

QUIMIOMETRÍA APLICADA AL CONTROL DE CALIDAD DE FÁRMACOS

MARÍA DE LA LUZ SALAZAR,** PEDRO L. LÓPEZ DE ALBA,*** ALFREDO PIÑEYRO LÓPEZ,* NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES**

La química analítica se ha desarrollado notoriamente en los últimos años con el uso de las técnicas quimiométricas, las cuales se basan en el tratamiento matemático de datos. De las técnicas quimiométricas más empleadas por los espectroscopistas se cuentan el uso de derivadas para el procesamiento de señales espectrales¹⁻⁸ y la calibración multivariante en sus diferentes versiones algorítmicas.⁹⁻¹² Estas técnicas son útiles para la cuantificación de compuestos en mezclas complejas, cuando, dadas las características espectrales que poseen, no se pueden resolver por los métodos de espectroscopía tradicionales.

En los últimos años en el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL existe una línea de investigación encaminada al estudio de los componentes presentes en las plantas del género *Karwinskia*. En particular, uno de estos compuestos que ahora recibe el nombre de peroxisomicina A1 (PA1) (figura 1), ha llamado la atención debido a su posible uso anti-neoplásico. Actualmente se encuentra en experimentación en fase clínica I.¹³ Por esta razón se ha estado trabajando en su aislamiento y purificación, lo cual conllevó a la necesidad de asegurar la calidad del producto obtenido.

Las pruebas que se plantearon inicialmente para el control de calidad de la PA1 se clasificaron en biológicas y fisicoquímicas.

Los ensayos fisicoquímicos incluían el punto de fusión, la cromatografía en capa fina y la cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa, así como el análisis espectrofotométrico UV-visible, donde se determinaba la relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes en los espectros de orden cero.

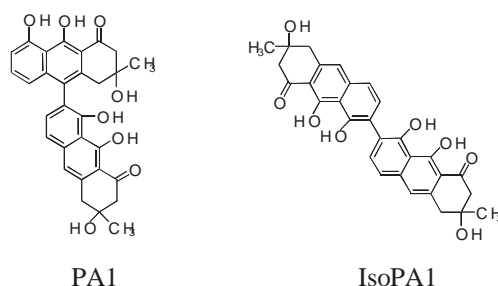


Fig. 1. Estructuras químicas de los compuestos en estudio.

Se planteó la necesidad de mejorar las técnicas analíticas existentes, con el fin de aumentar los límites de detección de uno de los contaminantes que con mayor frecuencia se presenta en los lotes de la PA1. Se trata de un isómero de posición de la PA1 conocido como isoperoxisomicina A1 (IsoPA1) (figura 1).

El objetivo del presente trabajo fue aplicar métodos Quimiométricos en Espectrofotometría UV-visible y en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para mejorar el control de calidad de la PA1.

Métodos

Los espectros UV-visibles fueron obtenidos en un espectrofotómetro Beckman DU 7500 de arreglo de diodos. Los cromatogramas se obtuvieron en un cromatógrafo de Líquidos HP 1090 con detector de

*Departamento de Farmacología y Toxicología.

** Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina, UANL.

*** Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato.

arreglo de diodos y en columnas de fase reversa. La manipulación de los datos tanto espectroscópicos como cromatográficos se realizó empleando el programa Galactic GRAMS 32 v5.

Espectroscopia UV-visible

Las características espectrales de la PA1 y la isoPA1 son muy semejantes (figura 2a), por lo que fue necesario recurrir al empleo de espectros derivados (figura 2b) para realizar la cuantificación por espectrofotometría UV-visible.

Se desarrollaron dos métodos que permitieron la cuantificación de IsoPA1 en los lotes de PA1: la espectroscopia de derivadas y la calibración multivariante.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Por CLAR se establecieron las condiciones del análisis de pureza del pico cromatográfico y se desarrolló un método de cuantificación de IsoPA1 en los lotes de PA1 mediante la técnica de adición estándar. Dada la poca resolución de las señales cromatográficas de los compuestos, en este caso se trabajó con los cromatogramas derivados (en primera derivada).

Resultados y discusión

Espectroscopia UV-visible

Por espectroscopia de derivadas se trabajó inicialmente con la técnica de cruce al cero. Esta técnica está basada en la cuantificación del compuesto de interés a una longitud de onda a la que los otros compuestos no presenten respuesta. Inicialmente se establecieron las condiciones para la cuantificación tanto de la PA1 como de la IsoPA1 en mezclas preparadas en concentraciones semejantes para ambos compuestos. Sin embargo, al momento de aplicarlo en muestras reales, en las que la proporción del contaminante (IsoPA1) es menor (0.5 a 3%), la técnica de cruce al cero no proporcionó buenos resultados. Por este motivo se buscó una alternativa, empleando los mismos espectros derivados. El método desarrollado consistió en construir curvas de calibración de isoPA1 en una matriz de PA1 en un intervalo de concentraciones entre 0 y 10% de

isoPA1 respecto a PA1. La curva de calibración se construyó con los datos obtenidos de las derivadas de los espectros empleando como datos del eje "Y", el cociente de las respuestas a las longitudes de onda de 285 y 277 nm.

