

## ESTRATEGIAS EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA

M. Inés Toral\*, Sandra Orellana y Marta Saldías

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

César Soto

Departamento de Química Analítica e Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160C, Concepción, Chile

Recebido em 1/4/08; aceito em 2/7/08; publicado na web em 10/12/08

STRATEGIES USED TO DEVELOP ANALYTICAL METHODS FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS BY DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY. In this work is proposed, a simple experiment for the simultaneous determination of losartan (L) and hydrochlorothiazide (H) in synthetic and real samples by derivative spectrophotometry technique. For the students it is relevant to know this technique for simultaneous determinations of drugs, allowing that the students recognize that this technique is simple, rapid and applicable to quality control. This experimental work, it is proposed in order to being applied to undergraduates into laboratories of analytical chemistry. Furthermore, it is given the integration of the theoretical knowledge with the experimental work; this correlation is of interest for the students.

Keywords: derivative spectrophotometry; losartan; hydrochlorothiazide.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente el mercado farmacéutico tiene alcances mundiales, los progresos en ciencia y tecnología han llevado al desarrollo de numerosas drogas sintéticas de uso masivo. Debido a esto crece la necesidad de disponer de métodos para la determinación de compuestos activos de diversas formulaciones farmacéuticas.

Un ejemplo de éstos, lo constituyen los analgésicos y desinflamatorios. Dentro de este tipo de drogas cabe destacar a losartan (L) (2-n-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1-((2'-(1H-tetrazol-5-il)(bifenil-4-il)metil)) e hidroclorotiazida (H) (6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido) (Figura 1), su uso está ampliamente distribuido en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas, fabricadas por laboratorios de diferentes países. L, fármaco utilizado en el tratamiento de hipertensión, fue la primera de una nueva clase de fármacos, no-peptidos antagonistas del receptor angiotensina-II (tipo AT1).<sup>1-3</sup> H es un diurético de la clase de las benzotiadiazinas.<sup>4</sup> Recientes estudios han mostrado un aumento en la eficacia de L al ser administrado en conjunto con una baja dosis de H. Los efectos de ambas drogas demuestran una acción sinérgica, en especial en pacientes hipertensos.<sup>5-7</sup>

Se han reportado gran variedad de métodos para la determinación cuantitativa individual de L o en combinación con otras drogas en formulaciones farmacéuticas.<sup>8-11</sup> De forma similar se ha llevado a cabo la determinación individual de H, y en combinación con otras drogas utilizando diversas técnicas de análisis.<sup>12-19</sup>

Los métodos reportados en la determinación simultánea de L y H incluyen, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),<sup>20,21</sup> electroforesis capilar (CE), electro-cromatografía capilar (CEC),<sup>22,23</sup> espectrofotometría derivada<sup>24</sup> y de razón de espectros derivados.<sup>21</sup>

Los métodos de calibración multivariada, también han sido aplicados en la determinación simultánea en mezclas de drogas farmacéuticas, destacando; regresión de componentes principales (PCR) y regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS).<sup>25-28</sup>

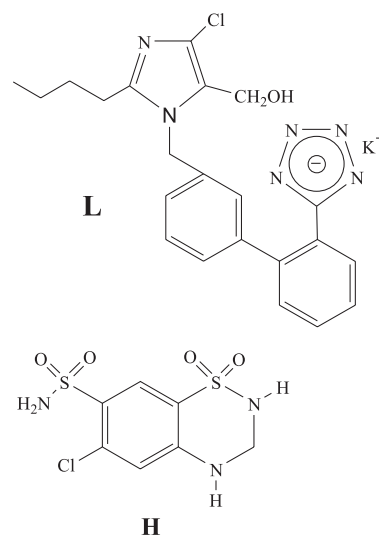


Figura 1. Estructura de losartan (L) e hidroclorotiazida (H)

En este trabajo se propone ilustrar el proceso que debe ser llevado a cabo durante una investigación analítica, para la determinación simultánea de drogas en formulaciones farmacéuticas, ejemplificadas con L y H. Esta metodología tiene la finalidad de ser aplicada en la enseñanza universitaria con el fin de fortalecer y enriquecer la formación integral en Química Analítica, ya que en este ejemplo se entregan las herramientas para resolver un problema analítico complejo.

Esta práctica experimental puede ser utilizada en cursos de análisis instrumental en carreras del área de la química, tales como licenciatura en química, química y farmacia, bioquímica, etc. Además, por la importancia de utilizar esta técnica, se han incorporado este tipo de prácticas en el área de la educación.<sup>29</sup>

### Espectrofotometría derivada

En la década de los 50, se introdujo la técnica de espectrofotometría derivada.

\*e-mail: analitic@uchile.cl

metría derivada, para solucionar aquellos sistemas en que diferentes analitos absorben en zonas cercanas, con la finalidad de obtener la estructura fina de las bandas espectrales. Esta técnica consiste en la representación gráfica del cociente diferencial  $dA/d\lambda$  para la primera derivada,  $d^2A/d\lambda^2$  para la segunda derivada, etc., en un intervalo determinado de longitud de onda. Más adelante en la década de los 80, la espectrofotometría derivada intensificó su uso, con la introducción de la diferenciación electrónica. La modalidad digital tuvo un mayor desarrollo, el cual consiste en utilizar los datos del espectro de absorción, almacenándolos en la memoria del microprocesador o en un computador en línea, para luego obtener las diferentes derivadas del espectro. Los espectros de orden cero son transformados en datos mediante un convertidor analógico digital, luego con un software son derivados, los cuales son transformados en un gráfico por un convertidor digital analógico.

