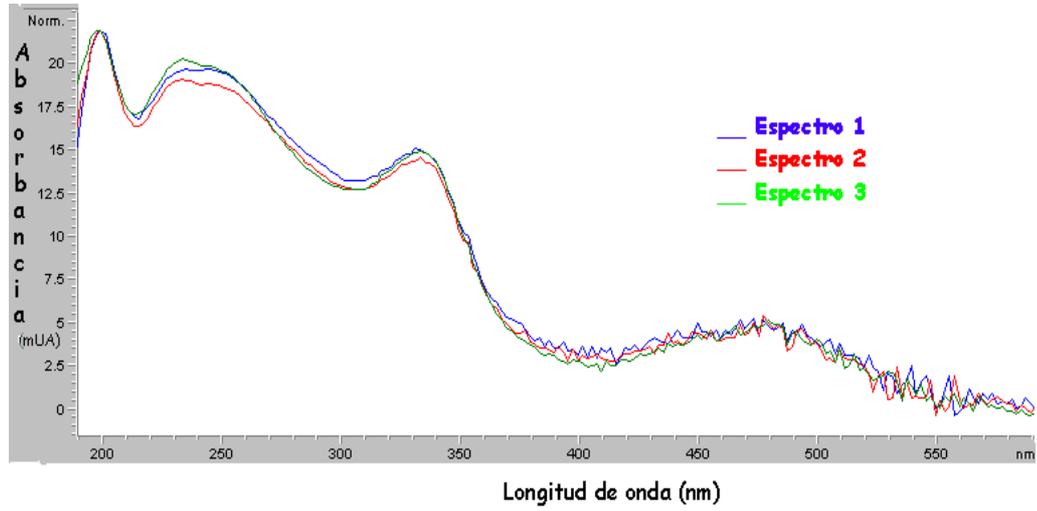


Figura 5.37. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rifinah.

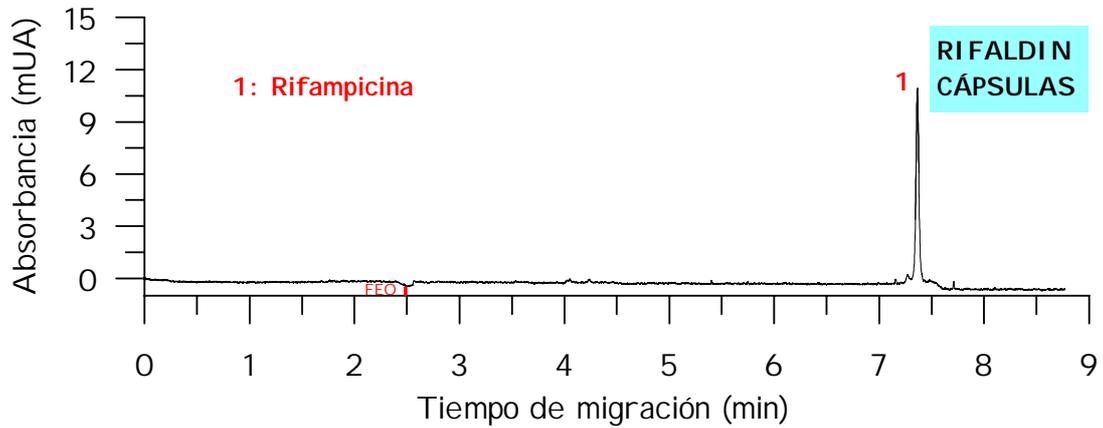


Figura 5.38. - Electroferograma obtenido por la aplicación del método optimizado a Rifaldín cápsulas.

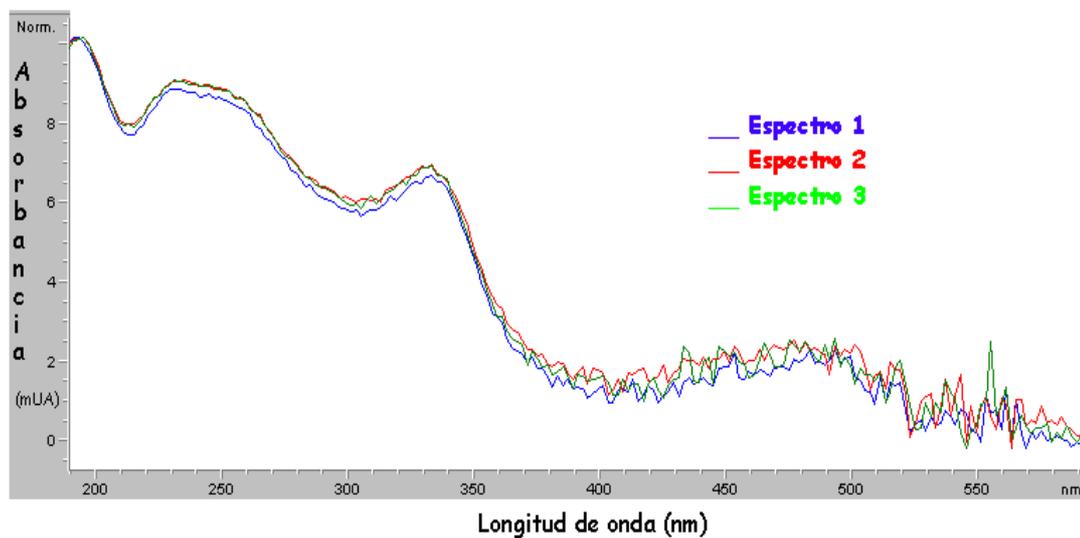


Figura 5.39. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rifaldín cápsulas.

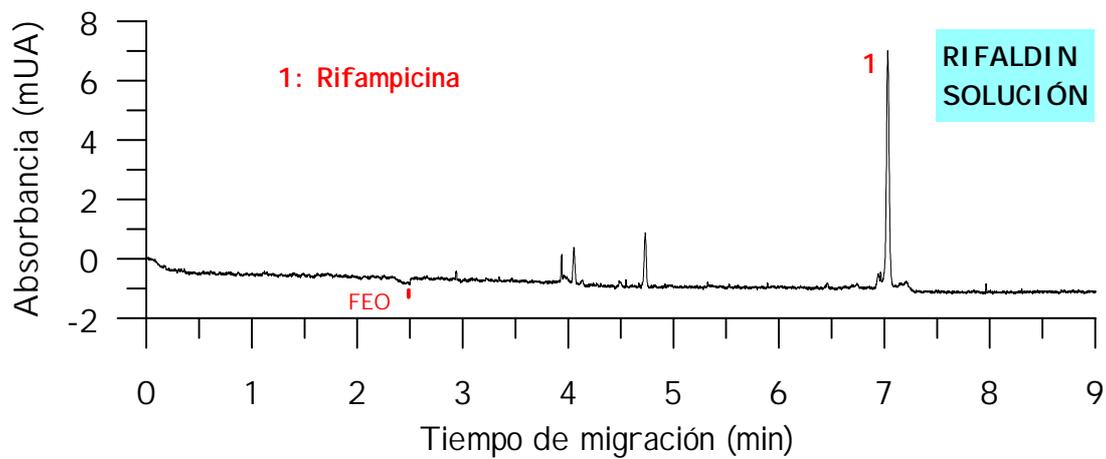


Figura 5.40. - Electroferograma obtenido por la aplicación de las condiciones optimizadas a Rifaldín solución

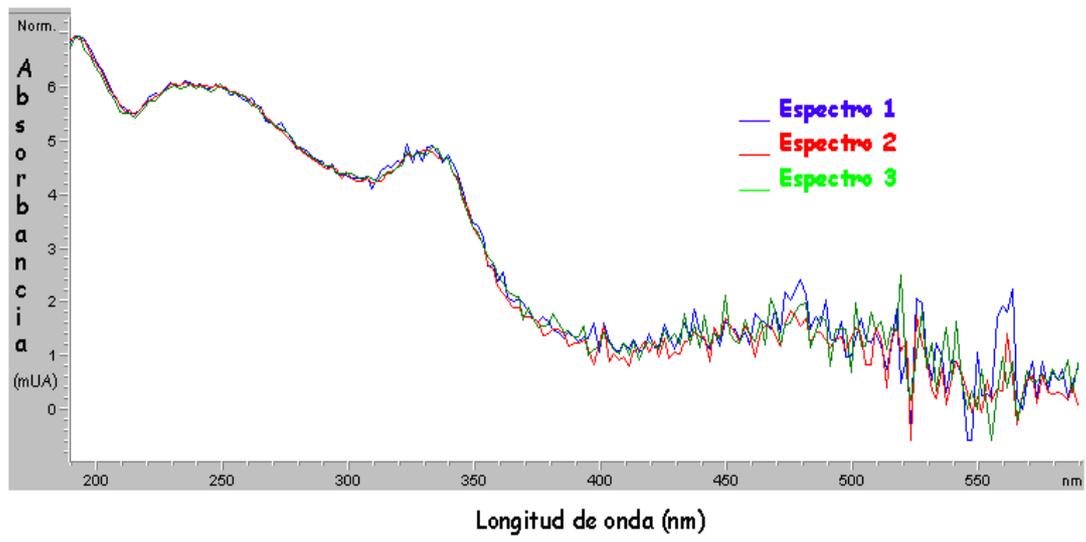


Figura 5.41. - Pureza de pico correspondiente a rifampicina en Rifaldín solución

## COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS CALCULADOS PARA LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN CADA FÁRMACO MEDIANTE HPLC Y MEKC

Los dos últimos métodos analíticos puestos a punto en esta Memoria se fundamentan en dos técnicas instrumentales separativas, HPLC y MEKC. Por este motivo, hemos encontrado interesante la comparación de los resultados obtenidos, por ambos métodos, en la determinación de los antituberculosos estudiados en las diferentes formulaciones farmacéuticas analizadas.

