

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



**APLICACIONES PRACTICAS DE LAS DERIVADAS DEL
ESPECTRO UV. EN EL ANALISIS FARMACEUTICO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
EVERARDO ARREOLA ZAVALA

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

- 1 . OBJETIVOS
- 2 . INTRODUCCION
- 3 . ASPECTOS TEORICOS
- 4 . PARTE EXPERIMENTAL
- 5 . RESULTADOS Y DISCUSION
- 6 . CONCLUSIONES

1. OBJETIVO

El principal objetivo de éste trabajo, es el realizar un estudio sobre la espectroscopía de derivadas y su posible -- aplicación en el análisis farmacéutico.

2. INTRODUCCION

Uno de los principales problemas a resolver en el desarrollo de una forma farmacéutica nueva, es la metodología analítica a seguir en la cuantificación de los principios activos de dicha forma farmacéutica. Es bien sabido que en una gran cantidad de principios activos, se aplican métodos analíticos diferentes a los empleados en la cuantificación de los mismos principios activos cuando estos forman parte de una forma farmacéutica, por simple que esta sea. Generalmente, en una gran cantidad de casos, es necesario recurrir a métodos físicos, químicos o fisicoquímicos con el fin de separar los principios activos y posteriormente, aplicar un método analítico, que puede ser diferente ó igual al usado en la cuantificación de esos principios-activos como materia prima.

Ahora bien, los requerimientos de una metodología analítica satisfactoria, son muchos, pero, dentro de los más importantes, tenemos los siguientes:

- a) Selectividad
- b) Reproducibilidad
- c) Sensibilidad, y
- d) Factibilidad

Con frecuencia, se han desarrollado técnicas analíticas muy sensibles, pero carentes de selectividad apropiada, que permita una aplicación directa en sistemas complejos, tales como multifármacos, o en formas farmacéuticas cuyos excipientes - presentan interferencias considerables. Siendo ésta la razón -- por la cual, una gran cantidad de métodos analíticos involucran procesos previos de separación, tales como procesos cromatográficos, extractivos, etc., con la finalidad de eliminar interferencias producidas por los otros componentes de un producto complejo. Pero, en muchos casos, por razones de rapidez y simplicidad, una vía más directa sería deseable. De este modo, siempre ha existido interés en desarrollar técnicas analíticas que puedan mejorar la selectividad de los métodos de medición. Últimamente, se ha observado un creciente interés en una metodología analítica novedosa y relativamente simple, la cual es conocida con el nombre de espectroscopía de derivadas.

La espectroscopía de derivadas, tubo su origen en 1955 (3), pero, debido a la dificultad en aquel entonces para desarrollar circuitos electrónicos capaces de proporcionar la señal derivada del espectro de absorción de una sustancia y a lo sofisticado que resulta obtener el espectro derivado por medio de cálculos, esta rama de la espectroscopía fue olvidada. Sin embargo debido al enorme progreso de la electrónica durante la década - de los setentas, la espectroscopía de derivadas, ha resurgido -

como una poderosa herramienta de la química analítica, siendo prueba de esto los interesantes trabajos publicados en los últimos años (1, 2, 4, 17).

Hasta hace poco, la espectroscopía de derivadas, tenía un campo de aplicación bastante reducido, ya que su uso estaba restringido a la primera derivada y esta sólo se aplicaba en el mejoramiento de la resolución de rasgos espectrales muy finos, tales como pequeños hombros. También en algunos casos, se le utilizaba en la localización de máximos de absorción.

Debido a la introducción de nuevos módulos electrónicos últimamente, se ha logrado obtener derivadas espectrales de orden superior y con esto, se ha logrado resolver una gran cantidad de problemas analíticos complejos, que hasta la fecha no habían sido resueltos por métodos espectroscópicos comunes directos. Por ejemplo, A.F. Fell (1), logró cuantificar agentes bactericidas (Fenol, alcohol bencílico, 2-fenil etanol, 3-fenilpropan-1-ol, etc). En medios nutritivos, que además, contenían microorganismos en suspensión. La cuantificación directa de estos agentes bactericidas, hubiera resultado imposible por cualquier método espectroscópico común. Pero, debido a que la banda de absorción presentada por el medio de cultivo y los microorganismos en suspensión es muy amplia, esta es completamente eliminada por medio de una segunda derivada del espectro de absorción total. En igual forma, éste mismo autor, logró cuantificar bromuro de hios

cina (2) en presencia de acetato de clorhexidina (Agente conservador) en gotas oftálmicas, que contenían de 0.25 a 2.0% m/v de bromuro de hioscina y 0.01% de acetato de clorhexidina.

En 1977, T. Ichikawa (13) realizó un interesante trabajo, el cual consistió en el análisis de las propiedades ópticas de los residuos de fenilalanina en proteínas. Este tipo de análisis no había sido resuelto por medios espectroscópicos comunes, debido a que el espectro de absorción de la fenilalanina está completamente solapado por los espectros de la tirosina y el triptofano. Al analizar la segunda derivada del espectro de absorción de la mezcla de aminoácidos, Ichikawa encontró que tanto la tirosina como el triptofano, no presentaban interferencia alguna sobre el espectro de la segunda derivada de la fenilalanina en el intervalo de 245-270 nm

La espectroscopía de derivadas, no ha restringido su campo de aplicación a la espectroscopía uv-visible ya que se han realizado importantes estudios en otros campos de la espectroscopía, tales como: Infrarrojo, Fluorescencia, Resonancia Magnética Nuclear y en Espectroscopía de Masas. Ultimamente, la espectroscopía de derivadas ha sido aplicada exitosamente en cromatografía de gases y en cromatografía líquida de alta presión. Por ejemplo, P.M. Houpt (9), logró separar los picos solapados del benceno y tolueno, usando un sistema derivador a longitud de onda fija (modulación).

Una vez analizada la importancia de la espectroscopía de derivadas, sus campos de aplicación y los estudios más importantes, pasaremos a considerar en el siguiente capítulo los fundamentos teóricos de la misma.

3. ASPECTOS TEORICOS

a) Definición:

Bajo el nombre de espectros de derivadas, se entiende la representación gráfica en un intervalo determinado de longitudes de onda, del cociente diferencial.

$$\frac{dA}{d\lambda} \quad \text{Para la primera derivada,}$$

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} \quad \text{Para la segunda derivada}$$

Siendo A la absorbancia y λ la longitud de onda. En base a lo anterior, podemos decir que la primera derivada de un espectro de absorción, es la representación gráfica de la pendiente de la curva de absorción en cada longitud de onda del intervalo medido, o sea:

$$\frac{\Delta A}{\Delta \lambda} \quad \text{cuando} \quad \Delta \lambda \longrightarrow 0$$

Podríamos decir también, que, la primera derivada de un espectro de absorción, es la velocidad de cambio de la absorción con respecto a la longitud de onda, Mientras que, la segunda derivada de un espectro de absorción, sería la aceleración de cambio de la absorción con respecto a la longitud de onda.

b) Sistemas Generadores de Espectros de Derivadas:

Los espectros de derivadas pueden ser obtenidos de -

diferentes maneras. Los aparatos empleados en la obtención de estos espectros, han sido clasificados en dos grupos:

1).- Espectrofotómetros en los cuales se utiliza la señal eléctrica de salida, los cuales pueden operar por medio de la diferenciación electrónica o por medio de la diferenciación numérica.

2).- Espectrofotómetros que utilizan el sistema óptico, los cuales pueden operar por medio de la modulación de la longitud de onda o por medio del empleo de dos longitudes de onda.

De los métodos anteriores, los más importantes son: el método de modulación de la longitud de onda, el método de doble longitud de onda y el método de diferenciación electrónica. En el método de modulación de la longitud de onda (11) la longitud de onda es oscilada rápidamente sobre un intervalo de longitud de onda, produciendo una señal modulada, la cual puede ser descifrada para proporcionar ya sea la primera derivada o derivadas de mayor orden a una longitud de onda estacionaria. Si el monocromador es simultáneamente registrado, se obtiene la derivada.

En el caso de los aparatos que emplean dos longitudes de onda, el espectro de primera derivada es generado cuando existe simultáneamente un intervalo de longitud de onda sufi---

cientemente pequeño entre los dos monocromadores registradores. Este tipo de aparatos, sólo es capaz de proporcionar la primera derivada de un espectro de absorción.

Los principales inconvenientes de los dos métodos anteriores, son el alto costo del equipo y su extrema complejidad.

En los últimos años, se ha estado usando con gran éxito el sistema de diferenciación electrónica. Estos módulos electrónicos (Fig. 2.1) son simplemente conectados en serie entre el registrador y la salida del espectrofotómetro. Los espectrofotómetros con dispositivos de diferenciación electrónica, proporcionan a voluntad, ya sea la primera derivada o derivadas de mayor orden, además, tienen un precio módico. Otra de las ventajas del sistema de diferenciación electrónica, es la facilidad con que pueden ser adaptados a espectrofotómetros registradores comunes.