En espectrofotometría derivada se mantienen todas las leyes de la espectrofotometría clásica, por ejemplo, la dependencia del valor derivado con la concentración de analito y la ley de aditividades. La diferenciación consiste en derivar la expresión de Lambert-Beer, con respecto a  $\lambda$ , obteniéndose la Ecuación 1:

$$D^n = \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} c b \quad (1)$$

donde  $D^n$  es el valor de derivada de orden  $n$  a una determinada longitud de onda  $\lambda$  (nm),  $\epsilon$  es el coeficiente de absorptividad molar ( $L\text{ cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ ),  $c$  concentración ( $\text{mol L}^{-1}$ ) y  $b$  es el paso de luz óptica (cm).

Como la ley de las aditividades se mantiene, los espectros derivados de una mezcla, son la suma de los espectros derivados de cada componente individual, Ecuación 2:

$$D^n_{\text{mix}} = D^n_1 + D^n_2 + \dots + D^n_n \quad (2)$$

donde el valor de derivada de orden  $n$  de la mezcla a una longitud de onda analítica,  $D^n_1, D^n_2, \dots, D^n_x$  son los valores de derivadas de orden  $n$  a una longitud de onda analítica del componente de la mezcla 1, 2, ...,  $n$ .

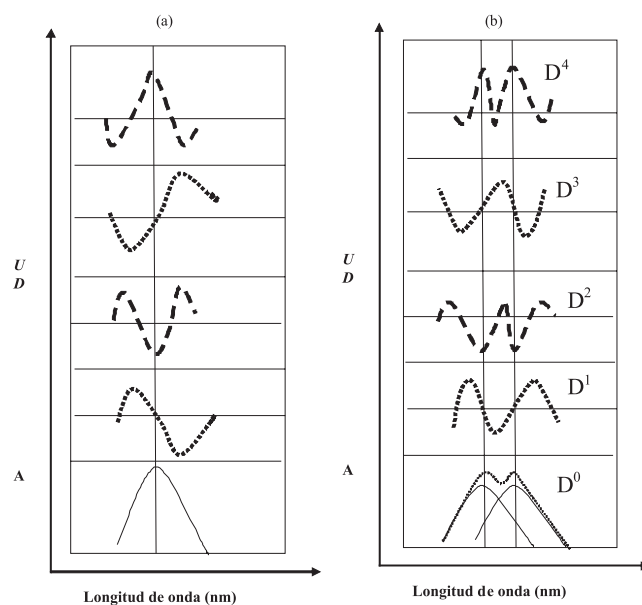
Para utilizar esta técnica se debe tomar en cuenta una diferencia mínima de 3 nm a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) que corresponden a los máximos de absorción de la mezcla de componentes derivados.

También es posible obtener espectros derivados de primer hasta cuarto orden del espectro de absorción, ( $A$  en función de  $\lambda$ ) (Figura 2).

Estas representaciones gráficas generalmente entregan detalles espectrales, los cuales no son observados en un espectro de orden cero o clásico, además permite realizar medidas para determinar simultáneamente la concentración de dos analitos o un analito en presencia de un interferente. En la resolución de espectros solapados por espectrofotometría derivada se debe considerar el orden de la derivada, ancho de las bandas adyacentes y la distancia de separación entre picos. Además, la selección del orden de la derivada, depende de la relación señal/ruido, la cual debe ser alta. Para satisfacer esta condición las derivadas de primer orden se ven privilegiadas frente a las de orden superior, siempre y cuando presenten bajo ruido de fondo.

La primera derivada es una banda de absorción simple, en la cual los puntos de inflexión del espectro clásico dan origen a un máximo y a un mínimo. La distancia vertical entre un máximo y un mínimo se denomina amplitud. El valor cero corresponde a la posición del máximo de absorción del espectro normal, corresponde a un punto llamado cruce-cero conocido como *zero crossing*.

La segunda derivada presenta puntos de inflexión del espectro original, los cuales se convierten en dos máximos, llamados satélites,



**Figura 2.** Espectros clásicos (Orden 0) y espectros derivados. Derivadas ( $D^n$ ): (a) Espectro clásico y sus derivadas de primer a cuarto orden de un analito. (b) Espectro clásico de una mezcla de analitos y sus derivadas de primer a cuarto orden

y el máximo de absorción en un mínimo, el cual coincide con el máximo de absorción del espectro de orden cero. La segunda derivada, generalmente, proporciona mayor información de la estructura fina del espectro, sin embargo, la sensibilidad disminuye.

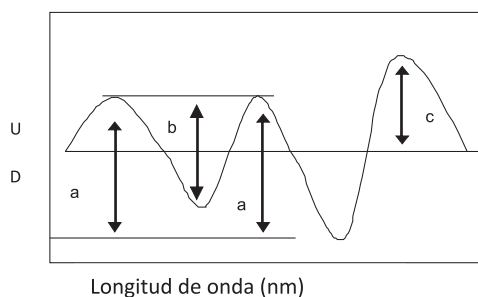
La tercera derivada presenta un mínimo seguido de un máximo, donde el cruce cero coincide con el máximo de absorción del espectro de orden cero.

La cuarta derivada presenta un máximo coincidente con la posición del máximo de absorción del espectro de orden cero.

Las derivadas de tercer y cuarto orden tienen menor aplicación analítica, debido a que aún cuando son más resueltas presentan un alto ruido de fondo, trayendo consigo una disminución de la relación señal/ruido. En este contexto, éstas serán seleccionadas sólo si las de primer y segundo orden no presentan zonas características para determinar cada analito.

