



## Exploración del tándem Espectrometría Infrarroja con transformada de Fourier - Mínimos Cuadrados Parciales para la cuantificación de excipientes en jarabes comercializados en el país.

Cristhian Quiroz, Carlos Ayala\*, Máximo Gallignani, María Brunetto, Arlenis Quintero, Yelitza Delgado, Pablo Carrero, Maribel Valero y Carlos Rondón.

Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Departamento de química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela. PO 440, Mérida, 5101-A.

(\*) [carlosayala@ula.ve](mailto:carlosayala@ula.ve)

Recibido: 08/06/2015

Revisado: 29/08/2015

Aceptado: 14/09/2015

### Resumen

En este trabajo se desarrolló un método directo para el análisis simultáneo de etanol y sacarosa en jarabes medicados, empleando la Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en la modalidad de ATR como método de detección y cuantificación de los analitos por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1). Las características analíticas del modelo de predicción resultaron satisfactorias y la exactitud de la metodología se certificó mediante análisis comparativos de muestras reales, con protocolos referenciados en la bibliografía especializada. Sobre esta base, la propuesta representa una alternativa válida que puede ser utilizada para el control de calidad en este tipo de formulaciones

**Palabras claves:** etanol; sacarosa; FTIR/ATR; PLS-1; jarabes

### Abstract

In this work a direct method for the simultaneous analysis of ethanol and sucrose in medicated syrups using Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) in ATR modality as detection method and quantification of analytes by Partial Least Squares (PLS-1) has been developed. The analytical characteristics of the prediction model were satisfactory and the accuracy of the methodology was certified by comparative analysis of real samples with protocols found in literature specialized. On this basis, the proposal represents a valid alternative that can be used for quality control in such formulations.

**Keywords:** ethanol; sucrose; FTIR/ATR; PLS-1; syrups

### Introducción

El etanol (EtOH) y la sacarosa (SAC) son excipientes cuya presencia en productos farmacéuticos ha sido discutida en los últimos tiempos, debido a los efectos tóxicos que ocasionan tras su consumo. Actualmente, los organismos que rigen la producción de medicamentos han venido exigiendo se disminuyan y declaren sus concentraciones en los rótulos de las formulaciones comerciales que los incluyan<sup>1</sup>; trayendo consigo una demanda en el desarrollo de metodologías válidas y viables que puedan ser aplicables para llevar a cabo su control de calidad en el producto terminado. Tanto el EtOH como la SAC han sido ampliamente determinados mediante diversas técnicas analíticas (ATR-FTIR<sup>2,3</sup>, técnicas cromatográficas<sup>1,4</sup> y técnicas electroquímicas<sup>5</sup>) y en diferentes matrices. Sin embargo, en el mejor conocimiento de los autores, no se ha descrito ningún método que involucre a la espectrometría FTIR con medidas de reflexión como Reflectancia Total Atenuada (ATR) en la región

del infrarrojo medio (MIR), para su determinación simultánea en jarabes. En tal sentido, el objetivo de este trabajo consistió en desarrollar una metodología alternativa que pueda ser utilizada para el control de calidad de ambos compuestos en jarabes medicados, utilizando como técnica de detección a la espectrometría FTIR/ATR y cuantificación por mínimos cuadrados parciales (PLS-1).

### Materiales y métodos

#### Equipos

Los espectros IR se adquirieron en un espectrómetro de absorción FTIR, Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 (Nolwack, CT. USA), equipado con un accesorio ATR-Universal (1 reflexión) de diamante sobre KRS-5. El software Spectrum v.6.3.4 permitió el control del equipo y, la data espectral se procesó a través del software quimiométrico Spectrum Quant Plus.

### Reactivos y muestras

Los reactivos empleados fueron de grado analítico, y para los estándares acuosos se utilizó agua ultra-pura proporcionada por un sistema Milli-Q. Se preparó: i) una solución patrón de EtOH 10 % (v/v), y ii) una solución patrón de SAC 15 % (m/v); a partir de reactivos comerciales (EtOH: J.T. Baker, 99,8% de pureza, Xalostoc, México; SAC: Laboratorios HIMEDIA, 99,9 % de pureza, Bombay, India) respectivamente. Para la calibración (11 estándares) y validación (nueve estándares), se utilizaron soluciones contentivas de los analitos (0,5-10 % (v/v) EtOH / 3-15 % (m/v) SAC), para ello, se empleó un diseño de variaciones continuas<sup>6</sup>. Los sets de calibración, validación y predicción se analizaron utilizando el algoritmo PLS-1, siguiendo el método de validación cruzada. Para el set de predicción, se analizaron directamente seis (6) muestras de jarabes -comerciales- provenientes de cinco laboratorios nacionales que declaran contenidos de 0,6-9,5 % (v/v) de EtOH y de 32-50 % (m/v) de SAC. Las formulaciones con concentraciones superiores a 5 % (v/v) del alcohol y 15 % (m/v) del azúcar se diluyeron previamente en agua.

