

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Determinación de multicomponentes  
por calibración univariada  
y multivariante: análisis de fármacos**

**Autor: Luis Luis, María Luz**

**Directores: Juan José Arias León  
y Ana Isabel Jiménez Abizanda**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**



Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología  
Universidad de La Laguna

JOSÉ MANUEL GARCÍA FRAGA, Profesor Titular y Director de este Departamento,

INFORMA: Que la presente Memoria titulada “Determinación de multicomponentes por calibración univariada y multivariante: Análisis de fármacos”, que presenta la Lcda. M<sup>a</sup> Luz Luis Luis para optar al Grado de Doctor en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los Dres. Juan José Arias León y Ana Isabel Jiménez Abizanda.

Y para que conste, firmo el presente informe en La Laguna, a treinta de abril de dos mil tres.

JUAN JOSÉ ARIAS LEÓN, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA, Y ANA ISABEL JIMÉNEZ ABIZANDA, PROFESORA TITULAR DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

AUTORIZAN: La presentación del trabajo “Determinación de multicomponentes por calibración univariada y multivariante: Análisis de fármacos” realizado por la Licenciada en Química Dña. M<sup>a</sup> Luz Luis Luis para optar al grado de Doctor en Química por esta Universidad.

Y para que conste, firman la presente en La Laguna, a treinta de abril de dos mil tres.

**DETERMINACIÓN DE MULTICOMPONENTES POR  
CALIBRACIÓN UNIVARIADA Y MULTIVARIANTE:  
ANÁLISIS DE FÁRMACOS**

por

M<sup>a</sup> Luz Luis Luis

LOS DIRECTORES

Fdo.: Dr. D. Juan José Arias León  
Catedrático de Química Analítica  
de la Universidad de La Laguna

Fdo.: Ana Isabel Jiménez Abizanda  
Profesora Titular de Química Analítica  
de la Universidad de La Laguna

Memoria presentada para aspirar  
al grado de Doctor en Química

Fdo.: M<sup>a</sup> Luz Luis Luis

*A mis padres y hermanos*

*En especial, a Víctor*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin la ayuda del Dr. Juan José Arias León y la Dra. Ana Isabel Jiménez Abizanda, directores de la presente tesis doctoral; el apoyo, dedicación, consejos, recomendaciones, y los conocimientos de los que me han hecho partícipe, justifican el testimonio de mi más sincera gratitud y agradecimiento.

Al Dr. José Manuel García Fraga, por su infinita paciencia, muchísimas gracias.

Especial consideración merece el Dr. Francisco Jiménez Moreno, por estar dispuesto siempre a ofrecer su desinteresada colaboración, y por su eterna sonrisa.

A los compañeros de grupo de trabajo, Dres. Oscar Hernández Torres y Elena Martín Febles, por compartir algo tan difícil como el espacio. A los compañeros de laboratorio y a todos aquellos que me ofrecieron su amistad durante todo este tiempo, a todos ellos mi más sincero agradecimiento.

Por último, agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una Beca de FPI.





<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I: Características de las sustancias en estudio</b> .....	5
I.1. Características farmacológicas .....	7
a) Agentes antihipertensivos .....	7
b) Antiepilépticos .....	10
I.2. Características fisico-químicas .....	13
I.3. Revisión bibliográfica .....	16
Bibliografía .....	22
<b>CAPÍTULO II: Fundamentos teóricos</b> .....	33
II.1. Calibración univariada .....	37
II.2. Calibración multivariante .....	43
II.2.1 Regresión lineal múltiple (MLR) .....	44
II.2.2. Regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS) .....	49
II.3. Procedimiento general para la selección del modelo óptimo .....	57
II.3.1. Calibración univariante .....	58
II.3.2. Calibración multivariante .....	58
a) Método del mínimo RSE y RMSE .....	59
b) Método del menor PRESS significativo .....	61
Bibliografía .....	62

---

<b>CAPÍTULO III: Resolución de mezclas binarias</b> .....	63
III.1. Espectrofotometría derivada .....	65
a) Método del “cruce por cero” .....	67
b) Método de los “espectros cocientes derivados” .....	68
III.1.1. Dihidralazina – Hidroclorotiazida .....	71
a) Método del cruce por cero .....	73
b) Método de los espectros cocientes derivados .....	80
III.1.2. Clortalidona – Espironolactona .....	85
a) Método del cruce por cero .....	85
b) Método de los espectros cocientes derivados .....	89
III.1.3. Fenitoína – Fenobarbital .....	94
a) Método del cruce por cero .....	95
b) Método de los espectros cocientes derivados .....	97
III.2. Regresión multivariante .....	100
III.2.1. Dihidralazina – Hidroclorotiazida .....	101
a) Regresión en mínimos cuadrados parciales .....	101
b) Regresión lineal múltiple .....	110
III.2.2. Clortalidona – Espironolactona .....	113
III.2.3. Fenitoína – Fenobarbital .....	119
III.3. Aplicaciones: Determinación de mezclas binarias en preparados farmacéuticos .....	125
III.3.1. Determinación de Dihidralazina e Hidroclorotiazida en “Adelfán-Esidrex” .....	125
III.3.2. Determinación de Clortalidona y Espironolactona en “Aldoleo” .....	130
III.3.3. Determinación de Fenitoína y Fenobarbital en “Epilantín” .....	134
Bibliografía .....	138

---

---

<b>CAPÍTULO IV: Resolución de mezclas ternarias</b> .....	139
IV.1. Determinación simultánea de Dihidralazina, Hidroclorotiazida y Reserpina .....	140
IV.1.1. Regresión en mínimos cuadrados parciales .....	140
IV.1.2. Regresión lineal múltiple .....	153
IV.2. Determinación simultánea de Clortalidona, Espironolactona y Reserpina .....	155
<b>CAPÍTULO V: Resolución de mezclas binarias por espectrofluorimetría</b> .....	169
V.1 Fluorescencia convencional .....	172
V.1.1. Regresión en mínimos cuadrados parciales .....	176
V.2. Fluorescencia sincrónica .....	179
V.2.1. Fluorescencia sincrónica derivada. Calibración univariada .....	181
V.2.2. Regresión en mínimos cuadrados parciales .....	185
V.2.3. Determinación de Furosemida y Triamtereno en preparados farmacéuticos .....	188
V.3. Determinación de Triamtereno en orina .....	190
Bibliografía .....	195
<b>CAPÍTULO VI: Electroforesis capilar</b> .....	197
VI.1. Separación y determinación de diuréticos por cromatografía micelar electrocinética (MEKC) .....	202
VI.2. Separación de determinación de antiepilépticos por electroforesis capilar (CZE) .....	209
Bibliografía .....	214

---

<b>EXPERIMENTAL</b> .....	215
E.1. Aparatos .....	217
E.2. Programas .....	218
E.3. Reactivos y disoluciones .....	219
E.4. Procedimiento .....	221
E.4.1. Determinaciones espectrofotométricas .....	221
a) Dihidralazina – Hidroclorotiazida .....	221
b) Clortalidona – Espironolactona .....	222
c) Fenitoína – Fenobarbital .....	223
d) Dihidralazina – Hidroclorotiazida – Reserpina .....	224
e) Clortalidona – Espironolactona – Reserpina .....	224
E.4.2. Determinaciones espectrofluorimétricas .....	224
E.4.3. Electroforesis capilar .....	226
<b>CONCLUSIONES</b> .....	229

---

**INTRODUCCIÓN**

---



La búsqueda de nuevos métodos de análisis que permitan multideterminaciones encaminadas a mejorar la sensibilidad, selectividad, rapidez y coste de los ya existentes ha sido siempre el objetivo de todo proceso analítico. El desarrollo experimentado tanto por la instrumentación como por los sistemas que permiten el tratamiento de los datos suministrados por ésta, ha dado lugar a la aparición de nuevos métodos de calibración capaces de procesar toda la información generada por los instrumentos, y de eliminar limitaciones de los métodos tradicionales de calibración como las interferencias o el efecto matriz.

El objetivo de la presente Memoria es la aplicación de los diferentes tipos de calibración a datos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos para la determinación simultánea de dos o más fármacos en mezclas.

La Memoria se ha estructurado en seis capítulos. En el Capítulo I se describen las sustancias utilizadas, detallando sus características físico-químicas, acción y beneficio que ejercen en el cuerpo humano, procesos de degradación y metabolitos de cada una de ellas. Asimismo, se realiza una revisión bibliográfica de los métodos descritos para la determinación de los fármacos en estudio.

En el Capítulo II se establecen los fundamentos teóricos de los distintos métodos de calibración que se aplicarán en los capítulos siguientes, y se explica el procedimiento general aplicado para la selección del mejor modelo para llevar a cabo las determinaciones, basado en la optimización del intervalo de longitudes de onda utilizado.

El Capítulo III se dedica a la resolución de mezclas binarias dihidralazina-hidroclorotiazida, clortalidona-espironolactona y fenitoína-fenobarbital haciendo uso tanto de métodos de calibración univariantes, aplicados a los espectros de orden cero y derivados (métodos del cruce por cero y de los espectros cocientes derivados), como de métodos de calibración multivariantes, regresión lineal en múltiples longitudes de onda y regresión en mínimos cuadrados parciales. Los métodos propuestos se aplican a la determinación de los fármacos en mezclas sintéticas y en preparados farmacéuticos, y se validan mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

En el Capítulo IV se estudian las mezclas ternarias dihidralazina-hidroclorotiazida-reserpina y clortalidona-espironolactona-reserpina por regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS), llevándose a cabo la selección del intervalo de longitudes de onda que proporciona mejores resultados en la determinación de cada analito.

El Capítulo V se dedica a los métodos espectrofluorimétricos. El procedimiento general propuesto para la selección del intervalo de longitudes de onda y del número de factores cuando se aplica PLS, se aplica a la resolución de mezclas binarias furosemida-triamtereno por fluorimetría convencional y sincrónica, y se realiza la determinación de triamtereno en orina.

Por último, en el Capítulo VI se aborda de nuevo la calibración univariante, que asociada a técnicas de separación tan importantes como la Electroforesis Capilar, permite también llevar a cabo multideterminaciones. Así, la determinación simultánea de los diuréticos furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona y triamtereno se lleva a cabo por Cromatografía Micelar Electrocinética (MEKC), y la resolución de mezclas de fenitoína y fenobarbital por Electroforesis Capilar de Zona (CZE). Los métodos propuestos se aplican a la determinación de diuréticos y antiepilépticos en medicamentos.

---

**CAPÍTULO I**  
**CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSTANCIAS EN ESTUDIO**



En este capítulo se describen las características farmacológicas y físico-químicas<sup>1-5</sup>, y se realiza una revisión bibliográfica de los métodos de determinación de los analitos estudiados en la presente Tesis Doctoral: agentes antihipertensivos (hidroclorotiazida (HCT), clortalidona (CLT), furosemida (FUR), triamtereno (TRI), espironolactona (SP), reserpina (RSP) y dihidralazina (DHZ)), y agentes antiepilépticos (fenobarbital (PB) y fenitoína (DPH)).

## **I.1. Características farmacológicas**

### **a) Agentes antihipertensivos**

La hipertensión arterial es una enfermedad cuyo signo objetivo característico es la existencia de una presión diastólica por encima de 90 mm Hg de una forma permanente y estable. La causa de esta enfermedad es multifactorial y, en la mayoría de los casos desconocida.

Los fármacos antihipertensivos influyen sobre la presión arterial en cuatro sitios efectores: los vasos de resistencia (arteriolas), los vasos de capacitancia (venas), el corazón y los riñones. Así, según su sitio de acción primario o su mecanismo de acción los agentes antihipertensivos pueden ser clasificados como:

- a) *Diuréticos*: entre los que destacan las tiazidas (HCT, CLT), y otros agentes relacionados (FUR, TRI).
- b) *Agentes simpaticolíticos*: agentes de acción central, bloqueantes ganglionares y de neuronas adrenérgicas (RSP), y antagonistas á y/o â adrenérgicos (SP).
- c) *Vasodilatadores*: divididos en arteriales (DHZ) y venosos.
- d) *Bloqueantes del calcio*.
- e) *Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina*.

### ***Hidroclorotiazida y clortalidona***

Una de las primeras estrategias para el manejo de la hipertensión arterial fue alterar el balance de  $\text{Na}^+$  por restricción de sal en la dieta. La modificación prolongada del equilibrio de  $\text{Na}^+$  mediante el uso de fármacos se logró en la década de los 50 con el desarrollo de los diuréticos benzotiazídicos. Estos diuréticos no sólo tienen efectos antihipertensivos cuando se usan solos, sino que intensifican la eficacia de prácticamente todos los agentes antihipertensivos.

Las tiazidas, grupo al que pertenecen la hidroclorotiazida y la clortalidona, actúan directamente sobre el riñón para incrementar la excreción de cloruro de sodio y agua, produciendo también un aumento en la excreción de  $\text{K}^+$ .

Cerca del 60-80 % de la dosis de hidroclorotiazida se excreta en la orina en 72 horas, estando al 95 % en forma inalterada; mientras que la clortalidona se absorbe lentamente en el tracto gastrointestinal y se excreta prácticamente inalterada.

### ***Furosemida***

La furosemida pertenece al grupo de los denominados diuréticos de techo alto, término utilizado para designar a aquellos agentes que logran una diuresis mucho mayor que la observada con otros agentes.

La furosemida es absorbida de forma rápida pero incompleta. Más del 90 % de una dosis intravenosa es excretada por la orina, principalmente sin descomposición, haciéndolo el 14 % de la dosis como el glucorónido conjugado.

### ***Triamtereno***

Durante las últimas décadas, la introducción de nuevos agentes natriuréticos se ha acompañado de estudios paralelos sobre la secreción de potasio, que establecieron que las pérdidas excesivas de potasio pueden constituir una consecuencia desfavorable de la acción diurética.

Aunque es cierto que el triamtereno posee moderada actividad natriurética, lo más importante es su efecto sobre la excreción de potasio.

El triamtereno es relativamente insoluble en agua y sólo puede administrarse por vía oral. Se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y luego se excreta por la orina. En torno al 30 – 70 % de la dosis se excreta como p-hidroxitriamtereno, principal metabolito, y entre el 5 y el 10% en forma inalterada.

### ***Dihidralazina***

La mayor parte de los efectos de las hidralazinas están confinados al sistema cardiovascular. La disminución de la presión sanguínea posterior a su administración está asociada con una reducción selectiva de la resistencia vascular en la circulación coronaria, cerebral y renal.

La dihidralazina, al actuar directamente sobre la musculatura vascular, sobre todo la arteriolar, provoca una vasodilatación periférica reduciendo, así, la tensión arterial elevada.

Su absorción es rápida, y su vida media de eliminación es, por término medio, de 4 - 5 horas. En el plasma, se encuentra entre un 10 y un 15 % en forma de hidralazina tras su metabolización.

### ***Reserpina***

Alcaloide que se extrae de la raíz de la *Rauwolfia serpentina*, arbusto trepador originario de la India. La descripción del uso medicinal de la raíz de esta planta se encuentra en antiguos escritos hindúes del *ayurveda*. Sin embargo, los alcaloides de la *Rauwolfia* no se emplearon en la medicina occidental hasta mediados de la década de 1950. La reserpina fue el primer agente conocido capaz de interferir con la función del sistema nervioso simpático del hombre, y su empleo marcó el comienzo de la era moderna de la farmacoterapia efectiva contra la hipertensión.

La reserpina se absorbe rápidamente, y su fijación proteica es del 96 %. Durante las primeras 96 horas se excreta el 8 % por la orina (principalmente en forma de metabolitos) y el 62 % de la dosis con las heces (básicamente en forma inalterada). La principal ventaja de la reserpina es su bajo coste, muy inferior al de otros agentes antihipertensivos.

### ***Espironolactona***

El papel de los adrenocorticoesteroides es la regulación del balance de líquidos y electrolitos. Los mineralcorticoides actúan aumentando la reabsorción de sodio y cloruro, y también de potasio. La espironolactona es uno de los esteroides de mayor selectividad y eficacia.

Después de su administración oral, el derivado ditioacetilado aparece rápidamente en plasma, alcanzando un máximo de absorción después de 4 a 6 horas.

## **b) Antiepilépticos**

Las convulsiones son paroxismos de contracciones musculares involuntarias y generalizadas, que en ocasiones se acompañan de inconsciencia, aunque éste no es un componente necesario. Pueden deberse a procesos patológicos intra o extracerebrales, así como a diversas toxinas, fármacos y organismos vivos, aunque una causa frecuente de convulsiones consiste en la serie de defectos neuronales agrupados bajo el término colectivo de epilepsia.

El área focal es una característica esencial en el origen de las convulsiones epilépticas. El foco puede ser funcional (originado en la proximidad de un tumor) o criptogénico (lesión bioquímica o conexiones sinápticas anormales).

La crisis epiléptica aparece cuando las descargas de neuronas focales invaden regiones extrafocales, reclutando más elementos neuronales que constituyen una agregación de células excitadas con descarga sincrónica.

Las epilepsias se clasifican a efectos de control terapéutico:

- A. Convulsiones generalizadas, entre las que se distinguen: - gran mal (pérdida de conciencia y/o convulsiones); - pequeño mal (mirada fija o ausencia, con signos motores); - crisis mioclónicas (contracciones corporales rítmicas sin pérdida de conciencia).
- B. Convulsiones parciales, que pueden ser motoras o sensoriales.

Los bromuros fueron los primeros fármacos antiepilépticos, seguidos por el fenobarbital en 1912 y la fenitoína en 1938.

Desde el punto de vista químico, los diversos fármacos utilizados en la epilepsia pueden clasificarse en las categorías siguientes:

- a) *Barbitúricos y sustancias relacionadas*: fenobarbital, mefobarbital, metarbarbital, pirimidona.
- b) *Hidantoínas*: fenitoína, feniletilhidantoína, mefenitoína.
- c) *Oxazolidonas*: trimetadiona, paarametadiona.
- d) *Succinimidas*: fenusuximida, metsuximida, etosuximida.
- e) *Otros anticonvulsivantes*: fenacemida, acetazolamida, clonacepam, diacepam, carbamacipina, ácido valproico.

El examen de las fórmulas estructurales básicas de barbitúricos, hidantoínas, oxazolidonas y succinimidas pone de manifiesto la existencia de ciertas semejanzas evidentes entre los distintos grupos.

Mientras que el ácido barbitúrico es la malonilurea, la hidantoína tiene un anillo de cinco componentes que puede considerarse como una combinación de ácido acético y urea. En los derivados de la oxazolidona, el nitrógeno del anillo hidantoínico es sustituido por oxígeno. Las succinimidas tienen una clara semejanza con las oxazolidonas.

### ***Fenobarbital***

Es uno de los fármacos antiepilépticos más antiguo y barato, se administra por vía oral con una dosis diaria total de 0,1 a 0,2 g. Difiere de la mayoría de los restantes barbitúricos en que posee un efecto antiepiléptico significativo a dosis que no causan excesivo sueño o sedación. Su principal utilidad radica en el tratamiento del gran mal y la epilepsia focal.

El fenobarbital es parcialmente metabolizado y se excreta inalterado entre el 11 y 25% en orina. Su principal metabolito es el p-hidroxifenobarbital.

### ***Fenitoína***

Fue introducida en 1938, y es todavía hoy uno de los antiepilépticos más útiles. La dosis diaria para adultos oscila entre 0,2 y 0,6 g. Su principal ventaja principal consiste en que ejerce poca acción sedante a dosis eficaces.

La fenitoína puede administrarse por vía intravenosa en el estado epiléptico, utilizándose en el tratamiento de las convulsiones generalizadas y focales.

Es parcialmente metabolizada, alrededor de un 4 % de la dosis se excreta inalterada en orina, aumentando este porcentaje cuando la orina es alcalina. Su principal metabolito es el derivado p-hidroxi-fenilo, conjugado del ácido glucorónico.

## I. 2. Características físico-químicas

**Hidroclorotiazida (HCT):** Diurético de la familia de las benzotiazidas que funde con descomposición a 267 °C; es prácticamente insoluble en agua, éter y cloroformo, y un gramo de esta sustancia es soluble en 200 ml de etanol. En disolución presenta dos equilibrios ácido-base cuyos  $pK_a$  son 7,9 y 9,2.

A temperatura ambiente es estable durante años, no sufre degradación y el aumento de la temperatura prácticamente no le afecta.

En disolución acuosa sufre hidrólisis para dar formaldehído y 6-cloro-2,4-disulfamoilánilina, reacción que depende de la temperatura y del pH del medio.

**Clortalidona (CLT):** Diurético benzotiazídico, 12 mg se disuelven en 100 ml de agua, soluble en 1/150 de etanol, 1/650 en cloroformo y poco soluble en éter. En disolución presenta un único equilibrio ácido-base de  $pK_a$  9,4.

**Furosemida (FUR):** Polvo cristalino de color blanco o ligeramente amarillo, que funde con descomposición a 206° C. Soluble en 1/75 de etanol, 1/850 en éter, soluble en disoluciones acuosas a pH superiores a 8. En disolución presenta dos equilibrios ácido base de  $pK_a$  3,8 y 7,5.

**Triamtereno (TRI):** Polvo cristalino de color amarillo, soluble en 1/100 de agua, 1/3000 de etanol y 1/4000 de cloroformo. En disolución acuosa presenta un equilibrio ácido-base de  $pK_a$  6,2. Sus disoluciones ácidas producen fluorescencia azul.

**Dihidralazina (DHZ):** La 1,4-Dihidrazinoftalazina es un vasodilatador del grupo de las ftalazinas que descompone a 180 °C. Un gramo de esta sustancia es soluble en 300 ml de agua. Presenta en disolución dos equilibrios ácido-base de  $pK_a$  6,4 y 10,5, y puede ser extraída desde disoluciones acuosas alcalinas con disolventes orgánicos.

La dihidralazina junto con la 1(2H)-flazinona, la N(1-ftalazinil)-hidrazona del ácido pirúvico y/o la 3-metil-s-triazolo[3,4a]ftalazina, constituyen los productos más importantes de

descomposición de la hidralazina; dependiendo la velocidad de descomposición del pH del medio, de la temperatura y del tipo de anión presente.

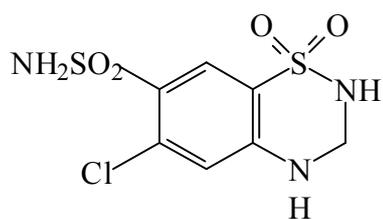
**Reserpina (RSP):** Alcaloide cristalino de color blanco que oscurece lentamente con la luz. Funde con descomposición a 264 °C. Prácticamente insoluble en agua y éter; un gramo es soluble en 2000 ml de etanol o en 6 ml de cloroformo.

Presenta un único equilibrio ácido-base de  $pK_a$  6,6. Sus disoluciones van adquiriendo lentamente color amarillo y exhiben pronunciada fluorescencia después de la adición de ácidos o por exposición a la luz.

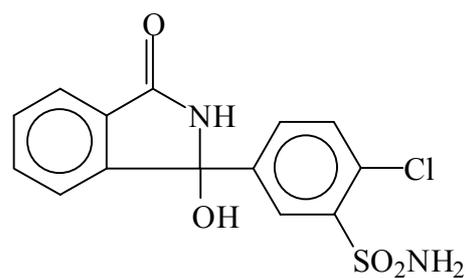
**Espironolactona (SP):** Antagonista de la aldosterona, prácticamente insoluble en agua, 1/400, soluble en 1/80 de etanol, 1/100 en éter y 1/3 de cloroformo.

**Fenobarbital (PB):** Anticonvulsivo de la familia de los barbitúricos, un gramo se disuelve en 1 ml de agua, y en 10 ml de alcohol; insoluble en éter y cloroformo. En disolución acuosa presenta dos equilibrios ácido-base cuyos  $pK_a$  son 7,3 y 11,8. Es muy estable frente a reactivos oxidantes como el  $KMnO_4$  o el  $K_2Cr_2O_7$ .

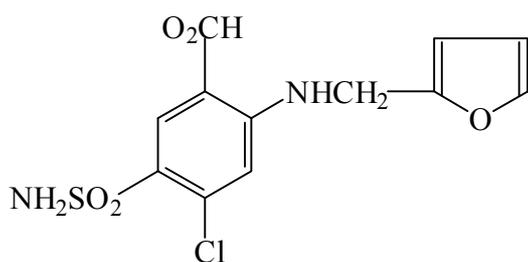
**Fenitoína (DPH):** Fármaco antiepiléptico de la familia de las hidantoínas, prácticamente insoluble en agua; soluble en disoluciones alcalinas, en 1/70 de etanol, 1/60 en éter y 1/500 de cloroformo. En disolución presenta un único equilibrio ácido/base de  $pK_a$  8,3.



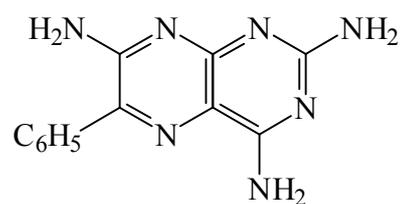
HCT



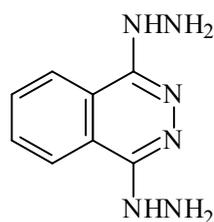
CLT



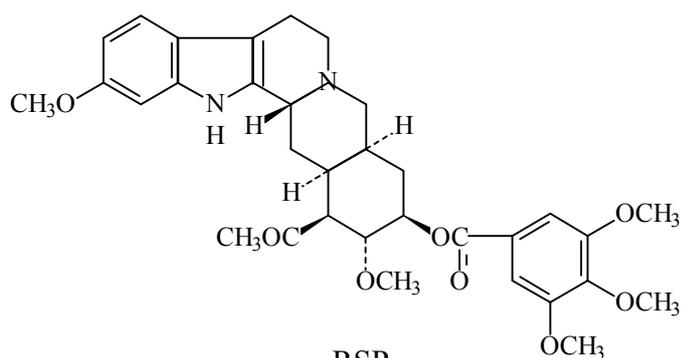
FUR



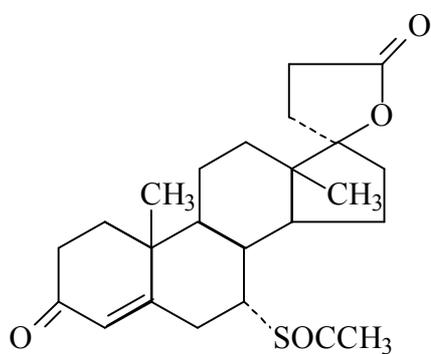
TRI



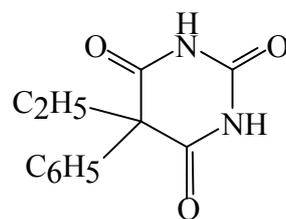
DHZ



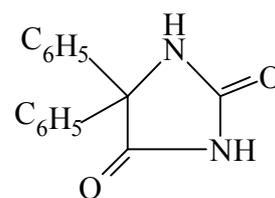
RSP



SP



PB



DPH

### I. 3. Revisión bibliográfica

Una revisión bibliográfica exhaustiva nos muestra que la determinación de antihipertensivos y antiepilépticos ha sido un tema muy estudiado, lo que es un índice de la importancia de la cuantificación de estos fármacos. Las muestras analizadas han sido mezclas sintéticas, preparados farmacéuticos y fluidos biológicos, y las técnicas empleadas muy variadas, espectrofotométricas, espectrofluorimétricas, polarográficas, inmunoensayos, cromatográficas y electroforéticas. El número de determinaciones por cada una de estas técnicas no se reparte equitativamente, se observa un mayor número de trabajos en las espectrofotométricas y cromatográficas, y pocas polarográficas, en los últimos años predominan las cromatográficas.

Como quiera que el número de fármacos estudiados es considerable, y que en la presente Tesis hemos hecho uso principalmente de la calibración multivariante aplicada a los datos espectrofotométricos o espectrofluorimétricos, nosotros haremos especial hincapié en los trabajos realizados por estas técnicas o que emplean algoritmos por regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS), por componentes principales (PCR), etc., para resolver mezclas en las que está presente alguno de los analitos objeto de esta Memoria.

#### ***Hidroclorotiazida (HCT)***

La determinación de HCT en distintas matrices se ha llevado a cabo frecuentemente por espectrofotometría UV-Vis<sup>7-11</sup>. Así, este fármaco ha sido determinado en mezclas con distintos diuréticos utilizando tanto la espectrofotometría derivada o el método de los espectros cocientes<sup>12-17</sup> como distintos métodos de calibración multivariante<sup>18-21</sup>. Dinç *et al.*<sup>19</sup> determinan cilazapril y HCT en tabletas haciendo uso de mínimos cuadrados clásico (CLS), mínimos cuadrados inverso (ILS), regresión en componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados parciales (PLS) con buenos resultados que contrastan con los obtenidos por HPLC; mientras que Kargosha *et al.*<sup>20</sup> aplican PLS y PCR a la determinación de triamtereno y HCT en preparados farmacéuticos; Martín *et al.*<sup>21</sup> comparan los resultados obtenidos aplicando calibración univariante y multivariante a los datos obtenidos en “batch” y mediante un sistema de inyección en flujo. También la quimioluminiscencia ha sido utilizada para la determinación de HCT; Ouyang *et al.*<sup>22</sup> aprovechan que HCT sensibiliza la reacción del Ce(IV) con Rodamina 6G, y Holeman *et al.*<sup>23</sup> utilizan la reacción de las tiazidas con el tris(2,2'-bipiridina) para su determinación.

Los métodos polarográficos han sido escasamente utilizados. No obstante, Kkolos *et al.*<sup>24</sup> describen la determinación de HCT y compuestos análogos por polarografía, no siendo necesaria una separación previa, y Martín *et al.*<sup>25</sup> proponen un método de determinación de HCT y amiloride en preparados farmacéuticos por polarografía de pulso diferencial aplicando PLS a los datos obtenidos electroquímicamente.

Con respecto al uso de técnicas cromatográficas para la determinación de HCT, son muchos los trabajos encontrados, siendo HPLC<sup>26-46</sup>, en combinación con distintos sistemas de detección, la técnica más utilizada. Así, se encuentran determinaciones que utilizan para la detección la espectrofotometría derivada<sup>26-31</sup>, sistemas electroquímicos<sup>42</sup> o detectores quimioluminiscentes<sup>38</sup>. La Cromatografía de Gases, aunque en menor extensión, también ha sido utilizada<sup>47-49</sup>. La electroforesis zonal<sup>50,51</sup> y la cromatografía micelar electrocinética<sup>52</sup> han sido empleadas en la determinación de este diurético en presencia de otros analitos; como ejemplo, cabría mencionar la determinación de HCT y rustin en hierbas medicinales chinas y en orina<sup>50</sup> por electroforesis zonal con detección amperométrica.

### ***Clortalidona (CLT)***

La espectrofotometría de derivadas ha sido útil para la determinación de este diurético en preparados farmacéuticos<sup>53,54</sup>. En uno de estos trabajos, Vertuschi *et al.*<sup>53</sup> determinan clortalidona en presencia de atenadol por cuarta derivada, demostrando que esta técnica es una buena opción para la determinación de analitos en matrices no excesivamente complejas.

Sin embargo, como mencionamos anteriormente, también los métodos cromatográficos son los que, en la actualidad, se utilizan preferentemente para la determinación de este fármaco, tanto en preparados farmacéuticos<sup>55</sup> como en fluidos biológicos<sup>56-66</sup>. La cromatografía de gases<sup>64-66</sup> ha sido utilizada con una frecuencia mucho menor que la cromatografía líquida, en la que destaca la utilización de sistemas de extracción en fase sólida para separar la CLT y determinarla en orina<sup>60</sup>, y el empleo de fases móviles micelares<sup>62,63</sup>.

### ***Furosemida (FUR)***

Para la determinación de FUR en preparados farmacéuticos se ha aplicado a la espectrofotometría convencional, tanto la calibración univariante, previa extracción sólido-líquido<sup>67</sup>, como la multivariante. Ferraro *et al.*<sup>68</sup> aplican PLS-1 a datos espectrofotométricos y determinan simultáneamente FUR y amilorida; también la reacción con el Pd<sup>2+</sup> con FUR ha

permitido la determinación de este último haciendo uso de métodos de análisis por inyección en flujo.

El hecho de que la FUR emita fluorescencia ha permitido la utilización de métodos espectrofluorimétricos para su determinación. Así, García *et al.*<sup>70</sup> han aplicado la fluorescencia sincrónica de ángulo variable a la determinación de FUR y triamtereno en mezclas, y Arnaud *et al.*<sup>71</sup> han estudiado las propiedades luminiscentes del complejo de este fármaco con el terbio en presencia de tritón X-100, proponiendo un método de determinación de FUR con un límite de detección de  $5 \cdot 10^{-10}$  M. Los métodos electroquímicos también han sido utilizados, Barroso *et al.*<sup>72</sup> la determinan en preparados farmacéuticos y orina haciendo uso de la polarografía de pulso diferencial.

Los métodos cromatográficos<sup>73-87</sup> son cada vez más utilizados para la determinación de FUR, encontrándose referencias que emplean sistemas de extracción en fase sólida<sup>73,76</sup>, que aprovechan la fluorescencia de este analito para llevar a cabo el análisis<sup>77,78</sup>, que utilizan detectores amperométricos<sup>76</sup> o fases móviles micelares<sup>79-81</sup>. La cromatografía de gases<sup>86,87</sup> y los métodos electroforéticos<sup>88-90</sup> hasta ahora han sido utilizados con menos frecuencia.

### ***Triamtereno (TRI)***

El TRI reacciona con distintos compuestos formando productos coloreados que permiten su determinación; así, con azul de bromofenol<sup>91</sup> origina un complejo extraíble en cloroformo que absorbe a 417 nm y permite su determinación. La espectrofotometría derivada con calibración por PLS-1<sup>92</sup> ha sido utilizada para la determinación simultánea de TRI y leucovorina en fluidos biológicos.

La acusada fluorescencia del triamtereno hace posible su determinación por métodos fluorimétricos; Murillo *et al.* proponen un método para la determinación de TRI en orina por fluorescencia sincrónica isopotencial, con un límite de detección de 5,43 ng/ml<sup>93</sup>, y resuelven la mezcla de TRI y amiloride aplicando PLS a los datos espectrofluorimétricos<sup>94</sup>. Domínguez-Vidal *et al.*<sup>95</sup> proponen un sistema espectrofluorimétrico en flujo continuo en fase sólida que permite la determinación de TRI.

Los métodos cromatográficos, especialmente HPLC, han sido ampliamente utilizados<sup>96-103</sup> para la determinación de TRI en orina y otros fluidos biológicos; en la mayoría de los casos se utilizan detectores de fluorescencia, llegando incluso a encontrarse métodos con procesamiento de la muestra on-line como el que proponen Oertel *et al.*<sup>101</sup>. La electroforesis<sup>104,105</sup> también ha resultado útil, describiéndose por primera vez un sistema con

detección fluorescente y excitación generada por láser en uno de los trabajos citados, González *et al.*<sup>104</sup>.

### ***Dihidralazina (DHZ)***

La DHZ ha sido mucho menos analizada que el resto de los analitos objeto de estudio en la presente memoria. Para su determinación se ha utilizado principalmente la espectrofotometría, ya sea por medida directa de la absorbancia<sup>106-108</sup> a la longitud de onda del máximo de absorción, o después de derivatizar con distintos reactivos como 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB)<sup>109</sup>, N-bromosuccinimida<sup>110</sup>, 2-hidroxi-1-naftaldehído<sup>111</sup>. Con algunos de estos reactivos, concretamente con FDNB, la reacción no es instantánea, por lo que se desarrolla un método cinético-espectrofotométrico con un sistema de inyección en flujo.

Con respecto a su determinación cromatográfica, son pocas las citas que se encuentran<sup>112-116</sup>, posiblemente debido a que las dos funciones hidrazina de la molécula conducen a importantes interacciones con los sitios polares de los soportes alquílicos, lo que conlleva a bajos tiempos de retención y picos con colas, problemas que pueden ser solucionados con la formación de pares iónicos o la utilización de soportes que posean los grupos hidroxilos desactivados.

### ***Reserpina (RSP)***

Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los diuréticos estudiados en la presente memoria, los métodos espectrofotométricos han sido poco utilizados para la determinación de este fármaco, y son los métodos espectrofluorimétricos, en los que la fluorescencia se genera por oxidación de la RSP a 3,4-didehidroreserpina utilizando distintos agentes oxidantes, los que se han propuesto con mayor frecuencia<sup>117-122</sup>. Así, Walsh *et al.*<sup>117</sup> utilizan, para la oxidación de la RSP, el hexamincobalto (III) en medio neutro, Aly *et al.*<sup>118</sup> emplean el 2-yodoxibenzoato en medio ácido, y Urbanyi *et al.*<sup>120</sup> llevan a cabo la oxidación con Vanadio (V). Otro procedimiento de obtener el producto fluorescente es por reacción fotoquímica<sup>120-123</sup> en presencia de acetona; estas reacciones se realizan, tanto en el método propuesto por Xu *et al.*<sup>120</sup>, que se aplica con buenos resultados a la determinación de RSP en preparados farmacéuticos y en orina, como en los que proponen Martínez Calatayud *et al.*<sup>121,122</sup> utilizando sistemas de inyección en flujo.

La RSP ha sido también determinada por polarografía<sup>124</sup> y por cromatografía, tanto de gases<sup>125,126</sup> como líquida<sup>127-132</sup>, empleando principalmente detectores fluorimétricos tras una

derivatización post-columna<sup>127,128</sup>, y con menor frecuencia otros tipos, como en el caso de Wang *et al.*<sup>129</sup>, que utilizan un detector electroquímico.

### ***Espironolactona (SP)***

La determinación de SP se ha llevado a cabo por numerosos métodos: polarográficos<sup>133</sup>, espectrofotométricos<sup>134-138</sup>, espectrofluorimétricos<sup>139</sup>, cromatográficos<sup>142-153</sup> y electroforéticos<sup>154</sup>. Martín *et al.*<sup>137</sup> determinan SP e hidroclorotiazida en preparados farmacéuticos aplicando la calibración univariante a los datos espectrofotométricos obtenidos de los espectros cocientes derivados, tanto en sistemas estáticos como dinámicos.

En los fluidos biológicos, la SP se metaboliza rápidamente, siendo la canrenona su principal metabolito. Por esta razón, es frecuente la determinación simultánea de ambos; una reacción común de estos dos analitos es la formación de trianona (coloreada y fluorescente) por la acción del ácido sulfúrico. Martín *et al.*<sup>138</sup> y Hernández *et al.*<sup>139</sup> proponen métodos de determinación simultánea de SP y canrenona por aplicación de PLS a los datos cinético-espectrofotométricos o cinéticos-espectrofluorimétricos, respectivamente.

Un somero análisis de las citas bibliográficas que hacen referencia a los métodos cromatográficos<sup>142-153</sup>, nos indica que aproximadamente el 90 % de los trabajos emplean la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, ocupando la cromatografía líquida micelar un lugar destacado, con un 30 %, aproximadamente, de las publicaciones. En la mayoría de estos trabajos se determina la SP en presencia de sus metabolitos, especialmente canrenona, en distintos fluidos biológicos.

### ***Fenobarbital (PB) y fenitoína (DPH)***

Con respecto a los agentes antiepilépticos, los métodos utilizados para su cuantificación han sido muchos y variados, desde los métodos clásicos, como alcalimetrías, iodometrías o argentometrías, que exigen una separación previa del analito a determinar, hasta las modernas técnicas de inmunoensayo.

La polarografía de pulso diferencial se ha aplicado a la determinación de PB y difenilhidantoína<sup>154</sup>, y de PB en presencia de n-metilfenobarbital y n-metoximtilfenobarbital<sup>155</sup> en suero sanguíneo. Lima *et al.*<sup>156</sup> han descrito la construcción de un electrodo de ión selectivo de PB, que aplican a su determinación en preparados farmacéuticos.

Las técnicas espectrofotométricas combinadas con la calibración multivariante también han sido utilizadas para la determinación de PB en presencia de otros analitos. Así,

Goicoechea *et al.*<sup>157</sup> utilizan estos métodos de calibración para determinar fenobarbital y fenitoína simultáneamente; Ni *et al.*<sup>158</sup> la determinan junto con acetaminofenol aplicando regresión en componentes principales (PLS) y redes neuronales (ANN) a los datos cinético-espectrofotométricos; y Boeris *et al.*<sup>159</sup> determinan conjuntamente fenobarbital, fenitoína y metilfenobarbital en preparados farmacéuticos utilizando PLS y PCR.

Con respecto a la DPH, la polarografía de pulso diferencial<sup>160</sup> y los electrodos de ion-selectivo<sup>161</sup> han sido utilizados para la determinación de este fármaco en mezclas y en preparados farmacéuticos; la espectrofotometría de derivadas también ha sido empleada para su determinación junto con fenitoína<sup>162</sup> en preparados farmacéuticos. Korany *et al.*<sup>163</sup> describen un método extractivo-espectrofotométrico para la determinación de DPH en preparados farmacéuticos y cápsulas, que consiste en la oxidación de DPH con una disolución de permanganato potásico, formación de un complejo del producto obtenido con dicitclohexano-24-crown-8, y posterior extracción con cloroformo-ciclohexano.

En la actualidad, los métodos más utilizados para la determinación de antiepilépticos son los cromatográficos<sup>164-175</sup>, electroforéticos<sup>176-187</sup>, y la técnica del inmunoensayo<sup>188-195</sup>.

**Bibliografía**

1. Florey, *Analytical profiles of drug substances*, Academic Press, INC., Florida, 1987.
2. The Merck Index, 10ª Edición, Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., 1983.
3. E.G.C. Clarke en *Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*, Vol. II, The Pharmaceutical Press, Londres, 1975.
4. Goodman y Gilman. “*Las bases farmacológicas de la terapéutica*”. Editorial Panamericana, 6ª edición, 1981.
5. Andres Goth. “*Farmacología médica. Principios y conceptos*”. Ediciones Doyma, 11ª edición, 1984.
6. M. Parissipoulou, V. Reizopoulou y P. Macheras, *Int. J. Pharm.*, **51**, 169, 1969.
7. I. Panderi y M. Paresipoulou, *Int. J. Pharm.*, **86**, 99, 1992.
8. G. Carlucci, G. Diginseppe y P. Mazzeo, *Int. J. Pharm*, **93**, 245, 1993.
9. N. Erk y F. Onur, *Anal. Lett.*, **29**, 1963, 1996.
10. N. Erk, *Anal. Lett.*, **32 (7)**, 1371, 1998.
11. N. Erk, *Anal. Lett.*, **35 (2)**, 283, 2002.
12. I. Alberó, V. Ródenas, S. Garcçia y C. Sánchez Pedreño, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29 (1-2)**, 299, 2002.
13. E. Dinç y O. Üstündag, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29 (1-2)**, 371, 2002.
14. N. Erk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27 (6)**, 901, 2002.
15. I.E. Panderi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21(2)**, 257, 1999.
16. N. Erk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **20 (1-2)**, 155, 1999.
17. C.V.N. Prasad, C. Parihar, K. Sunil y P. Parimoo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17 (4-5)**, 877, 1998.
18. M.C.F. Ferraro, P.M. Castellano y T.S. Kaufman, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30 (4)**, 1121, 2002.
19. E. Dinç y D. Baleanu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30 (3)**, 715, 2002.
20. K. Kargosha y A.H.M. Sarrafi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26 (2)**, 273, 2001.
21. E. Martín, O. Hernández, J.J. Arias y A.I. Jiménez, *Microchem. J.*, **56 (2)**, 207, 1997.

- 
22. J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J. Delanghe G. Van der weken y A.C. Calokerinos, *Talanta*, **46 (5)**, 961, 1998.
  23. J.A. Holeman y N.D. Danielson, *Anal. Chim. Acta*, **227 (1)**, 55, 1993.
  24. E. Kholos y J. Walker, *Anal. Chim. Acta*, **80 (1)**, 17, 1975.
  25. E. Martín, O.M. Hernández, A.I. Jiménez, J.J. Arias y F. Jiménez, *Anal. Chim. Acta*, **381 (2-3)**, 247, 1999.
  26. E. Satana, S. Altinay, N.G. Göger, S.A. Özkan y Z. Sentürk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25 (5-6)**, 1009, 2001.
  27. N. Erk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24 (4)**, 603, 2001.
  28. S. Saglic, O. Sagirli, S. Atmaca y L. Ersoy, *Anal. Chim. Acta*, **427 (2)**, 253, 2001.
  29. M. Kartal y N. Erk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19 (3-4)**, 477, 1999.
  30. A.F.M. El Walily, S.F. Belal, E.A. Heaba y A. El Kersh, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13 (7)**, 851, 1995.
  31. V. Ulvi y H. Keski-Hynnälä, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12 (7)**, 917, 1994.
  32. N. Erk, *J. Chromatogr. B*, **784 (1)**, 195, 2003.
  33. D.L. Hertzog, J.F. McCafferty, X. Fang, R.J. Tyrrel y R.A. Reed, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30 (3)**, 747, 2002.
  34. A. El-Gindy, A. Ashour, L.Abdel-Fattah y M.M. Shabana, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25 (5-6)**, 923, 2001.
  35. A. El-Gindy, A. Ashour, L.Abdel-Fattah y M.M. Shabana, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25 (2)**, 171, 2001.
  36. G. Carlucci, G. Palumbo, P. Mazzeo y M.G. Quaglia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23 (1)**, 185, 2000.
  37. E. Banoglu, Y. Ördan y O. Atay, *Il Farmaco*, **55 (6-7)**, 477, 2000.
  38. J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J. Delanghe, G. Van der weken, W.V. Daele, D.D. Keukeleire y A.M. García Campaña, *Anal. Chim. Acta*, **386 (3)**, 257, 1999.
  39. J. Niopas y A.C. Daftsios, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **25 (3)**, 487, 2002.
  40. E. Bonet-Domingo, J.R. Torres-Lapasioó, M.J. Medina-Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.

41. S. Carda-Broch, M.C. García Álvarez-Coque, E.F. Simó-Alfonso y J.S. Esteve-Romero, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.
42. K. Ritcher, R. Oertel y W. Kirch, *J. Chromatogr. A*, **729 (1-2)**, 293, 1996.
43. I. E. Panderi y M. Parissi-Poulou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21 (5)**, 1017, 1999.
44. E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández, G. Ramis-Ramos y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. B*, **582 (1-2)**, 189, 1992.
45. R.B. Miller y C. Amestoy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10 (7)**, 541, 1992.
46. M.J. Van der meer y L.W. Brown, *J. Chromatogr. B*, **423**, 351, 1987.
47. A. M. Lisi, R. Kazlauskas y G.J. Trout, *J. Chromatogr. B*, **581 (1)**, 57, 1992.
48. D. Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M.A. García, C. Rodríguez y R. Cortes, *J. Chromatogr. A*, **683 (1)**, 195, 1994.
49. A.M. Lisi, G.J. Trout y R. Kazlauskas, *J. Chromatogr. B*, **563 (2)**, 257, 1991.
50. Q. Wang, F. Dinç, H. Li, P. He y Y. Fang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30 (5)**, 1507, 2003.
51. S. Hillaert, K. De Grauwe y W. Van der Bossche, *J. Chromatogr. A*, **924 (1-2)**, 439, 2001.
52. M.G. Quaglia, E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo y S. Fanali, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29 (6)**, 981, 2002.
53. C. Vetuschi y G. Ragno, *Int. J. Pharm.*, **65 (3)**, 177, 1990.
54. D. Bonazzi, R. Gotti, V. Andrisano y V. Cauniri, *Farmaco*, **51 (11)**, 733, 1996.
55. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11 (8)**, 711, 1993.
56. P.J.M. Guelen, A.M. Baars y T.B. Vree, *J. Chromatogr. B*, **181**, 479, 1980.
57. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasioó, J.S. Esteve Romero, M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, **893 (2)**, 321, 2000.
58. R. Herráez-Hernández y P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. B*, **740 (2)**, 169, 2000.
59. C. Giachetti, A. Tenconi, S. Lanali y G. Zanolò, *J. Chromatogr. B*, **698 (1-2)**, 187, 1997.
60. C. Salvalor Salado y L.E. Vera Avila, *J. Chromatogr. B*, **690 (1-2)**, 195, 1997.
61. P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández y A. Sevillano-Cabeza, *J. Chromatogr. B*, **612 (2)**, 245, 1993.

- 
62. E. Bonet-Domingo, J.R. Torres-Lapasioó, J.J. Medina-Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.
63. E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández, G. Ramis Ramos y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. B*, **582 (1-2)**, 189, 1992.
64. D. Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M.A. García, C. Rodríguez, A.F. Rodríguez y R. Cortes, *J. Chromatogr. A*, **683 (1)**, 195, 1994.
65. A.M. Lisi, R. Kazlauskas y G.J. Trout, *J. Chromatogr. B*, **581 (1)**, 57, 1992.
66. F.Y. Tsai, L.F. Lui y B. Chang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9 (10-12)**, 1069, 1991.
67. P.P. Shirke, V.A. Tamhane, M.A. Kulkarni, M.K. Patel, V.B. Tirodkar, P.D. Sethi, *Ind. Drugs*, **31 (10)**, 494, 1994.
68. M.C.F. Ferraro, P.M. Castellano, T.S. Kaufman, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56 (3)**, 443, 2001.
69. M.S. García, C. Sánchez-Pedereño, M.I. Albero y V. Ródenas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15 (4)**, 453, 1997.
70. F. García-Sánchez, A. Fernández Gutiérrez y C. Cruces Banco, *Anal. Chim. Acta*, **306 (2-3)**, 313, 1995.
71. N. Arnaud y J. Georges, *Anal. Chim. Acta*, **476 (1)**, 149, 2003.
72. M.B. Barroso, R.M. Alonso y R.M. Jiménez, *Anal. Chim. Acta*, **305**, 332, 1995.
73. T. Okuda, K. Yamashita y M. Motohashi, *J. Chromatogr. B*, **682 (2)**, 343, 1996.
74. P. Campíns-Falcó, R. Herraiz-Hernández y A. Sevillano-Cabeza, *Anal. Chim. Acta*, **270 (1)**, 39, 1992.
75. J.S. Sidhu y B.G. Charles, *J. Chromatogr. B*, **612 (1)**, 161, 1993.
76. M.B. Barroso, R.M. Jiménez, R.M. Alonso y E. Ortiz, *J. Chromatogr. B*, **675 (2)**, 303, 1996.
77. T.B. Vree, M. Van den Biggelaar-Martea y C.P. W.G.M. Verwey-van Wissen, *J. Chromatogr. B*, **655 (1)**, 53, 1994.
78. I. Robieux, P. Aita, R. Sorio, G. Toffoli y M. Bolocchi, *J. Chromatogr. B*, **686 (1)**, 35, 1996.
79. E. Bonet-Domingo, J.R. Torres-Lapasioó, M.J. Medina-Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.
-

80. S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **375 (1-2)**, 143, 1998.
81. S. Carda-Broch, J. Esteve-Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23 (5)**, 803, 2000.
82. M. E. Abdel-Hamid, *Il Farmaco*, **55 (6-7)**, 448, 2000.
83. C.D. Mills, C. Whitworth, L.P. Rybak y C.M. Henley, *J. Chromatogr. B*, **701 (1)**, 65, 1997.
84. H.S. Abou-Auda, M.J. Al-Yamani, A.M. Morad, A. Bawazir, S.Z. Khan y K.I. Al-Khamis, *J. Chromatogr. B*, **710(1-2)**, 121, 1998.
85. A.A. Nava Ocampo, E.Y. Velásquez Armenta, M. Reyes Pérez, E. Ramírez López y M. Ponce Monter, *J. Chromatogr. B*, **730 (1)**, 49, 1999.
86. D. Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M.A. García, C. Rodríguez, A.F. Rodríguez y R. Cortes, *J. Chromatogr. A*, **683 (1)**, 195, 1994.
87. A.M. Lisi, R. Kazlauskas y G.J. Trout, *J. Chromatogr. B*, **581 (1)**, 57, 1992.
88. P.D. Lalljie, M.B. Barroso, D. Steenackers, R.M. Alonso, R.M. Jiménez y P. Sandra, *J. Chromatogr. B*, **688 (1)**, 71, 1997.
89. M.G. Quaglia, E. Bossú, C. Dell'Aquila y M. Guidotti, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15 (8)**, 1033, 1997.
90. J. Caslavská y W. Thormann, *J. Chromatogr. B*, **770 (1-2)**, 207, 2002.
91. N.A. El Ragehy, S.S. Abbas y E. El Khateeb, *Anal. Lett.*, **28 (10)**, 1799, 1995.
92. I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, F. Salinas López y M.J. Rodríguez Gómez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27 (2)**, 81, 2002.
93. J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina y P. Fernández López, *Anal. Chim. Acta*, **326 (1-3)**, 117, 1996.
94. J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina y P. Fernández López, *Anal. Chim. Acta*, **449 (1-2)**, 179, 2001.
95. A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales y A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28 (3-4)**, 721, 2002.
96. S.F. Cooper, R. Massé y R. Dugal, *J. Chromatogr. B*, **489 (1)**, 65, 1989.
97. E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández, G. Ramis Ramos y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. B*, **582 (1-2)**, 189, 1992.

98. E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11(8)**, 711, 1993.
99. E. Bonet Domingo, J.R. Torres Lapasió, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.
100. K. Richter, R. Oertel y W. Kirk, *J. Chromatogr. A*, **729 (1-2)**, 293, 1996.
101. R. Oertel, K. Richter, T. Gramatté y W. Kirch, *J. Chromatogr. A*, **797 (1-2)**, 203, 1998.
102. S. Carda Broch, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **375 (1-2)**, 143, 1998.
103. S. Carda Broch, J.R. Torres Lapasió, J.S. Esteve Romero y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Chromatogr. A*, **893 (2)**, 321, 2000.
104. E. González, A. Becerra y J.J. Laserna, *J. Chromatogr. B*, **687 (1)**, 145, 1996.
105. C. Horstkötter, S. Kober, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler y G. Blaschke, *J. Chromatogr. B*, **769 (1)**, 107, 2002.
106. P. Issopoulous, *Int. J. Pharm.*, **61**, 261, 1990.
107. H. Perry, *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 566, 1953.
108. A.F. Yossef, S.A. Ibrahim y S.R. Elshabouri, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 116, 1977.
109. C.A. Georgiou, M.A. Koupparis y T.P. Hadjiioannou, *Talanta*, **38 (7)**, 689, 1991.
110. S.A. Halvatzis, M.M. Tomotheou-Potamia y T.P. Hadjiannou, *Anal. Chim. Acta*, **272 (2)**, 251, 1993.
111. G. Pous Miralles, R. García Domenech, J. Mañes Vinuesa y J. Marí Buigues, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11 (8)**, 647, 1993.
112. A.R. Waller, L.F. Chasseaud y T. Taylor, *J. Chromatogr. A*, **173 (1)**, 202, 1979.
113. D.B. Jack, S. Dean, M.J. Kendall y S. Laughler, *J. Chromatogr. A*, **196 (1)**, 189, 1980.
114. P.A. Reece, I. Cozamanis y R. Zacest, *J. Chromatogr. B*, **225 (1)**, 151, 1981.
115. P.H. Degen, S. Brechbühler, W. Schneider y P. Zbinden, *J. Chromatogr. B*, **233 (1)**, 375, 1982.
116. C. Laugel, P. Chaminade, A. Baillet y D. Ferrier, *J. Chromatogr. A*, **686 (2)**, 344, 1994.
117. M.I. Walash, F. Belal y F.A. Aly, *Talanta*, **35 (9)**, 731, 1988.
118. F.A. Aly, Al El-Brashy y F. Belal, *Anal. Chim. Acta*, **291 (1-2)**, 141, 1994.

119. T. Urbanyi y A. O'Connell, *Anal. Chem.*, **44 (3)**, 565, 1972.
120. J.G. Xu, H.P. Chen, X.Q. Guo y Y.B. Zhao, *Anal. Chim. Acta*, **302 (2-3)**, 207, 1995.
121. J. Martínez Calatayud y C. Gómez Benito, *Anal. Chim. Acta*, **245**, 101, 1991.
122. S.R. Varma, J. Martínez Calatayud y H. Mottola, *Anal. Chim. Acta*, **233**, 235, 1990.
123. H. Chen y Q. He, *Talanta*, **53 (2)**, 463, 2000.
124. J.C. Schaar y D.E. Smith, *J. Electroanal. Chem.*, **100**, 145, 1979.
125. G. Settimj, L. Disimone y M.R. del Giudice, *J. Chromatogr. A*, **116 (2)**, 263, 1976.
126. S.E. Khayyal, M.M. Ayad y A.N. Girgis, *J. Chromatogr. A*, **285**, 495, 1984.
127. J.R. Lang, I.L. Honigberg y J.T. Stewart, *J. Chromatogr. A*, **252**, 288, 1982.
128. J.R. Lang, J.T. Stewart y I.L. Honigberg, *J. Chromatogr. A*, **264**, 144, 1983.
129. J. Wang y M. Bonakdar, *J. Chromatogr. B*, **382**, 349, 1986.
130. P. Duez, S. Chamart, M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastré, M. Hanocq y L. Molle, *J. Chromatogr. A*, **356**, 334, 1986.
131. H.L. Rau, A.R. Aroor y P.G. Rao, *Ind. Drugs*, **28**, 157, 1990.
132. J. Ke, M. Yancey, S. Zhang, S. Lowes y J. Jenion, *J. Chromatogr. B*, **742 (2)**, 369, 2000.
133. Z. Fehér, G. Horvai, G. Nagy, Z. Niegreis, K. Toth y E. Pungor, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 41, 1983.
134. F. Behal, *Microchim. Acta*, **107 (1-2)**, 11, 1992.
135. S.V. Erram, H.P. Tipnis, *Ind. Drugs*, **30 (11)**, 555, 1993.
136. Z. Nowakowska, *Farm. Pol.*, **45 (7)**, 454, 1989.
137. E. Martín, O. Hernández, J.J. Arias y A.I. Jiménez, *Microchem. J.*, **56**, 207, 1997.
138. E. Martín, A.I. Jiménez, O. Hernández, F. Jiménez y J.J. Arias, *Talanta*, **49 (1)**, 143, 1999.
139. O. Hernández, E. Martín, F. Jiménez, A.I. Jiménez y J.J. Arias, *Analyst*, **125**, 119, 2000.
140. J. Chamberlain, *J. Chromatogr. A*, **55 (2)**, 249, 1971.
141. J. Van der Merwe, D.G. Müller y E.C. Clark, *J. Chromatogr.*, **171**, 519, 1979.
142. G.B. Neurath y D. Ambrosius, *J. Chromatogr. B*, **163 (2)**, 230, 1979.
143. De Croo, W. Van der Bossche y P de Moerloose, *J. Chromatogr. A*, **329**, 422, 1985.

- 
144. W.P.M. Overdiek, W.A.J.J. Hermens y F. W.H.M. Merkus, *J. Chromatogr. B*, **341**, 279, 1985.
  145. J.H. Sherry, J.P. O'Donnell y H.D. Colby, *J. Chromatogr. B*, **374**, 183, 1986.
  146. L.S. Jackson y J.E.H. Stafford, *J. Chromatogr. B*, **428**, 377, 1988.
  147. F.Cooper, R. Massé y R. Dugal, *J. Chromatogr. B*, **489**, 65, 1989
  148. F. Varin, T.M. Tu, F. Benoît, J.P. Villeneuve y Y. Theorêt, *J. Chromatogr. B*, **574 (1)**, 57, 1992.
  149. E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11 (8)**, 711, 1993.
  150. E. Bonet Domingo, J.R. Torres Lapasióo, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287 (3)**, 201, 1994.
  151. R. Herráez Hernández, E. Soriano Vega y P. Campíns Falcó, *J. Chromatogr. B*, **658 (2)**, 303, 1994.
  152. A. Jankowski, A. Skorek-Jankowska y H. Lamparczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14 (8-10)**, 1359, 1996.
  153. M.L. Riekkola y J.H. Jumppasen, *J. Chromatogr. A*, **735 (1-2)**, 151, 1996.
  154. M.A. Brooks, J.A.F. de Silva y M.R. Kackman, *Anal. Chim. Acta*, **64 (2)**, 165, 1973.
  155. M. Romer, L.G. Donaruma y P. Zuman, *Anal. Chim. Acta*, **88 (2)**, 261, 1977.
  156. J.L.F.C. Lima, M. Conceição, B.S.M. Montenegro y A.M. Roque da Silva, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8 (8-12)**, 701, 1999.
  157. H.C. Goicoechea y A.C. Oliveri, *Talanta*, **47 (1)**, 103, 1998.
  158. Y. Ni, C. Liu y S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, **419 (2)**, 185, 2000.
  159. M.S. Boeris, J.M. Luco y R.A. Olsina, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24 (2)**, 259, 2000.
  160. O.A. Razak, A.A. Gazy, A.M. Wahbi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28 (3-4)**, 613, 2002.
  161. V.V. Cosofre y R.P. Buck, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **4 (1)**, 45, 1986.
  162. C.V.N. Prasad, A. Gautam, V. Bharadwaj y P. Parimoo, *Talanta*, **44 (5)**, 917, 1997.
  163. M.A. Korany, M.J. Bedair y R.S. Haggag, *Talanta*, **46 (1)**, 9, 1998.
  164. S.J. Rainbow, C.M. Dawson y T.R. Tickner, *J. Chromatogr. B*, **527**, 389, 1990.

165. H. Liu, M. Delgado, L.J. Forman, C.M. Eggers y J.L. Montoya, *J. Chromatogr. B*, **616 (1)**, 105, 1993.
166. S.G. Paibir y W.H. Soine, *J. Chromatogr. B*, **691 (1)**, 111, 1997.
167. V. Ferranti, C. Chabenat, S. Menager y O. Lafont, *J. Chromatogr. B*, **718 (1)**, 199, 1998.
168. M. Moriyama, S. Yamashita, H. Domoto, K. Furuno, H. Araki y Y. Gomita, *J. Chromatogr. B*, **732 (1-2)**, 301, 1999.
169. Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas y M.J. Medina Hernández, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21 (2)**, 331, 1999.
170. J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic y S. Vladimirov, *Il Farmaco*, **57 (9)**, 709, 2002.
171. E. Bugamelli, C. Sabbioni, R. Mandrioli, E. Kenndler, F. Albani y M.A. Raggi, *Anal. Chim. Acta*, **472 (1-2)**, 1, 2002.
172. M.T. Maya, A.R. Farinha, A.M. Lucas y J.A. Morais, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10 (10-12)**, 1001, 1992.
173. M.J. Cwik, M. Liang, K. Deyo, C. Andrews y J. Fisher, *J. Chromatogr. B*, **693 (2)**, 407, 1997.
174. M.M. Bhatti, G.D. Hanson y L.S. Schultz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16 (7)**, 1233, 1998.
175. G.L. Lensemeyer, B.E. Gidal, D.A. Wiebe, *Ther. Drug Monit.*, **19 (3)**, 292, 1997.
176. M.H. Nelson, A.K. Birnbaum, P.J. Nyhus y R.P. Remmel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17 (8)**, 1311, 1998.
177. I.C. Bhor, S.T. Patil y M. Sundaresan, *Talanta*, **48 (5)**, 1179, 1999.
178. S. Bardin, J.C. Ottinger, A.P. Breau y T.J. O'Shea, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23 (2-3)**, 573, 2000.
179. F. Guan, C.E. Uboh, L.R. Soma, E.K. Birks, D. Teleis, J.A. Rudy, A.O. Watson y D.S. Tsang, *J. Chromatogr. B*, **746 (2)**, 209, 2000.
180. S. N. Muchoni, B.R. Ogutu, C.R.J.C. Newton y G.O. Kokwaro, *J. Chromatogr. B*, **761 (2)**, 255, 2001.
181. A. Berezcki, A. Tolokan, G. Horvai, V. Horváth, F. Lanza, A.J. may y B. Sellergren, *J. Chromatogr. A*, **930 (1-2)**, 31, 2001.
182. H. Levert, P. Odou y H. Robert, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28 (3-4)**, 517, 2002.