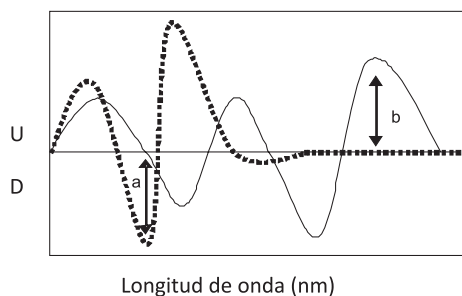
Evaluación de la señal analítica: puede realizarse mediante los siguientes métodos: Separación entre picos - utilizado de preferencia en derivadas de primer orden, se realiza midiendo la distancia entre un máximo y un mínimo vecinos. (Figura 3a); de la tangente - utilizado de preferencia en derivadas de segundo orden. Se realiza trazando una tangente entre dos máximos vecinos y midiendo la distancia paralelamente a la ordenada entre la tangente y el mínimo entre ambos máximos, permitiendo eliminar o rebajar la influencia del ruido de fondo (Figura 3b); separación entre la línea base y un máximo de un pico - utilizado en derivadas de diferentes órdenes. Corresponde a la distancia entre un máximo o mínimo y la línea base del espectro, sólo requiere una línea base bien definida (Figura 3c).

Métodos de cuantificación: cruce cero - se utiliza el valor absoluto del eje y del espectro derivado del compuesto A, a una longitud de onda donde el compuesto B, o de una especie que se requiera eliminar la interferencia, debe presentar un valor igual a cero en el eje x. En estas condiciones cuando ambos compuestos estén presentes, a tal longitud de onda toda la absorción puede ser atribuida al compuesto A. Para determinar B se utiliza el mismo protocolo a una longitud de onda donde la señal en el eje x de la derivada del compuesto A sea cero. Las medidas realizadas a esa longitud de onda en el espectro de



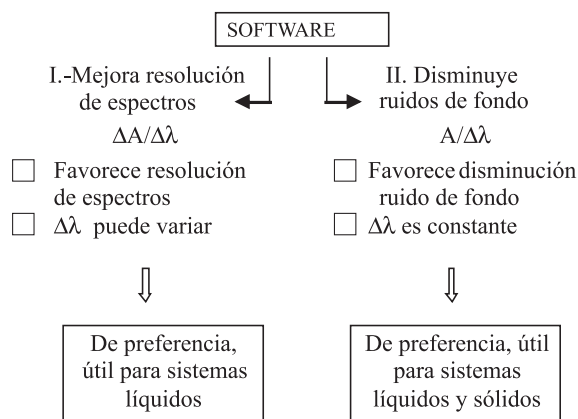
**Figura 3.** Proceso de evaluación de la señal analítica. (a) Método de separación entre picos, (b) Método de la tangente y (c) Método de separación entre la línea base y un pico

la mezcla, podrán ser función solamente de la concentración del compuesto que se analiza. Cabe destacar que todas estas distancias pueden ser expresadas en unidades de longitud (cm o mm) o en unidades de derivadas (UD) (Figura 4); gráfico - en este método uno de los analitos (A) presenta un rango de longitud de onda en que no presenta señal, pudiendo evaluarse el otro analito (B) en dicho rango, para favorecer la sensibilidad debe seleccionarse la longitud de onda en que la señal de B sea más alta (Figura 4).



**Figura 4.** Métodos de cuantificación de la señal analítica. (a) Método de cruce-cero (zero crossing), (b) Método gráfico

Debido a que la espectrofotometría derivada utiliza un software (Figura 5), es posible utilizar diferentes formas de obtener las derivadas, sin embargo existen dos principales: las derivadas se obtienen mediante la evaluación de dos columnas (A y  $\lambda$ ) y corresponde a  $\Delta A/\Delta \lambda$ . El valor de  $\Delta \lambda$  puede ser variado, para llevar a cabo la diferenciación del espectro de orden cero. En este tipo de derivada, se puede modular el valor de  $\Delta \lambda$  y preferentemente, se debería utilizar cuando los espectros son muy solapados. Sin embargo, siempre es necesario tomar en cuenta el ruido de fondo asociado; las derivadas se obtienen mediante la evaluación de una columna (A) y el valor de  $\Delta \lambda$  es constante y representa al rango de barrido de espectro y la derivada corresponde a  $A/\Delta \lambda$ . Este tipo de espectrofotometría derivada está basada en el modelo matemático propuesto por Savitzky-Golay, en el cual la diferenciación y el suavizado, se llevan a cabo por la resolución de mínimos cuadrados de un polinomio, lo cual minimiza el ruido de fondo asociado.<sup>30</sup> En este trabajo se utilizará esta última modalidad de derivada, para lo cual se deben optimizar las siguientes variables: orden de la derivada - obtención de máxima resolución y sensibilidad, sin sacrificar la relación señal/ruido. A medida que el orden de la derivada aumenta, disminuye la señal, pero la resolución y el ruido aumentan, mientras que la relación señal/ruido decrece; factor de suavizado - corresponde al número de puntos utilizados para la diferenciación. Si su valor aumenta disminuyen la señal analítica, así como el ruido de fondo. Su selección debe comprometer máxima sensibilidad, alta relación señal/ruido y ausencia de efectos de distorsión (deformación de la banda); factor de escala - éste amplifica la señal



**Figura 5.** Modalidades de espectrofotometría derivada

entre 1 a  $10^{11}$  veces, aumenta la señal analítica y el ruido de fondo en la misma proporción. Este factor sólo incide en obtener una buena lectura de la señal analítica y no altera los límites de detección y cuantificación, debido a que la pendiente aumenta en la misma medida que la desviación estándar del blanco; longitud de onda analítica ( $\lambda$ ) - su selección se lleva a cabo utilizando como criterios, la minimización del ruido de fondo, la proporcionalidad entre las concentraciones y los valores de la ordenada en unidades de derivadas (UD). A partir de estos conceptos, se evidencia que los efectos son contrapuestos, por lo que para lograr una mayor eficiencia en espectrofotometría derivada, es fundamental la experiencia en la optimización de los parámetros asociados a ella. Para seleccionar las condiciones espectrales hay que tomar un compromiso, en donde se favorezca la selectividad y sensibilidad, sin comprometer la calidad de la señal, para lo cual se debe exigir una alta relación señal/ruido.

