

5 Metodología y discusión de los resultados

5.1 Introducción

La CE presenta una serie de características (poder de resolución, rapidez de análisis, generación mínima de residuos) que la hacen adecuada para resolver problemas de interés industrial. La industria actual compete en un mercado cada vez más competitivo que la obliga a demostrar la calidad y estabilidad con el uso de sus productos. La oxidación de los blanqueantes ópticos usados en la industria textil o de la detergencia frente a otros agentes de blanqueo como las lejías es un ejemplo de esta problemática. Estos agentes de blanqueo ópticos se añaden a los tejidos blancos para aumentar su luminosidad y se incorporan a la formulación del detergente para recuperar la fracción de los mismos que se desadsorbe del tejido durante el proceso de lavado. Debido a que en el hogar es habitual el uso de agentes oxidantes como el hipoclorito (lejías) para eliminar manchas difíciles existe el riesgo de oxidación del blanqueante del tejido si lejía es usada directamente sobre la mancha o del incorporado en el detergente si se incluye una etapa de lejado en el proceso de lavado. Esta oxidación provoca una pérdida de blanco y puede ser perjudicial para el medioambiente por la formación de productos organoclorados. La presencia de carga en la mayoría de blanqueantes ópticos permite el seguimiento del proceso de oxidación del blanqueante estudiado en esta memoria mediante CE

El control de calidad en la industria farmacéutica es especialmente riguroso porque el producto final está destinado a consumo humano. La determinación del contenido de principio activo, de impurezas relacionadas, la uniformidad de contenido por unidad de dosis o los tests de estabilidad son ensayos habituales del control de calidad de un laboratorio farmacéutico. Estos ensayos implican múltiples análisis y separaciones complejas por lo que requieren una técnica rápida, versátil y resolutive. Las alquilxantinas son una familia de compuestos con propiedades farmacológicas complementarias y habitualmente administradas conjuntamente en fármacos. Las alquilxantinas usadas en la farmacopea han sido separadas en esta memoria mediante CE para demostrar la capacidad de la técnica para abordar separaciones complejas y obtener condiciones de separación de estos principios activos para futuras aplicaciones. Las conclusiones extraídas en este trabajo se usan para proponer un método de análisis de tres de estas alquilxantinas en un fármaco .

La industria farmacéutica necesita para la determinación de impurezas relacionadas con el principio activo (impurezas de síntesis o productos de degradación) una técnica con sensibilidad y poder de resolución suficiente. El contenido del enantiómero minoritario en principios activos administrados en su forma enantioméricamente pura es un ejemplo de este tipo de ensayos. La CE es una técnica idónea para la

enantioseparación de compuestos quirales por su alta eficacia y variedad de selectores quirales disponibles. La elección del selector quiral se realiza hasta el momento de forma empírica pero en esta tesis se proponen algunos criterios relacionados con la estructura del analito que facilitan esta selección. Estos criterios se usan para la enantioseparación de Dopa y Ketoprofeno, dos principios activos comercializados en su forma enantioméricamente pura. La técnica se aplica para desarrollar métodos de análisis en condiciones acquirales y quirales que permiten determinar el contenido total de principio activo y del enantiómero minoritario respectivamente.

Todos estos trabajos presenta un parte común de metodología experimental que se comenta a continuación.

5.2 Metodología Experimental

Durante el trabajo experimental de esta tesis se han utilizado básicamente dos modos de separación: la electroforesis capilar de zonas (CZE) y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Puntualmente, se ha hecho uso de variantes de estos modos con ciclodextrinas. No obstante para todos estos modos podemos establecer un esquema de trabajo similar.

- Elegir el pH y el BGE de trabajo en base al estudio de las características de los componentes de la muestra problema y su posible comportamiento electroforético.
- Fijar el voltaje y la polaridad de la fuente. Normalmente, 30 kV (polaridad directa) para reducir los tiempos de análisis siempre que no aparezcan problemas de resolución.
- Elegir las longitudes de onda de detección. Por lo general, en el máximo de absorbancia de los analitos más una longitud de onda baja (alrededor de 200 nm), universal, muy sensible y que permite detectar el flujo electroosmótico.
- Seleccionar otros parámetros experimentales (longitud y diámetro del capilar. presión y volumen de inyección.. etc)
- Realizar ensayos iniciales y según los resultados modificar la composición del BGE y/o parámetros instrumentales de forma empírica. Se discute la posibilidad de variar el pH, añadir un tensioactivo o algún modificador del BGE (selector quiral, solvente orgánico, etc..) hasta conseguir una resolución suficiente.
- Modificar el camino óptico del capilar o variar la longitud de onda de detección si la sensibilidad es insuficiente.
- Cuantificar muestras con el método propuesto a partir del área corregida de los patrones
- Validar el método si es necesario

A partir de este esquema podemos discutir la metodología aplicada a aquellos trabajos de carácter cualitativo frente a aquellos de carácter cuantitativo. Los trabajos que tienen como objeto el seguimiento de los productos de una mezcla en evolución o la separación de un conjunto de principios activos presentan una etapa importante de identificación de los picos de los electroferogramas. Esta identificación se ha llevado a cabo por comparación respecto los patrones puros de los espectros UV-Vis y de los tiempos de migración. En aquellos casos donde los espectros UV-Vis eran idénticos (por ejemplo, los enantiómeros) o muy parecidos (isómeros de posición) y los tiempos de migración próximos se ha procedido a añadir a la muestra el analito en cuestión y detectar que pico aumenta su área. Para el análisis cuantitativo, se ha utilizado la calibración univariable relacionando el área corregida por el tiempo de migración con la concentración de patrones sintéticos. La predicción de nuevas muestras se realiza por interpolación en la recta de calibración antes establecida.

Aunque en esta memoria se presentan métodos desarrollados mediante CE, en algún punto de la investigación ha sido necesario complementar los resultados con otras técnicas de análisis. En este sentido, se han utilizado técnicas espectroscópicas que proporcionan una información complementaria (UV-Vis, fluorescencia o dispersión óptica rotatoria) o HPLC para comprobar la bondad de los resultados generados por CE.

