

Validación de una metodología analítica empleando espectrofotometría ultravioleta para el estudio de la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes alcohol + agua

Resumen

En este trabajo se propone y se valida una metodología analítica que utiliza la espectrofotometría UV para estudiar la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes. Los parámetros evaluados fueron: especificidad, linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación, así como la estabilidad de los fármacos bajo las condiciones de análisis de solubilidad. El método propuesto es útil para determinar la solubilidad de estas sulfonamidas en función de la temperatura y la composición cosolvente.

Palabras clave: validación, espectrofotometría UV-Vis, sulfonamidas, solubilidad.

Validation of an analytical method for the study of the solubility of some sulfonamides in alcohol + water cosolvent mixtures by ultraviolet spectrophotometry

Abstract

An analytical method by UV-spectrophotometry has been proposed and validated to study the solubility of some sulfonamides in cosolvent mixtures. The parameters evaluated were specificity, linearity, precision, and detection and quantification limits, as well as the drug stability under the solubility analysis conditions. The developed method was useful to determine the solubility of these drugs as a function of temperature and cosolvent concentration.

Keywords: Validation, UV-Vis-spectrophotometry, sulfonamides, solubility.

Validação de um método analítico utilizando espectrofotometria de UV para o estudo da solubilidade de algumas sulfamidas em misturas álcool + água

Resumo

Neste trabalho propomos é validamos uma metodologia analítica ultravioleta para o estudo da solubilidade de alguns sulfamidas em misturas dos solventes. Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação, e a estabilidade dos fármacos nas condições de estudo. O método proposto é útil para a determinação da solubilidade destes sulfamidas em função da temperatura e da composição do cosolvente.

Palavras-chave: validação, espectrofotometria UV-Vis, sulfamidas, solubilidade.

Introducción

EN LA ACTUALIDAD, LAS SULFONAMIDAS tienen importancia farmacológica relevante en el tratamiento de algunas infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, algunos hongos y ciertos protozoarios debido a que son inhibidoras competitivas de la enzima bacteriana dihidropteroato sintetasa (1). Esta enzima es necesaria para el

procesamiento adecuado del ácido *para*-aminobenzoico, esencial en la síntesis de ácido fólico. Por esta razón, estas sulfonamidas se consideran antibióticos de amplio espectro (2, 3). Estudios realizados por Wang *et al.*, exponen la gran importancia de las sulfonamidas en el campo de la química supramolecular y medicinal, mediante el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos producto de la combinación de dos compuestos, entre ellos las sulfonamidas, con lo que se obtienen agentes terapéuticos más potentes, de mayor espectro, menos tóxicos, con menores efectos

adversos, mejor biodisponibilidad y, por tanto, mayor seguridad (4). De otro lado, Krátký *et al.*, plantean la posibilidad del diseño de fármacos antituberculosos a partir de varias sulfonamidas, puesto que estas inhiben la β -anhidrasa carbónica a bajas concentraciones en *Mycobacterium tuberculosis*, lo que favorecería el surgimiento de efectos adversos (5). Lo anterior pone de manifiesto la importancia de los estudios que permitan caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas, dentro de las cuales la solubilidad es una de las más relevantes puesto que es parte esencial en el desarrollo de productos farmacéuticos, ya que afecta sus características biofarmacéuticas, farmacodinámicas y farmacocinéticas (6), por lo que la validación de las metodologías analíticas para la cuantificación de estos fármacos es de gran relevancia para el estudio de su comportamiento químico y biológico (7-9).

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la solubilidad es el denominado "método de agitación de frasco", propuesto por Higuchi y Connors (10). Una gran cantidad de valores obtenidos por este método han sido sistematizados recientemente por Jouyban (11). Este método implica el uso de una metodología analítica para la cuantificación del analito de interés, la cual debe ser validada con el ánimo de proporcionar resultados precisos en su aplicación rutinaria (12). En este sentido la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), ha concertado los requisitos de validación en dos directrices: la Q2(R1) y la Q2B (13, 14). La primera resume y define las características necesarias para varios tipos de procedimientos de ensayo; la segunda describe los datos experimentales requeridos y la interpretación estadística de los mismos. Con base en lo anterior, en este trabajo se realiza la validación de una metodología analítica por espectrofotometría ultravioleta para la cuantificación de sulfadiazina, (SD, 4-amino-*N*-2-pirimidinilbencensulfonamida, CAS RN: [68-35-9], Figura 1), sulfamerazina, (SMR, 4-amino-*N*-(4-metil-2-pirimidinil)-bencensulfonamida, CAS RN: [127-79-7], Figura 1) y sulfametazina (SMT, 4-amino-*N*-(3,5-dimetilfenil)-bencensulfonamida, CAS RN [57-68-1], Figura 1) (15, 16), en cuatro solventes puros: agua (W), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y propanol (PrOH), así como en mezclas co-solventes (MeOH + W, EtOH + W y PrOH + W), puesto que las tres sulfonamidas presentan grupos cromóforos en su estructura molecular, los cuales permiten obtener una adecuada absorción en la región UV.