En general, todos los parámetros se interrelacionan entre sí, por lo tanto, deberá buscarse un equilibrio entre ellos.

En lo referente a la resolución de los espectros, la espectrofotometría derivada presenta una gran ventaja ya que la estructura fina que normalmente es difícil de observar en un espectro de orden cero, se resuelve mejor en espectros derivados. En la práctica, esto puede presentar utilidad, ya sea, para fines de identificación, criterios de pureza, o bien en el uso de control de calidad.

Esta técnica se utiliza tanto en la espectrofotometría UV-visible como también en espectroscopia IR, de absorción atómica, fotometría de llama y en fluorometría.<sup>31,32</sup>

Los objetivos del presente trabajo son: introducir al alumno en un método de análisis instrumental por medio de la resolución de un problema analítico complejo; conocer y aplicar conceptos, teoría y metodología de la técnica de espectrofotometría derivada; determinar cuantitativamente L y H simultáneamente, en formulaciones farmacéuticas (Tabletas); realizar el siguiente trabajo experimental, siguiendo el protocolo analítico para análisis cuantitativo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Aparatos e instrumentos

Para realizar las mediciones de absorbancia fue utilizado un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 y celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico. Los espectros fueron registrados entre 190-400 nm y leídos contra disolvente, usando 0,2 y 480  $\text{nm min}^{-1}$  como intervalo de muestreo y velocidad de barrido, respectivamente.

El procesamiento de los datos espectrales se realizó por medio del programa Shimadzu versión 3.7 (P/N 206-60570-04). Las muestras sólidas se masaron en una balanza Sartorius R 200D con  $\pm 0,01$  mg de incertidumbre.

## Reactivos

Todos los reactivos fueron de calidad analítica. L (98,2%) y H (101,2%) fueron proporcionados por el Laboratorio Chile, Santiago de Chile. Disoluciones stock de concentración  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de L y H se prepararon disolviendo 14,9 y 23,1 mg de cada compuesto en 50 mL de acetonitrilo. Otros rangos de concentraciones fueron preparados por dilución apropiada usando el mismo disolvente. Para el estudio del efecto del disolvente sobre la conducta espectral de los analitos, se prepararon disoluciones stock  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de L y H, disolviendo la misma cantidad antes descrita para cada droga en disolventes diferentes. Otros rangos de concentración fueron preparados por dilución apropiada usando el disolvente respectivo.

## Procedimientos

### Calibración y determinación de L y H en mezclas

Alícuotas de las disoluciones stock de L y H fueron diluidas simultáneamente en acetonitrilo, obteniéndose disoluciones con rango de concentración entre  $1,0 \times 10^{-5}$  -  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. El procedimiento de calibración se llevó a cabo para cada compuesto en presencia de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de L y H, respectivamente. En todos los casos, los valores absolutos correspondientes a los espectros de las primeras derivadas, fueron obtenidos a 244,6 y 332,0 nm para L y H, respectivamente, para luego ser graficados contra las concentraciones correspondientes.

### Determinación simultánea de L y H en mezclas simuladas con diferentes relaciones en masa

Las disoluciones stock para cada compuesto fueron preparadas en acetonitrilo, para posteriormente ser diluidas apropiadamente hasta obtener proporciones en masa entre 1:4 y 4:1, para L:H. Para cada disolución se realizaron cinco repeticiones. Luego se evaluaron los espectros de las primeras derivadas, determinando la concentración de cada compuesto, permitiendo calcular la desviación estándar relativa (DER) y los valores correspondientes a las recuperaciones.

### Estudios de foto estabilidad para L y H

Disoluciones stock de una mezcla de L y H, conteniendo  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> en acetonitrilo, fueron usadas en el estudio de foto-estabilidad. Las disoluciones fueron expuestas a luz directa, indirecta y oscuridad. Se evaluaron las señales de los espectros derivados de primer orden, cada 30 min durante 5 h y luego a 24 h.

### Determinación simultánea de L y H en formulaciones farmacéuticas (Tabletas)

Diez tabletas de Simperten-D (Laboratorio Chile) fueron masadas y pulverizadas. Se disolvieron 262,4 mg en 100 mL de acetonitrilo. La disolución se agitó 20 min, para luego centrifugar por 3 min, se midieron 200 µL del sobrenadante diluyéndolos en acetonitrilo a 10 mL, para posteriormente ser evaluados por espectrofotometría derivada de primer orden.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En síntesis, el desarrollo del método requiere de diferentes etapas. En primer término se llevó a cabo la selección del disolvente, para lo cual se realiza un estudio para verificar la solubilidad de los analitos a concentración  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, a objeto de preparar las disoluciones stock y luego preparar las diluciones necesarias. Además, se estudia el efecto del disolvente sobre las conductas espectrales de L y H. Una vez seleccionado el disolvente, se realiza el estudio de foto-estabilidad de los compuestos. En segundo término corresponde seleccionar las

variables espectrales, los valores óptimos de éstas son necesarios para la obtención de los parámetros analíticos, asegurando con esto la calidad de los resultados. En la última etapa se debe verificar el efecto de los probables interferentes. Establecidas todas estas condiciones, el método desarrollado puede ser aplicado en muestras reales, como por ejemplo, en formulaciones farmacéuticas.