Con objeto de saber si los valores medios obtenidos, por la aplicación de ambos métodos, son comparables se procedió a realizar el estudio estadístico en cada uno de los fármacos estudiados.

El estudio estadístico realizado ya se ha llevado a cabo en el capítulo 2 (página 88), en el cual se explicó detalladamente, por lo que aquí daremos las pautas generales obviando las ecuaciones utilizadas.

1) Aplicación del test de Fisher para la comparación de las varianzas de dos conjuntos:  $F_{\text{calculado}} = \sigma_a^2 / \sigma_b^2$ , se calcula  $F_{\text{tabulado}}$  para  $n_a - 1$  y  $n_b - 1$  grados de libertad y un intervalo de confianza.

2) Si  $F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$ ; los métodos tienen precisión semejante y se comparan los valores medios utilizando el Test-T, que tiene en cuenta una varianza conjunta para el cálculo de la t de Student, cumpliéndose que:

Si  $t_{\text{tabulada}} > t_{\text{calculada}}$ ; valores medios estadísticamente comparables para el intervalo de probabilidad elegido y  $n_a+n_b-2$  grados de libertad.

Si  $t_{\text{tabulada}} < t_{\text{calculada}}$ ; valores medios no son estadísticamente comparables para el intervalo de probabilidad elegido y  $n_a+n_b-2$  grados de libertad.

3) Si  $F_{\text{tabulado}} < F_{\text{calculado}}$ ; los métodos no tienen precisión semejante por lo que para comparar los valores medios hay que aplicar el criterio de Cochran para determinar la t de Student. Siguiendo el razonamiento anterior para decidir si dos valores medios son comparables o no.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas (**tablas 5.21-24**) con objeto de organizar la información, cada tabla corresponde a una composición farmacéutica en la cual se señalan los principios activos que contiene, la composición calculada mediante HPLC y MEKC así como los valores de  $\sigma_{n-1}$  (n= 9). En todos los casos el valor de  $F_{\text{tabulada}}$  fue,  $F_{8/8} = 4.43$ , para un intervalo de confianza,  $P = 0.05$  y el intervalo de probabilidad elegido para la obtención de  $t_{\text{tabulada}}$  fue del 95%.

*Tabla 5.21. - Rifaldin solución.*

<i>Composición etiquetada: rifampicina 2000 mg/100 ml</i>		
	HPLC	MEKC
	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$
Rifampicina	2100 $\pm$ 30	2000 $\pm$ 50
$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (2.77) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (0.12) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>		

Tabla 5.22. - Rifaldin, cápsulas.

<i>Composición etiquetada: rifampicina 300 mg/cápsula</i>		
	HPLC	MEKC
	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$
Rifampicina	321.0 $\pm$ 5.1	315.0 $\pm$ 5.5
$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (1.16) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (0.45) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>		

Tabla 5.23. - Rifinah, grageas

<i>Composición etiquetada (mg/gragea): Rifampicina 300 mg; isoniacida 150 mg</i>		
	HPLC	MEKC
	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$	Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$
Rifampicina	304.2 $\pm$ 5.2	321.0 $\pm$ 4.5
Isoniacida	147.9 $\pm$ 3.1	155.9 $\pm$ 3.7
Rifampicina	$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (1.33) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (1.51) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>	
Isoniacida	$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (1.42) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (1.46) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>	

Tabla 5.24. - Rifater, grageas.

<i>Composición etiquetada (mg/gragea): Rifampicina 120 mg; piracinamida 300 mg; isoniacida 50 mg.</i>		
	HPLC Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$	MEKC Composición encontrada $\pm$ $\sigma_{n-1}$
Rifampicina	126.1 $\pm$ 2.5	127.1 $\pm$ 6.1
Piracinamida	300.7 $\pm$ 1.8	292.7 $\pm$ 3.7
Isoniacida	47.6 $\pm$ 2.7	50.9 $\pm$ 1.5
Rifampicina	$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (5.95) \Rightarrow$ Diferencia estadística en la precisión ( aplicamos criterio de Cochran) $t_{\text{tabulado}} (2.16) > t_{\text{calculado}} (0.45) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>	
Piracinamida	$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (4.22) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (2.01) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>	
Isoniacida	$F_{\text{tabulada}} (4.43) > F_{\text{calculada}} (3.24) \Rightarrow$ Precisión semejante $t_{\text{tabulado}} (2.12) > t_{\text{calculado}} (1.47) \Rightarrow$ <b>Valores medios comparables</b>	

A la vista de los resultados podemos concluir que todos los valores medios obtenidos para cada uno de los principios activos en las distintas formulaciones farmacéuticas analizadas son comparables.

En cuanto a la precisión de los métodos, sólo en un caso (determinación de rifampicina en rifater), la precisión de ambos métodos no es estadísticamente comparable, siendo más preciso el método cromatográfico (HPLC).

## Determinación de isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida en suero sanguíneo

Aunque la sangre aparece como un líquido rojo y homogéneo, se compone en realidad de una parte líquida, llamada plasma y de otra corpuscular compuesta por elementos celulares de la sangre ( glóbulos rojos, los cuales dan el color a la sangre, glóbulos blancos y plaquetas). Estas dos partes se pueden separar fácilmente centrifugando con anticoagulantes (citrato, oxalato, etc.).

El plasma es un líquido amarillento que está compuesto principalmente por agua (90-92 %) y proteínas (7-8 %); otros componentes minoritarios son: sales minerales, glúcidos, lípidos y otras sustancias orgánicas e inorgánicas. El plasma contiene varias clases de proteínas, cada una con sus funciones y propiedades específicas: el fibrinógeno es una de las proteínas destinadas al proceso de coagulación; la albúmina y las globulinas regulan el contenido de agua dentro de la célula y en los líquidos intercelulares. La presencia de dichas proteínas hace que la sangre sea unas seis veces más viscosa que el agua. Las proteínas del plasma y la hemoglobina de los glóbulos rojos son importantes amortiguadores ácido-básicos que mantienen el pH de la sangre y de las células corporales dentro de una pequeña variación, alrededor de 7.4.

La importancia de las proteínas plasmáticas está en que la mayor parte de las moléculas llevadas de un lugar a otro del cuerpo circulan sobre una proteína. Entre estas moléculas quedan incluidos los fármacos. En la sangre los fármacos pueden encontrarse libres, fijados a eritrocitos o unidos a proteínas plasmáticas. La fracción unida a las proteínas plasmáticas es inactiva. Para que un fármaco se combine reversiblemente a las proteínas plasmáticas se requiere que la estructura terciaria de ésta esté intacta.

El plasma extraído sin la adición de anticoagulantes, coagula al cabo de poco tiempo formando un retículo macromolecular de fibrina. El suero se obtiene al separar este retículo de fibrina. Por lo tanto el suero es un líquido transparente, amarillento y ligeramente viscoso que se separa de la sangre coagulada, por lo tanto el suero posee la misma composición del plasma exceptuando el fibrinógeno ( que precipita con las células sanguíneas) (97, 98).

#### Determinación de los analitos en diferentes sueros

Por último, mediante la aplicación del método operatorio optimizado, se aborda la determinación de tres de los analitos en estudio: isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida en un fluido biológico, el suero sanguíneo.

Los estudios se han llevado a cabo en tres sueros pertenecientes a distintas personas. Los sueros se inyectaron en el sistema de electroforesis sin ningún tipo de tratamiento previo, solamente se filtraron para evitar la obturación del capilar.