### Procedimiento general

La secuencia de análisis consta de los siguientes tres pasos: i) se coloca una gota de la solución a analizar sobre la superficie del cristal -en el accesorio ATR-; ii) se adquiere el espectro FTIR/ATR (resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ ) y; iii) se procesa la data espectral de interés.

### Métodos de referencia

Los análisis de referencias se realizaron a través de protocolos individuales encontrados en la bibliografía especializada. Para el EtOH, se llevaron a cabo por CG con detección de ionización en llama (FID)<sup>1</sup>. Por su parte, la SAC, el análisis comparativo se realizó por polarimetría, siguiendo el método descrito en el Official Methods of Analysis<sup>7</sup>.

## Resultados y discusión

### Estudios preliminares

El EtOH y la SAC presentan absorción en la región del MIR. En la Figura 1, se muestran los espectros FTIR/ATR obtenidos de ambos analitos a partir del compuesto sólido y en solución acuosa. Al observar el comportamiento espectral de ambas especies en solución se aprecian algunos cambios; no obstante, la mayoría de las bandas se ven muy poco afectadas en este medio, condición que las hace potencialmente útiles desde el punto de vista analítico. Este comportamiento - espectral - igualmente evidencia que el agua es un disolvente adecuado para llevar a cabo la determinación propuesta, ya que ésta no presenta interferencias espectrales en la región de interés y, además, provee un medio adecuado para llevar a cabo la preparación de las soluciones estándares de trabajo, considerando que el EtOH es miscible

en ella bajo cualquier proporción y la solubilidad de la SAC (a 20 °C) es de 2,04 g/mL en este solvente.

### Selección del modelo de calibración

Se utilizaron dos algoritmos para el análisis de los espectros (PCR y PLS-1) correspondientes a las soluciones estándares de los analitos bajo estudio, encontrando el menor error así como prestaciones analíticas más apropiadas para llevar a cabo el análisis, en el que involucra el algoritmo PLS-1 para el espectro de absorbancia con primera derivada y ventana de derivatización de 18 puntos; por tanto, éste fue el seleccionado para llevar a cabo la cuantificación de los analitos en las distintas soluciones (ver tabla 1).