L y H son compuestos orgánicos con actividad farmacéutica y debido a las diferencias estructurales que presentan, su conducta espectral y solubilidad deberían ser diferentes. La solubilidad de L es favorecida en disolventes orgánicos polares, en cambio H es menos soluble en este tipo de disolventes.

En el estudio del efecto del disolvente sobre la conducta espectral, se usaron: acetonitrilo (ACN), etanol (ET), metanol (ME), agua (desionizada), HCl  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> y NaOH  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. En estos disolventes se encontraron bandas espectrales totalmente solapadas, razón por la cual, se usó la técnica de espectrofotometría derivada, debido a que permite resolver exitosamente este tipo de espectros.<sup>33,34</sup>

Sin embargo, los espectros de absorción obtenidos en ACN y ET son más sensibles y definidos. En la Figura 1S (a,b – material suplementario) se muestran ampliaciones de las primeras derivadas de L y H en ACN y ET. En ACN, L no presenta señal analítica entre 320 y 400 nm, en cambio H presenta señal analítica en dicho rango. Sin embargo en ET, L presenta señal analítica en el mismo rango de longitud de onda, por lo que no es posible la determinación de H, razón por la cual, ACN fue seleccionado para llevar a cabo la determinación simultánea de L y H.

Para determinar la foto-estabilidad de L y H en ACN, se utilizaron mezclas de L y H,  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, dichas disoluciones fueron expuestas a luz directa, indirecta y a la oscuridad. En todos los casos, no se evidenció degradación fotoquímica, ya que las señales espectrales permanecieron constantes.

## Selección de variables espectrales

### Orden de la derivada

Como se muestra en la Figura 2S (material suplementario), los espectros de orden cero de ambas drogas se encuentran solapados, pudiéndose solamente determinar H en presencia de L por el método gráfico. Debido a que el objetivo es la determinación simultánea de ambas drogas, se utilizó la técnica de espectrofotometría derivativa digital. La optimización del orden de la derivada se llevó a cabo, con disoluciones que contienen a cada droga, registrando las derivadas de primer hasta cuarto orden para cada una de ellas (Figura 3Sa-d, material suplementario). Al comparar los espectros derivados obtenidos, se observa que las derivadas de primer orden presentan la más alta sensibilidad y regiones espectrales definidas para cada droga, por lo cual es factible la determinación simultánea de ambos analitos. Sobre la base de estas características se seleccionó dicho orden de derivada. Los órdenes superiores de derivada no fueron considerados debido a que, presentaban baja sensibilidad y relación señal/ruido.

### Selección del factor de suavizado y del factor de escala

Usando la derivada de primer orden, los valores del factor de suavizado utilizados son definidos por defecto dependiendo del valor de  $\Delta\lambda$ . Para un  $\Delta\lambda = 210$  nm, los valores del factor de suavizado entregado por el software son los siguientes:  $2,0 \times 10^3$ ,  $4,0 \times 10^3$ ,  $8,0 \times 10^3$  y  $16,0 \times 10^3$ . Al aumentar el factor de suavizado, tanto las alturas del espectro derivado como el ruido disminuyen, produciendo un aumento en la razón señal/ruido. Con el objeto de disminuir el error del método se seleccionó  $16,0 \times 10^3$  como valor óptimo para el factor de suavizado, aún cuando las sensibilidades disminuyan. Usando la derivada de primer orden y un factor de suavizado de  $16,0 \times 10^3$ , los factores de

amplificación de escala estudiados fueron entre  $1,0 \times 10^2$  y  $1,0 \times 10^6$ . Se seleccionó  $1,0 \times 10^4$ , ya que favorece la lectura, disminuyendo su error asociado, en este caso las bandas espectrales no presentan efecto de distorsión, ya que mantienen su forma y posición.

### Selección de la longitud de onda analítica

Utilizando la derivada de primer orden, factor de suavizado  $16,0 \times 10^3$  y factor de amplificación de escala  $1,0 \times 10^4$ , la derivada de H presenta tres cruce-cero a 244,6, 268,4 y 297,0 nm (Figura 4S - material suplementario). Cuando ambas drogas están simultáneamente presentes, las señales analíticas en estas longitudes de onda pueden ser atribuidas a L. Se seleccionó 244,6 nm, debido a que, a esta longitud de onda, L presenta una señal analítica alta. Tomando en consideración que L no absorbe en un rango longitudes de onda entre 325,0 a 400,0 nm, la determinación de H se realizó por medio del método gráfico, para lo cual fue seleccionado 332,0 nm, debido a que H presenta la más alta señal analítica.

Por otra parte, en la Figura 4S se observa que el cruce-cero a 244,6 nm es independiente de la concentración de H y la señal de L aumenta proporcionalmente con su concentración. A 332,0 nm la señal de L es cero y la de H aumenta proporcionalmente con su concentración. Estos resultados confirman las longitudes de onda analíticas seleccionadas anteriormente.

### Parámetros analíticos

A partir de la derivada de primer orden y utilizando  $16,0 \times 10^4$  como factor de suavizado,  $1,0 \times 10^4$  como factor de amplificación de escala y  $\Delta\lambda = 210$  nm, se construyeron las curvas de calibración graficando el valor de unidades de derivadas (UD) del espectro de primer orden,  $h_1$  para L ( $\lambda = 244,6$  nm) y  $h_2$  para H ( $\lambda = 332,0$  nm) versus las respectivas concentraciones de los analitos (Tabla 1).

Los parámetros analíticos fueron obtenidos usando el criterio dado por ICH Harmonized Tripartita<sup>35</sup> Para determinar los límites de detección y cuantificación (LD y LC), se utilizaron las siguientes ecuaciones:  $3,3 \sigma/S$  y  $10 \sigma/S$ , respectivamente, donde S es la pendiente de la curva de la calibración y  $\sigma$  es la desviación estándar correspondiente al registro de 11 blancos independientes.