El otro método utilizado para la cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1 fue la calibración multivariante. La ventaja que presentan los métodos de calibración multivariante sobre los métodos tradicionales, es que en lugar de utilizar un solo punto del espectro para realizar la cuantificación, emplea todo un intervalo espectral para realizar el análisis.

Para la cuantificación de IsoPA1 mediante la calibración multivariante, se construyó una matriz de calibración con 20 experimentos y 2 componentes (PA1 e IsoPA1), en concentraciones dentro de un intervalo de linealidad establecido previamente. En este caso también se trabajó con los espectros derivados (derivada de primer orden). Se seleccionaron los intervalos espectrales y el número óptimo de factores para el análisis. La calibración se realizó empleando el método de Análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales, PLS1.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos por ambos métodos fueron semejantes (tabla I).

Aunque los valores de precisión del análisis de calibración multivariante son mayores, la ventaja que presenta el método es que una vez establecida la matriz de calibración no se requiere incluir estándares al momento de hacer el análisis.

CLAR

Durante el análisis de pureza por CLAR se analizó en primer lugar la existencia de una sola señal cromatográfica y, posteriormente, se practicó el análisis espectral a dicha señal, empleando detector de arreglo de diodos, en un intervalo de longitud de onda de 220 a 500 nm.

Entre las técnicas empleadas para evaluar la pureza de un pico cromatográfico se mencionan:^{14,15} la supresión espectral, la sobreposición de espectros derivados, la sobreposición de espectros normalizados, la relación de absorbancias en diferentes puntos del pico cromatográfico y la sobreposición de cromatogramas obtenidos a distintas longitudes de onda. El uso de librerías espectrales para el análisis de pureza también ha sido empleado.

En el caso de la peroxisomicina A1, el análisis

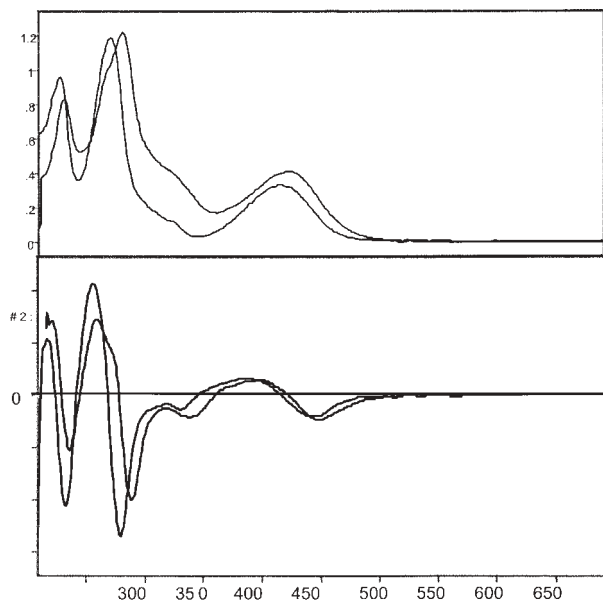


Fig. 2. Espectros UV-visible de PA1 e IsoPA1 a: orden cero b: en primera derivada

Tabla I. Resultados de precisión y sensibilidad de los métodos espectrofotométricos para la cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1

Técnica analítica		Sensibilidad		Presición % C.V.
		L.D.	L.C.	
UV-visible	Relción de respuestas 285/277 (derivadas)	$\mu\text{g/L}$		0.6%
		0.35	1.06	
		%		
		0.7	2.0	
PLS 1 (derivadas)		$\mu\text{g/L}$		26%
		0.25	0.74	
		%		
		0.7	2.0	

de pureza espectral se ha realizado por sobreposición de espectros y por relación de señales a las longitudes de onda de 269, 280, 410 y 310nm.

Para el análisis de pureza espectral de un pico cromatográfico, existen algunos factores que afectan los resultados del análisis y que deben ser controlados. En este caso fueron considerados factores clasificados como externos e instrumentales. Los factores externos considerados fueron: la composición del solvente, el efecto del pH y la masa inyectada, siendo únicamente la masa inyectada el parámetro que afectó significativamente el resultado

del análisis de pureza. Los parámetros instrumentales fueron: rango de longitud de onda empleado en el análisis de pureza, selección de la longitud de onda de referencia, número de espectros a comparar para el cálculo del umbral, número de puntos del espectro a comparar, factor de suavizado, tiempo de muestreo espectral. Para evaluar estos parámetros se empleó un diseño experimental para 7 variables de Plackett y Burman. El parámetro de referencia para la evaluación en este caso fue el porcentaje de pureza espectral.