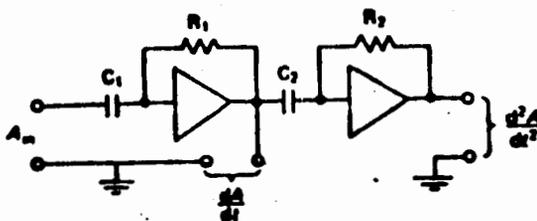


Fig. 2.1. Circuito electrónico derivador simplificado.

c) Características de los Espectros de Derivadas:

Muchos autores (2, 3, 4, 12) consideran que en los espectros de primera derivada, existe un valor máximo y un valor mínimo. Pero, en realidad, el número de máximos y mínimos, dependerá del tipo de espectro de absorción en estudio.

Supongamos que un espectro de absorción tiene un sólo máximo (Fig. 2.2,a), y que cumple con las características de un pico Gaussiano (pico simétrico). Si nosotros obtenemos la primera derivada de dicho pico y graficamos dichos valores contra la longitud de onda, observaremos que este nuevo espectro presenta un valor máximo y un valor mínimo y que el valor máximo del espectro de absorción, se convierte en cero en el espectro de primera derivada, tal como se observa en la Fig. 2.2,b.- A la distancia vertical existente entre el máximo y el mínimo de la primera derivada, se le conoce con el nombre de amplitud del espectro de primera derivada, siendo esta distancia, proporcional a la concentración de la sustancia en estudio.

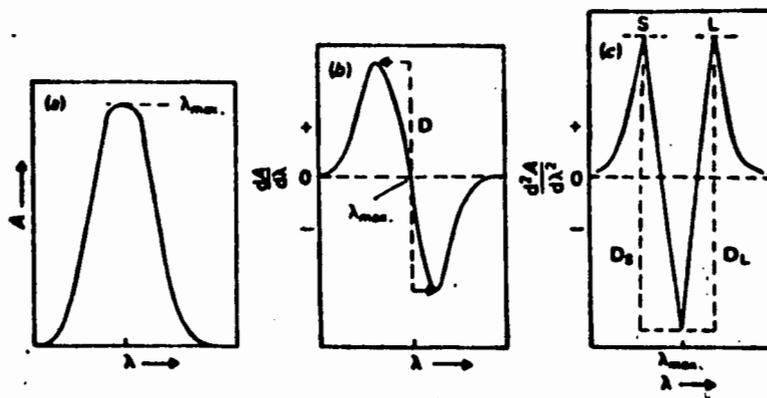


Fig. 2.2 (a) Pico Gaussiano ideal

(b) Espectro de primera derivada

(c) Espectro de segunda derivada

Ahora bien, si nosotros obtenemos la segunda derivada del espectro de cero orden (Fig. 2.2, a) y graficamos los valores de dicha segunda derivada contra la longitud de onda correspondiente a cada valor de la segunda derivada, encontraremos que el nuevo espectro presentará dos valores máximos y un valor mínimo (Fig. 2.2, c). El valor mínimo de este espectro de derivada, se presenta a la misma longitud de onda a la cual se presenta el valor máximo de la absorción del espectro de cero orden.

La distancia vertical entre el valor mínimo y cualquiera de los valores máximos, siempre será proporcional a la concentración de la sustancia en estudio.

Si observamos la Fig. 2.2, veremos que tanto en el

espectro de primera derivada, como en el de segunda derivada, existen valores positivos y negativos de ordenadas. Estos valores de ordenadas, no son proporcionales a la absorción, sino a la pendiente de cada uno de los puntos del espectro de cero orden, siempre y cuando, el espectro de cero orden esté registrado en unidades de absorción.

Otra de las características de la espectroscopía -- de derivadas, es la presentada por bandas de absorción muy amplias o por bandas de absorción constante ($dA=0$). En el caso de las bandas de absorción constante, sus derivadas siempre serán cero. Pero, en el caso de las bandas de absorción -- muy amplias, es probable que presenten primera derivada no -- igual a cero, pero que su segunda derivada, sea igual a cero. Estas dos últimas propiedades de la espectroscopía de derivadas, son ampliamente usadas en la cuantificación de analitos, cuyo espectro de absorción se encuentra interferido por el espectro de absorción de otra sustancia.

Uno de los ejemplos más clásicos de espectros de -- absorción cuyo espectro de segunda derivada es igual a cero, -- es el presentado por una solución acuosa de dipirona sódica, -- tal como podemos observar en la Fig. 2.3.

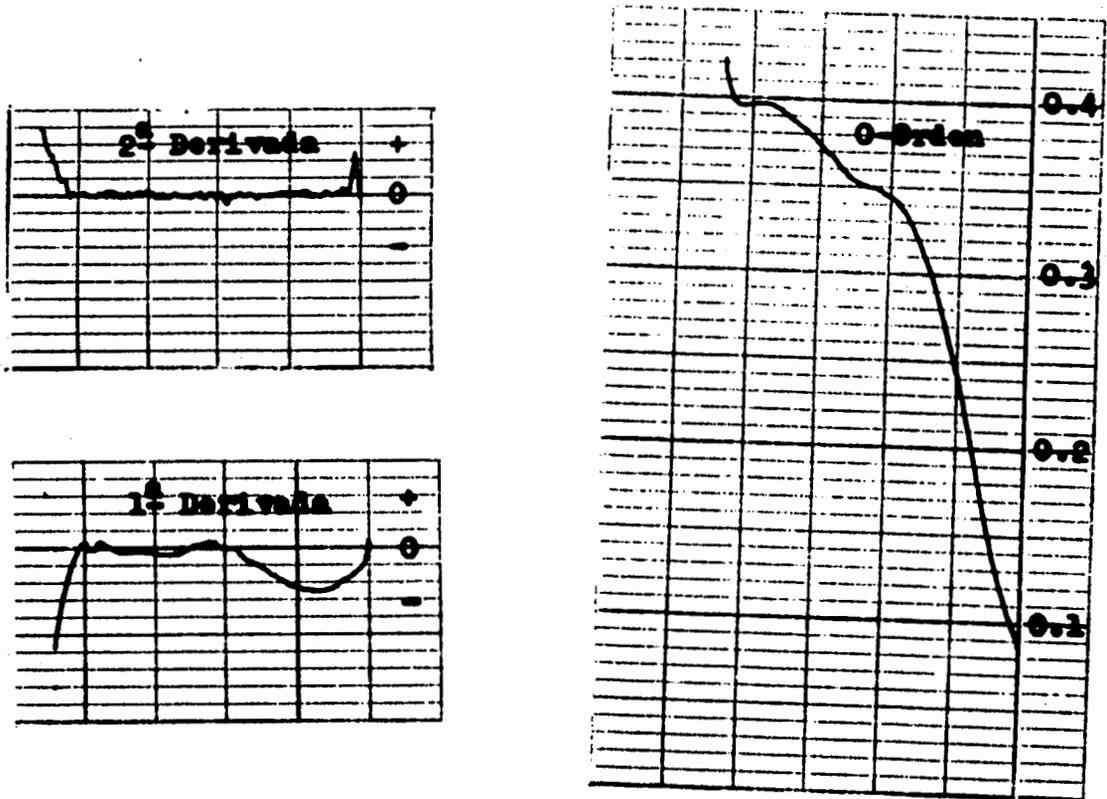


Fig. 2.3 Dipirona Sódica en agua

(15 ppm).

Rendija: 2 nm

Velocidad: 60 nm/min.