La repetibilidad expresada como desviación estándar relativa (DER), se obtuvo usando 9 muestras que contenían  $1,0 \times 10^{-5}$ ,  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de cada droga por triplicado para cada concentración. El rango de determinación se definió entre el LC y la pérdida de linealidad de las curvas de calibración (Tabla 1).

Para establecer las proporciones, en las cuales un analito puede ser determinado en presencia de otro, se llevó a cabo la recuperación de muestras que contienen diferente proporción de concentración de L y H (Tabla 2). Es posible determinar la concentración de cada analito, si la proporción de las mezclas está entre 4:1 y 1:4 para L: H, respectivamente. Cabe destacar que, el método desarrollado es aplicable a proporciones similares a las presentes en formulaciones farmacéuticas.

En el estudio de interferentes, se utilizaron excipientes de uso común (estereato-gelatina de magnesio 3-5% y lactosa-almidón 95-97%). Las recuperaciones fueron  $100,6 \pm 1,7$  y  $97,4 \pm 2,0\%$  para L y H, respectivamente. De estos resultados es posible establecer que los excipientes comunes en formulaciones farmacéuticas no interfieren en el método propuesto.

### Aplicación del método propuesto

Finalmente, fue analizado el contenido de L y H en las tabletas Simperten-D (Laboratorio Chile). Esta formulación farmacéutica

**Tabla 1.** Parámetros analíticos

Parámetros Analíticos	Losartan	Hidroclorotiazida
Longitud de onda analítica [nm]	244,6	332,0
LD <sup>a</sup> (mol L <sup>-1</sup> )	$2,61 \times 10^{-7}$	$2,84 \times 10^{-7}$
LC <sup>b</sup> (mol L <sup>-1</sup> )	$8,70 \times 10^{-7}$	$9,48 \times 10^{-7}$
Rango de determinación (mol L <sup>-1</sup> )	$8,70 \times 10^{-7} - 1,00 \times 10^{-4}$	$9,48 \times 10^{-7} - 1,00 \times 10^{-3}$
Repetibilidad (DER, %)	0,18	1,17
Ecuaciones de regresión lineal <sup>c</sup>	$h_1 = 6,46 \times 10^6 C - 1,29$	$h_2 = 1,34 \times 10^6 C - 0,18$
Coefficiente de correlación	0,999	0,999

<sup>a</sup> Criterio 3,3  $\sigma$ . <sup>b</sup> Criterio 10  $\sigma$ . <sup>c</sup> Con  $h$ , en unidades de derivada, y C concentración del analito en molL<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.** Determinación de L y H en mezclas con diferentes proporciones en masa

L : H	Masa adicionada (mg)		Masa encontrada (mg) (recuperación, %) <sup>a</sup>	
	L	H	L	H
1:4	0,46	1,19	0,47 (102,2)	1,18 (99,2)
1:3	0,46	0,89	0,47 (102,2)	0,88 (98,9)
1:2	0,46	0,59	0,45 (97,8)	0,61 (103,4)
1:1	0,46	0,29	0,46 (100,0)	0,29 (100,0)
2:1	0,92	0,29	0,88 (95,6)	0,28 (96,6)
3:1	1,38	0,29	1,38 (100,0)	0,29 (100,0)
4:1	1,84	0,29	1,79 (97,3)	0,29 (100,0)

<sup>a</sup> Promedio de cinco determinaciones, en todos los casos DER fue menor al 5%

contiene 50,0 mg de L y 12,5 mg de H. Siguiendo el procedimiento propuesto, L presentó un promedio de masa  $50,5 \pm 0,2$  mg y H  $12,4 \pm 0,2$  mg. Los excipientes presentes en este medicamento son: celulosa microcristalina, lactosa, almidón glicolato sódico, estearato de magnesio y el recubrimiento de las pastillas presenta los siguientes compuestos: hidroxipropilmetilcelulosa, triacetina, óxido de hierro amarillo y dióxido de titanio. Estos compuestos no presentan interferencia sobre la señal analítica, debido a que se mantienen precipitados.

### Aportes didácticos a considerar

Para realizar el informe de este práctico, los estudiantes podrían destacar los siguientes puntos adicionales: explicar como este experimento presenta los efectos empíricos de la teoría de absorción molecular (Ley de Beer); explicar el efecto del disolvente sobre los espectros clásicos de los analitos; ¿cuál es la importancia de desarrollar nuevos métodos para la cuantificación de fármacos?; proponer un espectro clásico y postular cuales serían las derivadas de primer y segundo orden; proyectar la importancia de la química analítica en el desarrollo de la ciencia y la tecnología a nivel de políticas mundiales y nacionales; en los trabajos experimentales debe fomentarse el interés del estudiante por el medio ambiente, debido a esto debe tomar conocimiento de los protocolos a seguir para los residuos obtenidos en este trabajo práctico. Para lograr este objetivo, los residuos deberán ser almacenados en diferentes envases debidamente

rotulados, para posteriormente ser recuperados por rotavaporación o destilación fraccionada, lo que significa un ahorro económico, además de evitar la agresión al medio ambiente. Esta acción puede conducir a la formación de buenos hábitos en el trabajo experimental; la impresión de los alumnos del presente práctico, es de asombro ya que en el desarrollo de métodos por espectrofotometría derivada, no se pueden dar reglas rígidas, sino que se requiere creatividad para las optimizaciones de las variables químicas y propias de la técnica, debido a que se presentan efectos contrapuestos en dicho proceso, por lo cual se necesita un buen criterio en la selección de éstas, lo que se logra con la realización exhaustiva del trabajo experimental.