Debido a que la técnica de espectrofotometría ultravioleta (UV) no es una metodología específica, puesto que no permite discriminar a cuál analito corresponde una lectura, se hace necesario garantizar que en el momento de la determinación de la absorbancia, la muestra corresponda al analito de interés y no a una mezcla de sustancias o productos de degradación; por esta razón se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) con detector UV/DAD (CLAE-DAD) para verificar la presencia o ausencia de productos que pudieran generarse durante el tiempo de equilibrio de saturación de las sulfonamidas.

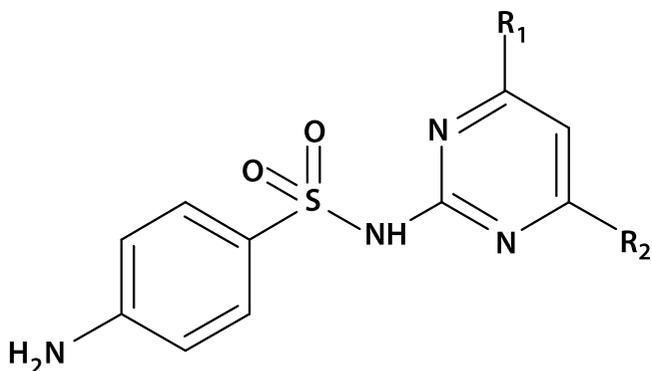


Figura 1. Estructura molecular genérica de las sulfonamidas estudiadas: sulfadiazina: R_1 y $R_2 = H$; sulfamerazina: $R_1 = H$ y $R_2 = CH_3$; sulfametazina: R_1 y $R_2 = CH_3$.

Materiales y métodos

Estándares y reactivos

Los estándares sulfadiazina (SD) R.A., sulfamerazina (SMR) R.A. y sulfametazina (SMT) R.A., con pureza mayor de 99%, fueron obtenidas de Sigma (E.U.); etanol absoluto R.A Merck (Alemania); metanol Reag. Ph. Eur. HPLC, Merck (Alemania) con pureza mayor de 99,9%; propanol R.A. Merck (Alemania) con pureza mayor de 99,9%; acetonitrilo Reag. Ph. Eur., Merck (Alemania) con pureza mayor de 99,9%; ácido trifluoroacético (TFA) Merck (Alemania), pureza > 99,9%; agua con conductividad menor a $2 \mu S \text{ cm}^{-1}$; tamiz molecular números 3 y 4 Merck; filtros 0,45 μm Millipore Corp. Swinnex⁻¹³ (E.U.); filtros de membrana de acetato de celulosa 0,3 μm Advantec MFS, Inc. (E.U.); equipo de filtración al vacío; columna Eclipse XDB-C18 4,6 mm x 150 mm; espectrofotómetro UV/VIS Biomate 3 Electron Corporation (E.U.); cromatógrafo líquido de alta eficiencia Serie Agilent 1200 con detector UV de arreglo de diodos (E.U.); balanza analítica Ohaus Pioneer TM sensibilidad $\pm 0,0001 \text{ g}$ (E.U.); balanza digital de platillo externo sensibilidad $\pm 0,01 \text{ g}$; ultrasonido Elma E 60 H Elmasonic (E.U.); baño termostático con agitación Julabo SW23 (Alemania); baño termostático de recirculación Neslab RTE 10 Digital One Thermo Electron Company (E.U.).