183. W. Thormann, P. Meier, C. Marcolli y F. Binder, *J. Chromatogr. A*, **545 (2)**, 445, 1991.
184. K.J. Lee y G.S.H.N.J. Kim y D.C. Moon, *J. Chromatogr. A*, **608 (1-2)**, 243, 1992.
185. A. Haque, X. Xu y J.T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21 (5)**, 1063, 1999.
186. K. Makino, Y. Goto, M. Sueyasu, K. Futagami, Y. Kataoka y R. Oishi, *J. Chromatogr. B*, **695 (2)**, 417, 1997.
187. A. Bretnall y G.S. Clarke, *J. Chromatogr. A*, **716 (1-2)**, 49, 1995.
188. F.V. Brighy y L.B. McGown, *Talanta*, **32 (1)**, 15, 1985.
189. H. Sayo, H. Hatsumura y M. Hosokawa, *J. Chromatogr. B*, **426**, 449, 1988.
190. A.L. Bordes, B. Limoges, P. Brossier y C. Degrand, *Anal. Chim. Acta*, **356 (2-3)**, 195, 1997.
191. J. Astles y W.G. Miller, *Sensor Actuat. B Chem.*, **11 (1-3)**, 73, 1993.
192. A.L.G. La Salle, B. Limoges, R. Rapicault, C. Degrand y P. Brossier, *Anal. Chim. Acta*, **311 (3)**, 301, 1995.
193. A. Bereczki y V. Horváth, *Anal. Chim. Acta*, **391 (1)**, 9, 1999.
194. B.L. Zhang, M.C. Wang, W.B. Chang, Y.X.C.I., *Fenxi Huaxue*, **25 (9)**, 993, 1997.
195. L. Locascio-Brown, L. Martynova, R.G. Chistensen, G. Horvai, *Anal. Chem.*, **68 (9)**, 1665, 1996.

**CAPÍTULO II**  
**FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

---



En este capítulo se establecen los fundamentos teóricos de los métodos de calibración que se aplicarán a la resolución de mezclas de analitos en capítulos posteriores.

Un aspecto crucial del análisis químico es la obtención y posterior tratamiento de los datos analíticos. La forma de llevar a cabo este tratamiento depende del tipo de datos medidos, de la información analítica que se puede extraer de ellos, y del conocimiento previo que se tenga del sistema que es analizado.

Una señal, medida como función de una única variable, tiempo o longitud de onda, es llamada señal univariante (un cromatograma o un espectro). Obviamente, la cantidad de información que se puede extraer de una señal univariante es muy limitada. Por ejemplo, en cromatografía de líquidos usando un detector con una única longitud de onda, no se puede obtener información fiable sobre el número de componentes eluidos en un perfil de pico complejo, ni es posible identificar un componente desconocido.

Estas limitaciones han sido soslayadas con la introducción de detectores de imágenes (espectrofotómetros de diodos en fila) y de los llamados métodos híbridos (acoplamiento de un

cromatógrafo de líquidos con un detector de diodos en fila, cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas como detector, etc.). Estos sistemas permiten medir los datos como una función de dos variables, por ejemplo tiempo y longitud de onda, obteniéndose, en definitiva una tabla de datos o señal multivariante.

No debe perderse de vista que el análisis detallado de la relación entre la concentración de un analito y la señal analítica es la clave para decidir sobre las posibilidades cuantitativas de un procedimiento de análisis químico, esta etapa es la que recibe el nombre de calibración. Así, se puede decir que mediante la calibración se determina la relación matemática existente entre las variables. Esta relación puede ser de tres tipos:

- a) **funcional**, cuando no hay errores de tipo aleatorio en ninguna de las variables determinadas.
- b) **de regresión**, cuando una de las variables lleva asociado un error de tipo aleatorio y la otra se considera exacta.
- c) **de correlación**, cuando ambas variables llevan asociado un error de tipo aleatorio.

Durante el proceso de calibración generalmente se considera que la dependencia entre las variables es de regresión, donde la variable que se encuentra exenta de error aleatorio es la concentración (variable independiente) y se asume que la respuesta analítica en estudio (variable dependiente) lleva asociado error aleatorio, originando una distribución normal o gaussina de las mismas.

## II. 1. Calibración univariada

### *Modelo matemático*

La calibración univariada estudia la relación existente entre dos variables,  $x$  e  $y$ . Donde  $x$  representa la variable independiente o predictora (concentración de los analitos) e  $y$  es la variable dependiente o respuesta analítica. De forma general puede decirse que la relación entre ambas viene dada por una ecuación del tipo

$$y = f(b_0, b_1, \dots, b_k) \quad (2.1)$$

donde  $b_k$  son los parámetros desconocidos que se desea estimar a partir de los datos experimentales ( $x_n, y_n$ ) en el proceso de calibración. Para ello, se puede realizar un ajuste por mínimos cuadrados siempre que se reúnan los siguientes requisitos:

- a) la relación entre la variable predictora  $x$ , y la respuesta analítica  $y$ , debe ser lineal en el rango de aplicabilidad.
- b) la variable predictora no debe ser aleatoria. Es decir, está medida sin error o su error aleatorio es despreciable frente al de la respuesta, o lo que es lo mismo, los únicos errores en los pares de datos ( $x_n, y_n$ ) se encuentran en la variable dependiente. Si la variable predictora está sujeta a error, éste ha de ser mucho menor que los relacionados con la variable dependiente. Es decir, las varianzas asociadas a la variable predictora  $x$ , y a las respuestas analíticas  $y$ , han de cumplir:  $\sigma_x^2 = 0$  ó  $\sigma_x^2 \ll \sigma_y^2$ . Lo que llevado a la práctica significa que el error cometido en la preparación de los patrones ha de ser despreciable frente al error asociado a la medida instrumental.
- c) Los errores en la respuesta deben seguir distribuciones normales, independientes, igualmente distribuidas y de media cero:  $\sigma_y^2 \{N(0, \sigma^2)\}$ .
- d) Las varianzas en los valores de las respuestas instrumentales han de ser estadísticamente iguales:  $\sigma_{y_1}^2 = \sigma_{y_2}^2 = \dots = \sigma_{y_n}^2 = \sigma_{y_i}^2$ , o sea, ha de haber homoscedasticidad.

Por lo tanto, para realizar una calibración mediante el método de mínimos cuadrados deben verificarse las condiciones de linealidad, aleatoriedad, normalidad, independencia y

homoscedasticidad. En este caso se pueden calcular por mínimos cuadrados los parámetros  $b_k$  de la función de calibración:

$$y_j = b_0 + b_1 x + e_j \quad (2.2)$$

donde  $y_j$  es la respuesta instrumental,  $x$  es la concentración de analito,  $b_0$  y  $b_1$  son los parámetros del modelo lineal simple, y  $e_j$  es el error aleatorio asociado a la respuesta, lo que nos indica que la respuesta analítica es proporcional a la cantidad de analito que la genera más una señal de fondo  $b_0$ .

*Estimación de los parámetros del modelo por ajuste de mínimos cuadrados*

Partiendo de  $n$  observaciones  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$  se pueden estimar los valores desconocidos  $b_0$  y  $b_1$  del modelo mediante los valores  $\hat{b}_0$  y  $\hat{b}_1$ , estimaciones correspondientes a la línea que mejor se ajusta a los puntos experimentales. Dicha línea es la que minimiza la suma de los cuadrados de los residuos, definida como:

$$\sum_{j=1}^n e_j^2 = \sum_{j=1}^n [y_j^2 - (b_0 + b_1 x_j)]^2 \quad (2.3)$$

Las componentes  $e_j$  representan las diferencias entre los valores  $y_j$  experimentales y los valores  $\hat{y}_j$  predichos por el modelo ( $\hat{y}_j = \hat{b}_0 + \hat{b}_1 x_j$ ).

La condición de mínimos comporta la resolución del sistema de ecuaciones que se deriva de la siguiente expresión

$$\frac{d}{db_0} \sum_{j=1}^n e_j^2 = \frac{d}{db_1} \sum_{j=1}^n e_j^2 = 0 \quad (2.4)$$

Siempre que el modelo sea lineal la ecuación planteada tiene solución única independientemente del número de parámetros implicados. La pendiente y la intersección con el origen estimados vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$\hat{b}_0 = \frac{\sum y_j \sum x_j^2 - \sum x_j \sum x_j y_j}{n \sum x_j^2 - (\sum x_j)^2} \quad (2.5)$$

$$\hat{b}_1 = \frac{n \sum x_j y_j - \sum x_j \sum y_j}{n \sum x_j^2 - (\sum x_j)^2} \quad (2.6)$$

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la intersección con el origen, derivados de los errores asociados a las respuestas analíticas, hacen que tanto una como otra no sean valores únicos y “verdaderos”, sino los valores más probables dentro de un intervalo. Por tanto, resulta conveniente la utilización de parámetros estadísticos que reflejen la presencia y magnitud de los errores en dicha respuesta, como son:

- a) La estimación de la desviación estándar de la ordenada en el origen dada por la expresión:

$$s_{b_0} = s \sqrt{\frac{\sum x_j^2}{n \sum (x_j - \bar{x})^2}} \quad (2.7)$$

donde  $s$  es la estimación de  $\sigma_c^2$ .

$$s = s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_j - \hat{y}_j)^2}{n - 2}} \quad (2.8)$$

$\bar{x}$  es la media de los valores de concentración, e  $\hat{y}_j$  son los valores de las respuestas, calculadas de acuerdo con el modelo.

- b) La estimación de la desviación estándar de la pendiente viene dada por la expresión:

$$s_{b_1} = \frac{s}{\sqrt{\sum (x_j - \bar{x})^2}} \quad (2.9)$$

La imprecisión asociada a la estimación de  $\hat{b}_0$  y  $\hat{b}_1$  implica que la recta de regresión no es única. Por el contrario, lo que se obtiene es la siguiente banda de regresión:

$$y = \hat{b}_0 + \hat{b}_1 x \pm t_{n-2, \alpha} s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{j=0}^n (x_j - \bar{x})^2}} \quad (2.10)$$

Idealmente, la recta tendría que pasar por el origen, ya que cuando la concentración de analito es cero, no tendría que haber respuesta significativa. Esto implicaría unas condiciones de trabajo en las que el ruido de fondo, experimental e instrumental, así como cualquier tipo de interferencia, no tuvieran ningún efecto sobre la señal analítica tratada.

### *Validación del modelo*

Una vez elegido el modelo de regresión y determinados sus parámetros mediante los datos experimentales es inexcusable validar (o invalidar) el modelo propuesto. Cuanto más cuidadoso sea el analista en esta etapa, más solidez tendrán las conclusiones químicas que puedan derivarse de su propuesta.

La validación del modelo es esencialmente una verificación de que tanto la parte determinista del mismo ( $b_0 + b_1x$ ) como la aleatoria ( $e$ ) son compatibles con los datos experimentales.

A la hora de llevar a cabo la validación del modelo, tendremos que comprobar que se verifican las hipótesis relativas del mismo para los errores en la variable respuesta. Recordemos que, si el modelo carece de sesgo, los  $n$  residuos del ajuste  $e_j = y_j - (b_0 + b_1x_j)$  son  $n$  estimaciones de dichos errores aleatorios, y por lo tanto han de ser compatibles con las hipótesis de aleatoriedad, independencia, normalidad y homoscedasticidad.

Aunque estas verificaciones se llevan a cabo mediante los tests de hipótesis correspondientes, suelen ser de gran utilidad, por su simplicidad, las representaciones gráficas. En estas representaciones pueden observarse pautas típicas que no sólo alertan sobre el posible fallo de las hipótesis sino que son de ayuda para decidir sobre las acciones a tomar para restablecerlas.

En cuanto a los métodos inferenciales, para comprobar la verificación de la aleatoriedad e independencia suele utilizarse el test de Durbin-Watson<sup>1</sup>; para la normalidad, el test de Kolmogoroff o el de la  $\chi^2$ <sup>2</sup> y para la homoscedasticidad o igualdad de varianzas, los tests de Barlett y Cochran<sup>1</sup>.

### *Etapa de predicción*

Una vez efectuada la regresión y debidamente validada, el siguiente paso es el cálculo de valores de la variable independiente,  $\hat{x}$ , a partir de la respuesta instrumental  $y'$ , por interpolación inversa

$$\hat{x} = \frac{y' - b_0}{b_1} \quad (2.11)$$

Debido a la existencia de intervalos de confianza tanto para la pendiente como para la ordenada en el origen, es lógico pensar que este futuro valor de concentración no es un valor

único, sino que tiene asignado, de igual manera, un intervalo de confianza, intervalo que viene dado como:

$$\bar{x} \pm t_{n-2,\alpha} \frac{s}{b_1} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y' - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_j - \bar{x})^2}} \quad (2.12)$$

siendo N el número de medidas repetidas de la respuesta  $y'$  para la misma muestra de concentración desconocida  $\hat{x}$ .

Quizás sea útil recordar que este intervalo es teórico, es decir, se construye antes de realizar ninguna medida, dicho de otra manera, recoge toda la información sobre la relación concentración-respuesta y proporciona una estimación de la incertidumbre que se ha de esperar en el futuro bajo las mismas condiciones.

Dado que el analista está interesado en poseer intervalos de confianza pequeños, tendrá que hacer mínimos los términos que se encuentran en el numerador de la ecuación 2.12 y máximos los de denominador de dicha expresión. Así, interesa que el valor de  $s$ , desviación estándar de los residuos, sea lo menor posible; y para ello, habrá que tener en cuenta la existencia de puntos discrepantes durante la calibración, puesto que éstos aumentan considerablemente el valor de  $s$ . De igual forma resulta interesante que se lleven a cabo el máximo número de repeticiones del valor de la respuesta, N, que se establezca el modelo matemático con el mayor número posible de patrones de calibración, n, y que se tengan rectas de calibrado con valores elevados de  $\hat{b}_1$  (es decir, rectas de calibrado de elevada sensibilidad), así como que se haga máxima la expresión  $\sum (x_j - \bar{x})^2$ . Este último concepto está relacionado con el establecimiento de la recta de calibración mediante el uso de patrones  $x_j$ ; obtener valores elevados de  $\sum (x_j - \bar{x})^2$  significa que es mejor utilizar patrones que están lejos del valor medio del intervalo de calibración, lo que equivale a decir que los patrones de calibración que se encuentran en la zona media de este intervalo no contribuyen significativamente a la obtención de intervalos de confianza reducidos, del valor predicho  $\hat{x}$ .

### *Límite de detección*

Para caracterizar un procedimiento analítico es importante establecer su límite de detección (LD). La IUPAC proporciona la siguiente definición: “el límite de detección, expresado como la concentración,  $c_L$ , o cantidad  $q_L$ , se deriva de la menor medida,  $y_L$ , que puede ser detectada con una certidumbre razonable para un determinado procedimiento analítico”<sup>3</sup>, para matizar aún más la cuestión podría decirse que “límite de detección es la menor

concentración que se puede determinar estadísticamente diferente de un blanco analítico”<sup>4</sup>, con esta nueva definición se introduce un criterio objetivo y una metodología perfectamente definida para evaluar la “certidumbre razonable”.

Es posible plantear el problema del límite de detección, desde un punto de vista rigurosamente matemático, con un test de hipótesis teniendo en cuenta la relación señal-concentración y sin necesidad de disponer del blanco. El procedimiento consta de dos etapas, en la primera se determina una relación lineal entre la concentración y la señal garantizándose cuidadosamente la hipótesis de mínimos cuadrados. La segunda etapa consiste en considerar el límite de detección como un test de hipótesis en relación a la presencia de analito en la muestra problema.

El límite de detección depende de la probabilidad de falso negativo (afirmar que no hay analito cuando sí lo hay) que se esté dispuesto a asumir, y de hecho una representación de los valores de la probabilidad del falso negativo frente a los correspondientes límites de detección es una descripción detallada del procedimiento analítico en términos de su “capacidad de detección”.

## **II. 2. Calibración multivariante**

Dadas las características actuales de la instrumentación analítica es posible aplicar múltiples sensores de forma rutinaria a una muestra; de esta manera en cada una de ellas se tienen  $n$  variables medidas (por ejemplo, absorbancia a  $n$  longitudes de onda).

La información aportada por todo el espectro define mejor a la muestra que una sola medida, aunque evidentemente, existirá una gran redundancia, ya que no todos los sensores van a aportar una información complementaria a la de los demás. Estas dos ideas, además de justificar la utilización de modelos multivariantes, obligan a la introducción de modelos flexibles de calibración.

Hasta ahora, y a través de la calibración univariada, se han tratado los modelos de calibración clasificados como rígidos. En éstos, el número de variables predictoras es bajo, y se debe tener conocimiento tanto del número de analitos presentes, como de la señal aportada por cada uno; en otras palabras y en cuanto a determinación espectrofotométrica se refiere, se hace imprescindible el conocimiento de todos los analitos presentes y de sus espectros de absorción. La existencia de alguna fuente de variación no considerada hace que este tipo de modelos no resulte apropiado, y por lo tanto, no genere resultados de calidad.

A continuación, se procederá al desarrollo de los modelos de calibración flexibles basados en transformaciones de las cantidades medidas directamente, con el objetivo de obtener una elevada calidad en la predicción. Los modelos flexibles están menos influenciados por distorsiones o errores debidos a la presencia de fuentes de variación ajenas a los analitos presentes, y se caracterizan por un elevado número de variables predictoras, y un escaso conocimiento formalizable sobre el problema; lo que se desea, básicamente, es predecir.

La calibración multivariante ha adquirido una importancia creciente en los últimos años, revelándose como una herramienta de gran utilidad en una amplia variedad de campos. Así, estos modelos de calibración han sido aplicados con éxito a la determinación de tierras raras<sup>5</sup> y de fármacos por emisión de fluorescencia<sup>6</sup>, a datos cinéticos<sup>7, 8</sup>, y de análisis por inyección en flujo<sup>9</sup>, por citar sólo algunos ejemplos.

### II.2.1. Regresión lineal múltiple (MLR)

La regresión lineal múltiple (MLR, Multiple Lineal Regression) es un modelo funcional que relaciona las variables independientes o predictoras  $x$ , con la variable dependiente o respuesta  $y$ , función que puede expresarse de la siguiente manera:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k + e \quad (2.13)$$

*Estimación de los parámetros del modelo con el criterio de mínimos cuadrados*

Los datos experimentales pueden ser expresados en forma matricial como:

$$X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} & \cdots & x_{1m} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{j1} & x_{j2} & \cdots & x_{jk} & \cdots & x_{jm} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{p1} & x_{p2} & \cdots & x_{pk} & \cdots & x_{pm} \end{bmatrix} \quad y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_j \\ \vdots \\ y_p \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_j \\ \vdots \\ b_p \end{bmatrix} \quad e = \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \vdots \\ e_j \\ \vdots \\ e_p \end{bmatrix}$$

por tanto, el modelo de la ecuación (2.13) se puede escribir

$$y = Xb + e \quad (2.14)$$

y se pueden determinar, como en el caso de la calibración univariada, los valores de  $\hat{b}_k$  que hacen mínima la suma de los cuadrados de los residuos

$$\sum_{j=1}^p [y_j - \hat{y}_j]^2 = \sum_{j=1}^p [y_j - (b_0 + b_1x_{j1} + \dots + b_mx_{jm})]^2 \quad (2.15)$$

La solución de la ecuación viene dada por:

$$\hat{b} = (X^tX)^{-1}X^ty \quad (2.16)$$

Las características más importantes de la estimación calculada mediante la ecuación anterior pueden resumirse de la siguiente manera:

- a) La solución que minimiza la suma de los cuadrados es única.
- b) La matriz de covarianza de estos estimadores es una matriz simétrica de dimensiones  $(k \times k)$  cuyos elementos diagonales  $X_{kk}$  son las varianzas de cada  $\hat{b}_k$

$$\text{Cov}(\hat{\mathbf{b}}) = s^2(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1} \quad (2.17)$$

de donde se deduce que las varianzas de los estimadores dependen de dos fuentes diferenciadas, de la varianza del error y de la matriz del diseño.

La matriz  $(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}$  recibe el nombre de matriz de inflación y su cálculo se realiza invirtiendo la matriz  $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ . Para que la inversión sea posible es necesario que las columnas de  $\mathbf{X}$  sean linealmente independientes; en caso contrario, la solución dada por la ecuación (2.16) no es única y debe realizarse una inversión generalizada.

- c) Si los errores  $e_j$  son independientes y distribuidos como  $N(0, \sigma)$ , entonces  $\hat{\mathbf{b}}_k$  ( $k = 1, \dots, m$ ) es la estimación de un máximo verosímil, es decir, es el conjunto de valores de  $\mathbf{b}$  que hacen que el resultado experimental observado sea el más probable de entre todos los posibles.

Una vez estimados dichos parámetros, se puede realizar una estimación de la variable respuesta como:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\hat{\mathbf{b}} \quad (2.18)$$

Si se sustituye el valor de  $\hat{\mathbf{b}}$  dado por la ecuación (2.16) obtenemos

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t\mathbf{y} \quad (2.19)$$

donde  $\mathbf{X}(\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^t$  recibe el nombre de matriz *hat*,  $\mathbf{H}$ , y encierra gran información sobre la regresión efectuada ya que describe la transformación que ha de aplicarse a la respuesta, para convertirla en la estimación realizada por parte del modelo. Una vez definida dicha matriz la ecuación (2.18) podría escribirse como

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{H}\mathbf{y} \quad (2.20)$$

donde aparece la respuesta estimada como función lineal de la observada,  $y$ .

El vector de diferencias  $\mathbf{e} = (e_j) = \mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}}$  está formado por  $j$  estimaciones independientes de la distribución del error, y como consecuencia del criterio de mínimos cuadrados expresado por la ecuación (2.15), la media de los residuos es cero. Una estimación de la varianza, que a priori no suele ser conocida, viene dada por la varianza de los residuos

$$s^2 = \frac{\text{SCR}}{\text{GL}} \quad (2.21)$$

donde SCR y GL son la suma de los cuadrados de los residuos y el número de grados de libertad, respectivamente. Teniendo en cuenta el número de grados de libertad, n° de variables - n° de componentes - 1 (p-m-1), la ecuación anterior podría expresarse como

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p e_j^2}{p - m - 1}} \quad (2.22)$$

Los valores de  $\hat{b}_k$  normalmente se calculan haciendo mínima la suma de los cuadrados de los residuos; sin embargo, algunos autores<sup>10</sup> proponen utilizar valores de la señal ponderados por su desviación estándar con el fin de reducir el efecto matriz. Así, si consideramos el residual como

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (y_j - \hat{y}_j)^2}{n - m}} \quad (2.23)$$

donde n y m corresponden al número de muestras medidas y número de analitos, respectivamente, la ecuación (2.13) puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{y_j}{e_j} = b'_0 + \sum_{k=1}^m \frac{b_k}{e_j} X_k \quad (2.24)$$

Tanto este método de calibración como el anterior pueden ser aplicados a la determinación simultánea de analitos en una mezcla si se conocen todos los componentes que contribuyen a la señal analítica y las interferencias; suponiendo, además, que no existen interacciones entre ellas y la matriz.

Hay que tener en cuenta que a medida que los espectros de los analitos están más solapados, provocan una colinealidad mayor en las columnas de la matriz  $\mathbf{K}$ , conduciendo a error en el cálculo de la matriz inversa  $\mathbf{K}^t\mathbf{K}$ . Por tanto, el intervalo de longitudes de onda utilizado en la determinación (número de filas de dicha matriz), constituye un parámetro crítico en la calidad de la determinación.

### *Validación del modelo*

Garantizar la validez de las hipótesis de un modelo de regresión es a menudo una etapa crítica para el éxito de los procedimientos inferenciales que permiten decidir objetivamente sobre las características del mismo. La estrategia a seguir es similar a la de la regresión univariada. Las verificaciones siguen las hipótesis hechas sobre la distribución de errores: linealidad, normalidad, independencia y homoscedasticidad.

En general, no se dispone de observaciones directas de los errores, sino de estimaciones de los mismos como residuos calculados a partir de los valores estimados por el modelo de regresión, las ecuaciones (2.21) y (2.22) son los resultados básicos al respecto. El control de las hipótesis se llevará a cabo a través de los residuos, de manera que una incorrecta especificación de la parte funcional del modelo conducirá a un falseamiento del análisis de los residuos.

### *Análisis de residuos*

Debe recordarse que los residuos son univariantes, y por lo tanto, su tratamiento y análisis no difiere del seguido para el caso de la regresión univariada tratada en el apartado anterior. Se tienen por un lado los métodos gráficos que consisten, habitualmente, en representar los residuos frente al índice de observación, la respuesta calculada o las variables predictoras; y por otro, los métodos inferenciales, usados para contrastar entre otras:

- a) La aleatoriedad e independencia (prueba de los signos y test de Durbin-Watson)<sup>1</sup>
- b) La normalidad (test de Kolmogoroff,  $\chi^2$ ). Los test de normalidad necesitan tamaños muestrales grandes, en otro caso son muy conservadores; es decir, no rechazan la hipótesis de normalidad salvo que exista una gran evidencia en contra. Especialmente sensible al fallo de la normalidad son los test basados en la distribución F de Snedecor<sup>1</sup>.
- c) La igualdad de varianzas. Siempre que se disponga de réplicas experimentales pueden aplicarse los test de Barlett y de Cochran, si bien en la práctica exigen un esfuerzo experimental notable.

Una medida muy popular del grado de validez de una regresión es el coeficiente de Determinación Múltiple,  $R^2$  que se define como

$$R^2 = \text{corr}(y, \hat{y})^2 = 1 - \frac{\sum (y_j - \hat{y}_j)^2}{\sum (y_j - \bar{y}_j)^2} \quad (2.25)$$

$R^2$  es una medida de la reducción en la dispersión en la respuesta y causada por el uso de predictoras  $x_1, \dots, x_m$ . Como en el caso univariante se cumple  $0 \leq R^2 \leq 1$ ; un ajuste perfecto de los datos dará  $R^2 = 1$ , por el contrario si los coeficientes  $\hat{\mathbf{b}}_k$  ( $k = 1, \dots, m$ ) son nulos se tendrá que  $y_j$  es una constante, salvo el error aleatorio, y entonces  $R^2 = 0$ . En consecuencia  $R^2$  es una medida global de la utilidad de los términos de la regresión distintos de  $b_0$ , lo que de algún modo tiene que ver con la importancia de las variables predictoras.

Ahora bien, este coeficiente puede conducir a conclusiones erróneas. Por ejemplo, siempre que se añade una variable al modelo,  $R^2$  crece, aún cuando la variable no sea significativa.

La raíz cuadrada de  $R^2$  es el coeficiente de correlación múltiple de  $y$  sobre las  $x_j$  y es una medida del grado de asociación lineal entre variables predictoras y respuestas.

#### *Intervalos de confianza para las estimaciones de los parámetros*

Una forma de evaluar la calidad de un modelo de regresión es determinar los intervalos de confianza para las estimaciones de los parámetros que en él intervienen, así como la respuesta estimada. Esto es de gran importancia cuando el modelo está deducido de una teoría, en este caso química, y los parámetros tienen significado físico-químico. La determinación de estos intervalos es posible en tanto se cumpla que los errores son independientes y siguen una distribución  $N(0, \sigma)$ .

Así, una vez calculada la varianza del modelo según la ecuación (2.17), el intervalo de confianza  $100(1-\alpha)$  para cualquiera de los parámetros viene dado por

$$\hat{b}_j \pm t_{\alpha/2, p-m-1} \sqrt{s^2 x_{kk}} \quad (2.26)$$

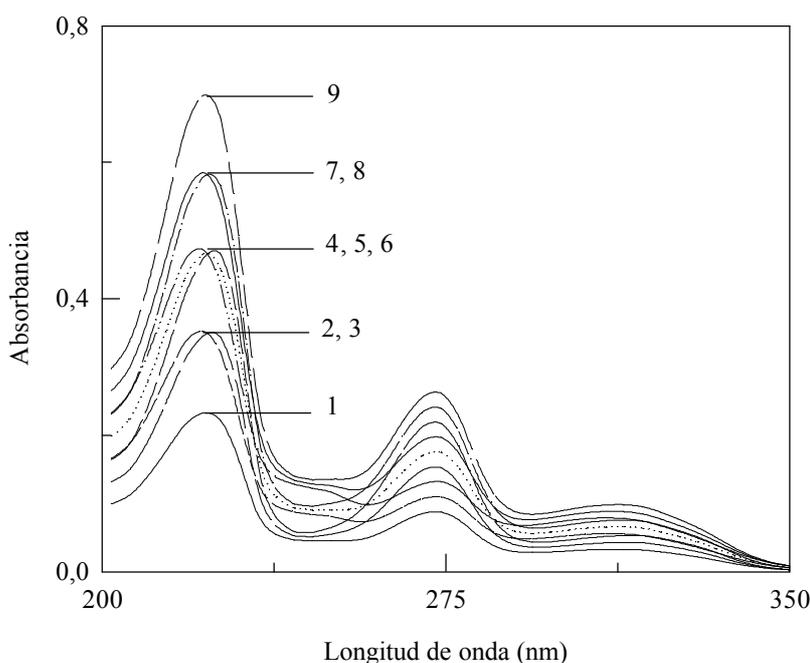
## II. 2. 2. Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

La regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS, Partial Least Squares), introducida por H. Wold<sup>11</sup> en 1975, ha tenido gran difusión como una alternativa a la regresión lineal múltiple.

Con PLS, se introducen nuevos términos para la realización de cálculos quimiométricos como son *factores*, *scores* o *loadings*, (estos dos últimos términos pierden su significado cuando son traducidos al castellano, por tanto, cuando se aluda a ellos se presentarán en letra cursiva).

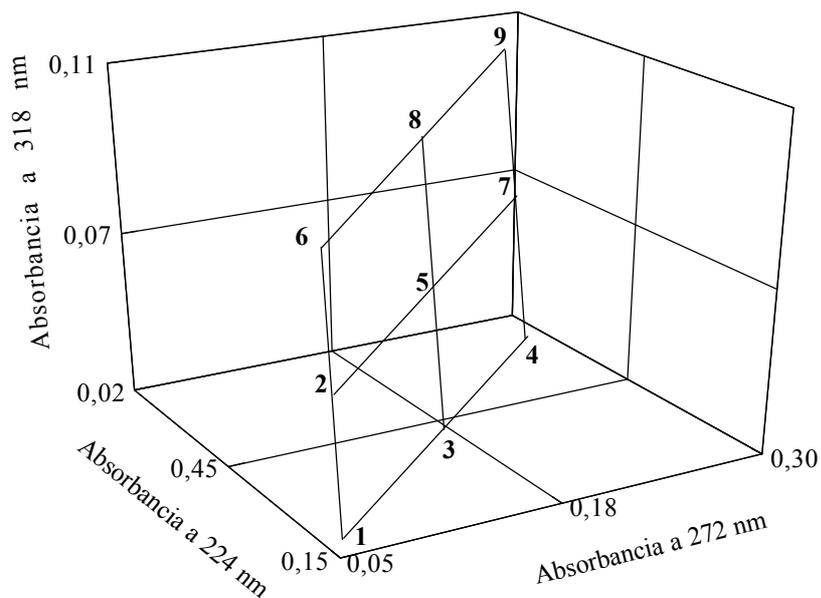
PLS, como otros modelos flexibles de calibración, realiza una transformación de un sistema de coordenadas m-dimensional a otro de dimensiones inferiores, a través de proyecciones. Por ejemplo, un sistema coordenado tridimensional puede ser transformado en uno bidimensional, por proyección de sus elementos en el espacio al plano.

Veamos esto con un ejemplo: en los espectros de la Figura 2.1 se pueden observar tres máximos de absorción a 224, 272 y 318 nm; considerando estas tres variables, se podría definir un espacio tridimensional, como el mostrado en la Figura 2.2, en el cual es factible la realización de una reducción de variables por proyección de sus elementos en el plano que puede observarse en dicha figura. Aquí se presenta el ejemplo en tres dimensiones, puesto que resulta imposible la visualización de un espacio de orden superior a tres.



**Figura 2.1:** Espectros de absorción de mezclas de dos analitos.

La posición de las muestras en el nuevo sistema es lo que se conoce como *scores*, y expresan la relación existente entre los objetos. Los *scores* también pueden ser considerados como una medida de la presencia de un factor determinado en un objeto en particular.



**Figura 2.2:** Esquema de una reducción de variables.

Los *scores* constituyen la proyección local de los objetos en los *factores*, y sus valores para cada factor,  $t$ , son recogidos en la matriz **T**, o matriz de *Scores*. Cada columna de dicha matriz corresponde a un factor, cada fila a un objeto.

Las relaciones existentes entre las variables originales y los *factores* definidos por el modelo, reciben el nombre de *loadings*, (es por ello que, formalmente y en nuestro caso en particular, presentan la misma forma que los espectros tratados). Los *loadings* son los coeficientes de regresión de cada variable en cada *factor*, información que es recogida en las matrices **P** y **Q**, matrices de *loadings*.

*Modelo matemático*

La idea básica de la regresión en mínimos cuadrados parciales es sustituir las variables predictoras  $x_1, x_2, \dots, x_k$  ( $k = 1, 2, \dots, m$ ) por otras, los denominados *factores*, que son combinaciones lineales de las variables originales:

$$\text{Fac}_h = p_{h0} + p_{h1}x_1 + p_{h2}x_2 + \dots + p_{hm}x_m \text{ donde } (h = 1, 2, \dots, a, \dots, m)$$

quedando las variables respuestas definidas por

$$y_j = b_{h1}\text{Fac}_1 + b_{h2}\text{Fac}_2 + \dots + b_{jh}\text{Fac}_h$$

Estos *factores* tienen dos características interesantes que se deducen del criterio con las que se construye. Inicialmente, todos los objetos en estudio forman una nube de puntos en un espacio  $m$ -dimensional ( $m$  es la dimensión de las variables predictoras) que presenta una estructura propia: la estructura interna de correlación y colinealidad que tienen las variables predictoras entre sí.

El primer *factor* se construye en la dirección de máxima elongación de la nube de puntos, o sea, dirección de máxima variación en los datos. Formalmente, se trata de determinar los valores  $p_{hm}$  con la condición impuesta de que sea máxima la varianza del primer factor,  $\text{Fac}_1$ .

El segundo *factor* se construye de modo que siga una dirección ortogonal a la anterior y que además contenga la máxima varianza no explicada por el primer factor. O sea, que este segundo factor está caracterizado por  $\text{Corr}(\text{Fac}_1, \text{Fac}_2) = 0$  y  $\text{Var}(\text{Fac}_2)$  máxima; de este modo se construyen los sucesivos *factores* ( $\text{Fac}_3, \dots, \text{Fac}_h$ ) no correlacionados con los anteriores y de varianzas máximas, en número igual a la dimensión del espacio:

- $\text{Fac}_1 = p_{11}x_1 + p_{12}x_2 + \dots + p_{1m}x_m$  tal que  $\text{Var}(\text{Fac}_1)$  sea máxima
- $\text{Fac}_2 = p_{21}x_1 + p_{22}x_2 + \dots + p_{2m}x_m$  tal que  $\text{Var}(\text{Fac}_2)$  sea máxima, con la restricción  $\text{Corr}(\text{Fac}_1, \text{Fac}_2) = 0$
- ...
- $\text{Fac}_h = p_hx_1 + p_hx_2 + \dots + p_hx_m$  tal que  $\text{Var}(\text{Fac}_h)$  sea máxima, con la restricción  $\text{Corr}(\text{Fac}_h, \text{Fac}_1) = \text{Corr}(\text{Fac}_h, \text{Fac}_2) = \dots = \text{Corr}(\text{Fac}_h, \text{Fac}_{h-1}) = 0$

Asimismo, en todos los casos se debe cumplir la restricción  $p_{h1}^2 + p_{h2}^2 + \dots + p_{hm}^2 = 0$ , condición impuesta para que en los criterios de máxima varianza no se llegue a una solución trivial: los máximos se alcanzan cuando los coeficientes son infinitos.

Para evitar una nube distorsionada por las diversas escalas de medida de las variables (por ejemplo medir en unidades multiplicadas y/o divididas por potencias de diez de varios órdenes) se debe proceder a tipificar las variables, es decir, restar la media y dividir por la desviación típica. De este modo, la nube de puntos está centrada en el origen de coordenadas y la varianza de cada variable es uno. Este proceso no altera las relaciones internas entre las variables, simplemente garantiza que las elongaciones de la nube de puntos no están causadas por un efecto de escala irrelevante en muchos problemas.

Las coordenadas de los objetos en los nuevos ejes son como ya se dijo, los *scores*,  $t_h$ .

$$\mathbf{X} = t_1 \mathbf{p}_1^t + t_2 \mathbf{p}_2^t + \dots + t_h \mathbf{p}_h^t \quad (2.27)$$

Se ha descompuesto la matriz de predicción en el producto de varios sumandos, cada uno de ellos producto de dos vectores, el *loading*  $\mathbf{p}_h^t$  y el *score*  $t_h$ . En forma matricial :

$$\mathbf{X}_{nm} = \mathbf{T}_{nh} \mathbf{P}_{hm}^t \quad (2.28)$$

Una importante ventaja de estos *factores* es que al explicar, por definición, fracciones decrecientes e independientes de la varianza encerrada en las variables predictoras, puede considerarse que las últimas componentes no son informativas, ya que presumiblemente encerrarán ruido de fondo del problema en estudio. De esta forma, y si sólo se consideran las  $d$  primeras componentes, el modelo de regresión buscado es,

$$Y_j = b_{j0} + b_{j1} \text{Fac}_1 + b_{j2} \text{Fac}_2 + \dots + b_{jd} \text{Fac}_d \quad (2.29)$$

Al seleccionar las  $d$  primeras componentes se está utilizando una fracción de la información que tienen las predictoras; de modo que, partiendo de  $m$  variables predictoras y  $p$  variables respuestas, obtenidas de  $n$  objetos, PLS modela las matrices  $\mathbf{X}_{nm}$  e  $\mathbf{Y}_{np}$  mediante  $d$  variables latentes, de modo que se cumpla que

$$\mathbf{X}_{nm} = \mathbf{T}_{nd} \mathbf{P}_{dm}^t + \mathbf{F}_{nm} = \sum_{h=1}^d \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^t + \mathbf{F}_h \quad (2.30)$$

$$\mathbf{Y}_{np} = \mathbf{U}_{nd} \mathbf{Q}_{dp}^t + \mathbf{E}_{np}^i = \sum_{h=1}^d \mathbf{u}_h \mathbf{q}_h^t + \mathbf{E}_h^i \quad (2.31)$$

siendo  $\mathbf{T}$  y  $\mathbf{U}$  las matrices de los *scores* de los bloques  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , respectivamente;  $\mathbf{P}^t$  y  $\mathbf{Q}^t$ , las de los *loadings*, respectivamente;  $\mathbf{F}_h$  es la matriz de los residuales del bloque  $\mathbf{X}$  cuando se utilizan  $h$  *factores*; y  $\mathbf{E}_h^i$  es un paso intermedio para la obtención de los residuales del bloque  $\mathbf{Y}$ .

PLS establece una condición que liga a las variables latentes determinadas en el bloque  $\mathbf{X}$  y en el bloque  $\mathbf{Y}$ , consistente en obligar a que exista una relación lineal entre los *scores*  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ . Formalmente se debe cumplir que:

$$\hat{\mathbf{u}}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \quad (2.32)$$

donde  $\mathbf{b}_h = \mathbf{u}_h^t \mathbf{t}_h / \mathbf{t}_h^t \mathbf{t}_h$ , y se corresponde con los coeficientes de regresión de cada uno de los *factores*.

A partir de estas expresiones se calcula el valor de  $\mathbf{Y}$  utilizando  $\hat{\mathbf{u}}_h$

$$\mathbf{Y}_{np} = \mathbf{T}_{nd} \mathbf{B}_{dd} \mathbf{Q}_{dp}^t + \mathbf{E}_{np} \quad (2.33)$$

En este caso los *loadings* no coinciden exactamente con la dirección de máxima variación, como sucede en otros modelos flexibles de calibración, por ejemplo en el análisis en componentes principales, sino que están corregidos para conseguir una óptima capacidad predictiva para la matriz  $\mathbf{Y}$ .

#### Algoritmo PLS

Suponiendo que las matrices  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  están centradas y escaladas (el subíndice  $h$  se refiere al factor  $h$ -ésimo), el proceso de iteración para cada variable que se desee calcular conlleva los siguientes pasos:

- a) Se toma como aproximación inicial el vector  $\mathbf{u}$  de los *scores* del bloque  $\mathbf{Y}$  con una columna  $j$  de la matriz  $\mathbf{Y}$ :  $\mathbf{u}_{inicial} = y_j$
- b) Partiendo de la aproximación anterior  $\mathbf{u} = \mathbf{u}_{h-1}$ 
  - b.1) Para cada variable predictora  $x_k$  ( $k = 1, 2, \dots, m$ ) se calcula la regresión por el origen respecto a  $\mathbf{u}$ . El vector de los coeficientes de regresión forma el vector de los pesos  $\mathbf{w}_h^t$ .
  - b.2) Se normaliza  $\mathbf{w}_h^t$  y se obtiene la columna de *loadings* que define la aproximación  $h$ -ésima a la primera variable latente de las predictoras.
  - b.3) Se obtiene la aproximación  $h$ -ésima de los *scores* asociados a esta variable latente,  $\mathbf{t}_h = \mathbf{F}_{h-1} \mathbf{W}_h$ .
- c) Si hay una sola variable en el bloque  $\mathbf{Y}$  el cálculo se detiene en este paso porque sólo es posible un único factor en el bloque  $\mathbf{Y}$ . En este caso el algoritmo continúa en d), en los demás casos el algoritmo sigue:

- c.1) Para cada variable  $y_j$  ( $j = 1, 2, \dots, p$ ) respuesta, se calculan los coeficientes de las regresiones por el origen sobre los  $\mathbf{t}_h$ . El vector formado con ellos es el vector de los pesos del bloque  $\mathbf{Y}$ ,  $\mathbf{q}_h^t$ .
- c.2) Los pesos anteriores se normalizan y así se obtiene la aproximación  $h$ -ésima de los *loadings* del bloque  $\mathbf{Y}$ .
- c.3) Se calcula la aproximación  $h$ -ésima de los *scores* asociados a esta variable latente,  $\mathbf{u}_h = \mathbf{E}_{h-1} \mathbf{q}_h$ .  
Se vuelve al paso b.1) salvo que se cumpla la condición de convergencia sobre los pesos  $\mathbf{q}_h$  o los scores  $\mathbf{u}_h$ . En este caso se usarán  $\mathbf{t}_h$ ,  $\mathbf{q}_h$ , y  $\mathbf{u}_h$  como valores definitivos.
- d) Se calculan los *loadings* del bloque  $\mathbf{X}$ , de acuerdo con  $\mathbf{p}_h^t = \mathbf{t}_h^t \mathbf{F}_{h-1} / \mathbf{t}_h^t \mathbf{t}_h$  y normalizando posteriormente. A continuación, se actualiza la matriz  $\mathbf{X}$  restando la contribución de la variable latente calculada:  $\mathbf{F}_h = \mathbf{F}_{h-1} - \mathbf{t}_h \mathbf{q}_h^t$ , teniendo en cuenta que  $\mathbf{X} = \mathbf{F}_0$ .
- e) Regresión de  $\mathbf{u}$  sobre  $\mathbf{t}$  para tener el coeficiente de proporcionalidad asociado a ambas variables latentes determinadas.
- f) Actualización de la matriz  $\mathbf{Y}$  restando la contribución de la variable latente calculada mediante la ecuación (2.27):  $\mathbf{E}_h = \mathbf{E}_{h-1} - \mathbf{b}_h \mathbf{t}_h \mathbf{p}_h^t$ , teniendo en cuenta que  $\mathbf{Y} = \mathbf{E}_0$ .

#### *Interpretación de los resultados*

El número de variables latentes o *factores* en esta regresión es un parámetro del procedimiento que ha de ser estimado de acuerdo con la optimización del “rendimiento” del modelo. En quimiometría, y especialmente en calibración, no debe incluirse un factor cuyo significado químico no se encuentre bien establecido (los gráficos resultan de gran utilidad). Tampoco deberá incluirse ninguna componente que no explique la respuesta observada por más que pudiera parecer interesante para la interpretación química del modelo.

En cualquier caso, no debe olvidarse que PLS es un método cuyo éxito depende de la habilidad para descifrar la estructura interna de los datos y, por ello, debe someterse a un riguroso control de su significado químico. Resulta evidente que PLS no es adecuado para atribuir sentido químico a los parámetros y, en general, sólo interesa una predicción de calidad.

### *Métodos de validación*

Idealmente, para establecer un modelo se debe disponer de un conjunto de datos con los que se construye el modelo (matriz de calibración), y otro de evaluación o validación del modelo construido (matriz de validación), formado por objetos con variables predictoras y respuestas conocidas, pero que no han intervenido en el proceso de calibración; este tipo de validación se conoce como *validación externa*. Sin embargo, se corren ciertos riesgos debido a que los objetos de la matriz de validación son distintos de los de la matriz de calibración; por ello, en casos reales, se suele seguir un esquema de validación basado en la utilización de los mismos objetos que fueron utilizados para la calibración. Este tipo de validación es interna y es llevada a cabo a través de los siguientes métodos:

#### a) *Leverage correction*

La principal ventaja de este método radica en su rapidez. Aunque son numerosos los inconvenientes que posee, se utiliza cuando se construye un modelo por primera vez, como indicativo de su calidad. En una primera etapa se calcula la influencia que tiene cada objeto de calibración en el modelo (*leverage*), para corregir posteriormente los residuales de los mismos de acuerdo con esta influencia, aumentando o disminuyendo sus pesos. Este tipo de corrección es criticable, puesto que aumenta artificialmente la evaluación de los resultados en la predicción.

Resulta aconsejable la utilización de un método de validación más conservador antes de decidir el número de *factores* necesarios para la construcción del modelo.

#### b) *Cross validation*

Este método divide los objetos de calibración en pequeños grupos de tamaño aproximadamente igual, de forma que su unión sea el total. Cada uno de los subconjuntos jugará sucesivamente el papel de conjunto de validación, se construirá el modelo con los restantes objetos y se evaluará la suma de cuadrados residuales. El proceso se repite tantas veces como grupos haya.

### *Varianza*

El cálculo de las diferentes varianzas permite disertar sobre la calidad del modelo construido y su capacidad predictora. Se puede distinguir entre varianza de calibración y de validación; la primera nos permite evaluar el ajuste de las muestras de calibración al modelo

construido, en el caso de la varianza explicada aumenta al hacerlo el número de *factores*. La varianza residual de las variables Y de validación nos da una idea de la bondad del modelo y de su capacidad de predicción, normalmente disminuye con el número de *factores* y es una de las herramientas clave para decidir el número de *factores* óptimo que suele corresponderse con el primer mínimo local.

### II. 3. Procedimiento general para la elección del mejor modelo

La calibración tiene como finalidad, en la mayoría de los casos, la determinación de un valor de concentración a partir de un cierto valor experimental proporcionado por un instrumento. Esta etapa es la denominada predicción, y es llevada a cabo una vez establecida una relación matemática válida, o modelo matemático, entre la respuesta “y”, y la concentración de analito, “x”. La calidad en el proceso de medida exige, además de saber hallar la concentración de analito (predecir), unos valores elevados de ciertos parámetros tales como exactitud o precisión.

Si entendemos por optimización el proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de las variables independientes que producen el mejor resultado posible en el proceso de determinación analítica, el modelo óptimo sería aquél en el que los errores cometidos en la etapa de predicción fueran mínimos.

En la presente memoria, una vez establecido el tipo de relación matemática existente entre las variables en estudio, se procederá a la determinación de los parámetros de la calibración de todos los modelos en los que es posible llevar a cabo la cuantificación de los analitos. A continuación, se realizará la predicción con mezclas sintéticas de concentración perfectamente conocida y se elegirá el modelo óptimo utilizando como parámetros estimativos del error cometido para evaluar la bondad del modelo de calibración:

- el error global o RSE (Relative Standar Error of Prediction),

$$RSE = 100 \sqrt{\frac{\sum (x_j - \hat{x}_j)^2}{n^2}}$$

- la media de los errores relativos o RMSE (Relative Medium Standar Error of Prediction),

$$RMSE = \frac{100}{n} \sum \frac{|x_j - \hat{x}_j|}{x_j}$$

- el PRESS (Prediction Residual Sum of Squares),

$$PRESS = \sum (x_j - \hat{x}_j)^2$$

donde  $x_j$  y  $\hat{x}_j$  son las concentraciones puesta y predicha, respectivamente, para el analito j-ésimo y n el número de muestras de predicción.

### II. 3. 1. Calibración univariante

Cuando se utilizaron métodos gráficos, es decir, la calibración univariante, para cada analito se obtuvieron las ecuaciones de todas las posibles curvas de calibrado correspondientes a las longitudes de onda en las que los analitos presentaban máximos, mínimos, cruces por cero, etc. Con el fin de encontrar la mejor de estas curvas de calibrado, se prepararon una serie de mezclas sintéticas en las que se llevó a cabo la determinación, obteniéndose para cada una de las series el valor de RSE y RMSE, aplicando todas las posibles ecuaciones. Se seleccionó como óptimo el modelo que presentaba mejores valores de los parámetros estimativos de la calidad de los resultados planteados en el apartado anterior.

### II. 3. 2. Calibración multivariante

La información aportada por todo el espectro de absorción define mejor a una muestra que una única medida; sin embargo, existe una redundancia puesto que no todas las longitudes de onda aportan una información complementaria a la de las demás. Esta es una de las principales dificultades que presentan los modelos de calibración multivariante que se suelen aplicar a este tipo de datos, y de ahí, la importancia de encontrar métodos que permitan seleccionar entre todas las variables medidas aquellas que sean relevantes para la construcción del modelo de calibración.

La calibración por Partial Least Square Regression (PLS) descompone la matriz de variables independientes (X) (absorbancias a distintas longitudes de onda) y la matriz de variables dependientes (Y) (concentraciones de los analitos en las muestras) en sus respectivas variables latentes o *factores*. De forma general, el número de variables independientes es mayor que el de variables dependientes, por tanto se podrían utilizar tantas variables latentes o *factores* PLS como rango tenga la matriz de las variables independientes. Sin embargo, normalmente no se usan todos estos *factores* debido a que las variables independientes no siempre están exentas de ruido y algunos de los *factores* utilizados podrían intentar describirlo, introduciéndolo en el modelo. Si la relación entre ambas matrices es lineal, las variables independientes están libres de ruido, y no existen otras interferencias, el número de variables latentes o *factores* necesarios para describir el modelo es igual al rango de las variables dependientes. Cuando la relación entre las variables no sea lineal o existan interferencias, será necesario utilizar un número mayor de *factores*.

Por otra parte, y como ocurre en cualquier método de calibración, la elección de las variables independientes juega un papel muy importante en el establecimiento de un modelo PLS de calidad. Así, aunque la mayoría de las aplicaciones de PLS se realizan usando un intervalo de longitudes de onda completo (full spectrum method), muchos autores han propuesto diferentes métodos para seleccionar las longitudes de ondas de forma que se eviten las que están asociadas a mucho ruido, falta de linealidad o información irrelevante<sup>12-14</sup>.

En la presente memoria se proponen dos métodos para la selección del intervalo de longitudes de onda que proporciona los mejores resultados cuando se aplica PLS: a) el método del mínimo RSE y RMSE y b) el método del menor PRESS significativo, que permite seleccionar no sólo el intervalo de longitudes de onda, sino también el número de *factores* más adecuado.

#### a) Método del mínimo RSE y RMSE

Para llevar a cabo la selección del intervalo de longitudes de onda correspondiente al mejor modelo se utilizaron “macros” en el programa UNSCRAMBLER. Los pasos a seguir se recogen a continuación:

1. Se registran los espectros de las muestras de calibración y validación. Se construyen las matrices de calibración  $\mathbf{C}$  (servirán para construir los modelos) y de validación  $\mathbf{O}$  (permitirán elegir el óptimo de entre todos los modelos construidos). Estas matrices tienen  $i$  variables (longitudes de onda) ( $v_1, v_2, \dots, v_i$ ) y  $j$  muestras.
2. Se realiza un modelo  $\mathbf{M}_1$  por PLS-1 a partir de la matriz de calibración  $\mathbf{C}^1$  [ $i \times j$ ]. A partir de este modelo,  $\mathbf{M}_1$ , se predicen las muestras de validación ( $\mathbf{O}$ ) utilizando 1, 2, ...,  $h$ , ...,  $f$  *factores* y se calculan los  $\text{RSE}_1^h$  y  $\text{RMSE}_1^h$  para cada una de las  $\mathbf{P}_1^h$  predicciones realizadas con cada número  $h$  de *factores*.
3. Se elimina la variable con mayor subíndice,  $v_i$ , de  $\mathbf{C}^1$ , obteniéndose una matriz de calibración  $\mathbf{C}^2$  [( $i-1$ )  $\times j$ ]. A continuación, utilizando dicha matriz se realiza un modelo  $\mathbf{M}_2$  por PLS-1 a partir de  $\mathbf{C}_2$ , y se obtienen las correspondientes predicciones  $\mathbf{P}_2^h$  con sus respectivos valores de  $\text{RSE}_2^h$  y  $\text{RMSE}_2^h$  para cada número  $h$  de *factores* ensayado.
4. Se repite el paso 3 tantas veces como sea necesario hasta obtener la matriz  $\mathbf{C}^{i-n+1}$  [ $n \times j$ ],  $\mathbf{M}_{i-n+1}$ ,  $\mathbf{P}_{i-n+1}^h$  y  $\text{RSE}_{i-n+1}^h$  y  $\text{RMSE}_{i-n+1}^h$ . De esta forma se han realizado todos los modelos posibles que poseen como longitud de onda inicial  $v_1$  y tienen como

mínimo  $n$  variables ( $i-n+1$  intervalos) y se han calculado los RSE y RMSE de todos estos modelos prediciendo con  $1, 2, \dots, h, \dots, f$  factores.

5. Se elimina la variable con menor subíndice ( $v_1$ ) de la matriz inicial  $C^1$  [ $i \times j$ ], obteniéndose la matriz  $C^{(i-n+1)+1}$  [( $i-1$ )  $\times$   $j$ ] a partir del cual se calculará el modelo  $M_{(i-n+1)+1}$ , y sus correspondientes predicciones  $P_{(i-n+1)+1}^h$  y valores de  $RSE_{(i-n+1)+1}^h$  y  $RMSE_{(i-n+1)+1}^h$  para cada número de factores ensayado.
6. Se elimina la variable con mayor subíndice ( $v_i$ ) de  $C^{(i-n+1)+1}$  [( $i-1$ )  $\times$   $j$ ], obteniéndose  $C^{(i-n+1)+2}$  [( $i-2$ )  $\times$   $j$ ], y se realiza un modelo  $M_{(i-n+1)+2}$  del que se obtienen  $P_{(i-n+1)+2}^h$  y a partir de estos los  $RSE_{(i-n+1)+2}^h$  y  $RMSE_{(i-n+1)+2}^h$ .
7. Se repite el paso 6 hasta obtener la matriz  $C^{(i-n+1)+(i-n)}$  [ $n \times j$ ],  $M_{(i-n+1)+(i-n)}$ ,  $P_{(i-n+1)+(i-n)}^h$  y  $RSE_{(i-n+1)+(i-n)}^h$  y  $RMSE_{(i-n+1)+(i-n)}^h$ . De esta forma se realizan todos los modelos posibles que poseen como longitud de onda inicial  $v_2$  y como mínimo  $n$  variables ( $i-n$  intervalos).
8. Se repiten los pasos 5, 6 y 7 hasta obtener en cada iteración las series de matrices de calibración siguientes:

$$\begin{aligned}
 &C^1, C^2, C^3, \dots, C^{i-n+1} \\
 &C^{(i-n+1)+1}, C^{(i-n+1)+2}, C^{(i-n+1)+3}, \dots, C^{(i-n+1)+(i-n)} \\
 &C^{(i-n+1)+(i-n)+1}, C^{(i-n+1)+(i-n)+2}, C^{(i-n+1)+(i-n)+3}, \dots, C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)} \\
 &C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)+1}, C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)+2}, C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)+3}, \dots, C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)+(i-n-2)} \\
 &\dots \\
 &C^{(i-n+1)+(i-n)+(i-n-1)+(i-n-2)+ \dots + (i-n)-(i-n-1)}
 \end{aligned}$$

con sus respectivos modelos ( $M_i$ ), predicciones ( $P_i^h$ ),  $RSE_i^h$  y  $RMSE_i^h$ .

9. Se repite el proceso completo para cada analito utilizando PLS-1, y para la mezcla en estudio utilizando PLS-2.
10. Se elige como intervalo óptimo cada número de factores  $h$ , el que presenta menor valor de RSE y/o RMSE.
11. Del paso anterior obtenemos  $f$  modelos, uno por factor, seleccionándose como óptimo, para llevar a cabo la determinación, el intervalo de longitudes de onda y el número de factores que proporcionan el menor valor de RSE y/o RMSE.
12. Si el valor mínimo de RSE y/o RMSE corresponde a más de un intervalo de longitudes de onda, se recurre a los valores de RSE y RMSE calculados para las

---

mezclas de la matriz de calibración ( $C$ ), eligiéndose el intervalo que presente los valores mínimos para estos nuevos parámetros.

**b) Método del menor PRESS significativo**

Este método permite seleccionar simultáneamente el intervalo de longitudes de onda en el que debe ser aplicado PLS y el número de *factores* que deben ser utilizados en la etapa de predicción.

El proceso se realizó de forma similar a la descrita en el apartado anterior, utilizando “macros” en el programa UNSCRAMBLER. Los pasos a seguir para la obtención del mejor modelo son los siguientes:

1. Se realizan los pasos 1 a 8 como se describió en apartado anterior para el método de los mínimos RSE y RMSE, pero en este caso se obtienen los valores de  $PRESS_i^h$  para cada uno de los modelos ( $M_i$ ), y la predicción con cada número de *factores* ensayado ( $P_i^h$ ).
2. El intervalo óptimo para cada número de *factores*  $h$ , se elige comprobando que el valor mínimo de  $PRESS^h$  es significativamente menor que el  $PRESS^{h-1}$  correspondiente al mismo modelo con un *factor* menos. Esta comprobación suele hacerse mediante el cálculo del estadístico F, cuyo valor tabulado para una probabilidad de 0,75 es adecuado para determinar si existen diferencias significativas entre los modelos, según determinaron empíricamente Haaland y Thomas<sup>15</sup>.

Si el modelo con menor PRESS no cumple la premisa anterior, se elige el siguiente modelo con mínimo valor de PRESS y se aplica el mismo criterio.

Este proceso se debe realizar para 1, 2, ...,  $h$ , ...  $f$  *factores* ensayados. Al tratarse de un criterio restrictivo, se evita que se produzca un sobreajuste (overfitting).

3. Del paso anterior obtenemos  $f$  modelos, uno por *factor*. Para seleccionar el óptimo, se aplica nuevamente el criterio del apartado anterior: el modelo óptimo será aquél que posea menor PRESS, siempre y cuando el valor de F calculado indique que presenta diferencias significativas con respecto al PRESS correspondiente a un número menor de *factores*.

**Bibliografía**

1. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Micote, y L. Kaufman; *Chemometrics a textbook*, Ed. Elsevier Science Publisher B.V., New York, 1988.
2. J.C. Miller y J.N. Miller, *Estadística para Química Analítica*, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, Delaware, E.U.A., 1993.
3. IUPAC, *Spectrochim. Acta*, **33B**, 242, 1978.
4. G.L. Long y J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, **55**, 712A, 1983.
5. J.M. García, A.I. Jiménez, F. Jiménez, J.J. Arias y J. Havel, *Microchim. J.*, **54**, 32, 1996.
6. R.D. Bautista, F.J. Aberásturi, A.I. Jiménez y F. Jiménez, *Talanta*, **43**, 2107, 1996.
7. J. Havel, F. Jiménez, R.D. Bautista y J.J. Arias, *Analyst*, **118**, 1355, 1993.
8. K.D. Khalaf, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, J.M. García, F. Jiménez y J.J. Arias, *Microchim. J.*, **53**, 461, 1996.
9. O. Hernández, F. Jiménez, A.I. Jiménez y J.J. Arias, *Analyst*, **121**, 169, 1996.
10. V. Cerdá, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Gómez y M.T. Oms, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **52**, 159, 1993.
11. H. Wold, *Perspectives in Probability and Statistics*, Academic Press, Londres, 1975.
12. A. Garrido Frenich, D. Jouan-Rimbaud, D.L. Massart, S. Kuttatharmmakul, M. Martínez Galera and J.L. Martínez Vidal, *Analyst*, **120**, 2787, 1995.
13. H.C. Goicoechea y A.C. Olivieri, *Talanta*, **49**, 783, 1999.
14. D.S. Osborne, B.R. Jordan y K. Rainer, *Analyst*, **122**, 1531, 1997.
15. D.M. Haaland y V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.

**CAPÍTULO III**  
**RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS**

---



En este capítulo se aplican las calibraciones univariada y multivariante a la determinación de mezclas binarias de los fármacos en estudio. La señal analítica estudiada ha sido la medida de absorbancia en los espectros de absorción y en los espectros derivados.

### III. 1. Espectrofotometría derivada

La primera aplicación de la espectroscopía derivada en el rango UV-visible fue realizada por S. French<sup>1</sup> *et al.* en 1954, adaptando el principio de modulación de la longitud de onda propuesto por Hammond<sup>2</sup> *et al.* al estudio del espectro de primera derivada en sistemas fotosintéticos. Los dispositivos de diferenciación se basaban en el uso de circuitos de resistencias-capacitancias con amplificadores de válvulas, que con muy pocas modificaciones se han seguido utilizando hasta hace muy poco tiempo.

A medida que han pasando los años y con el avance en la tecnología aparecían aparatos que permitían la utilización de un orden de derivada superior; pero la gran revolución la constituyó, sin duda, la introducción en el mercado de los espectrofotómetros de diodos en fila. Estos constan de una serie de detectores fotodiódicos, asociados cada uno de ellos a una determinada longitud de onda, lo que permite la obtención de espectros derivados de orden n-ésimo, en un corto período de tiempo y sin costes excesivamente elevados.

Un espectro de derivadas consiste en la representación gráfica del cociente diferencial:

$$\frac{d^n A_j}{d\lambda^n} \quad (3.1)$$

donde  $A_j$  es la absorbancia medida a la longitud de onda  $j$ , y  $n$  el orden de derivada.

Si se sustituye  $A_j$  por el valor que le corresponde según la ley de Lambert-Beer, se obtiene la expresión (3.2) que muestra la dependencia de los espectros derivados con la concentración de analito.

$$\frac{d^n}{d\lambda^n} (\epsilon_j l c) = l c \frac{d^n \epsilon_j}{d\lambda^n} \quad (3.2)$$

donde  $l$  es el paso óptico,  $c$  la concentración de analito y  $\epsilon_j$  la absortividad molar del analito a la longitud de onda  $j$ .

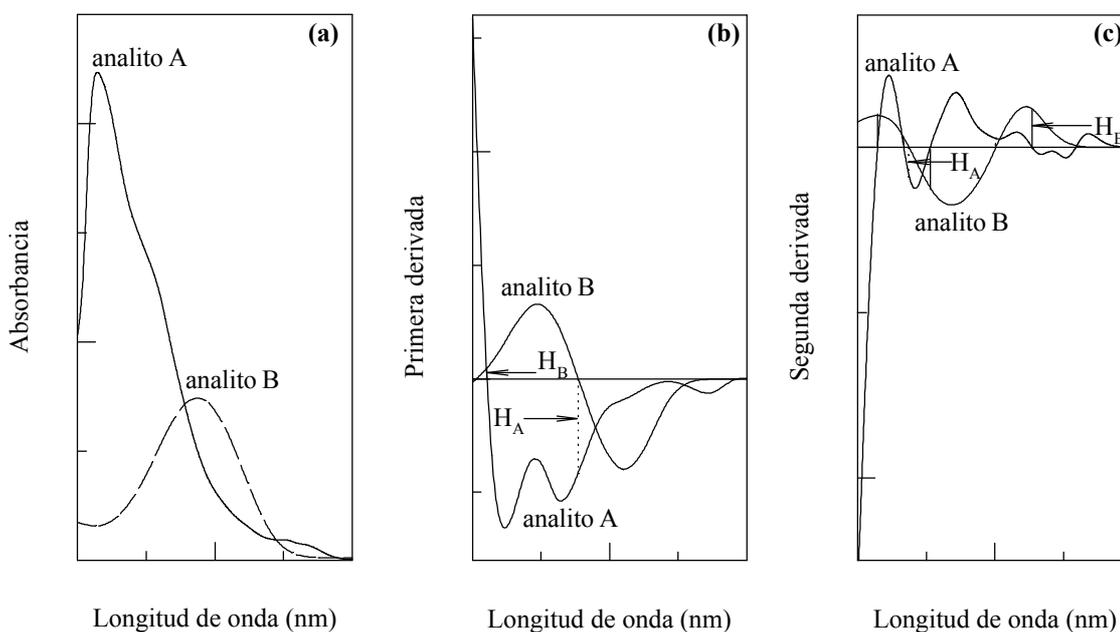
El proceso de cuantificación se realiza por medidas en los máximos y/o mínimos<sup>3</sup>. En otros casos se recurre a la medida de las distancias entre máximos y mínimos vecinos<sup>4</sup> para mejorar la calidad de los resultados.