## CONCLUSIONES

La simbiosis entre los conocimientos teóricos y la aplicación de éstos en la resolución de problemas reales, es presentada en este trabajo.

En el trabajo experimental, se resaltó la importancia de la aplicación de la técnica de espectrofotometría derivada en el análisis cuantitativo de formulaciones farmacéuticas, en donde L y H fueron determinados simultáneamente y aplicado en muestras sintéticas y reales.

El método desarrollado es rápido, simple, de bajo costo y útil para el control de calidad en trabajos rutinarios de laboratorio.

Mediante el desarrollo de este método, resulta posible motivar y dar a conocer a los alumnos que las ciencias básicas no solamente resuelven problemas lejanos, sino que también de la vida cotidiana, de esta forma las ciencias y en particular la química analítica logran este objetivo, para con esto hacer más atractiva esta disciplina.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

Las figuras identificadas con S en el texto, están disponibles en <http://quimicanova.s bq.org.br>

## AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (FONDECYT) proyecto N°1070905 y a la Dirección de Investigación, de la Universidad de Concepción proyecto DIUC N° 204.021.021-1.0, por el apoyo financiero, y al Laboratorio Chile por proporcionar las drogas puras.

## REFERENCIAS

- Schoenberger, J. A.; *J. Hypertens.* **1995**, *13*, S43.
- Timmermans, P.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Smith, R. D.; *J. Hypertens.* **1995**, *13*, S1.
- Munafò, A.; Christen, Y.; Nussberger, J.; Shum, L. Y.; Borland, R. M.; Lee, R. J.; Waeber, B.; Biollaz, J.; Brunner, H. R.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1992**, *51*, 513.
- Dollery, C.; *Therapeutic Drugs*, 2<sup>nd</sup> ed., Churchill Livingstone: London, 1999, H 52.
- Ruilope, L. M.; Simpson, R. L.; Toh, J.; Arcuri, K. E.; Goldberg, A.; Sweet, C. S.; *Blood Press* **1996**, *5*, 32.
- Soffer, B. A.; Wright, Jr J. T.; Pratt, J. H.; Wiens, B.; Goldberg, A.; Sweet, C. S.; *Hypertension* **1995**, *26*, 112.
- Oparil, S.; Aurup, P.; Snaveley, D.; Goldberg, A.; *Am. J. Cardiol.* **2001**, *87*, 721.
- Prabhakar, A. H.; Giridhar, R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 861.
- Lastra, O. C.; Lemus, I. G.; Sánchez, H. J.; Pérez, R. F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 175.
- Cagigal, E.; González, L.; Alonso, R. M.; Jiménez, R. M.; *Talanta* **2001**, *54*, 1121.
- Polinko, M.; Riffel, K.; Song, H.; Man-Wai, Lo; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 73.
- Takubo, T.; Okada, H.; Ishii, M.; Hara, K.; Ishii, Y.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *806*, 199.
- Abdel, R. O.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 433.
- Murillo, J. A.; Alañón, A.; Pérez-Olivares, G.; *Anal. Chim. Acta* **2004**, *518*, 37.
- Huang, T.; He, Z.; Yang, B.; Shao, L.; Zheng, X.; Duan, G.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 644.
- Dinc, E.; Baleanu, D.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 715.
- Hillaert, S.; Van den Bossche, W.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 329.
- Bebawy, L. I.; Abbas, S. S.; Fattah, L. A.; Refaat, H. H.; *Farmaco* **2005**, *60*, 859.
- Vetuschi, C.; Giannandrea, A.; Carlucci, G.; Mazzeo, P.; *Farmaco* **2005**, *60*, 665.
- Hertzog, D. L.; Finnegan, McCafferty J.; Fang, X.; Jeffrey, Tyrrell R.; Reed R. A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 747.
- Erk, N.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 603.
- Quaglia, M. G.; Donati, E.; Carlucci, G.; Mazzeo, P.; Fanali, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 981.
- Balestros, M.; Faria, A.; Olivveira, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 554.
- Vetushi, C.; Giannandrea, A.; *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 1051.
- Contreras, D.; Freer, J.; Rodriguez, J.; *Int. Biodeter. Biodegr.* **2006**, *57*, 63.
- Kalivas, J. H.; *Anal. Lett.* **2005**, *38*, 2259.
- Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Talanta* **1998**, *47*, 103.
- Lemus, J. M.; Perez, J.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, *460*, 89.
- Aberásturi, F.; Jiménez, A. I.; Jiménez, F.; Arias, J. J.; *J. Chem. Edu.* **2001**, *78*, 793.
- Savitzky, A.; Golay, M.; *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627.
- Pandey, S. N.; *Text. Res. J.* **1989**, *59*, 226.
- Wang, H. Y.; Xiao, Y.; Han, J.; *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 537.
- Toral, M. I.; Muñoz, M. A.; Orellana, S. L.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1173.
- Toral, M. I.; Tassara, A.; Soto, C.; Richter, P.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 241.
- Validation of Analytical Procedures: Methodology*; 1997, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland. ICH Q2B.