Condiciones de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

Se empleó un cromatógrafo líquido modular Agilent 1200 Series, con automuestreador Agilent 1260 Infinity, desgasificador Agilent 1200 Series, bomba cuaternaria Agilent 1200 Series, detector UV/VIS con arreglo de diodos e integrador Agilent 1200 Series, así como una columna Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 3,5-5 μm) cuya temperatura de operación fue de 25 °C. El volumen de inyección fue de 10 μL ; la fase móvil utilizada fue el sistema de gradiente lineal de dos solventes con agua/acetonitrilo, ambos con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05% cuya composición de partida fue 90/10 a cero minutos, luego se cambió a 85/15 a los diez minutos. La velocidad de flujo fue de 2,5 mL/min, y las longitudes de onda empleadas para la cuantificación fueron de 254 nm y 268 nm, con un ancho de pico de 0,1 minutos, en un rango de escaneo de 190 a 400 nm y un ancho de banda de 1,0 nm con una apertura (*slit*) de 4 nm.

Determinación de la solubilidad de las sulfonamidas (SD, SMR y SMT)

Para la determinación de la solubilidad termodinámica (equilibrio entre la fase líquida, correspondiente a la solución saturada, y la fase sólida, correspondiente al fármaco no disuelto) de las sulfonamidas, se empleó el método de agitación de frasco propuesto por Higuchi y Connors (10), así:

Preparación de la muestra

Se adicionó una cantidad suficiente de cada sulfonamida para obtener una solución saturada en equilibrio con la fase sólida a 20 g de solvente (W, MeOH, EtOH y PrOH), contenida en frascos de vidrio ámbar con capacidad de 30 mL y con tapa de polipropileno. Cada muestra se sometió a ultrasonido durante 30 minutos antes de ser colocada en el termostato a la temperatura de estudio; posteriormente se agitó periódicamente durante el tiempo de equilibrio.

Separación de fases

Para la separación de fases de la solución saturada se empleó el método de filtración a través de membranas con diámetro de poro de 0,45 μm

para asegurar la ausencia de partículas sólidas, teniendo en cuenta que las jeringas y filtros estuvieran termostatados a la temperatura de estudio. Para reducir los posibles errores en la determinación de la solubilidad por la adsorción del soluto en el filtro, se purgó el mismo con la solución saturada para saturar los sitios de adsorción.

Análisis de la solución saturada

Se realizó un análisis espectrofotométrico UV con las condiciones descritas con anterioridad, para lo cual se tomó una masa de solución de cada una de las muestras, realizando las respectivas diluciones gravimétricas en etanol; luego se determinaron las absorbancias en el espectrofotómetro. Se aseguró, además, que la absorbancia se encontrara en la zona de linealidad de la curva de calibración obtenida para cada sulfonamida.

Validación del método analítico

La validación del método analítico por espectrofotometría UV se realizó teniendo en cuenta los lineamientos establecidos en la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, International Conference on Harmonization), la farmacopea USP y las normas de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (13, 14, 17, 18), analizando los siguientes parámetros:

Especificidad

Se validó la capacidad del método analítico para cuantificar cada una de las tres sulfonamidas de forma inequívoca. Inicialmente se determinó el espectro ultravioleta de cada sulfonamida en EtOH, para obtener la longitud de onda de máxima absorbancia (λ_{max}) (Figura 2). De otro lado, si bien es claro que cuando se realiza experimentalmente una determinación con el espectrofotómetro, el mismo solvente de las diluciones es utilizado como blanco, y por lo tanto el equipo descuenta la posible contribución del mismo, en este trabajo se realizó un análisis mediante CLAE-DAD de los solventes puros empleados en el estudio de solubilidad (MeOH, EtOH y PrOH) a la longitud de onda de máxima absorbancia de los analitos para determinar si éstos absorben en estas condiciones, encontrándose que los cromatogramas obtenidos no muestran ningún pico en esa longitud de onda (Figura 3).