En las **figuras 5.42-44**, están representados los electroferogramas obtenidos por la aplicación del método anteriormente optimizado. Como podemos observar, los tres presentan los mismos picos comunes y también a la vista de las figuras podemos concluir que rifampicina no puede determinarse utilizando este método, debido al pico tan ancho que presentan los sueros en la zona donde sale el pico correspondiente a rifampicina ( $t_m=7\text{min}$ )

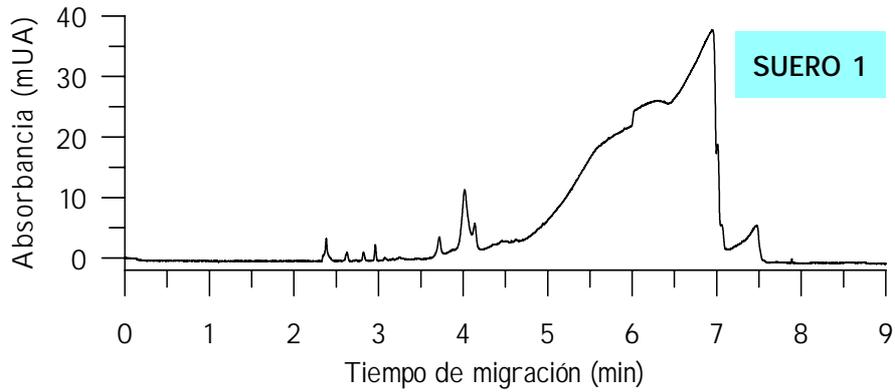


Figura 5.42. - Electroferograma obtenido aplicando el método propuesto al suero1.

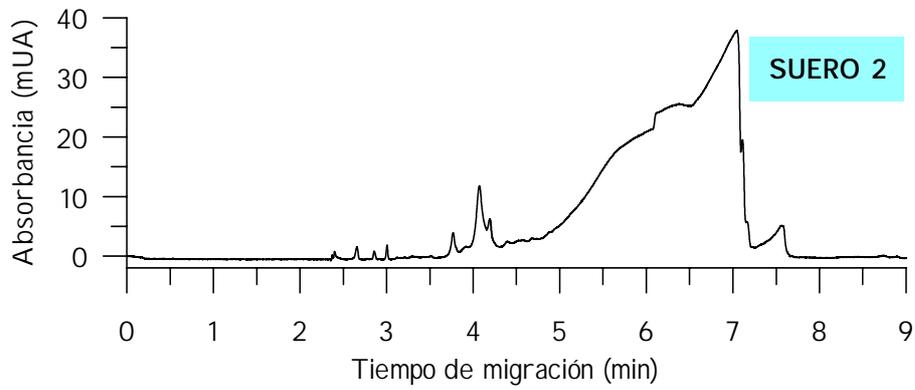


Figura 5.43. - Electroferograma obtenido aplicando el método propuesto al suero2.

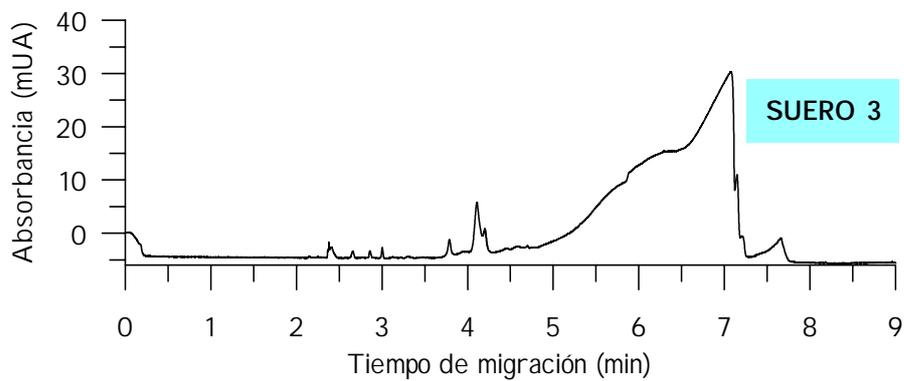
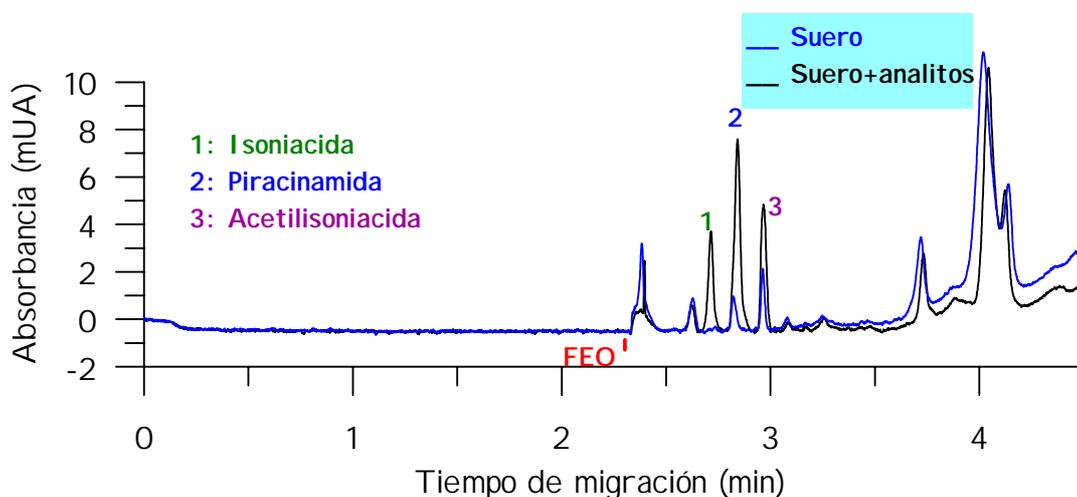


Figura 5.44. - Electroferograma obtenido aplicando el método propuesto al suero3.

En la **figura 5.45** se comparan los electroferogramas de una muestra de suero con otra contaminada con los analitos (16 ppm de cada uno). En la comparación se observa que el pico de isoniacida no tienen interferencia con ninguno de los pequeños picos del suero que salen en la misma zona, no así piracinamida y sobre todo acetilisoniacida, cuyos picos engloban a picos del suero. A pesar de ello se contaminaron los tres sueros con los analitos, en tres niveles de concentración y se calcularon las recuperaciones, comparando las rectas de calibrado obtenidas en cada suero, con otras rectas de calibrado de patrones preparadas en medio acuoso.

El objetivo es ver si las interferencias se mantienen constantes y como afectan en la determinación de los analitos cuando se utiliza como señal analítica, área de pico corregida o altura de pico.



**Figura 5.45.** - Electroferogramas de una muestra de suero (—) y una muestra de suero 2 contaminado con 16 ppm de cada analito (—).

Las muestras se prepararon a partir de 4.5 ml de suero, el cual se contaminaba por adición de 0.5 ml de una disolución patrón acuosa, que contenía isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida en diferentes concentraciones, por lo tanto el suero era diluido sólo un 10%.

En cada suero se realizaron tres adiciones, correspondientes a las concentraciones de analitos de 16 ppm, 20 ppm y 24 ppm. Por otro lado, la recta de calibrado patrón se preparó mediante diferentes diluciones de la disolución patrón que contenía a los tres analitos, obteniéndose así, disoluciones de estos en un intervalo entre 4 -30 ppm. Cada nivel de concentración, tanto de los sueros como de la disolución patrón acuosa, fue inyectado por triplicado.

En todos los casos se calcularon las rectas de calibrado, utilizando como señal analítica el área de pico corregida y la altura de pico.

En las **tablas 5.25-27** se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para las señales analíticas del área de pico corregida y la altura de pico, pertenecientes a la recta de calibrado patrón y a las rectas de calibrado en cada suero. También se muestran las desviaciones estándar de la pendiente y ordenada en el origen y el coeficiente de regresión.

Tabla 5.25. - Rectas de calibrado patrón y de los 3 sueros para isoniacida.

ISONIACIDA		
Recta de calibrado	Área de pico corregida	Altura de pico
Patrón	Y= 0.179*[I SO](±0.002)+0.016(±0.058) R=0.9984	Y=0.231*[I SO](±0.006)-0.222(±0.103) R=0.9959
Suero 1	Y= 0.156*[I SO](±0.004)+0.338(±0.080) R=0.9949	Y= 0.229*[I SO](±0.010)+0.600 (±0.211) R=0.9920
Suero 2	Y= 0.163*[I SO](±0.004)+0.119(±0.073) R=0.9969	Y= 0.229*[I SO](±0.008)+0.428±0.169) R=0.9951
Suero 3	Y= 0.146*[I SO](±0.007)+0.352(±0.152) R=0.9912	Y= 0.211*[I SO](±0.008)+0.445(±0.167) R=0.9953

Tabla 5.26. - Rectas de calibrado patrón y de los 3 sueros para piracinamida.