ESTRATEGIAS EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA

M. Inés Toral\*, Sandra Orellana y Marta Saldías

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile

César Soto

Departamento de Química Analítica e Inorgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160C, Concepción, Chile

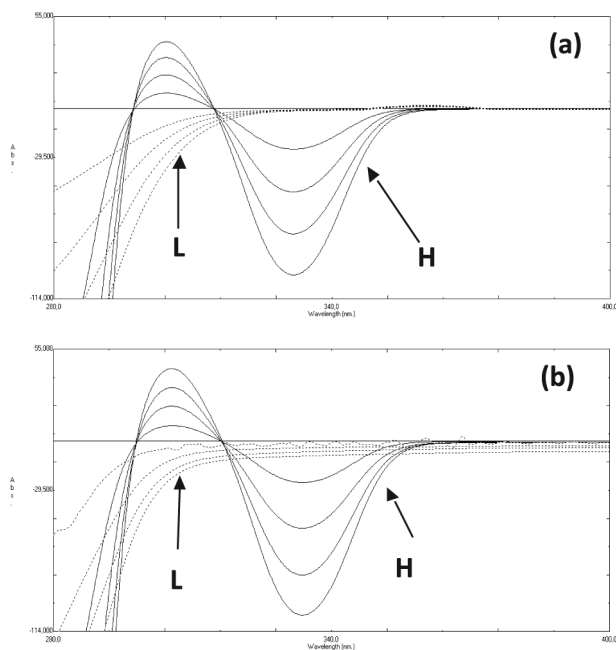


Figura 1S. Ampliación de las primeras derivadas de los espectros clásicos de L y H en: a) ACN y b) ET. Concentraciones entre  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

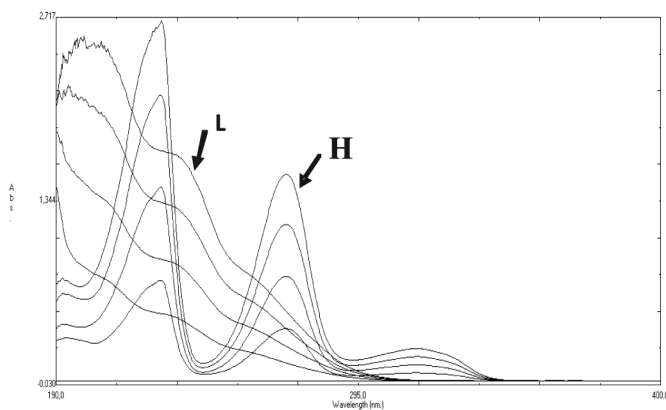


Figura 2S. Espectro de orden cero de L y H en ACN. Concentraciones entre  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

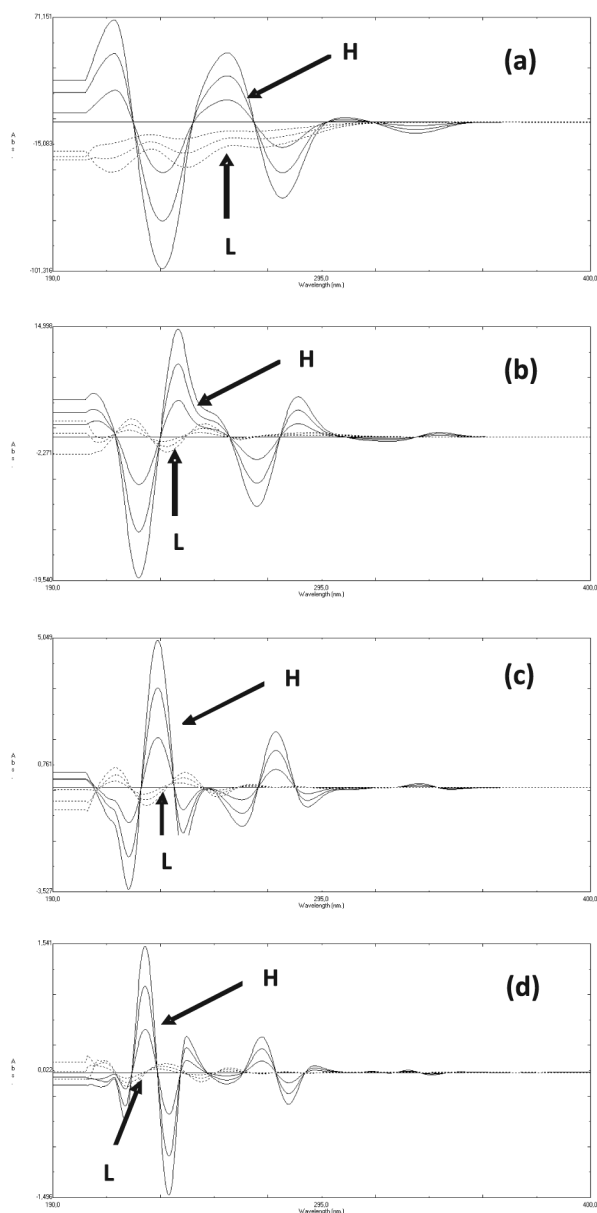


Figura 3S. Espectros derivados de L y H. a) Primer orden, b) segundo orden, c) tercer orden d) cuarto orden. Concentraciones entre  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

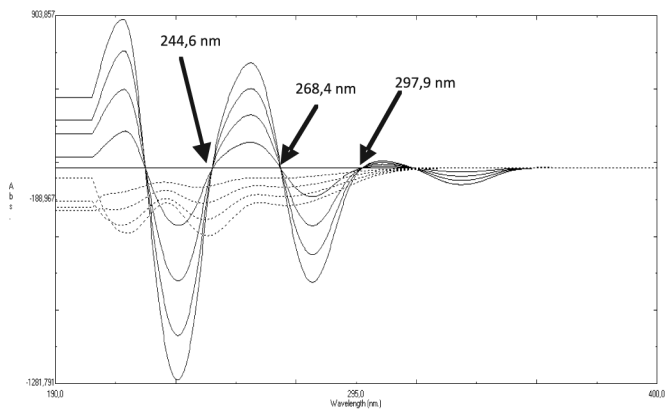


Figura 4S. Espectros de primer orden de L y H. Rango de concentración entre:  $2,0 \times 10^{-5}$  y  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$