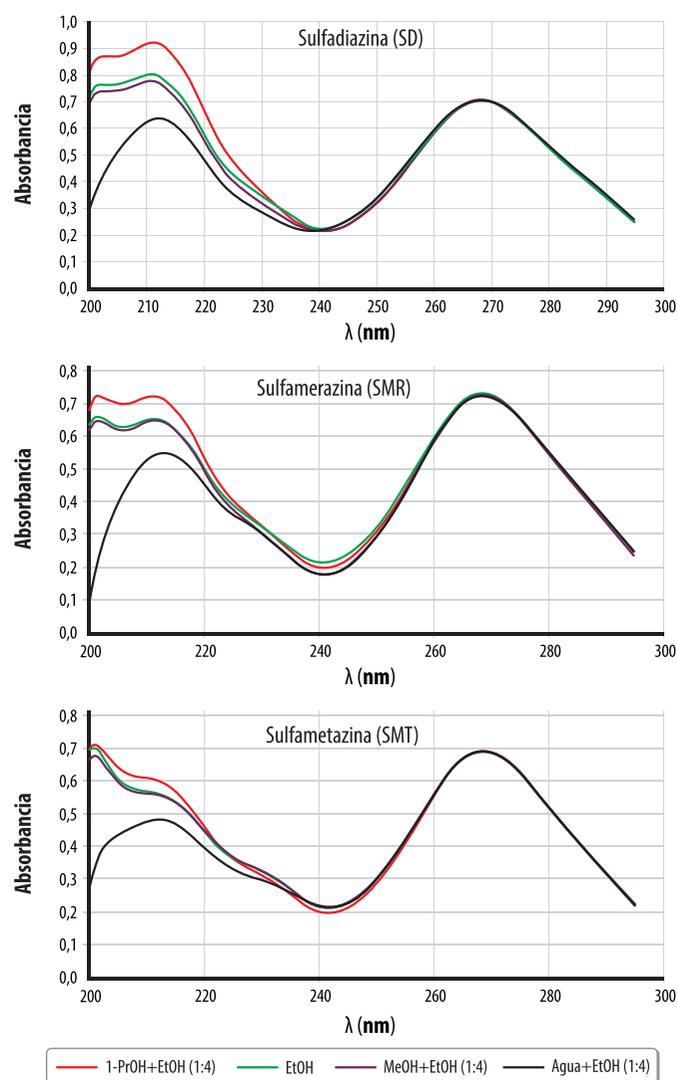
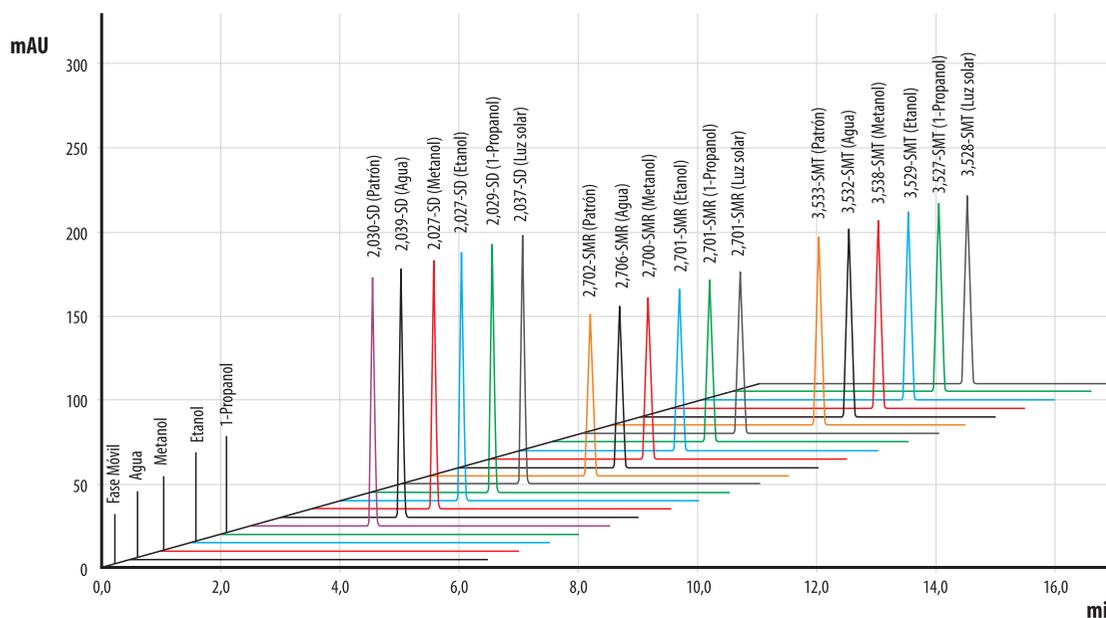


Figura 2. Espectros de absorción ultravioleta de SD, SMR y SMT en mezclas W+EtOH 1:4, MeOH+EtOH 1:4, etanol puro y EtOH+PrOH 1:4 obtenidos mediante un espectrofotómetro UV/VIS Biomate 3 Electron Corporation.