Las características analíticas de la espectroscopía derivada han reducido o eliminado algunas de las limitaciones de la espectrofotometría convencional en el análisis de multicomponentes. Así, se mejora notablemente la resolución espectral, ya que pequeñas variaciones en los espectros de absorción son más fácilmente detectables, permitiendo la evaluación cuantitativa en muestras cuyos componentes posean picos que se solapan en el espectro de absorbancia; además, en muchos casos, se puede eliminar el efecto matriz.

Los espectros derivados de orden superior a dos son poco utilizados debido a que la relación señal-ruido disminuye a medida que aumenta el orden de derivada y, si bien se produce un aumento en el número de picos, la señal se hace aproximadamente diez veces menor al pasar de una derivada a otra de orden superior; a pesar de ello, se encuentran en la bibliografía trabajos que utilizan espectros de orden tres y cuatro<sup>5,6</sup>.

### a) Método del “cruce por cero” (CPC)

Este método consiste en medir las señales de los distintos componentes de la mezcla sobre los espectros derivados de la misma a los valores de longitudes de onda correspondientes al cruce por cero de cada componente. Las medidas realizadas en el cruce por cero de un componente son función únicamente de la concentración del otro. La concentración del segundo analito se puede determinar en otro cruce por cero, o simplemente estableciendo una curva de calibrado a cualquier longitud de onda del espectro.



**Figura 3.1:** Espectros de (a) absorción, (b) primera derivada y (c) segunda derivada de los analitos.

La Figura 3.1.(a) muestra los espectros de absorción de dos analitos, A y B; a pesar del fuerte solapamiento existente entre los espectros, la espectrofotometría derivada permite la determinación simultánea de ambos analitos.

En las Figuras 3.1.(b) y 3.1.(c), espectros de primera y segunda derivada de los analitos, se indican los cruces por cero de dichos analitos, y las distancias en las que se hace posible la determinación. Se han señalado con trazo discontinuo las alturas correspondientes a la longitud de onda donde se produce el cruce por cero de B ( $H_A$ ) y con trazo continuo las alturas correspondientes al cruce por cero de A ( $H_B$ ).

Se hace patente que a la longitud de onda a la que cruza por cero uno de los analitos la señal de la mezcla sólo depende del otro; de hecho, los espectros de la mezcla y del analito que no cruza por cero se cortan, independientemente del orden de la derivada, indicando que a esa longitud de onda la señal de la mezcla es la señal de este último analito.

Para la determinación se construyen curvas de calibrado en las que se representan las distancias  $H_B$ , que corresponden a un cruce por cero de A, frente a la concentración de B, y  $H_A$ , cruce por cero de B, frente a la concentración de A, para la cuantificación de B y A, respectivamente.

### b) Método de “espectros cocientes derivados” (ECD)

El método de los espectros cocientes derivados, propuesto por Salinas *et al.*<sup>7</sup>, se basa en aplicar la ley de Lambert-Beer a una mezcla M, formada por dos sustancias A y B a una longitud de onda j. Considerando que el paso óptico es de 1 cm se tiene:

$$A_{M,j} = \epsilon_{Aj}c_A + \epsilon_{Bj}c_B \quad (3.3)$$

donde  $A_{M,j}$  es la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda j,  $\epsilon_{Aj}$  y  $\epsilon_{Bj}$  son las absorptividades molares de los dos analitos que forman la mezcla, a la longitud de onda j; y  $c_A$  y  $c_B$  sus concentraciones.

Si esta expresión se divide por un espectro estándar del analito A de concentración  $c_A^0$  se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{A_{Mj}}{\epsilon_{Aj}c_A^0} = \frac{\epsilon_{Aj}c_A}{\epsilon_{Aj}c_A^0} + \frac{\epsilon_{Bj}c_B}{\epsilon_{Aj}c_A^0} \quad (3.4)$$

derivando se obtiene:

$$\frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{A_{Mj}}{\epsilon_{Aj}c_A^0} \right] = \frac{c_B}{c_A^0} \frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{\epsilon_{Bj}}{\epsilon_{Aj}} \right] \quad (3.5)$$

ecuación que pone de manifiesto que el espectro cociente derivado de una mezcla, formada por dos analitos A y B, es independiente de la concentración de la especie que actúa como divisor ( $c_A$ ), dependiendo directamente de la concentración de la especie que actúa como dividendo ( $c_B$ ), e inversamente de la del espectro estándar usado como divisor ( $c_A^0$ ) de dicho cociente. Dado que  $c_A^0$  es conocida, haciendo uso de esta expresión, podemos conocer la concentración del analito B en la mezcla.

Si la ecuación (3.3) se hubiera dividido por un espectro estándar de B ( $c_B^0$ ) se hubiera obtenido una expresión similar a la (3.5), pero que nos permitiría el cálculo de la concentración de A en dicha mezcla.

Salinas *et al*<sup>7</sup>. eligen como concentración óptima de analito divisor aquella que, entre los diferentes estándares de distintas concentraciones de cada analito, origina una mejor resolución de las mezclas sintéticas. Sin embargo, al estudiar los resultados obtenidos para diferentes espectros cocientes no se encuentran relaciones aparentes entre los errores cometidos y la concentración del espectro divisor. Es decir, los errores son independientes del espectro divisor, y sólo dependen de los errores instrumentales y del operario que realiza dichos espectros. Por tanto, proponer un espectro divisor óptimo es relativo, ya que dos operarios distintos pueden obtener espectros divisores óptimos diferentes sin que exista un fundamento teórico; asimismo, se hace tedioso ensayar espectros estándar como divisores.

Si se divide el espectro de una mezcla por un espectro de concentración  $\eta \cdot c_A^0$  ( $\eta =$  cte), y se deriva, se obtiene la expresión:

$$\frac{1}{\eta} \frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{A_{Mj}}{\varepsilon_{Aj} c_A^0} \right] = \frac{1}{\eta} \frac{c_B}{c_A^0} \frac{d}{d\lambda} \left[ \frac{\varepsilon_{Bj}}{\varepsilon_{Aj}} \right] \quad (3.6)$$

expresión equivalente a la (3.5) multiplicada por  $1/\eta$ . Es decir, que disminuir la concentración del espectro divisor tiene el mismo efecto que disminuir  $\eta$ , o sea, aumentar la señal. Por tanto, las curvas de calibrado aumentan sus pendientes, pero no mejoran la sensibilidad puesto que también se produce un aumento del ruido.

La obtención de mejores o peores resultados en la resolución de mezclas sintéticas no depende de la concentración del espectro estándar que actúa como divisor, sino que es función de los errores experimentales o instrumentales cometidos.

García *et al.*<sup>8</sup> comprobaron que la utilización de un espectro promediado como denominador reducía considerablemente los errores. Por ello, propusieron utilizar como espectro divisor el espectro normalizado de cada analito, obtenido dividiendo los espectros de varios estándar de diferentes concentraciones entre su concentración y promediándolos posteriormente. De esta manera se consigue, además, hacer menos tedioso el método.

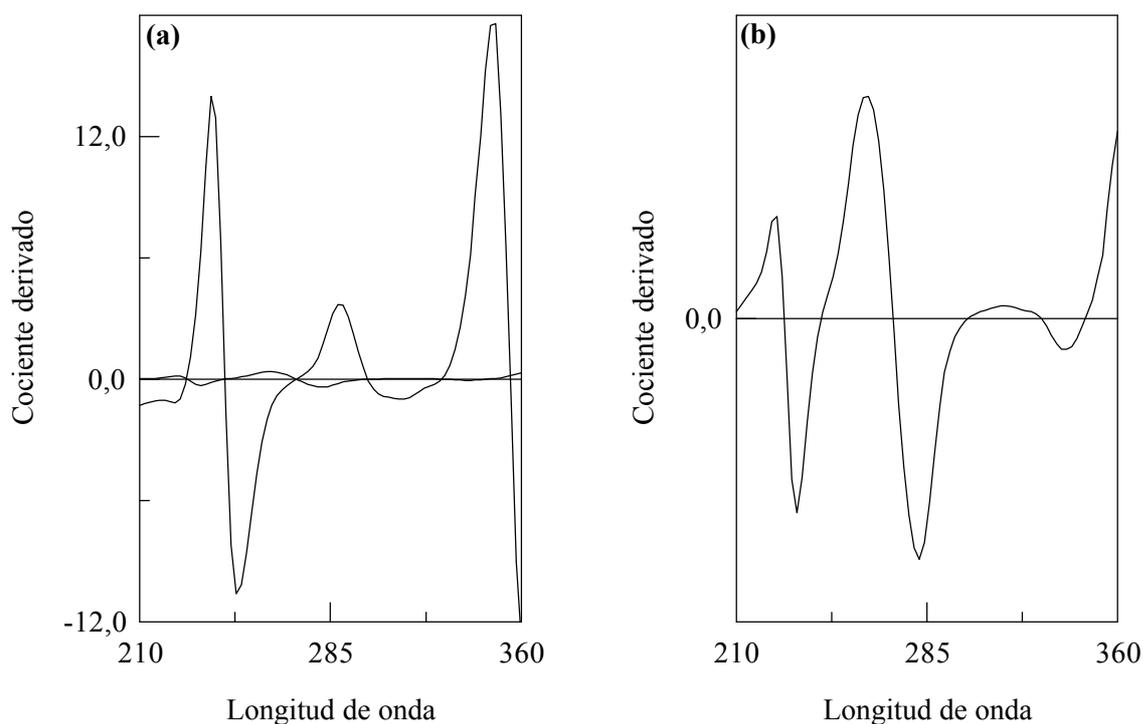
Por otro lado, si se deriva la ecuación (3.5), se obtiene:

$$\frac{d^2}{d\lambda^2} \left[ \frac{A_{Mj}}{\varepsilon_{Aj} c_A^0} \right] = \frac{c_B}{c_A^0} \frac{d^2}{d\lambda^2} \left[ \frac{\varepsilon_{Bj}}{\varepsilon_{Aj}} \right] \quad (3.7)$$

donde se puede observar que el espectro cociente de segunda derivada de la mezcla sigue dependiendo únicamente de la concentración de una de las especies, hecho que permite su determinación en mezclas binarias, con la ventaja adicional del aumento del número de picos al aumentar el orden de derivada.

Para obtener las curvas de calibrado del analito A se dividen los espectros de las disoluciones patrones de diferentes concentraciones de este analito, por el espectro normalizado del otro componente de la mezcla (B), posteriormente los espectros cocientes se derivan. La cuantificación se realiza por las medidas de máximos y/o mínimos en dichos espectros cocientes derivados<sup>9</sup>, o por la medida de la señal correspondiente a distancias entre máximos y/o mínimos vecinos. De igual forma, la cuantificación de B se realiza a partir de las medidas realizadas sobre los espectros obtenidos al dividir espectros puros del analito B por el espectro normalizado de A, con posterior derivación.

La Figura 3.2 muestra los espectros cocientes derivados de los analitos anteriormente estudiados.



**Figura 3.2:** (a) Espectro cociente ( $c_A^0$ ) derivado para la determinación de B; (b) Espectro cociente ( $c_B^0$ ) derivado para la determinación de A.

### III.1.1. Dihidralazina-Hidoclorotiazida

En este apartado se aborda la determinación simultánea de dihidralazina (DHZ) e hidrociorotiazida (HCT) mediante los métodos del cruce por cero (CPC) y espectros cocientes derivados (ECD).

Como paso previo a la determinación espectrofotométrica de DHZ y HCT se realizó el estudio de la variación de los espectros de absorción con el pH. Para ello se prepararon disoluciones de los analitos a los que se fueron añadiendo gotas de disoluciones de hidróxido sódico o ácido clorhídrico hasta obtener el pH deseado. Para valores de pH comprendidos entre 1 y 9 no se observaron variaciones en el espectro de absorción de DHZ, para valores de pH superiores a 9 la señal de la amina queda oculta debido a la elevada absorción del medio. La influencia del pH en el espectro de absorción de HCT no es tan acusada como en el caso anterior, observándose pequeñas variaciones para valores de pH muy alcalinos. Se decidió trabajar a valores de pH ácidos, estudiándose la influencia de distintas reguladoras en los espectros de absorción de los analitos.

Para  $\text{pH} = 1$  se utilizaron disoluciones 0,1 N de los ácidos clorhídrico, perclórico y sulfúrico, no observándose variaciones apreciables entre la utilización de uno u otro ácido.

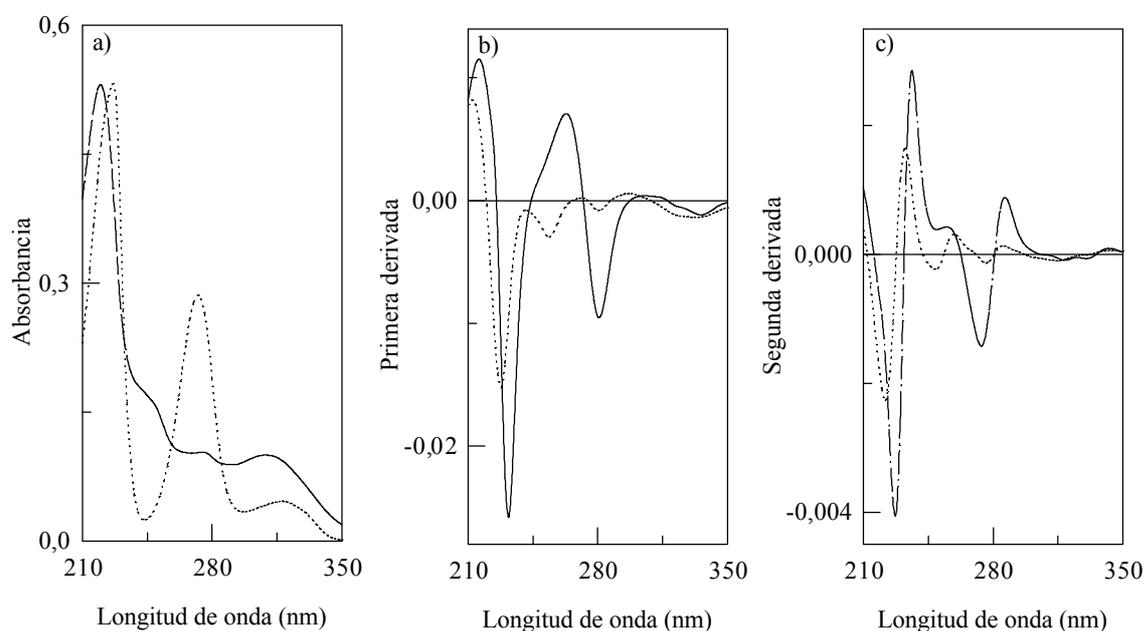
A continuación, se ensayaron disoluciones reguladoras ( $c_T = 0,04 \text{ M}$ ) de  $\text{pH} = 5$  de ácido ftálico/ftalato sódico, ácido tartárico/tartrato sódico y ácido acético/acetato sódico. Se descartó la utilización de las dos primeras disoluciones reguladoras porque proporcionaban espectros con mucho ruido como consecuencia de la fuerte absorción de la reguladora en la región ultravioleta del espectro. Los espectros obtenidos con la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico no presentaba diferencias significativas con respecto a los obtenidos con los ácidos minerales anteriormente mencionados. Se eligió como medio de trabajo HCl 0,1 N.

Teniendo en cuenta que la DHZ es soluble en agua y muy poco soluble en etanol, y que la HCT es soluble en etanol y muy poco soluble en agua, es necesario establecer el porcentaje de etanol para llevar a cabo la determinación simultánea de ambos analitos. Se estudiaron los porcentajes de etanol comprendidos entre el 4 y el 80 %, observándose escasas modificaciones en los espectros. Se eligió un porcentaje del 20 % etanol/agua como medio de trabajo adecuado para las determinaciones.

Una vez fijados el pH y el porcentaje de etanol, se procedió al estudio de la estabilidad de las disoluciones de los analitos en las condiciones de trabajo elegidas. Para ello se prepararon disoluciones de los fármacos en HCl 0,1 N y al 20 % etanol/agua, y se registraron

sus espectros cada cinco minutos durante la primera hora; cada 15 minutos la segunda; cada media hora, la tercera; a continuación, se registraron cada hora hasta hacer un total de seis, y por último a las 12, 24 y 48 horas. Durante el periodo de tiempo estudiado no se apreció la aparición de productos de hidrólisis o descomposición.

La Figura 3.3.(a) muestra los espectros de absorción de los analitos y su mezcla en las condiciones anteriormente mencionadas. La DHZ presenta un máximo de absorción a 220 nm, un hombro a 240 nm y otro máximo de menor intensidad a 316 nm; la HCT presenta dos máximos de absorción a 226 y 272 nm y otro de menor intensidad a 318 nm.



**Figura 3.3:** Espectros de (a) absorción, (b) primera derivada y (c) segunda derivada de  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  de (–) DHZ e (···) HCT en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v).

En la Figura anterior se pone de manifiesto el elevado solapamiento que presentan los espectros de los analitos en el intervalo de longitudes de onda en el que absorben radiación. La cuantificación simultánea haciendo uso de la calibración univariada que tradicionalmente se aplica a la espectrofotometría no es posible, y se hace necesario recurrir tanto a la calibración univariada aplicada a la espectrofotometría derivada (CPC y ECD), como a la calibración multivariante (PLS y MLR).

**a) Método del “cruce por cero” (CPC)**

Las Figuras 3.3.(b) y 3.3.(c) muestran los espectros de primera y segunda derivada de DHZ e HCT, siendo los cruces por cero observados de cada analito los siguientes:

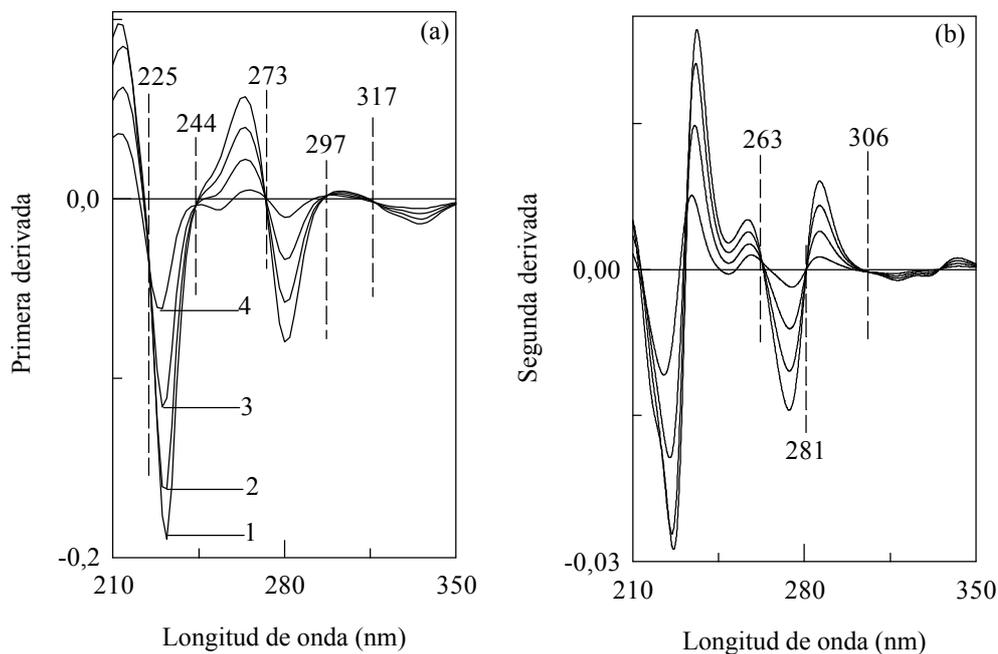
	<b>Primera derivada</b>	<b>Segunda derivada</b>
<b>DHZ</b>	225, 244, 273, 297 y 317 nm	263, 281 y 306 nm
<b>HCT</b>	266, 275 y 288 nm	224, 245, 273, 297 y 317 nm

En las Figuras 3.4 y 3.5 se presentan los espectros de primera y segunda derivada de mezclas de los analitos en estudio, que contienen concentraciones constantes de uno de ellos y variables del otro. Se puede observar que a las longitudes de onda a las que un analito cruza por cero, la señal es la misma independientemente de su concentración; cuando su concentración es constante, la señal varía ya que depende únicamente del otro analito, cuya concentración es variable.

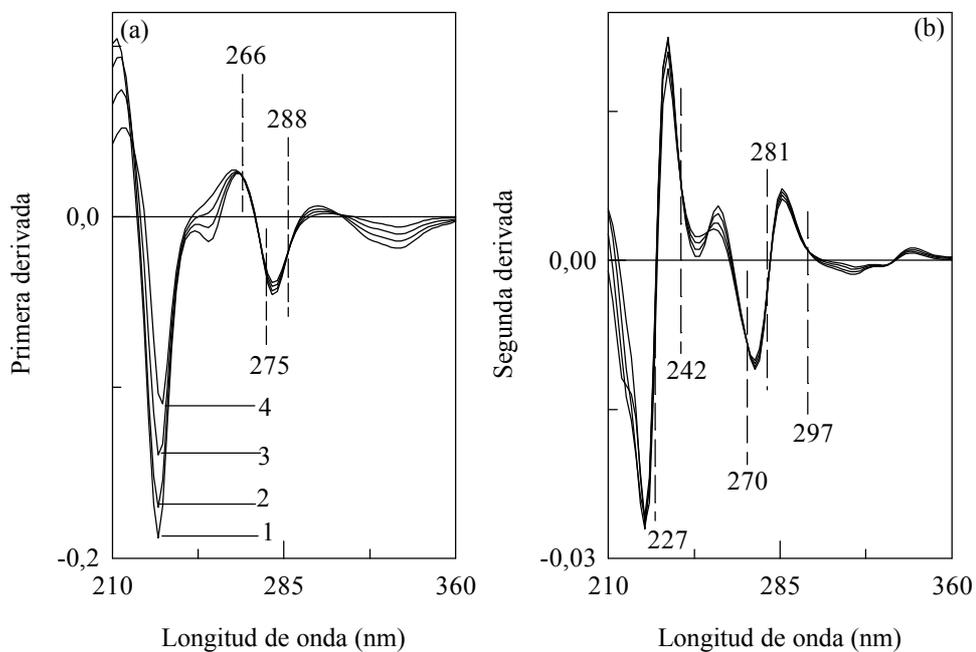
Si bien el número de longitudes de onda correspondientes a cruces por cero de cada analito es elevado, la mayoría corresponde a longitudes de onda impares, y teniendo en cuenta que el espectrofotómetro de diodos utilizado sólo puede medir a longitudes pares, habría que realizar las determinaciones a la longitud de onda par contigua al cruce por cero correspondiente. Para ello habría que construir, previamente, una curva de calibrado del analito que cruza por cero a una longitud de onda muy próxima a éste, con la consiguiente indeterminación debida al pequeño valor de la señal en esas condiciones; esta indeterminación aumenta al calcular la concentración del otro analito. Por tanto, las longitudes de onda de cruce por cero impares fueron descartadas.

Debido a lo expuesto anteriormente, de todos los cruces por cero sólo se estudiaron los siguientes:

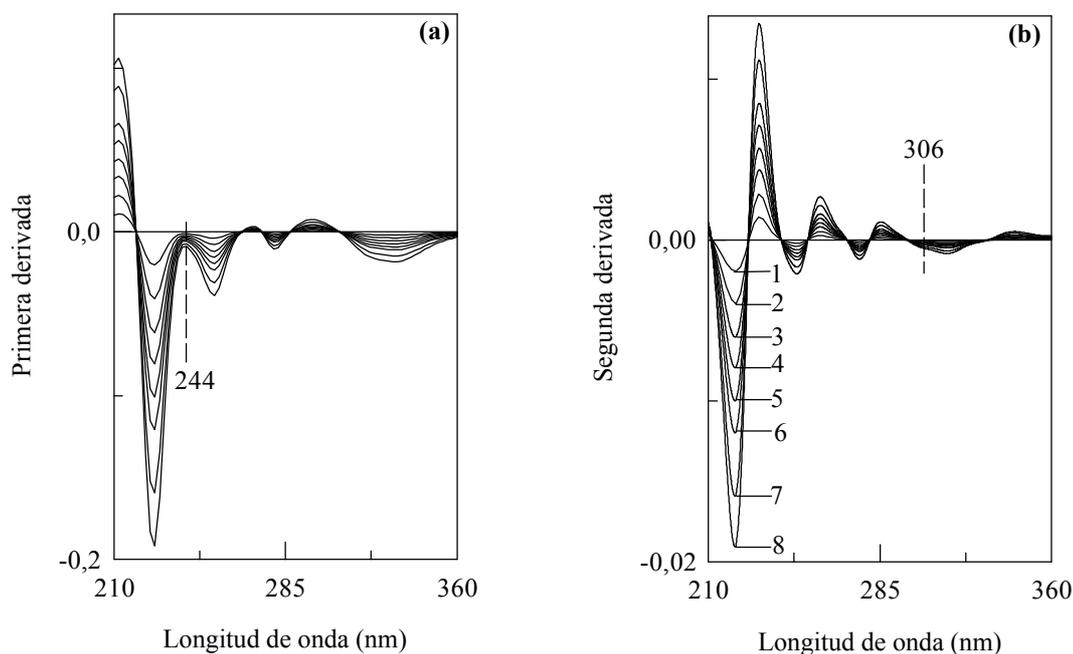
	<b>Primera derivada</b>	<b>Segunda derivada</b>
<b>DHZ</b>	244 nm	306 nm
<b>HCT</b>	266 y 288 nm	242 y 270 nm



**Figura 3.4:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v), de mezclas de 14  $\mu\text{g/ml}$  de HCT y 1) 2,00; 2) 8,00; 3) 14,00 y 4) 20,00  $\mu\text{g/ml}$  de DHZ.



**Figura 3.5:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v), de mezclas con concentración de 14  $\mu\text{g/ml}$  de DHZ y 1) 2,00; 2) 8,00; 3) 14,00 y 5) 20,00  $\mu\text{g/ml}$  de HCT, respectivamente.



**Figura 3.6:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v), de disoluciones 1) 2,00; 2) 4,01; 3) 6,01; 4) 8,02; 5) 10,02; 6) 12,02; 7) 16,03 y 8) 20,04  $\mu\text{g/ml}$  de DHZ.

En las Figuras 3.6 y 3.7, espectros de primera y segunda derivada de disoluciones estándar de cada analito, se observa que a las longitudes de onda elegidas, la señal es proporcional a la concentración de cada uno de ellos.

### *Curvas de calibrado*

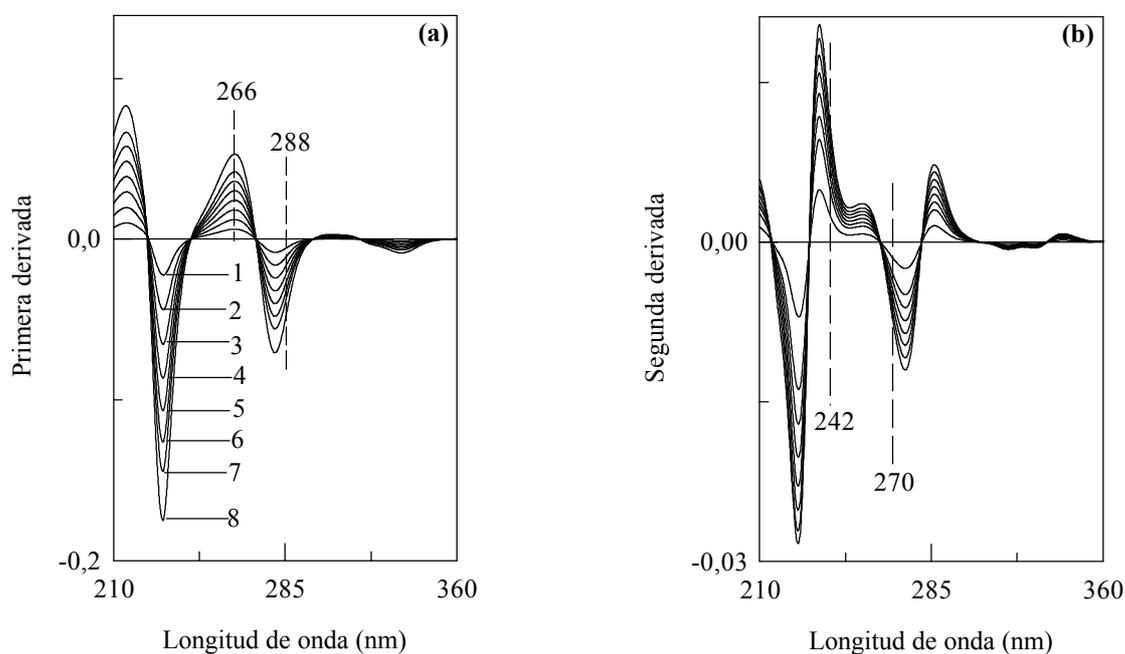
Para la construcción de las curvas de calibrado de los analitos a las longitudes de onda seleccionadas, se prepararon disoluciones estándar de los mismos con intervalos de concentración entre 2,00 y 20,04  $\text{mg.l}^{-1}$  y 2,03 y 20,26  $\text{mg.l}^{-1}$  de DHZ e HCT, respectivamente, y se registraron los correspondientes espectros de primera y segunda derivada.

La Tabla 3.1 recoge las ecuaciones de las distintas curvas de calibrado obtenidas, y sus parámetros de mayor interés. De la observación de estos últimos cabe destacar:

- Se acepta que todas las curvas pasan por el origen de coordenadas, salvo las correspondientes a 244 nm en primera derivada para DHZ y a 242 nm en segunda para HCT. En estos casos la imprecisión es muy elevada, con desviaciones estándar relativas en la ordenada en el origen superiores al 18%.

- Todas las pendientes poseen una desviación estándar relativa inferior o igual al 1%.
- Todas las curvas de calibrado presentan homoscedasticidad en el intervalo de concentración estudiado, excepto la correspondiente a la HCT en segunda derivada a 242 nm.
- Las desviaciones estándar relativas obtenidas para las diferentes curvas son siempre inferiores al 1%, excepto en el caso anterior, que presentaba heteroscedasticidad.
- De las diferentes curvas de calibrado obtenidas, las que presentan menor valor de RSE y/o RMSE para las mezclas de calibración, y menor límite de detección son:
  - DHZ: 306 nm en segunda derivada
  - HCT: 270 nm en segunda derivada

Por tanto, de todas las longitudes de onda elegidas para llevar a cabo la calibración, sólo se descarta para la etapa de predicción la correspondiente a HCT en segunda derivada a 242 nm debido a su falta de linealidad.



**Figura 3.7:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v), de disoluciones 1) 2,03; 2) 4,05; 3) 6,08; 4) 8,10; 5) 10,13; 6) 12,16; 7) 16,21 y 8) 20,26 µg/ml de HCT.

**Tabla 3.1**  
Curvas de calibrado encontradas para la determinación de DHZ e HCT por CPC

Analito	OD <sup>(a)</sup>	$\lambda$ (nm)	$b_0$	$b_1$	DSR (%)	r	LOD <sup>(b)</sup>	IL <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
DHZ	1	244	$-2,05E-4 \pm 3,72E-5$	$-4,38E-4 \pm 3,29E-6$	1,10	0,9998	0,55	2,00-20,04	0,93	1,57
DHZ	2	306	0 <sup>(b)</sup>	$-3,32E-5 \pm 1,40E-7$	0,61	0,9999	0,30	2,00-20,04	0,54	0,67
HCT	1	266	0 <sup>(b)</sup>	$3,02E-3 \pm 1,73E-5$	0,86	0,9999	0,38	2,03-20,26	0,72	0,78
HCT	1	288	0 <sup>(b)</sup>	$-1,82E-3 \pm 1,01E-5$	0,81	0,9998	0,41	2,03-20,26	0,68	0,92
HCT	2	242	$2,11E-4 \pm 8,39E-5$	$4,80E-4 \pm 5,14E-6$	1,59	0,9996	0,81	2,03-16,21	1,35	2,08
HCT	2	270	0 <sup>(b)</sup>	$5,41E-4 \pm 2,61E-6$	0,70	0,9999	0,35	2,03-20,26	0,59	0,59

<sup>(a)</sup> Orden de derivada;

<sup>(b)</sup> Se aceptó  $H_0: b_0 = 0$ ;

<sup>(c)</sup> Límite de detección ( $\text{mg.l}^{-1}$ );

<sup>(d)</sup> Intervalo de linealidad ( $\text{mg.l}^{-1}$ )

### *Mezclas sintéticas*

Para evaluar las curvas de calibrado obtenidas, se prepararon diferentes mezclas sintéticas de los analitos en estudio, y como parámetro de calidad se determinaron los RSE y RMSE.

En la Tabla 3.2 se recogen los resultados obtenidos en la determinación de DHZ en primera derivada a 244 y en segunda a 306 nm. Se observa que a esta última longitud de onda el error cometido en la determinación es menor, e independiente de la concentración de HCT en las mezclas, sin embargo, a 244 nm el error cometido aumenta a medida que lo hace la concentración de HCT, lo que implica que ésta no cruza por cero exactamente a esta longitud de onda, como parecía en un principio. Por tanto, la determinación de DHZ por CPC se puede llevar a cabo midiendo la señal a 306 nm en el espectro de segunda derivada, con valores de RSE y RMSE inferiores al 3 %, desviaciones estándar relativas por debajo del 1,5 % y errores relativos inferiores al 5 % siempre que la relación DHZ:HCT sea inferior a 1:10. La aplicación del test de Mandel<sup>9</sup> no evidencia la existencia de errores sistemáticos en la determinación ya que el punto (0, 1) se encuentra en el interior de la elipse construida.

**Tabla 3.2**

Resultados obtenidos en la determinación de DHZ por CPC en primera y segunda derivada a 244 y 306 nm respectivamente.

Cantidad añadida (mg.l <sup>-1</sup> )		DHZ encontrada (mg.l <sup>-1</sup> )		Error relativo (%)	
DHZ	HCT	244 nm	306 nm	244 nm	306 nm
2,40	2,40	2,94 ± 0,07	2,35 ± 0,03	22,61	-2,05
2,40	8,00	2,32 ± 0,07	2,47 ± 0,03	-3,52	3,12
2,40	14,00	1,57 ± 0,07	2,46 ± 0,03	-34,44	2,35
2,40	19,60	0,67 ± 0,08	2,57 ± 0,03	-71,96	7,04
8,00	2,40	9,07 ± 0,04	7,70 ± 0,02	13,36	-3,73
8,00	8,00	8,51 ± 0,04	7,72 ± 0,02	6,37	-3,56
8,00	14,00	7,43 ± 0,05	7,88 ± 0,02	-7,15	-1,50
8,00	19,60	6,37 ± 0,05	8,28 ± 0,02	-20,32	3,51
14,00	2,40	15,17 ± 0,06	13,55 ± 0,02	8,34	-3,22
14,00	8,00	14,45 ± 0,05	13,73 ± 0,02	3,22	-1,92
14,00	14,00	13,62 ± 0,05	14,01 ± 0,02	-2,74	0,09
14,00	19,60	12,24 ± 0,05	14,67 ± 0,02	-12,54	4,81
19,60	2,40	20,39 ± 0,09	19,61 ± 0,04	4,05	0,07
19,60	8,00	19,66 ± 0,08	19,50 ± 0,04	0,32	-0,53
19,60	14,00	18,95 ± 0,08	19,56 ± 0,04	-3,32	-0,19
19,60	19,60	17,63 ± 0,07	20,42 ± 0,04	-10,04	4,18
CV		1,09	0,46		
RSE				8,34	2,57
RMSE				14,02	2,62

La Tabla 3.3, muestra los resultados obtenidos en la determinación de HCT por este método, a las longitudes de onda anteriormente seleccionadas. En ella se observa que los valores más bajos de RSE y RMSE se obtienen a 288 y 270 nm. Sin embargo, a estas longitudes, los errores dependen de la concentración de DHZ; por tanto, ésta no cruza por cero a esos valores de longitudes de onda, como inicialmente se ponía de manifiesto en la Figura 3.5. Además, a 288 nm la desviación estándar relativa es alta, aunque los errores relativos son, en general, bajos; a 270 nm ocurre lo contrario, desviaciones estándar pequeñas pero errores relativos

elevados. Las otras dos longitudes de onda estudiadas (266 y 242 nm), no presentan problemas de dependencia del error con la concentración de DHZ; sin embargo, muestran en muchas ocasiones errores mayores del 5 %. Por otra parte, según el test de Mandel a 266, 288 y 242 nm existe evidencia de error sistemático. Por lo tanto, ninguna de las longitudes de onda estudiadas permite la cuantificación de HCT por CPC con garantías. Para llevar a cabo la determinación de HCT por CPC se ha optado por medir la señal a 270 nm en los espectros de segunda derivada, ya que a esta longitud de onda se obtiene la mejor recta de calibrado y no se observa evidencia de la existencia de error sistemático. No obstante, hay que resaltar que la determinación sólo es fiable para concentraciones superiores a 8,00 mg.l<sup>-1</sup> de HCT.

**Tabla 3.3**

Resultados de la determinación de HCT por el CPC en primera derivada a 266 y 288 nm, y en segunda derivada a 242 y 270 nm.

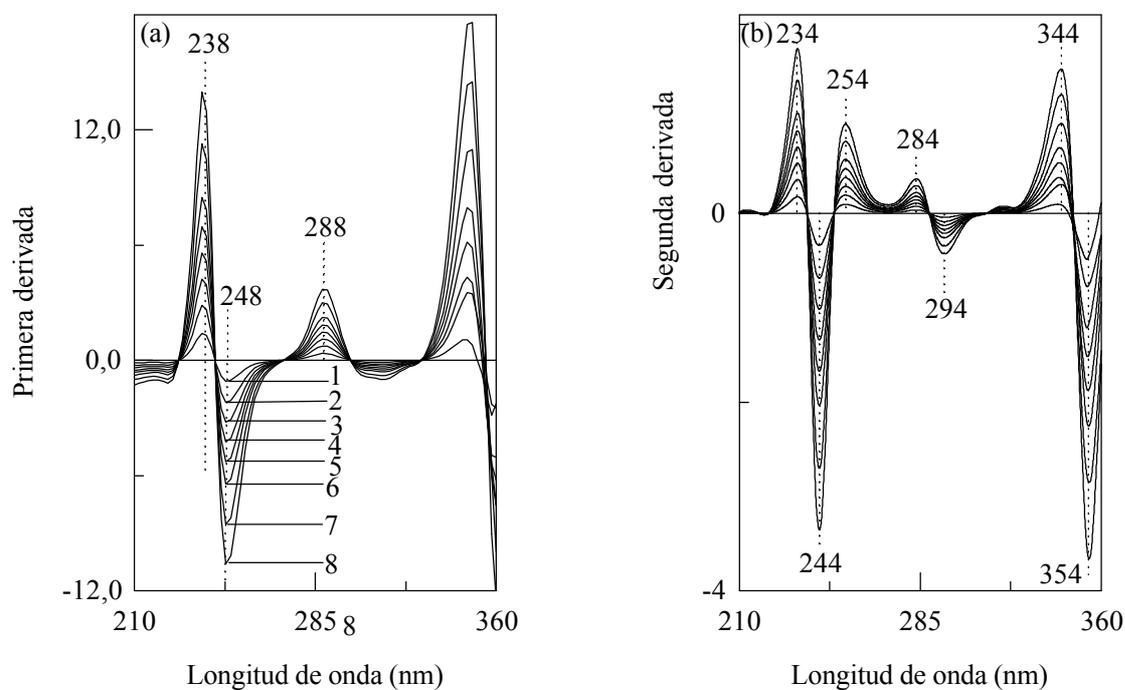
Cantidad añadida (mg.l <sup>-1</sup> )		Error relativo (%)			
DHZ	HCT	266 nm	288 nm	242 nm	270 nm
2,40	2,40	-0,45	0,04	-0,28	-0,41
2,40	8,00	4,88	4,04	5,82	3,34
2,40	14,00	4,74	4,31	4,73	3,74
2,40	19,60	4,62	4,04	3,12	3,67
8,00	2,40	-3,82	-2,39	5,64	-7,44
8,00	8,00	3,05	4,05	8,04	1,56
8,00	14,00	4,14	4,19	4,91	3,08
8,00	19,60	4,33	3,03	1,95	3,57
14,00	2,40	-7,23	-4,63	11,30	-14,17
14,00	8,00	2,56	3,50	8,28	-0,00
14,00	14,00	4,25	3,02	3,74	2,66
14,00	19,60	5,02	0,93	-0,88	3,25
19,60	2,40	-5,78	-17,64	0,08	-17,80
19,60	8,00	3,25	-1,85	2,10	-1,25
19,60	14,00	3,57	1,02	1,52	1,36
19,60	19,60	4,27	-0,58	-2,74	2,43
	CV	0,92	4,96	1,52	0,71
	RSE	4,37	2,45	3,10	2,47
	RMSE	4,12	3,42	3,58	4,07

**b) Método de los “espectros cocientes derivados” (ECP)**

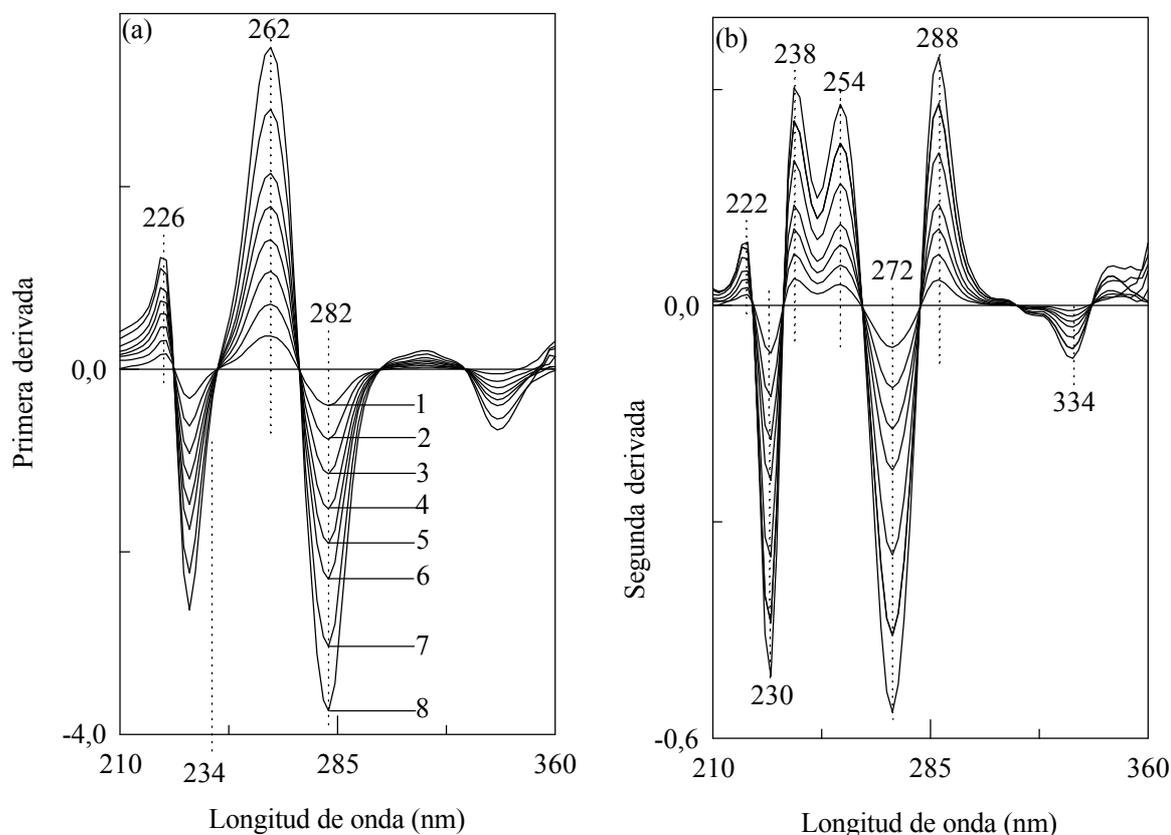
Las Figuras 3.8 y 3.9 muestran los espectros cocientes de primera y segunda derivada de diferentes disoluciones estándar de DHZ e HCT, utilizando como divisor el espectro normalizado del otro analito. En dichas figuras se muestra que las alturas a las longitudes de onda que se señalan a continuación son proporcionales a la concentración de los analitos en estudio:

	Primera derivada	Segunda derivada
<b>DHZ</b>	238, 248 y 288 nm	234,244, 254, 284, 294, 344 y 354 nm
<b>HCT</b>	226, 234, 262 y 282 nm	222, 230, 238, 254, 272, 288 y 334 nm

Existen otros picos que no se han mencionado y que corresponden a longitudes de onda donde el espectro que actúa como divisor presenta valores de absorbancia muy pequeños, lo que origina que el resultado del cociente sea un valor alto pero acompañado de un ruido elevado. Estos picos aparecen a partir de 360 nm, ya que a longitudes de onda superiores los analitos no absorben.



**Figura 3.8:** Espectros cocientes de (a) primera y (b) segunda derivada de disoluciones con 1) 2,00; 2) 4,01; 3) 6,01; 4) 8,02; 5) 10,02; 6) 12,02; 7) 16,03 y 8) 20,04  $\mu\text{g/ml}$  de DHZ, en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v) utilizando como divisor el espectro normalizado de HCT.



**Figura 3.9:** Espectros cocientes de (a) primera y (b) segunda derivada de disoluciones 1) 2,03; 2) 4,05; 3) 6,08; 4) 8,10; 5) 10,13; 6) 12,16; 7) 16,21 y 8) 20,26  $\mu\text{g/ml}$  de HCT, en HCl 0,1 N y 20% etanol/agua (v/v) utilizando como divisor el espectro normalizado de DHZ.

### *Curvas de calibrado*

Las curvas de calibrado se construyeron a partir de los espectros de disoluciones estándar de cada uno de los analitos, empleando siempre como divisor el espectro normalizado del componente de la mezcla que no se está calibrando.

Sobre los espectros cocientes de primera y segunda derivada obtenidos se midieron las alturas de los máximos y/o mínimos, y las distancias entre máximos y mínimos adyacentes, y se representaron frente a la concentración, evaluándose un total de 31 curvas de calibrado.

La Tabla 3.4 muestra los parámetros más importantes de las curvas de calibrado que se consideraron aceptables tras descartar aquellas que carecían de linealidad, o presentaban una distribución no aleatoria de los datos por originar altos valores de RSE y RMSE. También se descartaron las curvas con límites de detección elevados y intervalos de confianza amplios para las pendientes.

**Tabla 3.4**

Curvas de calibrado para la determinación simultánea de DHZ e HCT por ECD\*.

$\lambda$ (nm)	$b_0$	$b_1$	r	DSR (%)	LOD <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
DHZ (1ª Derivada)							
238	0 <sup>(b)</sup>	6,98E-1 ± 2,83E-3	1,0000	0,58	0,29	0,50	0,65
248	0 <sup>(b)</sup>	-5,30E-1 ± 2,09E-3	1,0000	0,59	0,30	0,51	0,66
288	0 <sup>(b)</sup>	1,86E-1 ± 8,83E-4	1,0000	0,69	0,49	0,48	0,63
238-248	0 <sup>(b)</sup>	1,23E-1 ± 4,92E-3	1,0000	0,59	0,30	0,58	0,67
248-288	0 <sup>(b)</sup>	7,15E-1 ± 7,93E-3	1,0000	0,60	0,30	0,50	0,65
DHZ (2ª Derivada)							
234	0 <sup>(b)</sup>	8,28E-2 ± 3,41E-4	0,9999	0,61	1,12	0,51	0,73
244	0 <sup>(b)</sup>	-1,55E-1 ± 6,15E-4	1,0000	0,57	0,29	0,47	0,65
254	0 <sup>(b)</sup>	4,51E-2 ± 1,67E-4	1,0000	0,54	0,27	0,75	0,56
270	0 <sup>(b)</sup>	4,48E-3 ± 2,70E-5	0,9999	0,88	0,45	0,89	0,94
284	0 <sup>(b)</sup>	1,72E-2 ± 7,69E-5	0,9999	0,65	0,33	0,69	1,35
294	0 <sup>(b)</sup>	-2,01E-2 ± 1,09E-4	0,9999	0,79	0,40	4,98	0,84
244-254	0 <sup>(b)</sup>	2,00E-1 ± 7,82E-4	1,0000	0,58	0,29	0,62	0,63
254-270	0 <sup>(b)</sup>	4,06E-2 ± 1,41E-4	1,0000	0,51	0,26	0,61	0,53
270-284	0 <sup>(b)</sup>	1,28E-2 ± 5,27E-5	0,9999	0,61	0,31	4,08	0,63
284-294	0 <sup>(b)</sup>	3,73E-2 ± 1,85E-4	0,9999	0,73	0,37	1,44	0,74
HCT (1ª Derivada)							
262	0 <sup>(b)</sup>	1,74E-1 ± 6,14E-4	1,0000	0,52	0,26	0,45	0,41
234-262	1,44E-1 ± 6,88E-2	3,02E-1 ± 4,22E-3	0,9994	2,07	0,34	1,72	2,74
HCT (2ª Derivada)							
254	0 <sup>(b)</sup>	1,38E-2 ± 4,86E-5	0,9999	0,51	0,26	0,44	0,45
272	0 <sup>(b)</sup>	-2,79E-2 ± 1,70E-4	0,9999	0,90	0,92	0,76	0,80
246-254	0 <sup>(b)</sup>	6,45E-3 ± 2,51E-5	1,0000	0,58	0,29	0,48	0,74
254-272	0 <sup>(b)</sup>	4,17E-2 ± 2,17E-4	0,9999	0,77	0,39	0,65	0,66
272-288	0 <sup>(b)</sup>	4,50E-2 ± 2,74E-4	0,9999	0,90	0,46	0,76	0,90

\* Método de los espectros cocientes derivados. <sup>(b)</sup> Se aceptó la hipótesis nula de ordenada en el origen igual a cero. <sup>(c)</sup> Límite de detección (mg.l<sup>-1</sup>)

Las curvas de calibrado que se recogen en dicha tabla se caracterizan por presentar: intervalos de linealidad comprendidos entre 2,00 y 20,04 mg.l<sup>-1</sup> para la DHZ y 2,03 y 20,26 mg.l<sup>-1</sup> para HCT, homoscedasticidad, intervalos de confianza para las pendientes inferiores al 1 %, y valores de RSE y RMSE inferiores al 1 %, salvo alguna excepción.

### ***Mezclas sintéticas***

La Tabla 3.5 recoge los resultados de las distintas determinaciones de DHZ, a las longitudes de onda que se indican, en mezclas sintéticas. Para DHZ los mejores resultados se obtienen cuando se mide a 254 nm o entre 254 y 270 nm en el espectro cociente de segunda derivada, que coinciden con los menores valores de RSE y RMSE en las muestras de calibración; en ambos casos se obtienen desviaciones estándar relativas pequeñas, siendo a 254 nm donde se obtienen los mejores resultados, errores relativos inferiores al 2,5 %; además, el Test de Mandel a esta longitud de onda no puso en evidencia la presencia de errores sistemáticos. Por todo lo anterior se elige para la determinación de DHZ la medida a 254 nm.

Respecto a la determinación de HCT, los resultados obtenidos al aplicar las distintas curvas de calibrado seleccionadas en la resolución de mezclas sintéticas, se observa que la mayoría de los métodos presentan desviaciones estándar relativas altas, y cuando no es así (262 nm en primera derivada) se aprecia claramente la existencia de errores sistemáticos.

Por tanto, el método de los espectros cocientes derivados no parece ser un buen método para la determinación de HCT en mezclas con DHZ. No obstante, en el supuesto de que las exigencias no sean de gran exactitud, se podría determinar entre 254 y 272 nm en el espectro cociente de segunda derivada, pues es el método que presenta menor RMSE para la predicción y no parece tener error sistemático, aunque los intervalos de confianza de las concentraciones determinadas son elevados.

**Tabla 3.5**

Resultados obtenidos en la determinación simultánea de DHZ e HCT por ECD\*

$\lambda$ (nm)	CV	RSE	RMSE
DHZ (1ª Derivada)			
238	0,79	2,16	1,85
248	1,01	1,72	1,77
288	0,54	2,88	1,79
238-248	0,50	1,94	1,73
248-288	0,42	1,98	1,62
DHZ (2ª Derivada)			
234	0,48	3,81	3,19
244	1,00	1,90	1,67
254	0,47	1,29	1,26
270	0,75	4,97	4,75
284	0,59	2,75	2,81
294	1,55	3,04	2,80
244-254	1,47	1,78	1,55
254-270	0,84	1,14	1,23
270-284	3,18	3,28	3,58
284-294	0,59	2,88	2,16
HCT (1ª Derivada)			
262	0,51	4,30	3,32
234-262	39,11	3,92	4,88
HCT (2ª Derivada)			
254	11,69	3,94	3,88
272	11,78	4,20	3,80
246-254	12,00	4,69	6,12
254-272	11,77	4,12	3,45
272-288	11,85	4,34	4,10

\*Método de los espectros cocientes derivados

### III. 1. 2. Clortalidona - Espironolactona

En el presente apartado se aborda la resolución de la mezcla de diuréticos formada por la clortalidona (CLT) y la espironolactona (SP).

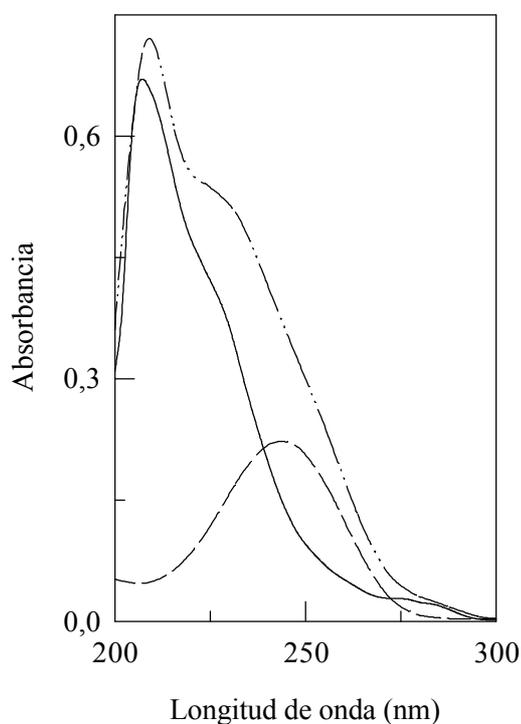
Como paso previo a la determinación espectrofotométrica de CLT y SP se realizó el estudio de la variación de los espectros de absorción en función del pH. Para ello se prepararon disoluciones de los analitos a los que se fueron añadiendo gotas de disoluciones de hidróxido sódico o ácido clorhídrico hasta obtener el pH deseado, no observándose cambios apreciables en los distintos espectros. Se decidió trabajar a pH alcalinos, estudiándose la influencia de distintas reguladoras ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HBO}_3^-/\text{BO}_3^{2-}$ , 0,04 M y pH 10,0 en todos los casos) sin que se observaran diferencias apreciables en los espectros de absorción de los analitos. Se eligió como medio de trabajo  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  0,04 M y pH 10,0.

Teniendo en cuenta la diferencia de solubilidades de los analitos se realiza el estudio de la influencia del porcentaje de etanol en los espectros de absorción, observándose escasas modificaciones en los espectros, eligiéndose 20 % etanol/agua como medio de trabajo adecuado para las determinaciones. En estas condiciones experimentales, las disoluciones eran estables durante 48 horas.

En la Figura 3.10 se recogen los espectros de absorción de los analitos individuales y el espectro de la mezcla en las condiciones anteriormente mencionadas. CLT presenta un máximo de absorción a 210 nm, un hombro en 230 nm y otro máximo de menor intensidad a 274 nm; la SP presenta un máximo de absorción a 244 nm. Se pone de manifiesto el elevado solapamiento espectral de los analitos en el intervalo donde absorben radiación. Por tanto, esta mezcla, como la anterior, se resolverá haciendo uso de los métodos del cruce por cero y de los espectros cocientes derivados.

#### a) Método del “cruce por cero”

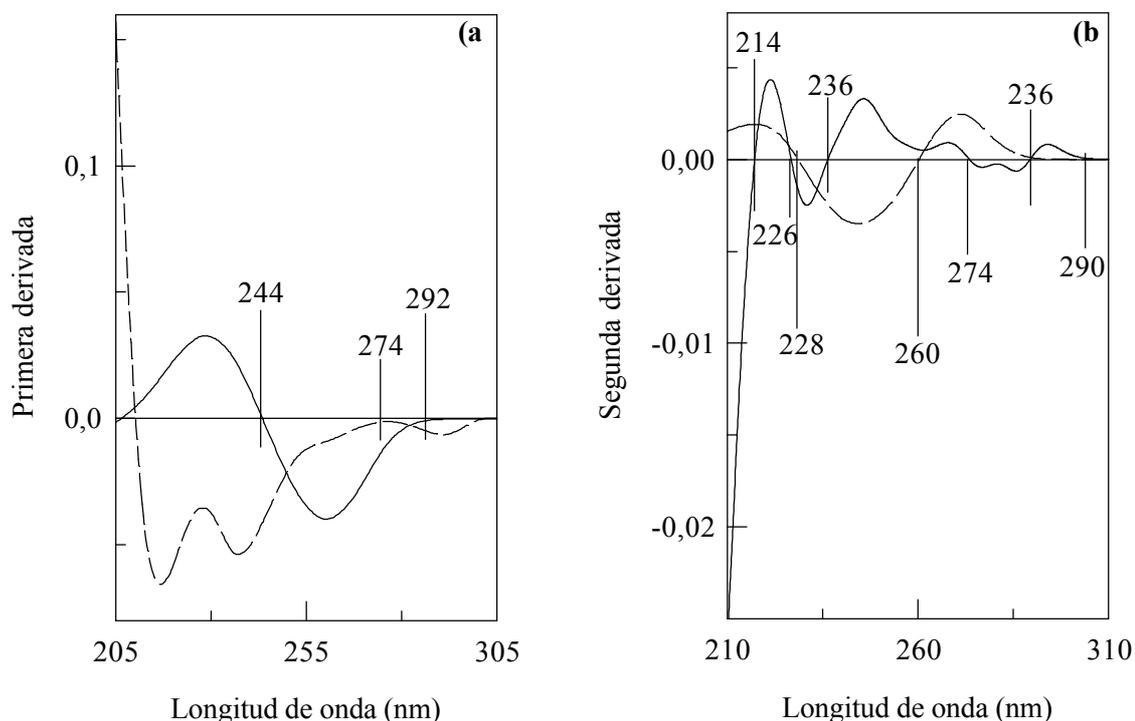
La Figura 3.11 muestra los espectros derivados de los analitos. En ella se puede observar que el espectro de primera derivada de CLT es siempre menor que cero, no existiendo ninguna longitud de onda a la que se produzca un cruce por cero; también se puede observar que a 274 nm el valor de la señal prácticamente se anula. En segunda derivada el espectro de CLT cruza por cero a 214, 226, 236, 274 y 290 nm. Estas longitudes de onda permitirán la cuantificación de SP.



**Figura 3.10:** Espectros de absorción de disoluciones de 4,04 mg.l<sup>-1</sup> de CLT (—); 7,92 mg.l<sup>-1</sup> de SP (---) y su mezcla (— · —) en NH<sub>3</sub>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v).

En dicha Figura también se puede observar que el espectro de primera derivada de SP cruza por cero a 244 y 292 nm, y a 228, 260 y 300 nm en segunda derivada. Se estudió, por tanto, la determinación de CLT a 244 y 292 nm en el espectro de primera derivada, y a 228, 260 y 300 nm en el de segunda.

	Primera derivada	Segunda derivada
CLT	-	214, 226, 236, 274, 290 y 309 nm
SP	244 y 292 nm	228, 260 y 300 nm



**Figura 3.11:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada en en  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v) de  $4,04 \text{ mg.l}^{-1}$  CLT (—) y  $7,92 \text{ mg.l}^{-1}$  de SP (---).

### Curvas de calibrado

Para la construcción de las curvas de calibrado se prepararon disoluciones estándar de los analitos con intervalos de concentración comprendidos entre  $8,94$  y  $20,86 \text{ mg.l}^{-1}$  para CLT y entre  $3,12$  y  $21,84 \text{ mg.l}^{-1}$ , para SP, y se registraron los correspondientes espectros.

La Tabla 3.6 muestra los principales parámetros de la regresión de las rectas de calibrado con valores de RSE y RMSE inferiores al 5 %, destacando que: todas las curvas son lineales en el intervalo de concentraciones estudiado, salvo CLT en segunda derivada a  $228 \text{ nm}$ , que es lineal hasta  $23,84 \text{ mg.l}^{-1}$ ; todas presentan homoscedasticidad en el intervalo de concentraciones en el que son lineales; los menores valores de RSE y RMSE se obtienen para la determinación de CLT; los límites de detección son inferiores a  $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , el límite de detección más bajo,  $0,34$ , se obtiene en la determinación de CLT en el espectro de primera derivada a  $274 \text{ nm}$ .

**Tabla 3.6**

Curvas de calibrado encontradas para la determinación de CLT y SP por CPC\*.

Analito	OD <sup>(a)</sup>	$\lambda$ (nm)	$b_0$	$b_1$	r	LD <sup>(b)</sup>	IL <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
CLT	1	244	-1,17E-3 ± 3,92E-4	-2,14E-3 ± 1,96E-5	0,9998	0,77	8,94-26,86	0,46	0,445
CLT	1	292	-1,29E-4 ± 1,05E-4	-3,21E-4 ± 5,21E-6	0,9995	0,76	8,94-23,84	0,83	0,75
CLT	2	300	-2,88E-6 ± 2,16E-6	1,41E-5 ± 1,08E-7	0,9999	0,36	8,94-26,86	0,39	0,37
SP	1	274	6,22E-5 ± 8,17E-5	-7,50E-4 ± 4,56E-6	0,9999	0,34	3,12-21,84	0,52	0,64
SP	2	226	6,75E-6 ± 1,03E-5	4,15E-5 ± 5,77E-7	0,9997	0,79	3,12-21,84	1,19	1,29
SP	2	236	-1,95E-6 ± 2,98E-5	-1,75E-4 ± 1,66E-6	0,9997	0,80	3,12-21,84	1,21	1,48
SP	2	290	-5,63E-7 ± 8,11E-7	5,07E-6 ± 4,52E-8	0,9999	0,51	3,12-21,84	0,77	1,40

\*Método del cruce por cero. <sup>(a)</sup> Orden de derivada; <sup>(b)</sup> Límite de detección (mg.l<sup>-1</sup>); <sup>(c)</sup> Intervalo de linealidad (mg.l<sup>-1</sup>)

### *Mezclas sintéticas*

En la Tabla 3.7 se recogen los resultados obtenidos en la determinación de CLT a las longitudes de onda antes señaladas. En dicha Tabla puede observarse que para CLT, los RSE y RMSE más bajos se obtienen para la determinación a 244 nm en el espectro de primera derivada; también se aprecia la existencia de errores sistemáticos, pues en la mayoría de las mezclas los errores obtenidos se encuentran en el mismo sentido.

La determinación de SP no se puede realizar satisfactoriamente, pues para las longitudes de onda propuestas, los RSE y RMSE calculados son superiores al 5 %, y cuando no es así, existen evidencias de error sistemático.