### Optimización de parámetros experimentales

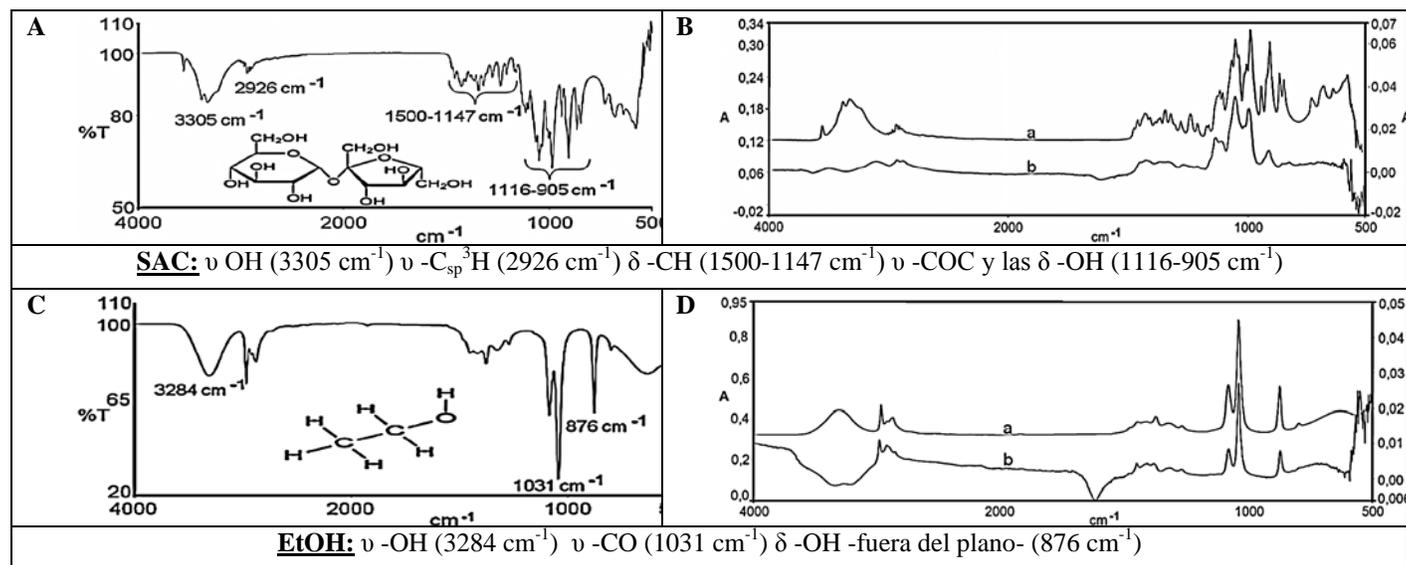
La metodología propuesta solo requirió de la optimización de las condiciones instrumentales-espectroscópicas; tales como: resolución nominal ( $R_N$ ) y ventana de derivatización ( $V_D$ ). Para ello, se empleó un diseño factorial ( $2^4$ ); para la realización de estas experiencias se utilizaron una solución estándar (EtOH = 5 % (v/v)/SAC = 10 % (m/v)) y soluciones-muestras bajo evaluación. El análisis de varianza arrojó que los factores estudiados eran significativos ( $p = 0,002 R_N$  y  $p = 0,001 V_D$ ), por tanto se decidió realizar un estudio de superficie de respuestas para la selección de los parámetros; por su parte, los coeficientes de múltiples determinaciones ( $r^2$ ) para el EtOH y SAC fueron de 0,9467 y 0,9315, respectivamente; los mismos indican un buen ajuste del modelo, y permiten inferir que éste es adecuado para llevar a cabo la explicación de las variables estudiadas. Las figuras 2A y 2C, muestran las superficies de respuesta obtenidas, en las mismas se puede observar que para el parámetro  $R_N$ , un comportamiento diferente en ambos analitos, caso contrario para la  $V_D$ , donde si observa un máximo definido alrededor de 17 puntos de derivación; los gráficos de contornos (ver figuras 2B y 2D), permiten apreciar que las condiciones más adecuadas para realizar el análisis de interés resultaron ser:  $R_N$  de 4  $\text{cm}^{-1}$  y  $V_D$  de 18 puntos.

### Validación del método propuesto

Para establecer la confiabilidad de la propuesta metodológica, se realizaron experiencias dirigidas a caracterizar analíticamente el sistema, estudiar posibles efectos interferentes por parte de la matriz y a determinar la exactitud del método. En la tabla 1, se muestran las características del modelo seleccionado (PLS-1 / Espectro de absorción derivado de primer orden), en ella se aprecian que los coeficientes de determinación ajustados, así como los valores de SEP y SEE obtenidos, resultan adecuados para llevar a cabo la predicción de las concentraciones en las soluciones muestras. Por lo tanto, se continuó con la estimación de la precisión del método, en base a criterios de repetitividad durante el día y entre días; encontrándose una desviación estándar relativa (RSD) para el EtOH fue de 0,8 % y 1,7 %, respectivamente; por su

parte, para la SAC fue de 0,6 % y 1,4 %. Los límites de detección ( $3\sigma$ ) y cuantificación ( $10\sigma$ ) determinados fueron: 0,25 y 0,80 % v/v para el EtOH y de 0,35 y 1,20 % m/v para