Figura 3. Cromatogramas del estándar de cada sulfonamida (SD, SMR y SMT) y de muestras expuestas a condiciones que pueden afectar la estabilidad de los analitos a una longitud de onda de 268 nm, obtenidos con un equipo CLAE-DAD.



Adicionalmente, con el ánimo de garantizar que al momento de realizar la cuantificación no hubiera presencia de productos de degradación que pudieran interferir en la medida, lo que arrojaría datos inexactos, se sometió cada fármaco a condiciones de estrés: exposición a la luz solar directa (solamente en agua) y temperatura de 50 °C en los cuatro solventes empleados en el estudio de solubilidad (W, MeOH, EtOH y PrOH) durante cinco días. Las condiciones de estrés, referidas a la hidrólisis ácida y básica de los analitos, no se realizaron en esta investigación puesto que el objetivo global del presente estudio no consistió en determinar productos de degradación de las sulfonamidas en condiciones extremas de pH, ya que las mismas no se presentan en este tipo de estudios fisicoquímicos. Las muestras fueron analizadas mediante CLAE-DAD, con el fin de establecer la presencia o ausencia de sustancias de degradación que pudieran interferir de manera directa en las lecturas espectrofotométricas (Figura 3).

El criterio de aceptación de este parámetro consiste en demostrar que la lectura del espectrofotómetro es consecuencia únicamente de la concentración del fármaco en la dilución correspondiente y no de la presencia de los solventes utilizados o posibles productos de degradación que se puedan generar bajo las condiciones de solubilidad, durante el tiempo de equilibrio de saturación.

Linealidad y rango

Para evaluar la linealidad se establecieron cinco niveles de concentración, así: 1,5; 4,5; 7,5; 10,5 y 13,5 µg/g para la SD, mientras para la SMR y la SMT fueron de 2,0; 5,0; 8,0; 11,0 y 14,0 µg/g. Se utilizó etanol absoluto como solvente, realizando tres replicas (niveles de concentración $K=5$, número de réplicas $n=3$) para un total de 15 determinaciones por cada sulfonamida. Las muestras se analizaron de manera aleatoria y no de manera creciente para ofrecer un análisis estadístico válido. La evaluación de la linealidad se obtuvo a través del análisis de varianza (ANOVA) para la regresión, y el estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto con un grado de significancia $\alpha = 0,05$.

Precisión

La ICH Q2B (14) define como ámbito de aplicación de la precisión, la determinación cuantitativa de los principios activos, por lo que se hace necesario evaluar la precisión mediante el estudio de la repetibilidad instrumental y del método, además de la precisión intermedia.

Para evaluar la *repetibilidad del equipo*, se preparó una solución de SD con una concentración cerca de la concentración nominal (7,5 µg/g) a la cual se le determinó 12 veces su absorbancia. El criterio de aceptación de este parámetro es que el coeficiente de variación de las medidas sea menor al 1,0% (18).

En cuanto a la *repetibilidad del método*, ésta se analizó a partir de una solución a la concentración nominal de la recta de calibración, realizando siete réplicas para cada sulfonamida. El criterio de aceptación de este parámetro es que el coeficiente de variación de las medidas sea menor al 1,0% (18).

Finalmente, la *precisión intermedia* se evaluó considerando dos analistas y realizando las mediciones durante tres días diferentes por triplicado, lo que implica la preparación de cada muestra desde la pesada. El criterio de aceptación para este parámetro es que el coeficiente de variación de las medidas sea menor que el doble del coeficiente de variación correspondiente a la repetibilidad del método (18).

Los resultados del estudio de linealidad se tabularon relacionando las concentraciones y su respuesta instrumental (absorbancia), expresando su relación matemáticamente como una recta de regresión lineal de la forma $y = a + bx$, obtenida mediante el método de ajuste de mínimos cuadrados.

Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

Los límites de detección y cuantificación se determinaron a partir de la pendiente y la desviación estándar del intercepto de la curvas de cali-

bración en el rango de linealidad para cada una de las sulfonamidas analizadas en este estudio (14, 18, 19-21).