PIRACINAMIDA		
Recta de calibrado	Área de pico corregida	Altura de pico
Patrón	Y= 0.326*[PI R](±0.006)+0.051(±0.138) R=0.9973	Y=0.405*[PI R](±0.007)-0.205(±0.158) R=0.9977
Suero 1	Y= 0.271*[PI R](±0.012)+1.705(±0.248) R=0.9929	Y= 0.421*[PI R](±0.021)+1.383(±0.438) R=0.9901
Suero 2	Y= 0.287*[PI R](±0.020) +1.280(±0.412) R=0.9839	Y= 0.437*[PI R](±0.019)+1.117(±0.402) R=0.9929
Suero 3	Y= 0.341*[PI R](±0.020)+0.345(±0.411) R=0.9830	Y= 0.496*[PI R](±0.023)-0.105(±0.058) R=0.9902

Tabla 5.27. - Rectas de calibrado patrón y de los 3 sueros para acetilisoniacida.

ACETILISONIACIDA		
Recta de calibrado	Área de pico corregida	Altura de pico
<b>Patrón</b>	$Y=0.159*[AI\ SO](\pm 0.002)+0.046(\pm 0.048)$ R=0.9986	$Y=0.296*[AI\ SO](\pm 0.004)+0.079(\pm 0.101)$ R=0.9983
<b>Suero 1</b>	$Y=0.117*[AI\ SO](\pm 0.007)+1.530(\pm 0.158)$ R=0.9845	$Y=0.233*[AI\ SO](\pm 0.013)+1.555(\pm 0.268)$ R=0.9885
<b>Suero 2</b>	$Y=0.135*[AI\ SO](\pm 0.009)+1.115(\pm 0.187)$ R=0.9849	$Y=0.283*[AI\ SO](\pm 0.021)+0.611(\pm 0.434)$ R=0.9805
<b>Suero 3</b>	$Y=0.157*[AI\ SO](\pm 0.009)+0.522(\pm 0.173)$ R=0.9901	$Y=0.296*[AI\ SO](\pm 0.019)+0.172(\pm 0.400)$ R=0.9834

Los diferentes valores de ordenadas, muy distintos en cada muestra de suero analizada, son debidos a que son sueros de distintas personas por lo que, para poder hacer una validación, habría que hacer un número muy elevado de muestras.

A simple vista, se observa que las pendientes de las rectas obtenidas en los sueros y en disolución acuosa tienen valores similares. Se aplicó el test de Fisher para la varianza, según el cual el valor de F de las pendientes debe ser menor que el valor de F tabulado para un intervalo de confianza,  $P = 0.05$ , con 16 y 7 grados de libertad respectivamente. Con este test comprobamos si existen diferencias significativas entre las varianzas.

Para comprobar, si existe o no diferencias significativas entre las pendientes de las rectas aplicamos:

-  Test-T, si no hay diferencia significativa entre las varianzas.
-  Aproximación de Cochran, si existe diferencia entre las varianzas.

En ambos casos el valor de  $t$  tabulado debe ser mayor que el de  $t$  calculado para que se cumpla que no existe diferencias significativas entre las pendientes, para un nivel de significación de 0.05.

En las **tablas 5.28-30**, se muestran los resultados obtenidos al realizar el estudio de comparación de las pendientes.

**Tabla 5.28.** - Comparación rectas de calibrado patrón y adición patrón de *isoniacida*

ISONIACIDA	
Área de pico corregida	Altura de pico
(Patrón)	(Patrón)
$Y = 0.179 \cdot [I\ SO] (\pm 0.002) + 0.016 (\pm 0.058)$	$Y = 0.231 \cdot [I\ SO] (\pm 0.006) - 0.222 (\pm 0.103)$
(Suero)	(Suero)
$Y = 0.163 \cdot [I\ SO] (\pm 0.004) + 0.119 (\pm 0.073)$	$Y = 0.229 \cdot [I\ SO] (\pm 0.008) + 0.428 (\pm 0.169)$
<b>Test-F:</b>	<b>Test-F:</b>
$F_{16,7} = 4.57; F_{calculado} = 2.40$	$F_{16,7} = 4.57; F_{calculado} = 5.86$
$F_{tabulado} > F_{calculado}$	$F_{tabulado} < F_{calculado}$
<b>Test-T:</b>	<b>Aproximación de Cochran:</b>
$t_{calculada} = 2.26, t_{tabulado} = 2.33$	$t_{calculada} = 0.203, t_{tabulado} = 2.29$
$t_{tabulado} > t_{calculado}$	$t_{tabulado} > t_{calculado}$

*Tabla 5.29. - Comparación rectas de calibrado patrón y adición patrón de isoniacida*

PIRACINAMIDA	
Área de pico corregida	Altura de pico
(Patrón)	(Patrón)
$Y = 0.325 \cdot [\text{PIR}] (\pm 0.005) + 0.051 (\pm 0.138)$	$Y = 0.405 \cdot [\text{PIR}] (\pm 0.006) - 0.205 (\pm 0.158)$
(Suero)	(Suero)
$Y = 0.287 \cdot [\text{PIR}] (\pm 0.020) + 1.280 (\pm 0.411)$	$Y = 0.437 \cdot [\text{PIR}] (\pm 0.019) + 1.117 (\pm 0.402)$
<b>Test-F:</b>	<b>Test-F:</b>
$F_{16,7} = 4.57; F_{\text{calculado}} = 2.41$	$F_{16,7} = 4.57; F_{\text{calculado}} = 3.33$
$F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$
<b>Test-T:</b>	<b>Test-T:</b>
$t_{\text{calculada}} = 2.21, t_{\text{tabulado}} = 2.29$	$t_{\text{calculada}} = 1.00, t_{\text{tabulado}} = 2.29$
$t_{\text{tabulado}} > t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{tabulado}} > t_{\text{calculado}}$

*Tabla 5.30. - Comparación rectas de calibrado patrón y adición patrón de isoniacida*

ACETILISONIACIDA	
Área de pico corregida	Altura de pico
(Patrón)	(Patrón)
$Y = 0.159 \cdot [\text{AI SO}] (\pm 0.002) + 0.046$ ( $\pm 0.048$ )	$Y = 0.296 \cdot [\text{AI SO}] (\pm 0.004) + 0.079$ ( $\pm 0.100$ )
(Suero)	(Suero)
$Y = 0.135 \cdot [\text{AI SO}] (\pm 0.009) + 1.115 (\pm 0.187)$	$Y = 0.283 \cdot [\text{AI SO}] (\pm 0.021) + 0.611$ ( $\pm 0.434$ )
<b>Test-F:</b>	<b>Test-F:</b>
$F_{16,7} = 4.57; F_{\text{calculado}} = 1.44$	$F_{16,7} = 4.57; F_{\text{calculado}} = 1.14$
$F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$
<b>Test-T:</b>	<b>Test-T:</b>
$t_{\text{calculada}} = 2.27, t_{\text{tabulado}} = 2.29$	$t_{\text{calculada}} = 0.576, t_{\text{tabulado}} = 2.29$
$t_{\text{tabulado}} < t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{tabulado}} > t_{\text{calculado}}$

A la vista de los resultados, en el caso de isoniacida, la aplicación del test nos dice que no existe diferencias significativas en los valores de las pendientes de ambas rectas de calibrado, es decir, son rectas paralelas. Por otro lado, se observa diferencias en el valor de la ordenada en el origen, poniendo de manifiesto la existencia de alguna sustancia interferente, presente en la misma cantidad siempre, con el mismo tiempo de migración de la isoniacida. Esta pequeña interferencia afecta cuando se utiliza como señal analítica la altura de pico, como lo pone de manifiesto las recuperaciones obtenidas, en la **figura 5.42**. En cambio, no parece afectar cuando la señal analítica es el área de pico corregida.

En cuanto a piracinamida, otro tanto puede decirse con respecto a las pendientes de las rectas de calibrado. En cambio la magnitud de la interferencia es algo mayor, como lo pone de manifiesto las recuperaciones obtenidas (**figura 5.43**), que siempre resultan mayores del 100 %. Esta influencia es mayor en el caso de utilizar como señal analítica el área de pico.

En lo que respecta a la acetilisoniacida, cuando la señal analítica utilizada es altura de pico, las rectas resultan con pendientes comparables estadísticamente. Asimismo, como en los casos anteriores, el valor de la ordenada en el origen revela una interferencia positiva pero que apenas tiene influencia en el valor de las recuperaciones obtenidas (**figura 5.44**). No se puede decir lo mismo cuando se utiliza el área de pico corregida como señal analítica.

En todos los casos, en los valores de recuperación se obtuvieron desviaciones estándar relativas por debajo del 5 %.