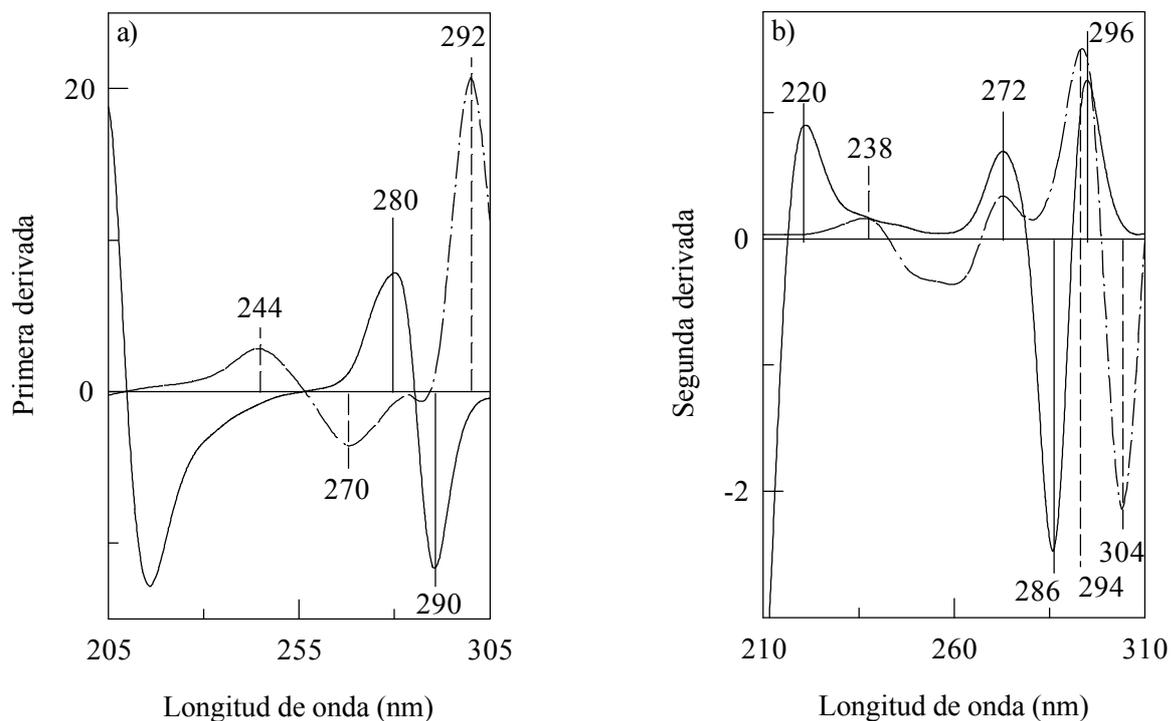
**Tabla 3.7**

Resultados de la determinación de CLT por CPC\* en primera derivada a 244 y 292 nm y en segunda derivada a 300 nm.

CLT (mg.l <sup>-1</sup> )	Cantidad encontrada (mg.l <sup>-1</sup> )			Error relativo (%)		
	244 nm	292 nm	300 nm	244 nm	292 nm	300 nm
8,94	9,26	9,65	8,38	3,58	7,97	-6,25
8,94	9,27	9,37	8,10	3,70	4,81	-9,36
8,94	8,52	8,64	8,21	-4,66	-3,36	-8,21
11,92	12,13	12,20	11,33	1,72	2,38	-4,98
11,92	21,30	12,55	11,34	3,21	5,29	-4,87
11,92	12,81	12,82	10,96	7,49	7,54	-8,02
14,90	14,98	15,07	14,86	0,51	1,11	-0,27
14,90	15,23	15,27	14,48	2,21	2,51	-2,81
14,90	15,35	15,71	14,43	3,00	5,42	-3,13
17,88	18,12	18,15	17,71	1,37	1,51	-0,93
17,88	18,08	18,39	17,44	1,14	2,86	-2,46
17,88	18,16	18,38	17,41	1,56	2,78	-2,64
20,86	21,29	21,91	20,51	2,05	5,05	-1,70
			RSE	2,74	4,10	3,89
			RMSE	2,78	4,05	4,28

**b) Método de los “espectros cocientes derivados” (ECD)**

Con respecto al método de los espectros cocientes derivados, la Figura 3.12 pone de manifiesto que cuando se derivan los espectros cocientes resultantes de dividir los espectros de las mezclas por el espectro normalizado de la SP, las señales a 280 y 290 nm en primera derivada y a 272, 286 y 296 nm en segunda, son proporcionales a la concentración de CLT, mientras que cuando el divisor es un espectro normalizado de la CLT, la SP puede ser determinada a 244 y 270 nm en primera derivada y a 238, 256 y 276 nm en segunda.



**Figura 3.12:** Espectros cocientes de a) primera y b) segunda derivada en en  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v) de 4,04  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  CLT (—) y 7,92  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de SP (---), utilizando como divisor los espectros normalizados de SP y CLT, respectivamente.

### Curvas de calibrado

La Tabla 3.8 recoge, como en los casos anteriores, las ecuaciones de las distintas calibraciones efectuadas y sus parámetros de mayor interés. Hay que destacar la linealidad y homoscedasticidad en el intervalo de concentraciones estudiado. Los menores valores de RSE y RMSE, así como el límite de detección más bajo (0,42  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) corresponden a la determinación de SP.

Tabla 3.8

Curvas de calibrado encontradas para la determinación de DHZ e HCT por ECD\*.

Analito	OD <sup>(a)</sup>	$\lambda$ (nm)	$b_0$	$b_1$	r	LD <sup>(b)</sup>	IL <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
CLT	1	290	-7,11E-2 ± 1,85E-1	-4,01E-1 ± 9,23E-3	0,9990	1,1	8,94-26,86	1,17	1,10
CLT	1	280-290	5,51E-1 ± 4,63E-1	6,38E-1 ± 2,31E-2	0,9974	1,7	8,94-26,86	1,84	1,98
CLT	2	272	1,98E-3 ± 2,14E-2	2,67E-2 ± 1,02E-3	0,9978	1,7	8,94-26,86	4,42	2,39
CLT	2	286	-7,47E-2 ± 5,95E-2	-7,56E-2 ± 2,97E-2	0,9969	1,5	8,94-26,86	1,99	2,13
CLT	2	296	1,65E-2 ± 1,63E-2	3,97E-2 ± 8,13E-4	0,9992	0,98	8,94-26,86	1,06	0,99
CLT	2	272-286	1,16E-1 ± 9,76E-2	1,01E-1 ± 4,87E-1	0,9954	2,3	8,94-26,86	2,45	2,62
CLT	2	286-296	-9,14E-2 ± 6,71E-2	1,15E-1 ± 3,35E-3	0,9983	1,4	8,94-26,86	1,48	1,50
SP	1	244	2,20E-4 ± 2,17E-2	1,33E-1 ± 1,21E-3	0,9999	0,51	3,12-21,84	0,77	0,69
SP	1	270	2,24E-2 ± 2,91E-2	-1,82E-1 ± 1,62E-3	0,9999	0,51	3,12-21,84	0,76	1,04
SP	1	244-270	-2,18E-2 ± 4,93E-2	-3,15E-1 ± 2,75E-3	0,9999	0,50	3,12-21,84	0,75	0,88
SP	2	238	3,05E-5 ± 1,18E-3	7,44E-3 ± 6,60E-5	0,9999	0,42	3,12-21,84	0,75	0,71
SP	2	256	2,63E-5 ± 2,92E-3	-1,63E-2 ± 1,63E-4	0,9999	0,57	3,12-21,84	0,85	1,09
SP	2	276	2,52E-3 ± 2,78E-3	1,68E-2 ± 1,55E-4	0,9999	0,52	3,12-21,84	0,78	1,08
SP	2	238-256	-2,61E-3 ± 4,03E-3	2,38E-2 ± 2,25E-4	0,9999	0,54	3,12-21,84	0,81	0,93
SP	2	256-276	-1,35E-4 ± 5,38E-3	3,31E-2 ± 3,004	0,9999	0,52	3,12-21,84	0,77	0,73

\*Método de los espectros cocientes derivados. <sup>(a)</sup> Orden de derivada. <sup>(b)</sup> Límite de detección (mg.l<sup>-1</sup>). <sup>(c)</sup> Intervalo de linealidad (mg.l<sup>-1</sup>)

**Mezclas sintéticas**

Las Tablas 3.9 y 3.10 recogen los resultados obtenidos en la determinación de CLT y SP, respectivamente, en mezclas. Se puede observar que los RSE más bajos corresponden a la determinación de CLT en el espectro de segunda derivada a 296 nm; y en el caso de la SP en el espectro de primera derivada entre 244 y 270 nm. Sin embargo, cuando se hace la predicción en las mejores condiciones, se observa que se cometen errores relativos por exceso o por defecto, y cuando no es así toman valores superiores al 5 %.

**Tabla 3.9**  
Resultados obtenidos en la determinación de CLT en mezclas por ECD\*

CLT (mg.l <sup>-1</sup> )	1D <sup>a</sup>		2D <sup>b</sup>		
	290	280-290	286	296	286-296
8,94	1,93	-1,57	-3,35	-2,59	-3,15
8,94	3,40	-12,41	-13,72	-2,80	-10,01
8,94	-6,43	-11,66	-15,06	-11,42	-13,86
11,92	1,88	-8,16	-8,89	-1,96	-6,55
11,92	4,36	-6,11	-6,75	-0,37	-4,60
11,92	4,92	-2,57	-2,47	0,95	-1,34
14,90	1,33	-1,12	-1,35	-0,24	-1,01
14,90	2,30	-1,87	-2,16	-0,48	-1,62
14,90	3,10	1,22	0,67	0,37	0,52
17,88	1,48	0,81	0,89	0,85	0,84
17,88	2,36	-0,70	-0,97	-0,11	-0,71
17,88	2,18	-1,91	-2,17	0,16	-1,41
20,86	5,26	1,08	1,61	2,74	1,97
RSE	3,37	3,95	4,59	2,42	3,69
RMSE	3,15	3,94	4,62	1,93	3,66

\* Método de los espectros cocientes derivados. <sup>a</sup> Primera derivada. <sup>b</sup> Segunda derivada.

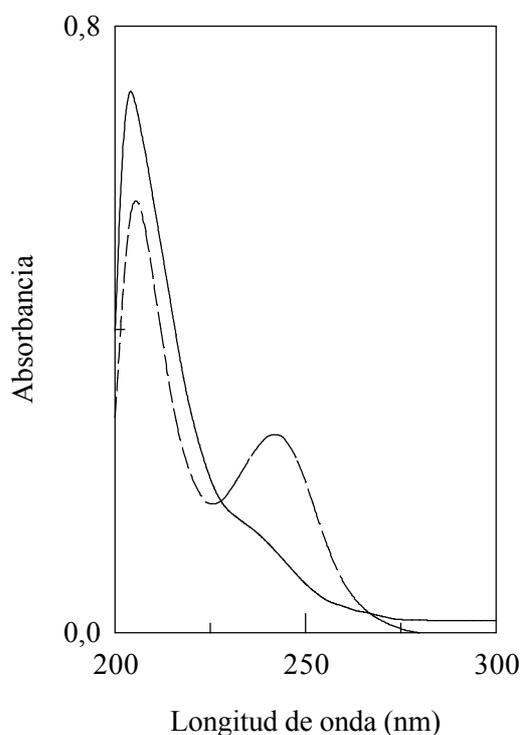
**Tabla 3.10**  
Resultados obtenidos en la determinación de SP en mezclas por ECD\*

SP (mg.l <sup>-1</sup> )	Error relativo (%)							
	1D <sup>a</sup>			2D <sup>b</sup>				
	244	270	244-270	238	256	276	238-256	256-276
21,84	0,46	-1,12	-0,42	0,91	-1,81	1,52	-0,96	-0,12
21,84	-0,73	-0,42	-0,52	-0,18	-1,14	-0,50	-0,84	-0,81
12,48	1,18	1,79	1,55	5,03	-2,59	3,01	-0,21	0,26
15,6	-1,66	-0,83	-1,16	-1,03	-1,12	-2,01	-1,10	-1,57
18,72	0,06	0,29	0,22	0,60	-0,41	-0,39	-0,10	-0,40
21,84	-0,3	-1,18	-0,78	-0,36	0,18	-0,40	0,00	-0,11
3,12	-3,29	1,52	-0,53	0,22	0,84	-7,72	0,65	-3,49
9,36	-1,62	-0,07	-0,71	-0,03	-0,89	-1,97	-0,63	-1,43
15,6	-0,28	-1,01	-0,68	0,86	-2,41	0,58	-1,39	-0,89
3,12	-1,23	2,76	1,05	-0,80	3,60	-4,06	2,22	-0,27
9,36	-0,8	0,49	-0,04	0,95	-1,12	-1,38	-0,48	-1,25
12,48	-1,73	-0,83	-1,19	-0,41	-2,12	-2,34	-1,59	-2,23
12,48	-3,34	-2,89	-3,06	-5,43	-2,44	-5,42	-3,38	-3,94
RSE	1,16	1,14	1,03	1,82	1,54	1,89	1,14	1,28
RMSE	1,28	1,17	0,92	1,29	1,59	2,41	1,04	1,29

\*Método de los espectros cocientes derivados. <sup>a</sup>Primera derivada. <sup>b</sup>Segunda derivada.

### III. 1. 3. Fenitoína - Fenobarbital

En el presente apartado se aborda la resolución de la mezcla de dos barbitúricos, la fenitoína (DPH) y el fenobarbital (PB).



**Figura 3.13:** Espectros de absorción de disoluciones de 6,18 mg.l<sup>-1</sup> de DPH (—) y 5,88 mg.l<sup>-1</sup> de PB (---) en NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v).

En primer lugar, se realizó el estudio de la variación de los espectros de absorción de DPH y PB en función del pH. Para ello, se prepararon disoluciones de los analitos a los que se fueron añadiendo gotas de disoluciones de hidróxido sódico o ácido clorhídrico hasta obtener el pH deseado. Se pudo observar un aumento de la absorbancia para pH alcalinos, por lo que a continuación se estudió la influencia de distintas reguladoras de pH 10,0 y concentración 0,04 M: NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y HBO<sub>3</sub><sup>-</sup>/BO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Para la disolución reguladora de carbonato/bicarbonato los espectros presentan ruido en la zona baja del espectro, mientras que para la disolución reguladora de ácido bórico/borato la absorbancia en esta zona es muy elevada, eligiéndose como medio de trabajo NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,04 M y pH 10,0.

Teniendo en cuenta la diferencia de solubilidades de los analitos se realiza el estudio de la influencia del porcentaje de etanol en los espectros de absorción, observándose escasas modificaciones en los espectros, eligiéndose 20 % etanol/agua como medio de trabajo adecuado

para las determinaciones. En estas condiciones experimentales las disoluciones eran estables durante 48 horas.

En la Figura 3.13 se muestran los espectros de absorción individuales de los analitos, donde se puede observar que ambos absorben radiación en la misma zona del espectro, presentando un máximo de absorción común situado a 210 nm, el espectro de DPH también presenta un hombro a 240 nm y el espectro de PB otro máximo situado a 244 nm.

#### a) Método del “cruce por cero” (CPC)

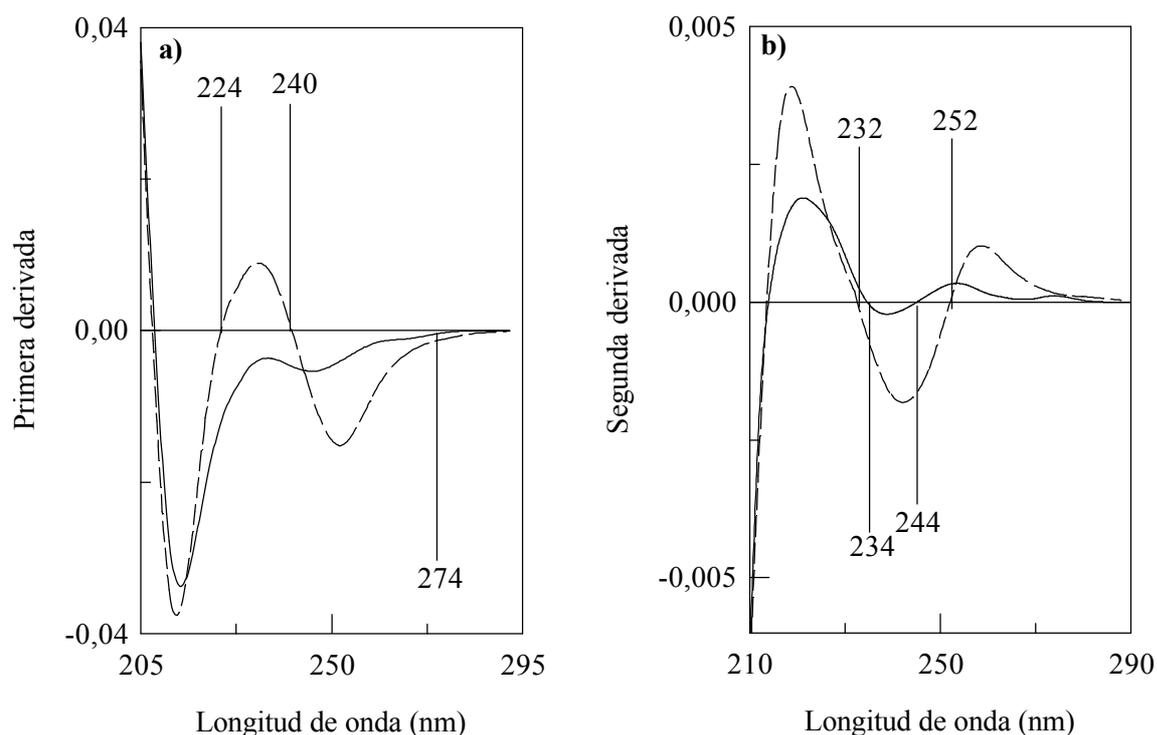
En la Figura 3.14.(a), espectros de primera derivada de los analitos, se puede observar que no existe ninguna longitud de onda a la que el espectro de DPH cruce por cero. Sin embargo, el espectro de primera derivada de PB cruza por cero a 224 y 240 nm por tanto, estas longitudes de onda permitirán la determinación de DPH en el espectro de primera derivada.

En la Figura 3.14.(b) se puede observar que el espectro de segunda derivada de DPH cruza por cero a 234 y 244 nm, mientras que el espectro de PB lo hace a 232 y 252 nm. Estas longitudes de onda serán las utilizadas para estudiar la posible determinación de DPH y PB por el método del cruce por cero.

#### *Curvas de calibrado*

Para la construcción de las curvas de calibrado de los analitos se prepararon disoluciones estándar de los analitos con intervalos de concentración comprendidos entre 2,06 y 18,50 mg.l<sup>-1</sup> y entre 1,96 y 17,60 mg.l<sup>-1</sup>, para DPH y PB, respectivamente, y se registraron los correspondientes espectros de absorción que posteriormente se derivaron.

La Tabla 3.11 muestra los principales parámetros de la regresión de las rectas de calibrado a las longitudes de onda antes señaladas, así como los valores de RSE y RMSE encontrados para las mismas. Cabe destacar que la dependencia es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, intervalo en el que presentan homoscedaticidad. Se acepta la hipótesis nula de ordenada en el origen igual a cero para la determinación de DPH a 224 nm en el espectro de primera derivada y a 232 y 252 nm en el espectro de segunda derivada; y para la determinación de PB a 244 nm en el espectro de segunda derivada.



**Figura 3.14:** Espectros de a) primera y b) segunda derivada de 6,18 mg.l<sup>-1</sup> de DPH (—) y 5,88 mg.l<sup>-1</sup> de PB (---) en NH<sub>3</sub>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v).

**Tabla 3.11**

Curvas de calibrado encontradas para la determinación de DPH y PB por CPC\*.

Analito	OD <sup>(a)</sup>	λ nm)	b <sub>0</sub>	b <sub>1</sub>	r	LD <sup>(b)</sup>	IL <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
DPH	1	224	-7,37E-4 ± 3,11E-4	-2,25E-3 ± 2,63E-5	0,9998	0,46	2,06-18,54	0,90	1,69
DPH	1	240	3,29E-3 ± 7,04E-4	2,51E-3 ± 5,96E-5	0,9992	0,33	2,06-18,54	0,53	0,68
DPH	2	232	2,18E-5 ± 3,67E-5	7,54E-5 ± 3,11E-6	0,9980	0,53	2,06-18,54	2,26	4,96
DPH	2	252	8,61E-5 ± 5,25E-6	5,30E-5 ± 4,44E-7	0,9999	1,90	2,06-18,54	1,64	2,45
PB	2	234	7,38E-5 ± 2,71E-5	-5,57E-5 ± 2,22E-6	0,9984	0,066	1,96-17,64	2,72	4,47
PB	2	244	4,80E-5 ± 3,52E-5	-3,20E-4 ± 3,13E-6	0,9999	0,33	1,96-17,64	0,86	1,83

\* Método del cruce por cero. <sup>(a)</sup> Orden de derivada. <sup>(b)</sup> Límite de detección (mg.l<sup>-1</sup>). <sup>(c)</sup> Intervalo de linealidad (mg.l<sup>-1</sup>)

Los valores de RSE y RMSE son inferiores al 5 % en todos los casos, correspondiendo los menores a la determinación de DPH a 240 nm en el espectro de primera derivada.

### ***Mezclas sintéticas***

Para evaluar las curvas de calibrado obtenidas se prepararon diferentes mezclas sintéticas de los analitos en estudio y se le aplicaron las curvas de calibrado anteriormente mencionadas. La predicción de PB puede hacerse a 244 nm en el espectro de segunda derivada, pues se obtienen RSE (1,94) y RMSE (3,42) inferiores al 5%. Sin embargo, no existe ninguna longitud de onda que permita la determinación de DPH con valores de estos parámetros inferiores al 5 %.

#### **b) Método de los “espectros cocientes derivados” (ECD)**

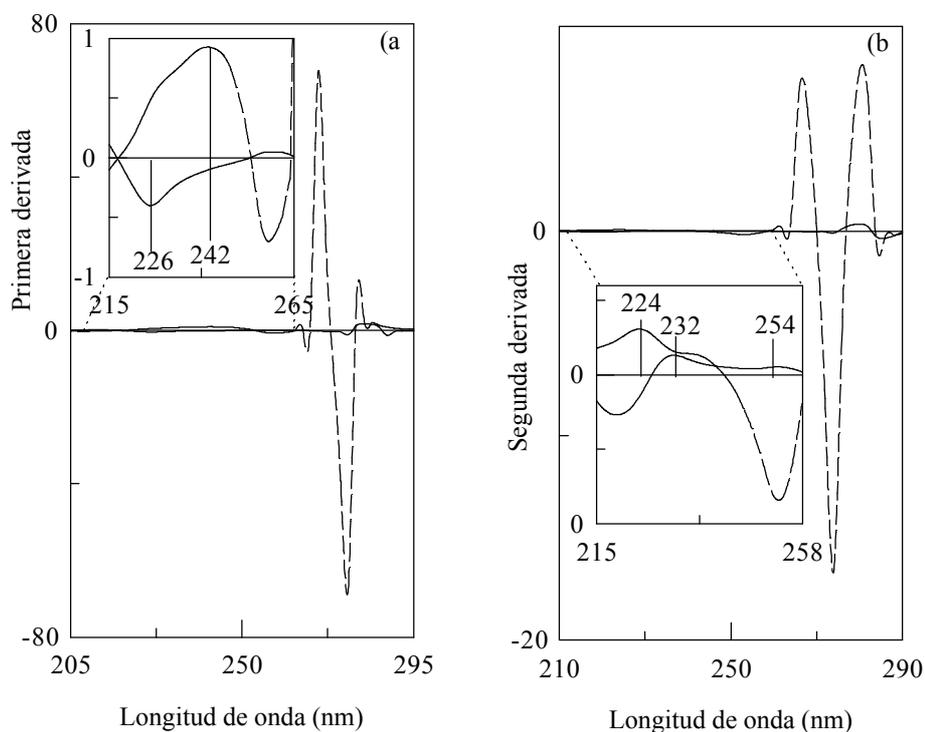
La Figura 3.15 muestra los espectros cocientes derivados de DPH y PB. En el espectro cociente de primera derivada de DPH, utilizando como divisor el espectro normalizado de PB, se puede observar un mínimo situado a 226 nm, y en el espectro cociente de segunda derivada se observa un máximo a 232 nm.

En el espectro cociente de primera derivada de PB, utilizando como divisor el espectro normalizado de DPH, se puede observar un máximo situado a 242 nm y un mínimo a 260 nm; mientras que en el espectro cociente de segunda derivada se observan un máximo a 224 nm y un mínimo a 254 nm.

### ***Curvas de calibrado***

Para la construcción de las curvas de calibrado de los analitos a las longitudes de onda seleccionadas, se prepararon disoluciones estándar de los mismos con intervalos de concentración entre 2,14 y 12,84 mg.l<sup>-1</sup> y 2,10 y 12,58 mg.l<sup>-1</sup> de DPH y PB, respectivamente, y se registraron los correspondientes espectros que posteriormente se derivaron.

La Tabla 3.12 recoge las ecuaciones de las distintas calibraciones efectuadas, y sus parámetros de mayor interés. Hay que destacar que todas las curvas son lineales y presentan homoscedasticidad, en el intervalo de concentraciones estudiado. Se acepta la hipótesis nula de ordenada en el origen igual a cero para la determinación de DPH a 226 nm en el espectro de primera derivada y a 232 nm en segunda; y para la determinación de PB a 242 nm en primera derivada y a 224 nm entre 224 y 254 nm en el espectro de segunda derivada. Los menores valores de RSE y RMSE se obtienen para la determinación de DPH en el espectro de primera derivada a 226 nm. El límite de detección más bajo, 0,20 mg.l<sup>-1</sup>, se obtienen para la determinación de PB en el espectro de primera derivada a 242 nm.



**Figura 3.15:** Espectros cocientes de a) primera y b) segunda derivada en  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  0,04 M, pH 10,0 y 20% etanol/agua (v/v) de DPH (—) y PB (---), utilizando como divisor los espectros normalizados de PB y DPH, respectivamente.

**Tabla 3.12**

Curvas de calibrado encontradas para la determinación de DPH y PB por ECD\*

Analito	OD <sup>(a)</sup>	$\lambda$ (nm)	$b_0$	$b_1$	r	LD <sup>(b)</sup>	IL <sup>(c)</sup>	RSE	RMSE
DPH	1	226	$-2,22\text{E-}2 \pm 1,18\text{E-}2$	$5,70\text{E-}2 \pm 9,97\text{E-}4$	0,9995	0,45	2,06-18,54	1,64	2,45
DPH	2	232	$9,30\text{E-}4 \pm 1,35\text{E-}3$	$3,45\text{E-}3 \pm 1,14\text{E-}4$	0,9984	0,46	2,06-18,54	2,77	4,13
PB	1	242	$-5,79\text{E-}3 \pm 6,11\text{E-}2$	$1,81\text{E-}1 \pm 5,44\text{E-}3$	0,9986	0,20	1,96-17,64	2,50	3,72
PB	2	224	$-4,95\text{E-}3 \pm 3,43\text{E-}3$	$-1,09\text{E-}2 \pm 3,05\text{E-}4$	0,9981	0,28	1,96-17,64	2,33	4,33

\*Método del cruce por cero. <sup>(a)</sup> Orden de derivada. <sup>(b)</sup> Límite de detección ( $\text{mg.l}^{-1}$ ). <sup>(c)</sup> Intervalo de linealidad ( $\text{mg.l}^{-1}$ )

### ***Mezclas sintéticas***

Al aplicar el método a mezclas sintéticas encontramos que la predicción de PB puede hacerse en el espectro de primera derivada a 242 nm (RSE = 3,78, RMSE = 2,74) ó en el de segunda a 224 nm (RSE = 4,43, RMSE = 4,14) o entre 224 y 254 nm (RSE = 4,90, RMSE = 4,81), obteniéndose en todos los casos valores de RSE y RMSE inferiores al 5 %. Sin embargo, por este método tampoco es posible realizar la predicción de DPH con RSE y RMSE inferiores al a este valor.

### III.2. Regresión multivariante

Del estudio realizado se desprende que la calibración univariada no ofrece en la mayoría de los casos resultados aceptables, pueden ser considerados mejores o peores, dependiendo esta calificación del nivel de exigencia que se nos pida.

El método del cruce por cero que hemos estudiado presenta la dificultad de que es necesario conocer con absoluta certeza las longitudes de onda en las que se anula la señal de un analito, pues basta que uno de los analitos absorba algo a esa longitud de onda para que la determinación se haga tediosa o se cometan errores apreciables.

Por ello en este subcapítulo se afronta la aplicación de la calibración multivariante a la resolución de mezclas binarias.

Uno de los mayores problemas que presenta la aplicación de los métodos multivariantes es la selección de variables. En regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS) es de suma importancia la selección tanto del intervalo de longitudes de onda como del número de *factores* que se debe emplear. Un número de *factores* superior al óptimo puede provocar un sobreajuste del sistema que origina buenas calibraciones, pero es incapaz de predecir con unos mínimos de calidad. Por el contrario, un número de *factores* inferior al óptimo origina un sistema más robusto, pero sigue teniendo problemas en la etapa de predicción. Por ello, longitudes de onda y número de *factores* deben ser optimizados.

Como se explicó en el Capítulo II, en esta memoria se propone un nuevo método para la selección del intervalo de longitud de onda que, a su vez, permite optimizar el número de *factores*; para ello hubo que plantearse establecer la variable o magnitud que define el mejor modelo. Puesto que el objetivo final de un modelo es la determinación cuantitativa del analito, o analitos, se consideró que un parámetro adecuado sería aquél que permitiera cuantificar el error cometido en el proceso de predicción; es decir, el mejor modelo sería aquél que proporcionara menor RSE o RMSE calculados para la matriz de validación.

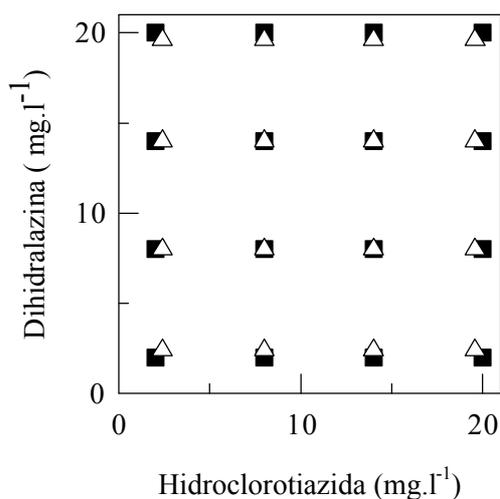
### III. 2. 1 Dihidralazina – Hidroclorotiazida

#### a) Regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS)

##### *Selección del intervalo de longitudes de onda*

Como se vio en los apartados anteriores, los espectros de absorción de dihidralazina (DHZ) e hidroclorotiazida (HCT) se encuentran ampliamente solapados, presentando los dos analitos máximos de absorción situados entorno a 220 y 280 nm.

Para llevar a cabo la optimización del intervalo de longitudes de onda se construyeron matrices de calibración y validación con un diseño en 4 niveles para dos analitos,  $n^2$ , donde n representa el número de niveles. Preparándose, por tanto, 16 mezclas de calibración y otras tantas de validación. La composición de ambas matrices se muestra en la Figura 3.16.



**Figura 3.16:** Composición de las matrices de calibración (■) y validación (Δ).

Los límites superior e inferior de la matriz de calibración se establecieron de acuerdo con los intervalos de linealidad encontrados en la determinación espectrofotométrica de DHZ e HCT, teniendo en cuenta que la absorbancia de las mezclas no debe ser en ningún caso superior a 1,2 unidades para no saturar los diodos del espectrofotómetro. Los espectros de las disoluciones se registraron entre 200 y 400 nm, pero la optimización se realizó entre 200 y 358 nm, ya que a partir de esta longitud de onda la señal de la mezcla es prácticamente nula, Figura 3.3.

Para realizar la calibración se ha utilizado con el programa informático UNSCRAMBLER, programa que realiza regresión en mínimos cuadrados parciales haciendo uso de los algoritmos PLS-2 y PLS-1. PLS-2 aplica la regresión a todos los analitos, abordando la calibración para todas las variables de forma simultánea; PLS-1 realiza la regresión para cada analito individualmente.

Se establecieron todos los modelos posibles con un mínimo de seis variables (longitudes de onda), siendo el límite inferior cualquier longitud de onda comprendida entre 200 y 348 nm, y el límite superior cualquier variable entre 210 y 358 nm. De esta forma se obtuvieron 2830 modelos, es decir, 2830 calibraciones con sus respectivas predicciones; la calibración se realizó aplicando PLS-2 y PLS-1 para cada analito, y la predicción con 2 y 3 *factores*; por tanto, el número total de modelos ensayados fue de 16980.

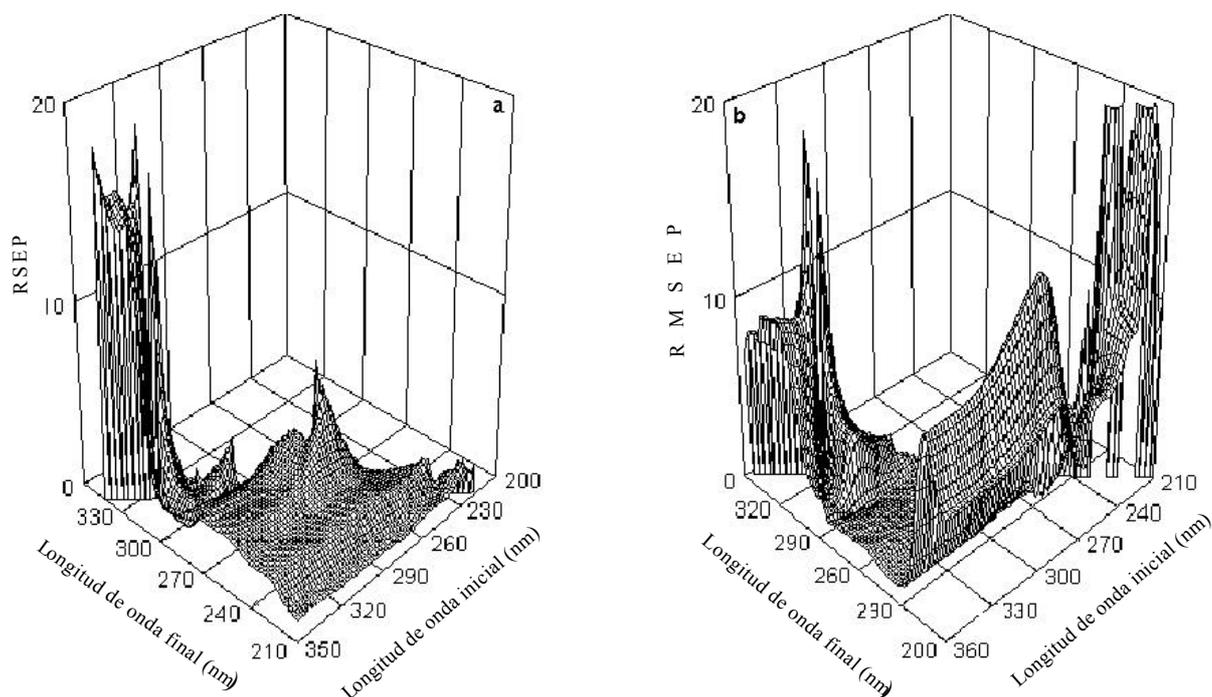
Para llevar a cabo esta laboriosa tarea se construyó una *macro* (conjunto de comandos que un programa informático ejecuta para operaciones [sencillas o complejas] repetitivas) en el UNSCRAMBLER, que, además de realizar los procesos de calibración y predicción para cada modelo, exportaba los resultados a hojas de cálculo donde otra *macro* se encargaba de calcular los RSE y RMSE.

En todos los casos la calibración fue realizada centrando los datos y utilizando como método de validación el *leverage correction*, debido a la mayor rigidez de cálculo que ofrece.

#### Determinación de dihidralazina por PLS-1

Al realizar la predicción de DHZ con 2 y 3 *factores* por PLS-1, se encontró que los valores menores de RSE y RMSE se obtenían utilizando sólo dos *factores*. En la Figura 3.17, se muestran las superficies de respuesta obtenidas, RSE y RMSE, para la predicción con este número de *factores*; se puede observar que en aquellos intervalos en los que la longitud de onda inicial es superior a 290 nm los errores aumentan considerablemente como consecuencia de la escasa absorbancia de la DHZ y de la semejanza en los espectros de los analitos.

En los intervalos cuya longitud de onda inicial está comprendida entre 200 y 230 nm, los errores son altos debido al ruido de la señal de los espectros en esta zona por la fuerte absorción del medio. Cuando la longitud de onda final se aproxima a 260 nm se observa un descenso del error cometido.



**Figura 3.17:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de DHZ por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.

Los menores valores de RMSE, inferiores al 1 %, los proporcionan aquellos intervalos cuya longitud de onda inicial se encuentra entre 230 y 280 nm, y la final entre 260 y 360 nm. El intervalo con menor valor del RSE es 282-306 nm, y el mínimo RMSE corresponde a 238-318 nm.

En la Tabla 3.13 se recogen los resultados obtenidos en la determinación de DHZ utilizando los modelos construidos con estos intervalos de longitudes de onda. A pesar de que los resultados son excelentes en ambos casos, con errores relativos inferiores al 2,1 % y desviaciones estándar relativas inferiores al 3,0 %, se eligió el modelo con menor RMSE por poseer una media de las desviaciones estándar relativas inferior.

Este modelo explica el 80 y 100 % de la varianza de la matriz de absorbancia, y el 58 y el 100 % de la varianza de la matriz de concentración de DHZ, con 1 y 2 *factores*, respectivamente.

**Tabla 3.13**

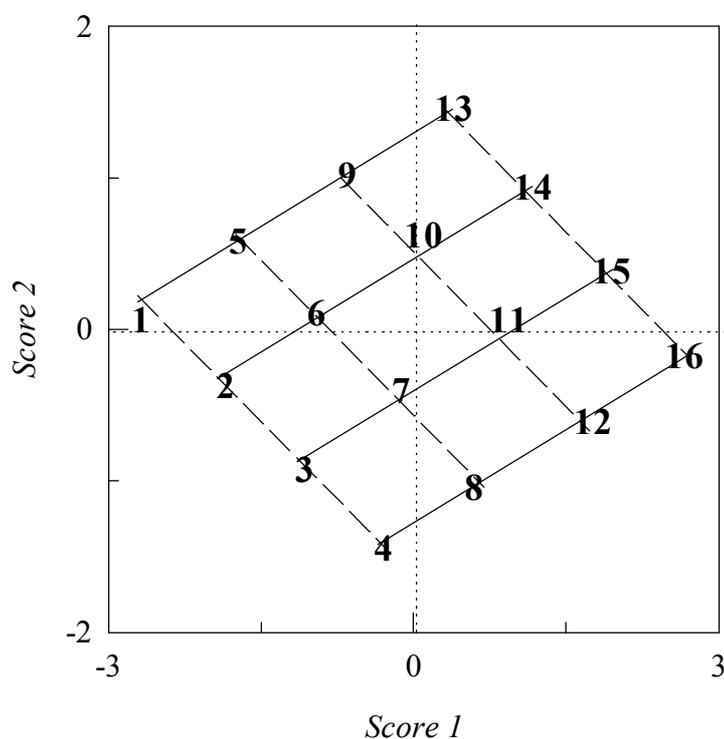
Resultados de la determinación simultánea de DHZ e HCT por PLS-1 en mezclas sintéticas

Cantidad añadida (mg.l <sup>-1</sup> )		DHZ (282-306 nm)		DHZ (238-318 nm)		HCT (258-268 nm)	
DHZ	HCT	mg l <sup>-1</sup> ± DS	% E	mg l <sup>-1</sup> ± DS	% E	mg l <sup>-1</sup> ± DS	% E
2,40	2,40	2,45 ± 0,07	2,08	2,40 ± 0,04	0,00	2,39 ± 0,05	-0,42
2,40	8,00	2,42 ± 0,06	0,83	2,39 ± 0,04	-0,42	8,05 ± 0,05	0,63
2,40	14,00	2,36 ± 0,02	-1,67	2,37 ± 0,03	-1,25	14,03 ± 0,05	0,21
2,40	19,60	2,43 ± 0,04	1,25	2,40 ± 0,05	0,00	19,66 ± 0,04	0,31
8,00	2,40	8,03 ± 0,04	0,37	8,02 ± 0,03	0,25	2,37 ± 0,03	-1,25
8,00	8,00	8,08 ± 0,06	1,00	8,08 ± 0,03	1,00	8,03 ± 0,03	0,37
8,00	14,00	7,94 ± 0,06	-0,75	8,02 ± 0,03	0,25	14,04 ± 0,04	0,29
8,00	19,60	7,97 ± 0,03	-0,38	7,97 ± 0,02	-0,38	19,66 ± 0,04	0,31
14,00	2,40	14,05 ± 0,03	0,36	14,03 ± 0,02	0,21	2,36 ± 0,03	-1,67
14,00	8,00	14,02 ± 0,07	0,14	14,04 ± 0,03	0,50	8,04 ± 0,04	0,50
14,00	14,00	14,09 ± 0,03	0,64	14,12 ± 0,02	0,86	14,08 ± 0,03	0,57
14,00	19,60	14,03 ± 0,18	0,21	13,93 ± 0,08	-0,50	19,66 ± 0,15	0,31
19,60	2,40	19,61 ± 0,11	0,05	19,48 ± 0,06	-0,61	2,38 ± 0,05	-0,83
19,60	8,00	19,71 ± 0,07	0,56	19,60 ± 0,10	0,00	7,98 ± 0,07	-0,25
19,60	14,00	19,51 ± 0,04	-0,46	19,49 ± 0,02	-0,56	14,02 ± 0,07	0,14
19,60	19,60	19,64 ± 0,22	0,20	19,47 ± 0,09	-0,66	19,61 ± 0,12	0,05
CV		0,92		0,66		0,76	
RSE		0,44		0,55		0,33	
RMSE		0,69		0,47		0,51	

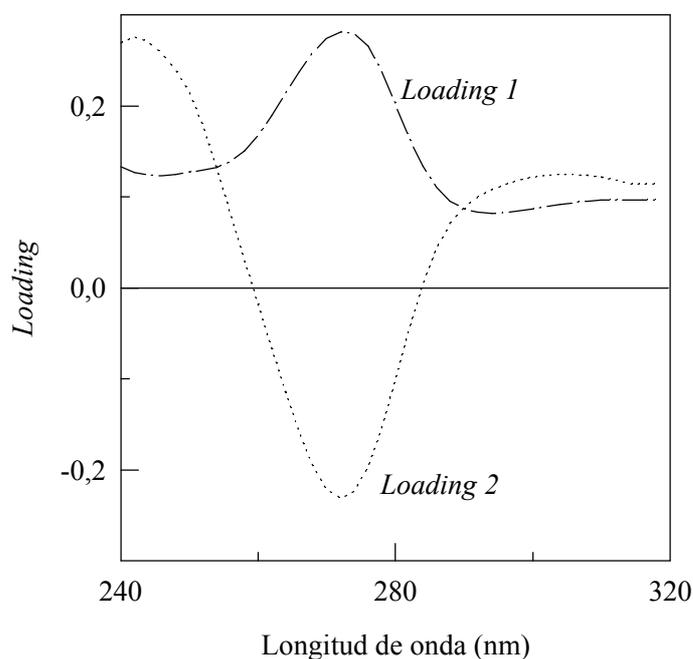
El estudio de la representación del *score 2* vs *score 1* para este modelo (Figura 3.18), revela que el primer factor depende de la concentración total DHZ + HCT, las muestras se sitúan horizontalmente según la concentración, mayor *score 1* implica mayor concentración total. Sin embargo, para la misma concentración total, las muestras con mayor cantidad de DHZ se encuentran ligeramente desplazadas hacia la derecha, indicando que la dependencia con la concentración de DHZ es algo superior.

El *score 2* también depende de los dos analitos, aumentando éste a medida que lo hace la relación DHZ/HCT; a igual relación, igual valor del *score 2*. El *score 2* depende directamente de la concentración de DHZ, e inversamente de la de HCT.

El estudio de los *loading* está relacionado con el de los *scores*. En este sentido la Figura 3.19 muestra que el primer *loading* corresponde a la suma de los espectros individuales de ambos analitos y el segundo a la derivada del anterior, de acuerdo con la dependencia de los *scores* con la relación de concentraciones entre los analitos.



**Figura 3.18:** *Score 2* vs *Score 1* en la determinación de DHZ por PLS-1. Objetos de la matriz de calibrado con concentración de DHZ de: 1, 2, 3 y 4, 2,00 mg.l<sup>-1</sup>; 5, 6, 7 y 8, 8,00 mg.l<sup>-1</sup>; 9, 10, 11 y 12, 14,00 mg.l<sup>-1</sup>; 13, 14, 15 y 16, 20,00 mg.l<sup>-1</sup>; y concentración de HCT de: 1, 5, 9 y 13, 2,00 mg.l<sup>-1</sup>; 2, 6, 10 y 14, 8,00 mg.l<sup>-1</sup>; 3, 7, 11 y 15, 14,00 mg.l<sup>-1</sup>; 4, 8, 12 y 16, 20,00 mg.l<sup>-1</sup>.



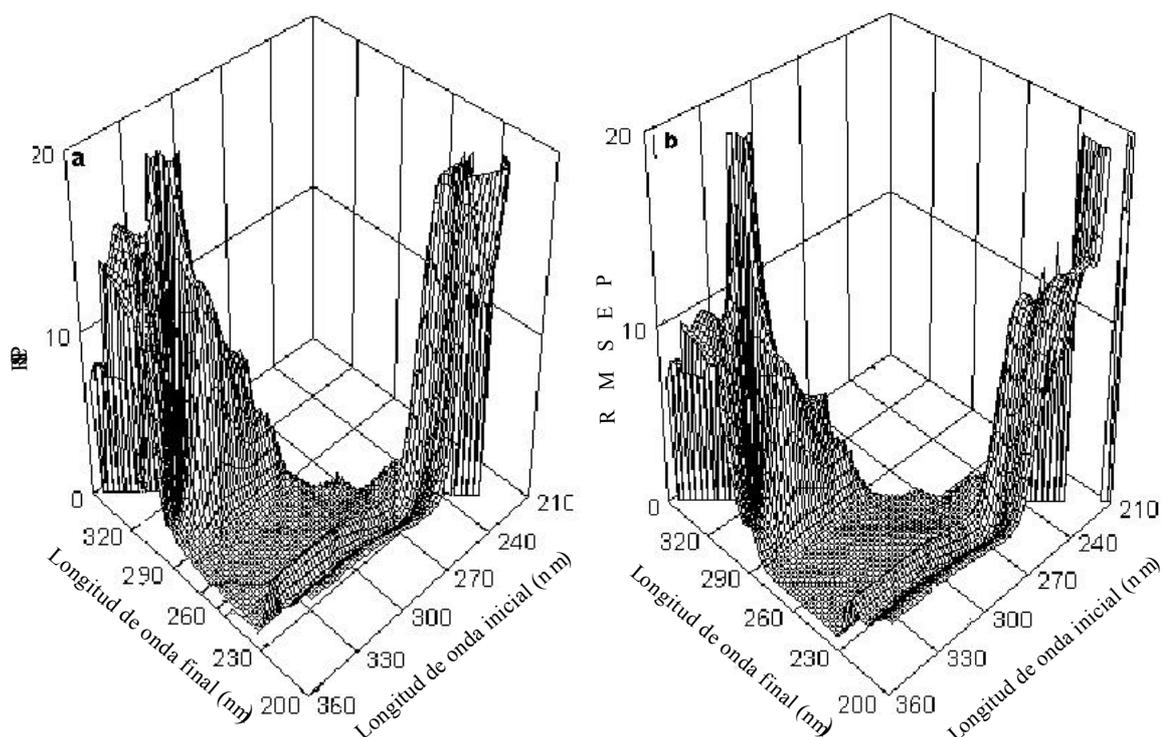
**Figura 3.19:** *Loadings* en la determinación de DHZ por PLS-1.

*Determinación de hidroclorotiazida por PLS-1*

Como en el caso de la DHZ, los menores valores de RSE y RMSE, para las muestras de validación, en la determinación de HCT por PLS-1 se obtuvieron utilizando 2 *factores*. La Figura 3.20 pone de manifiesto la semejanza entre los perfiles de las superficies de respuesta obtenidas, y su similitud con las obtenidas para la DHZ. La única diferencia manifiesta entre ambos analitos es la disminución del error en los intervalos de longitudes de onda iniciales entre 200 y 230 nm, debida probablemente a que el pico que presenta la HCT en esta zona se encuentra más alejado de la señal del medio que el de la DHZ.

Cuando se realiza PLS-1 para la determinación de HCT, los valores mínimos de RSE y RMSE corresponden al mismo modelo (258-268 nm), siendo de destacar que este intervalo sólo tiene 6 variables o longitudes de onda.

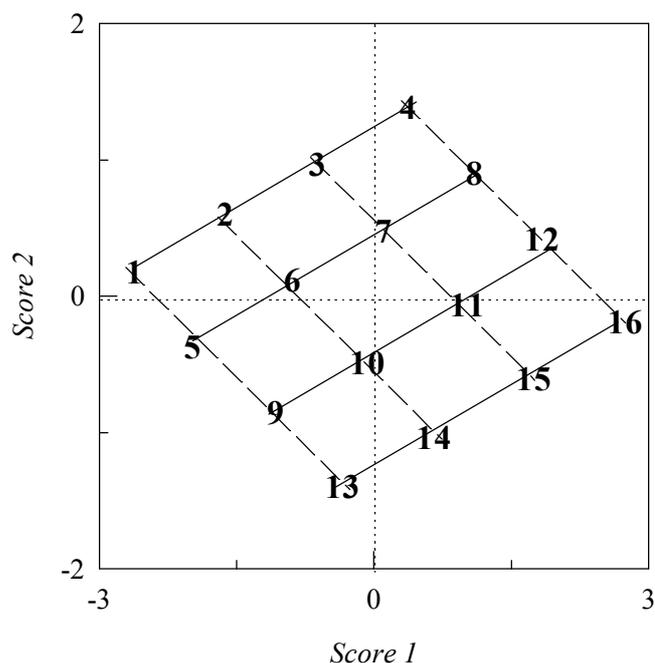
La Tabla 3.13 recoge los resultados obtenidos en la predicción de HCT por PLS-1 utilizando el modelo previamente seleccionado, observándose errores y desviaciones estándar relativas inferiores al 1,7 y al 2,1 %, respectivamente.



**Figura 3.20:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de HCT por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.

Como era de esperar, debido al escaso número de variables, que implica una alta correlación entre las mismas, el modelo seleccionado explica el 98 y 100% de la varianza de la matriz de absorbancia, y el 80 y el 100% de la varianza de la concentración, con 1 y 2 *factores*, respectivamente.

La representación gráfica del *score 2* vs *score 1*, Figura 3.21, conduce a las mismas conclusiones que en el caso de la determinación de DHZ. El *score 1* depende de la concentración total de los analitos, aunque la concentración de HCT parece tener un peso ligeramente superior, y el *score 2* depende de la concentración de ambos analitos. El pequeño número de variables del modelo hace imposible la interpretación de los *loadings*.



**Figura 3.21:** *Score 2 vs Score 1* en la determinación de HCT por PLS-1. Objetos de la matriz de calibrado con concentración de DHZ de: (1, 2, 3 y 4), 2,00 mg.l<sup>-1</sup>; (5, 6, 7 y 8), 8,00 mg.l<sup>-1</sup>; (9, 10, 11 y 12), 14,00 mg.l<sup>-1</sup>; (13, 14, 15 y 16), 20,00 mg.l<sup>-1</sup>; y concentración de HCT de: (1, 5, 9 y 13), 2,00 mg.l<sup>-1</sup>; (2, 6, 10 y 14), 8,00 mg.l<sup>-1</sup>; (3, 7, 11 y 15), 14,00 mg.l<sup>-1</sup>; (4, 8, 12 y 16), 20,00 mg.l<sup>-1</sup>.

#### Determinación de dihidralazina e hidroclorotiazida por PLS-2

Cuando se aplicó PLS-2 a la determinación simultánea de DHZ e HCT y se realizó la optimización como se ha descrito en los apartados anteriores, se encontraron 33 modelos con RSE mínimo, y 10 con RMSE mínimo para las mezclas de la matriz de validación, y sólo dos en los que tanto RSE como RMSE son mínimos. Estos últimos, 238-314 y 238-316, difieren en una única variable y pueden ser utilizados indistintamente, ya que proporcionan los mismos resultados.

La Tabla 3.14 pone de manifiesto que cuando la calibración se realiza por PLS-2, el error en la predicción de DHZ no supera el 1,25 %, y los resultados son muy parecidos a los obtenidos por PLS-1, hecho que pierde importancia al comparar los intervalos de longitudes de onda en los dos modelos, 238-318 nm (PLS-1) y 238-316 nm (PLS-2). En el caso de la HCT, el error relativo llega a alcanzar valores del 4,2 %.

La utilización de PLS-1 implica realizar un modelo de calibración para cada analito, mientras que con PLS-2 sólo es necesario un único modelo; por tanto, el empleo de PLS-1 sólo

queda justificado en base a la calidad de los resultados; en nuestro caso, los errores en la determinación de HCT se reducen hasta casi la mitad. Por lo tanto, la determinación de DHZ e HCT se debe realizar por PLS-1 en los intervalos 238-318 nm y 258-268 nm, respectivamente.

**Tabla 3.14**  
Resultados de la determinación simultánea de DHZ e HCT por PLS-2

Cantidad añadida (mg.l <sup>-1</sup> )		Cantidad encontrada (mg.l <sup>-1</sup> )		Error relativo (%)	
DHZ	HCT	DHZ	HCT	DHZ	HCT
2,40	2,40	2,40 ± 0,04	2,34 ± 0,06	0,00	-2,50
2,40	8,00	2,39 ± 0,04	8,02 ± 0,06	-0,42	0,25
2,40	14,00	2,37 ± 0,03	14,04 ± 0,04	-1,25	0,29
2,40	16,00	2,40 ± 0,05	19,66 ± 0,07	0,00	0,31
8,00	2,40	8,03 ± 0,03	2,33 ± 0,04	0,37	-2,92
8,00	8,00	8,08 ± 0,03	8,07 ± 0,04	1,00	0,88
8,00	14,00	8,02 ± 0,04	14,11 ± 0,06	0,25	0,79
8,00	16,00	7,97 ± 0,03	19,65 ± 0,04	-0,38	0,26
14,00	2,40	14,03 ± 0,02	2,36 ± 0,03	0,21	-1,67
14,00	8,00	14,07 ± 0,03	8,10 ± 0,05	0,50	1,25
14,00	14,00	14,13 ± 0,03	14,11 ± 0,04	0,93	0,79
14,00	16,00	13,93 ± 0,07	19,50 ± 0,10	-0,50	-0,51
16,00	2,40	19,48 ± 0,05	2,30 ± 0,08	-0,61	-4,17
16,00	8,00	19,59 ± 0,09	8,04 ± 0,13	-0,05	0,50
16,00	14,00	19,49 ± 0,02	14,02 ± 0,03	-0,56	0,14
16,00	16,00	19,47 ± 0,07	19,44 ± 0,11	-0,66	-0,82
CV		0,66	0,94		
			RSE <sub>individual</sub>	0,56	0,62
			RMSE <sub>individual</sub>	0,48	0,97
			RSE <sub>global</sub>	0,59	
			RMSE <sub>global</sub>	0,81	

**b) Regresión lineal múltiple**

Hasta el momento, en la presente memoria se han propuesto diferentes métodos para la determinación simultánea de DHZ e HCT utilizando métodos de calibración univariada (cruce por cero y espectros cocientes derivados) y multivariantes (regresión en mínimos cuadrados parciales). En el presente apartado se proponen dos nuevos métodos multivariantes basados en regresión lineal múltiple. Estos modelos, que se nombran según el programa informático que se utilizó: MULTIC o MULTI3, sólo se diferencian, como se explicó en el capítulo II, en la forma de calcular los coeficientes de regresión.

El programa MULTIC fue diseñado para la determinación de multicomponentes en una muestra a partir de los espectros puros de los analitos sin considerar posibles interacciones entre ellos, es decir, se trata de un método de calibración rígido basado en el cumplimiento de la ley de Beer para cada uno de los componentes de la mezcla y en la aditividad de las absorbancias.

El programa MULTI3 fue diseñado con posterioridad y ofrece la posibilidad de calibrar con los espectros de los analitos puros y con espectros de mezclas de composición conocida. Sus fundamentos teóricos son los señalados con anterioridad y se puede aplicar con buenos resultados siempre que se conozcan todos los componentes que contribuyen a la señal analítica, y no existan interacciones, físicas o químicas, entre las especies absorbentes o entre ellas y la matriz.

La determinación de DHZ e HCT mediante regresión lineal múltiple se realizó en los intervalos de longitudes de onda seleccionados como óptimos en los apartados anteriores.

En la Tabla 3.15 se recogen los resultados obtenidos empleando el intervalo 238-318 nm para cuantificar DHZ, y 258-268 nm para HCT. Si comparamos los resultados obtenidos por aplicación de MULTI3 y MULTIC, se encuentra que cuando se utiliza MULTIC para realizar la regresión, los valores de RSE y RMSE son inferiores para la DHZ y muy próximos para la HCT. Sin embargo las desviaciones estándar relativas para esta última llegan a tener valores de hasta seis veces los obtenidos por MULTI3. Cuando se utiliza MULTI3, la DHZ se determina con errores relativos inferiores al 1,7 % en todos los casos, exceptuando una única muestra, y las desviaciones estándar relativas tampoco superan el 1,7 %. En cuanto a la HCT, los errores relativos cometidos son inferiores al 2% y las desviaciones estándar medias menores del 1 %.

Tabla 3.15

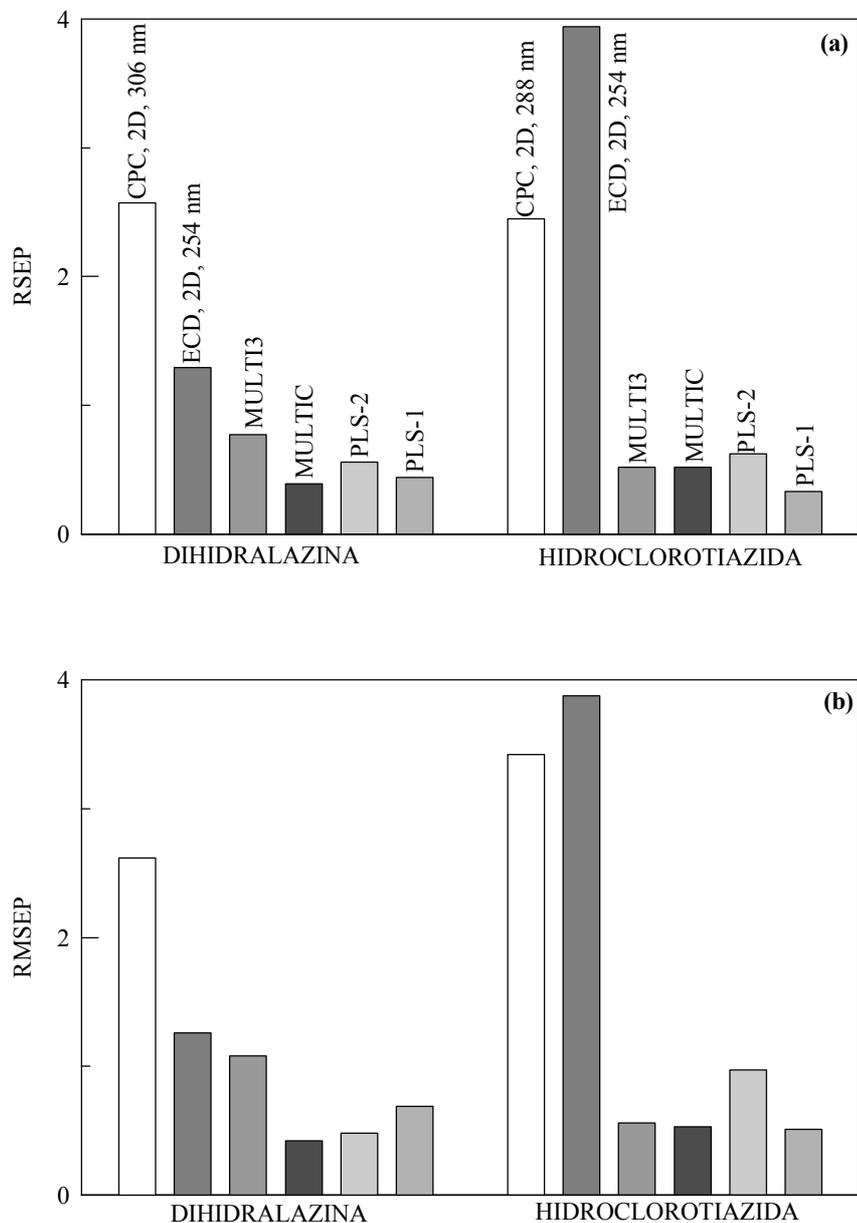
Resultados de la determinación simultánea de DHZ e HCT por regresión lineal múltiple.

Cantidad añadida (mg.l <sup>-1</sup> )		MULTI3				MULTIC			
		DHZ (238-318)		HCT (258-268)		DHZ (238-318)		HCT (258-268)	
DHZ	HCT	mg.l <sup>-1</sup> ± DS	% E*						
2,40	2,40	2,43 ± 0,04	1,25	2,45 ± 0,02	2,08	2,38 ± 0,03	-0,83	2,37 ± 0,31	-1,25
2,40	8,00	2,37 ± 0,04	-1,25	8,09 ± 0,02	1,12	2,38 ± 0,02	-0,83	7,98 ± 0,30	0,25
2,40	14,00	2,36 ± 0,03	-1,67	13,99 ± 0,02	-0,07	2,40 ± 0,03	0,00	14,00 ± 0,08	0,00
2,40	19,60	2,26 ± 0,03	-5,83	19,64 ± 0,04	0,20	2,39 ± 0,05	-0,42	19,72 ± 0,16	0,61
8,00	2,40	8,00 ± 0,03	0,00	2,40 ± 0,02	0,00	8,02 ± 0,03	0,25	2,38 ± 0,14	-0,83
8,00	8,00	8,08 ± 0,02	1,00	7,99 ± 0,02	-0,12	8,05 ± 0,06	0,63	8,00 ± 0,07	0,00
8,00	14,00	8,09 ± 0,04	1,12	13,99 ± 0,04	-0,07	8,00 ± 0,03	0,00	13,99 ± 0,08	-0,07
8,00	19,60	7,97 ± 0,02	-0,38	19,64 ± 0,05	0,20	8,08 ± 0,07	1,00	19,77 ± 0,08	0,87
14,00	2,40	13,97 ± 0,01	-0,21	2,36 ± 0,01	-1,67	14,03 ± 0,02	0,21	2,43 ± 0,09	1,25
14,00	8,00	14,06 ± 0,03	0,43	7,99 ± 0,02	-0,12	14,04 ± 0,04	0,29	7,99 ± 0,05	-0,12
14,00	14,00	14,17 ± 0,02	1,21	14,08 ± 0,06	0,57	14,10 ± 0,03	0,71	13,93 ± 0,16	-0,50
14,00	19,60	13,96 ± 0,10	-0,29	19,77 ± 0,02	0,87	13,95 ± 0,09	-0,36	19,61 ± 0,13	0,05
19,60	2,40	19,38 ± 0,07	-1,12	2,41 ± 0,02	0,42	19,54 ± 0,05	-0,31	2,38 ± 0,12	-0,83
19,60	8,00	19,49 ± 0,02	-0,56	8,06 ± 0,05	0,75	19,53 ± 0,09	-0,36	8,07 ± 0,17	0,88
19,60	14,00	19,53 ± 0,08	-0,36	14,02 ± 0,07	0,14	19,56 ± 0,05	-0,20	14,10 ± 0,19	0,71
19,60	19,60	19,48 ± 0,01	-0,61	19,72 ± 0,02	0,61	19,53 ± 0,10	-0,36	19,66 ± 0,11	0,31
CV		0,58		0,40		0,66		2,57	
RSE		0,77		0,52		0,39		0,52	
RMSE		1,08		0,56		0,42		0,53	

\*%Error relativo de la determinación

La Figura 3.22 muestra los valores de RSE y RMSE obtenidos utilizando los mejores modelos de cada uno de los métodos de calibración estudiados hasta ahora. En ella se observa que los resultados mejoran notablemente al pasar de la calibración univariada a la multivariante, encontrándose los valores mínimos para los dos fármacos cuando se utiliza PLS-1.

Teniendo en cuenta estos resultados a partir de ahora se descartará la determinación de los analitos mediante regresión lineal múltiple.



**Figura 3.22:** Valores de a) RSE y b) RMSEP para la predicción de DHZ e HCT por los distintos métodos de calibración propuestos.

### III.2.2 Clortalidona - Espironolactona

La Figura 3.10 muestra los espectros de absorción de CLT y SP, en ella se puede observar que CLT presenta un máximo de absorción a 210 nm con un hombro a 230 nm; la SP presenta un máximo de absorción a 244 nm. Con objeto de mejorar los resultados obtenidos en la determinación simultánea de ambos analitos aplicando métodos de calibración univariados, a continuación se procederá a resolver la mezcla utilizando métodos de calibración multivariantes.