Estabilidad

Con el fin de determinar la estabilidad de las tres sulfonamidas en aquellas condiciones a las que estarían expuestas durante el ensayo de solubilidad, se prepararon un total de 15 muestras (tres de cada sulfonamida en cada alcohol, y seis en agua, de las cuales tres se expusieron a luz solar directa, garantizando el equilibrio termodinámico de saturación (presencia de dos fases sólido-líquido) y se termostataron las muestras a 50 °C durante 120 h (5 días). Las áreas obtenidas por CLAE-DAD de SD, SMR y SMT, determinadas al comienzo de cada ensayo, se compararon con las obtenidas al final del ensayo con el fin de identificar su posible degradación.

Resultados y discusión

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en etanol absoluto, puesto que la solubilidad de las tres sulfonamidas (SD, SMR y SMT) en este solvente es alta, reduciendo así el riesgo de precipitación; por esta razón las diluciones de cada una de las muestras se hicieron en este alcohol, a pesar de que la matriz inicial puede ser un solvente o mezcla de solventes diferentes de etanol. Se evaluó, además, la influencia de todos los solventes empleados en la respuesta analítica, como los efectos batocrómico, hipsocrómico, hipercrómico o hipocrómico además de verificar si estos solventes absorbían o no a la longitud de onda de máxima absorbancia de cada fármaco (ver Figura 2).

Para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia, se realizó un barrido en la región ultravioleta, en el rango de 200 a 300 nm, definiéndose que el λ_{\max} para las sulfonamidas en estudio es de 268 nm (ver figura 2). De otro lado, para evaluar el efecto de la presencia de solventes diferentes al etanol (W, MeOH y PrOH) sobre la longitud de onda de máxima absorción, se prepararon tres soluciones de cada sulfonamida a una concentración aproximada de 10 µg/mL en mezclas cosolventes con una fracción másica de 0,20 de agua, metanol o propanol en etanol, en donde se observa un punto isobéptico a 268 nm (λ_{\max}) (ver Figura 2), demostrándose que los solventes en una relación 1:4 no afectan la cuantificación de las sulfonamidas a la longitud de onda de estudio; se debe tener presente que la mínima dilución se realiza para la cuantificación de la SD en agua en una relación 1:4 de etanol y agua.

Adicionalmente, se evaluó si los solventes empleados en el estudio de solubilidad absorbían a la longitud de onda de máxima absorbancia mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, demostrándose que su incidencia en la cuantificación de las tres sulfonamidas es despreciable (ver Figura 3).

En el estudio de solubilidad de las sulfonamidas se evaluaron cuatro factores que pueden afectar la estabilidad de los fármacos, esto es, la luz solar (los estudios de solubilidad se llevan a cabo en frascos ámbar para reducir el efecto de la luz), la temperatura, los solventes y el tiempo de equilibrio termodinámico el cual se estableció en 72 horas (momento en el cual se realiza la cuantificación de cada una de las sulfonamidas), de acuerdo a la Figura 4, en la cual se evidencia un aumento significativo en la concentración de las soluciones después de ser sometidas a ultrasonido durante los 30 minutos. Este aumento vertiginoso en la concentración posiblemente se debe a la reducción en el tamaño de partícula y, por tanto, del área superficial, lo que implica una mayor velocidad de disolución; además, se presenta incremento en la temperatura del sistema por lo que la concentración determinada a los 30 minutos corresponde a una solubilidad transitoria o temporal, la cual es mayor que la solubilidad termodinámica del fármaco en las condiciones de equilibrio (25 °C) (22-24).