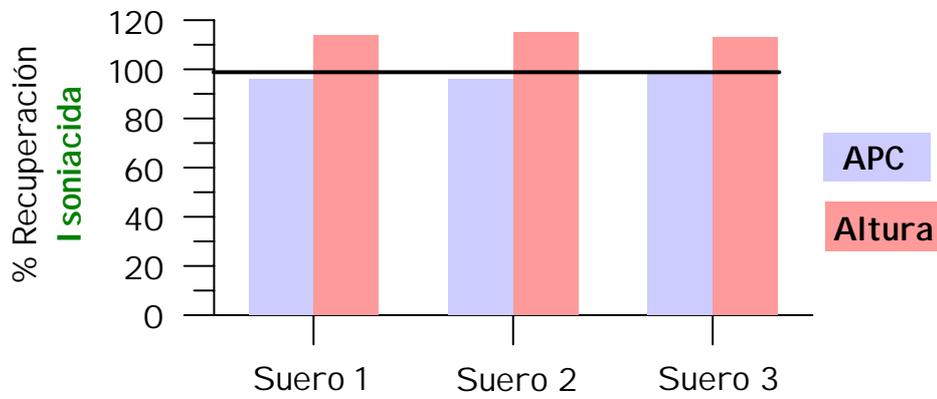


Figura 5.42- Recuperaciones de isoniacida en los diferentes sueros.

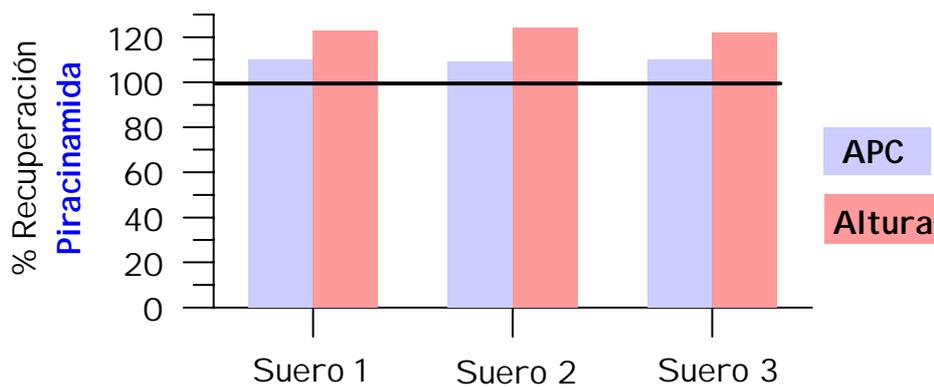


Figura 5.43- Recuperaciones de piracinamida en los diferentes sueros.

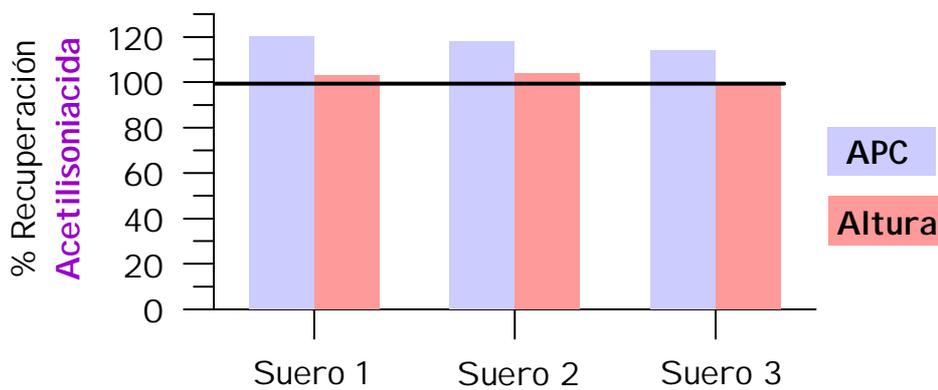


Figura 5.44- Recuperaciones de acetilisoniacida en los diferentes sueros.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- F. Kohlrausch; *Ann. Phys. Chem.*, (62), 209, (1897).
- 2.- A. Tiselius; *Trans. Faraday Soc.*, (33), 524, (1937).
- 3.- S. Hjertén; *Chromatogr. Rev.*, (9), 122, (1967).
- 4.- F.M. Everaerts, J.L. Beckers y Th. P.E.M. Verheggen (eds), *Isotachopheresis, Theory, Instrumentation and Applications*. J. Chromatogr. Library, Elsevier, Amsterdam, Oxford, Nueva York (1976).
- 5.- F.E.P. Mikkers, F.M. Evaraerts y Th.P.E.M. Verheggen; *J. Chromatogr.*, (169), 11, (1979).
- 6.- J. Jorgenson y K. Luckas; *Anal. Chem.*, (53), 1298, (1981).
- 7.- S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikama, A. Tsuchiya y T. Ando; *Anal. Chem.*, (56), 111, (1984).
- 8.- S. Terabe, K. Otsuka y T. Ando; *Anal. Chem.*, (57), 834, (1985).
- 9.- K. Otsuka, S. Terabe y T. Ando; *J. Chromatogr.*, (63) 1820, (1986).
- 10.- R. Khun, S. Hoffstetter Khun; *Capillary Electrophoresis. Principles and Practice*. Springer Laboratory.
- 11.- D.R. Baker; *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., (1995).
- 12.- D.N. Heiger; *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard Company, Alemania, (1992).
- 13.- T. Tsuda, K. Nomura y G. Nakagawa; *J. Chromatogr.*, (248), 241, (1982).
- 14.- D.J. Sanger; *Behavioural Pharmacology*, (6), 116, (1995).
- 15.- X.Z. Wu, A. Hosaka y T. Hobo; *Anal. Chem.*, (70), 2081, (1998).
- 16.- R. Chien y D.S. Burgi; *Journal of Chromatography*, (559), 141, (1991).
- 17.- R.L. Chien y D. S. Burgi; *Anal. Chem.*, (64), 489A (1992).
- 18.- J. Palmer, N.J. Munro y J.P. Landers; *Anal. Chem.*, (71), 1679, (1999).
- 19.- T. Wang, J.H. Aiken, C. W. Huie y R.A. Hartwick; *Anal. Chem.*, (63), 1372, (1991).

- 20.- T. Tsuda, J.V. Sweedler y R.N. Zare; *Anal. Chem.*, (62) 2149, (1990).
- 21.- H. Shintani, J. Polonsky; *Handbook of Capillary Electrophoresis applications*, Blackie academic&professional, (1997).
- 22.- B.B. VanOrman, G.G. Liversidge, G.L. McIntire, T.M. Olefirowick y A.G. Ewing; *J. Microcol. Sep.*, (2), 176, (1990).
- 23.- H.J. Issaq, I.Z. Atamna, G.M. Muschik y G.M. Janini; *Chromatographia*, (32), 155, (1991).
- 24.- L.J. Cline Love, J. G. Habarta y J.G. Dorsey; *Anal. Chem.*, (56), 1132, (1984).
- 25.- E. Pramauro y E. Pelizzetti; *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol: XXXI, *Surfactants in Analytical Chemistry*, Nueva York, (1982).
- 26.- W.L. Hinze, H.N. Singh, Y. Bara y N.G. Harvey; *Trends in Anal. Chem.*, (3), 193, (1984).
- 27.- A.T. Balchunas y M.J. Sepaniak; *Anal. Chem.*, (60), 617, (1988).
- 28.- V. Schuring y M. Jung; *Recent Advances in Chiral Separations*, D. Stevenson, I.D. Wilson, eds. Plenum, Nueva York, (1990).
- 29.- D.R. Taylor y K. Maher; *J. Chrom. Sci.*, (30), 67, (1992).
- 30.- W.G. Kuhr y C.A. Monning; *Anal. Chem.*, (64), 389R, (1992).
- 31.- A. Guttman, A. Paulus, A.S. Cohen y B.L. Karger; *J. Chromatogr.*, (448), 41, (1988).
- 32.- I. Cruzado y G. Vigh; *J. Chromatogr.*, (608), 421, (1992).
- 33.- P. Gozel, E. Gassman, H. Michelsen y R.N. Zare; *Anal. Chem.*, (59), 44, (1987).
- 34.- K.D. Altria, *Chromatographia*, (35), 177, (1993).
- 35.- B. Widmon, P. Jackson, W. Jones y P. Alden; *J. Chromatogr.*, (546), 459, (1991).
- 36.- B. Kenney; *J. Chromatogr.*, (546), 423, (1991).
- 37.- M. Ackermans, J. Beckers, F. Everaerts, H. Hoogland y H. Tomassen; *J. Chromatogr.*, (596), 101, (1992).
- 38.- E. Jellun, A. Thorsrud y E. Time; *J. Chromatogr.*, (559), 445, (1992).
- 39.- J.J. Berzas, C. Guiberteau y A.M. Contento; *Anal. Chim. Acta*, (378), 63, (1999).
- 40.- J.J. Berzas, A.M. Contento y G. Castañeda; *Analyst*, (124), 61, (1999).