#### *Selección del intervalo de longitudes de onda*

En primer lugar se construyeron tres matrices, una de calibración (con un diseño en 4 niveles para 2 analitos), otra de validación y una tercera de predicción. Los límites superior e inferior de la matriz de calibrado se establecieron de acuerdo con los intervalos de linealidad encontrados en la determinación espectrofotométrica de CLT y SP. Los niveles ensayados para CLT fueron 1,19; 5,95; 10,12 y 14,88 mg.l<sup>-1</sup>; y los de SP 2,92; 7,01; 11,10 y 14,60 mg.l<sup>-1</sup>.

Los espectros de las disoluciones se registraron entre 200 y 350 nm, si bien la optimización se hizo entre 200 y 300 nm, ya que a longitudes de onda superiores la señal de la mezcla era prácticamente nula. Así, se establecieron todos los modelos posibles con un mínimo de 3 variables, siendo el límite superior cualquier longitud de onda comprendida entre 206 y 300 nm, y el límite inferior cualquiera de las comprendidas entre 200 y 294 nm. De esta forma se obtuvieron 1176 modelos, es decir, 1176 calibraciones con sus respectivas predicciones.

La calibración se realizó aplicando PLS-2 y PLS-1 para cada analito, y la predicción con 2, 3 y 4 *factores* para PLS-2 y 1, 2 y 3 *factores* para PLS-1; por tanto, el número total de modelos ensayados fue de 10584. En todos los casos la calibración fue realizada centrando los datos y utilizando como método de validación interna el *leverage correction*.

#### *Determinación de clortalidona por PLS-1*

Al determinar la concentración de CLT en las muestras de validación con 2 y 3 *factores* para la calibración efectuada por PLS-1 se encontraron los menores valores de RSE y RMSE, de forma simultánea, para la predicción con 3 *factores* en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 216 y 258 nm. Para la predicción con 2 *factores* los menores valores de RSE y RMSE se obtienen en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 232 y 268 nm, Tabla 3.16. En ella se puede observar que no existen diferencias significativas entre los valores de RSE y RMSE para las predicciones efectuadas con 2 y 3 *factores*; por tanto, se

decide realizar la predicción con 2 *factores*. En la Figura 3.23, superficies de respuesta obtenidas (RSE y RMSE), se puede observar que los errores más elevados se obtienen en los intervalos de longitudes de onda donde ambos espectros siguen el mismo comportamiento y presentan valores de absorbancias muy pequeños.

**Tabla 3.16**

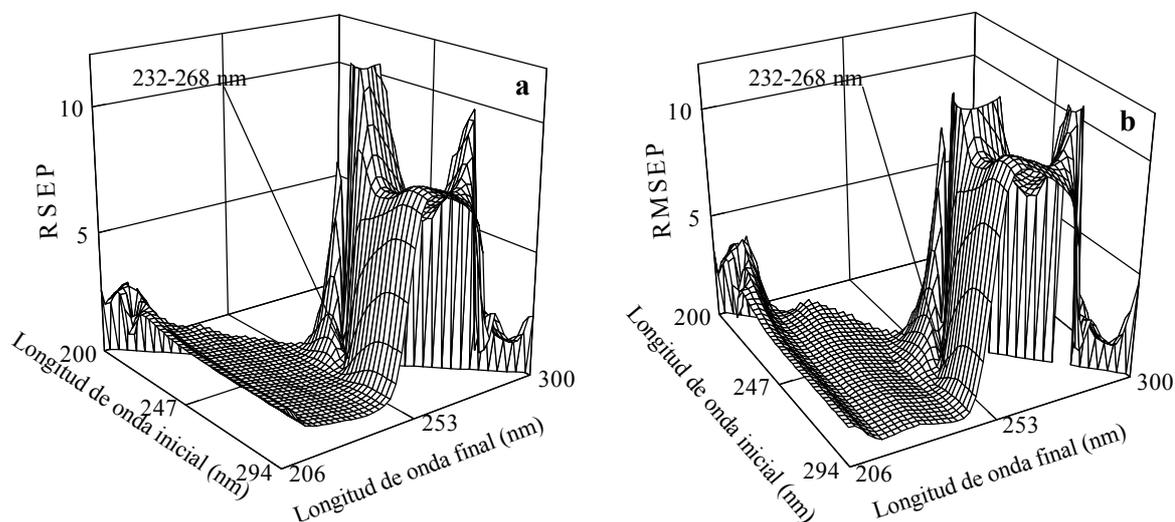
RSE, RMSE y CV de las distintas predicciones efectuadas para PLS-1 y PLS-2

	PLS-2		PLS-1		
			CLT		SP
<i>2 factores</i>					
Äë (nm)	226-274	232-270	232-268	242-284	242-290
RSE	0,89	0,94	0,73	0,63	0,70
RMSE	0,96	0,94	0,71	0,69	0,63
CV	0,48	0,85	0,56	0,32	0,46
<i>3 factores</i>					
Äë (nm)	228-262		216-258	234-290	
RSE	0,78		0,43	0,66	
RMSE	0,82		0,51	0,72	
CV	0,52		0,56	0,42	

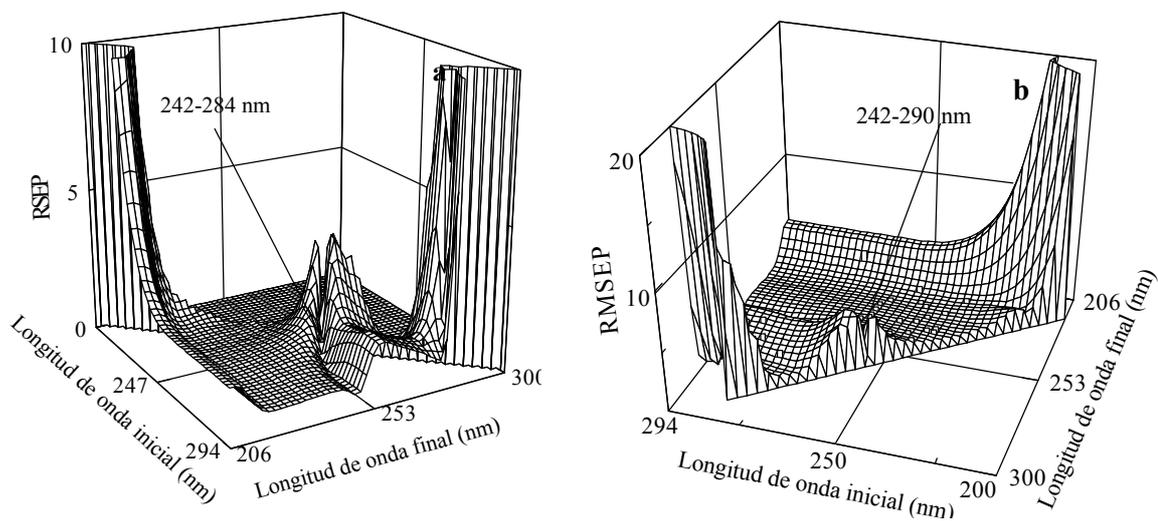
*Determinación de espirolactona por PLS-1*

Cuando se realiza la determinación de SP los valores mínimos de RSE y RMSE se obtienen para la predicción efectuada con 2 *factores* entre 242 y 284 nm y entre 242 y 290 nm, respectivamente. Para la predicción con 3 *factores* los menores valores de RSE y RMSE se obtienen de forma simultánea entre 234 y 290nm. En la Figura 3.24, superficies de respuesta obtenidas para la predicción con 2 *factores*, se puede observar que ambos parámetros siguen el mismo comportamiento, distinguiéndose tres zonas donde los errores son elevados: a) intervalos con longitudes de onda donde la absorción del medio es elevada (200-210 nm); b) intervalos con longitudes de onda superiores a 270 nm, donde la absorción de los analitos es prácticamente nula; c) intervalos con longitudes de onda comprendidas entre 246 y 260 nm -los espectros de absorción de los analitos presentan el mismo comportamiento, lo que dificulta la asignación de

la señal de cada uno de ellos -, en esta zona del espectro los errores que se cometen son ligeramente inferiores a los obtenidos en las zonas que se señalan anteriormente.



**Figura 3.23:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de CLT por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.



**Figura 3.24:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de SP por PLS-1: a) RSE y b) RMSE

Determinación de clortalidona y espironolactona por PLS-2

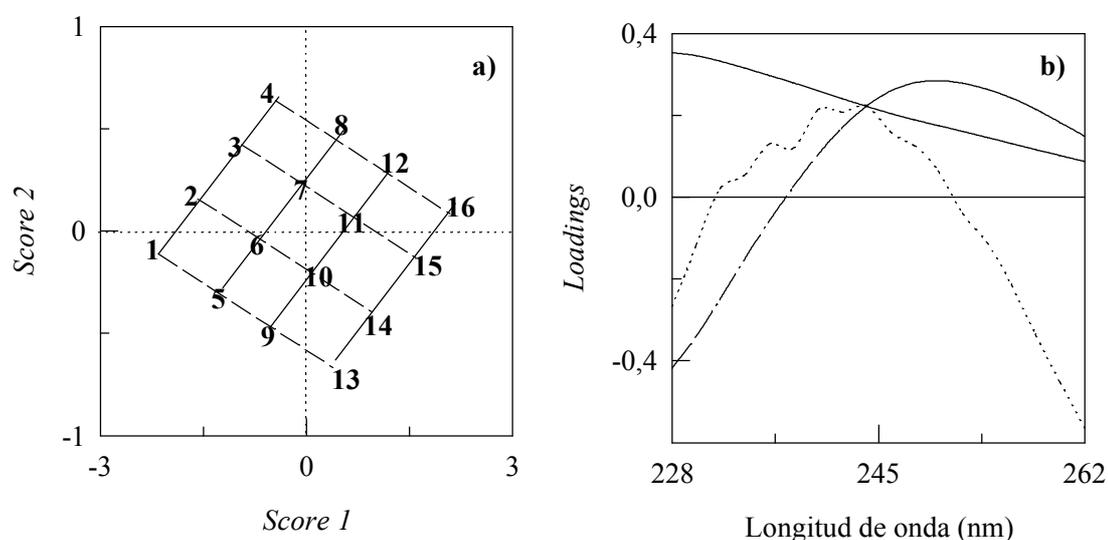
Al aplicar PLS-2 a la determinación simultánea de CLT y SP se obtuvieron los valores mínimos de RSE y RMSE, utilizando las muestras de la matriz de validación, para la predicción con 3 *factores* entre 228 y 262 nm. Para la predicción con 2 *factores* los mínimos RSE y RMSE se obtienen entre 226 y 274 nm y entre 232 y 270 nm, respectivamente. Las superficies de respuesta obtenidas para la predicción con 3 *factores*, muestran un comportamiento similar al que se obtuviera para la predicción de CLT con 3 *factores*, en la que los errores más elevados se obtenían en los intervalos con longitudes de onda superiores a 260 nm. Los menores valores de RSE y RMSE, inferiores al 0,9 %, se obtuvieron en los intervalos de longitud de onda que comienzan entre 220 y 238 nm.

En la Tabla 3.16, RSE y RMSE para la calibración efectuada por PLS-2 y PLS-1 y la predicción con 2 y 3 *factores*, se puede observar que no existen diferencias significativas entre las calibraciones efectuadas por PLS-2 y PLS-1 y las predicciones efectuadas con 2 ó 3 *factores*. A la vista de estos resultados, se decide realizar la determinación de los analitos utilizando el algoritmo PLS-2 y la predicción con 2 *factores* entre 226 y 274 nm. Se descarta la determinación entre 232 y 270 nm por poseer un coeficiente de variación superior.

El modelo seleccionado explica con 1 *factor* el 64,6 % de la varianza residual de CLT y el 28,2 % de la varianza residual de SP, pasando a explicarse el 100 % con 2 *factores*.

El estudio de la representación del *score 2* vs *score 1* para este modelo (Figura 3.25.a), revela que los dos *factores* dependen de la concentración total CLT + SP, las muestras se sitúan horizontalmente según la concentración, mayor *score 1* implica mayor concentración total. Respecto del *score 2* se puede observar que las muestras se sitúan verticalmente atendiendo a la relación SP/CLT, a mayor concentración de CLT menor *score 2* y a mayor concentración de SP mayor *score 2*. El *score 2* depende inversamente de la de CLT, y directamente de la concentración de SP.

El estudio de los *loading* está relacionado con el de los *scores*. La Figura 3.25.b muestra que el primer *loading* corresponde a la suma de los espectros individuales de ambos analitos en el intervalo seleccionado, la relación con el segundo *loading* es más compleja y difícil de interpretar. Con respecto al tercer *loading*, sólo puede ser asociado a ruido, por lo que la predicción con tres *factores* carece de sentido.



**Figura 3.25:** a) *Score 2* vs *score 1* en la determinación de CLT y SP por PLS-2. Objetos de la matriz de calibrado con concentración de CLT de: (1, 2, 3 y 4), 1,19mg.l<sup>-1</sup>; (5, 6, 7 y 8), 5,95 mg.l<sup>-1</sup>; (9, 10, 11 y 12), 10,12 mg.l<sup>-1</sup>; (13, 14, 15 y 16), 14,88 mg.l<sup>-1</sup>; y concentración de SP de: (1, 5, 9 y 13), 2,92mg.l<sup>-1</sup>; (2, 6, 10 y 14), 7,01mg.l<sup>-1</sup>; (3, 7, 11 y 15), 11,10 mg.l<sup>-1</sup>; (4, 8, 12 y 16), 14,60 mg.l<sup>-1</sup>; b) Representación de *loadings* en la determinación de CLT y SP por PLS-2, : (—) *loading 1*, (---) *loading 2* y (...) *loading 3*.

La Tabla 3.17 muestra los resultados de la predicción y validación en las condiciones de mínimo error para la determinación por PLS-2 para las predicciones efectuadas con 2 y 3 *factores*. En ella se puede observar que los resultados obtenidos para las predicciones con 2 y 3 *factores* son similares. En las condiciones óptimas de análisis (PLS-2, 2 *factores* entre 226 y 274 nm) los errores que se cometen no superan -en valor absoluto- el 3,53 y 3,21% de error relativo y el 2,52 y 3,04 % para CLT y SP y las matrices de predicción y validación, respectivamente.

**Tabla 3.17**

Resultados de la predicción y validación en la determinación de CLT y SP por PLS-2

		Validación				Predicción					
Cantidad añadida (mg l <sup>-1</sup> )		Error relativo (%)				Cantidad añadida (mg l <sup>-1</sup> )		Error relativo (%)			
		2 factores 226-274		3 factores 228-262				2 factores 226-274		3 factores 228-262	
CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP
2,98	4,67	-2,35	-0,86	-1,68	-0,43	3,57	5,26	1,96	2,47	-1,68	-0,43
2,98	7,01	2,01	2,28	1,34	1,71	3,57	8,18	-1,12	-1,34	1,34	1,71
2,98	11,10	0,34	0,27	0,00	0,09	3,57	11,10	0,56	1,80	0,00	0,10
2,98	12,85	2,35	0,62	3,02	0,62	3,57	14,02	-2,24	-0,43	3,02	0,52
5,95	4,67	1,01	3,21	0,67	2,57	7,14	5,26	0,28	-0,76	0,67	2,57
5,95	7,01	0,34	0,86	0,34	0,86	7,14	8,18	0,28	0,12	0,34	0,86
5,95	11,10	-0,34	0,18	0,00	0,36	7,14	11,10	1,40	-1,89	0,00	0,27
5,95	12,85	3,53	0,93	3,19	0,23	7,14	14,02	0,00	0,71	3,19	0,23
10,12	4,67	-0,20	-0,64	-0,20	-0,64	10,71	5,26	-2,52	-3,04	-0,20	-0,64
10,12	7,01	0,99	1,85	0,89	1,43	10,71	8,18	0,47	1,47	0,89	1,43
10,12	11,10	-0,20	0,18	-0,20	-0,09	10,71	11,10	0,56	-0,27	-0,20	-0,09
10,12	12,85	0,20	-0,47	0,30	-0,54	10,71	14,02	0,09	-0,93	0,30	-0,54
13,09	4,67	-0,31	-1,28	-0,38	-1,28	14,28	5,26	0,91	0,19	-0,38	-1,28
13,09	7,01	-0,92	-0,29	-0,92	-0,43	14,28	8,18	0,14	2,32	-0,92	-0,43
13,09	11,10	-1,07	-0,09	-1,07	-0,18	14,28	11,10	-0,56	-1,08	-1,07	-0,18
13,09	12,85	0,08	-0,54	0,15	-0,54	14,28	14,02	-0,07	0,64	0,15	-0,54

### III. 2. 3 Fenitoína - Fenobarbital

#### *Selección del intervalo de longitudes de onda*

Como se vio en los apartados anteriores, los espectros de absorción de fenitoína (DPH) y fenobarbital (PB) se encuentran ampliamente solapados; ambos analitos presentan un máximo de absorción a 210 nm y dejan de absorber radiación a partir de 280 nm.

Siguiendo el mismo diseño experimental planteado con anterioridad se construyó una matriz de calibración -acorde con los intervalos de linealidad- con los siguientes niveles: 1,97; 4,53; 7,29 y 9,85 mg.l<sup>-1</sup> para DPH y 2,02; 4,64; 7,46 y 10,08 mg.l<sup>-1</sup> para PB.

Los espectros de las disoluciones se registraron entre 200 y 300 nm, pero se decidió realizar la optimización entre 200 y 280 nm, estableciéndose todos los modelos posibles con un mínimo de 3 variables. La calibración se realizó aplicando PLS-2 y PLS-1 y la predicción con 2, 3 y 4 *factores* para PLS-2 y 1, 2, 3 y 4 *factores* para PLS-1.

En todos los casos la calibración fue realizada centrando los datos y utilizando como método de validación interna el *leverage correction*.

#### *Determinación de fenitoína por PLS-1*

La Tabla 3.18 muestra los resultados de la optimización del intervalo de longitudes de onda para las distintas calibraciones y predicciones efectuadas. En ella se puede observar que cuando se realiza la calibración por PLS-1 y la predicción con 1, 2, 3 y 4 *factores*, sólo los resultados correspondientes a un *factor* difieren de forma significativa del resto, no existiendo diferencias apreciables en los valores de RSE y RMSE para las predicciones efectuadas con 2, 3 y 4 *factores*. El elevado valor de los RSE y RMSE para la predicción con 1 *factor* descarta la predicción de DPH con este número de *factores*.

Cuando la calibración es efectuada por PLS-1 y la predicción con 2 *factores*, se obtienen dos modelos de mínimo RSE (0,55), uno de los cuales obtiene simultáneamente mínimo valor de RMSE (0,49), 238-244 nm. En la Figura 3.26 se puede observar el mismo comportamiento para ambos parámetros, observando también que los errores más altos se obtienen en las zonas en las que la absorción del medio es elevada (hasta 210 nm, aproximadamente), y en los intervalos de longitud de onda donde los analitos dejan de absorber (longitudes de onda superiores a 270 nm).

**Tabla 3.18**

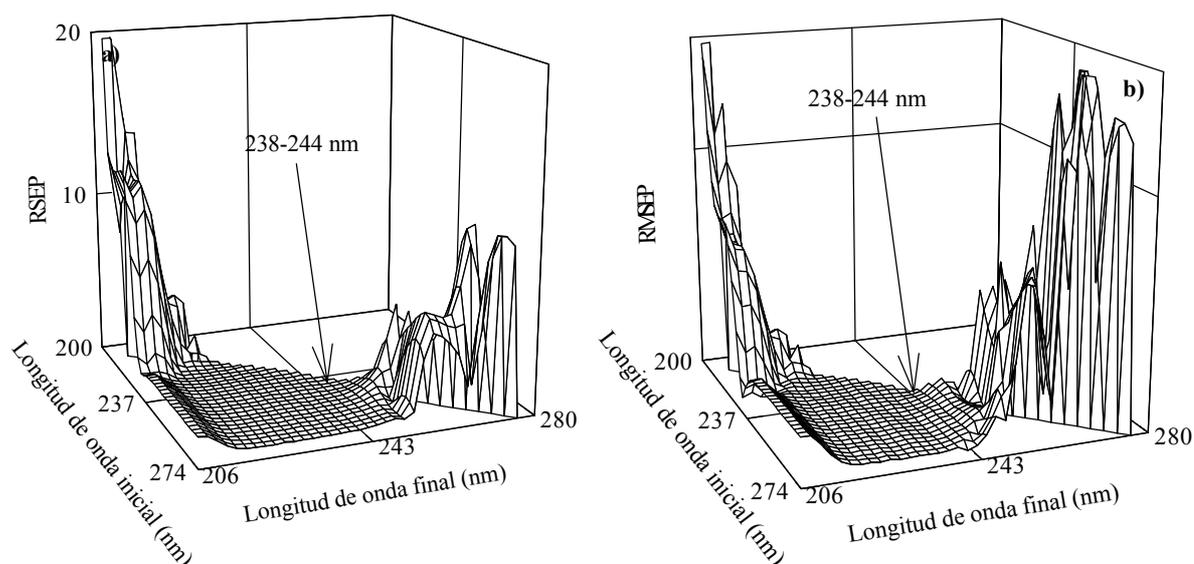
Resultados de la optimización del intervalo de longitudes de onda en la determinación de DPH y PB por PLS.

Nº factores	PLS-2			PLS-1				
	λ (nm)	RSE	RMSE	DPH			PB	
				λ (nm)	RSE	RMSE	RSE	RMSE
1				274-280	13,41	12,80		
				250-256			7,07	
				272-278				7,77
2	222-230	0,70		238-244	0,55	0,49		
	214-230		0,55	238-246	0,55			
				212-232			0,64	0,43
				214-232				0,43
3	202-236	0,72		240-256	0,53			
	222-268	0,74	0,57	200-234		0,76		
				240-250			0,50	
				240-252			0,50	
				240-256			0,50	
				220-228				0,56
4	222-228	0,71	0,60	202-244	0,57			
				218-224		0,49		
				222-228			0,74	0,57

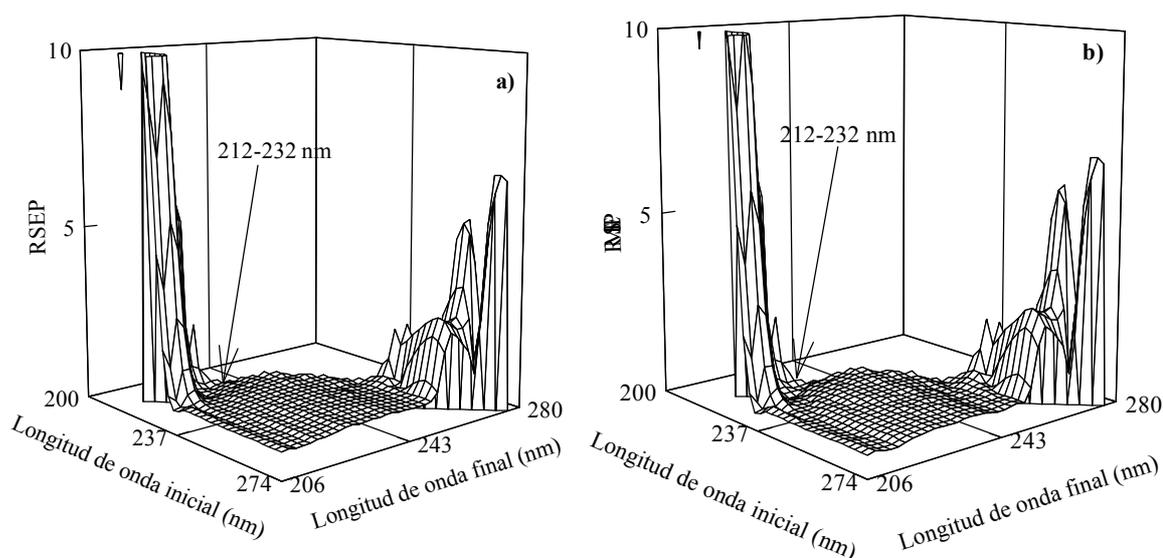
Determinación de fenobarbital por PLS-1

Como en el caso de DPH, al realizar la calibración por PLS-1 y la predicción con 1 *factor*, los valores de RSE y RMSE que se obtienen son elevados. Para la predicción con 2 *factores* se obtienen dos modelos de mínimo RMSE (0,43), para uno de ellos también es mínimo el RSE (0,64), 212-232 nm. La Figura 3.27 muestra las superficies de respuesta obtenidas para la calibración por PLS-1 y la predicción con 2 *factores*; se vuelve a observar la semejanza de ambos perfiles. Los errores más elevados se obtienen en la zona donde la

absorción de la reguladora es alta y los espectros de los dos analitos muestran igual comportamiento, se observa también una zona donde los errores toman valores intermedios, que corresponde a la región del espectro donde son máximas las diferencias espectrales, 220-260 nm, así como una última zona donde los errores aumentan, debido a la escasa absorbancia de los analitos.



**Figura 3.26:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de DPH por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.



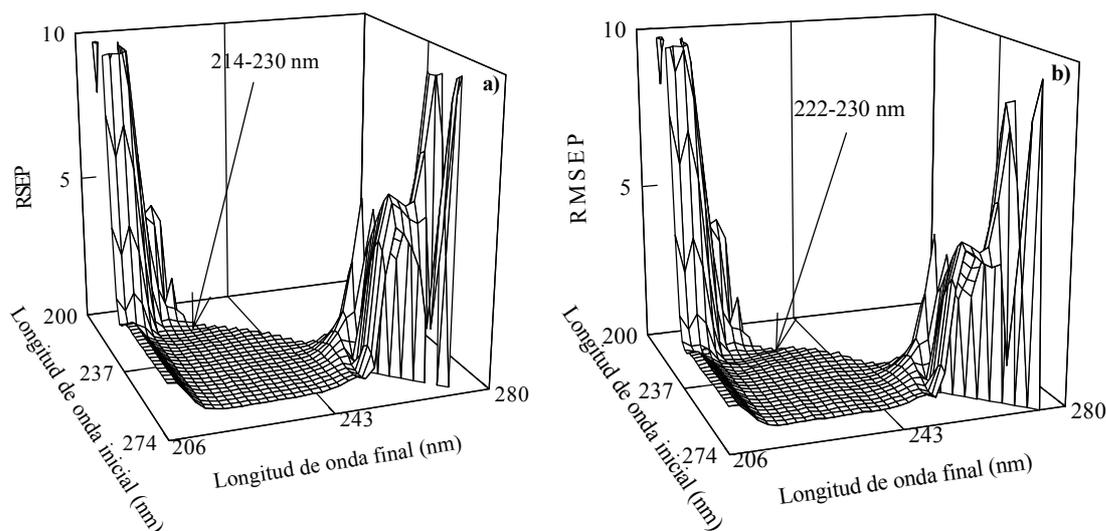
**Figura 3.27:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de PB por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.

Determinación de fenitoína y fenobarbital por PLS-2

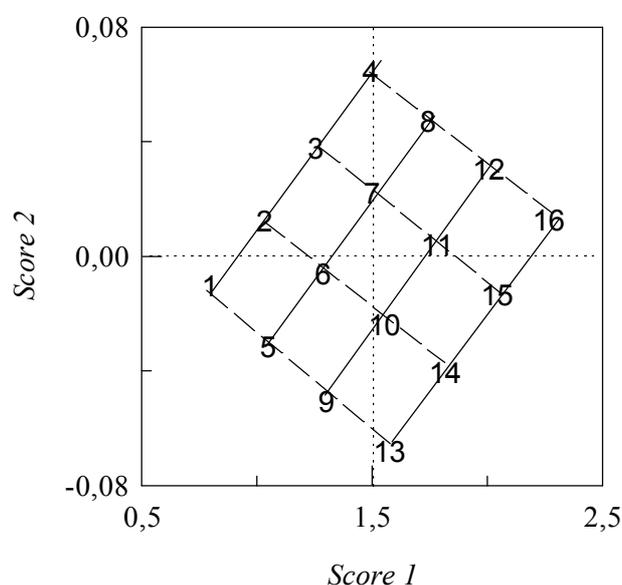
Cuando se aplicó PLS-2 a la determinación simultánea de DPH y PB y la predicción con 2 factores, se obtiene un modelo de mínimo RSE (0,70), 222-230 nm, y otro de mínimo RMSE (0,55), 214-230 nm. La Figura 3.28 muestra las superficies de respuesta obtenidas, que son similares a las que se mencionan en párrafos anteriores.

Como se observa en la Tabla 3.18 las distintas calibraciones efectuadas, independientemente del número de factores utilizados para realizar la predicción, originan valores de RSE y RMSE similares. Puesto que la utilización de PLS-1 implica realizar un modelo por analito, mientras que con PLS-2 un sólo modelo es suficiente, la cuantificación de DPH y PB por PLS se realizó por PLS-2. De los dos modelos encontrados para la calibración efectuada por PLS-2 se descarta la utilización del modelo de menor RSE por presentar error sistemático, pues para la mayoría de las mezclas de predicción los errores obtenidos tienen el mismo sentido.

La Tabla 3.19 muestra los resultados de la determinación, en ella se puede observar que los errores que se cometen en la predicción de la concentración de DPH y PB en las muestras de la matriz de validación son inferiores al 1,75 y 1,32 %, respectivamente. Para la matriz de predicción los errores que se obtienen son ligeramente superiores, en cualquier caso son inferiores –en valor absoluto- al 4,62 y 1,59 %, respectivamente.



**Figura 3.28:** Resultado de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de DPH y PB por PLS-2: a) RSE y b) RMSE.



**Figura 3.29:** *Score 2 vs Score 1* en la determinación de DPH y PB por PLS-2. Objetos de la matriz de calibrado con concentración de DPH de: (1, 2, 3 y 4), 1,97 mg.l<sup>-1</sup>; (5, 6, 7 y 8), 4,53 mg.l<sup>-1</sup>; (9, 10, 11 y 12), 7,29 mg.l<sup>-1</sup>; (13, 14, 15 y 16), 9,85 mg.l<sup>-1</sup>; y concentración de PB de: (1, 5, 9 y 13), 2,02 mg.l<sup>-1</sup>; (2, 6, 10 y 14), 4,64 mg.l<sup>-1</sup>; (3, 7, 11 y 15), 7,46 mg.l<sup>-1</sup>; (4, 8, 12 y 16), 10,08 mg.l<sup>-1</sup>.

El modelo elegido explica con 1 *factor* el 95,66 y 89,78 % de la varianza de la matriz de absorbancias de DPH y PB, con 2 *factores* la varianza explicada pasa a ser del 99,98 % para ambos analitos.

La Figura 3.29 muestra la representación de *scores*, en ella se puede observar que los *scores* 1 y 2 dependen de la concentración total de DPH y PB, es decir, aumentan a medida que lo hacen la suma de las concentraciones de DPH y PB. El escaso número de variables impide la interpretación de los *loadings*.

La precisión del método fue evaluada con un análisis de varianza, para lo cual se prepararon 3 series de 6 muestras cada una, obteniendo un valor de F de Snedecor de 1.66 y 2.55 para DPH y PB, respectivamente, valores inferiores a la  $F_{2,15}$  crítica tabulada para un nivel de significación del 95 %, 3,68, no existiendo, por tanto, evidencias de error sistemático.

**Tabla 3.19**

Resultados de la determinación de DPH y PB por PLS-2 y la predicción con 2 *factores*.

Validación				Predicción			
Cantidad añadida (mg l <sup>-1</sup> )		Cantidad encontrada (mg l <sup>-1</sup> ± DS)		Cantidad añadida (mg l <sup>-1</sup> )		Cantidad encontrada (mg l <sup>-1</sup> ± DS)	
DPH	PB	DPH	PB	DPH	PB	DPH	PB
4,11	2,94	4,16 ± 0,02	2,95 ± 0,02	3,46	2,04	3,53 ± 0,07	2,02 ± 0,05
4,11	4,20	4,08 ± 0,02	4,21 ± 0,02	3,46	4,08	3,57 ± 0,09	4,08 ± 0,07
4,11	6,30	4,10 ± 0,01	6,32 ± 0,01	3,46	6,12	3,60 ± 0,09	6,06 ± 0,06
4,11	7,56	4,19 ± 0,03	7,63 ± 0,03	3,46	8,16	3,62 ± 0,05	8,00 ± 0,03
5,14	2,94	5,11 ± 0,02	2,96 ± 0,02	5,19	2,04	5,22 ± 0,06	2,01 ± 0,04
5,14	4,20	5,21 ± 0,02	4,21 ± 0,02	5,19	4,08	5,28 ± 0,07	4,02 ± 0,05
5,14	6,30	5,19 ± 0,02	6,37 ± 0,02	5,19	6,12	5,30 ± 0,05	6,07 ± 0,04
5,14	7,56	5,11 ± 0,03	7,62 ± 0,02	5,19	8,16	5,26 ± 0,06	8,03 ± 0,04
6,85	2,94	6,88 ± 0,01	2,95 ± 0,01	6,92	2,04	6,99 ± 0,07	2,02 ± 0,05
6,85	4,20	6,82 ± 0,02	4,23 ± 0,02	6,92	2,04	6,99 ± 0,07	2,02 ± 0,05
6,85	6,30	6,86 ± 0,02	6,31 ± 0,02	6,92	4,08	7,05 ± 0,10	4,07 ± 0,07
6,85	7,56	6,85 ± 0,03	7,61 ± 0,03	6,92	6,12	6,94 ± 0,09	6,04 ± 0,07
7,88	2,94	7,86 ± 0,02	2,96 ± 0,02	6,92	8,16	6,90 ± 0,09	8,00 ± 0,06
7,88	4,20	7,89 ± 0,02	4,22 ± 0,02	8,65	2,04	8,59 ± 0,07	2,06 ± 0,05
7,88	6,30	7,87 ± 0,01	6,37 ± 0,01	8,65	4,08	8,56 ± 0,09	4,09 ± 0,06
7,88	7,56	7,82 ± 0,02	7,63 ± 0,02	8,65	6,12	8,57 ± 0,05	6,08 ± 0,04

### **III.3. Aplicaciones: Determinación de mezclas binarias en preparados farmacéuticos**

Los métodos de calibración univariada y multivariante estudiados anteriormente han sido aplicados a la determinación de los principios activos de varios medicamentos.

#### **III.3.1 Determinación de dihidralazina (DHZ) e hidroclorotiazida (HCT) en “Adelfán-Esidrex”**

Los comprimidos de estos productos farmacéuticos, que contienen 10 mg de DHZ y 10 mg de HCT, se trataron como se describe en la parte experimental, preparándose disoluciones de 10 mg.l<sup>-1</sup>. De esta disolución se tomaron seis muestras y de cada una de ellas tres disoluciones que se trataron y midieron como las muestras sintéticas descritas en los apartados anteriores.

##### ***Espectrofotometría derivada***

La Tabla 3.20 muestra los resultados obtenidos en la determinación de DHZ y HCT en el preparado farmacéutico “Adelfán-Esidrex” por los métodos del cruce por cero y espectros cocientes derivados. En el método del cruce por cero la DHZ se determinó en el cruce del espectro en segunda derivada de HCT (306 nm); HCT se determinó en el cruce del espectro de DHZ en segunda derivada a 270 nm. En el método de los espectros cocientes derivados, la determinación se realizó entre 254 y 270 y entre 254 y 272 nm, para DHZ y HCT, respectivamente.

##### ***Regresión multivariante***

A los espectros de absorción de las disoluciones del medicamento se aplicó PLS-1 entre 238 y 318 nm para DHZ y entre 258 y 268 nm para HCT. Los resultados encontrados se exponen en la Tabla 3.21.

La observación de las Tablas 3.20 y 3.21 permite asegurar que tanto la calibración univariada como la multivariante ofrecen buenos resultados para la determinación de DHZ e

HCT, obteniéndose errores y desviaciones estándar relativas inferiores al  $\pm 15 \%$  y  $6 \%$ , respectivamente, valores estos permitidos por la legislación vigente en relación a la uniformidad en el peso declarado en los productos farmacéuticos.

**Tabla 3.20**

Determinación simultánea de DHZ e HCT en preparados farmacéuticos mediante calibración univariante

Método del cruce por cero		Método de los cocientes derivados	
mg DHZ $\pm$ DS*	mg HCT $\pm$ DS*	mg DHZ $\pm$ DS*	mg HCT $\pm$ DS*
10,43 $\pm$ 0,28	10,12 $\pm$ 0,00	10,33 $\pm$ 0,12	10,12 $\pm$ 0,02
9,42 $\pm$ 0,16	9,99 $\pm$ 0,01	9,94 $\pm$ 0,11	9,99 $\pm$ 0,03
9,81 $\pm$ 0,34	9,96 $\pm$ 0,07	9,88 $\pm$ 0,18	9,91 $\pm$ 0,04
10,17 $\pm$ 0,32	10,02 $\pm$ 0,04	9,91 $\pm$ 0,02	9,97 $\pm$ 0,04
9,94 $\pm$ 0,36	9,97 $\pm$ 0,02	10,21 $\pm$ 0,12	10,08 $\pm$ 0,06
9,66 $\pm$ 0,20	9,94 $\pm$ 0,01	9,76 $\pm$ 0,08	9,93 $\pm$ 0,04
9,91 $\pm$ 0,36	10,00 $\pm$ 0,06	10,01 $\pm$ 0,20	10,00 $\pm$ 0,08

\* Desviación estándar

**Tabla 3.21**

Resultados de la determinación de DHZ e HCT en preparados farmacéuticos mediante PLS y HPLC

mg DHZ <sup>(a)</sup> $\pm$ DS*		mg HCT <sup>(b)</sup> $\pm$ DS*	
PLS-1	HPLC	PLS-1	HPLC
10,25 $\pm$ 0,59	9,70 $\pm$ 1,11	11,80 $\pm$ 0,15	10,03 $\pm$ 0,22
9,76 $\pm$ 0,53	9,52 $\pm$ 0,46	9,48 $\pm$ 0,12	9,63 $\pm$ 4,26
9,91 $\pm$ 0,31	9,61 $\pm$ 0,94	9,86 $\pm$ 0,11	9,50 $\pm$ 0,09
9,25 $\pm$ 0,27	10,22 $\pm$ 0,86	9,79 $\pm$ 0,05	10,04 $\pm$ 0,45
9,80 $\pm$ 0,35	10,00 $\pm$ 1,41	9,68 $\pm$ 0,11	9,67 $\pm$ 0,37
10,00 $\pm$ 0,31	9,81 $\pm$ 1,03	9,88 $\pm$ 0,09	9,85 $\pm$ 0,59
9,82 $\pm$ 0,33	9,81 $\pm$ 0,26	10,08 $\pm$ 0,85	9,79 $\pm$ 0,22

<sup>(a)</sup> Cromatogramas a 217,4 nm. <sup>(b)</sup> Cromatogramas a 224,5 nm. \* Desviación estándar

### ***Validación por HPLC***

En el presente apartado se procede a la validación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución del método espectrofotométrico propuesto.

#### ***Elección de las condiciones cromatográficas***

En primer lugar se estudió la composición de la fase móvil que pusiera de manifiesto la presencia de los dos analitos, y que permitiera su cuantificación. Se ensayaron mezclas etanol/agua (20/80 y 30/70) como fases móviles, encontrándose que la polaridad era excesiva, y ninguno de los fármacos quedaba retenido en la columna. Se disminuyó, entonces, la polaridad de la fase móvil cambiando su composición a acetonitrilo/agua: 70/30, 60/40 y 50/50. Sólo con esta última apareció el pico correspondiente a la HCT, con un tiempo de retención de 2,9 minutos; la DHZ no era retenida.

Con Na H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/Metanol 80/20 como fase móvil se empieza a apreciar también la señal correspondiente a la DHZ, pero su tiempo de retención es tan pequeño, que el solapamiento con la señal del frente hace imposible una cuantificación en estas condiciones. Por tanto, se consideró que una modificación en el pH de la fase móvil o en su concentración podrían mejorar los resultados. Así, al disminuir el pH de la fase móvil a 3,5, la señal del frente se va separando de la de la DHZ; a pH = 2,5, los tiempos de retención no varían con respecto a los anteriores, pero se incrementa el ruido de fondo en los cromatogramas, y además, la fase estacionaria puede verse afectada de forma irreversible por el aumento de la acidez; de ahí, que se considerara adecuado un pH de 3,5 para la determinación. Por otra parte, aumentando la concentración de dihidrógeno fosfato de sodio a 50 mM se encontró que el solapamiento del pico de la DHZ con el del frente desaparecía, aunque éste era asimétrico.

En un intento de mejorar la simetría del pico de la DHZ se ensayó la utilización de hidróxido de trimetilamonio 50 mM (pH=3,5)/Metanol 80/20 como fase móvil, obteniéndose, así, señales comparables, simétricas y perfectamente separadas para DHZ e HCT. Sin embargo, al realizar la cuantificación de DHZ con esta fase móvil no se obtenían buenos resultados en la etapa de validación. Por ello, la cuantificación se llevó a cabo utilizando NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH=3,5)/Metanol 80/20; al proceder en estas condiciones se encontró que los resultados obtenidos en la calibración y validación de las muestras sintéticas eran aceptables, a pesar de la asimetría en el pico de la DHZ. Los tiempos de retención de los analitos en estas condiciones eran de 1,35 y 2,32 minutos para DHZ e HCT, respectivamente.

Calibración

Una vez elegida la fase móvil, para poder llevar a cabo la determinación cromatográfica se realizó una calibración para cada uno de los analitos. Así, se prepararon mezclas de concentraciones definidas por los intervalos de linealidad mostrados por los analitos en su determinación cromatográfica, 9-31 mg.l<sup>-1</sup> para DHZ y 1-30 mg.l<sup>-1</sup> para HCT, y se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo.

A continuación, se procedió a determinar las áreas y las alturas de los picos cromatográficos correspondientes a las longitudes de onda de los máximos de los analitos, y a 254 nm (longitud de onda utilizada por defecto por el sistema cromatográfico). El mayor ajuste de los datos se encontró cuando se utilizaban las áreas, y, los mejores resultados, mostrados a continuación, correspondían a la determinación a partir de los cromatogramas a 217,4 nm para la DHZ y 224,5 para HCT (longitudes de onda de sus máximos de absorción).

	DHZ		HCT		
	254	217,4	254	224,5	272,7
λ (nm)	254	217,4	254	224,5	272,7
RSE	5,12	3,57	1,80	4,23	5,34
RMSE	4,37	4,03	1,25	2,75	2,94

La Tabla 3.22 recoge los resultados procedentes de una serie de mezclas sintéticas preparadas con la finalidad de comprobar la capacidad de predicción de las rectas de calibrado obtenidas, apreciándose que en las condiciones mencionadas (áreas de los picos cromatográficos a las longitudes de onda de sus máximos de absorción) se obtienen mejores resultados en la predicción de HCT, como era de esperar puesto que el pico cromatográfico es totalmente simétrico.

Determinación en “Adelfán-Esidrex”

Las disoluciones del medicamento, preparadas como se describe en la parte experimental, se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de líquidos, y se determinaron los contenidos de DHZ e HCT haciendo uso de las rectas de calibrado correspondientes a las áreas de los picos a 217,4 y 224,5 nm, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.21, en la que se puede observar que los valores encontrados están siempre dentro del ± 15% del valor declarado (10 mg para cada uno de los fármacos) y las desviaciones estándar por debajo del 6 %.

**Tabla 3. 22**  
Resultados de la determinación de DHZ e HCT en mezclas por HPLC

mg.l <sup>-1</sup> añadidos		mg.l <sup>-1</sup> encontrados	
DHZ	HCT	DHZ	HCT
9,18	19,20	8,57 ± 1,28	19,75 ± 0,16
9,18	25,60	9,70 ± 1,56	27,23 ± 0,13
12,24	19,20	11,69 ± 1,12	18,87 ± 0,50
12,24	25,60	11,65 ± 1,59	26,94 ± 0,31
18,36	6,40	20,43 ± 1,05	6,53 ± 0,26
18,36	12,80	16,87 ± 3,23	12,18 ± 2,49
24,48	6,40	26,20 ± 3,15	6,54 ± 0,73
24,48	12,80	23,37 ± 2,86	13,82 ± 1,08
30,60	6,40	30,53 ± 2,14	6,29 ± 0,30
30,60	19,20	31,09 ± 0,94	19,71 ± 0,15

### *Comparación de resultados*

Por último, se realizó la comparación de las medias obtenidas por los distintos métodos, Tablas 3.20 y 3.21. Con respecto a los métodos de calibración univariada y HPLC, los valores de t-Student obtenidos para la comparación de DHZ son de 3,66 y 1,98 para los métodos del cruce por cero y espectros cocientes, respectivamente; los valores de t-Student obtenidos para la comparación de HCT son de 5,08 y 4,83. El valor de t tabulado para un 95% de confianza y 5 grados de libertad es de 4,96, no existiendo diferencias significativas para la determinación de DHZ por ambos métodos y sí para la determinación de HCT por el método del cruce por cero en el espectro de segunda derivada a 306 nm. Cuando se comparan la aplicación de PLS a datos espectrofotométricos y HPLC, Tabla 3.21, se obtienen valores de t-Student de 2,32 y 1,89, para DHZ e HCT, respectivamente, valores que son inferiores al tabulado, con lo que se puede decir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por espectrofotometría aplicando PLS-1 y por cromatografía de líquidos en fase inversa.

### **III.3.2 Determinación simultánea de clortalidona (CLT) y espironolactona (SP) en “Aldoleo”**

La determinación simultánea de CLT y SP se llevó a cabo en “Aldoleo”, 50 mg CLT, 50 mg SP. Para ello se prepararon las muestras siguiendo el procedimiento que se describe en la parte experimental aplicando los métodos seleccionados anteriormente.

#### ***Espectrofotometría derivada***

Como se vio con anterioridad en el desarrollo del presente capítulo, los métodos de calibración univariados no son apropiados para resolver la mezcla de CLT y SP por encontrarse evidencias de error sistemático y errores altos en su cuantificación. No obstante, es posible la determinación de SP en presencia de CLT por el método del cruce por cero en primera derivada a 274 nm y por el método de los espectros cocientes derivados en primera derivada a 270 nm y en segunda derivada a 256 nm.

La cuantificación de SP en el medicamentos puede realizarse con un error del 4,8 % y una desviación estándar media de 1,4 %.

#### ***Regresión multivariante***

A los espectros de absorción de las disoluciones de los medicamentos se les aplicó el algoritmo PLS utilizando el modelo que proporcionaba mejores resultados en la determinación simultánea de los analitos en mezclas sintéticas; es decir, PLS-2 entre 226 y 274 nm llevando a cabo la predicción con 2 *factores*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.23, donde se puede observar una buena concordancia entre los valores encontrados y declarados.

**Tabla 3.23**  
Determinación simultánea de CLT y SP en “Aldoleo”

mg CLT <sup>(a)</sup> ± DS*		mg SP <sup>(b)</sup> ± DS*	
PLS-1	HPLC	PLS-1	HPLC
51,66 ± 0,02	53,48 ± 0,02	47,38 ± 0,02	51,28 ± 0,04
49,68 ± 0,04	46,90 ± 0,06	51,95 ± 0,03	51,15 ± 0,08
50,05 ± 0,05	52,44 ± 0,09	51,96 ± 0,05	52,61 ± 0,20
47,57 ± 0,09	51,21 ± 0,05	50,98 ± 0,09	48,58 ± 0,22
48,61 ± 0,03	50,78 ± 0,18	51,13 ± 0,03	51,61 ± 0,05
47,20 ± 0,02	44,62 ± 0,15	51,63 ± 0,02	46,45 ± 0,14
49,76 ± 0,04	50,35 ± 0,20	48,87 ± 0,04	51,95 ± 0,10
48,21 ± 0,02	46,23 ± 0,12	50,37 ± 0,02	49,02 ± 0,08
50,20 ± 0,04	52,17 ± 0,13	46,14 ± 0,05	59,04 ± 0,17
47,82 ± 0,02	49,34 ± 0,01	51,37 ± 0,03	51,36 ± 0,06
49,07 ± 1,42	49,79 ± 2,99	50,12 ± 2,04	51,31 ± 3,30

<sup>(a)</sup> Cromatogramas a 207 nm para CLT. <sup>(b)</sup> Cromatogramas a 238 nm para SP. \*Valor medio de tres determinaciones.

### ***Validación por HPLC***

Para realizar la determinación por HPLC se han seguido las mismas pautas descritas anteriormente.

### ***Elección de las condiciones cromatográficas***

Para comenzar el análisis se ensayó la mezcla metanol/agua (20/80) como fase móvil, encontrándose que la polaridad era excesiva, y ninguno de los fármacos quedaba retenido en la columna. Se disminuyó, entonces, la polaridad de la fase móvil cambiando su composición a metanol/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, pH 6,0) (20/80), en estas condiciones la CLT presenta un tiempo de retención superior a 10 minutos y la SP se desplaza con el frente.

En un intento de retener a este último analito, se cambia la polaridad de la fase móvil a metanol/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, pH 6,0) (80/20), la CLT muestra un tiempo de retención de 1,2 minutos y la SP de 1,5 minutos. Finalmente se probaron fases móviles de polaridad intermedia:

metanol/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, pH 6,0) (75/25) y metanol/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, pH 6,0) (70/30). En estas condiciones la CLT muestra un tiempo de retención de 1,3 minutos y la SP de 1,9 y 2,3 minutos, respectivamente. Se seleccionó la última de las fases anteriormente mencionadas.

### Calibración

Para la construcción de las curvas de calibrado de los analitos se prepararon mezclas de concentraciones definidas por los intervalos de linealidad mostrados por los analitos en su determinación cromatográfica, 4,08-16,32 mg.l<sup>-1</sup> para CLT y 4,16-18,72 mg.l<sup>-1</sup> para SP; la inyección se hizo por triplicado.

A continuación, se procedió a determinar las áreas y las alturas de los picos cromatográficos correspondientes a las longitudes de onda de los máximos de los analitos, 207 y 238 nm, para CLT y SP, respectivamente. El mejor ajuste de los datos se encontró cuando se utilizaban las áreas:

---

	CLT		SP	
	Áreas	Alturas	Áreas	Alturas
RSE	3,64	4,73	1,84	4,14
RMSE	4,23	4,82	1,61	3,15

---

La Tabla 3.24 recoge los resultados procedentes de la determinación de los analitos en una serie de mezclas sintéticas preparadas con la finalidad de comprobar la capacidad de predicción de las rectas de calibrado obtenidas.

### Determinación en "Aldoleo"

La Tablas 3.23 muestra los resultados encontrados para la determinación de CLT y SP en el medicamento mediante HPLC; se observa que la diferencia entre los valores encontrados y declarados, y las desviaciones estándar relativas son inferiores a un 5 %.

**Tabla 3.24**  
Resultados de la determinación de CLT y SP en mezclas por HPLC

mg.l <sup>-1</sup> añadidos		mg.l <sup>-1</sup> encontrados		Error relativo (%)	
CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP
6,12	6,00	6,58 ± 0,13	6,29 ± 0,16	-7,52	-4,89
8,16	8,00	8,36 ± 0,16	8,08 ± 0,20	-2,39	-1,00
10,20	10,00	10,18 ± 0,37	10,08 ± 0,52	0,16	-0,80
12,24	12,00	11,93 ± 0,24	11,69 ± 0,05	2,53	2,63
	RSE	4,08	3,32		
	RMSE	4,27	3,26		

#### *Comparación de resultados*

Por último se realizó un estudio estadístico de comparación de las medias obtenidas por HPLC, y por aplicación de PLS a los datos espectrofotométricos. Los valores de t-Student fueron de 2,17 para CLT y 1,19 para SP, valores que son inferiores al valor tabulado. Por tanto, se puede decir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por espectrofotometría aplicando PLS y por cromatografía de líquidos de alta resolución.

### III.3.3. Determinación de fenitoína (DPH) y fenobarbital (PB) en “Epilantín”

Los métodos de calibración univariados y multivariantes propuestos para la determinación de DPH y PB en mezclas se aplicaron a la determinación de los fármacos en el medicamento “Epilantín”, comprimidos que contienen 100 y 50 mg declarados para DPH y PB, respectivamente. Para ello se prepararon diversas disoluciones que se trataron y midieron como se describe en la parte experimental.

#### *Espectrofotometría derivada*

Al realizar el estudio de esta mezcla en muestras sintéticas, se encontró que DPH no puede determinarse por ninguno de los métodos de calibración univariada ensayados por nosotros; sin embargo, sí se puede determinar PB por el método del cruce por cero, midiendo en segunda derivada a 244 nm, y por el método de los espectros cocientes derivados en el espectro de primera derivada a 242 nm. Las cantidades de PB encontradas fueron de  $47,96 \pm 0,28$  mg y  $44,79 \pm 0,69$  mg, para el método del cruce por cero y de los espectros cocientes derivados, respectivamente. Estos resultados no son del todo satisfactorios, pues en el mejor de los casos - método del cruce por cero a 244 nm- el error que se comete en la determinación es 4,2 %, y la desviación estándar relativa 6,7 %.

#### *Regresión multivariante*

A las muestras medidas espectrofotométricamente se les aplicó PLS-1 entre 200 y 242 nm para la determinación de DPH y entre 226 y 244 nm para la determinación de PB, condiciones en las que se obtuvieron los mejores resultados en la determinación simultánea en muestras sintéticas.

Los resultados son excelentes para la determinación de DPH y muy buenos para PB, Tabla 3.25.

**Tabla 3.25**

Resultados de la aplicación de PLS a la determinación de DPH y PB en preparados farmacéuticos

mg DPH $\pm$ DS*		mg PB $\pm$ DS*	
PLS-1	HPLC	PLS-1	HPLC
97,8 $\pm$ 0,1	97,5 $\pm$ 0,0	48,7 $\pm$ 0,4	49,8 $\pm$ 0,4
98,5 $\pm$ 0,1	97,8 $\pm$ 0,0	49,9 $\pm$ 0,5	49,5 $\pm$ 0,3
99,4 $\pm$ 0,1	99,5 $\pm$ 0,0	51,0 $\pm$ 0,6	50,0 $\pm$ 0,3
99,5 $\pm$ 0,1	98,9 $\pm$ 0,0	49,5 $\pm$ 0,5	50,3 $\pm$ 0,2
99,7 $\pm$ 0,1	101,1 $\pm$ 0,0	49,8 $\pm$ 0,6	49,9 $\pm$ 0,2
104,8 $\pm$ 0,1	105,6 $\pm$ 0,0	52,0 $\pm$ 0,6	50,6 $\pm$ 0,1
100,0 $\pm$ 2,5	100,1 $\pm$ 3,0	50,2 $\pm$ 1,2	50,0 $\pm$ 0,4

\*Valor medio de tres determinaciones.

#### ***Validación por HPLC***

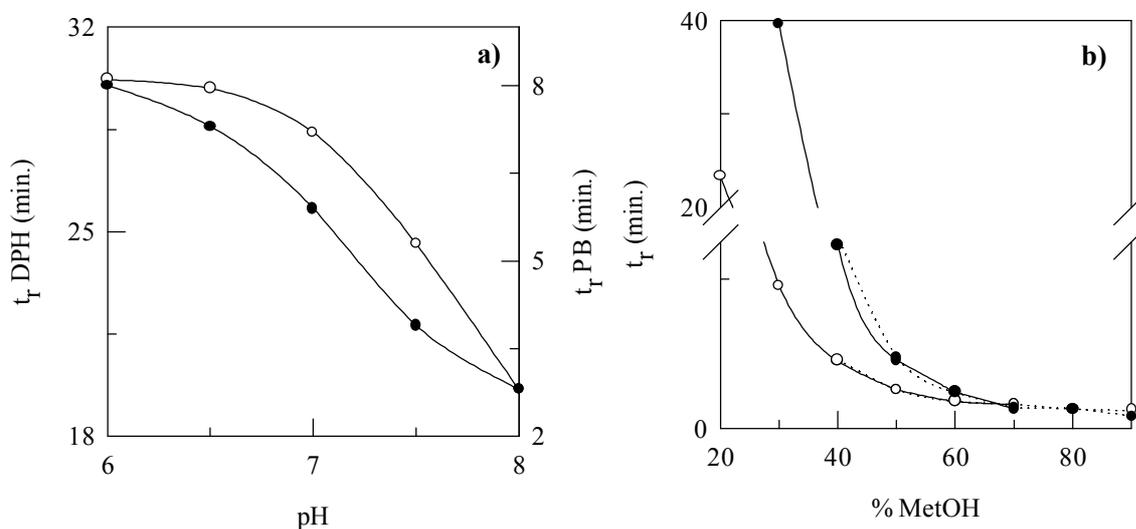
El método propuesto se validó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

#### ***Elección de las condiciones cromatográficas***

Como quiera que en los casos precedentes la fase móvil empleada fue metanol/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, este estudio se inició tratando de optimizar el porcentaje de metanol y el pH de la fase móvil. La Figura 3.30.(a) muestra la variación en los tiempos de retención de DPH y PB utilizando una fase móvil con el 25 % de metanol y una disolución 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> con valores de pH comprendidos entre 6,0 y 8,0, observándose que a medida que el pH de la fase móvil aumenta los tiempos de retención de DPH y PB disminuyen. Así, para un pH de 6,0 los tiempos de retención de DPH y PB son de 30,2 y 8,0, respectivamente, pasando a 19,6 y 2,8 cuando el pH es de 8,0.

Por otro lado, la Figura 3.30.(b) muestra la variación de los tiempos de retención de DPH y PB en función del porcentaje de metanol para disoluciones de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6,5, y TRIS, pH 7,0. En ambos casos se observa que a medida que aumenta el porcentaje de metanol los tiempos de retención de DPH y PB disminuyen. Cuando se utiliza una disolución 10 mM de TRIS, pH 7,0, se observa que con un 20% de metanol el tiempo de retención de DPH es

superior a 40 minutos; sin embargo, con Metanol/10mM TRIS, pH 7,0 (60:40) los tiempos de retención de DPH y PB son de 2,5 y 1,8 minutos, respectivamente.



**Figura 3.30:** a) Variación de los tiempos de retención de DPH (o) y PB (•) con el pH. Fase móvil MetOH/10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25/75); b) Variación de los tiempos de retención de DPH (o) y PB (•) con el porcentaje de MetOH para una fase móvil 10 mM de: (...) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5 y (–) TRIS, pH 7,0.

### Calibración

Una vez encontradas las condiciones de pH y porcentaje de metanol de la fase móvil, se procedió a la construcción de las curvas de calibrado de los analitos. Se prepararon mezclas de concentraciones definidas por los intervalos de linealidad mostrados por los fármacos en su determinación cromatográfica, 2,14-12,84 mg.l<sup>-1</sup> para DPH y 2,10-12,58 mg.l<sup>-1</sup> para PB, y se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo, midiendo las áreas de los cromatogramas obtenidos a 220 nm (longitud de onda que mejores resultados proporciona).

### Determinación en “Epilantín”

La disolución del medicamento, preparada como se describe en la parte experimental, se inyectó por triplicado en el cromatógrafo de líquidos, y a partir de los cromatogramas registrados, y haciendo uso de la recta de calibrado preparada anteriormente, se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 3.25 donde se aprecia una buena concordancia entre los valores encontrados y declarados. En la Tabla se comprueba que la diferencia entre los valores declarados (100 mg DPH, 50 mg PB) y encontrados de ambos fármacos es inferior al  $\pm 15 \%$  y las desviaciones estándar relativas son inferiores al 4 %.

***Comparación de resultados***

La comparación de las medias obtenidas por ambos métodos da como resultado valores de t-Student de 2,12 y 2,51, para DPH y PB, respectivamente, valores que son inferiores al tabulado, con lo que se puede decir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por PLS-1 y HPLC.

**Bibliografía**

1. C.S. French, A.B. Church y R.W. Epply, *Carnegie Institution of Washington, Year Book*, **53**, 182, 1954.
2. V.J. Hammond y W.C. Price, *J. Opt. Soc. Amer.*, **43**, 924, 1953.
3. G. Bonfiglioli y P. Provetto, *Appl. Opt.*, **3**, 1417, 1964.
4. J.M. García, A.I. Jiménez, F. Jiménez y J.J. Arias, *Anal. Chim. Acta*, **252 (1-2)**, 107, 1991.
5. C. Vetuschi, A.M. Farina y G. Ragno, *Spectroscopy Letts*, **22 (1)**, 41, 1989.
6. Y.L. Zhu y J.X. Shao, *Analyst*, **114**, 97, 1989.
7. F. Salinas, J.J. Berzas y A. Espinosa, *Talanta*, **37 (3)**, 347, 1990.
8. J.M. García, O. Hernández, A.I. Jiménez, F. Jiménez y J.J. Arias, *Anal. Chim. Acta*, **317 (1-3)**, 83, 1995.
9. J. Mandel y F.J. Linnig, *Anal. Chem.*, **29**, 743, 1957.

---

**CAPÍTULO IV**  
**RESOLUCIÓN DE MEZCLAS TERNARIAS**



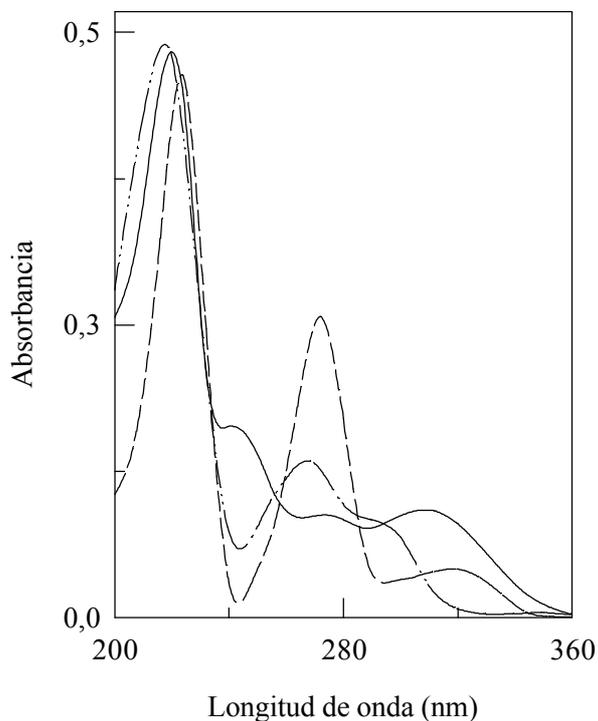
En este capítulo se demuestra que la calibración multivariante permite la resolución de mezclas ternarias de analitos con espectros ampliamente solapados, sin tener que recurrir a separaciones previas o a complejos montajes. Las mezclas elegidas han sido: dihidralazina (DHZ), hidroclorotiazida (HCT) y reserpina (RSP), y clortalidona (CLT), espironolactona (SP) y reserpina (RSP).

#### **IV.1. Determinación simultánea de dihidralazina, hidroclorotiazida y reserpina**

Los espectros de absorción de DHZ e HCT se describen en el Capítulo III, y en la Figura 4.1 se puede observar que RSP presenta dos máximos de absorción situados a 220 y 270 nm, con un hombro a 300 nm.

##### **IV. 1. 1. Regresión en mínimos cuadrados parciales**

La Figura 4.1 muestra los espectros de absorción de los tres diuréticos DHZ, HCT y RSP en el intervalo 200 – 360 nm; en ella puede observarse el elevado solapamiento espectral de los analitos, por lo que la cuantificación se realiza por calibración multivariante (regresión en mínimos cuadrados parciales, PLS).

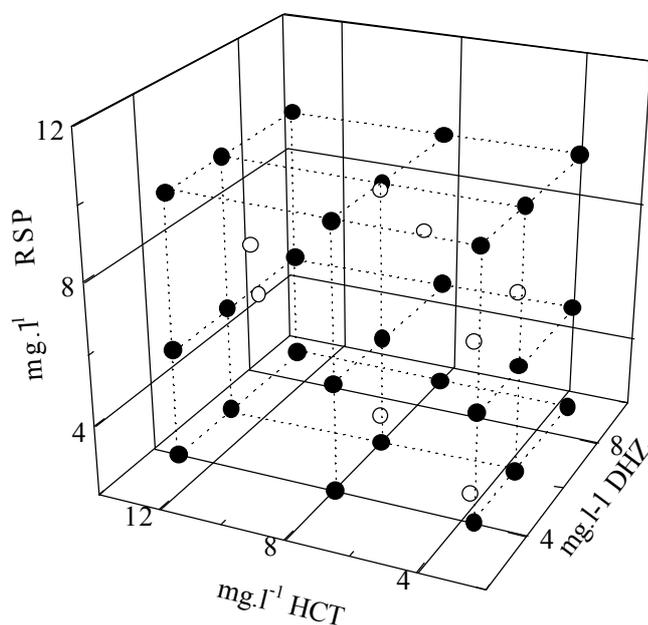


**Figura 4.1:** espectros de absorción de 4, 3 y 5 mg.l<sup>-1</sup> de DHZ (—), HCT (---) y RSP (- · -), respectivamente.