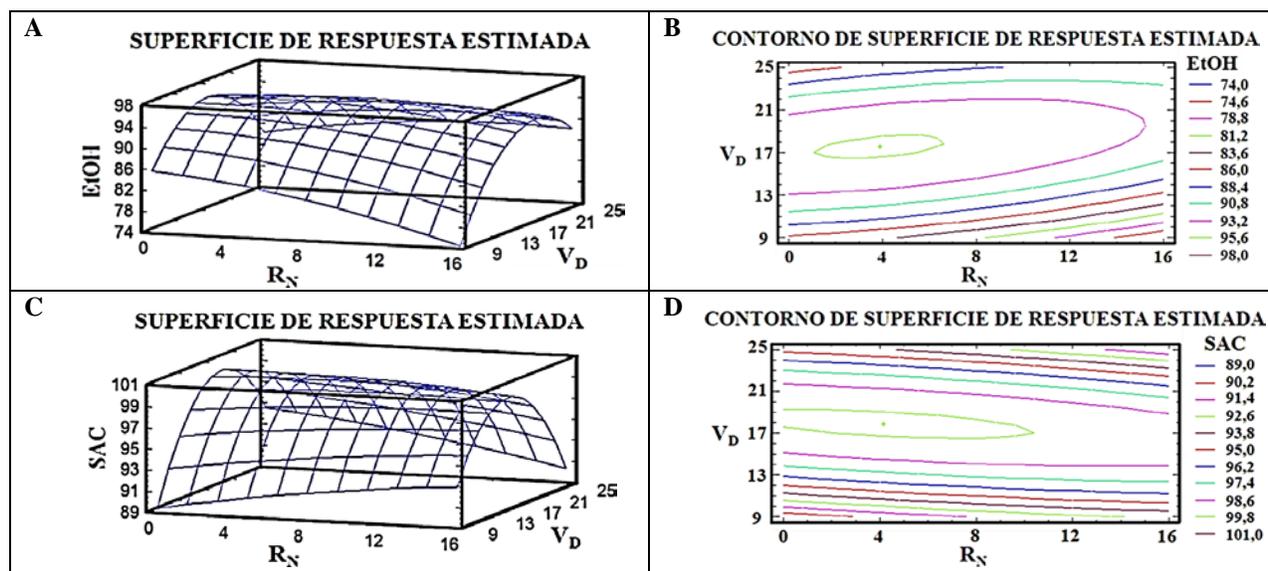
la SAC, respectivamente. Y una frecuencia de análisis de 30 muestras por hora. Asimismo, se realizó un estudio preliminar de la exactitud del método a través del análisis de



**Fig. 1:** Comportamiento espectral de los analitos: A) Espectro FTIR/ATR de la SAC en fase sólida. B) Espectros FTIR/ATR de: (a) SAC en fase sólida y (b) en solución acuosa (10% m/v). C) Espectro FTIR/ATR film del EtOH. D) Espectros FTIR/ATR: (a) film de EtOH y (b) en solución acuosa (5% v/v).

**Tabla 1:** Modelos de calibración.

Estadístico	PCR (Intervalo espectral: $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ )				PLS-1 (Intervalo espectral: $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ )			
	Espectro de absorbancia		Espectro de absorbancia ( $1^{\text{era}}$ derivada / $V_D = 18$ )		Espectro de absorbancia		Espectro de absorbancia ( $1^{\text{era}}$ derivada / $V_D = 18$ )	
	EtOH	SAC	EtOH	SAC	EtOH	SAC	EtOH	SAC
SEP	0,4055	0,1331	0,3366	0,1782	0,4616	0,1207	0,4048	0,1309
SEE	0,3866	0,1134	0,2957	0,1252	0,3641	0,1168	0,2842	0,1127
$r^2$ (%)	95,69	99,96	97,88	99,95	98,93	99,97	99,13	99,96
PC's o LV's	1	2	4	3	3	3	2	3



**Fig. 2:** Optimización de parámetros experimentales.

**Tabla 2:** Análisis en muestras reales.

Muestra	Analitos					
	EtOH (media $\pm$ s; n=5) % (v/v)			SAC (media $\pm$ s; n=5) % (m/m)		
	Etiqueta	CG-FID <sup>1</sup>	FTIR/PLS-1	Etiqueta	Polarimetría <sup>7</sup>	FTIT/PLS-1
<b>J1</b>	1,526	1,56 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,1	---	0	0
<b>J2</b>	0,633	5,14 $\pm$ 0,02	5,2 $\pm$ 0,1	45,000	37,4 $\pm$ 0,2	37,6 $\pm$ 0,2
<b>J3</b>	6,337	6,34 $\pm$ 0,02	6,4 $\pm$ 0,1	50,000	50,9 $\pm$ 0,3	51,2 $\pm$ 0,2
<b>J4</b>	9,569	12,96 $\pm$ 0,03	13,2 $\pm$ 0,2	32,175	33,2 $\pm$ 0,2	33,6 $\pm$ 0,2
<b>J5</b>	5,069	15,34 $\pm$ 0,03	15,8 $\pm$ 0,1	40,000	41,6 $\pm$ 0,3	42,0 $\pm$ 0,2