- 41.- W. Thormann, P. Meier, C. Maecolli y F. Binden; *J. Chromatogr.*, (545), 449, (1991).
- 42.- P. Pietta, P. Mauri, A. Rava y G. Sabbatini; *J. Chromatogr.*, (549), 367, (1991).
- 43.- C. Ong, C. Ng, N. Chong, H. Lee y S. Li; *J. Chromatogr.*, (516), 263, (1990).
- 44.- H. Nishi y M. Matsuo; *J. Liq. Chromatogr.*, (14), 973, (1991)
- 45.- G. Castañeda, E. Julien y H. Fabre; *Chromatographia*, (42), 159, (1996).
- 46.- K.D. Altria; *J. Chromatogr.*, (646), 245, (1993).
- 47.- P. Horvath, G. Balogh, J. Brlik, A. Csehi, F. Dravec, Z. Halmos, A. Lauko, M. Renyei, K. Varga y S. Gorog; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (15), 1343, (1997).
- 48.- H. Fabre, G. Castañeda; *Journal of Liquid Chromatography*, (18), 3877, (1995).
- 49.- G. Castañeda, E. Julien y H. Fabre; *Chromatography*, (42), 159, (1996).
- 50.- S. Hjertén y M. Johansson; *J. Chromatogr.*, (550), 811, (1991).
- 51.- J. Waterval, H. Krabbe, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingman y W. Underberg; *Abstracts 23<sup>rd</sup> International Symposium of High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC*, 99, PA7/66, (1999).
- 52.- W.C. Yang, A.M. Yu, Y.Q. Dai y H.Y. Chen; *Anal. Lett.*, 33(15), 3343, (2000).
- 53.- T.Y. You, L. Niu, J.Y. Gui, S.J. Dong y E.K. Wang; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (19), 231, (1999).
- 54.- J. Liu, W.H. Zhou, T.Y. You, F.L. Li, E.K. Wang y S.J. Dong; *Anal. Chem.*, 68(19), 3350, (1996).
- 55.- T.B. Chen, W.H. Deng, W.H. Lu, R.W. Chen y P.F. Rao; *Sepu.*, (19), 91, (2001).
- 56.- J. Zhou, G.C. Gerhardt, A. Baranski y R. Cassidy; *J. Chromatogr. A*, (839), 193, (1999).
- 57.- S.Q. Zhu, C.Q. Niu y H.M. Zhang; *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, (18), 248, (1998).
- 58.- J. Tjornelund y S.H. Hansen; *J. Chromatogr. A*, (779), 235, (1997).
- 59.- M.F.M. Tavares y V.L. McGuffin; *J. Chromatogr. A*, (686), 129, (1994).
- 60.- T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz y E. Bravo; *Electrophoresis*, (22), 134, (2001).

- 61.- W.C. Yang, A.M. Yu y H.Y. Chen; *J. Chromatogr. A*, (905), 309, (2001).
- 62.- P.D. Voegel y R.P. Baldwin; *Electroanalysis (NY)*, (9), 1145, (1997).
- 63.- C.L. Flurer; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (13), 809, (1995).
- 64.- D. Barron, E. Jiménez-Lozano y J. Barbosa; *Chromatographia*, (53), 395, (2000).
- 65.- D. Barron, E. Jiménez-Lozano y J. Barbosa; *Anal. Chim. Acta*, (415), 83, (2000).
- 66.- M. Hernández, F. Borrull y M. Calull; *J. Chromatography B: Biomed. Appl.*, (742), 255, (2000).
- 67.- T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz y E. Bravo; *Chromatographia*, (49), 419, (1999).
- 68.- C.E. Lin, H.W. Chen, E.C. Lin, K.S. Lin Y H.C. Huang; *J. Chromatogr. A*, (879), 197, (2000).
- 69.- J.K. Zhou, Y. Chen y R. Cassidy; *Electrophoresis*, (21), 1349, (2000).
- 70.- A.K. Laloo, S.C. Chattaraj y I. Kanfer; *J. Chromatography B: Biomed. Appl.*, (704), 333, (1997).
- 71.- Bio. Rad Application Note, 1575-45, (1999).
- 72.- S. Taniguchi, K. Hamase, A. Kinoshita y K. Zaitzu; *J. Chromatography B: Biomed. Appl.*, (727), 219, (1999).
- 73.- P. Gutiérrez-Navarro, A. El-Bekkouri y E. Rodríguez-Reinoso; *Biomed. Chromatogr.*, (13), 105, (1999).
- 74.- X.M. Fang, J.N. Ye y Y.Z. Fang; *Anal. Chim. Acta*, (329), 49, (1996).
- 75.- V.M. Okun, O.V. Aak y Vyu. Kozlov; *J. Chromatography B: Biomed. Appl.*, (675), 313, (1996).
- 76.- A. Gavenda, J. Sevcik y J. Psotova; *Chem. Listy.*, (94), 1010, (2000).
- 77.- G. Pajchel y S. Tyski; *J. Chromatogr. A*, (895), 27, (2000).
- 78.- C.J. Sciacchitano, B. Mopper y J.J. Specchio; *J. Chromatography B: Biomed. Appl.*, (657), 395, (1994).
- 79.- G. Pajchel y S. Tyski; *J. Chromatogr. A*, (846), 223, (1999).
- 80.- S.W. Sun y A.C. Wu; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, (22), 281, (1999).

- 81.- Y.C. Chen y C.E. Lin; *J. Chromatogr. A*, (802), 95, (1998).
- 82.- S. Croubels, W. Baeyens, C. Dewaele y C. Van- Peteghem; *J. Chromatogr. A*, (673), 267, (1994).
- 83.- J. Liu, T.T. Dabrah, J.A. Matson, S.E. Klohr, K.J. Volk, E.H. Kerns y M.S. Lee; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (16), 207, (1997).
- 84.- M.E.P. Hows, D. Perrett y J. Kay; *J. Chromatogr. A*, (768), 97, (1997).
- 85.- C.L. Flurer y K.A. Wolnik; *J. Chromatogr. A*, (674), 153, (1994).
- 86.- C.L. Flurer; *Electrophoresis*, (17), 359, (1996).
- 87.- T.J. Ward y A.B. Farris; *J. Chromatogr. A*, (906), 73, (2001).
- 88.- H.Y. Aboul-Enein y I. Ali; *Chromatographia*, (52), 679, (2000).
- 89.- F. Hui, K.H. Ekborg-Ott y D.W. Armstrong; *J. Chromatogr. A*, (906), 91, (2001).
- 90.- K.H. Ekborg-Ott, G.A. Zientara, J.M. Scheniderheinze, K. Gahm y D.W. Armstrong; *Electrophoresis*, 20(12), 2438, (1999).
- 91.- K.L. Rundlett, M.P. Gasper, E.Y. Zhou y D.W. Armstrong; *Chirality*, (8), 88, (1996).
- 92.- D.W. Armstrong y K.L. Rundlett; *J. Liq. Chromatogr.*, (18), 3659, (1995).
- 93.- D.W. Armstrong, M.P. Gasper y K.L. Rundlett; *J. Chromatogr. A*, (689), 285, (1995).
- 94.- J.P. Liu, K.J. Volk, M.S. Lee, M. Pucci y S. Handwerger; *Anal. Chem.*, (66), 2412, (1994).
- 95.- M.B. Harrold, M.J. Wajtusik, J. Riviello y P. Henson; *J. Chromatogr.*, (640), (1993).
- 96.- S. Fujiwara y S. Honda; *Anal. Chem.*, (59), 487, (1987).
- 97.- A. Saporano, *Nuestra Salud*, Tomo II, Ed. De Vecchi S.A., Barcelona, (1972).
- 98.- G. Hajak, P. Clarenbach, W. Fischer, W. Haase y E. Ruther; *International Clinical Psychopharmacology*, (9), 251, (1994).

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1.- Se han estudiado las propiedades de interés analítico de la rifamicina SV en disolución, poniendo especial énfasis en las reacciones que tienen lugar en medio amoniacal, tanto en presencia, como en ausencia de metales de transición. La reacción de mayor interés corresponde a la que tiene lugar en presencia de cobre (II), la cuál parece ser debida a la catálisis que dicho metal ejerce en la oxidación de la rifamicina SV, por el oxígeno atmosférico.

2.- Se ponen a punto dos métodos cinético-espectrofotométricos, manual y semiautomático para la determinación de rifamicina SV y rifampicina, basados en la reacción de oxidación en presencia de cobre (II), en medio amoniacal. Se comprueba un drástico aumento en la sensibilidad, precisión y selectividad, del método semiautomático respecto del manual.

3.- El método manual puede ser aplicado al análisis de formulaciones farmacéuticas. Así se ha llevado a cabo el análisis de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio".