Respuesta: 0.5 s

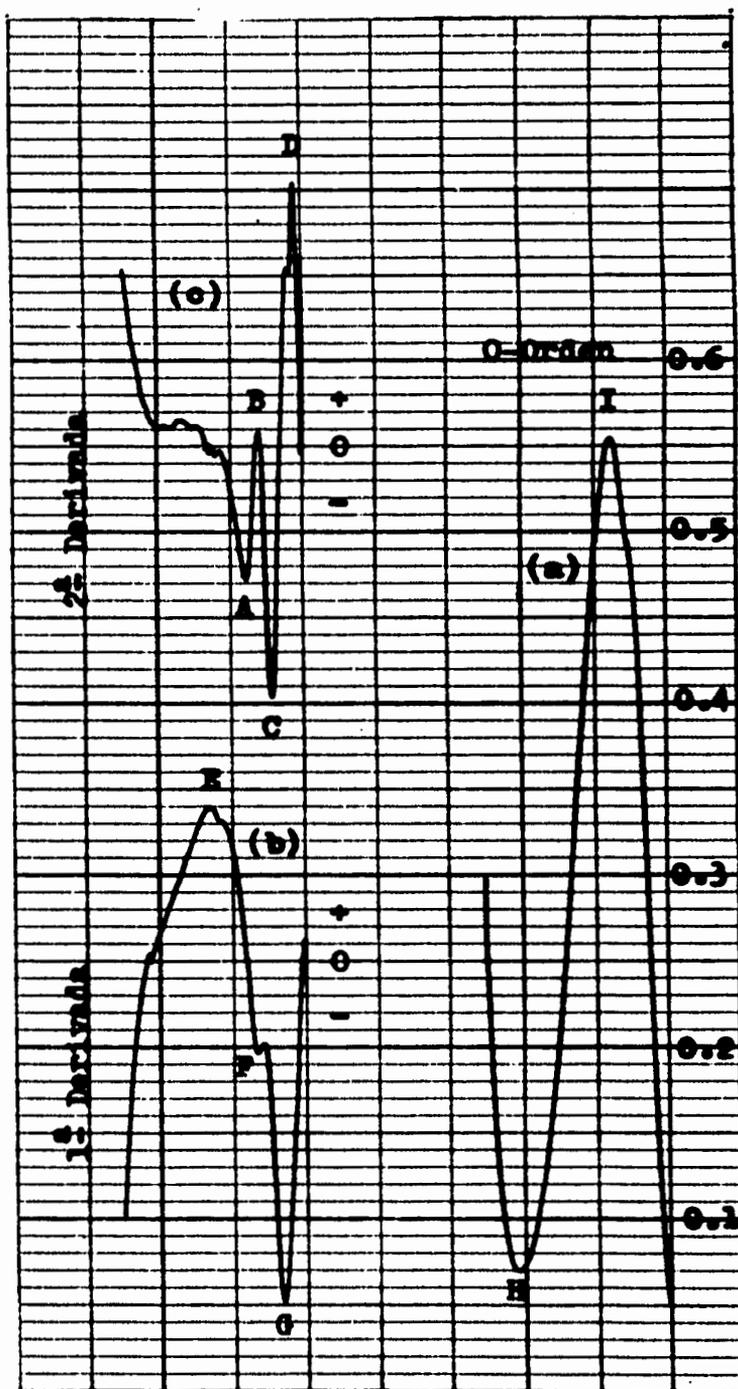
Intervalo 295-210 nm

d) Interpretación Cuantitativa de los Espectros de Derivadas:

Una descripción detallada de la interpretación de los espectros de derivadas y de su aplicación en el análisis cuantitativo, ha sido proporcionado por T.C. O'Haver (12). Para analizar los parámetros utilizados en la cuantificación de los espectros de derivadas, analizaremos el espectro de absorción de la guayanesina en solución acuosa (Fig. 2.4). En el espectro de cero orden (Fig. 2.4, a), podemos observar que sólo consta de un máximo de absorción, siendo éste el parámetro de mayor confiabilidad en el análisis de la guayanesina. Si nosotros analizamos la primera derivada del espectro de absorción de la guayanesina (Fig. 2,4,b), veremos que existe un mayor número de parámetros utilizables en la cuantificación de dicha sustancia. Estos parámetros están constituidos por las distancias verticales entre máximos y mínimos (EF, EG y FG). Siempre se debe procurar que la distancia medida, sea entre un máximo y un mínimo adyacentes.

Ahora bien, si nosotros analizamos la segunda derivada del espectro de absorción de la guayanesina, observaremos que el número de parámetros útiles en la cuantificación de dicha sustancia, se incrementa, tal como puede observarse en la Fig. 2, 4, c.

Fig. 2.4
Guayanesina en agua
(50 mcg/ml)
Rendija: 2 nm
Velocidad: 60 nm/min
Respuesta: 0.5 s
Intervalo 285-235 nm



Una vez seleccionado el parámetro más adecuado, lo único que tenemos que realizar para evaluar cuantitativamente una señal derivada, es comparar dicha señal con la señal derivada obtenida mediante un estándar, o extrapolarla en una curva patrón obtenida con señales derivadas procedentes de un estándar. Cuando se presenta el problema de espectros de absorción interferidos, la selección del parámetro que permita la cuantificación del analito en estudio, es bastante crítica. Lo primero que se debe realizar es el análisis de cada espectro de absorción por separado y localizar zonas en las cuales el analito en estudio no sea interferido. Tal es el caso proporcionado por una mezcla de guayanesina y acetofenetidina en solución acuosa (Fig. 2.5). En el espectro de cero orden, observamos que el espectro de la guayanesina, está solapado por el espectro de la acetofenetidina. En el espectro de primera derivada, podemos observar que la interferencia aún existe, pero que en el espectro de segunda derivada (Fig. 2.5, c), existe un parámetro totalmente libre de interferencia (XY), que permitirá cuantificar a la guayanesina sin importar la presencia de la acetofenetidina. La razón por la cual la acetofenetidina no interfiere al espectro de segunda derivada de la guayanesina en esa región, se debe a que la acetofenetidina presenta una banda de absorción muy amplia --

en esa zona y por lo tanto, su espectro de segunda derivada es prácticamente igual a cero.

Fig. 2.5

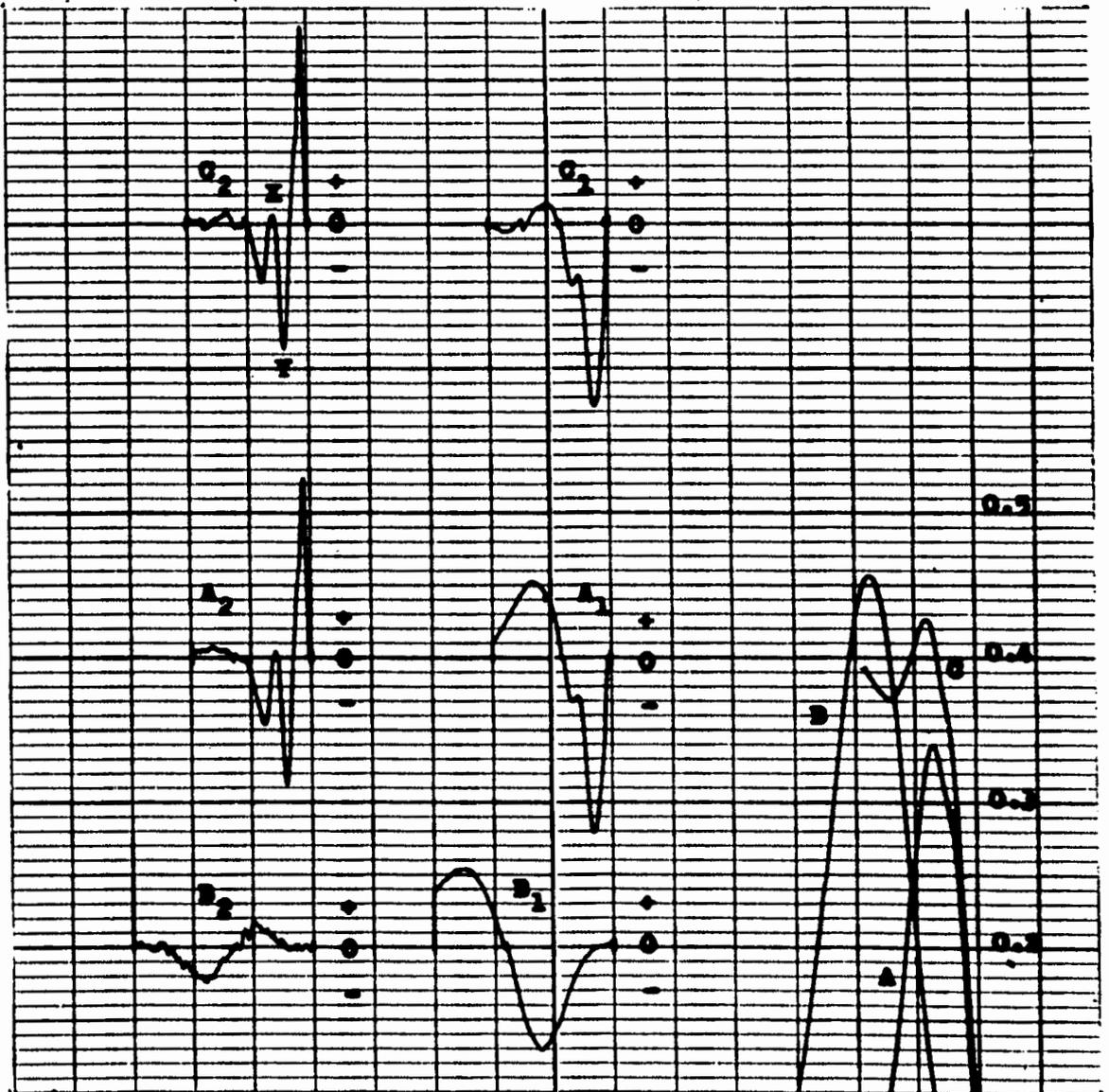
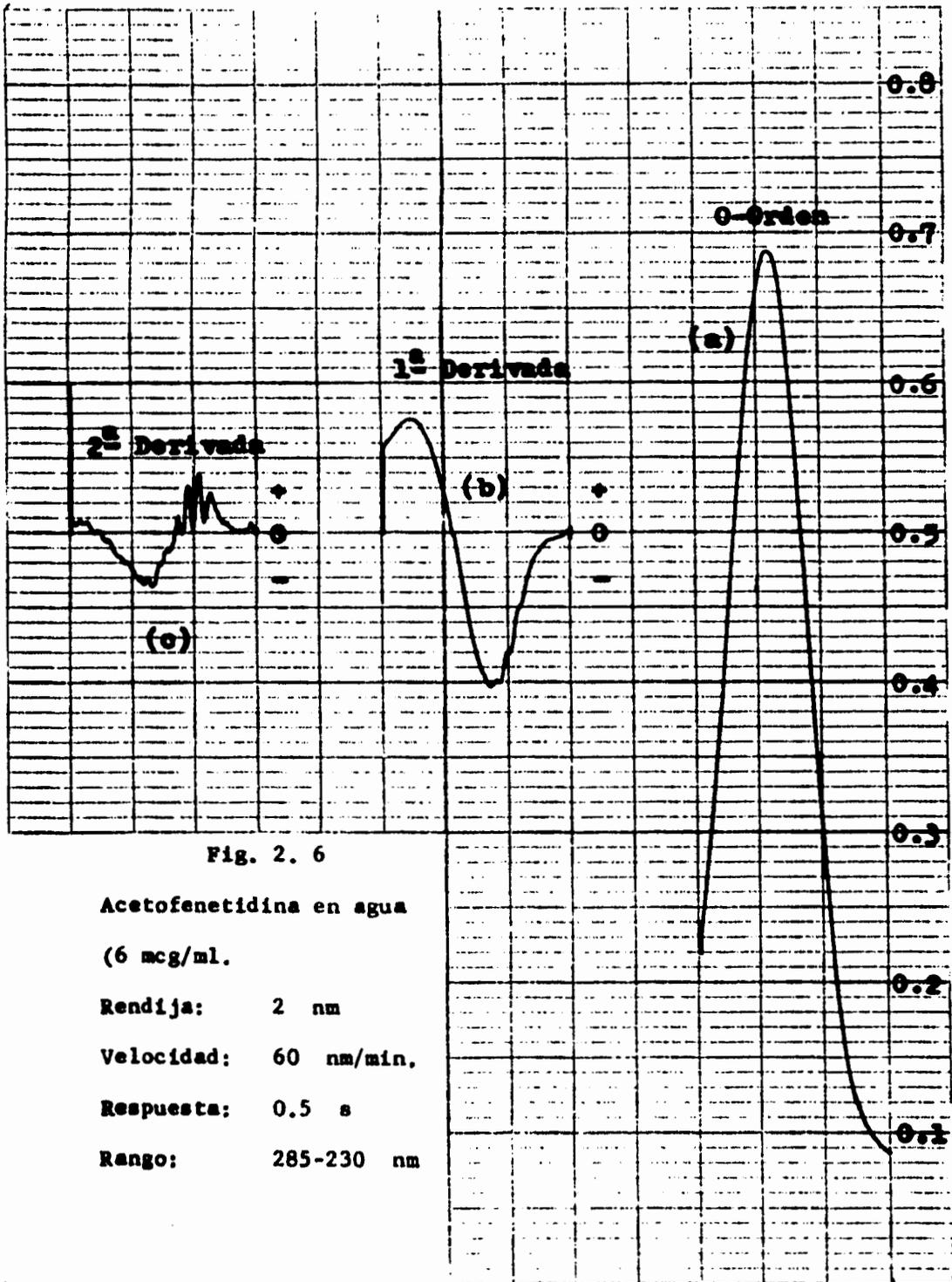