soluciones fortificadas, arrojando porcentajes de recuperación en el caso del EtOH que oscilan entre 101,7-103,9 %; por su parte, los de la SAC se encuentran entre 100,4-104,1 %. Finalmente fueron analizadas las muestras reales con la metodología diseñada y los métodos de referencia; la respectiva comparación estadística (pruebas F-Fisher y t-student) de los valores arrojados por los métodos involucrados, no mostraron diferencias significativas con un 95 % de confianza. Por tanto, estos ensayos corroboran la ausencia de interferencias de matriz y la exactitud del método propuesto; así como su confiabilidad, viabilidad y aplicabilidad.

#### Análisis de muestras reales

Como se puede apreciar en la Tabla 2, en cuatro de los jarabes analizados se encontraron concentraciones de SAC coherentes con el valor reportado por el fabricante (J1, J3, J4, J5), de igual manera los valores determinados -en estos casos- se encuentran dentro del intervalo de tolerancia aceptado por la USP ( $\pm 10$  %)<sup>8</sup>. Con respecto al EtOH solo en dos de los casos (J1 y J3) se encontraron resultados próximos a los valores mostrados en las etiquetas de los productos. En este punto, es importante mencionar que en consulta con investigadores del área farmacéutica, éstos nos indican que en la mayoría de los medicamentos de este tipo no se tiene un control total sobre la concentración final de los excipientes, contrario al principio activo farmacéutico, en donde existe un mayor seguimiento. Asimismo es importante señalar, que en esta sección se analizaron jarabes de uso pediátrico y en todos ellos se encontraron concentraciones de EtOH dentro de los límites acordados para este tipo de formulaciones<sup>1</sup>.

#### Conclusión

El tándem espectrometría FTIR/ATR – quimiometría proporciona un medio de trabajo con alta potencialidad para abordar la determinación simultánea, simple y directa de EtOH y SAC en jarabes, con prestaciones analíticas atractivas; además, el método no requiere de etapas previas de separación y la manipulación de la muestra es mínima. Adicionalmente, la metodología involucrada puede considerarse ecológica (“química verde”) ya que la cantidad de reactivos utilizados es mínima y se evitó el uso de solventes

orgánicos, solamente se utilizan los patrones y agua como medio de dilución, estas características le confieren al método bajo costo y accesibilidad a muchos laboratorios de control de la industria farmacéutica.

#### Referencias

1. VS Kashikar. Validation of a gas chromatographic method for determination of ethanol in liquid preparations intended for children. **Int. J. Chem. Res.**, **2**, 32-34 (2011).
2. JM Garrigues, M Akssira<sup>1</sup>, FJ Rambla, S Garrigues, M de la Guardia. Direct ATR-FTIR determination of sucrose in beet root. **Talanta**, **51**, (2), 247–255 (2000).
3. R Nagarajan, A Gupta, R Mehrotra, MM Bajaj. Quantitative Analysis of Alcohol, Sugar, and Tartaric Acid in Alcoholic Beverages Using Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. **J. Autom. Meth. Managem. Chem.**, Vol. 2006, 1–5 (2006).
4. M Chunmei, S Zhen, C Changbao, Z Lili, Z Shuhua. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. **Food Control**, **145**, 784-788 (2014).
5. H Shekarchizadeh, A Ensafi, M Kadivar. Selective determination of sucrose based on electropolymerized molecularly imprinted polymer modified multiwall carbon nanotubes/glassy carbon electrode. **Mat. Sci. Eng.**, **33**, 3553-3561 (2013).
6. DA Skoog, J Leary. Análisis Instrumental. Editorial Mc. Graw Hill, Interamericana Editores, S. A. U., cuarta edición, Madrid, España (1994).
7. K Helrich. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists. USA, 1012-1016 (1990).
8. Convención de la Farmacopea de Estados Unidos. Farmacopea de Los Estados Unidos de América USP 35. 30<sup>ma</sup> Edición, United Book Press: USA, 661-664; 861; 2036; 2168-2170 (2012).