5.3 Discusión de los resultados

Para simplificar la discusión de los resultados se ha dividido este apartado en tres bloques: los trabajos relacionados con la estabilidad del blanqueante óptico con el hipoclorito, los relacionados con el análisis de alquixantinas y por último los que abordan la problemática de las separaciones quirales y determinación de excesos enantioméricos. Aunque formalmente se seguirá esta estructura también se intentará mostrar los aspectos comunes de los trabajos y discutirlos, en la medida de lo posible, de forma conjunta.

5.3.1 Estudio de la estabilidad de un blanqueante óptico frente al hipoclorito

El *E,E*-[4,4-*bis*(2-sulfostyryl)biphenyl] (DSBP) es un blanqueante óptico (FWA) de la familia estilbeno diseñado para tener una gran afinidad para el algodón y la poliamida y ser más estable a la luz que los derivados triazinilamino-estilbénicos (los FWAs más habituales en estos tejidos).

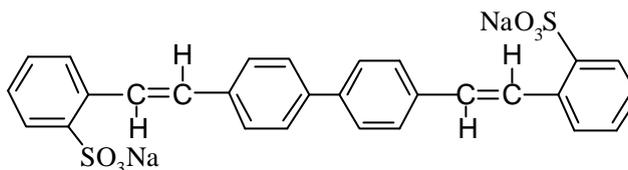


Figura 5.1. Estructura química del DSBP

En esta memoria se estudia la estabilidad de este blanqueante frente al hipoclorito. Como ya se ha comentado, el uso sucesivo de detergente y lejía es un método usual de lavar ropa blanca. No obstante, la mayoría de FWAs se oxidan en presencia del hipoclorito de la lejía. Esta oxidación comienza en el proceso de lavado pero podría continuar en aguas residuales. Además la capacidad clorante del hipoclorito puede dar lugar a productos organoclorados perjudiciales para el medioambiente. Por tanto, es interesante identificar en caso de producirse la oxidación que productos se descargan con las aguas de lavado.

La estabilidad del DSBP al hipoclorito se estudia inicialmente mediante espectroscopia UV-Vis preparando una disolución de blanqueante e hipoclorito y siguiendo la evolución del espectro de la mezcla. Este seguimiento (figura 5.2) muestra la evolución desde el espectro inicial del blanqueante (máximo a 348 nm) hasta obtener al cabo de 24 horas un espectro con máximo de absorción a 280 nm. Esto indica la inestabilidad del DSBP con el hipoclorito y la formación de nuevas especies. Esta misma experiencia se realizó añadiendo pequeñas cantidades (ppms) de algunos metales de transición y se obtuvo la misma evolución del espectro pero más rápida.

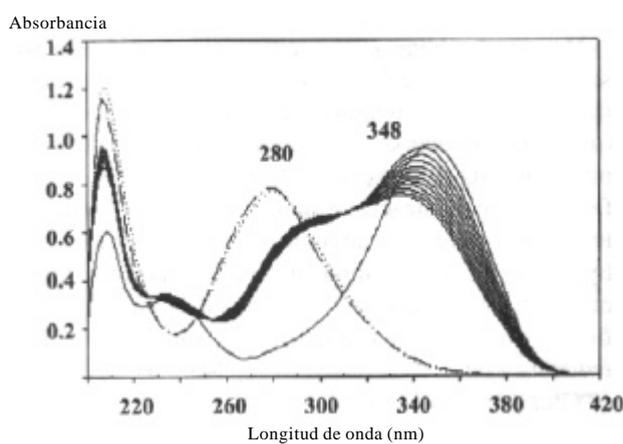


Figura 5.2. Evolución del espectro del DSBP (50 ppm) con el hipoclorito (500 ppm). Espectros registrados cada cinco minutos durante una hora (-), cada 24 horas (- · ·) y una semana después (· · ·).

Este efecto catalítico de los metales se estudia mediante la espectroscopia de fluorescencia y un sistema en continuo. La mayor selectividad de esta técnica permite seguir la oxidación del DSBP ya que no presenta interferencias por parte del hipoclorito o de los productos de reacción. La disolución del FWA y metal se introduce en el matraz protegido de la luz (para evitar la fotodegradación del DSBP) y se hace circular hasta la celda de medida donde se registra la señal durante cinco minutos. Se añade el hipoclorito al matraz y se registra la medida de fluorescencia. Los resultados (figura 5.3) demuestran que la adición del hipoclorito conduce a una pérdida de fluorescencia y que esta es más rápida en presencia de los metales ensayados, siendo el hierro (II) el metal más activo en este sentido.

La fotodegradación del DSBP ha sido objeto de múltiples estudios^{1,2}. Nuestra hipótesis de partida ha sido suponer que los productos de reacción del DSBP con el hipoclorito son muy diferentes a los obtenidos por fotodegradación. Esta hipótesis se sustenta en:

- La evidencia que la luz actúa como promotor de la oxidación del doble enlace estilbénico del DSBP. El hipoclorito es un agente oxidante y ese doble enlace es la zona más probable de ataque.
- La comprobación experimental que los espectros UV-Vis de la mezcla DSBP/hipoclorito y del DSBP en presencia de luz evolucionan de manera muy parecida sobretodo a tiempos cortos.

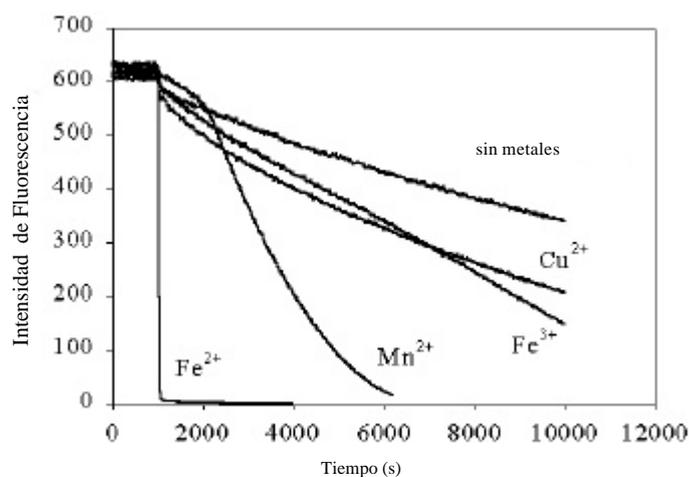


Figura 5.3 Variación de la fluorescencia del DSBP con el hipoclorito en presencia de metales de transición. 10 ppm de DSBP/100 ppm NaClO/ 1 ppm de los metales. $\lambda_{exc}=348$ nm, $\lambda_{emi}=430$ nm.