4.- Mediante el método semiautomático se determinó rifampicina en "Rifater", fármaco que no podría haberse determinado mediante el método manual debido a la presencia de isoniacida y piracinamida. Este método, también se ha aplicado al análisis de rifampicina en orina.

5.- Se han determinado rifampicina, isoniacida y piracinamida en formulaciones farmacéuticas utilizando dos métodos de calibración multivariante, que utilizan el

## Conclusiones

---

espectro completo de absorción de la mezcla de analitos: PLS1 o mínimos cuadrados parciales y el recientemente introducido HLA o análisis lineal híbrido.

6.- Los resultados obtenidos por ambos métodos, han dado resoluciones similares para la determinación de rifampicina y piracinamida, mientras que para isoniacida se obtienen mejores resultados mediante el método PLS1.

7.- El concepto de señal de analito neto (NAS), utilizado en HLA, nos permite el cálculo de los parámetros de calidad (selectividad, sensibilidad, sensibilidad analítica y límites de detección) útiles para la comparación de los métodos.

8.- Se pone a punto un método cromatográfico para la determinación de creatinina, isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y rifampicina mediante HPLC, en modo gradiente y en conjunción con un detector fotométrico programable, que permite el cambio automático de la longitud de onda de detección. Obteniéndose una aceptable resolución cromatográfica para los cinco analitos determinados. El método cromatográfico propuesto es sencillo y sólo se necesita un tiempo de 8 min para la elución de todos los compuestos.

9.- El método ha sido aplicado a la determinación de isoniacida, piracinamida y rifampicina en formulaciones farmacéuticas, las cuales contenían mezclas de: rifampicina, piracinamida e isoniacida; rifampicina e isoniacida o rifampicina sola. Pudiendo comprobar que los valores obtenidos mediante el método cromatográfico propuesto y los certificados en el medicamento estaban en concordancia, obteniéndose recuperaciones entre el 95 y 108 %.

10.- El método optimizado se aplica a la determinación de rifampicina en muestras de orina, procedentes de un paciente bajo tratamiento. Las muestras de orina fueron inyectadas en el sistema cromatográfico sin pretratamiento, sólo dilución. No se observan interferencias entre la matriz de orina, la cual contenía otros principios activos coadministrados (etambutol, ofloxacino, difunisal etc.) y el compuesto determinado, como ponen de manifiesto la correlación entre los diferentes métodos de calibración aplicados (patrón externo y adición patrón).

11.- Se pone a punto un método de electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC), para la resolución de mezclas formadas por isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y rifampicina. La utilización de un surfactante (SDS) en concentración por encima de la concentración crítica micelar, ha sido necesaria para llevar a cabo la separación de analitos neutros. Se obtiene una adecuada resolución en un tiempo total aproximado de 7 minutos.

12.- El método propuesto se ha aplicado a la determinación de los compuestos de interés en formulaciones farmacéuticas. Los resultados obtenidos se han validado con el método de HPLC.

13.- En el análisis de formulaciones farmacéuticas, el método de electroforesis capilar resulta más ventajoso respecto al de HPLC, ya que el tiempo total de análisis es menor, así como el consumo de reactivos. La ventaja que presenta el método de HPLC es la mayor sensibilidad, pero en el caso de fármacos no es relevante, ya que las muestras a analizar están en concentraciones elevadas y hay que realizar importantes diluciones.

## **Conclusiones**

---

14.- Por último, el método optimizado se ha aplicado a la determinación de isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida en suero fortificado, sin tratamiento previo. En este caso rifampicina no se ha podido determinar debido a la interferencia de la matriz.

## ABREVIATURAS



---

## ABREVIATURAS

**A**- Área de pico.

**ACE**- Alternating Conditional Expectations.

**Aiso o AISO**- Acetilisoniacida.

**APC**- Área de pico corregida.

**C<sub>T</sub>**- Concentración total.

**CE**- Electroforesis capilar.

**CEC**- Electro cromatografía micelar.

**CGE**- Electroforesis capilar en gel.

**CIEF**- Isoelectroenfoque capilar.

**CITP**- Isotacoforesis capilar.

**CLS**- Análisis multicomponente clásico.

**c.m.c. o CMC**- Concentración crítica micelar.

**col**- Colaboradores.

**Cre o CRE**- Creatinina.

**CZE**- Electroforesis capilar en zona libre.

**DER**- Desviación estándar relativa.

**FEO**- Flujo electroosmótico.

**FIA**- Análisis por inyección en flujo.

**g.d.l**- Grados de libertad

**H**- Altura de pico.

**HLA**- Análisis lineal híbrido.

**HLA/XS**- Variante de HLA.

**HPCE**- Electroforesis capilar de alta eficacia.

**HPLC**- Cromatografía líquida de alta eficacia.

**HPTLC**- Cromatografía líquida de alta eficacia en capa fina.

- ILS.**- Regresión inversa por mínimos cuadrados.
- In.**- Interferente.
- IR.**- Infra-rojo.
- Iso o ISO.**- Isoniacida.
- k'.**- Factor de capacidad.
- LOD ó LD.**- Límite de detección.
- LOQ.**- Límite de determinación o cuantificación.
- LWR.**- Locally Weighted Regression.
- MARS.**- Multivariante Adaptive Regression Splines.
- MEKC.**- Electroforesis capilar electrocinética micela.
- MLR.**- Regresión lineal múltiple.
- mUA.**- Mili unidades de absorbancia.
- N.**- Número de platos teóricos.
- NA.**- Número de agregación.
- NAS.**- Señal del analito neto.
- NIPALS.**- Non-linear iterative partial least squares.
- NN.**- Redes neuronales.
- OMS.**- Organización Mundial de la Salud.
- PCA.**- Análisis por componentes principales.
- PCR.**- Regresión por componentes principales.
- PFTE.**- Politetrafluoroelileno.
- Pir o PIR.**- Piracinamida.
- PLS.**- Regresión por mínimos cuadrados parciales.
- ppm.**- Partes por millón ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).
- PPR.**- Projection Pursuit Regression.
- PRESS.**- Prediction Residual Error Sum of Squares.
- Qrf.**- Quinona correspondiente a rifamicina 5V.

- R**.- Coeficiente de correlación.
- R<sup>2</sup>**.- Coeficiente de determinación.
- R<sub>s</sub>**.- Resolución entre dos picos.
- Ref**.- Referencia.
- REP**.- Relative Error of Prediction
- Rf**.- Rifamicina.
- Rp o Rif**.- Rifampicina.
- RMSD**.- Residual mean standard deviation.
- RSD**.- Desviación estándar residual.
- SCR**.- Suma de los cuadrados de la regresión.
- SCT**.- Suma de los cuadrados totales.
- SCE**.- Suma de los cuadrados de los errores.
- SDS**.- Dodecilsulfato sódico.
- SEL**.- Selectividad.
- SEN**.- Sensibilidad.
- SEP**.- Standard Error of Prediction.
- t<sub>FEO</sub>**.- Tiempo de migración del flujo electrostático.
- t<sub>m</sub>**.- Tiempo de migración.
- T<sub>R</sub>**.- Tiempo de retención.
- UV**.- Ultravioleta.
- Vis**.- Visible.
- α<sub>1,2</sub>**.- Factor de separación.
- λ**.- Longitud de onda.



# ÍNDICE



**Capítulo 1.- Introducción. Aparatos y reactivos.**

Introducción. . . . .	3
Tuberculosis. Generalidades. . . . .	4
Analitos objeto de estudio. . . . .	5
Rifamicinas. . . . .	6
Modo de acción. . . . .	8
Metabolismo y eliminación. . . . .	8
Aplicaciones clínicas e interacciones con otros fármacos. . . . .	9
Isoniacida y acetilisoniacida. . . . .	10
Modo de acción. . . . .	10
Metabolismo y eliminación. . . . .	10
Contraindicaciones. . . . .	11
Piracinamida. . . . .	12
Modo de acción. . . . .	12
Metabolismo y eliminación. . . . .	12
Contraindicaciones. . . . .	13
Creatinina. . . . .	13
Otros antibióticos antituberculosos. . . . .	14
Pautas terapéuticas. . . . .	15
Aparatos y reactivos utilizados en el desarrollo de la Memoria . . . . .	17
Aparatos. . . . .	17
Reactivos. . . . .	18
Bibliografía. . . . .	22

**Capítulo 2.- Estudios analíticos y determinación mediante métodos cinético-espectrofotométricos (manual y semiautomático) de ansamicinas.**

Métodos cinéticos en Química Analítica. . . . .	25
Semiautomatización. Aplicación al análisis farmacológico. . . . .	30
Revisión bibliográfica. . . . .	34
Análisis de rifamicinas. . . . .	35