En primer lugar, y con el fin de optimizar el número de *factores* y el intervalo de longitudes de onda, como se hizo en la mezcla binaria DHZ-HCT en el Capítulo III, se preparó una matriz de calibración con un diseño en 3 niveles para 3 analitos,  $n^k$ , donde n representa el número de niveles y k el número de analitos, Figura 4.2. Los límites superiores de concentración de la matriz han sido rebajados con respecto a la mezcla binaria para evitar valores de absorbancia no lineales.

Se preparó, además, un conjunto de muestras de validación con 8 disoluciones con concentraciones próximas a los valores altos, intermedios y bajos de la matriz de calibración, elegidos al azar, Figura 4.2.

Los espectros de las disoluciones se registraron entre 200 y 400 nm, estudiándose todos los modelos posibles con un mínimo de seis variables entre 200 y 358 nm, longitud de onda a partir de la cual los analitos dejan de absorber radiación. Los intervalos podían tener como límite inferior cualquier variable comprendida en el intervalo de longitudes de onda que va desde 200 hasta 348 nm, y como límite superior cualquier variable comprendida entre 210 y 358 nm; en total 2830 modelos diferentes.



**Figura 4.2:** Composición de las matrices de calibración (●) y validación (○).

El proceso de calibración se realizó aplicando tanto PLS-2 como PLS-1 para cada uno de los analitos, y el proceso de predicción se realizó con 2, 3 y 4 *factores* sobre las muestras de validación, en total se ensayaron 33960 modelos.

En todos los casos la calibración se efectuó centrando los datos respecto a la media y utilizando el *leverage correction* como método de validación. Como se hizo con la mezcla binaria, se construyó una *macro* en el UNSCRAMBLER capaz de realizar los procesos de calibración y predicción de cada uno de los modelos, y una vez obtenidos, los resultados de la predicción fueron exportados a hojas de cálculo que mediante otra *macro* calculaban los RSE y RMSE para cada modelo.

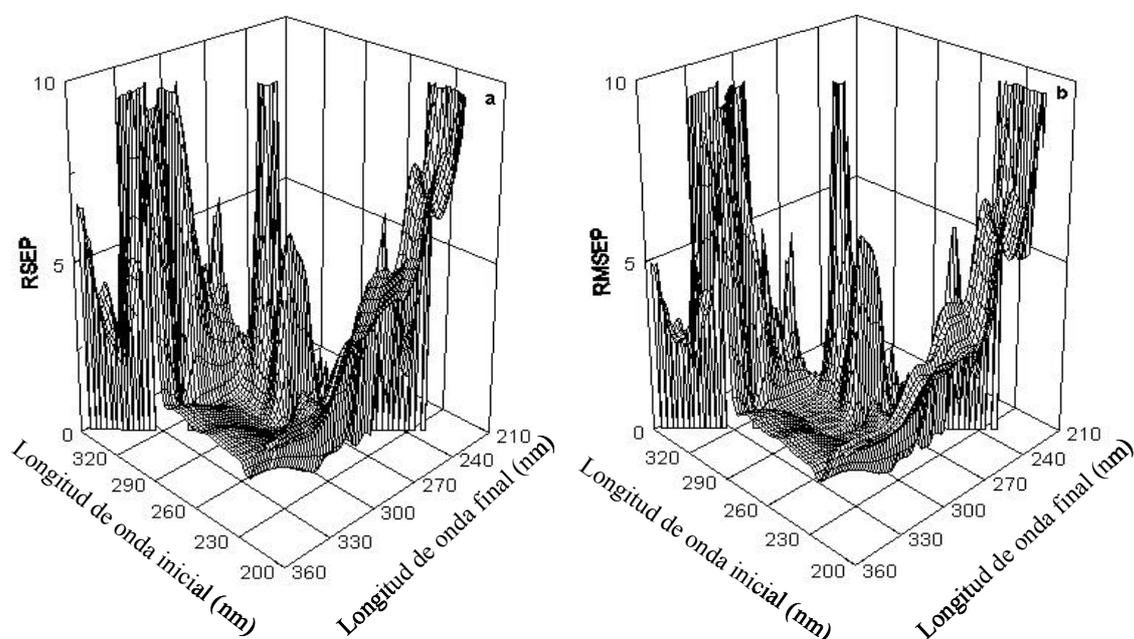
#### ***Determinación de dihidralazina por PLS-1***

La Figura 4.3 muestra la superficie de respuesta para los RSE y RMSE obtenidos en la determinación de DHZ con 3 *factores* (número con el que se obtenían mejores resultados en todos los intervalos).

En dicha Figura se puede observar que con ambos parámetros los resultados obtenidos muestran idéntico comportamiento:

- todos los intervalos que incluyen las longitudes de onda comprendidas entre 200 y 220 nm presentan errores elevados, que aumentan cuando las longitudes de onda finales son inferiores a 330 nm. El origen de estos errores elevados recae en la absorción del medio y en la necesidad de aumentar las concentraciones para que también aumente la relación entre los analitos, aún cuando las absorbancias correspondientes fueran mayores que 1,2.
- los intervalos que tienen longitudes de onda iniciales superiores a 270 presentan también errores altos debido a la similitud entre los espectros de DHZ e HCT a estas longitudes de onda.
- los intervalos con pocas variables en torno a 280 nm originan también errores elevados debido a la semejanza entre los espectros de la DHZ y la RSP.
- los intervalos con longitudes de onda iniciales entre 220 y 280, y finales entre 306 y 360 nm presentan errores inferiores al 1%.

De todos los intervalos estudiados para la determinación de DHZ por PLS-1 sólo uno presenta valores mínimos de RSE (0,72) y RMSE (0,61), 228-308 nm.



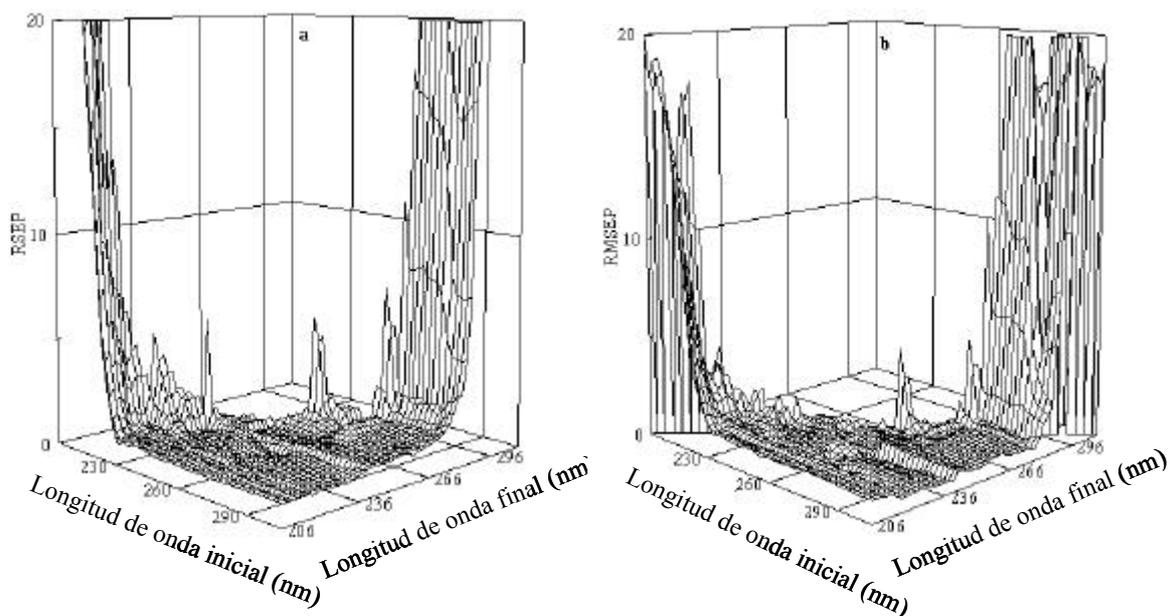
**Figura 4.3:** Superficies de respuesta de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de DHZ PLS-1: a) RSE y b) RMSE.



### ***Determinación de hidroclorotiazida por PLS-1***

Las superficies de respuestas obtenidas para los RSE y RMSE en la determinación de este analito por PLS-1, Figura 4.5, son en líneas generales similares a las obtenidas para la DHZ. La única diferencia es que los errores para los intervalos con longitudes de onda iniciales mayores que 270 nm son superiores, debido a la menor absorbancia que presenta este analito en esa región del espectro. Además, desaparecen los errores elevados que se encontraban en los intervalos pequeños en torno a 280 nm, ya que a esta longitud de onda el espectro de la HCT se diferencia de los otros dos analitos.

En el caso de la determinación de HCT por PLS-1 se encontró un único modelo con mínimo RSE, 0,48, y diecinueve con mínimo RMSE, 0,36. Debido al elevado número de modelos que poseían mínimo RMSE, se buscaron, entre estos, aquellos que además tenían menor RMSE, encontrándose tres.



**Figura 4.5:** Superficies de respuesta de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de HCT por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.

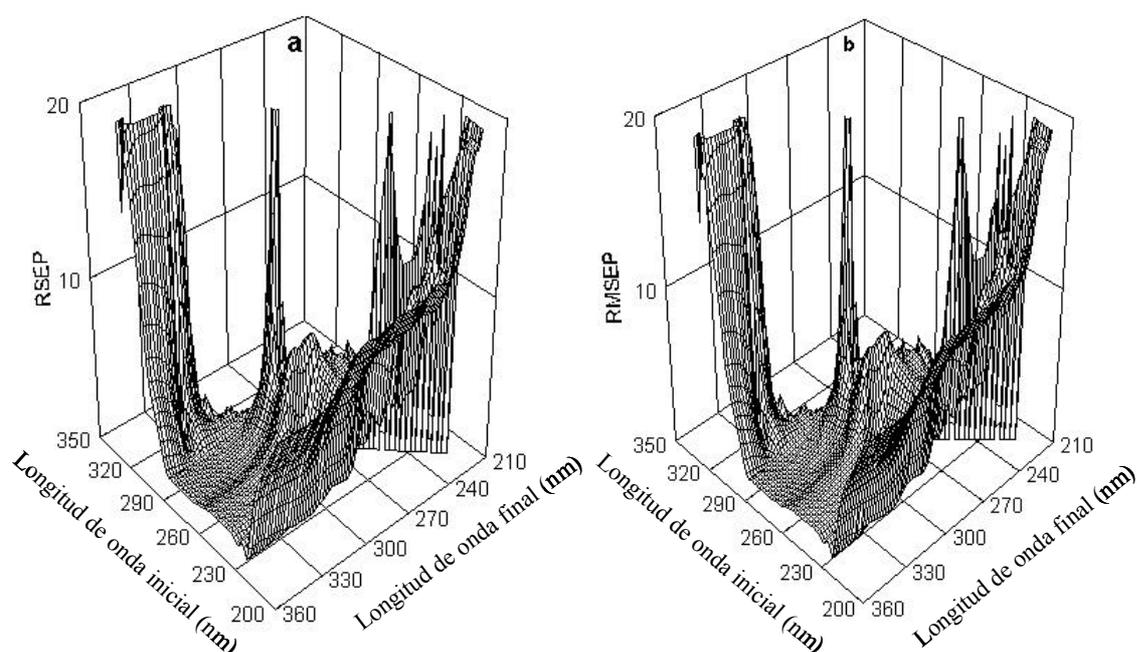
Estos tres intervalos de mínimo RSE son muy parecidos y presentan los mismos errores relativos, por ello se escogió como modelo óptimo: 240 - 310 nm. La Tabla 4.1 muestra estos intervalos y los valores obtenidos para estos parámetros.



El estudio de la representación del *score 2* vs *score 1* para este modelo, Figura 4.6, revela que el primer *factor* depende principalmente de la concentración de HCT y en menor medida de la de DHZ. Las muestras se sitúan horizontalmente según la concentración de HCT; y para igual concentración de HCT, las muestras con mayor concentración de DHZ se encuentran ligeramente desplazadas hacia la derecha. Además, el *score 2* disminuye a medida que aumenta la concentración de DHZ y RSP y disminuye la de HCT. En el estudio del *score 3* vs *score 1* se observa idéntico comportamiento para el *score 1* y un aumento en el *score 3* a medida que la concentración de RSP disminuye y la de DHZ aumenta.

### ***Determinación de reserpina por PLS-1***

Las superficies de respuesta encontradas para la determinación de RSP por PLS-1 son similares a las anteriores, como se muestra en la Figura 4.7.



**Figura 4.7:** Superficies de respuesta de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de RSP por PLS-1: a) RSE y b) RMSE.

La Tabla 4.2 muestra los modelos de menor RSE y RMSE obtenidos. En ella se observan cinco modelos de mínimo RSE, 1,01, y un único modelo de RMSE mínimo, 0,95.

**Tabla 4.2**

Valores de RSE y RMSE para los intervalos de longitudes de onda óptimos por PLS-1 para RSP

$\Delta\lambda$ (nm)	RSEC	RMSEC	RSEV	RMSEV
224-352	2,24	2,42	<b>1,01</b>	1,11
224-354	2,24	2,40	<b>1,01</b>	1,11
224-356	2,23	2,40	<b>1,01</b>	1,11
224-358	<b>2,23</b>	2,40	<b>1,01</b>	1,11
304-336	1,89	1,78	1,26	<b>0,95</b>

Debido al elevado número de modelos que poseían mínimo RSE, para la elección del óptimo se recurrió a los parámetros de calibración. Los RSEC y RMSEC, y RSEV y RMSEV se definen de forma análoga, siendo la concentración encontrada la estimación del ajuste para las mezclas usadas en el proceso de calibración o de predicción, respectivamente.

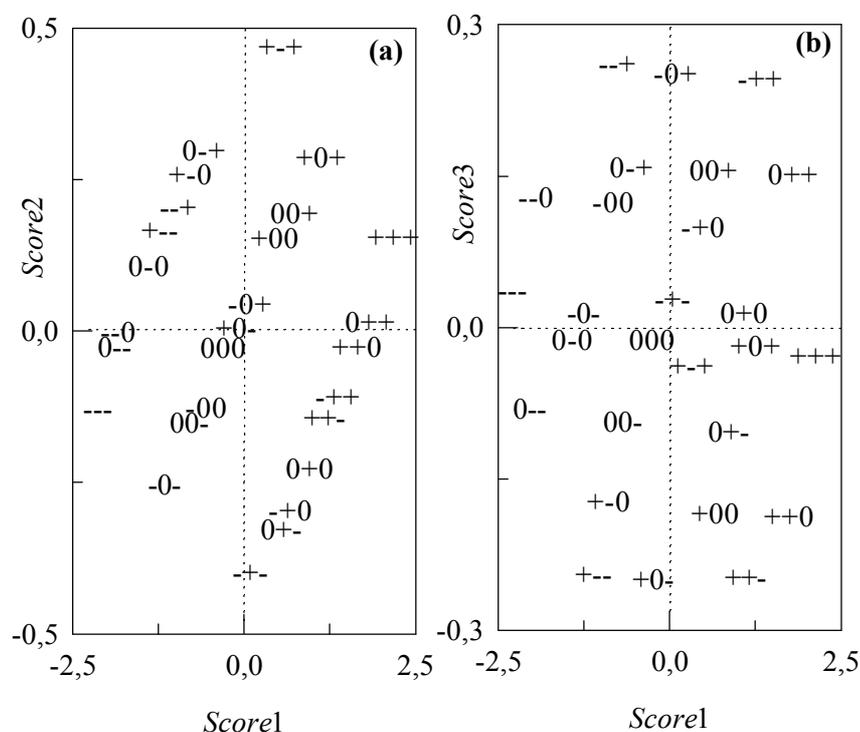
De todos los intervalos estudiados el que presenta mínimo RMSEV es 304-336 nm; aunque en un primer momento el resultado parece extraño, pues a estas longitudes de onda la absorbancia del analito es pequeña, este intervalo tiene la ventaja de ser la única zona donde el perfil del espectro de la RSP es completamente diferente al de los otros analitos. Sin embargo, la aplicación del test de Mandel pone de manifiesto la existencia de error sistemático en dicho intervalo.

El modelo seleccionado para la determinación de RSP por PLS-1 (224-358 nm), explica el 95, 98 y 100 % de la matriz de absorbancias y el 18,0, 54,3 y 99,7 % de la de concentración de RSP con 1, 2 y 3 *factores* respectivamente.

El estudio de la representación del *score 2* vs *score 1* para este modelo, Figura 4.8, revela que el primer *factor* depende principalmente de la concentración de HCT, mayor concentración de HCT implica mayor *score 1* de forma que las mezclas se sitúan horizontalmente atendiendo a dicha concentración, si bien, a igual concentración de HCT se produce un ligero desplazamiento que atiende al aumento de las concentraciones de DHZ y RSP.

Asimismo, el *score 2* se encuentra muy poco influenciado por la concentración de HCT, siendo el *factor* determinante de la posición de las mezclas en este eje la concentración total de DHZ y RSP, produciéndose un aumento en dicho *score* a medida que aumenta esta concentración. Analizando la representación del *score 3* vs *score 1* se observa idéntico

comportamiento al mencionado para el *score* 1 y un aumento en el *score* 3 a medida que disminuye la concentración de DHZ y que aumenta la de RSP. De lo que se deduce que tanto el *score* 1, como el 2 o el 3 dependen de los tres analitos.



**Figura 4.8:** Determinación de RSP en mezclas ternarias por PLS-1: a) *score* 2 vs *score* 1, b) *score* 3 vs *score* 1. Matriz de calibrado en la Figura 4.4.

La Tabla 4.3 muestra los resultados de la determinación de DHZ, HCT y RSP en las mezclas de la matriz de validación, utilizando los modelos seleccionados para la calibración efectuada por PLS-1. En ella se puede observar que:

- Para la determinación de DHZ los errores obtenidos son en todos los casos inferiores al 3 % y la desviación estándar relativa inferior al 3,5 %.
- Para la determinación de HCT en los dos intervalos estudiados, los errores relativos y los coeficientes de variación son los más bajos obtenidos, inferiores al 1,1 % y 0,8 %, respectivamente.
- Para la determinación de RSP los errores relativos son inferiores al 2,7 %, los coeficientes de variación obtenidos son similares a los obtenidos en la determinación de DHZ y superiores a los obtenidos en la determinación de HCT.

- En ninguno de los casos la aplicación del Test de Mandel evidencia la presencia de errores sistemáticos.

**Tabla 4.3**

Errores obtenidos en la predicción de los analitos por PLS-1 en los intervalos de longitudes de onda correspondientes a los valores mínimos de RSE y RMSE

Cantidades añadidas (mg.l <sup>-1</sup> )			DHZ	HCT	RSP	Error relativo (%)		
DHZ	HCT	RSP	<RSE, RMSE (228-308 nm)	<RSE (232-298 nm)	<RMSE (240-310 nm)	<RSE (224-358 nm)	<RMSE (304-336 nm)	
3,33	3,33	9,75	0,00	-0,30	0,00	-0,82	-1,33	
7,49	3,33	3,39	-0,40	-0,60	0,00	1,77	0,59	
5,41	7,49	9,75	-0,55	0,53	0,67	-0,31	-1,13	
5,41	7,49	3,39	0,18	0,93	1,07	2,65	0,29	
5,41	11,65	7,63	-0,37	-0,26	-0,34	0,39	-0,52	
5,41	3,33	7,63	0,00	0,00	0,00	0,26	-0,13	
7,49	7,49	7,63	0,40	0,13	0,53	-0,92	-1,44	
3,33	7,49	7,63	3,00	-0,40	-0,27	-1,83	-2,10	
	CV		1,96	0,76	0,57	1,85	0,56	
	RSE		0,72	0,48	0,56	1,01	1,24	
	RMSE		0,61	0,40	0,36	1,12	0,94	

#### ***Determinación de dihidralazina, hidroclorotiazida y reserpina por PLS-2***

La Tabla 4.4 muestra los distintos parámetros obtenidos tanto en la calibración como en la predicción mediante aplicación del algoritmo PLS-2, apareciendo un único modelo con mínimo  $RSE_{total}$  y cuatro de mínimo  $RMSE_{total}$  cuando se realiza la predicción en las muestras de la matriz de validación. También se puede observar que uno de los modelos de mínimo RMSE tiene valores mínimos de los correspondientes parámetros de la calibración, escogiéndose este modelo como óptimo. La Tabla 4.5 recoge los resultados obtenidos al aplicar PLS-2 a la mezcla ternaria en el intervalo seleccionado.

**Tabla 4.4**

Valores de RSE y RMSE para los intervalos de longitudes de onda óptimos utilizando PLS-2

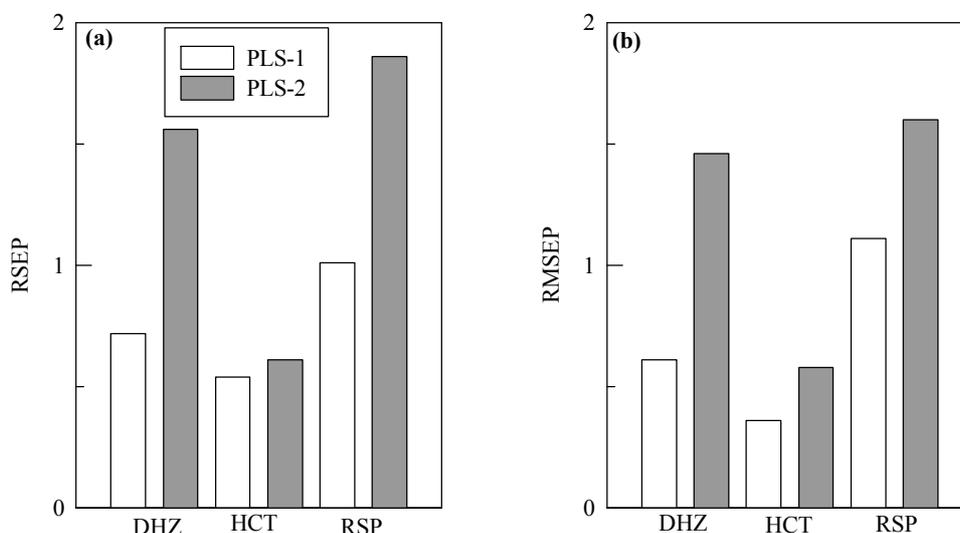
$\Delta\lambda$ (nm)	RSEC <sub>total</sub>	RMSEV <sub>total</sub>	RSEV <sub>total</sub>	RMSEV <sub>total</sub>
222-318	2,17	1,97	<b>1,28</b>	1,31
272-322	<b>1,58</b>	<b>1,55</b>	1,39	<b>1,17</b>
272-324	1,60	1,57	1,39	<b>1,17</b>
268-324	1,61	1,58	1,38	<b>1,17</b>
268-326	1,61	1,60	1,38	<b>1,17</b>

**Tabla 4.5**

Resultados obtenidos en la predicción aplicando PLS-2 entre 272-322 nm

Añadido (mg.l <sup>-1</sup> )			Encontrado $\pm$ DS (mg.l <sup>-1</sup> )			Error relativo (%)			
DHZ	HCT	RSP	DHZ	HCT	RSP	DHZ	HCT	RSP	
3,33	3,33	9,75	3,25 $\pm$ 0,05	3,32 $\pm$ 0,02	9,59 $\pm$ 0,08	-2,40	-0,30	-1,64	
7,49	3,33	3,39	7,54 $\pm$ 0,04	3,32 $\pm$ 0,02	3,44 $\pm$ 0,06	0,67	-0,30	1,47	
5,41	7,49	9,75	5,23 $\pm$ 0,08	7,52 $\pm$ 0,03	9,56 $\pm$ 0,13	-3,33	0,40	-1,95	
5,41	7,49	3,39	5,33 $\pm$ 0,05	7,57 $\pm$ 0,02	3,39 $\pm$ 0,08	-1,48	1,07	0,00	
5,41	11,65	7,63	5,31 $\pm$ 0,09	11,59 $\pm$ 0,04	7,53 $\pm$ 0,15	-1,85	-0,52	-1,31	
5,41	3,33	7,63	5,45 $\pm$ 0,28	3,28 $\pm$ 0,12	7,46 $\pm$ 0,45	0,74	-1,50	-2,23	
7,49	7,49	7,63	7,49 $\pm$ 0,07	7,51 $\pm$ 0,03	7,48 $\pm$ 0,11	0,00	0,27	-1,97	
3,33	7,49	7,63	3,37 $\pm$ 0,06	7,47 $\pm$ 0,03	7,46 $\pm$ 0,10	0,20	-0,27	-2,23	
CV			1,75	0,83	2,11				
						RSE <sub>individual</sub>	1,56	0,61	1,86
						RMSE <sub>individual</sub>	1,46	0,58	1,60

En la Tabla anterior se puede observar que, si bien los resultados son buenos, en ningún caso PLS-2 iguala o mejora los resultados obtenidos anteriormente por PLS-1, Figura 4.9. Por lo tanto a la hora de determinar simultáneamente los tres analitos por PLS se recurrirá a PLS-1.

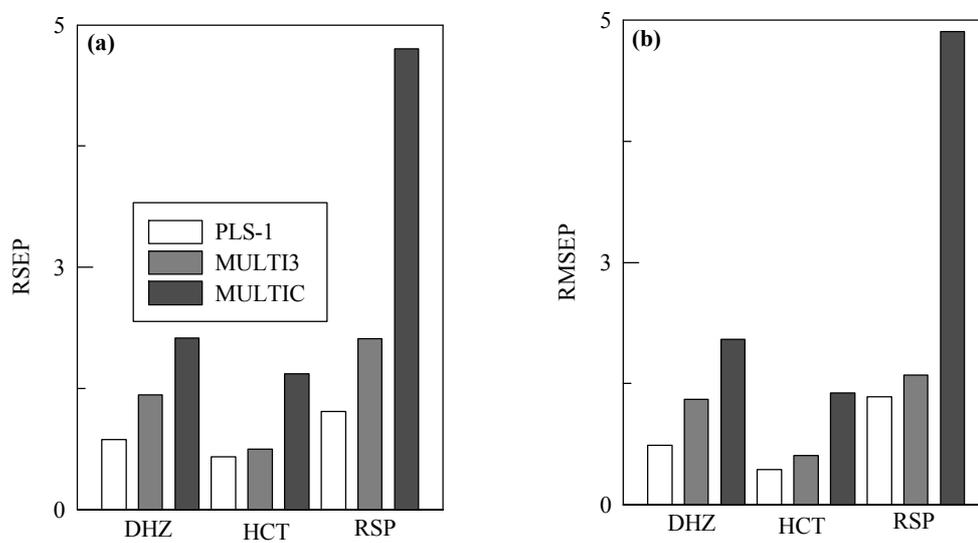


**Figura 4.9:** Valores de a) RSE y b) RMSEP obtenidos por aplicación de PLS

#### IV. 1. 2. Regresión lineal múltiple

Del mismo modo que se hiciera en el estudio de las mezclas sintéticas binarias, en este apartado se realizó el estudio de las mezclas sintéticas de DHZ, HCT y RSP por regresión lineal múltiple utilizando los programas MULTIC y MULTI3. Estos programas se aplicaron en los intervalos de longitudes de onda considerados óptimos al aplicar PLS-1. En todos los casos se encontraron errores relativos y desviaciones estándar relativas inferiores al 5 %, siendo la HCT la que presenta mejores resultados.

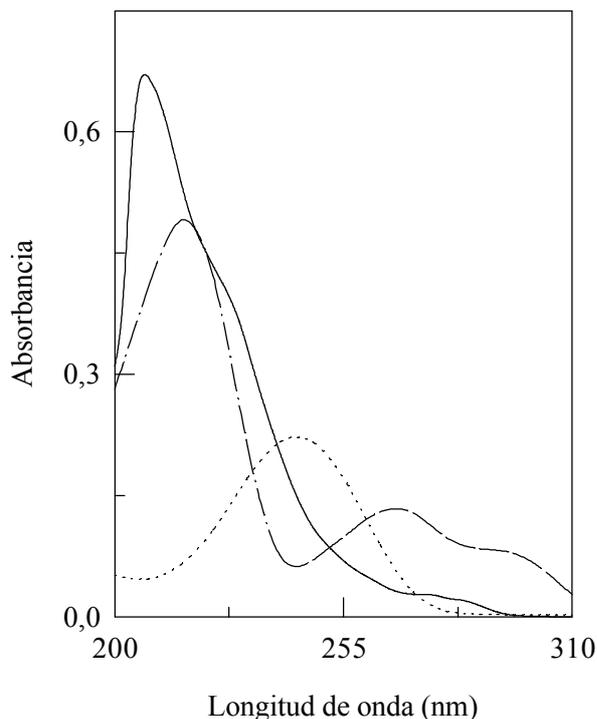
Si comparamos los RSE y RMSEP obtenidos por PLS-1 con los que se obtienen por regresión lineal múltiple, Figura 4.10, se deduce que PLS-1 posee mejor capacidad predictora; para todos los analitos estudiados, tanto los RSE como los RMSEP encontrados por PLS-1 son menores que los calculados por MULTIC. Estas diferencias son especialmente acusadas en el caso de la RSP. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se descarta la utilización de la regresión lineal múltiple para la determinación simultánea de los tres analitos en mezclas.



**Figura 4.10:** Valores de a) RSE y b) RMSE obtenidos para las distintas calibraciones efectuadas.

## IV.2. Clortalidona-Espironolactona-Reserpina

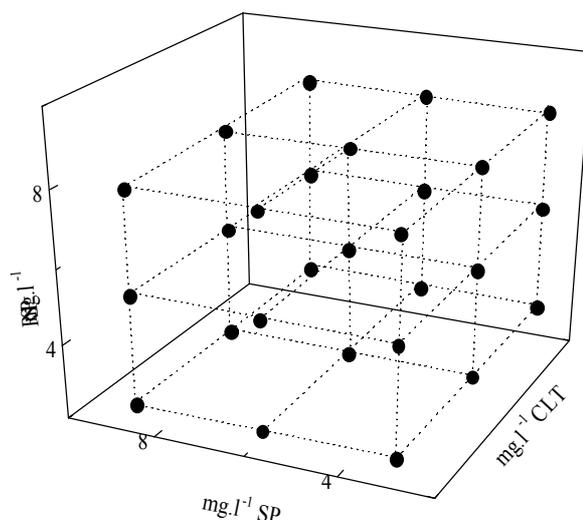
La Figura 4.11 pone de manifiesto que los espectros de absorción de los analitos presentan un amplio solapamiento espectral, y que existe una gran semejanza entre los espectros de absorción de CLT y RSP.



**Figura 4.11:** Espectros de absorción, 20% etanol/agua (v/v) de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de CLT (—) y RSP (— · —) y  $7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de SP (...), en  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  0,2 M y pH 10.

En el presente apartado se realiza la optimización del número de *factores* y del intervalo de longitudes de onda para la determinación simultánea de CLT, SP y RSP, siguiendo el criterio de mínimo RSE y/o RMSE; procediéndose a continuación a la determinación simultánea de los citados analitos en mezclas.

Para optimizar el intervalo de longitudes de onda y el número de *factores* se preparó una matriz de calibración con un diseño  $n^3$ , en este caso el número de niveles,  $n$ , fue de 3. Se prepararon, además, 14 muestras de validación y 18 de predicción con concentraciones próximas a los valores altos, intermedios y bajos de la matriz de calibración. La composición de la matriz de calibración se puede observar en la Figura 4.12.



**Figura 4.12:** Composición de la matriz de calibración.

La optimización se realizó en los espectros de absorción entre 200 y 310 nm, ya que a longitudes de onda superiores los analitos no absorben. Se estudiaron todos los modelos posibles con un mínimo de tres variables comprendidas en dicho intervalo, siendo el límite inferior cualquier variable entre 200 y 304 nm, y el superior cualquier longitud de onda comprendida entre 206 y 310 nm; en total 1430 modelos diferentes.

El proceso de calibración se realizó aplicando PLS-2 y PLS-1 para cada uno de los analitos, y la predicción utilizando 3 y 4 *factores*, ensayándose en total 11440 modelos.

En todos los casos la calibración se efectuó centrando los datos respecto a la media y utilizando el *leverage correction* como método de validación interna. La Tabla 4.6 muestra los intervalos en los que se obtuvieron los valores mínimos de RSE y/o RMSE.

En la mencionada Tabla se puede observar que los errores más bajos se obtienen para la determinación de los analitos por PLS-1 en los intervalos: 220-252 nm con 4 *factores* para CLT, 252-264 nm con 3 *factores* para SP y 212-270 nm con 4 *factores* para RSP. También se puede observar que para la calibración efectuada por PLS-2 no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando 3 y 4 *factores* en la etapa de predicción.

Teniendo en cuenta estos resultados, obtenidos para la determinación simultánea de CLT, SP y RSP, por PLS-1 y PLS-2, se considera óptima la calibración efectuada por PLS-2 y la predicción con 3 *factores* entre 246 y 310 nm.

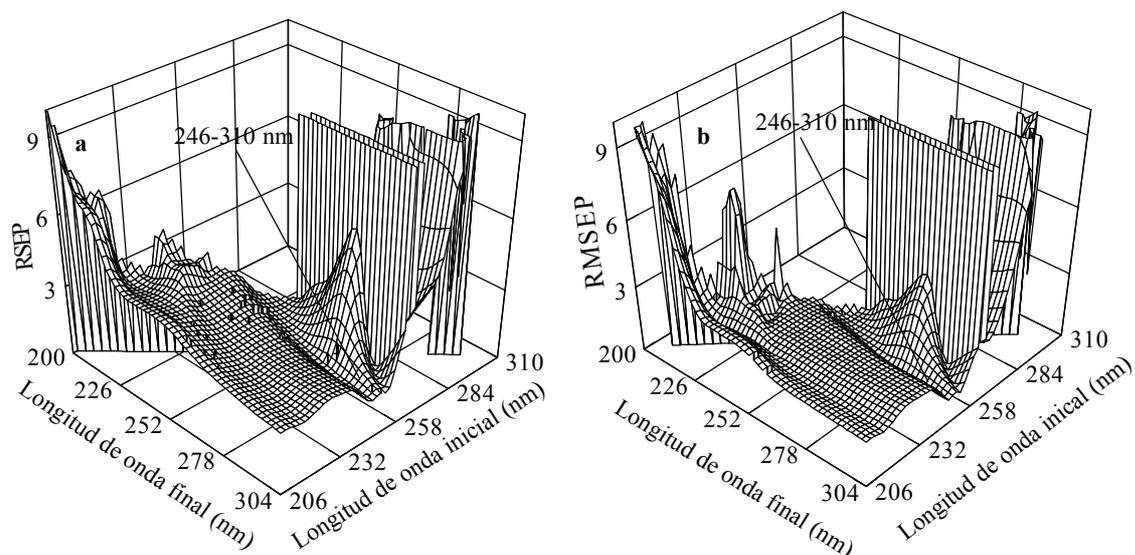
Tabla 4.6

Valores mínimos de RSE, RMSE y CV de las distintas predicciones efectuadas para PLS-1 y PLS-2

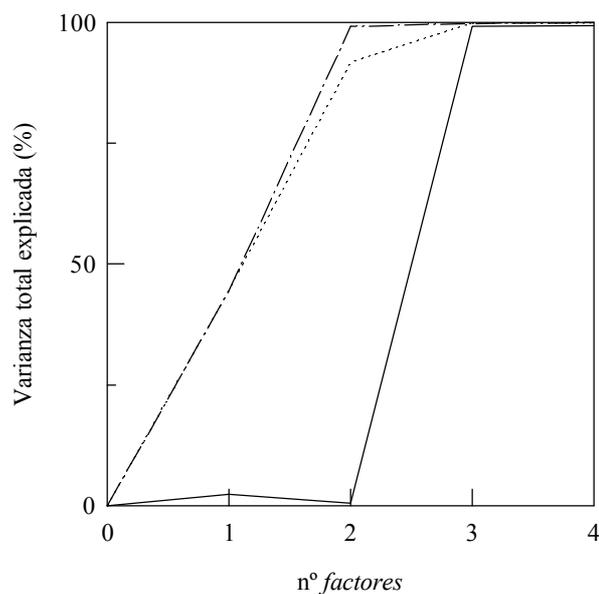
	PLS-2	PLS-1		
		CLT	SP	RSP
<i>3 factores</i>				
$\Delta\lambda$ (nm)	246-310	212-224	252-264	270-310
RSE	1,53	1,40	1,05	2,17
RMSE	1,09	1,01	0,70	1,57
CV	2,44	1,26	1,80	2,44
<i>4 factores</i>				
$\Delta\lambda$ (nm)	250-266	220-252	230-276	212-270
RSE	1,52	0,78	0,87	2,34
RMSE	1,01	0,58	0,74	1,47
CV	1,21	0,70	1,07	1,42

La Figura 4.13 muestra los RSE y RMSE obtenidos para la predicción efectuada con *3 factores*. En ella se puede observar que los valores más altos se obtienen en los intervalos de longitud de onda donde los analitos no absorben radiación (por debajo de 220 nm y por encima de 280 nm).

La Figura 4.14 muestra que este modelo, con *1 factor*, explica el 2,4, 44,5 y 44,7 % de la varianza residual para CLT, SP y RSP, respectivamente; con *2 factores* la varianza explicada para CLT disminuye ligeramente hasta un 0,5 %, mientras que tanto la varianza de la SP como de la RSP quedan prácticamente explicadas, tomando valores de 91,7 y 99,1 %, respectivamente; cuando el número de *factores* utilizados es 3 la varianza pasa a explicarse en un 99,1 % para CLT, 99,8 % para SP y 99,7 % para RSP.



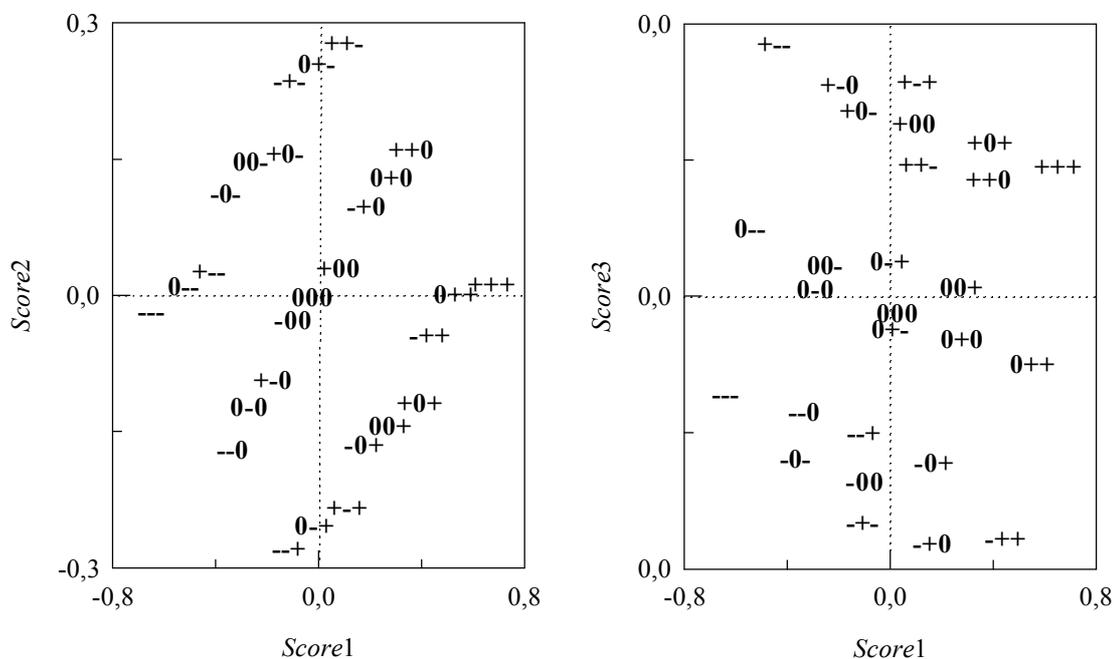
**Figura 4.13:** Superficies de respuesta de la optimización del intervalo de longitud de onda en la determinación de CLT, SP y RSP por PLS-2: a) RSE y b) RMSE.



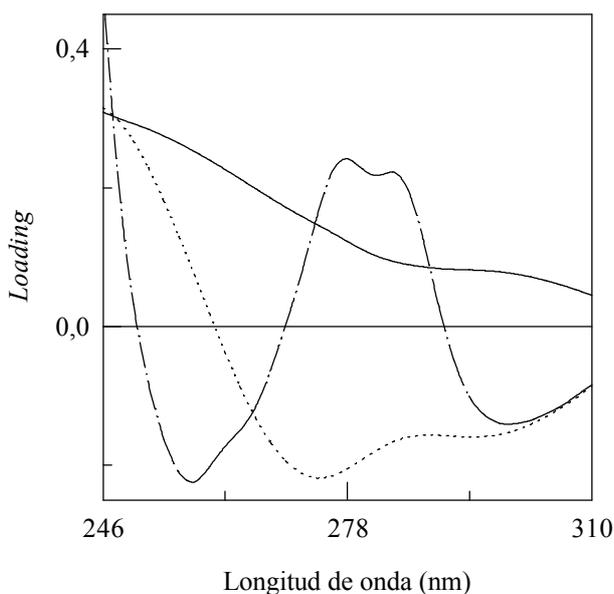
**Figura 4.14:** Varianza residual explicada en función del número de *factores* para la determinación de CLT (—), SP (···) y RSP (—·—).

Del estudio anterior se puede deducir que tanto el *score 1* como el *score 2* dependen principalmente de la cantidad de SP y RSP, apareciendo la CLT únicamente en el *score 3*. El estudio de los *scores* para dicho modelo, Figura 4.15, muestra que el *score 1* depende principalmente de la concentración de RSP en la muestra, aumentando a medida que lo hace dicha concentración. Respecto al *score 2*, se observa que aumenta a medida que lo hace la

concentración de SP. Con respecto al *score* 3, se observa que las muestras se ordenan principalmente atendiendo a la concentración de CLT, mayor concentración de CLT implica mayor *score* 3.



**Figura 4.15:** Representación de *scores* en la determinación de CLT, SP y RSP por PLS-2. Matriz de calibrado: CLT-SP-RSP. (-): 6,00 mg.l<sup>-1</sup> CLT; 2,78 mg.l<sup>-1</sup> SP; 2,76 mg.l<sup>-1</sup> RSP. (0): 8,00 mg.l<sup>-1</sup> CLT; 5,56 mg.l<sup>-1</sup> SP; 5,63 mg.l<sup>-1</sup> RSP. (+): 10,00 mg.l<sup>-1</sup> CLT; 8,34 mg.l<sup>-1</sup> SP; 8,28 mg.l<sup>-1</sup> RSP.



**Figura 4.16:** Representación de *loading* en la determinación de CLT, SP y RSP por PLS-2. (—) *loading* 1, (···) *loading* 2 y (-·-·-) *loading* 3.

En el estudio de los *loadings*, Figura 4.16, se puede concluir que el primer *loading* está relacionado con SP y RSP, siendo la suma de los dos espectros en el intervalo de longitud de onda estudiado; el *loading 2* se corresponde con el inverso del espectro derivado del anterior en ese intervalo de longitudes de onda, y el *loading 3* con la inversa del espectro derivado de la mezcla de los tres analitos.

La Tabla 4.7 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los analitos en el intervalo de longitudes de onda óptimo. Para los conjuntos de mezclas de validación y predicción se puede observar que en la serie de validación los errores relativos no superan el 5,1, 3,4 y 3,8 %, para CLT, SP y RSP, respectivamente, mientras que en la serie de predicción son inferiores al 4,9, 3,2 y 2,8 %.

La precisión del método fue evaluada con un análisis de varianza, para lo cual se prepararon 3 series de 6 muestras cada una que se analizaron utilizando el modelo seleccionado; en todos los casos, los valores de F encontrados: 2,23, 2,94 y 2,30 para CLT, SP y RSP, respectivamente, eran inferiores a la  $F_{2,15}$  crítica para un nivel de significación del 95 %, 3,68, no existiendo, por tanto, evidencias de error sistemático.

#### ***Determinación de clortalidona y espirolactona en presencia de reserpina***

En el apartado anterior se ha estudiado la mezcla ternaria formada por CLT, SP y RSP, llegando a la conclusión de que se obtenían buenos resultados cuando la calibración se efectuaba por PLS-2, entre 246 y 310 nm, y la predicción con 3 *factores*, con cantidades relativas de los analitos no superiores a 1:3. Sin embargo, en el mercado existe un preparado farmacéutico, “Resnedal”, en el que la cantidad de RSP presente se encuentra en la relación 0,1/50 y 0,1/25 respecto a las cantidades de CLT y SP declaradas. De ahí que en el presente apartado se estudie la influencia que tiene la presencia de RSP en la determinación simultánea de CLT y SP en mezclas.

Para realizar este nuevo estudio se procedió de la misma manera, aplicando PLS a la optimización del intervalo de longitudes de onda y número de *factores* en la determinación simultánea de CLT y SP en presencia de RSP. Para ello se construyeron matrices de calibración, validación y predicción con un diseño en 4 niveles para 2 analitos,  $n^2$ , para CLT y SP, con cantidades de RSP variando entre 0 y 0,062 mg.l<sup>-1</sup>. Los niveles de CLT fueron 6,06; 8,08; 10,10 y 12,12 mg.l<sup>-1</sup> y los de SP 3,04; 3,80; 4,56 y 5,32 mg.l<sup>-1</sup>.

**Tabla 4.7**

Resultados obtenidos en la determinación de CLT, SP y RSP por PLS-2 con 3 factores entre 246 y 310 nm en los conjuntos de predicción y validación

mg.l <sup>-1</sup> añadidos			mg.l <sup>-1</sup> encontrados ± std			Error relativo (%)		
CLT	SP	RSP	CLT	SP	RSP	CLT	SP	RSP
<b>Validación</b>								
6,42	2,54	2,54	6,38 ± 0,07	2,52 ± 0,05	2,49 ± 0,06	-0,62	-0,79	-1,97
6,42	2,54	5,08	6,46 ± 0,06	2,50 ± 0,04	5,02 ± 0,05	0,62	-1,57	-1,18
6,42	2,54	7,62	6,75 ± 0,06	2,60 ± 0,04	7,91 ± 0,05	5,14	2,36	3,81
6,42	5,08	2,54	6,41 ± 0,15	5,06 ± 0,10	2,60 ± 0,13	-0,16	-0,39	2,36
6,42	5,08	5,08	6,38 ± 0,04	5,11 ± 0,02	4,98 ± 0,03	-0,62	0,59	-1,97
6,42	5,08	7,62	6,35 ± 0,06	5,18 ± 0,04	7,50 ± 0,05	-1,09	1,97	-1,57
6,42	7,62	2,54	6,36 ± 0,08	7,67 ± 0,05	2,45 ± 0,07	-0,93	0,66	-3,54
6,42	7,62	5,08	6,36 ± 0,06	7,75 ± 0,04	5,01 ± 0,05	-0,93	1,71	-1,38
6,42	7,62	7,62	6,32 ± 0,08	7,88 ± 0,05	7,59 ± 0,07	-1,56	3,41	-0,39
8,56	2,54	2,54	8,48 ± 0,06	2,56 ± 0,04	2,57 ± 0,05	-0,93	0,79	1,18
8,56	2,54	5,08	8,40 ± 0,04	2,51 ± 0,03	5,06 ± 0,03	-1,87	-1,18	-0,39
8,56	2,54	7,62	8,57 ± 1,20	2,56 ± 0,77	7,41 ± 1,00	0,12	0,79	-2,76
8,56	5,08	2,54	8,58 ± 0,09	5,08 ± 0,06	2,53 ± 0,08	0,23	0,00	-0,39
8,56	5,08	5,08	8,43 ± 0,05	5,15 ± 0,03	5,06 ± 0,04	-1,52	1,38	-0,39
8,56	5,08	7,62	8,44 ± 0,04	5,23 ± 0,03	7,66 ± 0,03	-1,40	2,95	0,52
8,56	7,62	2,54	8,42 ± 0,06	7,69 ± 0,04	2,45 ± 0,05	-1,64	0,92	-3,54
8,56	7,62	5,08	8,59 ± 0,08	7,77 ± 0,05	4,96 ± 0,07	0,35	1,97	-2,36
8,56	7,62	7,62	8,37 ± 0,06	7,81 ± 0,04	7,68 ± 0,05	-2,22	2,49	0,79
RSEV						1,58	1,90	1,95
RMSEV						1,22	1,44	1,70
CV						1,66	2,60	2,17
<b>Predicción</b>								
6,40	3,34	3,31	6,48 ± 0,22	3,31 ± 0,14	3,36 ± 0,18	1,25	-0,90	1,51
6,40	8,90	8,83	6,38 ± 0,04	8,77 ± 0,03	8,99 ± 0,04	-0,31	-1,46	1,81
7,60	5,00	4,97	7,23 ± 0,09	5,16 ± 0,06	5,11 ± 0,07	-4,87	3,20	2,82
7,60	5,00	6,62	7,68 ± 0,11	5,02 ± 0,07	6,77 ± 0,09	1,05	0,40	2,27
7,60	6,67	4,97	7,67 ± 0,03	6,67 ± 0,02	4,95 ± 0,03	0,92	0,00	-0,40
7,60	6,67	6,62	7,72 ± 0,06	6,69 ± 0,04	6,57 ± 0,05	1,58	0,30	-0,76
8,80	5,00	4,97	8,75 ± 0,70	4,99 ± 0,45	4,97 ± 0,58	-0,57	-0,20	0,00
8,80	5,00	6,62	8,94 ± 0,06	4,99 ± 0,04	6,61 ± 0,05	1,59	-0,20	-0,15
8,80	6,67	4,97	8,85 ± 0,05	6,68 ± 0,03	4,90 ± 0,04	0,57	0,15	-1,41
8,80	6,67	6,62	8,88 ± 0,06	6,74 ± 0,04	6,59 ± 0,05	0,91	1,05	-0,45
9,60	3,34	3,31	9,61 ± 0,07	3,31 ± 0,05	3,28 ± 0,06	0,10	-0,90	-0,91
9,60	3,34	8,83	9,60 ± 0,10	3,33 ± 0,06	9,00 ± 0,08	0,00	-0,30	1,93
9,60	8,90	3,31	9,75 ± 0,08	8,92 ± 0,05	3,31 ± 0,07	1,56	0,22	0,00
9,60	8,90	8,83	9,95 ± 0,08	8,72 ± 0,05	8,72 ± 0,07	3,65	-2,02	-1,25
RSEP						1,87	1,23	1,50
RMSEP						1,35	0,81	1,12
CV						1,51	1,66	2,12

La calibración se realizó aplicando PLS-2 y PLS-1 para cada analito, y la predicción con 2, 3 y 4 *factores* para PLS-2 y 1, 2 y 3 *factores* para PLS-1; por tanto, el número total de modelos ensayados fue de 10584.

La Tabla 4.8 muestra los valores de RSE y RMSE obtenidos en la predicción de las concentraciones de CLT y SP en las muestras de validación, realizando las calibraciones por PLS-1 y PLS-2 y utilizando distinto número de *factores* para llevar a cabo la predicción.

**Tabla 4.8**  
RSE y RMSE para las calibraciones por PLS-1 y PLS-2

nº <i>factores</i>	PLS-2			PLS-1					
				CLT			SP		
	2	3	4	1	2	3	1	2	3
RSE	0,77	0,73	0,55	0,95	0,27	0,27	11,78	1,45	1,28
RMSE	0,89	0,77	0,63	0,87	0,22	0,24	9,85	1,08	1,05

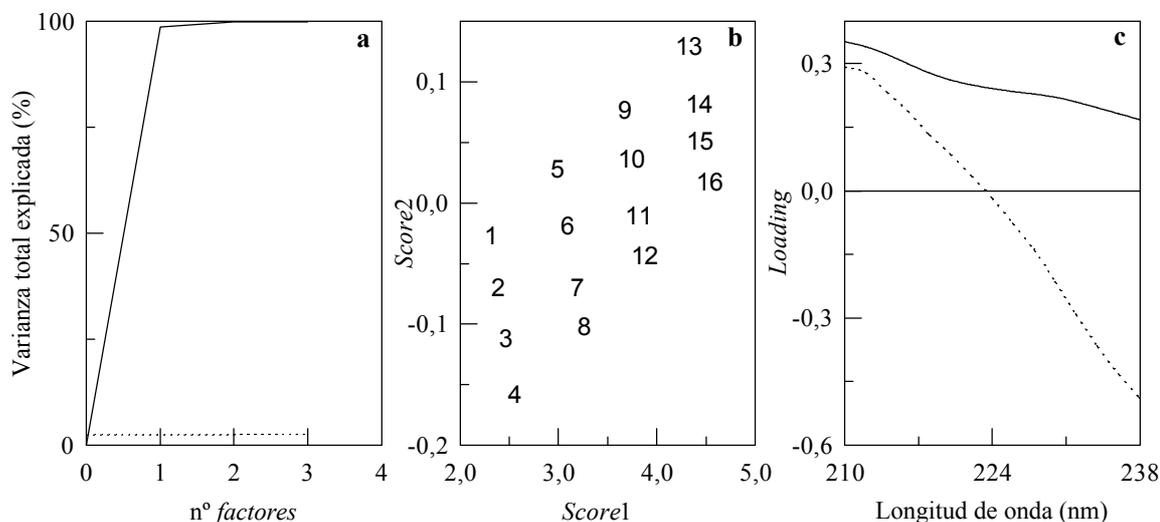
En la Tabla anterior se puede observar que al realizar la validación de CLT y SP para la calibración efectuada por PLS-1, se obtienen resultados similares cuando la predicción se efectúa con 2 y 3 *factores*, produciéndose un aumento en dichos valores cuando la predicción se realiza con 1 *factor*.

Cuando la calibración se lleva a cabo por PLS-1 y la predicción con 2 *factores*, para CLT se obtiene un sólo intervalo de longitudes de onda con mínimos RSE y RMSE simultáneamente, 210-238 nm, el error relativo para las mezclas de validación no supera el 0,77 %.

La Figura 4.17.(a) muestra la varianza explicada en función del número de *factores* para este modelo. Se puede observar que con 1 *factor* se explica el 98,6 % de la varianza, y con 2 el 100 %.

Del estudio de *scores*, Figura 4.17.(b) se puede concluir que el *score* 1 está relacionado con la suma de concentraciones de CLT y SP, mientras que la alineación prácticamente perpendicular del *score* 2 muestra una clara relación entre este *score* y la concentración de CLT. Este mismo comportamiento queda reflejado en la gráfica de los *loading*, donde se observa que mientras que el *loading* 1 se corresponde con la suma de los

espectros de CLT y SP en el intervalo de longitud de onda señalado por el modelo, el *loading* 2 es el espectro de CLT en dicho intervalo, Figura 4.17.(c).



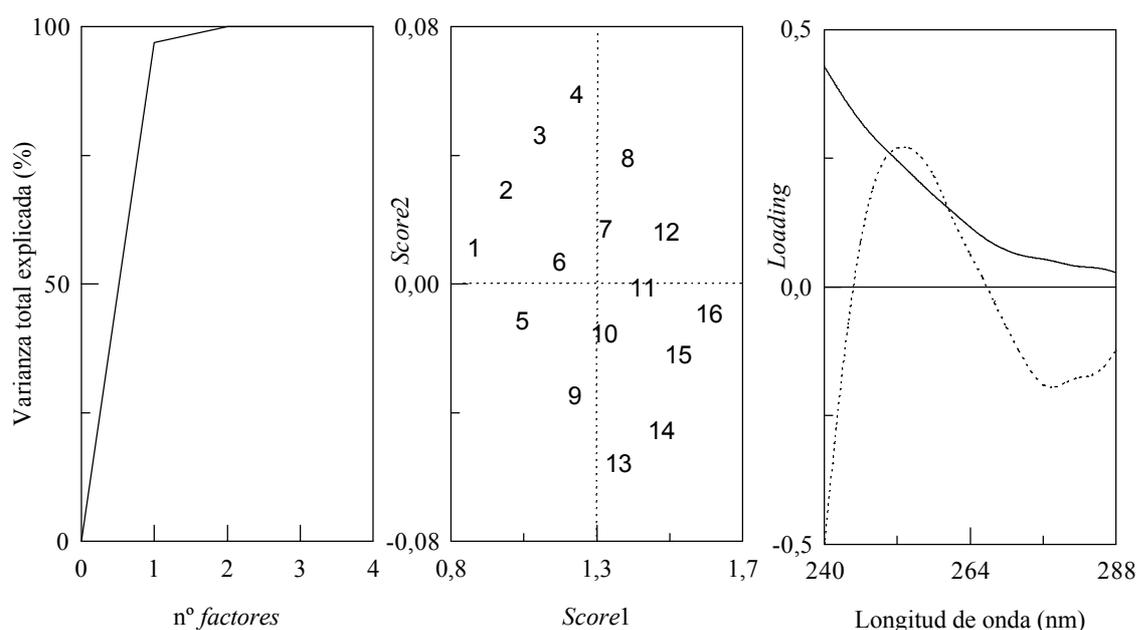
**Figura 4.17:** Modelo óptimo en la determinación de CLT por PLS-1: a) Varianza explicada; b) *score* 2 vs *score*,  $\text{mg.l}^{-1}$  de CLT: (1-4) 6,06; (5-8) 8,08; (9-12) 10,10; (13-16) 12,12;  $\text{mg.l}^{-1}$  de SP (1, 5, 9 y 13) 3,04; (2, 6, 10 y 14) 3,80; (3, 7, 11 y 15) 4,56; (4, 8, 12 y 16) 5,32. c) (—) *loading* 1, (...) *loading* 2.

Para la determinación de SP se obtiene un modelo de mínimo RSE, 240-288 nm y uno de mínimo RMSE, 268-276 nm, modelos para los cuales el error relativo en las mezclas de validación no supera el 3,42 y el 3,51 %, respectivamente. Para la determinación de SP se elige como óptimo el modelo de mínimo RSE, por ser el que proporciona mejores resultados.

Este modelo explica con 1 *factor* el 29,7 % de la varianza residual, siendo necesarios 2 *factores* para explicar el 99,5 %, Figura 4.18.(a).

De la posición de las muestras atendiendo a los valores de los *scores* 1 y 2, Figura 4.18.(b), se puede concluir que ambos *scores* dependen de la concentración de los dos analitos: el *score* 1 aumenta a medida que aumentan las concentraciones de ambos analitos, mientras que el *score* 2 aumenta cuando la concentración de SP aumenta y la de CLT disminuye. Los *loadings* se representan en la Figura 4.18.(c).

La Tabla 4.9 muestra los resultados obtenidos para la validación y predicción de CLT entre 210 y 238 nm y de SP entre 240 y 288 nm, respectivamente. En ella se puede observar que los analitos pueden ser determinadas con errores relativos que, para la predicción, no superan el 0,8 % y 1,8 %, para CLT y SP, respectivamente.



**Figura 4.18:** Modelo óptimo para la determinación de SP or PLS-1: a) Varianza explicada; b) score 2 vs score 1 (concentraciones como en la Figura 4.17); c) (—) loading 1, (...) loading 2.

Para la calibración efectuada por PLS-2 y la predicción con 2 *factores*, se obtienen dos modelos de mínimo RSEP, 230-234 nm y 230-236 nm, así como un modelo de mínimo RMSEP, 232-240 nm, se toma como óptima la calibración efectuada entre 232-240 nm puesto que los errores relativos para las mezclas de validación son los más bajos y no superan el 0,77 y 2,89 % para CLT y SP, respectivamente.

Si bien para la calibración efectuada por PLS-1 se produce un ligero aumento en el error relativo cometido en la determinación de SP, la utilización de PLS-2 conduce a un aumento importante en las desviaciones estándar, obteniendo similares RSE y/o RMSE; es por ello que de los distintos modelos estudiados se escogen como óptimos los obtenidos para la calibración por PLS-1, en el intervalo comprendido entre 210 y 238 para CLT y entre 240 y 288 nm para SP, intervalos de longitudes de onda donde son máximas las diferencias espectrales.

La precisión de dichos métodos fue evaluada con un análisis de varianza, para lo cual se prepararon 3 series de 6 muestras cada una, obteniendo valores de F de 1,29 y 1,10 para la CLT y SP, respectivamente, valores inferiores a la  $F_{2,17}$  crítica tabulada para un nivel de significación del 95 %, 3,68, no existiendo evidencias de error sistemático.

A la vista de los resultados expuestos, se puede concluir que al determinación de CLT y SP en presencia de RSP es posible con buenos resultados, en los niveles de concentración estudiados.

Tabla 4.9

Resultados de la determinación de CLT entre 210-238 nm y de SP entre 240-288 nm, por PLS-1 utilizando 2 factores en las muestras de las matrices de validación y predicción.

Validación					
mg.l <sup>-1</sup> añadidos		mg.l <sup>-1</sup> encontrados ± std		Error relativo (%)	
CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP
6,46	3,42	6,41 ± 0,02	3,48 ± 0,05	-0,77	1,75
6,46	3,80	6,47 ± 0,02	3,79 ± 0,03	0,15	-0,26
6,46	4,56	6,46 ± 0,02	4,52 ± 0,02	0,00	-0,88
6,46	4,94	6,49 ± 0,03	4,92 ± 0,02	0,46	-0,40
8,08	3,42	8,07 ± 0,03	3,40 ± 0,03	-0,12	-0,58
8,08	3,80	8,09 ± 0,06	3,81 ± 0,03	0,12	0,26
8,08	4,56	8,08 ± 0,02	4,62 ± 0,02	0,00	1,32
8,08	4,94	8,09 ± 0,03	4,86 ± 0,02	0,12	-1,62
10,10	3,42	10,14 ± 0,04	3,44 ± 0,02	0,40	0,58
10,10	3,80	10,11 ± 0,06	3,78 ± 0,03	0,10	-0,53
10,10	4,56	10,12 ± 0,05	4,40 ± 0,03	0,20	-3,51
10,10	4,94	10,13 ± 0,05	4,95 ± 0,05	0,30	0,20
11,72	3,42	11,72 ± 0,04	3,43 ± 0,03	0,00	0,29
11,72	3,80	11,73 ± 0,03	3,92 ± 0,06	0,09	3,16
11,72	4,56	11,69 ± 0,05	4,54 ± 0,03	-0,26	-0,44
11,72	4,94	11,77 ± 0,06	4,87 ± 0,03	0,43	-1,42
CV				0,40	0,77
RSEV				0,27	1,48
RMSEV				0,22	1,08
Predicción					
mg.l <sup>-1</sup> añadidos		mg.l <sup>-1</sup> encontrados ± std		Error relativo (%)	
CLT	SP	CLT	SP	CLT	SP
6,08	3,17	6,28 ± 0,05	3,23 ± 0,06	1,89	1,89
10,94	3,17	11,03 ± 0,05	3,39 ± 0,05	1,58	6,94
6,08	3,17	6,29 ± 0,08	3,32 ± 0,03	0,95	4,73
10,94	3,17	10,99 ± 0,05	3,42 ± 0,07	2,21	7,89
2,04	3,30	2,00 ± 0,05	3,26 ± 0,07	2,12	-1,21
2,04	4,12	1,97 ± 0,07	4,18 ± 0,13	3,16	1,46
2,04	4,94	1,86 ± 0,07	5,11 ± 0,10	2,02	3,44
6,12	3,30	6,19 ± 0,08	3,29 ± 0,05	1,52	-0,30
6,12	4,12	6,12 ± 0,08	4,24 ± 0,03	0,73	2,91
6,12	4,94	5,98 ± 0,07	5,23 ± 0,06	1,21	5,87
10,20	3,30	10,23 ± 0,10	3,37 ± 0,05	1,52	2,12
10,20	4,12	10,16 ± 0,08	4,26 ± 0,17	4,13	3,40
10,20	4,94	10,04 ± 0,10	5,35 ± 0,04	0,81	8,30
6,12	3,30	6,19 ± 0,08	3,29 ± 0,05	1,52	-0,30
6,12	4,12	6,12 ± 0,08	4,24 ± 0,03	0,73	2,91
10,20	3,30	10,23 ± 0,10	3,33 ± 0,05	1,52	0,82
CV				1,40	1,72
RSEP				1,44	3,50
RMSEP				1,84	3,41

**Determinación simultánea de clortalidona (CLT) y espironolactona (SP) en “Resnedal”**

La determinación simultánea de CLT y SP en presencia de reserpina se llevó a cabo en el preparado farmacéutico “Resnedal”, 50 mg CLT, 25 mg SP. Para ello se prepararon las muestras siguiendo el procedimiento que se describe en la parte experimental, aplicando los modelos seleccionados anteriormente.