La identificación de los productos de oxidación entre el DSBP y el hipoclorito se realiza mediante CE atendiendo a la presencia de carga en el producto de partida (DSBP) y de sus posibles productos de reacción (figura 5.4). Estos analitos más el E,E-DSBP y sus isómeros cis-trans (E,Z- y Z,Z- DSBP) se inyectan en un BGE a pHs básicos con el fin de tener los analitos en forma aniónica y un EOF suficientemente elevado para arrastrarlos hacia el cátodo. En las condiciones propuestas (20 mM

tetraborato pH 9.3) se consigue una buena separación de los analitos mientras que el hipoclorito no es detectado.

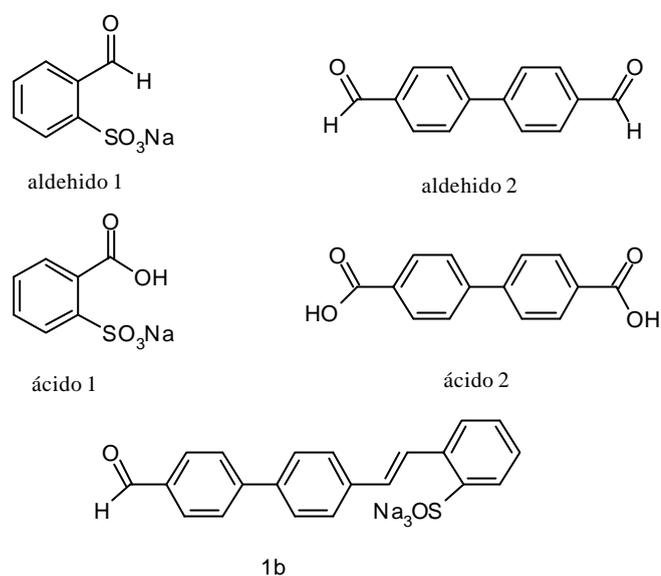


Figura 5.4. Productos de fotodegradación del DBSP y posibles productos de reacción de este FWA con el hipoclorito.

La evolución de especies formadas durante esta oxidación del DSBP se sigue mediante CE por un periodo de seis meses. Los electroferogramas evolucionan desde el pico inicial del DSBP hasta múltiples picos entre los que se pueden identificar los derivados aldehído 1 y 2. Con el fin de acelerar el proceso y obtener electroferogramas más simples se somete a las disoluciones a un proceso de envejecimiento a 60 °C.

El electroferograma inicial de una disolución de DSBP e hipoclorito en relación molar 1:8 muestra el pico del E,E-DSBP y dos especies intermedias que evolucionan con el tiempo (figura 5.5). En el electroferograma obtenido a la hora se observa un único pico correspondiente a una de estas especies intermedias (intermedio II) que evolucionan con el tiempo para formar los derivados aldehído 1 y 2 mientras que a los tres días se detectan los derivados ácido. No se observan cambios significativos a tiempos superiores y el electroferograma final (figura 5.6) presenta una mezcla de estas especies.

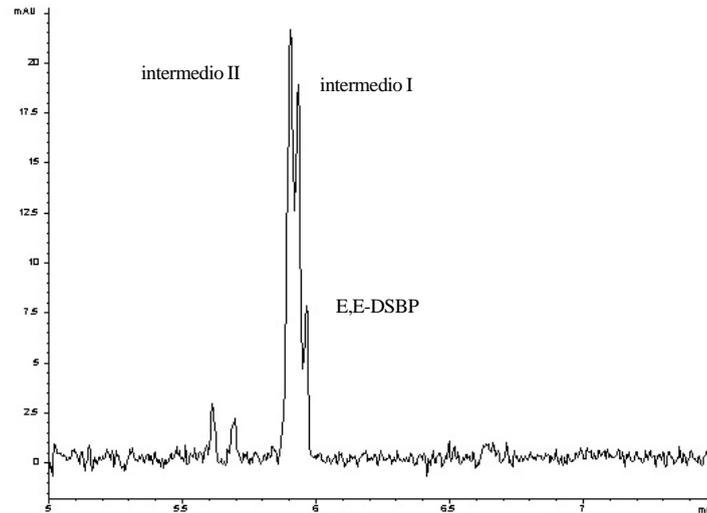
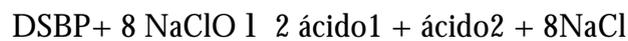


Figura 5.5. Electroferograma obtenido inicialmente para una disolución con 112 ppm de DSBP y 120 ppm de NaClO (relación molar 1:8). 20 mM tetraborato pH 9.3, 30 kV.