De los resultados obtenidos se concluye que, de todas las variables analizadas, el intervalo de longitud de onda incluidas en el espectro, el número de espectros por pico y la ubicación de la longitud de onda de referencia, son los que más afectan el análisis de pureza.

Para la cuantificación por CLAR de IsoPA1 en lotes de PA1 se probaron varios métodos de cuantificación, siendo el método de adición estándar el que presentó mayores ventajas debido a que permite disminuir los efectos de matriz. Las curvas de calibración fueron construidas tanto con los cromatogramas sin derivar como con los cromatogramas derivados. El empleo de los cromatogramas derivados mejoró la resolución de las señales. Además para intensificar la señal, se aplicó un factor de incremento (5X) (figura 3).

De esta manera se facilitó la cuantificación. Se comparó la precisión y linealidad de las técnicas, así como exactitud en la cuantificación de isoperoxisomicina A1 en un lote de peroxisomicina A1 naturalmente contaminado. Cuando la cuantificación se realizó en cromatogramas sin derivar, los resultados de la cuantificación de Isoperoxisomici-

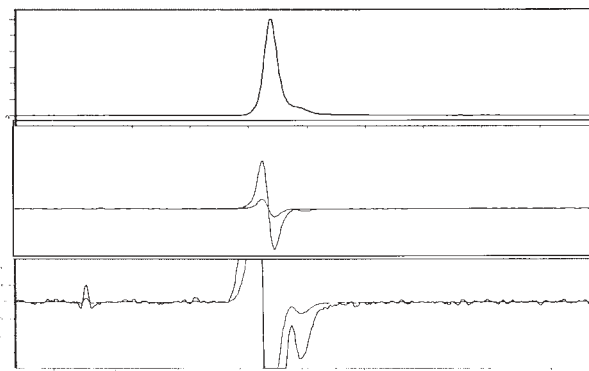


Fig. 3. a: Cromatograma de un lote de PA1 sin adicionar b: primera derivada del mismo cromatograma y c: mismo cromatograma derivado incrementada la señal (5X).

na A1 en la muestra de peroxisomicina A1 contaminada indicaron una sobrevaloración en la concentración, debido a la poca resolución de las señales. En el caso de la cuantificación empleando los cromatogramas derivados, los resultados fueron más cercanos a la concentración real de isoperoxisomicina en el lote (dato obtenido por RMN).

Tabla II. Resultados de precisión y sensibilidad de los métodos cromatográficos para la cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1

Técnica analítica		Sensibilidad		Presición % C.V.
		L.D.	L.C.	
CLAR	Adición estándar con cromatogramas derivados	0.6ng	2.0ng	18%
		0.3%	1.0%	
	Análisis de pureza del pico cromatográfico	<0.7%	--*	--

* No fue posible cuantificar IsoPA 1 de esta manera.

Perspectivas

Como se propuso anteriormente, el empleo de técnicas quimiométricas en química analítica resulta ser de gran importancia, sobre todo cuando se pretende realizar análisis de compuestos que presentan características muy similares, como es el caso de los compuestos antracénicos que fueron estudiados. Se propone aplicar estas técnicas, como parámetro para el análisis de pureza de la peroxisomicina A1.

La aplicación de las técnicas quimiométricas en espectroscopia, ha permitido facilitar los procedimientos de cuantificación en muestras complejas, tanto con el uso de derivadas como el de los diferentes tipos de análisis multicomponente.

El uso de derivadas en CLAR es aplicable al análisis de pureza de otros compuestos, ya que permite identificar impurezas que coeluyan con los compuestos de interés.

Así mismo, se puede emplear la derivación de los cromatogramas en análisis de muestras complejas con muchos componentes, en las que la

mayoría de las veces se presenta poca resolución de las señales cromatográficas y en las que la integración de las mismas se dificulta.

Resumen

Las técnicas empleadas para el control de calidad de la Peroxisomicina A1, fueron mejoradas aplicando técnicas quimiométricas tanto en CLAR como en espectrofotometría UV-visible. El uso de cromatogramas derivados en CLAR, permitió resolver la señal de un contaminante con tiempo de retención cercano al de la PA1 y de esta manera se mejoraron los parámetros de cuantificación del mismo. Por UV-visible se realizó la cuantificación del contaminante empleando dos técnicas quimiométricas: la espectroscopía de derivadas y la calibración multivariante. Ambos métodos fueron comparados en función de precisión y sensibilidad.