Fig. 2.5

- A, A₁, A₂ : Cero orden, primera derivada y segunda derivada de una solución acuosa de gua yanesina (30 mcg/ml).
- B, B₁, B₂ : Cero orden, primera derivada, segunda derivada de una solución acuosa de ace tofenetidina (4 mcg).
- C, C₁, C₂ : Cero orden, primera derivada y segunda derivada de una solución acuosa de gua yanesina y acetofenetidina (30 y 4 mcg). por ml respectivamente.

RENDIJA: 2 nm
VELOCIDAD: 60 nm/min.
RESPUESTA: 0.5 s
INTERVALO: 285-235

Ahora bien, nosotros podríamos preguntarnos que si sería posible cuantificar a la acetofenetidina en presencia de guayanesina por el método de las derivadas espectroscópicas. Si nosotros observamos los espectros de derivadas de la mezcla de acetofenetidina y guayanesina en solución acuosa-- (Fig. 2.5), pensaríamos que esto no es posible. Pero si analizamos detenidamente el espectro de segunda derivada de dicha mezcla, observaremos que existen pequeños picos, los cuales pueden ser intensificados tanto por medios electrónicos o por medio de efectos de concentración. Si analizamos los espectros de absorción de la guayanesina y la acetofenetidina por separado, observaremos que los pequeños picos presentes en el espectro de segunda derivada de la mezcla, corresponden a los pequeños picos presentados por el espectro de segunda derivada de la acetofenetidina. Si nosotros disminuimos la velocidad de registro y-- aumentamos la concentración de la acetofenetidina, observaremos que los pequeños picos presentados en el espectro de segunda derivada de la acetofenetidina se intensifican, lo cual podría permitir la cuantificación de la acetofenetidina en presencia de guayanesina. En la Fig. 2.6, podemos observar una perfecta definición de los picos presentados por la acetofenetidina cuando se disminuye la velocidad de registro y se incrementa la concentración. Obsérvese la diferencia con res-



pecto al espectro de la Fig. 2.5.

En la resolución de espectros solapados, es de -- gran importancia considerar los parámetros siguientes:

I) Relación entre la altura de la banda que interfiere y la altura de la banda que se desea medir.

II) Relación entre la anchura media de la banda que interfiere y la de la banda que se desea medir.

III) Separación entre los máximos de absorción de los dos componentes en estudio.

IV) La velocidad de registro.

Una descripción detallada de los procedimientos anteriores, incluyendo el tratamiento de errores, ha sido publicado por T.C. O'Haver (13).

e) Ventajas de la Espectroscopía de Derivadas:

1) Localización exacta de los máximos de absorción.

Cuando se tiene el problema de la determinación -- exacta de la longitud de onda a la cual una substancia presenta su máxima absorción, es de gran utilidad el uso de la primera derivada, ya que en ella, el máximo de absorción se convierte en valor cero (Zero Crossing).

II) Mejor resolución de los espectros.

La espectroscopía de derivadas, es de gran utilidad

como criterio de pureza en el control de calidad e investigación. La segunda derivada de un espectro de absorción tiene la ventaja de resolver los rasgos espectrales muy finos, que en el espectro de cero orden no son detectables. Por ejemplo, si analizamos el espectro de primera derivada de acetofenetidina en agua (Fig. 2.6,b), observaremos que en dicho espectro, ya se capta la presencia de pequeños picos muy finos.

Ahora bien, si analizamos el espectro de segunda derivada (Fig. 2.6 c), observaremos una serie de picos perfectamente definidos. Estos rasgos espectrales finos, es probable que sean producidos por cromóforos débiles no detectables por medio de la espectroscopía común.

III) Determinación cuantitativa en presencia de turbidez.

Una aplicación de gran importancia de la espectroscopía de derivadas, es la determinación cuantitativa de sustancias en soluciones turbias (1). Las soluciones turbias, por lo general, presentan interferencias espectrales de bandas amplias o constantes. Debido a que la banda interferente proveniente de la turbidez, es muy amplia o constante, su primera derivada cae dentro de un valor próximo a cero, o en algunos casos será igual a cero. Pero, en la segunda derivada, por lo general todas las bandas provenientes de turbidez, tendrán un valor igual a cero, lo cual permitirá la cuan-

tificación de cualquier sustancia. Cuando se use el método de diferenciación electrónica, se debe tener cuidado con el nivel de turbidez para evitar problemas debido a la dispersión de la luz.

IV) Determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes.

La determinación cuantitativa de compuestos con bandas de absorción relativamente estrechas y que estén solapadas por una banda ancha de un segundo componente, es -- uno de los campos de mayor aplicación de la espectroscopia de derivadas.

Con esto concluimos la parte teórica del trabajo y en el siguiente capítulo, analizaremos la parte experimental del mismo.

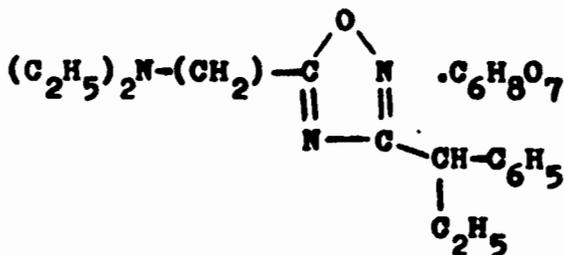
4. PARTE EXPERIMENTAL.

A) RESUMEN:

En la parte experimental de este trabajo, se integrará un método analítico para resolver un problema de absorción de fondo presentado por una forma farmacéutica (tabletas), cuyo principio activo es el citrato de proxazol. Experimentalmente, se observó que con el transcurso del tiempo, la absorbancia de fondo se incrementaba (efecto de "background"), interfiriendo el espectro de absorción del principio activo, a tal grado que la cuantificación de dicho principio activo por medios espectroscópicos comunes, resultaba imposible.

Experimentalmente, se encontró que los causantes de la absorción de fondo, eran los excipientes de la formulación (almidón de maíz, avicel y estearato de Magnesio).

Al aplicar el método de las derivadas espectroscópicas a este tipo de problemas, se observó que la interferencia espectral, se eliminaba totalmente en la segunda derivada del espectro de absorción de la solución en estudio, permitiendo cuantificar en forma directa al citrato de proxazol.



CITRATO DE PROXAZOL

El citrato de proxazol es un agente antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio; cuyo uso en humanos, aún está en investigación.

B) DISOLVENTES Y REACTIVOS:

Cloroformo grado reactivo, agua destilada, metanol - USP, almidón de maíz U.S.P., avicel U.S.P., estearato de magnesio.

C) INSTRUMENTACION.