El seguimiento de este proceso de oxidación a 60 °C en una disolución con igual concentración de DSBP y una concentración superior de hipoclorito muestra las mismas especies pero una evolución más rápida. No obstante, en este caso existe más agente oxidante y los derivados aldehído son totalmente oxidados a ácidos. A la vista de los resultados se propone la siguiente ecuación química para la oxidación del DSBP con el hipoclorito:



(5.1)

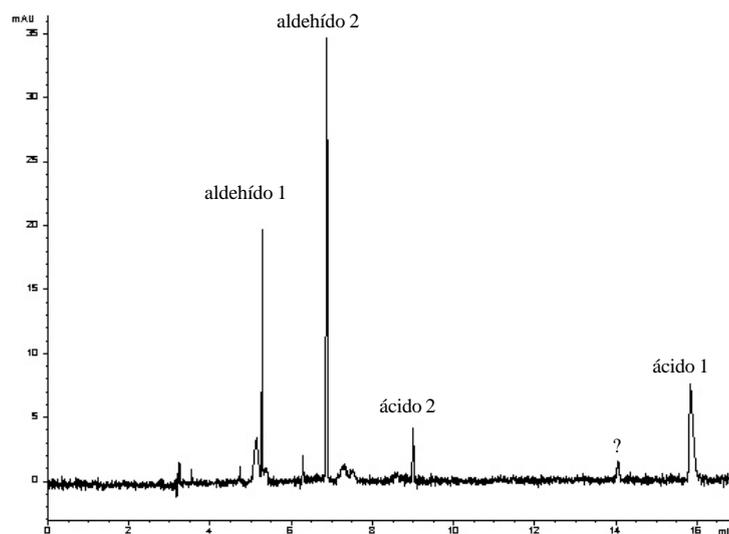


Figura 5.6. Electroferograma obtenido en las mismas condiciones que el anterior después de una semana a 60 °C.

Se utiliza la CE para confirmar el efecto catalítico del Fe^{2+} observado en las experiencias de fluorescencia (figura 5.3). Se prepara una disolución de DSBP e hipoclorito en relación estequiométrica (según ecuación 5.1) y 1 ppm de Fe^{2+} . Se observa la formación casi instantánea del intermedio II, si lo comparamos con lo obtenido en ausencia de metal (figura 5.5) y se concluye que el metal cataliza la formación de este intermedio. No obstante, la evolución de esta especie hacia los productos finales a temperatura ambiente vuelve a ser muy lenta. Una vez más cuando la muestra se mantiene a 60 °C se obtiene una evolución más rápida de especies y los mismos productos finales que en ausencia de metal.

A partir de los datos obtenidos en las experiencias de fluorescencia, UV-Vis y CE se propone un posible esquema de oxidación del DSBP. La oxidación empieza por el ataque del hipoclorito al doble enlace (para formar la clorhidrina) y posterior ciclación al epóxido que en medio básico se abre para generar un diol (intermedio II)³. Los datos espectroscópicos y de movilidad electroforética del intermedio II están de acuerdo con esta estructura. Además la estructura propuesta para esta especie permite explicar la formación del intermedio I. Cuando la temperatura o la cantidad de hipoclorito es menor, la reacción es más lenta y el intermedio fruto de la reacción de un solo doble enlace del DSBP puede ser detectado (intermedio I).

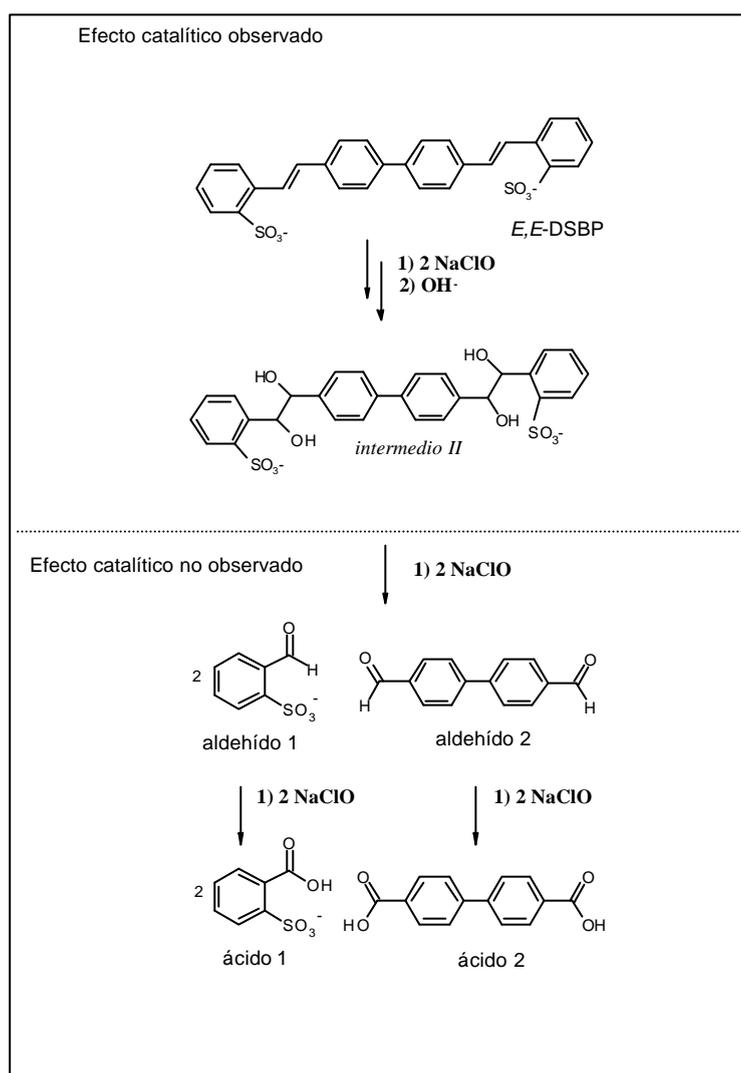


Figura 5.7. Esquema propuesto para la oxidación del DSBP con el hipoclorito.

Posteriormente, el diol vicinal sufre una rotura oxidativa, en una reacción bien descrita⁴, para formar los fragmentos aldehídos (1 y 2). Estos derivados aldehídos son oxidados a los derivados ácido por el hipoclorito restante. Este esquema concuerda con la relación estequiométrica propuesta en la ecuación 5.1 para el proceso global. Se concluye entonces que los productos mayoritarios de la oxidación del DSBP con el hipoclorito son los derivados aldehído 1 y 2 o en exceso del agente oxidante sus correspondientes derivados ácidos y no se tienen evidencias de la formación de productos orgánicos clorados.

Una vez identificado los productos de reacción entre el DSBP y el hipoclorito se investiga la posibilidad de reducir esta oxidación por la adición al medio de un complejante metálico que evite el efecto catalítico observado para ciertos metales.