**PARTE EXPERIMENTAL**

Estudio de las características de interés analítico de la rifamicina SV. . . . .	41
Estabilidad en agua. . . . .	41
Estabilidad en medio básico. . . . .	42
Influencia de la acidez del medio en las características espectrales rifamicina SV. . . . .	45
Influencia de la concentración del tampón en la reacción de oxidación de la rifamicina SV. . . . .	47
Cálculo de los órdenes parciales de reacción para las especies del tampón y protones. . . . .	48
Estudio de la reaccionabilidad de rifamicina SV con metales de transición. Procedimiento manual. . . . .	51
Influencia de la concentración de cobre (II) sobre la cinética de la oxidación de rifamicina SV. . . . .	53
Influencia de la concentración de rifamicina SV en la velocidad de reacción. Recta de calibrado. . . . .	58

Tratamiento estadístico de los datos de calibración. ....	60
Establecimiento del modelo lineal. ....	61
Validación del modelo lineal. ....	63
Predicción mediante interpolación inversa. ....	71
Tratamiento experimental. Rectas de calibrado. ....	74
Repetitividad. ....	78
Procedimiento recomendado. ....	78
Influencia de la concentración de etanol en la reacción catalizada. . .	80
Influencia de otros principios activos en la determinación de rifamicina SV. ....	80
Aplicación del método propuesto al análisis farmacéutico. Determinación de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio". ....	82
Determinación cromatográfica de rifamicina SV en "Rifamicina Colirio". ....	84
Estudio cromatográfico de la reacción de oxidación de rifamicina SV. ....	90
Influencia del tiempo y la luz en la evolución de las señales correspondientes a patrones de rifamicina SV. ....	90
Influencia de la presencia de oxígeno en las disoluciones de rifamicina SV. ....	92
Influencia de la presencia de cobre (II). ....	95
Determinación semiautomática de rifamicina SV. ....	98
Influencia de la concentración de tampón. ....	98
Influencia de la concentración de cobre (II). ....	99
Influencia de la concentración de rifamicina SV. Recta de calibrado. ....	100

Método semiautomático propuesto para la determinación de rifamicina SV. ....	103
Influencia de la presencia de diversos principios activos en la determinación de rifamicina SV. ....	103
Aplicación del método semiautomático propuesto al análisis farmacológico.	
Determinación de rifampicina en "Rifater". ....	105
Determinación de rifampicina en orina mediante el método semiautomático. ....	108
Bibliografía. ....	111

### **Capítulo 3.- Determinación de rifampicina, isoniacida y piracinamida mediante métodos de calibración multivariante (PLS1 y HLA).**

Introducción al análisis multivariante .....	117
Regresión lineal múltiple (MLR) .....	121
Regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS) .....	125
Descomposición espectral. ....	126
Análisis por componentes principales (PCA) .....	126
Método PLS o mínimos cuadrados parciales .....	127
Optimización del número de loading. ....	128
Selección de la región espectral. ....	133
Detección de muestras discrepantes o outliers. ....	133
Método PCR o regresión por componentes principales. ....	135
Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR, y PLS. ....	138

---

HLA (Hybrid Linear Analysis) como nuevo algoritmo en análisis multivariante. ....	139
Concepto de señal de analito neto (NAS). ....	140
Selectividad, sensibilidad y límites de detección. ....	144
Antecedentes bibliográficos. ....	146
<b>PARTE EXPERIMENTAL. ....</b>	<b>150</b>
Estudio de las características fotométricas de interés analíticos de rifampicina, isoniacida y piracinamida. ....	151
Estudio de las disoluciones acuosas de rifampicina. ....	151
Estabilidad en agua. ....	151
Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de rifampicina. ....	152
Estabilidad en medio básico. ....	155
Estudio de las disoluciones acuosas de isoniacida. ....	157
Estabilidad en agua. ....	157
Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de isoniacida. ....	158
Estudio de las disoluciones acuosas de piracinamida. ....	160
Estabilidad en agua. ....	160
Influencia de la acidez del medio en las características espectrales de piracinamida. ....	161
Comparación de espectros de absorción de rifampicina, isoniacida y piracinamida para diferentes valores de pH del medio. ....	161

## Índice

---

Determinación simultánea de rifampicina, isoniacida y piracinamida mediante calibración multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS) y análisis lineal híbrido (HLA) . . . . .	163
Condiciones generales para la obtención de la matriz de calibración . . . . .	163
Estudio de scores . . . . .	169
Determinación simultánea de rifampicina, piracinamida e isoniacida en muestras problemas y formulaciones farmacéuticas . . . . .	175
Determinación en muestras binarias y ternarias artificiales . . . . .	175
Cálculo de las figuras de mérito . . . . .	177
Determinación en composiciones farmacéuticas . . . . .	178
Bibliografía . . . . .	182

## **Capítulo 4.- Separación y determinación de rifampicina, isoniacida, acetilisoniacida, piracinamida y creatinina mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).**

Introducción . . . . .	189
Elección de la fase móvil . . . . .	190
Parámetros cromatográficos . . . . .	192
Factor de capacidad . . . . .	192
Factor de separación . . . . .	193
Resolución cromatográfica . . . . .	193
Selección del caudal de fase móvil . . . . .	194
Número de platos teóricos . . . . .	195
Revisión bibliográfica . . . . .	196

---

**PARTE EXPERIMENTAL**

Comportamiento de creatinina, isoniacida, piracinamida y rifampicina en diferentes fases móviles . . . . .	205
Estudio de la composición de la fase móvil . . . . .	207
Influencia del pH . . . . .	208
Influencia del porcentaje de metanol en la fase móvil . . . . .	210
Selección del caudal de la fase móvil. . . . .	213
Estudio del metabolito de isoniacida. Acetilisoniacida . . . . .	216
Procedimiento operatorio. Rectas de calibrado . . . . .	219
Parámetros estadísticos y de fiabilidad . . . . .	219
Aplicación del método propuesto a la determinación de los antibióticos en formulaciones farmacéuticas y muestras de orina. . . . .	225
Determinación en formulaciones farmacéuticas. . . . .	225
Estudios de pureza de pico . . . . .	228
Determinación en orina . . . . .	235
Bibliografía . . . . .	242

**Capítulo 5.- Separación y determinación de rifampicina, isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida mediante electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC).**

Introducción . . . . .	247
De la electroforesis clásica a la electroforesis capilar. . . . .	248
Fundamentos que rigen la separación en electroforesis capilar. . . . .	251
Movilidad electroforética . . . . .	251

## Índice

---

Flujo electroosmótico .....	253
Desarrollo del flujo electroosmótico.....	255
Parámetros analíticos .....	259
Tiempo de migración y movilidad electroforética aparente.....	259
Dispersión y eficacia .....	260
Resolución .....	265
Aspectos instrumentales y operacionales .....	267
Sistemas de inyección .....	268
Concentración de la muestra en el capilar.....	272
Capilar .....	275
Sistemas de termostatación del capilar.....	276
Detección .....	276
Detectores ópticos .....	278
Detectores electroquímicos .....	280
Acoplamiento en línea con un espectrómetro de masas....	280
Modos de separación en electroforesis capilar .....	281
Electroforesis capilar en zona (CZE) .....	281
Selectividad y uso de aditivos .....	282
Electroforesis capilar en gel (CGE) .....	283
Isoelectroenfoque capilar (CIEF) .....	284
Isotacoforesis capilar (CITP) .....	284
Electrocromatografía capilar (CEC) .....	286
Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC).....	287
Efecto de la temperatura. ....	293
Separaciones quirales en electroforesis capilar..	294
Optimización de la precisión de las medidas en electroforesis capilar....	296

Principales factores que deben someterse a control. ....	297
Aplicaciones de la electroforesis capilar .....	299
Revisión bibliográfica .....	300

**PARTE EXPERIMENTAL**

Introducción .....	309
Condiciones instrumentales .....	312
Influencia del pH en la separación .....	314
Influencia de la concentración de surfactantes .....	317
Influencia de la concentración de tampón .....	322
Modificadores orgánicos .....	324
Efecto de la temperatura .....	326
Influencia del potencial .....	328
Influencia del tiempo de inyección .....	331
Condiciones químicas e instrumentales finales. ....	333
Rectas de calibrado y parámetros estadísticos. ....	335
Aplicación del método a la determinación de los analitos en fármacos y muestras de suero .....	342
Determinación de isoniacida, piracinamida y rifampicina en fármacos. ....	342
Estudios sobre la pureza de pico .....	344
Comparación de los valores medios calculados para los principios activos en cada fármaco mediante HPLC y MEKC .....	351

## Índice

---

Determinación de isoniacida, acetilisoniacida y piracinamida en suero sanguíneo .....	355
Determinación de los analitos en diferentes sueros. ....	356
Bibliografía .....	366
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>371</b>