Todos los espectros reportados en este trabajo, fueron obtenidos por medio de un espectrofotómetro UV-visible Perkin-Elmer, modelo 552, con un accesorio de diferenciación electrónica integrado al mismo.

La señal eléctrica de salida fue codificada por medio de un graficador Hitachi modelo 560.

d) FORMULACION EN ESTUDIO:

Cada una de las tabletas en estudio, contenía las siguientes cantidades de materias primas.

Citrato de Proxazol	100.000 mg
Almidón de Maíz	79.000 mg
Avicel Microcristalino	79.000 mg
Estearato de Magnesio	2.000 mg

El peso total de cada comprimido en estudio es de 260 mg.

E) METODOLOGIA Y SECUENCIA DE TRABAJO:

La metodología seguida en este trabajo, es relativamente sencilla. En la primera parte de él, se realizó un estudio de las propiedades espectroscópicas del citrato de proxazol en diferentes disolventes, analizándose tanto el espectro de absorción (cero orden) como las dos primeras derivadas del mismo.

Una vez seleccionado el disolvente adecuado (agua destilada), se procedió a seleccionar los parámetros más adecuados para la cuantificación del citrato de proxazol. En igual forma, se procedió a analizar el comportamiento de la relación entre la concentración de citrato de proxazol y la amplitud del espectro de segunda derivada (Fig. 5.2).

Posteriormente, se procedió a determinar la reproducibilidad proporcionada por los tres métodos analíticos involu-

crados (cero orden, primera derivada y segunda derivada). Para esto, se procedió a preparar una serie de soluciones de citrato de proxazol a una concentración de un mg/ml, a las cuales se les determinó la absorbancia a una longitud de onda de 255 nm - determinándose además la amplitud máxima de los espectros de la primera y segunda derivada del espectro de absorción (Fig. 5.1), aplicándose posteriormente métodos estadísticos para evaluar la reproducibilidad de los métodos analíticos involucrados (Tabla 5.2).

En la segunda parte de este trabajo, se intentó cuantificar el citrato de proxazol contenido en tabletas, cuyos excipientes son mencionados en el inciso anterior. Para este estudio se tomó un total de 10 tabletas (260 mg de peso por cada tableta), las cuales se pulverizaron y, se tomaron muestras equivalentes a 100mg de citrato de proxazol (260 mg de pulverizado). Las muestras pulverizadas, se agitaron en un volumen aproximado de 50 ml de agua destilada hasta garantizar la disolución del citrato de proxazol. Se filtró la suspensión formada, lavando el equipo involucrado y, el filtrado se llevó a un volumen de 100ml con agua destilada. Posteriormente, se procedió a registrar el espectro de absorción (cero orden de esta solución, registrando en igual forma las dos primeras derivadas de dicho espectro de absorción Fig. 5.3). Con los datos obtenidos, se procedió a realizar un estudio estadístico de la reproducibilidad

de los métodos analíticos involucrados (tabla 5.3). En igual -- forma, se realizó un análisis del comportamiento de cada espectro de absorción con respecto a los obtenidos bajo las mismas - condiciones con un estándar secundario de citrato de proxazol.

La tercera parte de este trabajo, estuvo constituida-- por el proceso de identificación de la o las sustancias que in-- terferían la cuantificación del citrato de proxazol. Para esto, primero se preparó una suspensión acuosa de los excipientes de la formulación en estudio. Se pesó la cantidad de excipientes - equivalente a la cantidad contenida en una tableta. Esta canti-- dad de excipientes, se agitó fuertemente en un volumen aproxima-- do de 50 ml de agua destilada, se filtró y, el filtrado se lle-- vó a un volumen de 100 ml con agua destilada. Posteriormente,-- se procedió a registrar el espectro de absorción de dicha solu-- ción, registrando también las dos primeras derivadas de dicho - espectro de absorción (Fig. 5.5). En igual forma, se realizó el estudio de cada uno de los excipientes, con el fin de conocer la interferencia de cada excipiente sobre el espectro de absorción del citrato de proxazol.

En la cuarta y última parte de este trabajo, se anali-- zó la nobleza del método de las derivadas espectroscópicas.

Para esto, se pulverizó una tableta de citrato de pro-- xazol, a la cual se le adicionaron 50 ml de agua destilada, se agitó hasta disolver el citrato de proxazol, se aforó a un volú

men de 100 ml. A la suspensión turbia obtenida, se le registró su espectro de absorción y las dos primeras derivadas del mismo (Fig. 5.6). Posteriormente, se analizó cada uno de dichos espectros, comparándolos con los espectros obtenidos con un estándar secundario de citrato de proxazol (Fig. 5.1).

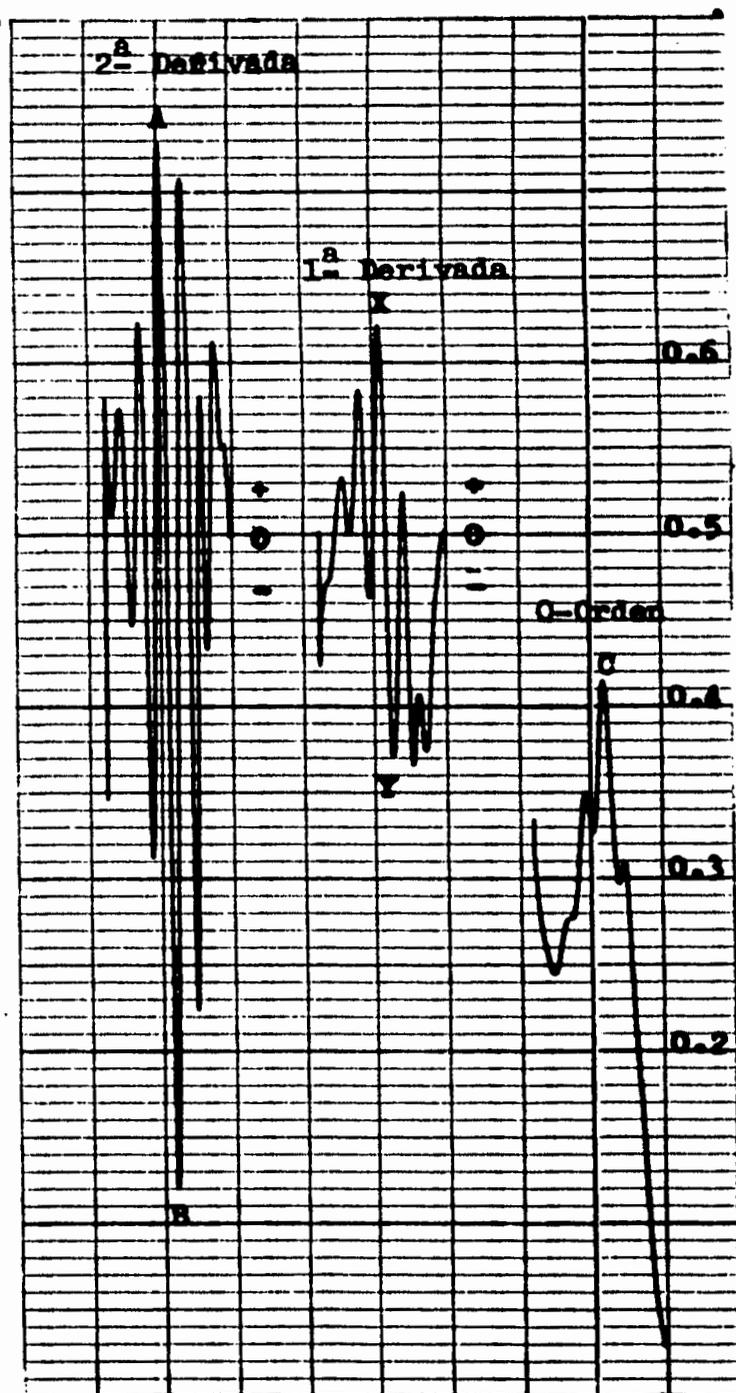
5. RESULTADOS Y DISCUSION

Por medio del estudio de las propiedades espectroscópicas del citrato de proxazol, se encontró que el disolvente más adecuado era el agua destilada, ya que con él los grupos cromóforos de la molécula presentan picos perfectamente definidos -- (Fig. 5.1). Además con éste disolvente se pueden eliminar problemas de evaporación rápida, presentados por otros tipos de disolventes. En la Fig. 5 podemos apreciar el espectro de absorción del citrato de proxazol en solución acuosa (1 mg/ml), en igual forma, podemos observar las dos primeras derivadas del espectro de absorción de dicha solución.

Como podrá observarse, cada uno de los máximos o mínimos del espectro de absorción del citrato de proxazol (Fig. 5.1) se transforman en cero al registrar el espectro de la primera derivada, mientras que, en el espectro de la segunda derivada, -- estos máximos y mínimos son transformados en mínimos y máximos -- respectivamente, con lo cual se demuestra lo establecido anteriormente en el capítulo 3.

FIG. 5.1
 Citrato de Proxazol
 estándar secundario
 (1 mg/ml en agua.
 Rendija: 2 nm
 Velocidad: 60 nm/min.
 Respuesta: 0.5 s
 Intervalo 270-235 nm

A = 250 nm
 B = 253 nm
 C = 255 nm



Al analizar el comportamiento de la relación entre la concentración de citrato de proxazol y la absorción de su solución acuosa (distancia entre el máximo y el mínimo; AB, Fig. 5.1), se encontraron los siguientes resultados (tabla 5.1).