Se investigó la familia de los fosfonatos cuya presencia es habitual en formulaciones de detergentes. Los resultados son satisfactorios en especial con el Dequest 2066® (ácido dietilenaminopenta (metilfosfónico)). En la figura 5.8 se muestran las caídas de fluorescencia obtenidas para la reacción entre el DSBP y el hipoclorito cuando el FWA se ha disuelto en agua del grifo. Como era esperable, la caída de fluorescencia es más rápida si el DSBP se disuelve en agua corriente debida al contenido de metales que presenta. No obstante, la adición del Dequest 2066® inhibe casi por completo el proceso.

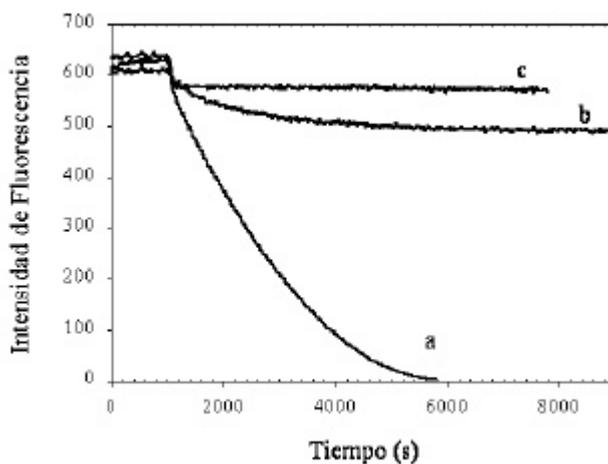


Figura 5.8. Caídas de fluorescencia con el hipoclorito cuando el DSBP es disuelto en: (a) agua del grifo, (b) en presencia 10^{-2} M de Sequion CLR® o (c) en presencia de 10^{-5} M de Dequest 2066®. 10 ppm DSBP/ 100 ppm NaClO pH 9.

Se concluye entonces que el uso de un agente complejante adecuado evita en gran medida la oxidación del DSBP y la caída de fluorescencia observada cuando el DSBP se pone en contacto con el hipoclorito en ausencia de metales añadidos es consecuencia de la presencia de trazas metálicas bien en los productos de partida o en el agua utilizada.

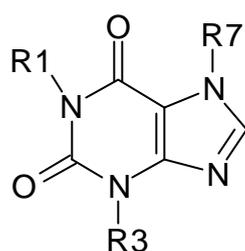
5.3.2 Separación de una mezcla de alquixantinas y aplicación al análisis de un preparado farmacéutico

Las alquixantinas constituyen son una familia de compuestos con una estructura base donde los hidrógenos en posición 1,3 y 7 (ver tabla 5.1) son remplazados por diferentes sustituyentes. Estas sustituciones dan lugar a una familia de principios activos con una estructura similar y propiedades broncodilatadoras y vasodilatadoras ligeramente distintas. Esto ha propiciado el uso conjunto de algunas de estas alquixantinas en fármacos. Se pretende demostrar la capacidad de la técnica para abordar la

separación de ocho alquixantinas usadas en la farmacopea y obtener así unas condiciones de separación para el análisis de mezclas de ellas en fármacos.

En medio básico, la desprotonación de los nitrógenos en posición 1 y 7 permite la separación de las alquixantinas por electroforesis capilar de zonas. No obstante, aquellas xantinas alquiladas en estos nitrógenos no pueden ser ionizadas y por tanto para separarlas es necesario otro modos de operación.

Tabla 5.1. Estructuras y número de identificación usados para las alquixantinas



Aniónicas	R1	R3	R7	pKa
1 Teofilina	-CH3	-CH3	-H	8.8
2 Teobromina	-H	-CH3	-CH3	10.0
3 Teofilina-7-ácido acético	-CH3	-CH3	-CH2COOH	1 4.7
4 Enprofilina	-H	-CH2CH2CH3	-H	8.4
Neutras				
5 Cafeína	-CH3	-CH3	-CH3	
6 Difilina	-CH3	-CH3	-CH2CHOHCH2OH	
7 Proxifilina	-CH3	-CH3	-CH2CHOHCH3	
8 Pentoxifilina	-(CH2) ₄ COCH3	-CH3	-CH3	

Los valores de pKa de las xantinas exigen un BGEs con un pHs en el intervalo 8.5-10 para asegurar la presencia de carga en los analitos. En todo este intervalo de pH, las xantinas neutras aparecen junto al EOF excepto la difilina que aparece a tiempos superiores (ver figura 5.11). Esto indica la presencia de carga negativa en su estructura a pesar de no poseer ningún grupo químico ionizable. Esta generación de carga se debe a su complejación con el borato del BGE. La reacción de los iones borato con dioles vicinales en medio básico es conocida⁴ y la difilina es la única xantina de la mezcla con una estructura capaz de formar complejos cargados con el borato. El aumento de la movilidad electroforética efectiva de la difilina con el pH y la concentración del BGE encontrada experimentalmente está de acuerdo con esta hipótesis⁵. Esta complejación se confirma cuando se sustituye el tetraborato del BGE por fosfato que provoca que la difilina migre con el EOF.

Se estudian dos aproximaciones para separar las xantinas neutras y las cargadas: la adición de un tensioactivo y la adición de una ciclodextrina cargada. Esta última opción da lugar a un modo de separación denominado cromatografía electrocinética mediante ciclodextrinas (CD-EKC) consistente en generar la movilidad electroforética en sustancias neutras por su inclusión dentro de una ciclodextrina cargada⁵. En nuestro caso, la adición de una ciclodextrina aniónica como la carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD) permite desplazar las xantinas neutras respecto del EOF sin embargo sus constantes de inclusión no son lo suficientemente distintas como para conseguir una resolución a línea base (figura 5.10).