Se les aplicó el algoritmo PLS-1 a los espectros de absorción de las disoluciones de los medicamentos entre 210 y 238 nm para CLT y entre 240 y 288 nm para SP, llevándose a cabo la predicción con 2 factores en ambos casos.

En la Tabla 4.10 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de los fármacos aplicando PLS y HPLC, utilizando las condiciones cromatográficas seleccionadas para la mezcla CLT-SP en el Capítulo anterior. Se puede observar una buena concordancia entre los valores encontrados y declarados.

**Tabla 4.10**  
Determinación simultánea de CLT y SP en “Resnedal”

mg CLT <sup>(a)</sup> ± DS*		mg SP <sup>(b)</sup> ± DS*	
PLS-1	HPLC	PLS-1	HPLC
45,91 ± 0,12	48,38 ± 2,92	22,20 ± 0,04	27,64 ± 0,25
48,02 ± 0,12	49,34 ± 2,90	23,47 ± 0,08	24,38 ± 0,08
47,02 ± 0,14	47,30 ± 1,34	22,85 ± 0,06	25,15 ± 0,13
46,69 ± 0,13	48,96 ± 3,74	22,77 ± 0,05	23,40 ± 1,13
48,38 ± 0,23	48,68 ± 1,70	23,32 ± 0,06	23,46 ± 0,13
45,51 ± 0,13	46,32 ± 0,31	22,38 ± 0,07	23,14 ± 0,04
51,31 ± 0,10	52,07 ± 1,91	26,27 ± 0,04	23,65 ± 0,06
50,30 ± 0,05	49,48 ± 1,06	25,84 ± 0,03	25,54 ± 0,02
49,61 ± 0,05	50,32 ± 2,79	24,76 ± 0,02	25,50 ± 0,03
48,23 ± 0,06	50,19 ± 2,31	24,51 ± 0,02	26,52 ± 0,22
50,22 ± 0,06	47,84 ± 2,24	25,55 ± 0,02	25,47 ± 0,08
49,61 ± 0,05	47,90 ± 0,50	24,92 ± 0,02	24,39 ± 0,00
48,40 ± 1,86	48,90 ± 1,54	24,07 ± 1,41	24,85 ± 1,37

<sup>(a)</sup> Cromatogramas a 207 nm. <sup>(b)</sup> Cromatogramas a 238 nm. \*Valor medio de tres determinaciones.

*Comparación de resultados*

Se realizó un estudio estadístico de comparación de las medias obtenidas por HPLC, y por aplicación de PLS a los datos espectrofotométricos. Los valores de t-Student encontrados, 1,19 para CLT y 1,89 para SP, eran inferiores al valor tabulado. Por tanto, se puede concluir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por espectrofotometría aplicando PLS y por cromatografía líquida de alta resolución.

**CAPÍTULO V**

---

**RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA**



El objetivo planteado en el presente capítulo es la resolución espectrofluorimétrica de una mezcla formada por dos analitos que exhiben fluorescencia nativa, furosemida y triamtereno, siendo la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de triamtereno (TRI) mucho mayor que la que muestran las disoluciones de furosemida (FUR). El método que se desarrolla se aplicará a la determinación de estos analitos en productos farmacéuticos, y en orina.

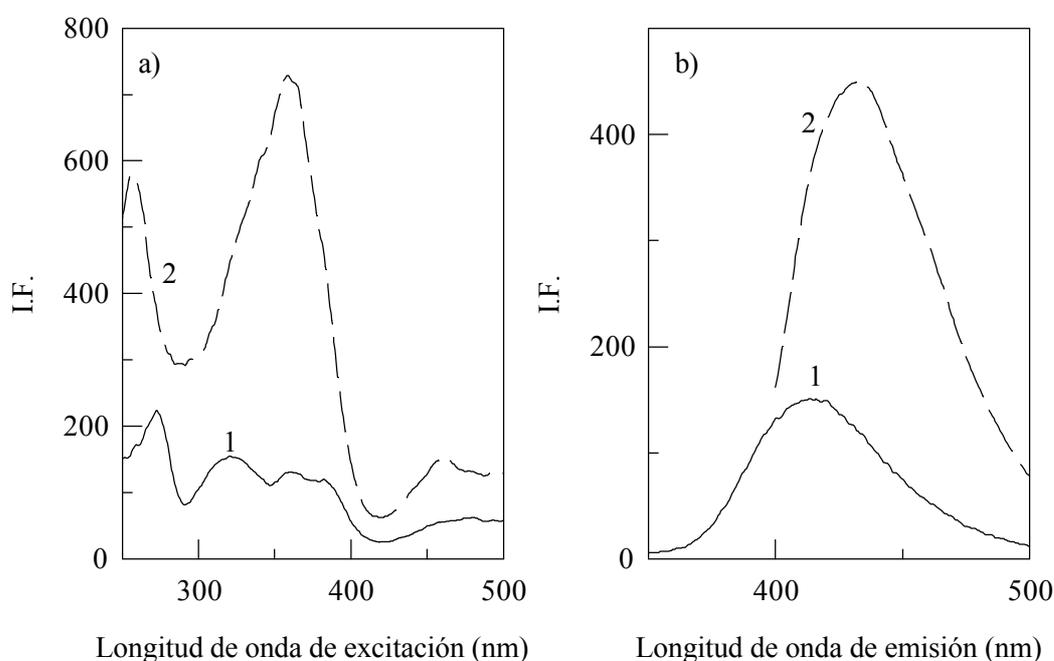
La espectroscopía de fluorescencia molecular, debido a su inherente sensibilidad, se ha considerado una técnica alternativa para la resolución de mezclas complejas; sin embargo, muchas de las determinaciones se han visto frustradas por problemas de solapamiento espectral. El desarrollo de técnicas fluorimétricas como fluorescencia derivada<sup>1,2</sup>, sincrónica<sup>3</sup>, de ángulo variable<sup>4</sup>, espectroscopía de luminiscencia<sup>5</sup> o la aplicación de métodos de calibración multivariante<sup>6</sup> a los datos adquiridos mediante las técnicas anteriores, ha resuelto un gran número de problemas analíticos.

En este capítulo se utilizan las técnicas de fluorescencia convencional y sincrónica, y se hace uso de métodos de calibración univariada y multivariante.

### V.1. Fluorescencia convencional

La Figura 5.1 muestra los espectros de excitación y emisión de disoluciones de FUR y TRI obtenidos fijando las longitudes de onda de emisión, para los primeros, y de excitación, para los segundos, a los valores de los correspondientes máximos.

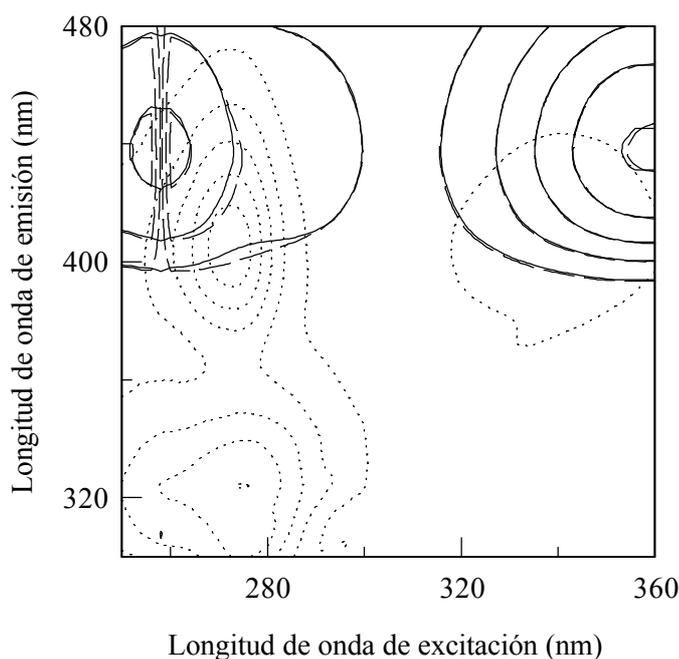
En la Figura 5.1.(a) se puede observar que FUR presenta un máximo de excitación a 270 nm, y otro de menor intensidad a 320 nm, mientras los máximos de TRI se encuentran a 260 y 360 nm, siendo este último de mayor intensidad. Los espectros de emisión, Figura 5.1.(b), obtenidos excitando las disoluciones acuosas de FUR y TRI a 270 y 360 nm, presentan máximos situados a 410 y 438 nm, para FUR y TRI, respectivamente.



**Figura 5.1:** Espectros de: a) excitación y b) emisión de 1) 0,144  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de FUR ( $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$ ) y 2) 0,014  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ), en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M pH 2,5. Anchos de rendijas de excitación y emisión, 6 nm.

El elevado solapamiento espectral puesto de manifiesto en los espectros de excitación y emisión de los analitos hace imposible la resolución de estos en mezclas haciendo uso de métodos de calibración univariados. Por ello, se hace necesario, no sólo recurrir a la aplicación de métodos de calibración multivariantes a los datos obtenidos por fluorescencia convencional, sino elegir una longitud de onda de excitación de compromiso para ambos analitos.

Con el fin de encontrar esta longitud de onda, se registraron los espectros de emisión de disoluciones de furosemida, triamtereno, y su mezcla, haciendo variar la longitud de onda de excitación entre 250 y 360 nm; la figura 5.2 muestra los diagramas de contorno obtenidos. Como puede observarse, a longitudes de onda superiores a 300 nm la fluorescencia de la mezcla es debida a TRI, mientras que entre 250 y 290 nm se debe a la combinación de los dos analitos. La máxima señal de fluorescencia se obtiene a 258 nm, por tanto, esta longitud de onda fue la seleccionada para llevar a cabo las determinaciones.

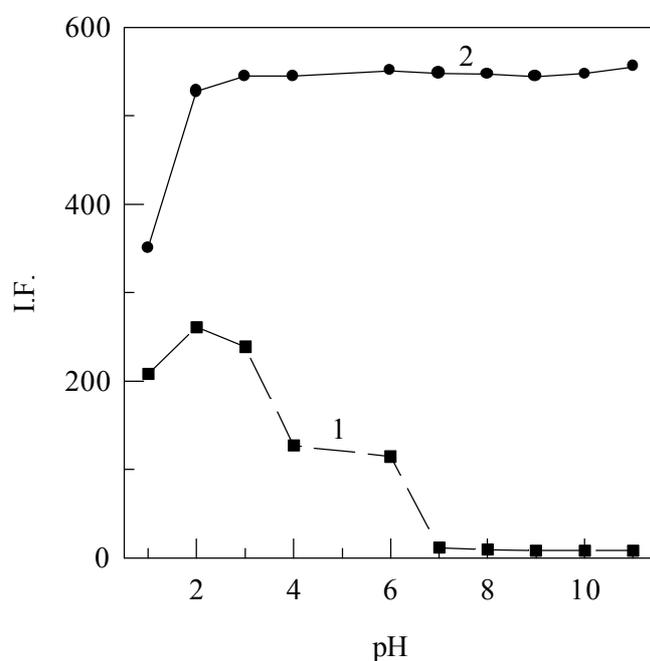


**Figura 5.2:** Diagramas de contorno obtenidos para la selección de la longitud de onda de excitación, en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M y pH 2,5; (—) 0,5  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de FUR, (...) 0,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de TRI, ( — ) mezcla.

Como paso previo a la determinación espectrofluorimétrica simultánea de FUR y TRI se realizó un estudio de las distintas variables que pueden afectar a la intensidad de fluorescencia y a la posición de los máximos de excitación y emisión, y se comprobó la estabilidad de los fármacos en función del tiempo de preparación y del pH.

Se prepararon disoluciones concentradas de FUR y TRI, que conservadas a 5 °C eran estables durante una semana. Al diluir éstas hasta obtener una concentración aproximada de 4  $\text{mg.l}^{-1}$  se observó que, a temperatura ambiente, las disoluciones de FUR así preparadas eran estables 12 horas, mientras que las de TRI permanecían inalteradas 48 horas. Por tanto, para todos los estudios posteriores se utilizaron disoluciones recién preparadas.

Para estudiar la influencia del pH en la intensidad de fluorescencia se prepararon disoluciones de cada uno de los analitos a las que se añadieron gotas de disoluciones de hidróxido sódico o ácido clorhídrico hasta obtener el pH deseado. La Figura 5.3 muestra la variación de la intensidad de fluorescencia frente al pH en los máximos de los espectros de emisión de FUR y TRI cuando se excita a 270 y 360 nm, respectivamente. Se puede observar que para FUR, la fluorescencia es máxima para valores de pH comprendidos entre 1,7 y 2,7, disminuyendo drásticamente a valores de pH inferiores y superiores; la fluorescencia de TRI no se ve afectada por las variaciones de pH entre 2,0 y 10,0. Por ello, con el fin de asegurar la máxima intensidad de fluorescencia para ambos analitos, se decidió trabajar a pH 2,5 en todas las experiencias posteriores.



**Figura 5.3:** Influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia de (1) 20 mg.l<sup>-1</sup> de FUR y (2) 2 mg.l<sup>-1</sup> de TRI.

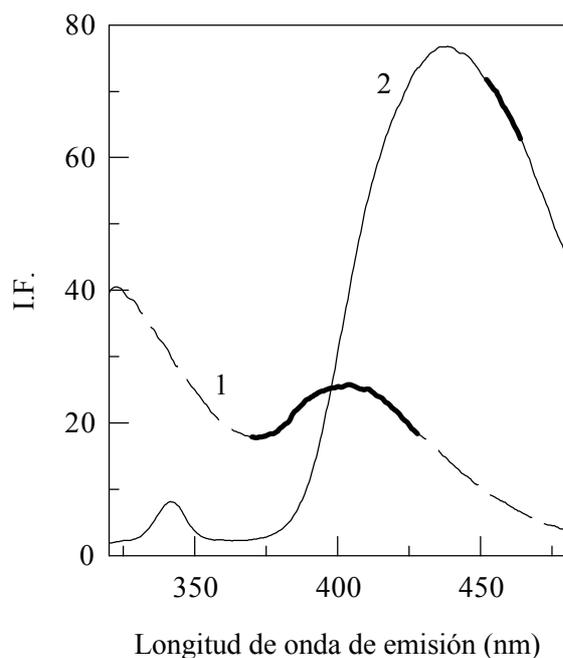
La Figura 5.3 también permite apreciar la elevada emisión de fluorescencia de TRI respecto a FUR; la fluorescencia emitida por FUR a los valores de pH correspondientes al máximo, es la mitad de la presentada por TRI, aún cuando la concentración de la primera es 10 veces superior.

Entre las distintas disoluciones reguladoras ensayadas, la formada por ácido tartárico y tartrato sódico proporcionaba señales idénticas a las obtenidas para el mismo pH en ausencia de reguladora, siendo ésta elegida para llevar a cabo la determinación simultánea. Se ensayaron también concentraciones de esta disolución reguladora entre 0,01 y 0,04 M sin que se apreciaran

diferencias notables en la intensidad de fluorescencia de los analitos; por tanto, se decidió utilizar una disolución reguladora de ácido tartárico/ tartrato sódico 0,04 M como medio de trabajo.

Otro factor que puede afectar a la intensidad de fluorescencia es la temperatura. Al aumentar ésta entre 15 y 30 °C se encontró que la intensidad de fluorescencia disminuía, por lo que los estudios posteriores se llevaron a cabo termostatazando a  $20 \pm 0,1$  °C.

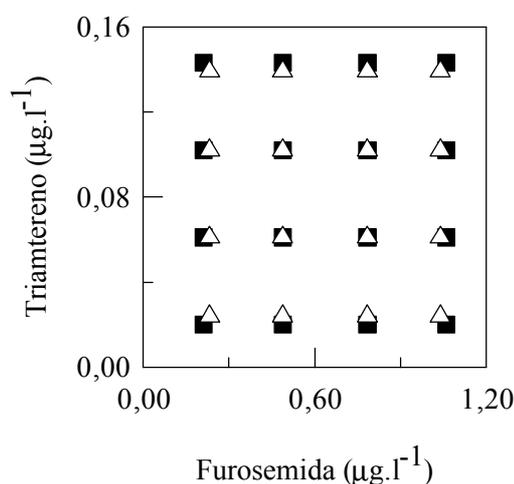
La Figura 5.4 muestra los espectros de emisión de disoluciones de FUR y TRI en las condiciones experimentales seleccionadas:  $\lambda_{exc} = 258$  nm, disolución reguladora de ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M de pH 2,5 y 20 °C. Se encontró que, en dichas condiciones, existe una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia a 410 nm y la concentración de FUR en el intervalo  $0,212 - 1.060 \mu\text{g l}^{-1}$ , y entre la señal de fluorescencia emitida a 438 nm y la concentración de TRI entre  $0,0204$  y  $0,143 \mu\text{g l}^{-1}$ .



**Figura 5.4:** Espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 258$  nm) en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M, pH 2,5, 1)  $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de FUR y 2)  $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de TRI. Anchos de rendijas de excitación y emisión, 6 nm.

### V.1.1. Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

El primer paso para la determinación simultánea de FUR y TRI utilizando métodos de calibración multivariantes implica la construcción de tres matrices, de calibración, de validación y de predicción. La matriz de calibración se preparó con un diseño en 4 niveles para dos analitos,  $4^2$ , conteniendo, por tanto, 16 disoluciones; los límites superior e inferior de esta matriz se establecieron de acuerdo con los intervalos de linealidad encontrados para cada analito. Las matrices de validación y de predicción se prepararon de forma que sus concentraciones se encontraran entre los límites anteriores. La composición de las matrices de calibración y validación se muestra en la Figura 5.5. Los espectros de emisión de las disoluciones anteriores se registraron entre 300 y 520 nm con  $\lambda_{exc.} = 258$  nm.



**Figura 5.5:** Composición de las matrices de calibración (■) y predicción (Δ).

#### *Selección del intervalo de longitudes de onda y del número de factores*

Como en otros métodos de calibración, la selección de variables a utilizar es de crucial importancia para obtener un modelo PLS de calidad. Así, es tan importante seleccionar sólo aquellas longitudes de onda que proporcionan información, como utilizar el número de *factores* adecuado, para evitar obtener un sobreajuste del sistema, que originaría buenos parámetros para la calibración pero predicciones deficientes, o un ajuste insuficiente que también conduciría a resultados inapropiadas.

La selección del intervalo de longitudes de onda y del número de *factores* se llevó a cabo utilizando el método del menor PRESS significativo, descrito en el Capítulo II. La calibración se realizó aplicando PLS-1 a los espectros de fluorescencia de las disoluciones de la

matriz de calibración, obtenidos en las condiciones citadas anteriormente. Se consideraron todos los posibles modelos, con un mínimo de 4 variables (longitudes de onda), en el intervalo 330 – 500 nm para FUR y 380 – 500 nm para TRI, y con cada uno de ellos se calcularon los valores de PRESS para la matriz de validación utilizando 1, 2, 3 y 4 *factores*. Estos valores de PRESS, así como los intervalos de longitudes de onda a los que corresponden se recogen en la Tabla 5.1, en la que se puede observar que los valores mínimos de PRESS corresponden a la predicción realizada con 3 *factores* en el caso de FUR, y con 4 en el de TRI.

**Tabla 5.1**

Valores de PRESS mínimos obtenidos en la determinación espectrofluorimétrica de FUR y TRI,  $\lambda_{exc} = 258$  nm.

Nº <i>factores</i>	FUR		TRI	
	PRESS	$\lambda$ (nm)	PRESS	$\lambda$ (nm)
1	9,947E-2	332-368	1,388E-4	474-480
2	6,615E-2	392-406	3,801E-5	<b>452-464</b>
3	1,423E-3	<b>370-428</b>	4,611E-5	382-442
4	4,628E-3	370-400	3,285E-5	384-410

De acuerdo con el método aplicado, los valores de PRESS obtenidos para cada número de *factores* se compararon, mediante un test F, con los correspondientes al mismo intervalo de longitudes de onda, pero con un número de *factores* inferior, con el fin de establecer si existían diferencias significativas entre ellos. Los intervalos correspondientes al menor PRESS significativo, 370 – 428 nm con 3 *factores*, para FUR, y 452 – 464 con 2 *factores* para TRI, se representan en negrita en la Tabla 5.1 y se han señalado con trazo más grueso en la Figura 5.5. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la selección de estos dos parámetros cuando se aplica PLS; los modelos seleccionados presentan un número de *factores* inferior al que presenta el mínimo valor de PRESS, lo que indica que este último estaría sobredimensionado, y corresponden a intervalos de longitudes de onda en las zonas del espectro donde las diferencias entre los analitos son máximas.

La Tabla 5.2 recoge los resultados encontrados en la determinación de FUR y TRI en las muestras de la matriz de predicción utilizando los modelos seleccionados. Se puede observar que los resultados son buenos en todos los casos, con errores relativos inferiores al 6 %.

**Tabla 5.2**

Resultados obtenidos en la determinación de FUR y TRI utilizando los modelos óptimos encontrados ( $\lambda_{exc} = 258 \text{ nm}$ ).

$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		% error	
FUR	TRI	FUR 370-428 nm 3 factores	TRI 452-464 nm 2 factores
0,233	0,024	-3,70	-5,80
0,490	0,024	1,79	0,29
0,780	0,024	-0,19	2,86
1,039	0,024	-0,87	1,61
0,233	0,060	-5,72	-1,77
0,490	0,060	2,48	-1,31
0,780	0,060	0,77	-1,80
1,039	0,060	0,97	0,90
0,233	0,100	-5,62	1,16
0,490	0,100	-0,14	0,68
0,780	0,100	-0,30	0,83
1,039	0,100	0,37	0,61
0,233	0,136	-2,90	0,40
0,490	0,136	-3,82	3,04
0,780	0,136	-1,05	-0,44
1,039	0,136	0,16	-2,51

## V.2. Fluorescencia sincrónica

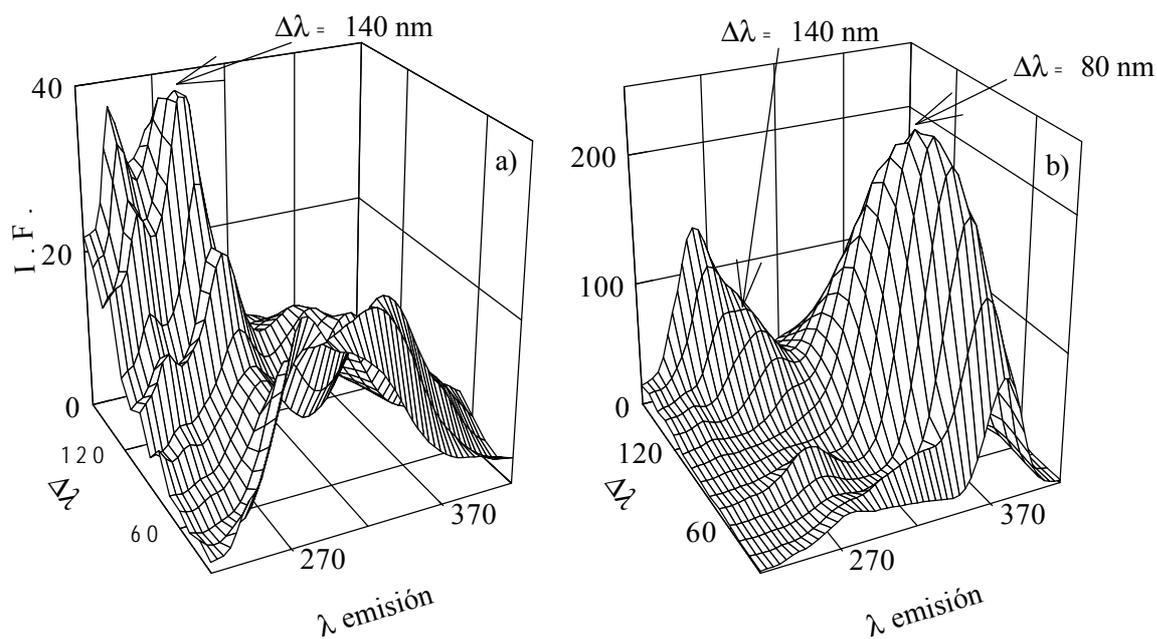
La espectrofluorimetría sincrónica, introducida por Lloyd<sup>8</sup> en el siglo pasado, consiste en registrar la señal fluorescente mientras se mueven simultáneamente los monocromadores de excitación y emisión, manteniendo un intervalo constante entre ambas longitudes de onda a lo largo de todas las medidas ( $\Delta\lambda$ ). Esto conduce a una disminución del ancho de banda, a la simplificación del espectro de emisión –sólo se observa señal cuando  $\Delta\lambda$  corresponde a una zona donde existe una banda de absorción y otra de emisión- y a la reducción del intervalo espectral.

En 1976, John y Soutar<sup>9</sup> proponen la fluorescencia sincrónica derivada, que surge de la combinación de dos técnicas alternativas: una específica de la fluorimetría (movimiento simultáneo de monocromadores cuyas ventajas se comentaron en el párrafo anterior) y otra general de la espectroscopía (derivatización de la señal). Esta combinación origina una técnica de gran versatilidad donde la simplicidad, rapidez, bajo coste, selectividad, etc., son una alternativa con respecto a las técnicas utilizadas individualmente, ofreciendo grandes posibilidades para la resolución de compuestos con características analíticas semejantes.

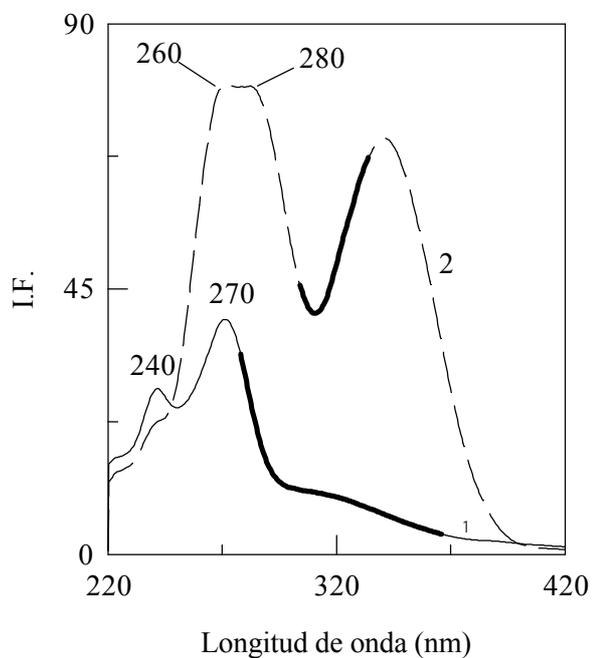
El primer paso para las determinaciones mediante fluorescencia sincrónica es la selección de  $\Delta\lambda$ , que generalmente es empírica, y debe optimizarse para cada caso en particular. Para establecer este incremento se registraron los espectros sincrónicos de los analitos entre 220 y 420 nm con valores de  $\Delta\lambda$  que se hicieron variar desde 30 hasta 160 nm aumentando el incremento en 10 nm para cada registro sucesivo.

La Figura 5.6.(a) muestra que la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de furosemida aumenta a medida que lo hace  $\Delta\lambda$ , alcanzando el valor máximo cuando  $\Delta\lambda = 140$  nm, espectro en el que se observan dos picos, uno a 270 nm, y otro de menor intensidad a 240 nm; la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de triamtereno, máxima para  $\Delta\lambda = 70 - 80$  nm, es mucho mayor que la de furosemida, con un pico definido a 360 nm, Figura 5.6.(b).

Con el fin de obtener mejores resultados en la determinación simultánea de FUR y TRI, se seleccionó el espectro sincrónico con  $\Delta\lambda = 140$  nm para llevar a cabo las determinaciones, ya que en este espectro las señales de los analitos se hacen comparables, al ser máxima la intensidad de fluorescencia de FUR y mínima la de TRI. En este espectro, el triamtereno exhibe dos picos, a 280 y 340 nm, Figura 5.7. En estas condiciones se encontró que la relación entre la intensidad de fluorescencia y las concentraciones de FUR y TRI era lineal en los intervalos 1,03 – 31,20 y 1,68 – 43,08  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , respectivamente.



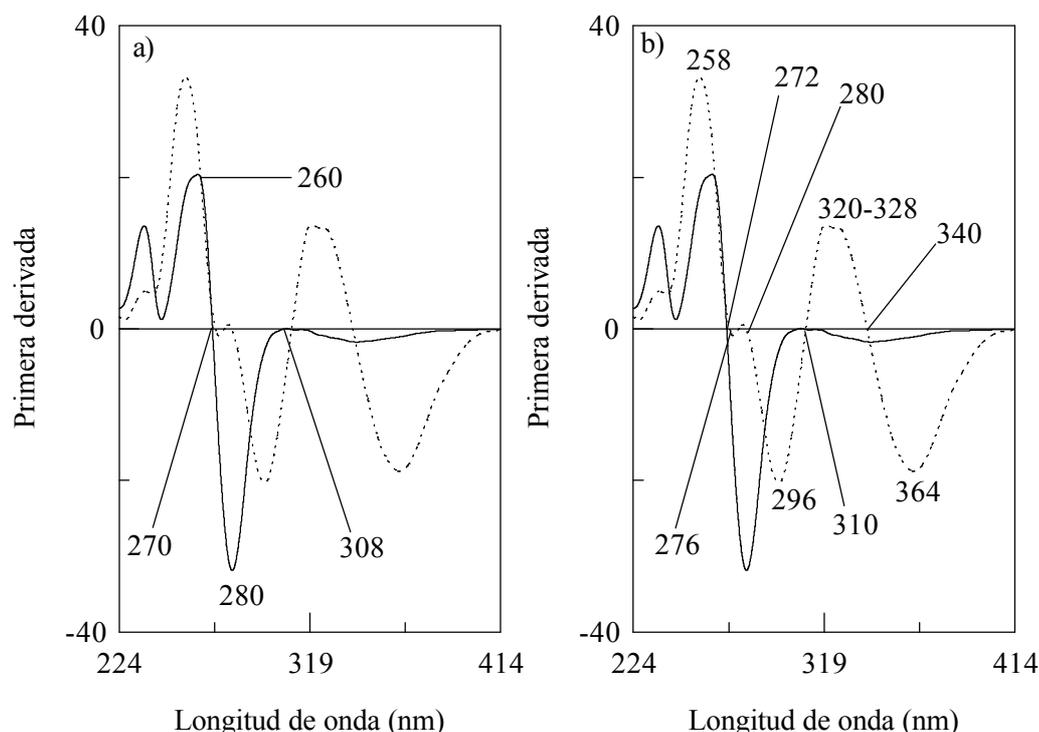
**Figura 5.6:** Espectros de fluorescencia sincrónica de (a)  $16,8 \mu\text{g.l}^{-1}$  FUR y (b)  $12,0 \mu\text{g.l}^{-1}$  TRI en ácido tartárico/tartrato sódico  $0,04 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 2,5$ .



**Figura 5.7:** Espectros sincrónicos de 1)  $3,4 \mu\text{g.l}^{-1}$  FUR y 2)  $2,1 \mu\text{g.l}^{-1}$  TRI, en ácido tartárico/tartrato sódico  $0,04 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 2,5$ ,  $\Delta\lambda = 140 \text{ nm}$ .

### V.2.1. Fluorescencia sincrónica derivada. Calibración univariada

La Figura 5.8 muestra los espectros sincrónicos derivados de disoluciones de FUR y TRI, registrados entre 220 y 420 nm con  $\Delta\lambda = 140$  nm. En la Figura 5.8.(a) se observa que el espectro de FUR presenta un máximo y un mínimo situados a 260 y 280 nm, respectivamente, y que los cruces por cero de su espectro se producen a 270 y 308 nm; a longitudes de onda superiores a 308 nm la señal es prácticamente nula. Las longitudes de onda más representativas del espectro sincrónico derivado de TRI se señalan en la Figura 5.8.(b); en ella se pueden observar dos máximos, el primero a 258 y el segundo entre 320 y 328 nm, y dos mínimos a 296 y 364 nm. Los cruces por cero del espectro sincrónico derivado de TRI se producen a 272, 276, 280, 310 y 340 nm.

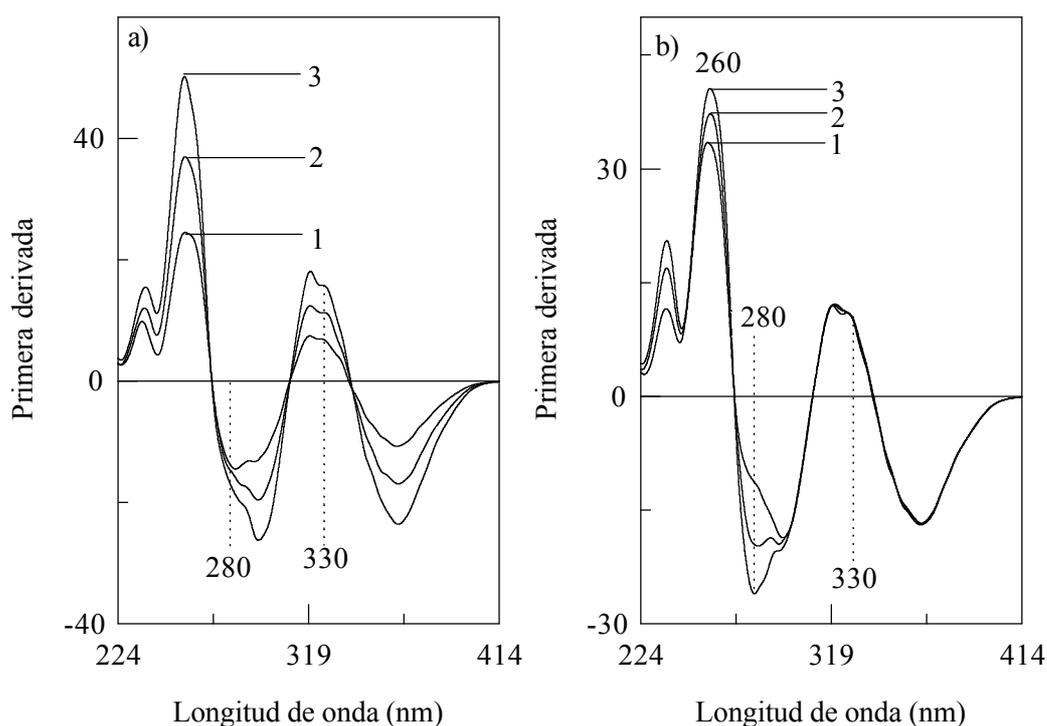


**Figura 5.8:** Espectros de sincrónicos derivados,  $\Delta\lambda = 140$  nm, de disoluciones de: (—)  $36,96 \mu\text{g.l}^{-1}$  de FUR y (...)  $16,80 \mu\text{g.l}^{-1}$  de TRI en ácido tartárico/tartrato sódico  $0,04$  M, pH 2,5.

La Figura 5.9 muestra los espectros sincrónicos de primera derivada de mezclas de los analitos en estudio que contienen concentraciones constantes de uno de ellos y variables del otro. Teniendo en cuenta que el espectro de FUR cruza por cero a 270 nm, que el espectro de TRI lo hace a 272, 276, 280, 310 y 340 nm, y que a partir de 295 nm FUR prácticamente no

emite fluorescencia, la única longitud de onda que permitiría la determinación de FUR sería 280 nm. Sin embargo, la señal a esa longitud de onda no permanece constante, como se observa en la Figura 5.9.(a), poniéndose de manifiesto la influencia de TRI; por tanto, si se lleva a cabo la determinación de FUR a esa longitud de onda, son de esperar errores elevados.

Con respecto a la determinación de TRI, los cruces por cero del espectro de FUR se producen a 270 y 308 nm, longitudes de onda que se encuentran muy cerca de los cruces por cero del espectro derivado de TRI, por lo que no se puede realizar la determinación de este analito a estas longitudes de onda. No obstante, en la Figura 5.9.(b) se puede observar que a 330 nm los espectros sincrónicos derivados con igual concentración de TRI toman el mismo valor, independientemente de la cantidad de FUR, mientras que en la Figura 5.9.(a) se evidencia la proporcionalidad de la señal a esta longitud de onda con el contenido de TRI en las mezclas, por lo que se podría recurrir a medir la intensidad de fluorescencia a 330 nm para realizar la determinación de TRI.



**Figura 5.9:** Espectros de sincrónicos de primera derivada en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M, pH 2,5, de disoluciones de: a) 16,80  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de FUR y 1) 7,20; 2) 16,80; 3) 26,40  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de TRI y b) 12,00  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de TRI y 1) 10,08; 2) 23,52 y 3) 36,96  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de FUR.

### Curvas de calibrado

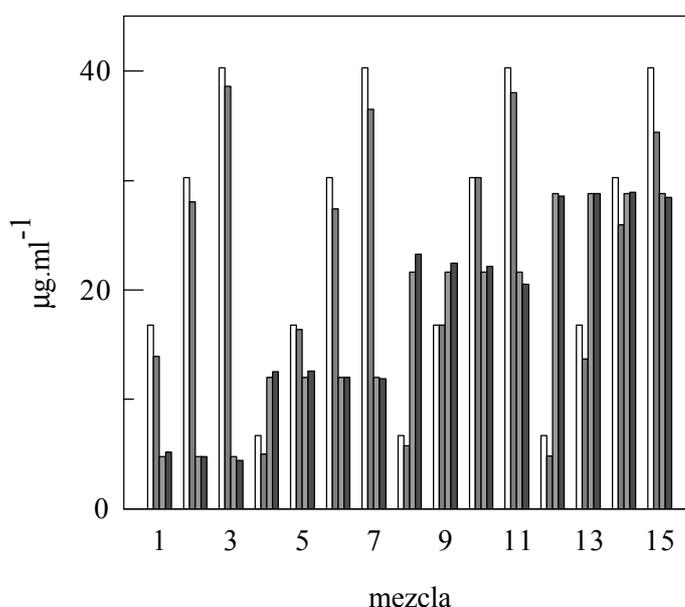
Para la construcción de las curvas de calibrado de los analitos a las longitudes de onda seleccionadas se prepararon disoluciones con concentraciones comprendidos en los intervalos de linealidad de los analitos, y se registraron los correspondientes espectros sincrónicos, que posteriormente fueron derivados.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$\text{I.F.}^{1^{\circ}} \text{ derivada, } 280 \text{ nm} = (1,09 \pm 4,12\text{E-}1) + (-8,47\text{E-}1 \pm 1,53\text{E-}2) \cdot [\text{FUR}] (\mu\text{g.l}^{-1}) \quad (r = 0,9992)$$

$$\text{I.F.}^{1^{\circ}} \text{ derivada, } 330 \text{ nm} = (-1,91\text{E-}1 \pm 1,87\text{E-}1) + (8,96\text{E-}1 \pm 1,45\text{E-}2) \cdot [\text{TRI}] (\mu\text{g.l}^{-1}) \quad (r = 0,9997)$$

La Figura 5.10 muestra los resultados obtenidos en la determinación de FUR y TRI en mezclas utilizando las ecuaciones anteriores. Se observa que, como ya se ha comentado, en la determinación de FUR se comete un error que depende de la concentración de TRI en la mezcla. Para poder realizar la determinación de FUR en presencia de TRI a 280 nm, sería necesario realizar un calibrado de TRI a esta longitud de onda, y restar a la señal de la mezcla, la señal asociada a TRI. Sin embargo, esta calibración doble, unida a la escasa señal que presenta TRI a 280 nm, no conduce a una mejora sensible de los resultados. La determinación de TRI a 330 nm se puede llevar a cabo con resultados aceptables.



**Figura 5.10:** Resultados obtenidos en la determinación de FUR y TRI por calibración univariada en el espectro sincrónico derivado,  $\Delta\lambda = 140 \text{ nm}$ . □ FUR añadido; □ FUR encontrado; □ TRI añadido; □ TRI encontrado.

De los resultados obtenidos podemos concluir que para esta mezcla, en la que los analitos presentan intensidades de fluorescencia significativamente diferentes, y las longitudes de onda de sus cruces por cero en los espectros sincrónicos derivados están muy próximas, la calibración univariada no resulta adecuada.

### V.2.2. Regresión en mínimos cuadrados parciales

Debido a las limitaciones de los métodos de calibración univariada, puestas de manifiesto en el apartado anterior, se intentó resolver la mezcla de FUR y TRI aplicando PLS a los espectros sincrónicos derivados de los analitos. Para ello es necesario disponer de tres series de muestras: matrices de calibración, validación y predicción.

La matriz de calibración se preparó con un diseño en 4 niveles: 2,52; 7,31; 12,10 y 16,88  $\mu\text{g.l}^{-1}$  para FUR y 1,03; 4,13; 7,22 y 10,32  $\mu\text{g.l}^{-1}$  para TRI y se registraron los espectros sincrónicos derivados con  $\Delta\lambda = 140$  nm. A continuación, siguiendo el procedimiento ya descrito en ocasiones anteriores, se ensayaron los 2485 modelos con un mínimo de 6 variables, por cada *factor*, que resultan al aplicar PLS-1 a los espectros sincrónicos entre 224 y 374 nm para la determinación de FUR, y entre 244 y 394 nm para la de TRI.

El intervalo de longitudes de onda y el número de *factores* se seleccionaron simultáneamente, utilizando como parámetro de calidad a optimizar el valor de PRESS calculado para las disoluciones de la matriz de validación con cada uno de los modelos establecidos. Los valores de PRESS mínimos obtenidos para cada número de *factores* ensayado se recogen en la Tabla 5.3.

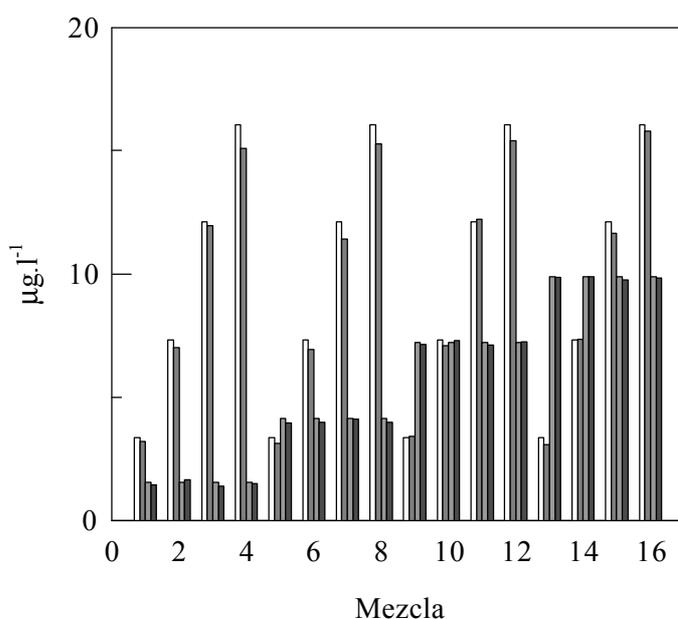
**Tabla 5.3**

Valores mínimos de PRESS encontrados en la determinación de FUR y TRI por PLS-1 en los espectros sincrónicos derivados.

nº <i>factores</i>	FUR		TRI	
	PRESS	$\lambda$ (nm)	PRESS	$\lambda$ (nm)
1	1,06E-5	270-284	2,1E-7	380-392 380-394
2	4,21E-6	<b>278-366</b>	1,7E-7	<b>304-324</b>
3	4,06E-6	286-374	1,40E-7	298-324
4	4,04E-6	286-366	1,40E-7	298-334 298-336

Los valores de PRESS mínimos para cada número de *factores* fueron comparados, mediante un test F, con los correspondientes al mismo intervalo de longitudes de onda pero con un *factor* menos, encontrándose que en ambos casos el menor PRESS significativo se obtenía con 2 *factores*.

En la Figura 5.11 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de furosemida y triamtereno en las muestras de la matriz de predicción. Como puede observarse, los errores para TRI son sustancialmente inferiores a los obtenidos para FUR, aunque también para este último los errores son aceptables en la mayoría de las mezclas.



**Figura 5.11:** Determinación de FUR y TRI por aplicación de PLS-1 en el espectro sincrónico derivado. □ FUR añadido; □ FUR encontrado; □ TRI añadido; □ TRI encontrado.

Una comparación de los valores de PRESS obtenidos al aplicar PLS a los espectros de emisión de fluorescencia con  $\lambda_{exc} = 258$  nm ( $1,43E-3$  para FUR y  $3,80E-5$  para TRI), y los espectros sincrónicos derivados con  $\Delta\lambda = 140$  nm ( $4,21E-6$  para FUR y  $1,17E-7$  para TRI), pone de manifiesto una disminución de varios órdenes de magnitud al pasar de la fluorescencia convencional a la sincrónica, especialmente en el caso de la furosemida. La aplicación de un test F a estos valores de PRESS confirma que existen diferencias significativas entre la fluorescencia convencional y la fluorescencia sincrónica, proporcionando esta última mejores resultados.

***Estudio de la exactitud y precisión***

Con objeto de comprobar la exactitud y precisión del método seleccionado se realizó un análisis de varianza. Para ello, se prepararon tres series de seis muestras de igual concentración, se registraron los espectros sincrónicos, y se trataron utilizando los modelos seleccionados en el apartado anterior para la determinación de cada analito.

Los valores de F obtenidos para FUR y TRI, 1,63 y 1,77, respectivamente, eran inferiores al valor crítico tabulado  $F_{2,15}$  para un nivel de confianza del 95% (3,68); por tanto, los métodos propuestos son exactos y no presentan evidencia de error sistemático.

### V.2.3. Determinación de furosemida y triamtereno en preparados farmacéuticos

Una vez estudiados los distintos métodos de calibración y encontradas las técnicas fluorescentes que mejores resultados proporcionan, con el fin de comprobar su aplicabilidad se llevó a cabo la determinación simultánea de FUR y TRI en el preparado farmacéutico comercial “Salidur”, que contiene 40 mg de FUR y 25 mg de TRI por comprimido, y la determinación de FUR en “Seguril” (40 mg FUR).

Para ello se prepararon 6 muestras, siguiendo el procedimiento que se describe en la parte experimental, de las cuales se obtuvieron 3 disoluciones que se analizaron y midieron como se expuso en los apartados anteriores.

La Tabla 5.4 muestra los resultados obtenidos. En ella se observa que la dispersión de los resultados, expresada como desviación estándar global, es mayor para FUR (1,01) que para TRI (0,36). No obstante, en ambos casos la diferencia entre los valores declarados y encontrados para cada uno de los fármacos es inferior al  $\pm 15\%$  permitido por la legislación vigente en cuanto a uniformidad de contenidos en los preparados farmacéuticos.

**Tabla 5.4**

Resultados de la determinación de FUR<sup>a</sup> y TRI<sup>a</sup> en preparados farmacéuticos.

“Salidur”	“Seguril”	“Salidur”
FUR <sup>b</sup> mg $\pm$ std		TRI <sup>c</sup> mg $\pm$ std
41,22 $\pm$ 0,51	39,55 $\pm$ 0,61	23,95 $\pm$ 0,03
39,49 $\pm$ 0,80	41,34 $\pm$ 0,54	23,56 $\pm$ 0,56
37,65 $\pm$ 0,45	41,11 $\pm$ 0,17	23,29 $\pm$ 0,16
40,28 $\pm$ 0,64	40,64 $\pm$ 0,45	23,39 $\pm$ 0,51
39,66 $\pm$ 0,83	39,77 $\pm$ 0,71	24,02 $\pm$ 0,42
39,77 $\pm$ 0,63	40,41 $\pm$ 0,63	23,13 $\pm$ 0,26
39,68 $\pm$ 1,18	40,45 $\pm$ 0,73	23,57 $\pm$ 0,36

<sup>a</sup> Valores medios de tres determinaciones

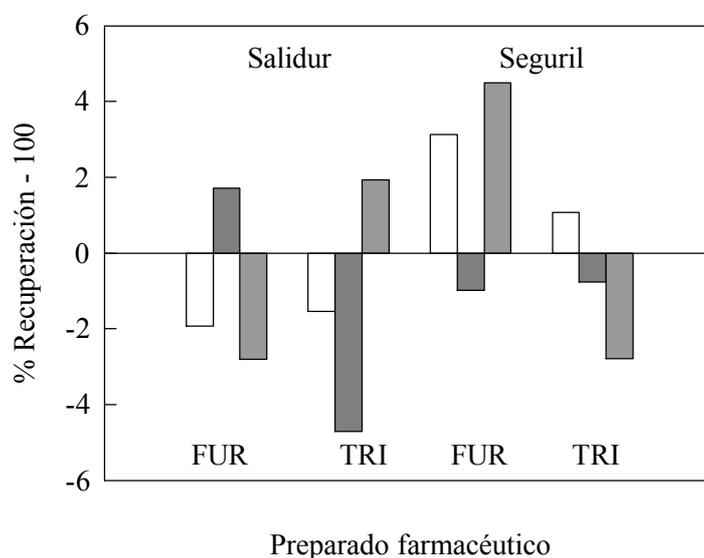
<sup>b</sup> 40 mg declarados

<sup>c</sup> 25 mg declarados

### Estudio de recuperaciones

La exactitud y precisión de los métodos aplicados a la determinación de los fármacos en medicamentos se comprobó realizando un estudio de recuperaciones. Para ello, se tomaron alícuotas de una muestra real ya analizada, se le añadieron distintas cantidades de FUR y TRI, y se registraron sus espectros sincrónicos

La Figura 5.12 muestra que los resultados de las determinaciones en “Salidur” y “Seguril” son satisfactorios para ambos analitos, con porcentajes de recuperación entre el 97 y 105 % para FUR y entre el 97 y 102% para TRI.

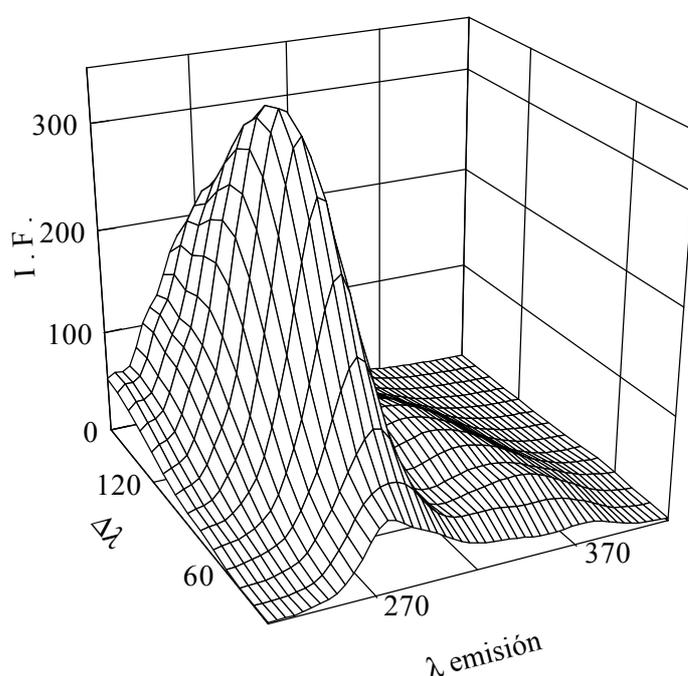


**Figura 5.12:** Estudio de recuperaciones de FUR y TRI en preparados farmacéuticos. Añadido: □ 10,22 µg l<sup>-1</sup> de FUR y 6,52 µg l<sup>-1</sup> de TRI; □ 20,45 µg l<sup>-1</sup> de FUR y 13,05 µg l<sup>-1</sup> de TRI; □ 30,67 µg l<sup>-1</sup> de FUR y 19,57 µg l<sup>-1</sup> de TRI.

### V.3. Determinación de triamtereno en orina

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la determinación los analitos en preparados farmacéuticos, se planteó la posibilidad de llevar a cabo la determinación se estos principios activos en muestras algo más complejas.

La Figura 5.13 muestra los espectros de disoluciones acuosas de orina en función de  $\Delta\lambda$  en las mismas condiciones experimentales que en los apartados anteriores, esto es, entre 30 y 160 nm a intervalos de 10 nm.

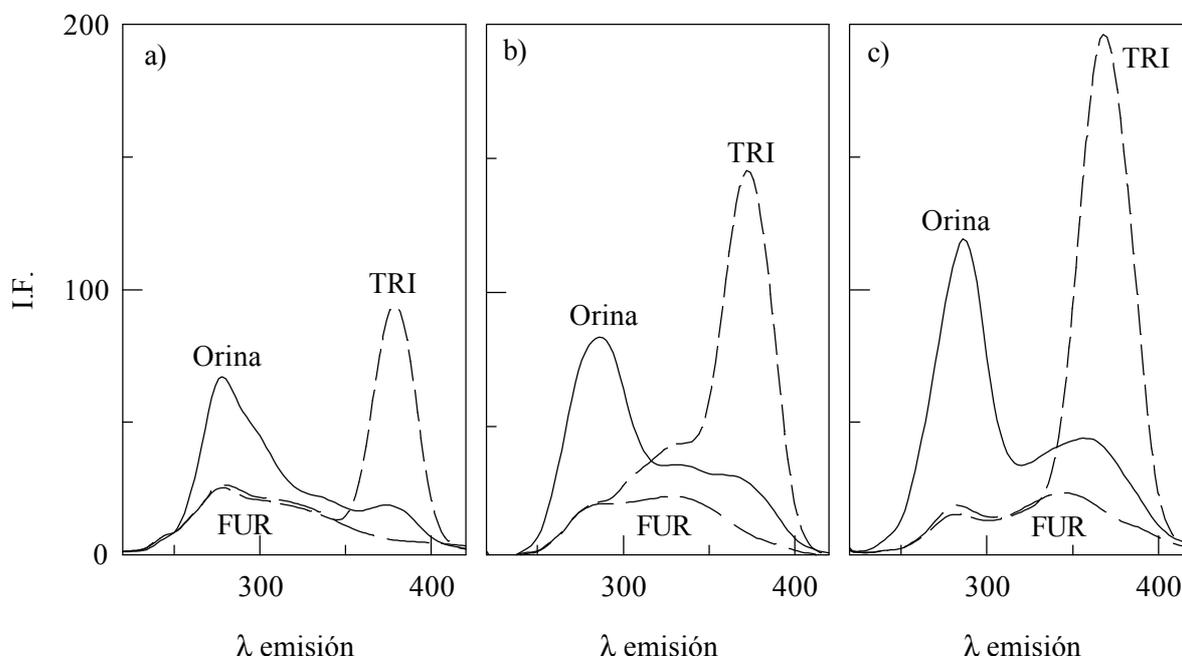


**Figura 5.13:** Espectros de sincrónicos de una disolución de orina en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M, pH 2,5.

En dicha Figura se observa que la orina, aún diluida, presenta una elevada intensidad de fluorescencia, máxima en el espectro correspondiente a un  $\Delta\lambda$  de 100 nm, y mínima en los espectros correspondientes a  $\Delta\lambda$  de 30, 40 y 50 nm.

La Figura 5.14 muestra los espectros sincrónicos de una disolución de orina y de disoluciones de FUR y TRI, registrados con  $\Delta\lambda$  de 30, 40 y 50 nm. En ella se puede observar que los espectros sincrónicos de FUR, para todos los valores de  $\Delta\lambda$  ensayados, presentan una señal prácticamente constante en el intervalo 280 – 350 nm, sensiblemente inferior a la que muestran el TRI y la orina. El espectro sincrónico de TRI presenta dos máximos perfectamente

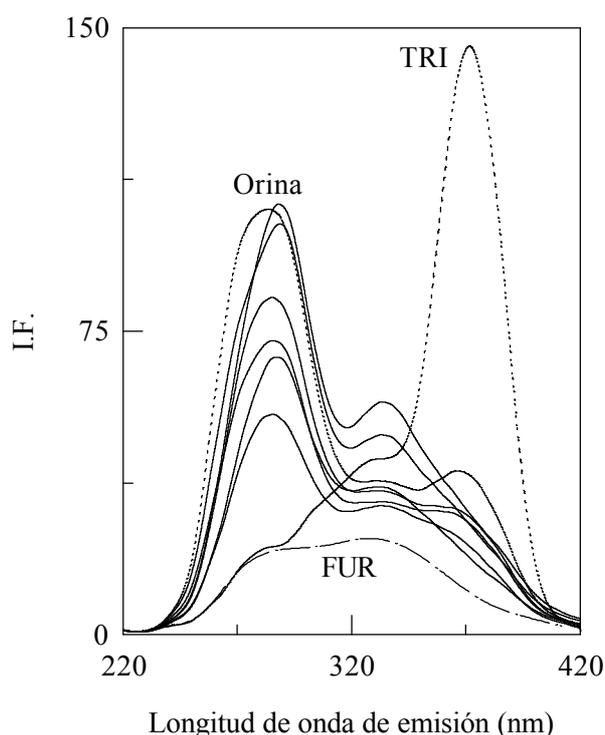
definidos a 280 y 360 nm, estando la intensidad de fluorescencia influenciada por  $\Delta\lambda$ . En cuanto a los espectros de la orina, se observa que presentan un máximo claramente definido, independientemente de valor de  $\Delta\lambda$ , a 280 nm, un hombro a 340 nm, y otro máximo que se perfila a medida que aumenta  $\Delta\lambda$  a 360 nm.



**Figura 5.14:** Espectros de sincrónicos de una disolución de orina, 16,80 mg.l<sup>-1</sup> de FUR y 12,00 mg.l<sup>-1</sup> de TRI en ácido tartárico/tartrato sódico 0,04 M, pH 2,5, para  $\Delta\lambda$ : a) 30, b) 40 y c) 50 nm.

El estudio anterior, variación de la intensidad de fluorescencia con  $\Delta\lambda$ , se repitió con diferentes orinas procedentes de individuos sanos, encontrándose en todos los casos un comportamiento similar, con máximos situados alrededor de 280, 340 y 360 nm. En la Figura 5.15 se muestran los espectros de diferentes orinas y de disoluciones de FUR y TRI cuando  $\Delta\lambda$  es 40 nm; con este  $\Delta\lambda$ , el pico que presentan las orinas a 360 nm, longitud de onda a la que también se encuentra el máximo de TRI, es de menor intensidad.

La escasa sensibilidad que presentan los espectros sincrónicos de las disoluciones de FUR y el amplio solapamiento espectral existente entre su señal y la correspondiente a la orina hacen imposible la determinación de este principio activo en estas condiciones. Por ello, abordaremos aquí únicamente la determinación de TRI en orina.



**Figura 5.14:** Espectros de sincrónicos de disoluciones de orina,  $16,80 \text{ mg.l}^{-1}$  de FUR y  $12,00 \text{ mg.l}^{-1}$  de TRI en ácido tartárico/tartrato sódico  $0,04 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 2,5$ , para  $\Delta\lambda = 40 \text{ nm}$ .

Para llevar a cabo la determinación de TRI en orina, en primer lugar se construyó la matriz de calibración, siguiendo un diseño experimental en 5 niveles para dos analitos ( $5^2$ ), en el que la orina se consideró como un segundo componente. Los límites inferior ( $0,59 \text{ } \mu\text{g. l}^{-1}$ ) y superior ( $5,80 \text{ } \mu\text{g. l}^{-1}$ ) de la matriz se establecieron en función del intervalo de linealidad de TRI y de las concentraciones en las que presumiblemente este fármaco se puede encontrar en la orina, teniendo en cuenta las dosis por la ingesta habitualmente prescrita, la dosis del fármaco que se excreta inalterada<sup>10-13</sup> y el volumen de orina que se excreta bajo la acción de estos diuréticos. Las matrices de validación y predicción se prepararon con concentraciones incluidas en los límites anteriores.

La calibración se realizó aplicando PLS-1 a los espectros sincrónicos registrados con  $\Delta\lambda$  de 30, 40 y 50 nm, estableciéndose todos los modelos posibles con un mínimo de 3 variables entre 310 y 410 nm, y la predicción se llevó a cabo con 1, 2, 3 y 4 *factores*.

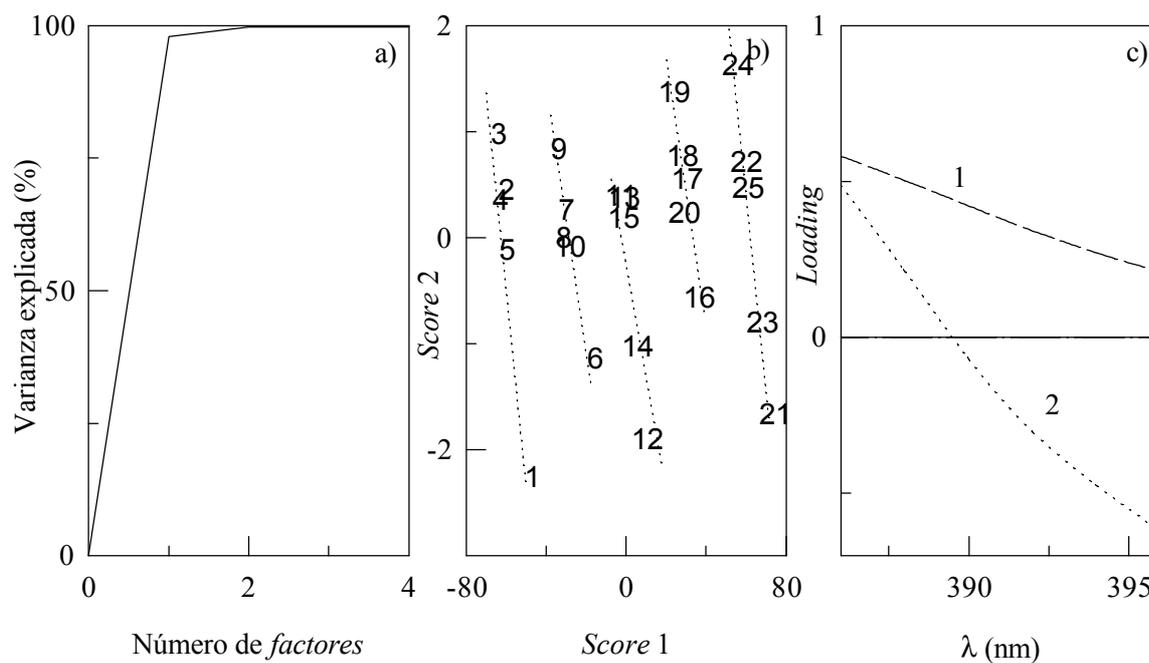
La Tabla 5.5 muestra los valores mínimos de PRESS, parámetro de calidad a minimizar considerado, para los distintos números de *factores* ensayados, así como las longitudes de onda a los que corresponden. Se puede observar que, independientemente del número de *factores* utilizados para realizar la predicción, los intervalos con valores mínimos de

PRESS corresponden a longitudes de onda en las que la señal de la orina es mínima y la de TRI máxima. La aplicación de un test F para encontrar el menor PRESS significativo nos indica que el número de *factores* adecuado para llevar a cabo la determinación de TRI en orina es 2; se señalan en negrita los intervalos de longitudes de onda a los que corresponde el menor PRESS significativo para cada  $\Delta\lambda$ .

**Tabla 5.5**  
PRESS mínimos obtenidos para la determinación de TRI en orina por PLS-1

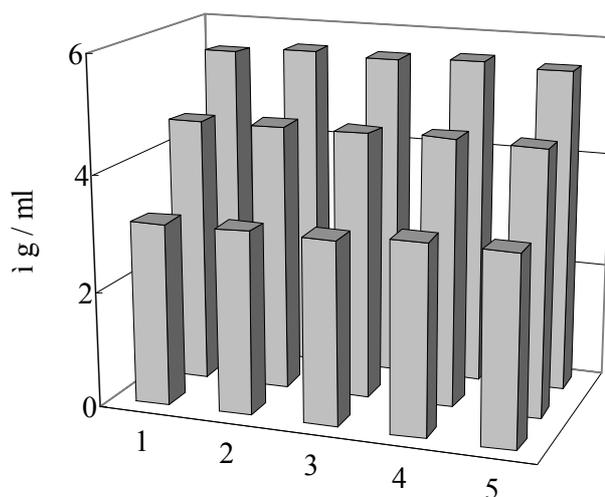
n° <i>factores</i>	$\Delta\lambda = 30$ nm		$\Delta\lambda = 40$ nm		$\Delta\lambda = 50$ nm	
	PRESS	$\lambda$ (nm)	PRESS	$\lambda$ (nm)	PRESS	$\lambda$ (nm)
1	8,93E-1	376-382	8,77E-1	372-378	7,77E-1	368-374
		376-381		372-380		370-376
				372-382		370-378
				374-380		372-378
2	2,88E-1	368-406	2,89E-1	386-394	2,23E-1	<b>390-396</b>
		368-408		<b>386-396</b>		
		368-410				
		<b>372-410</b>				
3	2,85E-1	390-396	2,67E-1	378-396	2,23E-1	388-394
				378-398		
				378-410		
4	2,99E-1	386-392	2,50E-1	356-386	2,38E-1	388-394
		390-396		356-390		

Los resultados obtenidos por los tres  $\Delta\lambda$  son muy similares, eligiéndose el espectro sincrónico con  $\Delta\lambda = 40$  nm para la determinación de TRI, en el intervalo 386 – 396 nm y utilizando 2 *factores*. La Figura 5.16 muestra los parámetros del modelo seleccionado; en la Figura 5.16.(a) se observa que para explicar el 99,8% de la varianza son necesarios dos *factores*, mientras que en la 5.16.(b), *score 2* vs *score 1*, se aprecia que el *score 1* aumenta al hacerlo la concentración de triamtereno, confirmando que el primer factor está asociado a su concentración. La dispersión en el *score 2* de las muestras, se debe a la variabilidad de la orina. Con respecto a los *loadings*, se puede observar su correspondencia con las señales de TRI y de las orinas en el intervalo de longitudes de onda seleccionado, lo que confirma que el primer factor está relacionado con la concentración de TRI y el segundo con la orina.