Citrato de Proxazol (mg/ml)	Amplitud Máxima (distancia AB)
0.30	18.00
0.40	24.00
0.50	30.10
0.60	36.00
0.70	41.90
0.80	48.00
1.00	60.20
1.20	72.10

TABLA 5.1

Al graficar los valores de concentración de citrato de proxazol contra los valores de amplitud máxima de la segunda derivada, se obtuvo la curva patrón de la Fig. 5.2. En dicha curva, podemos observar la perfecta linealidad entre la concentración y la amplitud máxima.

Con lo anterior, se demuestra que en espectroscopía de derivadas, la ley de Beer se cumple con gran exactitud, no obstante que estamos trabajando con derivadas y no con valores de absorción.

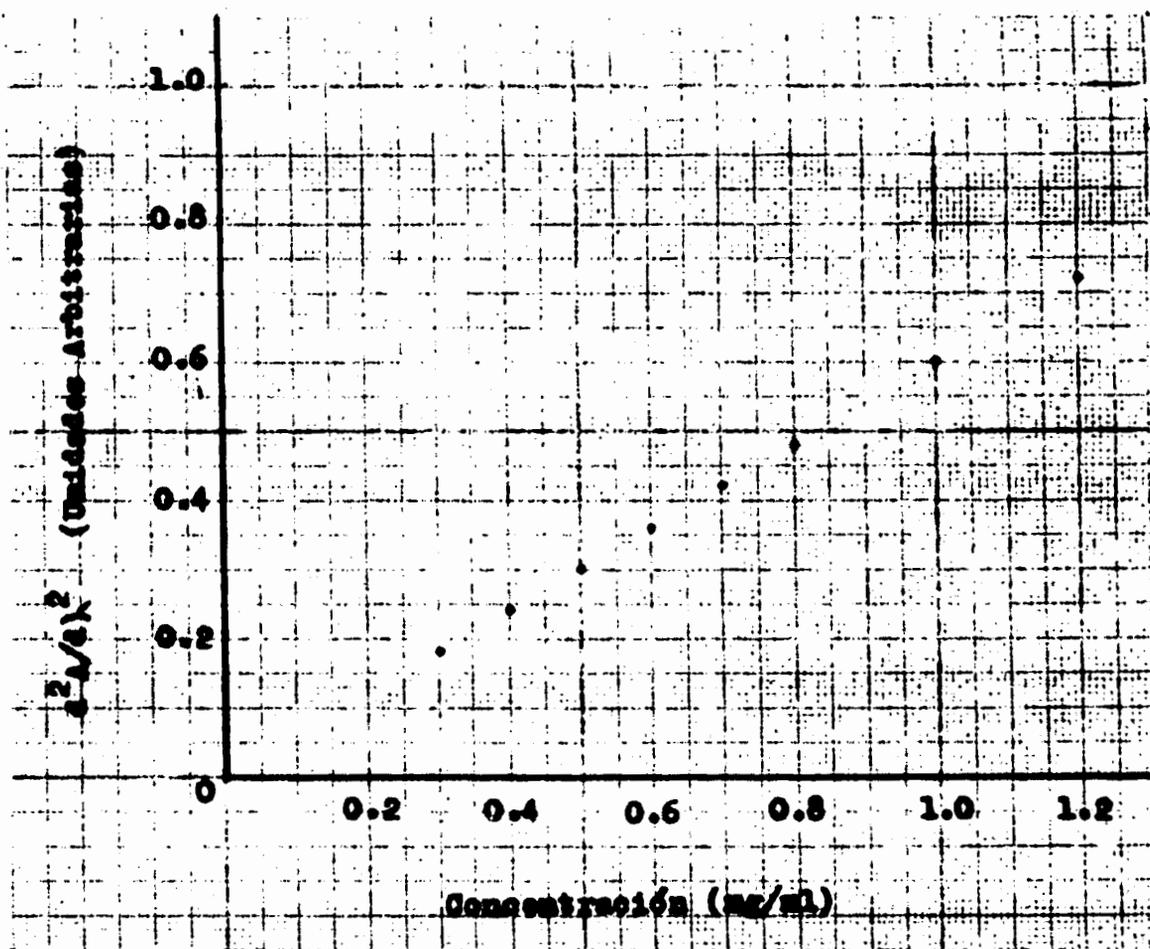


FIG. 5.2 CURVA PATRON DE CITRATO DE PROXAZOL

En el estudio realizado con el fin de determinar la reproducibilidad de los métodos analíticos involucrados, se obtuvieron los resultados proporcionados en la Tabla 5.2.

<u>Nuestra</u>	<u>0-Orden</u>	<u>1a. Derivada</u>	<u>2^a Derivada</u>
1	0.409	0.245	0.599
2	0.407	0.244	0.595
3	0.402	0.243	0.597
4	0.402	0.245	0.603
5	0.412	0.230	0.595
6	0.420	0.247	0.602
7	0.414	0.244	0.609
8	0.415	0.250	0.606
9	0.400	0.248	0.598
10	<u>0.403</u>	<u>0.250</u>	<u>0.600</u>
	$\bar{x} = 0.4080$	$\bar{x} = 0.2450$	$\bar{x} = 0.6000$
	$s = 0.0067$	$s = 0.0017$	$s = 0.0046$

Tabla 5.2 Soluciones de Citrato de Proxazol; estándar secundario.

(1 mg/ml) en agua.

0-Orden: absorbancia a 255 nm Fig. 5.1

1a. Derivada: Distancia XY Fig. 5.1

2a. Derivada: Distancia AB Fig. 5.1.

Todas las distancias XY y AB presentadas en éste trabajo, tablas 5.1, 5.2 y 5.3 están dadas en unidades arbitrarias -- (escala del papel graficador).

Si analizamos los resultados proporcionados en la tabla 5.2., observaremos que los resultados obtenidos con el método de la segunda derivada, presenta una menor desviación estándar con respecto a los resultados obtenidos por medio del espectro de cero orden. Por otro lado, los resultados obtenidos por medio del método de la primera derivada, son los que presentan la menor desviación estándar (s).

De lo anterior podemos establecer que el método de la segunda derivada es el que proporciona una mayor reproducibilidad. Pero, para poder establecer un mejor criterio, pienso que lo ideal sería realizar una serie de determinaciones efectuadas por diferentes analistas y en diferentes aparatos, con la finalidad de poder evaluar en forma correcta cada uno de los métodos en estudio.

Cuando se intentó valorar al citrato de proxazol contenido en tabletas, cuya formulación ya fue proporcionada en el capítulo anterior, se observó que dicha valoración, resultaba imposible por medio del método de espectroscopía común (cero orden), al igual que por el método de la primera derivada. Esto se debía a la presencia de sustancias extrañas que absorbían luz en el intervalo de longitud de onda de trabajo, interfiriendo

do el espectro de absorción del citrato de proxazol, e imposibilitando su valoración.

Sin embargo, al registrar la segunda derivada del espectro de absorción, se observó que la interferencia espectral, se eliminaba totalmente. En la Fig. 5.3, podemos observar la enorme deformación que sufre el espectro de absorción del citrato de proxazol, deformación que se reduce enormemente al registrar el espectro de la primera derivada, mientras que en el espectro de segunda derivada la interferencia es eliminada totalmente. (Fig. 5.3).

Los resultados de la valoración espectroscópica del citrato de proxazol en tabletas, están dados en la tabla 5.3.

En la tabla 5.3, podemos observar que los resultados obtenidos por medio de la segunda derivada del espectro de absorción, son prácticamente iguales a los obtenidos por medio del mismo método al analizar el estándar secundario de citrato de proxazol, lo cual indica que la interferencia espectral a sido totalmente eliminada, permitiendo cuantificar en forma sencilla y directa al citrato de proxazol. En la tabla 5.3, también podemos observar que los resultados obtenidos con el estándar secundario, presentan una desviación estándar ligeramente menor a la presentada por los resultados obtenidos al analizar al citrato de proxazol contenido en las tablas. Lo anterior, es muy lógico ya que a mayor interferencia en el sistema, es probable que el

nivel de error sea mayor.

En base a los resultados de la tabla 5.3, podemos establecer que el método de la segunda derivada espectroscópica, es el que mejores resultados proporciona en la resolución de problemas de interferencias espectrales de fondo.

<u>Muestra</u>	<u>0-Orden</u>	<u>1a. Derivada</u>	<u>2a. Derivada</u>
1	0.539	0.230	0.599
2	0.532	0.228	0.589
3	0.544	0.226	0.594
4	0.512	0.228	0.600
5	0.529	0.230	0.592
6	0.515	0.228	0.590
7	0.568	0.232	0.599
8	0.547	0.230	0.598
9	0.546	0.230	0.600
10	<u>0.529</u>	<u>0.229</u>	<u>0.602</u>
	$\bar{x} = 0.5361$	$\bar{x} = 0.2291$	$\bar{x} = 0.5963$
	$s = 0.0165$	$s = 0.0017$	$s = 0.0046$

TABLA 5.3

Soluciones de Citrato de Proxazol; muestras problema
(Concentración teórica 1 mg/ml).