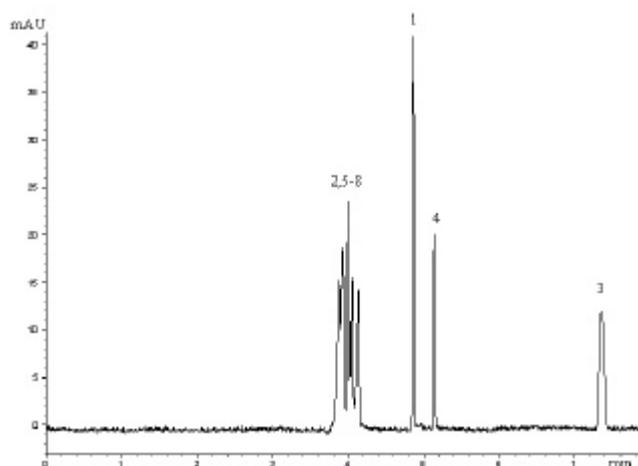
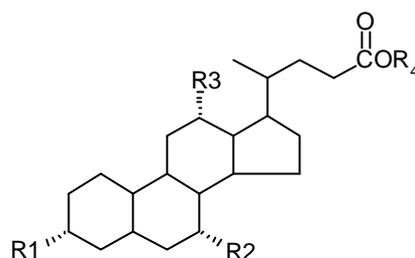


Figura 5.10. Electroferograma obtenido en condiciones de CD-EKC. 20 mM tetraborato pH 9.3, 10 mM CM- β -CD, 30 kV.

Se investiga entonces la aproximación MEKC añadiendo al BGE dodecilsulfato sódico (SDS) y se observan dos comportamientos con el tensioactivo distintos. Las xantinas aniónicas apenas varían su tiempo de migración al aumentar la concentración de SDS lo que indica que no se distribuyen en la fase micelar por repulsión eléctrica. Por el contrario, aquellas xantinas neutras varían considerablemente su tiempo de migración con el SDS y esta interacción es mayor cuanto mayor es la hidrofobicidad de su estructura. En este sentido, la pentoxifilina es la xantina que más interacciona con el SDS y estructuras de polaridad parecida como la cafeína y la proxifilina no pueden resolverse. En las mejores condiciones halladas en MEKC con SDS se pueden resolver siete de ocho xantinas en un tiempo aproximado de 12 minutos. Se investiga el efecto de añadir un aditivo al BGE (una ciclodextrina neutra) o un solvente orgánico (metanol) sobre la separación. Sin embargo, los resultados son insatisfactorios bien porque se producen otros solapamientos de picos o bien porque se alargan en demasía los tiempos de análisis.

Las sales biliares son tensioactivos aniónicos que se han mostrado eficaces para la separación de analitos con una estructura rígida de anillos fusionados. Se ensayan cuatro sales biliares (tabla 5.2) y los mejores resultados se obtienen para el ácido taurodeoxicólico (STDC) y para el deoxicólico (SDC) lo que indica que la ausencia del grupo hidroxilo de la posición 2 favorece la discriminación de las xantinas.

Tabla 5.2. Estructura de las sales biliares empleadas



Sal biliar	Abreviatura	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Colato sódico	SC	OH	OH	OH	ONa
Taurocolato sódico	STC	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na
Deoxicolato sódico	SDC	OH	H	OH	ONa
Taurodeoxicolato sódico	STDC	OH	H	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na

La separación completa de la mezcla en menos de nueve minutos es posible mediante la adición de STDC a una concentración 125 mM en el BGE de tetraborato pH 8.5. Si comparamos este electroferograma con el obtenido en las mismas condiciones con una concentración parecida de SDS se concluye que aunque la interacción de las alquixantinas con el STDC es menor que con el SDS (los tiempos de migración varían menos) esta interacción es más discriminante. Esto creemos se debe al tipo de micela helicoidal de la sal biliar que implica un mayor impedimento estérico que no la micela esférica del SDS⁶. La interacción con esta micela viene gobernada exclusivamente por la hidrofobicidad mientras que en la de STDC la estructura espacial de la xantina también influye.

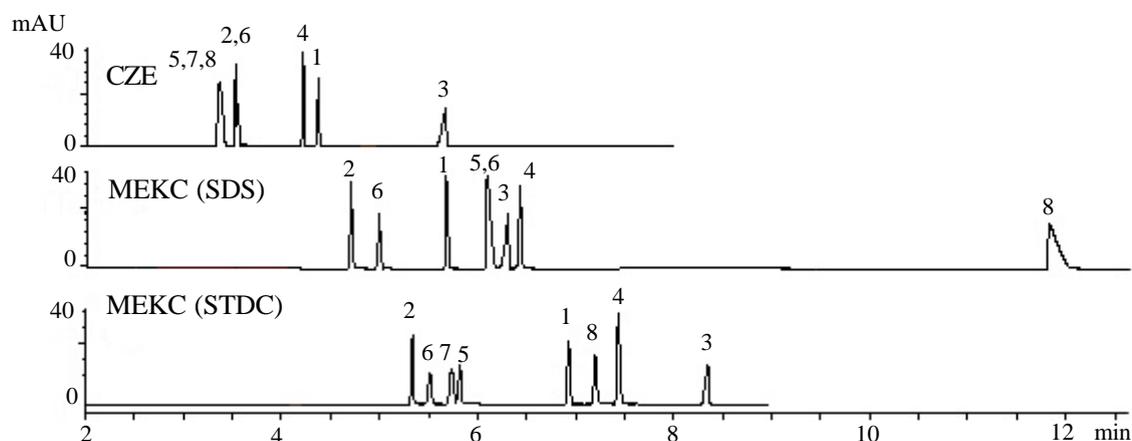


Figura 5.11. Comparación de la separación obtenida en condiciones CZE, MEKC con 100 mM de SDS o 125 mM de STDC. Condiciones de separación: 20 mM teraborato pH 8.5, 30 kV.

El Novofilin Retard® (Ferrer Internacional S.A) es un fármaco usado para combatir el asma compuesto por teofilina, difilina y proxifilina. Las conclusiones extraídas en este trabajo permiten proponer un que contiene tres alquilxantinas Se propone, a partir del comportamiento electroforético observado para estas xantinas, un método de análisis alternativo al HPLC para el análisis del preparado farmacéutico. En este caso, donde la mezcla es más sencilla se usa un tensioactivo más barato y simple como el SDS en vez del ácido taurodeoxicólico.