**Figura 5.16:** Parámetros del modelo seleccionado. a) Varianza explicada; b) Scores, matriz de calibración: (1, 2, 3, 4 y 5)  $0,592 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI; (6, 7, 8, 9 y 10)  $1,89\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI; (11, 12, 13, 14 y 15)  $3,20\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI; (16, 17, 18, 19 y 20)  $4,50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI y (21, 22, 23, 24 y 25)  $5,80 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TRI.

La Figura 5.17 recoge los resultados obtenidos en el análisis de varias muestras de orina, pudiéndose observar que existe una buena concordancia entre las cantidades añadidas y encontradas.



**Figura 5.17:** Resultados obtenidos en la determinación de TRI en orina en tres niveles: 3,2; 4,5 and  $5,4 \mu\text{g l}^{-1}$ .

**Bibliografía**

1. Q.J. Gong, J.L. Qiao, L.M. Du, C. Dong, W.J. Jin., *Talanta*, **53 (2)**, 359, 2000.
2. A. Segura Carretero, M. Martínez Galera; C. Cruces Blanco, M.D. Gil García, A. Fernández Gutiérrez, J.L. Martínez Vidal. *J. AOAC Int.*, **83 (2)**, 391, 2000.
3. J.A. Murillo-Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López., *Anal. Chim. Acta*, **326**, 117, 1996.
4. F. Garcia Sánchez, A. Fernández Gutiérrez, C. Cruces Blanco, *Anal. Chim. Acta*, **306 (2-3)**, 313, 1995.
5. Y. Rao, X.R. Zhang, G.O. Luo, W.R.G. Baeyens, *Anal. Chim. Acta*, **396 (2-3)**, 273, 1999.
6. R.D. Bautista, A.I. Jiménez, F. Jiménez, J.J., Arias, *Clin. Chim. Acta*, **249**, 21, 1996.
7. D.M. Haaland y V. Thomas, *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
8. J.B.F. Lloyd, *Nature*, **64**, 231, 1971.
9. P. John y I. Soutar, *Anal. Chem.*, **520**, 48, 1976.
10. T.B. Vree; M. Van Den Biggelaar-Martea; C.P.W.G.M. Verwey-Van Wissen y A.J.A.M. Van Der Ven., *J. of Applied Therap.*, **1**, 137, 1996.
11. T.B. Vree, M. Van Den Biggelaar-Martea, C.P.W.G.M. Verwey-Van Wissen, A.J.A.M. Van Der Ven, *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 964, 1995.
12. J. L. Sutter y E.P.K. Lau, *Analytical Profiles of Drug Substances* (K. Florey, Ed.), Vol. IV, Academic Press, Nueva York, 1986.
13. E.G.C. Clarke, *Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*, Vol. II, The Pharmaceutical Press, Londres, 1975.

**CAPÍTULO VI**  
**ELECTROFORESIS CAPILAR**

---



En este capítulo se aborda la separación y determinación de algunos de los analitos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral por electroforesis capilar.

Desde el punto de vista farmacológico, entre los analitos estudiados se pueden distinguir dos grandes grupos, un grupo de antihipertensivos pertenecientes a la familia de los diuréticos, y los antiepilépticos. La separación de los diuréticos se ha realizado haciendo uso de la cromatografía micelar electrocinética, y la de los agentes antiepilépticos a través de electroforesis zonal.

### **Introducción**

El término “electroforesis” fue ideado por Michaelis<sup>1</sup> en 1909, basándose en sus estudios sobre la separación de proteínas en función de su punto isoelectrico. En la década de los 50, Kolin<sup>2,3</sup> inicia el estudio desde un enfoque isoelectrico, generando gradientes de pH que eran cortos e inestables en el tiempo. Posteriormente, Versterg<sup>4</sup> propuso una mezcla de anfólitos

capaces de generar gradientes estables de pH, convirtiendo esta técnica en una herramienta de rutina en el análisis bioquímico y biomédico.

A principios de la década de los 70, Dale y Latner<sup>5</sup> describen la electroforesis bidimensional y Macko y Stegemann<sup>6</sup>, por combinación con el enfoque isoelectrico, utilizan la electroforesis en gel de poliacrilamida. Más tarde, Stegemann<sup>7</sup> introduce el enfoque isoelectrico en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS), desarrollado posteriormente por O'Farrell<sup>8</sup>. En términos de resolución, la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es la cuna de las técnicas de alta resolución.

La primera experiencia en el campo de electroforesis capilar fue desarrollada por Arne Tiselius, el cual consiguió la separación de proteínas en disolución libre empleando unos tubos en forma de U cuyo principal problema era el ensanchamiento de las bandas, debido a fenómenos de difusión convectiva originados por el fuerte calentamiento de la reguladora. Con el fin de minimizar la difusión debida al calentamiento Joule, S. Hjertén<sup>10</sup> propuso rotar el tubo. La solución definitiva fue propuesta por Mikkers y col<sup>11</sup> al disminuir su diámetro hasta 200  $\mu\text{m}$ ; finalmente, Jorgeson y col<sup>12</sup> redujeron el diámetro del capilar a 75  $\mu\text{m}$ , consiguiendo eliminar eficazmente el calor generado como consecuencia del fuerte aumento en la relación área/volumen conseguido con estos capilares tan finos que dan nombre a la técnica.

En las separaciones electroforéticas, basadas en la diferencia de movilidad de las sustancias a analizar (solutos) en el interior de un campo eléctrico, el medio de separación es un tampón que actúa simultáneamente conduciendo la corriente eléctrica y controlando la carga de los analitos. Bajo la influencia de un campo eléctrico, la disolución reguladora y los solutos se desplazan a través del capilar originando lo que se denomina *flujo electroosmótico*. El flujo electroosmótico de la disolución reguladora arrastra a los analitos, sumándose sus velocidades de migración individuales. Por tanto, los parámetros más importantes a controlar en electroforesis capilar serán aquellos capaces de modificar el flujo electroosmótico, es decir:

- *Potencial aplicado*. Un aumento del potencial aplicado produce un aumento del flujo electroosmótico y de la velocidad de migración de las sustancias cargadas, reduciendo los tiempos de migración de los analitos y aumentando la eficacia de la separación; si bien no hay que olvidar el inconveniente del calor generado por efecto Joule y el ensanchamiento de los picos que esto produce.

El potencial máximo que puede utilizarse para unas condiciones determinadas se obtiene a partir del punto donde la ley de Ohm pierde la linealidad, potencial que depende de la composición (pH y concentración) de la disolución reguladora y de las dimensiones (longitud y diámetro interno) del capilar.

- *pH y fuerza iónica de la disolución reguladora.* El efecto del pH en la separación puede estudiarse desde el grado de ionización que experimentan la pared del capilar y los solutos.

Un aumento del pH de la disolución reguladora aumenta el flujo electroosmótico, debido principalmente al mayor grado de disociación de los grupos silanol a silanoato en la pared del capilar. La influencia en el grado de disociación de los solutos depende de los valores de las constantes que gobiernan los distintos equilibrios ácido-base que las especies pueden experimentar.

Con respecto a la fuerza iónica, si la concentración de la disolución reguladora no está en exceso sobre la concentración de la muestra, se establecen diferencias de conductividades entre el soluto y la disolución, lo que genera distorsiones del campo eléctrico.

La separación de moléculas neutras puede realizarse por Electroforesis Capilar de Zona, CZE, si hay diferencias apreciables en la viscosidad de los analitos o en el tamaño de las moléculas; sin embargo, cuando estas diferencias son pequeñas CZE no es una buena técnica de separación. En estos casos se recurre a la introducción de micelas<sup>13</sup> en la disolución reguladora donde se lleva a cabo el proceso electroforético, originando la denominada cromatografía micelar electrocinética (MEKC).

MEKC suele realizarse con disoluciones reguladoras de pH elevados que contienen algún surfactante, lo que posibilita la determinación de solutos neutros y cargados en una sola inyección. Los solutos, atendiendo a su hidrofobicidad, experimentan un equilibrio entre la micela y la disolución reguladora que determina su comportamiento electroforético.

## VI.1 Separación y determinación de los diuréticos por cromatografía micelar electrocinética (MEKC)

Como se dijo en la introducción, los diuréticos estudiados han sido furosemida, hidroclorotiazida, clortalidona y triamtereno, siendo muchos y muy variados los métodos propuestos para su determinación. Entre ellos, las técnicas de electroforesis capilar más ampliamente utilizadas para el análisis de estos fármacos han sido la electroforesis capilar de zona (CZE)<sup>14-16</sup> y la cromatografía micelar electrocinética (MECK)<sup>17, 18</sup>.

### *Influencia de la disolución reguladora*

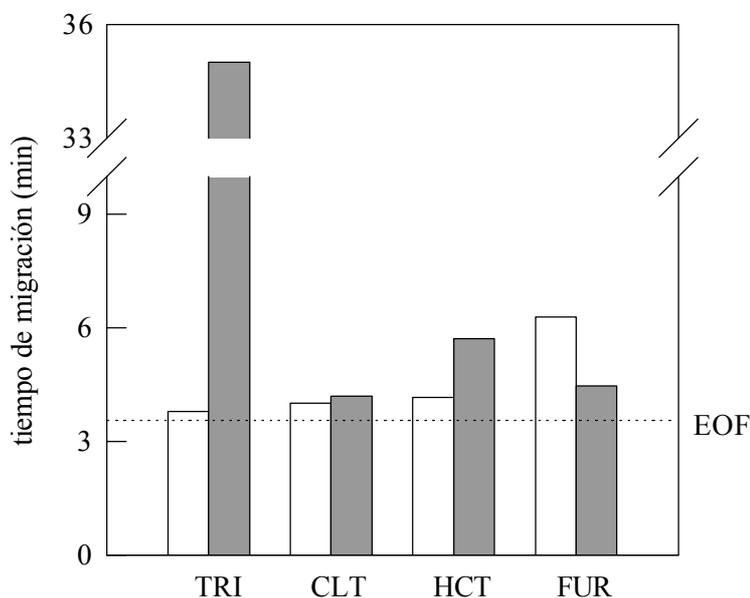
La separación de los diuréticos se intentó inicialmente por CZE. En las separaciones por electroforesis capilar, el control del pH de la disolución reguladora resulta de gran importancia, puesto que determina el grado de ionización y la movilidad de los analitos. Así, teniendo en cuenta la naturaleza de las sustancias a analizar, los valores de pK<sub>a</sub> de los analitos y la bibliografía consultada, se decidió estudiar dicha separación con disoluciones reguladoras de fosfato-borato de pH 9,0 y glicina de pH 10,5. A estos valores de pH los analitos deben encontrarse en forma aniónica o neutra.

	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>
Furosemida	3,9	7,5
Hidroclorotiazida	7,0	9,2
Clortalidona	9,4	-
Triamtereno	6,2	-

Con el fin de optimizar la concentración de la disolución reguladora, se hizo variar ésta en el intervalo comprendido entre 10 y 250 mM, encontrándose que los tiempos de migración de los analitos aumentaban al aumentar la concentración del tampón. Se eligió una concentración 50 mM por proporcionar picos de perfiles adecuados, una resolución elevada y una intensidad de corriente baja.

La Figura 6.1 muestra los tiempos de migración de los analitos con disoluciones reguladoras fosfato-borato (50 mM) y glicina (50 mM). Se puede observar que utilizando la disolución reguladora de fosfato-borato (pH 9,0) TRI, CLT y HCT presentan tiempos de migración similares –muy próximas al flujo electrosmótico (EOF)-, mientras que el tiempo de

migración de FUR es ligeramente superior. Por tanto, la mezcla de estos cuatro analitos originaría un electroferograma con dos picos, uno para TRI, CLT y HCT y otro para FUR.



**Figura 6. 1:** Tiempos de migración de los analitos con disoluciones reguladoras de: (□) fosfato-borato (50 mM, pH 9,0) y (■) glicina (50 mM, pH 10,5)

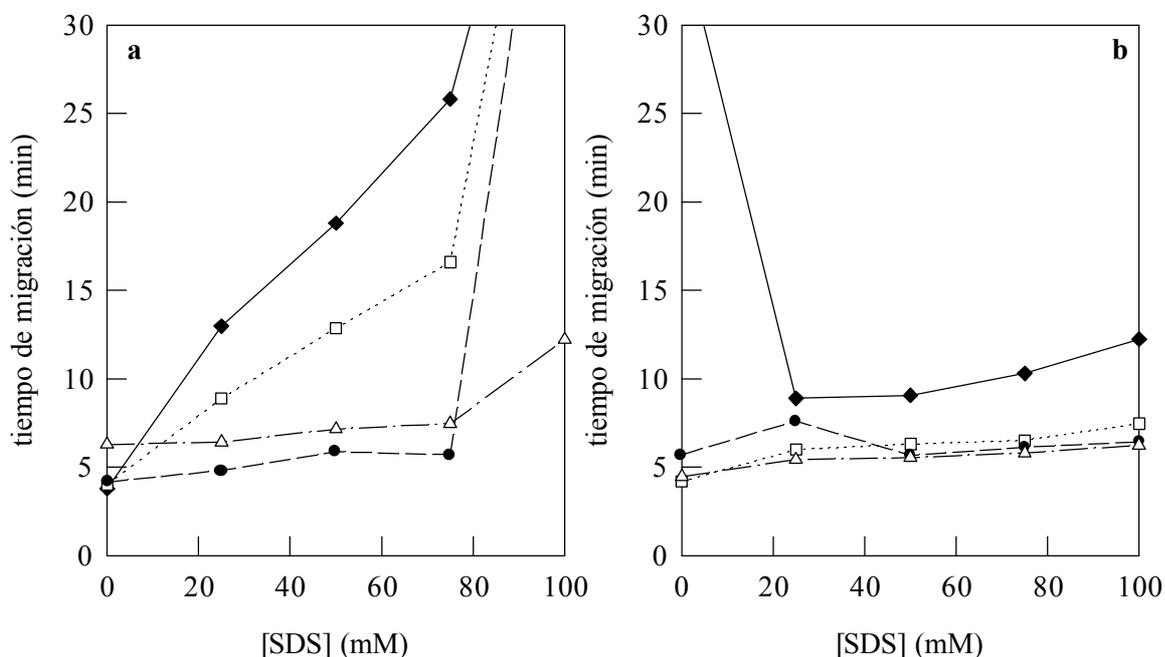
Con disolución reguladora de glicina (pH 10,5), los cuatro analitos se encuentran en forma aniónica, CLT y FUR muestran tiempos de migración similares, mientras que el correspondiente a HCT aumenta ligeramente. El tiempo de migración de TRI es superior a 30 minutos, lo que sugiere la adsorción de este analito en las paredes del capilar o la interacción entre éste y la disolución reguladora, puesto que también se ensayó un capilar recubierto. En estas condiciones, el electroferograma de la mezcla de los analitos presentaría también dos picos, uno correspondiente a CLT y FUR, y otro a HCT. El pico de TRI no aparecería.

Del estudio realizado se puede concluir que la separación de estos cuatro diuréticos por CZE no es posible; por ello, se procedió a estudiar la separación de CLT, FUR, HCT y TRI por MEKC. En esta metodología la disolución reguladora contiene micelas debido a la adición de un agente surfactante. El surfactante elegido fue el dodecilsulfato sódico (SDS); con este surfactante, los analitos cargados negativamente no son fuertemente atraídos por las micelas, y pueden ser separados, como en CZE, en función de su diferente movilidad electroforética, con tiempos de análisis que no son excesivamente altos.

### Influencia de la concentración de SDS

La Figura 6.2 pone de manifiesto la variación del tiempo de migración con la concentración de SDS en las disoluciones reguladoras de fosfato-borato y glicina. En ambos casos, los tiempos de migración para una concentración de SDS igual a cero corresponderían a los obtenidos mediante CZE. Con disolución reguladora de fosfato-borato, Figura 6.2.(a), los tiempos de migración de los analitos aumentan considerablemente cuando lo hace la concentración de SDS debido a la solubilización de los mismos en las micelas. Con disolución reguladora de glicina, Figura 6.2.(b), los tiempos de migración de CLT, FUR y HCT prácticamente no se ven afectados por la concentración de SDS, pero el tiempo de migración de TRI, como consecuencia de la adición del surfactante, alcanza un valor adecuado para la separación. Los tiempos de migración de los diuréticos son mayores con la disolución reguladora de fosfato-borato que con la de glicina.

A la vista de estos resultados, y tratando de que la separación de los analitos se hiciera en el menor tiempo posible, se seleccionó una concentración de SDS de 25 mM.

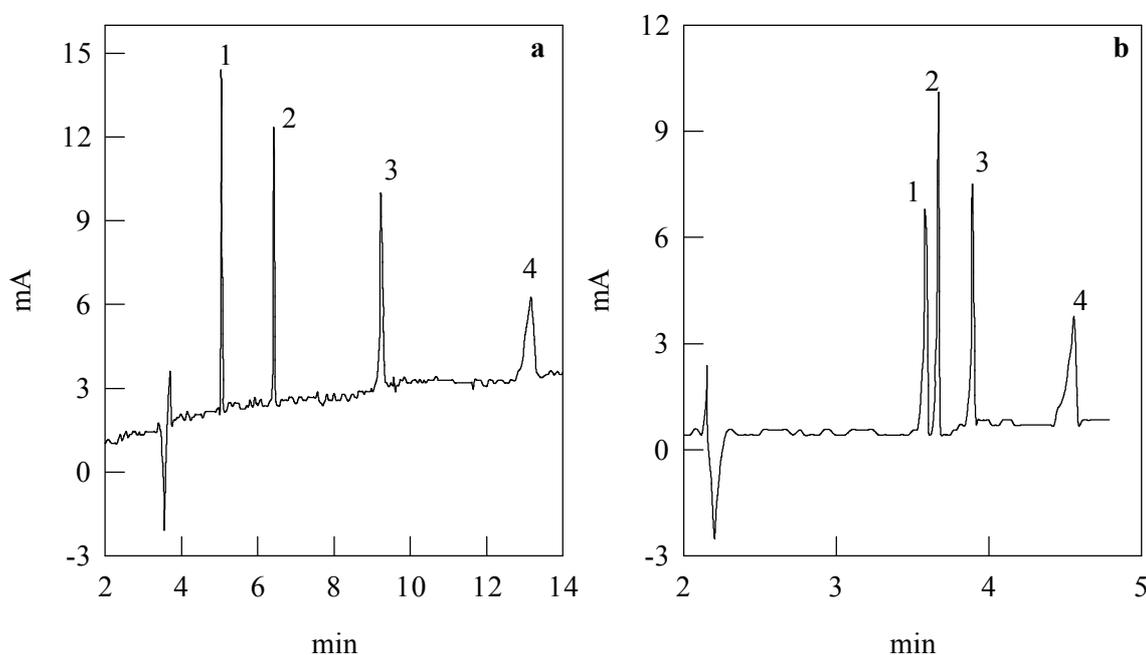


**Figura 6.2:** Variación de los tiempos de migración de los analitos con la concentración de surfactante. a) Disolución reguladora de fosfato-borato (50 mM, pH 9,0), 20 KV, 20° C; b) Disolución reguladora de glicina (50 mM, pH 10,5) con distintas concentraciones de SDS (0, 25, 50, 75 y 100 mM, 25 KV entre 0 y 3,7 minutos y 28 KV hasta el fin, 20° C. CLT (□); FUR (Δ); HCT (●), y TRI (◆).

### *Influencia del potencial aplicado*

Las disoluciones reguladoras fueron estudiadas utilizando distintos voltajes. La representación de la intensidad de corriente observada frente al potencial aplicado para las disoluciones reguladoras de fosfato-borato, ley de Ohm, muestra desviaciones de la linealidad a partir de 20 KV; para la disolución reguladora de glicina, la desviación se produce por encima de 30 KV.

La Figura 6.3 muestran los cromatogramas electrocinéticos obtenidos con disoluciones reguladoras de fosfato-borato y glicina, ambas 25 mM en SDS. En ellas se puede observar una disminución considerable de los tiempos de análisis cuando se utiliza la disolución reguladora de glicina. Debido a que potenciales superiores a 20 KV evitan la adsorción de TRI en las paredes del capilar, y teniendo en cuenta los perfiles de los picos y los tiempos de migración, las condiciones seleccionadas para llevar a cabo la separación de los cuatro diuréticos fueron: disolución reguladora 50 mM de glicina, pH 10,5, 25 mM SDS, temperatura de 20°C y potenciales de 25 KV entre 0 y 3,7 minutos y 28 KV hasta el final.



**Figura 6.3:** Electroferograma de una mezcla de (1) FUR, (2) CLT, (3) HCT y (4) TRI. a) Condiciones de la Figura 6.2.(a) y 25 mM SDS; b) Condiciones de la Figura 6.2.(b) y 25 mM SDS. Detección espectrofotométrica a 230 nm.

**Parámetros analíticos**

En la Tabla 6.1 se recogen los parámetros analíticos de la separación de los diuréticos mediante MECK. Como se puede observar, las reproducibilidades en los tiempos de migración y en las áreas corregidas del método propuesto, obtenidas a partir de 5 inyecciones, son satisfactorias. Las desviaciones estándar relativas encontradas para los tiempos de migración se encontraban en torno al 1 %, y para las áreas corregidas en la mitad del rango de calibración entre el 1,2 y 5,3 %.

Los límites de detección (LOD) se obtuvieron inyectando cinco blancos, midiendo la amplitud de las señales utilizando la máxima sensibilidad proporcionada por el sistema, y calculando su desviación estándar. LOD de los distintos analitos se estimaron multiplicando la desviación estándar del blanco por un factor de tres, y en todos los casos se obtuvieron valores inferiores a 1,2 mg.l<sup>-1</sup>.

**Tabla 6. 1**  
Características analíticas del método propuesto

	Tiempo de migración % RSD (n=5)	Áreas corregidas <sup>a</sup> %RSD (n=5)	LOD <sup>b</sup>
CLT	1,01	1,57	1,08
FUR	1,21	1,18	0,52
HCT	1,24	5,25	0,85
TRI	1,57	2,57	1,20

<sup>a</sup>RSD: desviación estándar relativa (para la mitad de la curva de calibración).

<sup>b</sup>LOD: límite de detección calculado para una relación señal/ruido igual a tres.

Los parámetros más representativos de las curvas de calibrado obtenidas inyectando, por triplicado, cinco disoluciones estándar de los analitos en los rangos 13,99 - 20,85 µg· ml<sup>-1</sup> para FUR, 18,05 – 31,10 µg· ml<sup>-1</sup> para CLT, 19,80 – 29,92 µg· ml<sup>-1</sup> para HCT y 9,00 – 12,00 µg· ml<sup>-1</sup> para TRI se recogen en la Tabla 6.2, donde se puede observar un buen ajuste para cada uno de los fármacos analizados. La linealidad del ajuste se verificó con dos pruebas estadísticas (test de Fisher y test lack-of-fit). Para el test de Fisher, los valores de F obtenidos fueron siempre superiores al valor tabulado (α=0,01), quedando por tanto demostrada la linealidad; para el test lack-of-fit, los valores calculados fueron inferiores a los tabulados (α=0,01), y en consecuencia la hipótesis nula aceptada.

**Tabla 6. 2**  
Parámetros de la regresión ( $y = b_0 + b_1x$ )

	$b_0 \times 10^2$	$b_1 \times 10^2$	r
Clortalidona	$2,46 \pm 3,55$	$1,19 \times 10^{-1} \pm 2,46 \times 10^{-2}$	0,995
Furosemida	$-2,11 \pm 1,54$	$4,55 \times 10^{-2} \pm 1,02 \times 10^{-1}$	0,996
Hidroclorotiazida	$-3,22 \times 10^{-2} \pm 2,83 \times 10^{-1}$	$1,58 \times 10^{-1} \pm 1,18 \times 10^{-2}$	0,987
Triamtereno	$-2,83 \pm 1,10$	$6,55 \times 10^{-1} \pm 1,01 \times 10^{-1}$	0,996

### *Determinación de diuréticos en preparados farmacéuticos*

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del método desarrollado para la determinación de diuréticos, éste se aplicó a distintos medicamentos que contenían los fármacos objeto de estudio. Los analitos se identificaron por comparación de los tiempos de migración y de los espectros con los correspondientes a los estándar. La cantidad de cada diurético en el preparado comercial que lo contenía fue determinada inyectando por triplicado tres muestras de disoluciones del fármaco, preparadas como se indica en la parte experimental.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando las curvas de calibrado y las áreas de los picos se corrigieron con el tiempo de migración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.3, donde se observan resultados reproducibles y errores inferiores al 2 % para CLT, FUR y HCT respecto al contenido declarado. El error más alto se obtiene en la determinación de TRI, y probablemente está relacionado con la irregularidad de su pico.

**Tabla 6. 3**  
Resultados del análisis en preparados farmacéuticos.

mg encontrados			
CLT <sup>a</sup>	FUR <sup>b</sup>	HCT <sup>c</sup>	TRI <sup>d</sup>
$48 \pm 2$	$40,2 \pm 0,5$	$10 \pm 1$	$22 \pm 1$
$49 \pm 4$	$40 \pm 1$	$9 \pm 2$	$24 \pm 1$
$52 \pm 2$	$42,6 \pm 0,7$	$10 \pm 2$	$22,9 \pm 0,2$
$50 \pm 2$	$41 \pm 2$	$9,8 \pm 0,4$	$23 \pm 1$

<sup>a</sup> 50 mg declarados en "Aldoleo". <sup>b</sup> 40 mg and <sup>d</sup> 25 mg declarados en "Salidur". <sup>c</sup> 10 mg declarados en "Adelfán-Esidrex".

Para verificar la precisión del método se realizó un estudio de recuperaciones. Para ello, se añadieron cantidades conocidas de cada diurético a las distintas muestras de los fármacos, y las disoluciones obtenidas se sometieron al proceso analítico descrito anteriormente. Cada una de las muestras de los medicamentos fue enriquecida con tres cantidades diferentes de las disoluciones patrón de cada uno de los analitos estudiados (niveles bajo, medio y alto), y las recuperaciones se calcularon teniendo en cuenta las cantidades añadidas y las encontradas, una vez restada la señal correspondiente al medicamento. Los análisis se hicieron por triplicado, y las recuperaciones medias obtenidas, que oscilaron entre el 97 y el 100 %, Tabla 6.4, ponen de manifiesto la precisión del método. La reproducibilidad (entre días) fue inferior al 4 % para todas las muestras analizadas.

**Tabla 6.4**  
Recuperaciones de diuréticos en preparados farmacéuticos

Analito	Recuperación media $\pm$ RSD <sup>a</sup>
Clortalidona	97 $\pm$ 3
Furosemida	100 $\pm$ 2
Hidroclorotiazida	98 $\pm$ 4
Triamtereno	99 $\pm$ 3

<sup>a</sup> valor medio de tres determinaciones

## VI. 2. Separación y determinación de antiepilépticos por electroforesis capilar (CZE)

En este apartado se estudia la separación y determinación de dos agentes antiepilépticos, la fenitoína (DPH) y el fenobarbital (PB), haciendo uso de la electroforesis capilar -ver estructuras en el capítulo I-.

### *Elección de las condiciones de separación*

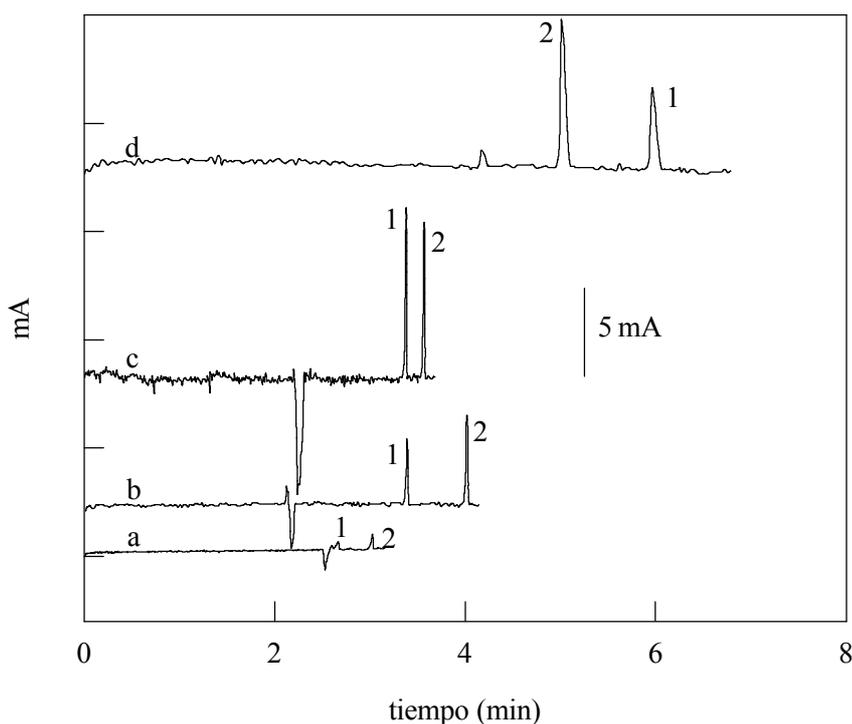
En primer lugar, debido a la importancia de que los analitos se encuentren en forma iónica, se procedió a la selección del pH adecuado. Además, el pH afecta a la magnitud del flujo electroosmótico (EOF), ya que éste depende directamente del grado de ionización de la disolución reguladora que se encuentre en el interior del capilar. Para la separación de aniones (y cationes) por CZE en un tiempo de análisis razonable, cuando se utiliza una polaridad positiva, es necesario forzar el EOF hacia el detector, con una velocidad que exceda los tiempos de migración individuales de dichos aniones. Para el análisis de aniones también es posible invertir la polaridad, de tal manera que el vial de destino sea el ánodo, los aniones pasan por el detector exclusivamente por atracción electrostática, puesto que se suprime el flujo electroosmótico.

En este caso se ensayaron tres disoluciones reguladoras, disolución de (Tris(hidroximetil)aminometano) - (Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico) (Tris-Mes), fosfato-borato y glicina, con valores de pH de 7,0, 9,0 y 10,5, respectivamente, utilizando distintos voltajes de separación. Los valores de  $pK_a$  son 7,3 y 11,8 para DPH y 8,3 para PB, por lo que cabe esperar que con la primera disolución reguladora los analitos se encuentren en su forma neutra, aumentando el grado de disociación -y por tanto la movilidad electroforética- a medida que aumenta el pH de la disolución reguladora utilizada.

Con respecto a los potenciales aplicados, las representaciones de la intensidad de corriente que circula por el capilar frente al potencial aplicado, para cada una de las disoluciones reguladoras, muestran desviaciones de la linealidad entorno a 20 KV para la disolución reguladora de fosfato-borato y entre 25 y 30 KV para las disoluciones reguladoras de Tris-Mes y glicina.

Se estudió la separación con las distintas disoluciones reguladoras, y en el caso de la disolución de glicina de pH 10,5 se realizó la separación con las dos polaridades posibles. La Figura 6.4 muestra los electroferogramas de DPH y PB para las separaciones realizadas utilizando los potenciales máximos aconsejados para cada una de las disoluciones reguladoras.

Se puede observar que los mejores perfiles de picos se obtienen con las disoluciones reguladoras de fosfato-borato y glicina, y que, salvo en el caso de la separación con disolución reguladora de glicina y polaridad negativa, los tiempos de migración son inferiores a 4 minutos. En la Tabla 6.5 se pone de manifiesto que la separación de máxima eficacia (mayor número de platos teóricos) es la obtenida utilizando la disolución reguladora 50 mM de glicina de pH 10,5 y polaridad positiva.



**Figura 6.4:** Electroferograma de una mezcla de fenitoína (1) y fenobarbital (2) con diferentes disoluciones reguladoras: a) TRIS-Mes (50 mM pH 7,0, 25 KV), b) fosfato-borato (50 mM pH 9,0, 20 KV), c) glicina (50 mM pH 10,5, 25 KV, polaridad positiva), d) glicina (50 mM pH 10,5, 25 KV, polaridad negativa). Temperatura del capilar, 20° C. Detección espectrofotométrica a 230 nm.

**Tabla 6.5**

Efecto de la disolución reguladora y polaridad en la eficacia de la separación

Disolución reguladora	$N_{DPH}$	$N_{PB}$
TRIS-MES, pH 7,0	$5,1 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$
Fosfato-borato, pH 9,0	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Glicina, pH 10,5 (polaridad positiva)	$1,9 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
Glicina, pH 10,5 (polaridad negativa)	$4,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$

N= número de platos teóricos

**Parámetros analíticos**

La Tabla 6.6 muestra las reproducibilidades en los tiempos de migración y las áreas corregidas del método propuesto cuando se inyectan 6 muestras de los analitos en las condiciones previamente seleccionadas, es decir, temperatura de análisis de 20 °C, potencial aplicado 25 KV y disolución reguladora 50 mM de glicina, pH 10,5 (polaridad positiva). En ella se puede observar que las desviaciones estándar relativas en los tiempos de migración son inferiores al 1,5 %, y las correspondientes a las áreas corregidas se encuentran entre el 4,6 para DPH y 6,9 % para PB.

**Tabla 6. 6**  
Parámetros característicos del método propuesto

	Tiempo de migración (min)	Tiempo de migración RSD % (n=11)	Área de pico RSD% (n=6)
Fenitoína	3,35	1,34	4,58
Fenobarbital	3,54	1,43	6,88

RSD = desviación estándar relativa.

Con objeto de comprobar la exactitud y precisión del método propuesto se prepararon dos series de tres muestras con concentraciones de los analitos situadas en el punto medio del calibrado que se midieron en las condiciones de separación seleccionadas, y se aplicó un análisis de varianza. Los valores de F obtenidos fueron 1,03 y 7,49 para DPH y PB, respectivamente, inferiores en ambos casos al valor crítico tabulado, 7,71.

Para obtener las curvas de calibrado de los analitos, se prepararon 5 mezclas de los mismos con concentraciones comprendidas entre el 80 y 120 % del valor nominal de los fármacos en sus respectivos medicamentos, que fueron inyectados por triplicado. Las áreas obtenidas fueron corregidas con el tiempo de migración.

En la Tabla 6.7 se recogen los parámetros de la regresión correspondientes a la determinación de DHP y PB. Se observa que en ambos casos los coeficientes de regresión lineal son superiores a 0,999. Como en el caso de la determinación de los diuréticos, se llevaron a cabo los test de Fischer y lack-of-fit que pusieron de manifiesto la linealidad del ajuste.

El límite de detección, obtenido como se explicó anteriormente multiplicando por un factor de tres la relación señal/ruido, fue de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> para ambos antiepilépticos.

**Tabla 6. 7**  
Parámetros de la regresión ( $y = b_0 + b_1x$ )

	$b_0^a$	$b_1$	r	LOD <sup>b</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )
Fenitoína	0	$1,59 \pm 4,06 \times 10^{-2}$	0,9997	0,1
Fenobarbital	0	$1,48 \pm 3,38 \times 10^{-2}$	0,9997	0,1

<sup>a</sup>se acepta la hipótesis nula de ordenada en el origen igual a cero.

<sup>b</sup>LOD = límite de detección.

### ***Determinación de antiepilépticos en preparados farmacéuticos***

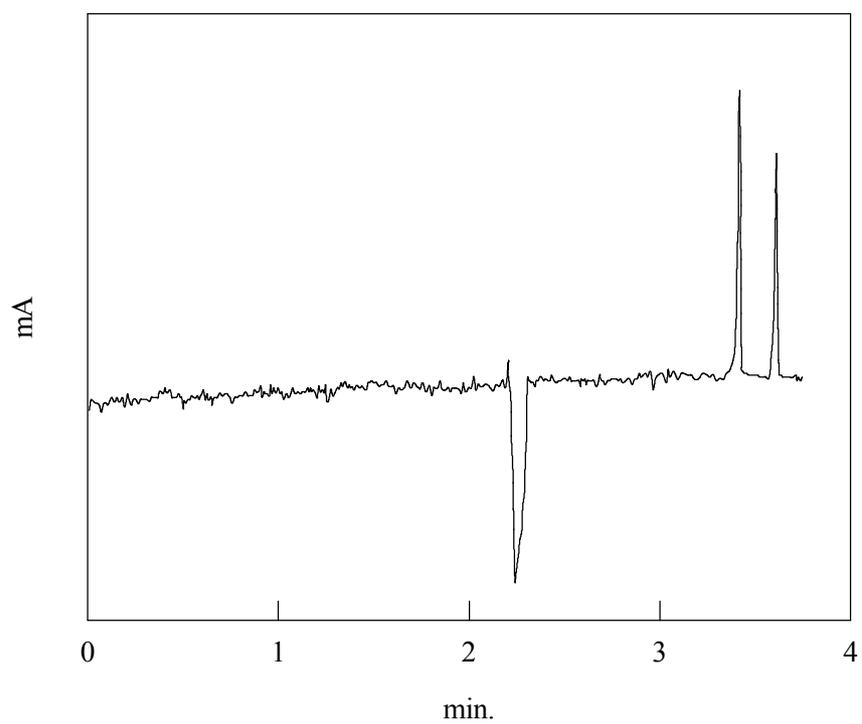
El método desarrollado se aplicó a la determinación de DHP y PB en el preparado farmacéutico “Epilantín”. En la Figura 6.5, electroferograma de una disolución de “Epilantín”, se pueden apreciar los dos picos correspondientes a los antiepilépticos en estudio, y los resultados se muestran en la Tabla 6.8, en la que se puede observar que la diferencia entre la cantidad declarada y la encontrada es inferior al 10 %, estando, por tanto, dentro de los límites permitidos por la farmacopea en cuanto a uniformidad de contenido en los preparados farmacéuticos.

Para verificar la exactitud del método, como en el caso anterior se llevó a cabo un estudio de recuperaciones, realizándose los análisis por triplicado, y obteniéndose recuperaciones medias entre el 100 y el 108 %.

**Tabla 6. 8**  
Resultados de la determinación de fenitoína y fenobarbital en “Epilantín”

	Cantidad encontrada <sup>a</sup> (mg)	Cantidad declarada (mg)
Fenitoína	$104 \pm 2$	100
Fenobarbital	$45 \pm 1$	50

<sup>a</sup> valor medio de tres determinaciones



**Figura 6.5:** Electroferograma del preparado farmacéutico Epilantín en las condiciones seleccionadas (Fig. 6.4.(c)).

**Bibliografía**

1. L. Michaelis, *Biochem. Z.*, **16**, 81, 1909.
2. A. Kolin, *J. Chem. Phys.*, 1628, 1954.
3. A. Kolin, *J. Phys.*, **22**, 2099, 1954.
4. O. Versterg, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2653, 1969.
5. G. Dale y A.L. Latner, *Clin. Chim. Acta*, **24**, 61, 1969.
6. V. Macko y H. Stegemann, *Physiol. Chem.*, **350**, 917, 1969.
7. H. Stegemann, *Angew. Chem.*, **9**, 643, 1970.
8. P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007, 1975.
9. A. Tiselius, *Trans. Faraday. Soc.*, **33**, 524, 1937.
10. S. Hjertén., *Chromatogr. Rev.*, **9**, 122, 1967.
11. F.E.P. Mikkers, F. M. Everaets, y Th. P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169**, 11, 1979.
12. J. W. Jorgeson y K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, 1298, 1981.
13. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56**, 111, 1984.
14. J. L. Sutter y E.P.K. Lau, *Analytical Profiles of Drug Substances* (K. Florey, Ed.), Vol. IV, Academic Press, Nueva York, 1986.
15. E.G.C. Clarke, *Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*, Vol. II, The Pharmaceutical Press, Londres, 1975.
16. E. Bonet-Domingo; J.R. Torres-Lapasió; M.J. Medina-Hernández; M.C. García-Alvarez-Coque, *Anal. Chim. Acta*, **287**, 201, 1994.
17. M.L. Riekkola, J.H. Jumppasen, *J. Chromatogr. A*, **735 (1-2)**, 151, 1996.
18. J.H. Jumppasen y M.L. Riekkola, *J. Microcolumn Sep.*, **6 (6)**, 595, 1994.
19. Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A.*, **807**, 27, 1998.
20. F. Guam, H. Wu, Y. Luo, *Anal. Chim. Acta.*, **342**, 133, 1997.

---

**EXPERIMENTAL**



## **E.1 APARATOS**

- Todos los espectros de absorción referidos en esta memoria fueron registrados en un espectrofotómetro de diodos en fila Hewlett-Packard HP 8452A controlado por un ordenador Vectra ES, conectado a una impresora Think Jet, ambos de la misma marca. En los distintos ensayos se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 4 ml de volumen interno.
- Todos los espectros de fluorescencia fueron registrados en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50 con lámpara de arco de Xenon, controlado por un ordenador ATAI0 386 SX 16 Mhz e impresora Epson FX-850. En los distintos ensayos se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 4 ml de volumen interno.
- Los ensayos cromatográficos fueron realizados en un cromatógrafo de líquidos Watters modelo 600E, con volumen de loop de 20  $\mu$ l y detector de diodos en fila, Watters 996, controlados ambos por un ordenador NEC Power Mate 433. Las determinaciones se realizaron en todos los casos con una columna Nova-Pack C<sub>18</sub> (3,9×150 mm) con relleno de

tamaño de partícula de 4µm.

- Las separaciones por electroforesis se realizaron en todos los casos con un equipo de electroforesis Hewlett-Packard, con detector de diodos en fila, y con capilar de sílice de 48,5 cm × 50 µm d.i., 40,0 cm de longitud efectiva.
- Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro digital Crison equipado con electrodo doble de vidrio-calomelanos saturado.
- Baño de ultrasonidos Ultrasonic Selecta.
- Termostato Lauda MS6.
- Balanza AND ER-182.

## **E.2 PROGRAMAS**

- *Detarchi* (L. Sarabia y M.C. Ortiz, Colegio Universitario de Burgos, 1993) para el cálculo del límite de detección.
- *Millennium* (versión 2. 10, Millipore Coporation, E.E.U.U., 1993) para el control del sistema cromatográfico.
- *MS-DOS-UV-Visible HP 8452A*; para el control del espectrofotómetro HP 8452A. Utilizado tanto para la obtención de los espectros de absorbancia, como de los espectros derivados.
- *Quattro Pro* (versión 5. 00, Borland International Inc., Francia, 1993), utilizado como hoja de cálculo para la obtención de los RSE, RMSE, PRESS y demás cálculos numéricos.
- *UNSCRAMBLER II*(versión 5.0, Computer-Aided Modelling A/S, Trondheim, Noruega, 1993), programa utilizado para la calibración en mínimos cuadrados parciales.
- *FLDM*, software que controla el funcionamiento del espectrofluorímetro, utilizado para registrar los espectros de excitación y emisión.

### E.3 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados durante el desarrollo experimental fueron adquiridos a diferentes firmas comerciales de reconocido nivel analítico. Para la preparación de las disoluciones y la limpieza del material de laboratorio, se empleó agua destilada, posteriormente tratada en un sistema Milli-Q de Millipore. Las disoluciones de menor concentración se obtuvieron por dilución adecuada de las disoluciones madre.

- ***Dihidralazina***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), dilución y aforo a 100 ml con agua destilada.
- ***Hidroclorotiazida***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), y posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico (Panreac). Las disoluciones acuosas de hidroclorotiazida también fueron preparadas por pesada directa de la misma, siendo necesarios 10 minutos de agitación en baño de ultrasonidos para conseguir su disolución.
- ***Reserpina***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), y posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico (Panreac), después de 10 minutos de agitación en baño de ultrasonidos para conseguir la disolución; las disoluciones se conservaron protegidas de la luz.
- ***Clortalidona***. Disolución estándar de 150 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), y posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico (Panreac), una vez disuelto el producto tras 10 minutos de agitación en baño de ultrasonidos.
- ***Espironolactona***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), con posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico (Panreac), siendo necesarios 10 minutos de agitación en baño de ultrasonidos para conseguir la disolución.
- ***Furosemida***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), con posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico (Panreac), que se guardaba en la nevera durante una semana. Esta disolución se diluía diariamente hasta obtener el nivel de concentraciones deseado.
- ***Triamtereno***. Disolución de 100 mg.l<sup>-1</sup> preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), con posterior dilución y aforo a 100 ml con alcohol etílico

(Panreac), siendo necesarios 15 minutos de agitación en baño de ultrasonidos para conseguir la disolución. La disolución se guardaba en la nevera durante una semana. A partir de esta disolución se preparaban diariamente disoluciones diluidas con el nivel de concentraciones necesario.

- **Fenitoína.** Disolución de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), dilución y aforo a 100 ml con agua destilada tras agitar durante 30 minutos en baño de ultrasonidos para conseguir la disolución.
- **Fenobarbital.** Disolución de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  preparada por pesada directa de su producto comercial puro (SIGMA), dilución y aforo a 100 ml con agua destilada, una vez disuelto el producto por agitación durante 30 minutos en baño de ultrasonidos.
  
- **Disoluciones reguladoras:**
  - *Ácido acético/acetato sódico* (Merck), de pH 5,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$ .
  - *Ácido cítrico/citrato sódico* (Merck), de pH 5,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$ .
  - *Ácido tartárico/tartrato sódico* (Merck), de pH 5,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$  y de pH 2,50 y  $C_T = 0,2 \text{ M}$ .
  - *Ácido bórico/borato sódico* (Panreac), de pH 10,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$ .
  - *Cloruro amónico/amoníaco*, de pH 10,0 y  $C_T = 0,2 \text{ M}$  y  $0,5 \text{ M}$ .
  - *Fosfato sódico/fosfato disódico* (Merck), de pH 6,0-8,0 y  $C_T = 0,01 \text{ M}$ , y de pH 9,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$ .
  - *TRIS* (Tris(hidroximetil)aminometano)/*Ácido clorhídrico* (Merck), de pH 7,0 y  $C_T = 0,01 \text{ M}$ .
  - *TRIS* (Tris(hidroximetil)aminometano) (Merck)-*MES* (*Ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico*) (Sigma), de pH 9,0 y  $C_T = 0,5 \text{ M}$ .
  
- **Otras disoluciones:**
  - *Glicina* (Sigma)  $0,35 \text{ M}$ .
  - *Ácido bórico* (Panreac)  $0,5 \text{ M}$ .

## **E.4 PROCEDIMIENTO**

### **E.4.1. Determinaciones espectrofotométricas**

#### ***Espectros de absorción***

Los espectros de absorción en la región UV de los distintos fármacos determinados tanto en mezclas binarias como ternarias se obtuvieron a partir de disoluciones preparadas en matraces aforados de 25 ml, que contenían cantidades variables de las disoluciones *madre*, el volumen de ácido, base o disolución reguladora necesario para alcanzar el valor de pH más adecuado para el estudio de cada mezcla, un volumen de alcohol etílico tal que en las disoluciones finales el porcentaje fuera del 20% (v/v), y agua destilada hasta el enrase.

Las disoluciones así preparadas se registraban entre 190 y 420 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin analito.

#### ***Influencia del pH y de la disolución reguladora***

Para obtener los espectros en función del pH se prepararon las disoluciones siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior, añadiendo gotas de ácido clorhídrico o de disolución de hidróxido sódico hasta conseguir el pH deseado, en el caso del estudio de la influencia del pH. Para el estudio de la influencia de la disolución reguladora, se añadían 2,5 o 5,0 ml de la disolución reguladora ensayada.

#### ***Influencia del porcentaje de etanol***

A disoluciones preparadas de la misma forma que apartados precedentes, se les hizo variar el porcentaje de etanol, por adición de distintos volúmenes de éste, de manera que las disoluciones finales tuvieran un contenido alcohólico entre el 20 y el 80 %.

#### **a. Dihidralazina – Hidroclorotiazida**

##### ***Determinación simultánea en mezclas sintéticas***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 2,5 ml de ácido clorhídrico 1 N, los volúmenes necesarios de las disoluciones de dihidralazina e hidroclorotiazida de manera que las concentraciones finales se encontraran en el intervalo 2 - 20 mg.l<sup>-1</sup>, y el etanol necesario para

obtener disoluciones al 20 % (v/v). Las disoluciones se aforaron con agua destilada y se registraron los espectros de absorción entre 200 y 400 nm. Las disoluciones así obtenidas se registraron frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin analito.

### ***Determinación en preparados farmacéuticos por espectrofotometría y HPLC***

Para la determinación de dihidralazina e hidroclorotiazida en el preparado farmacéutico “Adelfán-Esidrex” se pesaron, pulverizaron y homogeneizaron diez comprimidos de los cuales se tomaron doce muestras, de 25 mg cada una. Los fármacos objeto de estudio fueron extraídos con 100 ml de una disolución acuotética al 60 % (v/v) en baño de ultrasonidos durante 40 minutos. Pasado este tiempo se deja enfriar, se filtra, se toman 2 ml del filtrado que se llevan a un matraz de 25 ml donde se han añadido 2,5 ml de HCl 1 N, etanol hasta completar el 20 % y se afora. Esta operación se realiza por triplicado. A continuación se procede al registro de dicha disolución de la forma anteriormente descrita.

Para la determinación por HPLC, se toman 2 ml del filtrado anterior que se llevan a un matraz de 10 ml, y se afora. Estas disoluciones se filtran a través de una membrana de polipropileno de 0,4  $\mu$ m de tamaño de poro antes de ser inyectadas por triplicado en el cromatógrafo, utilizando una columna NovaPack C<sub>18</sub> (3,9 × 150 mm), y una mezcla 80:20 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH = 3,5):metanol, con un flujo de 1 ml/min como fase móvil. La detección se realizó espectrofotométricamente midiendo las áreas de los cromatogramas obtenidos a 217 para dihidralazina y 238 nm para hidroclorotiazida.

### **b. Clortalidona-Espironolactona**

#### ***Determinación simultánea en mezclas sintéticas***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 5 ml de reguladora de NH<sub>4</sub>Cl/NH<sub>3</sub> (0,2 M y pH 10,0), volúmenes adecuados de disoluciones de clortalidona y espironolactona para que su concentración final estuviera en los intervalos comprendidos entre 1 y 30 mg.l<sup>-1</sup> y 3 y 30 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, y el etanol necesario para obtener disoluciones al 20% (v/v). Las disoluciones se aforaron con agua destilada y se registraron los espectros de absorción entre 200 y 350 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin analito.

### ***Determinación en preparados farmacéuticos por espectrofotometría y HPLC***

Para la determinación de clortalidona y espironolactona en los preparados farmacéuticos “Aldoleo” y “Resnedal” se pesaron, pulverizaron y homogeneizaron diez comprimidos de los cuales se tomaron doce muestras, de 15 mg cada una. A continuación, los fármacos objeto de estudio fueron extraídos con 100 ml de una disolución acuoetanólica al 60 % (v/v) en baño de ultrasonidos durante 40 minutos, y a partir de ella se prepararon disoluciones como se describe en el apartado anterior en el caso de la determinación espectrofotométrica.

Para la determinación por HPLC, las disoluciones anteriores se filtran a través de una membrana de polipropileno de 0,4  $\mu$ m de tamaño de poro antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. Estas determinaciones se realizaron con una columna NovaPack C<sub>18</sub> (3,9  $\times$  150 mm) utilizando como fase móvil una mezcla metanol/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM pH 6,00) (5:2); el flujo se mantuvo en 1ml/min. La detección se realizó espectrofotométricamente midiendo las áreas de los cromatogramas obtenidos a 207 y 238 nm para clortalidona y espironolactona, respectivamente.

### **c. Fenitoína - Fenobarbital**

#### ***Determinación simultánea en mezclas sintéticas***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 5 ml de reguladora de NH<sub>4</sub>Cl/NH<sub>3</sub> (0,2 M y pH 10,0), volúmenes de disoluciones de fenitoína y fenobarbital adecuados para que su concentración final estuviera en los intervalos comprendidos entre 3 y 9 mg.l<sup>-1</sup>, y 2 y 8 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, y el etanol necesario para obtener disoluciones al 20% (v/v). Las disoluciones se aforaron con agua destilada y se registraron los espectros de absorción entre 200 y 300 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin analito.

#### ***Determinación en preparados farmacéuticos por espectrofotometría y HPLC***

Para la determinación de fenitoína y fenobarbital en el preparado farmacéutico “Epilantín” se pesaron, pulverizaron y homogeneizaron diez comprimidos de los cuales se tomaron seis muestras, de 40 mg cada una. Posteriormente, los fármacos objeto de estudio fueron extraídos con 100 ml de etanol en baño de ultrasonidos durante 20 minutos, diluyendo posteriormente a 250 ml con agua destilada. De esta disolución se toman 3 ml, procediéndose posteriormente como se describe en el apartado anterior.

Las disoluciones de los fármacos así obtenidas se filtran a través de una membrana de polipropileno de 0,4 µm de tamaño de poro antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. Las determinaciones por HPLC se realizaron con una columna NovaPack C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm) utilizando como fase móvil una mezcla metanol/TRIS (10 mM pH 7.0) (60:40); el flujo se mantuvo en 1ml/min. La detección se realizó espectrofotométricamente midiendo las áreas de los cromatogramas obtenidos a 254 nm

**d. Dihidralazina - Hidroclorotiazida – Reserpina**

En matraces aforados de 25 ml se añaden 2,5 ml de ácido clorhídrico 1N, volúmenes de las disoluciones de dihidralazina, hidroclorotiazida y reserpina de forma que su concentración final se encuentre en los intervalos 3 - 8 mg.l<sup>-1</sup>, 3 - 12 mg.l<sup>-1</sup> y 3 - 10 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, y etanol hasta obtener mezclas al 20 % (v/v). Las disoluciones se aforan con agua destilada y se registran sus espectros de absorción entre 200 y 400 nm frente a un blanco preparado de la misma manera.

**e. Clortalidona - Espironolactona - Reserpina**

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 5 ml de reguladora de NH<sub>4</sub>Cl/NH<sub>3</sub> (0,2 M y pH 10,0), el etanol necesario para obtener disoluciones al 20 % (v/v) y volúmenes adecuados de las disoluciones de clortalidona y espironolactona para que su concentración final estuviera en los intervalos 6 - 10 mg.l<sup>-1</sup> y 2 - 9 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, y reserpina entre 2 y 9 mg.l<sup>-1</sup> en el caso de la determinación de la mezcla ternaria, o entre 0 y 62 µg.l<sup>-1</sup> en el caso de la determinación de la mezcla binaria en presencia de este último. así como. Las disoluciones se aforaron con agua destilada y se registraron los espectros de absorción entre 200 y 350 nm frente a un blanco preparado de manera similar.

**E.4.2. Determinaciones espectrofluorimétricas**

***Fluorescencia convencional***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 2,5 ml de disolución reguladora de ácido tartárico/tartrato sódico 0,2 M y pH 2,5, volúmenes de disoluciones de furosemida y triamtereno adecuados para que su concentración final estuviera en los intervalos 212 - 1060 y 20-143 µg.l<sup>-1</sup>, respectivamente, y el etanol necesario para obtener disoluciones al 20 % (v/v) y agua destilada hasta el aforo. A continuación se registraron los espectros de emisión de las disoluciones

anteriores entre 220 y 420 nm, a las longitudes de onda de los máximos de excitación de furosemida y triamtereno, 270 y 360 nm, respectivamente, y a 258 nm. Los anchos de las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 6 nm.

#### ***Fluorescencia sincrónica***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 2,5 ml de disolución reguladora de ácido tartárico/tartrato sódico 0,2 M y pH 2,5, y los volúmenes de disoluciones de furosemida y triamtereno adecuados para que su concentración final estuviera en los intervalos 2,52 - 16,88 y 1,03 - 10,32 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Las disoluciones se aforaron con agua desionizada y se registraron sus espectros sincrónicos entre 220 y 420 nm, con  $\Delta\lambda$  inicial de 30 nm, aumentando la distancia entre los monocromadores 10 nm para cada espectro sucesivo. Los anchos de las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 14 y 16 nm, respectivamente.

#### ***Determinación de furosemida y triamtereno en preparados farmacéuticos***

Se pesaron, pulverizaron y homogeneizaron 3 comprimidos del preparado farmacéutico “Salidur” y 4 comprimidos del preparado farmacéutico “Seguril”, de los cuales se tomaron 6 muestras, de 10 mg aproximadamente para llevar a cabo la determinación. Los fármacos objeto de estudio fueron extraídos con 100 ml de una mezcla etanol/agua al 80 % en baño de ultrasonido durante 30 minutos. Para las determinaciones en “Salidur” se toman 9 ml de la disolución anterior y se diluyen a 100 ml en matraz aforado con agua destilada; a continuación se llevan 2,5 ml de esta disolución a un matraz de 250 ml en el que se introducen también 25 ml de la disolución reguladora y se afora. A partir de esta disolución, se continúa el procedimiento de la forma descrita en el apartado anterior.

En el caso del “Seguril”, se toman 5 ml y se diluyen a 100 ml en matraz aforado. Se toman 5 ml de esta disolución y se llevan a un matraz aforado de 250 ml al que también se añaden 25 ml de disolución reguladora, y agua destilada hasta el enrase. A continuación, se procedió como se describe en el apartado anterior.

#### ***Determinación de triamtereno en orina***

En matraces aforados de 25 ml se añadieron 2,5 ml de disolución reguladora de ácido tartárico/tartrato sódico (0,2 M y pH 2,5), 2,5 ml de orina previamente diluida, y un volumen de disolución de triamtereno adecuado para que su concentración final estuviera en los intervalos

0,5 - 5,8 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Las disoluciones se aforaron con agua desionizada y se registraron sus espectros sincrónicos entre 220 y 420 nm, con  $\Delta\lambda$  de 40 nm, y anchos de las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 14 y 16 nm, respectivamente.

#### **E.4.3. Electroforesis capilar**

##### ***Acondicionamiento del capilar***

El capilar de sílice utilizado para llevar a cabo las separaciones electroforéticas fue acondicionado antes de su primer uso haciendo pasar a su través NaOH 1 M durante 15 minutos. Puesto que la reproducibilidad en los tiempos de migración de los analitos depende del estado de la pared interna del capilar, entre inyecciones se hacía pasar la disolución reguladora del análisis durante 7 minutos.

Cuando se inyectaron las muestras de preparados farmacéuticos, se observó la inhibición del flujo electroosmótico, debido probablemente a la interacción de los iones silanoatos de la pared con el almidón que contienen los preparados. Para reproducir el estado de la pared interna del capilar cuando se inyectaban los preparados farmacéuticos, antes de cada inyección se hacía pasar NaOH 0,5 M durante 8 minutos y 5 minutos de la disolución reguladora.

La inyección se hizo por presión (hidrodinámica) a 50 mbar durante 3,7 s (aprox. 5,9 nL). Para hacer la inyección reproducible y cuantitativa, después de cada inyección de muestra se inyectaba una cantidad igual de disolución reguladora.

##### ***Determinación de diuréticos por MEKC***

Las disoluciones de los diuréticos se prepararon por dilución de las disoluciones patrón en agua Milli-Q, hasta obtener concentraciones comprendidas entre 18 y 31 mg.l<sup>-1</sup> para clortalidona, 14 y 21 mg.l<sup>-1</sup> para furosemida, 20 y 30 mg.l<sup>-1</sup> para hidroclorotiazida y 9 y 12 mg.l<sup>-1</sup> para triamtereno.

Las disoluciones de los fármacos obtenidas como se ha descrito anteriormente se filtran a través de una membrana de polipropileno de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectadas en el equipo de electroforesis capilar. Las determinaciones por MEKC se realizaron con un capilar de sílice de 48,5 cm  $\times$  50  $\mu\text{m}$  d.i. y 40,0 cm de longitud efectiva, utilizando una disolución reguladora 50 mM en glicina y 25 mM en SDS de pH 10,5; el voltaje aplicado fue de 25 kV entre 0 y 3,7 minutos y 28 kV hasta el final y la temperatura del capilar de 20°C. La detección se

realizó espectrofotométricamente midiendo las áreas de los picos y los tiempos de migración a 230 nm.

#### ***Determinación de antiepilépticos por CZE***

Se prepararon disoluciones diluidas de los antiepilépticos se prepararon con concentraciones comprendidas entre 42,00 y 61,60 mg.l<sup>-1</sup> para fenitoína y entre 20,80 y 31,20 mg.l<sup>-1</sup> para fenobarbital.

Las disoluciones de los fármacos se filtran a través de una membrana de polipropileno de 0,45 µm antes de ser inyectadas en el equipo de electroforesis capilar. Las determinaciones por CZE se realizaron con un capilar de sílice de 48,5 cm × 50 µm d.i. y 40,0 cm de longitud efectiva, utilizando una disolución reguladora 50 mM de glicina de pH = 10,5, el voltaje aplicado fue de 25 KV (polaridad positiva) y la temperatura del capilar de 20°C. La detección se realizó espectrofotométricamente midiendo las áreas de los picos y los tiempos de migración a 230 nm.

**CONCLUSIONES**

---



La presente memoria se dedica a la aplicación de los métodos de calibración univariantes y multivariantes a la determinación de antihipertensivos y antiepilépticos en mezclas.

En primer lugar se establecen las características físico-químicas y farmacológicas de los fármacos objeto de estudio, y se exponen los fundamentos teóricos de los distintos métodos de calibración que se utilizan a lo largo de la memoria para llevar a cabo las multideterminaciones.

Se resuelven las mezclas binarias dihidralazina-hidroclorotiazida, clortalidona-espironolactona y fenitoína-fenobarbital mediante los métodos del “cruce por cero” y de los “espectros cocientes derivados”, como métodos de calibración univariante, y regresión lineal múltiple (MLR) y regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS) como métodos de calibración multivariantes.

Se evalúa la capacidad predictora de los métodos de calibración utilizados mediante el cálculo de dos parámetros estimativos del error cometido en las determinaciones, el error estándar de la predicción (RSE) y el error relativo medio de la predicción (RMSE), se demuestra la importancia de la selección del intervalo de longitudes de onda a través del cálculo

de estos parámetros para todos los posibles intervalos cuando se aplican los métodos de calibración multivariantes, y se pone de manifiesto que cuando los métodos de calibración univariante fallan, por problemas de solapamiento espectral, la calibración multivariante conduce a buenos resultados.

Los métodos seleccionados se aplican con buenos resultados a la determinación de los analitos en mezclas sintéticas y en preparados farmacéuticos, y se validan por cromatografía líquida de alta resolución.

La mezcla ternaria dihidralazina-hidroclorotiazida-reserpina se resuelve por regresión lineal múltiple y por regresión en mínimos cuadrados parciales, una vez seleccionado el intervalo de longitudes de onda y el número de *factores*, obteniéndose mejores resultados con ésta última. La mezcla clortalidona-espironolactona-reserpina se resuelve por PLS, y se realiza la determinación de clortalidona y espironolactona en presencia de reserpina en preparados farmacéuticos.

Se ponen de manifiesto las posibilidades de la combinación de las técnicas espectrofluorimétricas, convencional y sincrónica, con los métodos de calibración multivariantes a través de los resultados obtenidos en la determinación de furosemida y triamtereno en mezclas. Para la selección de las condiciones óptimas, región espectral y número de *factores*, se utiliza el método del menor PRESS significativo, y los modelos propuestos se aplican a la determinación de estos analitos en preparados farmacéuticos y de triamtereno en orina.

Se estudian las multideterminaciones aplicando métodos de calibración univariante a los resultados obtenidos por electroforesis capilar. Se demuestran las ventajas de la cromatografía micelar electrocinética (MEKC) para la separación de analitos neutros y cargados, como consecuencia de la introducción un agente surfactante, que forma micelas, en el medio electroforético. Se propone un método MEKC, simple y rápido, para la identificación y cuantificación de clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida y triamtereno en preparados farmacéuticos.

Se propone un método rápido y reproducible para la determinación de antiepilépticos (fenitoína y fenobarbital) mediante electroforesis capilar de zona, con tiempos de análisis inferiores a 4 minutos, que se aplica a la determinación de las drogas en preparados farmacéuticos.