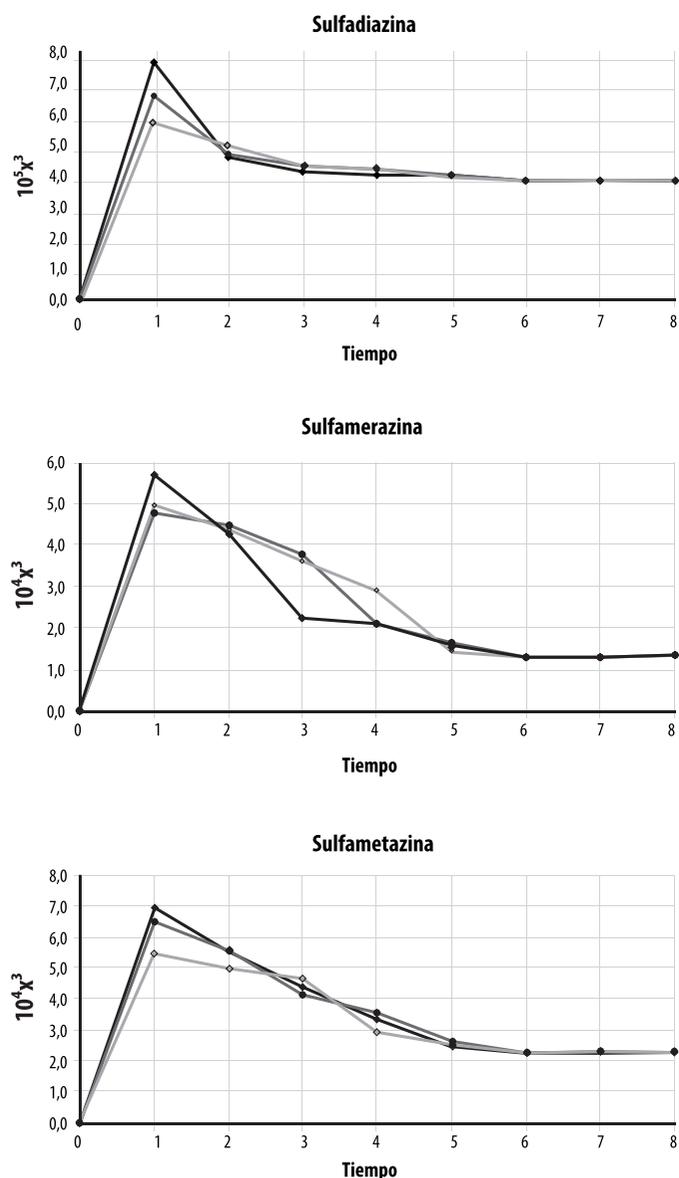


Figura 4. Concentración de las sulfonamidas en función del tiempo de equilibrio termodinámico entre la fase líquida (solución saturada) y la fase sólida (fármaco no disuelto). Las unidades del eje X corresponden a: 1 (30 min), 2 (60 min), 3 (120 min), 4 (240 min), 5 (1 día), 6 (2 días), 7 (3 días) y 8 (4 días).

Puesto que la mayor temperatura de los estudios de solubilidad es 40 °C, y el tiempo de equilibrio termodinámico es de 3 días, para la presente investigación las muestras fueron termostatadas durante 5 días a 50 °C, con el ánimo de garantizar que en condiciones más drásticas a las del estudio de solubilidad las sulfonamidas no presenten degradación. Inicialmente, se determina que el tiempo de retención para cada sulfonamida es: SD (2,0 min), SMR (2,7 min) y SMT (3,5 min) (Figura 5), y posteriormente se realizaron cromatografías de las muestras, determinándose las áreas correspondientes a cada fármaco al final del ensayo y fueron comparadas con el área del estándar de cada fármaco control (SD, SMR y SMT) (ver Figura 3).

De acuerdo con la Tabla 1 se observa que no hay una variación significativa en las áreas de cada uno de los picos de los analitos (porcentajes de coeficientes de variación para SD, SMR y SMT: 1,44, 0,86, y 1,08% respectivamente) con relación al estándar de cada sulfonamida; además, los tiempos de retención son muy similares y presentan

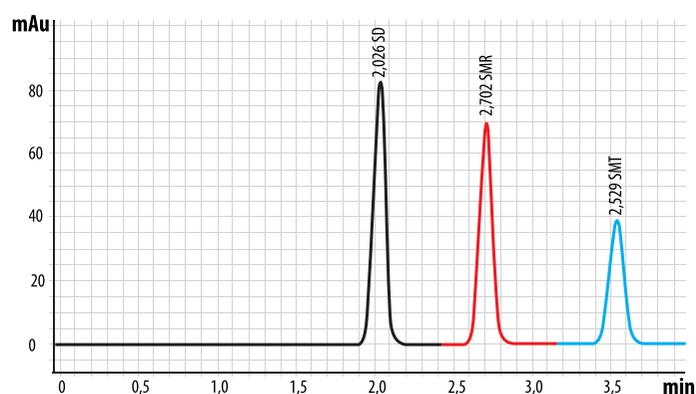


Figura 5. Cromatograma de una mezcla de sulfonamidas (SD, SMR y SMT) a una longitud de onda de 268 nm obtenido con un equipo CLAE-DAD.