Se hallan unas condiciones experimentales que permiten obtener una completa separación de los tres analitos y un corto tiempos de análisis (figura 5.12). El análisis de dos lotes del fármaco proporciona unos resultados concordantes entre sí y con los valores etiquetados. Por tanto, el método propuesto presenta una serie de características (exactitud, rapidez de análisis, consumo mínimo de reactivos..) que lo hacen adecuado para ser aplicado en el control de calidad del fármaco.

La farmacopea recomienda el test de análisis de uniformidad de contenido⁷ con el fin de demostrar la homogeneidad en el contenido del principio activo en cada dosis. Este tipo de análisis requieren de una técnica exacta y rápida por lo que el método propuesto parece reunir las propiedades adecuadas. Se analizan así 10 gráneas individuales y los resultados demuestran que los tres principios activos presentan variaciones inferiores al 5% respecto a su valor nominal. Si tenemos en cuenta que la farmacopea acepta variaciones del 10% se demuestra la uniformidad de contenido del lote analizado.

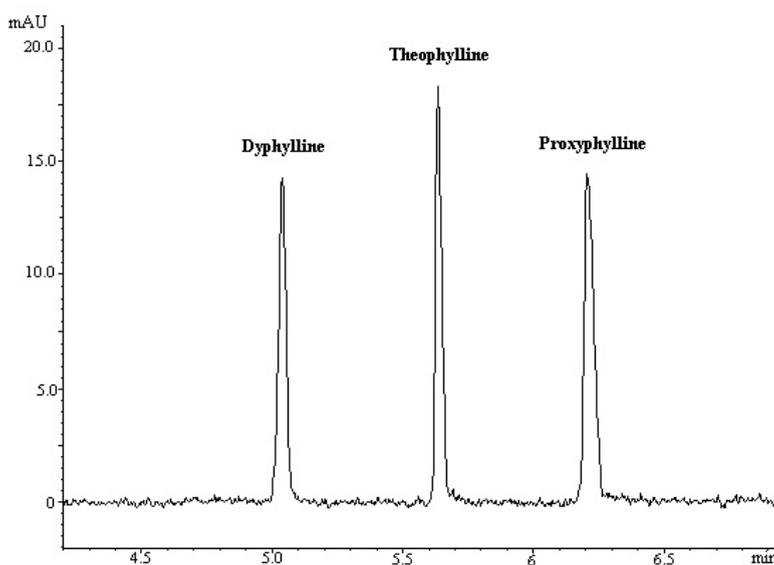


Figura 5.12. Electroferograma obtenido en el análisis de Novofilin® Retard. 20 mM tetraborato pH 8.5, 100 mM SDS, 30 kV, $\lambda=274$ nm.

Sin embargo, aquellos métodos de análisis pensados para el control de calidad de productos farmacéuticos, que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben validarse previamente a su uso en rutina. La validación de un método de análisis pretende⁸ :

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorías de calidad, la transferencia de métodos, la armonización de resultados entre laboratorios etc.

Existen numerosos textos oficiales que sirven de guía para la validación de métodos analíticos^{9,10,11}. En esta memoria se ha utilizado como guía de validación las recomendaciones de la *International Conference on Harmonisation* (ICH)¹². Los parámetros de calidad que deben estimarse se muestran en la tabla 5.3. En nuestro caso al tratarse de un método de análisis para la determinación del contenido es necesario evaluar la precisión, exactitud, selectividad, linealidad y robustez del método aunque el límite de detección y cuantificación también ha sido estimado. Los resultados de algunos de estos parámetros de la validación se muestran en la tabla 5.4.

La selectividad del método se muestra en la figura 5.12 donde se puede observar la perfecta resolución de los tres analitos y la ausencia de interferencias por parte de los excipientes. El estudio de la precisión se ha dividido en tres aspectos: la repetitividad de la inyección, del método y la precisión intermedia. La imprecisión el área corregida es el parámetro importante desde el punto de vista cuantitativo. Los resultados demuestran que el factor día no es significativo sobre el área corregida de los tres analitos ya que la precisión intermedia (interday-precision) y la repetitividad (intraday-precision) del método no son estadísticamente diferentes. Se observa que la mayor fuente de imprecisión de nuestros datos es la irreproducibilidad del sistema de inyección por tanto para mejorar la precisión global del método sería recomendable el uso de un patrón interno.

Tabla 5.4. Figuras de mérito de algunos parámetros de la validación. Los valores de precisión se indica como desviación estándar relativa (%RSD).

	Difilina	Teofilina	Proxifilina
Tiempos de migración medios (min)	4.95	5.57	6.12
Repetitividad (%)	0.8	0.9	0.6
Precisión intermedia (%)	1.8	1.9	2.2
Area corregida media	6.44	6.69	6.54
Repetitividad de inyección (%)	1.9	1.9	2.0
Repetitividad del método (%)	1.2	2.2	1.6
Precisión intermedia (%)	2.5	4.0	3.0
Resolución media		11.29	9.81
Repetitividad (%)		6.0	2.5
Precisión intermedia (%)		7.1	3.3
Recuperación media (%)	103	103	105
LD (mM)	0.013	0.010	0.011
LC (mM)	0.023	0.018	0.021

La linealidad del método se demuestra en el mismo intervalo (0.1-1mM) para los tres analitos mediante un test de ANOVA de la recta. Los resultados muestran que la varianza debida a la falta de ajuste es menor que el error aleatorio lo que confirma que la recta es un buen modelo para nuestros casos. Además la no significación de la ordenada en el origen para las tres rectas confirma la ausencia de errores sistemáticos en la calibración. A partir de los parámetros de la ordenada y desviación estándar del origen se calculan los valores del límite de detección(LD) y cuantificación (LC) tal y como se recomienda en la bibliografía⁹.