0-Orden: Absorbancia a 255 nm Fig. 5.3

1a. Derivada: Distancia XY; Fig. 5.3

2^a Derivada: Distancia AB; Fig. 5.3

FIG. 5.3

Cittrato de Proxazol

Solución Problema

(1 mg/ml) en agua

Rendija: 2 nm

Velocidad: 60 nm/min.

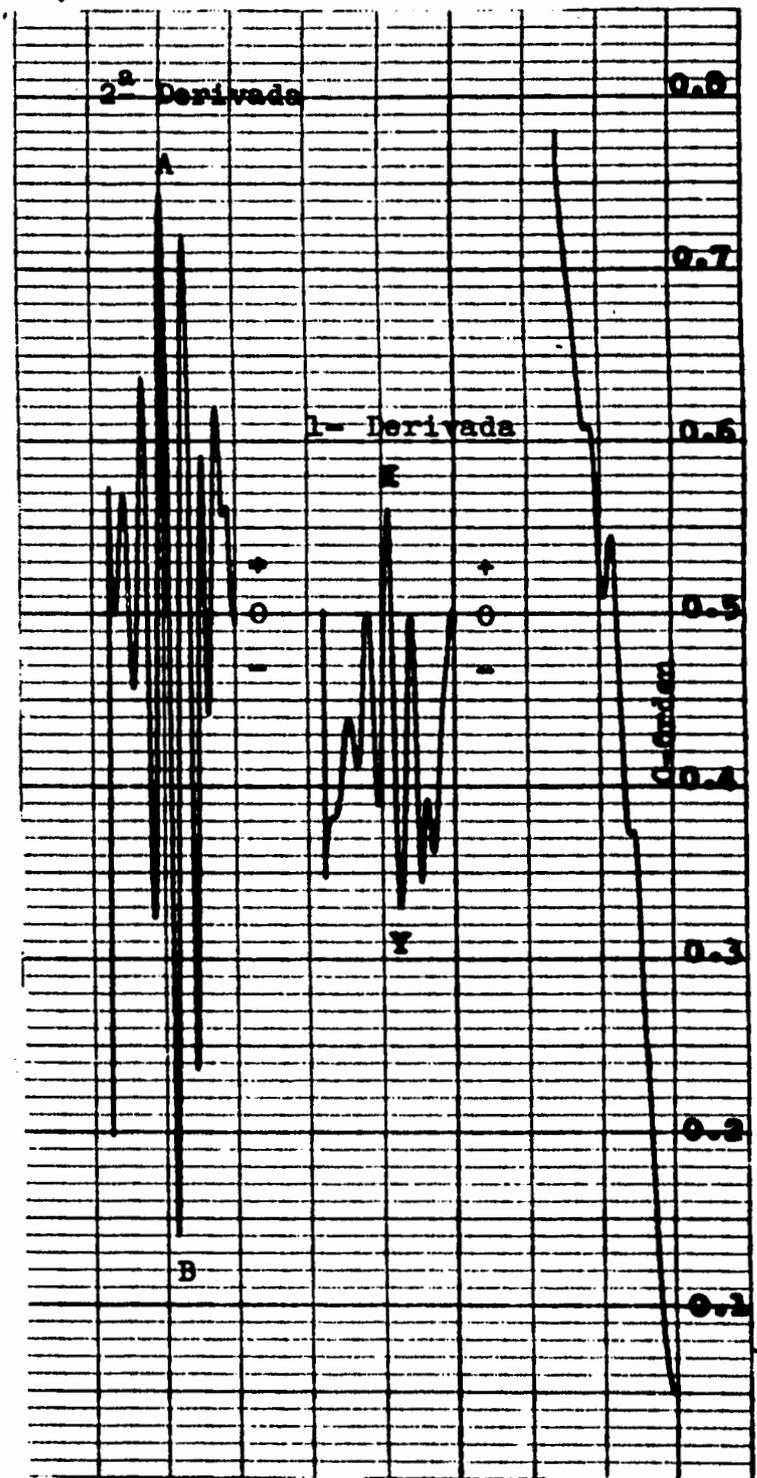
Respuesta: 0.5 s

Intervalo 270-235 nm

A = 250 nm

B = 253 nm

C = 255 nm



Ahora bien, en el estudio dedicado a la identificación del agente responsable de la interferencia espectroscópica, o sea del agente responsable del efecto de absorción de fondo se encontró que los tres excipientes de la formulación, interferían al espectro de absorción del citrato de proxazol. Esto se demostró al registrar los espectros de absorción de cada uno de los excipientes (almidón de maíz, avicel y estearato de magnesio), encontrándose que los excipientes que mayor interferencia presentaban eran el almidón de maíz y el avicel (Fig. 5.4). En igual forma, se observó que a menor longitud de onda, mayor era la interferencia espectral presentada por los excipientes.

En esta parte del trabajo, se hace mención de los espectros de absorción de los excipientes de la formulación, pero es probable que la sustancia absorbente, sólo sea una impureza que acompañe a las materias primas, o probablemente, las partículas pequeñas que logran pasar a través del papel filtro, dispersen la luz, provocando una falsa absorción.

Cuando se registró el espectro de absorción de la mezcla de excipientes (Fig. 5.5), se observó que la interferencia espectral producida por dichos excipientes, no se eliminaba en la primera derivada, pero, en la segunda derivada, la interferencia se eliminaba totalmente en todo el intervalo de longitud de onda de trabajo, permitiendo de esta manera la cuantificación -

en forma directa del citrato de proxazol, sin importar la presencia de los excipientes.

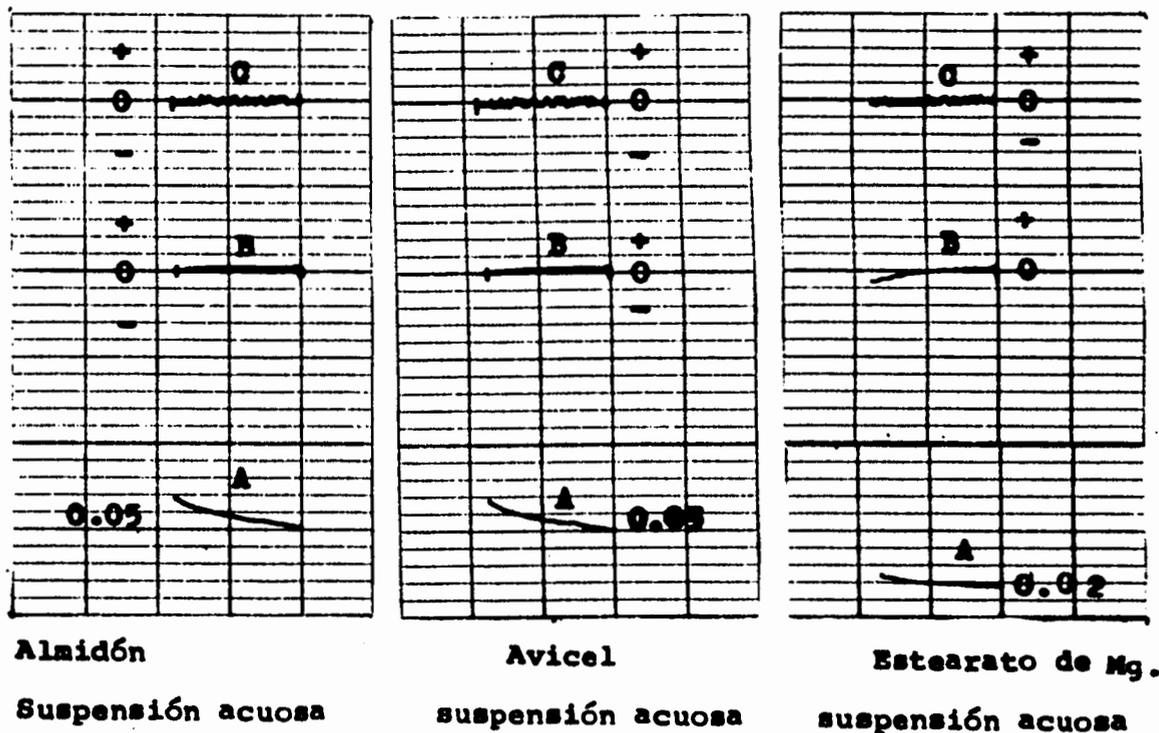


FIG. 5.4 Espectros de los excipientes de las tabletas en estudio.

Concentración 0.79 mg/ml

Rendija: 2 nm

Velocidad: 60 nm/min.

Respuesta: 0.5 s

A = 0-Orden

B = 1a. Derivada

C = 2a. Derivada

NOTA: La concentración indicada, es la concentración a la cual se preparó la suspensión y no la que existía en el sistema una vez filtrado.

Fig. 5.5

Mezcla de Excipientes en
agua destilada.

Almidón: 0.79 mg/ml

Avicel: 0.79 mg/ml

Estearato de

Mg : 0.02 mg/ml

Rendija: 2 nm

Velocidad: 60 nm/min.