Palabras clave: Quimiometría, PLS-1, Calibración multivariante, Espectroscopia de derivadas, Analisis de pureza cromatográfica.

Abstract

The methods employed for quality control of peroxisomicine A1

were enhanced by means of the application of chemometric techniques. These were used both in HPLC analysis as well as in UV-Vis spectrophotometry. The utilization of derivative chromatography allowed for the resolution of a signal arising from a contaminant with similar retention time as PA1; therefore, the quantification parameters were enhanced. Two chemometric techniques were applied in the UV-Vis spectra, namely: derivative spectroscopy and multivariate calibration. Both methods were compared in function of their precision and sensitivity.

Keywords: Chemometrics, PLS-1, Multivariate calibration, Derivative spectrophotometry, Peak purity analysis.

Bibliografía

1. López de Alba P. y López Martínez L. «Una Introducción a la espectrometría de derivadas» *Educación Química* 4 (3): 160-170 (1993).

- 2 Adams, M. J. *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, RSC Analytical Spectroscopy Monographs. Ed. The Royal Society of Chemistry, (1995).
- 3 Talsky G.; Lothar Mayring and Hans Kreuser «High Resolution, High-order UV-VIS Derivative Spectrophotometry». *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17: 785-799, (1978).
- 4 Wrobel-Zasada, K.; Wrobel-Kaesmarczyk K.; López-de-Alba, P.; López-Martínez, L.; García-López, M.A. «Application of internal standard for derivative-spectrophotometric determination of azinphos-methyl in commercial formulations». *Talanta* 43:1055-1060, (1996).
- 5 Secchifri, M. Bennassi, C. Pastore, S. and Semenazato A. «Rapid Pentachlorophenol Evaluation in solid Matrixes by Second Derivative UV-Spectroscopy for Application to Wood and Leather Samples» *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 74(4): 674-677, (1991).
- 6 Muñoz de la Peña, A. Salinas, F. and Durán M.S. «Simultaneous determination of propranolol and hidralizine by derivative synchronus spectrofluorimetry». *Anal. Chim. Acta.*, 255: 317-323, (1991).
- 7 Salinas F. Muñoz A. Durán I. «Determination of Salicylic Acid and its metabolites in Urine by Derivative Synchronous Spectrofluorimetry» *Analyst* 115: 1007- 1011, (1990).
- 8 Berzas Nevado J.J.; Salinas F. «Simultaneous determination of sulphathiazole and sulphanilamide in pharmaceuticals by derivative spectrophotometry». *Journal of Pharmaceuticl and Biomedical Analysis* Vo. 9, (2): 117-122, (1991).
- 9 Berzas J.J. and Guiberteau Cabanillas, «Spectrophotometric Resolution of ternary Mixtures of Salicylaldehyde, 3-hidroxibenzaldehyde and 4-hidroxibenzaldehyde by the derivative ratio spectrum-zero Crossing method». *Talanta*, 39 (5): 547-553, (1992).
- 10 López-de-Alba P.L.; López-Martínez, L.; Hernández, A. «Métodos de calibración multivariante» *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 41 (1): 34-44 (1996).
- 11 Frans, S. D. and Harris, J. M. «Selection of Analytical Wavelengths for Multicomponent Spectrophotometric Determinations». *Analytical Chemistry*, 57 (13): 2680, (1985).
- 12 López-de-Alba, P.L.; López-Martínez, L.; Wrobel-Kaczmarczyk, K.; Wrobel-Zasada, K. and Amador-Hernández, J. «The Resolution of Dye Binary Mixtures By Bivariate Calibration Using Spectrophotometric Data. *Analytical Letters*, 29 (3): 487 - 502, (1996).
- 13 Piñeyro, A.; Waksman, N. «Chemistry, Structure and Biological Activity of Antracenones of the *Karwinskia* genus». *Studies in Natural Products (C)* First edition. Ed. Elsevier, 22: 555 - 606, (2000).
- 14 H. Fabre, A.; Le Bris, M.D.; Blanchin. «Evaluation of different techniques for purity assessment on a diode-array detector in Líquid Chromatography» *J. Chromatogr.*, 697: 81-88, (1995).
- 15 J. Polster,; Sauerwald N.; Feucht W. Treutter D. «New methods for spectrometric peak purity analysis in chromatography» *J. Chromatogr.*, 800: 121-137, (1998).
- 16 Salazar-Cavazos, M.; Piñeyro-López, A. and Waksman-de-Torres, N. «Evaluation of purity assessment of peroxisomicine by HPLC with diode array detector» *Quinto Congreso de Química de América del Norte*. Noviembre 11 al 15, (1997).
- 17 A. Grant and P.J. Battacharya «Application of derivative Spectroscopy to the determination of Chromatographic Peak Purity». *J. of Chromatography* 347 219 - 235, (1985).