La exactitud del método se establece a través de un estudio de recuperación. Para ello a 6 alicuotas (aproximadamente 0.05g) del fármaco se le añaden cantidades perfectamente conocidas de teofilina, proxifilina y difilina del orden del 30% de la cantidad de analito esperada en la alicuota. Un test de diferencias prueba que la cantidad de analito recuperada y la cantidad de analito añadida no son estadísticamente diferente. Esto junto con las buenas recuperaciones medias confirma la exactitud del método.

La robustez del método se define como la capacidad del método para generar los mismos resultados a pesar de las pequeñas variaciones experimentales que se producen durante su aplicación. En nuestro caso, debido a que el método está ampliamente automatizado, es esperable cometer errores en la composición del BGE. Por lo tanto, se estudia el efecto de la concentración de tensioactivo, la concentración del BGE y el pH del BGE mediante un diseño factorial completo a dos niveles donde cada experiencia se realiza por duplicado (figura 5.13). Se examina la influencia de estos factores sobre el área corregida que es el parámetro clave desde el punto de vista cuantitativo sin embargo la resolución entre los analitos también puede limitar la aplicación del método de análisis.

La relación entre la respuesta y y los factores x_1, x_2, \dots queda descrito por la siguiente expresión desarrollada para cada variable:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + E \quad (5.2)$$

Donde β_0 es el valor medio de la respuesta estudiada, β_i el coeficiente de regresión que mide la magnitud del efecto causado por cada factor i , β_{ij} el coeficiente de regresión para la interacción entre dos factores y E el error experimental. A partir de las diferencias entre los replicados de cada punto del diseño se calcula el intervalo de confianza al 95% explicado por error experimental. Si el coeficiente del factor es menor que este intervalo se concluye que la variación en la respuesta causada por modificar este factor es menor que el error experimental y por tanto no significativo.

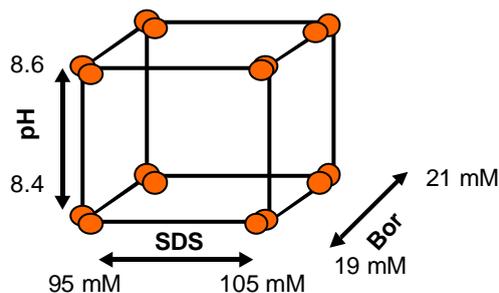


Figura 5.13. Dominio experimental y factores incluidos en el estudio de la robustez.

Los resultados muestran que ningún de los factores estudiados es significativo para las áreas corregidas de los tres analitos lo que confirma la robustez del método para fines cuantitativos. En la figura 5.14 se muestra a modo de ejemplo lo obtenido para el área corregida para la difilina, y la resolución.

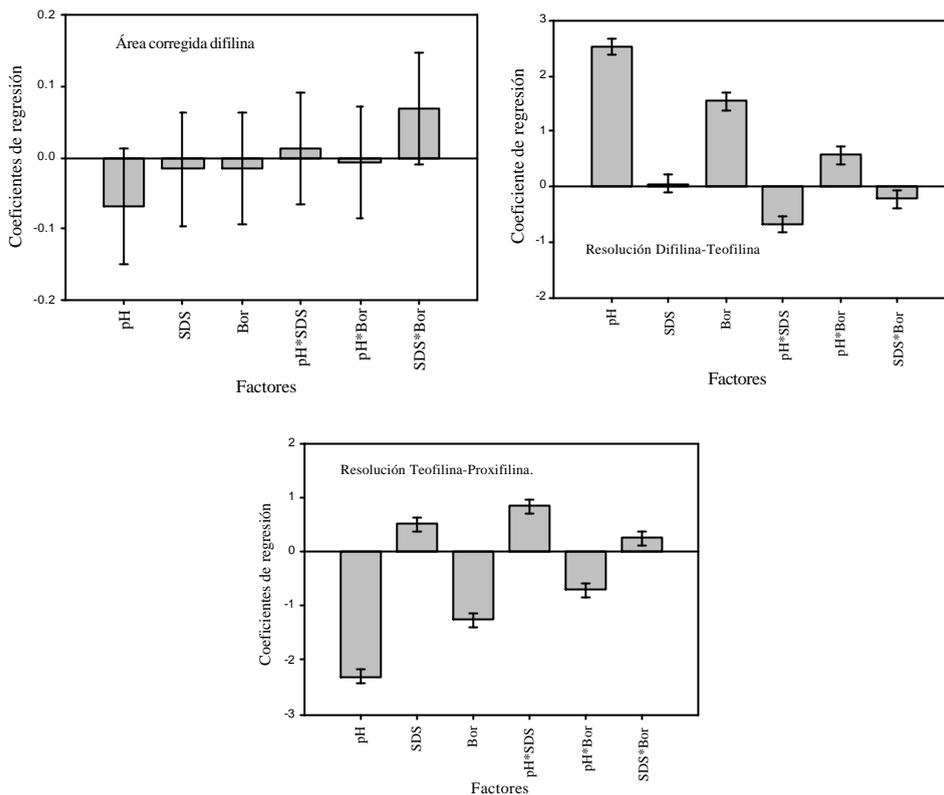


Figura 5.14. Resultados obtenidos en el estudio de la robustez

Los gráficos de la resolución muestran que el pH tiene un efecto significativo y de signo contrario sobre la resolución de ambos pares de analitos. La explicación reside en el incremento del grado de desprotonación y por tanto del tiempo de migración de la teofilina al aumentar el pH. Las xantina neutras no modifican su tiempo de migración y por tanto aumenta la resolución difilina-teofilina y se reduce la separación entre la teofilina y la proxifilina. El efecto del SDS concuerda con lo observado durante el desarrollo del método. La difilina y teofilina interaccionan poco con el SDS por que presentan carga negativa mientras que la proxifilina aumenta su tiempo de migración con este factor. En consecuencia aquellas experiencias realizadas a pHs elevados y concentración de SDS bajas pueden conducir al solapamiento de teofilina y proxifilina. En el dominio experimental ensayado esto no ocurre pero en un dominio más amplio se produce el solapamiento de ambos analitos en las experiencias llevadas a cabo a pH 8.7 y 90 mM de SDS.