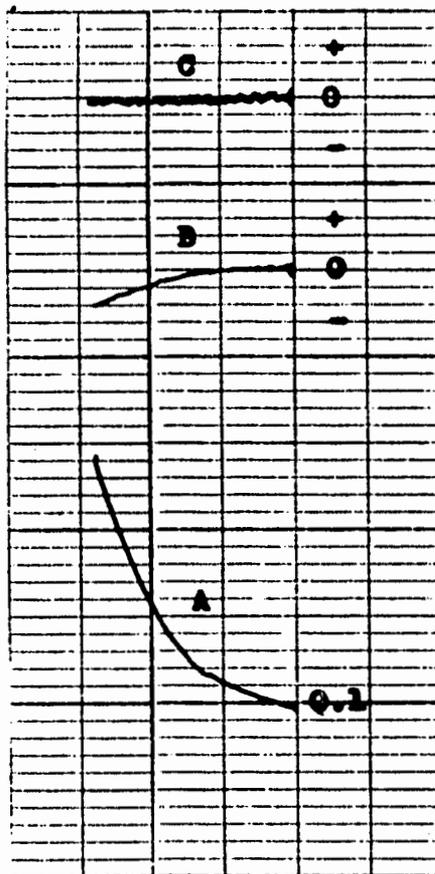
Respuesta: 0.5 s

Intervalo 270-210 nm

A = 0-Orden

B = 1a. Derivada

C = 2a. Derivada



Cuando se intentó cuantificar al citrato proxazol en presencia de turbidez o sea en presencia de las partículas de excipientes en suspensión, se encontró que el espectro de absorción (espectro de cero orden) se encontraba totalmente deformado (Fig. 5.6), ocurriendo lo mismo con el espectro de primera-derivada. Pero, al registrar el espectro de segunda derivada, se observó que tanto la interferencia producida por los excipientes en solución como la producida por las partículas de excipientes en suspensión, son totalmente eliminadas, presentando un espectro limpio de interferencias, permitiendo la cuantificación del citrato de proxazol en forma directa.

Con lo anterior, queda demostrada la nobleza del método de las derivadas espectroscópicas.

FIG. 5.6

Citrato de Proxazol.

Solución Problema sin
filtrar.

(1 mg/ml en agua

Rendija: 2 nm

Velocidad: 60 nm/min.

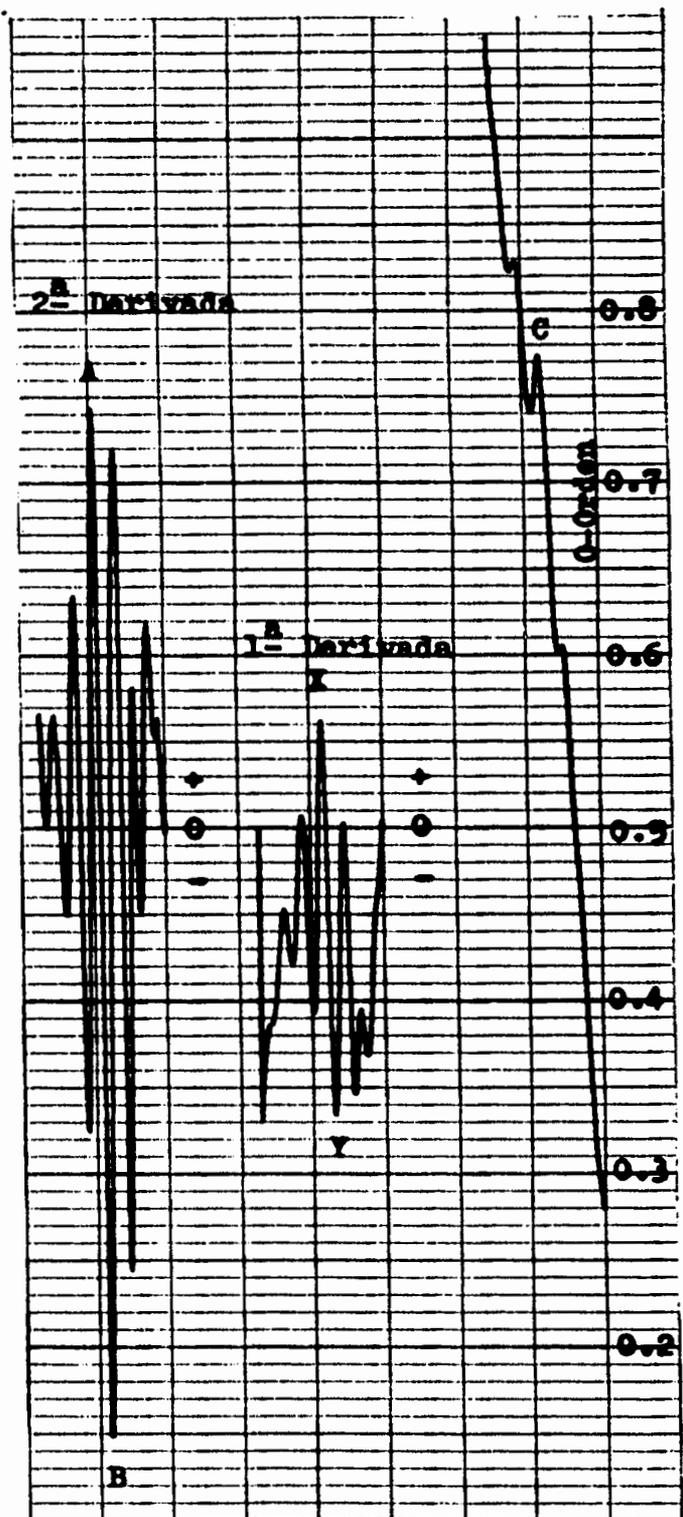
Respuesta: 0.5 s

Intervalo 270-235 nm

A = 250 nm

B = 253 nm

C = 255 nm



6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en éste trabajo -- se puede concluir que la espectroscopía de derivadas es una herramienta analítica de gran importancia en la resolución de --- problemas analíticos sencillos o complejos. En igual forma, por medio de la espectroscopía de derivadas, podemos eliminar interferencias de sustancias cuyas concentraciones no son conocidas con exactitud (excipientes por ejemplo). Por otro lado, la espectroscopía de derivadas es de gran utilidad al analizar la pureza de materias primas y productos naturales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fell Anthony F.
"The Analysis of Phenol and Aromatic Alcohols
by Second Derivative UV-Spectroscopy"
J. Pharm. Pharmac., 30, 63P (1978).
- 2.- Fell Anthony F.
"Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms by Second
Derivative Ultraviolet-Visible Spectrophotometry"
Proc. Analyt. Div. Chem. Soc., 15, 260-7 (1978).
- 3.- Schmitt A.
"Derivative Spectroscopy"
Perkin-Elmer Applications Data Bulletin ADS 103,
Perkin-Elmer Ltd., Norwalk, Conn., (1977).
- 4.- Balestrieri C.
"Second-Derivative Spectroscopy of Proteins: A
Method for the Quantitative Determination of
Aromatic Amino Acids in Proteins"
Eur. J. Biochem., 90, 433-40 (1978).
- 5.- Mc Farren Earl F.
"Criterion for Judging Acceptability of
Analytical Methods"
Anal. Chem., 42, 358-65 (1970).
- 6.- Green G.L.
"Derivative Luminescence Spectrometry"
Anal. Chem., 46, 2191 (1974).
- 7.- Strojek Jerzy W.
"Derivative Spectrophotometry: Application to
Trace Sulfur Dioxide Analysis".
Anal. Chem., 47, 1050-54 (1975).

- 8.- Elsayed Hady M.
"Spectrophotometric Determination of Tolbutamide, Thiamine Hydrochloride, and Pyridoxine Hydrochloride in Combination Products".
J. Pharm. Sci., 68, 739-41 (1979).
- 9.- Houpt P. M.
"Combination of a Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometer and a Gas Chromatograph".
Appl. Spectrosc., 31, 473-4 (1977).
- 10.- Hager Robert N.
"Derivative Spectroscopy With Emphasis on Trace Gas Analysis"
Anal. Chem., 45, 1131A-8A (1973).
- 11.- O'Haver T.C.
"Derivative and Wavelength Modulation Spectrometry"
Anal. Chem., 51, 91A-100A (1979).
- 12.- O'Haver T.C.
"Numerical Error Analysis of Derivative Spectrometry for the Quantitative Analysis of Mixtures"
Anal. Chem., 48, 312-318 (1976).
- 13.- Ichikawa Tetsuo
"Second Derivative Spectrophotometry as an Effective Tool for Examining Phenylalanine Residues in Proteins."
Biochim. Biophys. Acta, 494, 267-70 (1977).
- 14.- Porro T.J.
"Double-Wavelength Spectroscopy"
Anal. Chem., 44, 93A-103A (1972).
- 15.- Vo-Dinh T.
"The Applicability of Second-Derivative Method to Room-Temperature Phosphorescence Analysis"
Anal. Chem. Acta, 107, 261-71 (1979).

16.- Shibata Sho30

"Dual-Wavelength Spectrophotometry"
Anal. Chim. Acta, 62, 305-10 (1972).

17.- Such Vicente

"Stability Assays of Pharmaceutical Formulas
For Thiamine and Pyridoxine by High Performance
Thin-Layer Chromatography and Derivative
Ultraviolet Spectrometry"
Anal. Chem., 412-19 (1 80).