Tabla 1. Áreas del estándar de cada sulfonamida (SD, SMR y SMT) y de muestras expuestas a condiciones que pueden afectar la estabilidad de los analitos.

Fármaco	Factor	Área	Tiempo de retención (min)	Factor de pureza de pico
SD	Patrón	739 ± 7	2,030 ± 0,001	999,98 ± 0,01
	Agua	734 ± 10	2,039 ± 0,001	999,99 ± 0,01
	Metanol	745 ± 11	2,027 ± 0,002	999,93 ± 0,04
	Etanol	750 ± 11	2,027 ± 0,003	999,92 ± 0,02
	1-Propanol	734 ± 6	2,029 ± 0,002	999,93 ± 0,03
	Luz solar	730 ± 4	2,037 ± 0,003	999,97 ± 0,04
SMR	Patrón	516 ± 6	2,702 ± 0,001	999,99 ± 0,01
	Agua	513 ± 7	2,706 ± 0,002	999,91 ± 0,03
	Metanol	520 ± 6	2,700 ± 0,002	999,93 ± 0,03
	Etanol	517 ± 9	2,701 ± 0,002	999,90 ± 0,04
	1-Propanol	520 ± 8	2,701 ± 0,001	999,98 ± 0,03
	Luz solar	519 ± 10	2,710 ± 0,002	999,81 ± 0,05
SMT	Patrón	157,5 ± 2,1	3,533 ± 0,001	999,99 ± 0,01
	Agua	158,4 ± 2,3	3,532 ± 0,002	999,98 ± 0,05
	Metanol	156,6 ± 2,5	3,538 ± 0,003	999,91 ± 0,02
	Etanol	157,9 ± 2,7	3,529 ± 0,003	999,89 ± 0,10
	1-Propanol	156,6 ± 2,2	3,527 ± 0,001	999,92 ± 0,02
	Luz solar	156 ± 4	3,528 ± 0,003	999,95 ± 0,05

porcentajes de coeficiente de variación menores al 0,15%; el factor de pureza de pico indica una alta probabilidad de que la señal corresponda al analito respectivo ($> 999,81 \pm 0,05$), demostrándose así que las tres sulfonamidas son estables en las condiciones del estudio de solubilidad, puesto que no se evidencia degradación de las mismas a 50 °C (temperatura 10 °C superior a la máxima temperatura de estudios de solubilidad) durante 5 días (tiempo de equilibrio termodinámico: 3 días).

De acuerdo a lo anterior, se demuestra que existe una alta probabilidad de que en el momento de hacer la determinación de la solubilidad de las tres sulfonamidas, a cualquier temperatura de estudio de solubi-

lidad (20, 25, 30, 35 y 40 °C) y en cualquier mezcla cosolvente (MeOH + W, EtOH + W y PrOH + W), a los tres días de equilibrio termodinámico, la lectura de la absorbancia sea consecuencia únicamente de la concentración de cada uno de los analitos y no de productos de degradación de los mismos ni a la presencia de los solventes diferentes al etanol.

Las curvas de calibración se realizaron en etanol (Figura 6), para cada una de las sulfonamidas con el fin de establecer la regresión entre la relación de la concentración de las soluciones de cada sulfonamida (eje X expresado en $\mu\text{g/g}$) y su respuesta instrumental (eje Y expresado en unidades de absorbancia).

Los resultados del análisis de la linealidad se muestran en las Tablas 2 a 4. Mediante un análisis de varianza (ANOVA), la homocedasticidad se demuestra aplicando la prueba G del test de Cochran, donde G_{exp} (SD = 0,44; SMR = 0,45 y SMT = 0,15) es menor al G_{tab} ($\alpha=0,05$, $K=5$, $n=3$) = 0,68, lo que significa que las varianzas para los diferentes niveles de concentración son homogéneas, mostrando así que el nivel de concentración no influye en la variabilidad de los resultados para los rangos de concentración definidos, por lo tanto no se presenta una relación es-

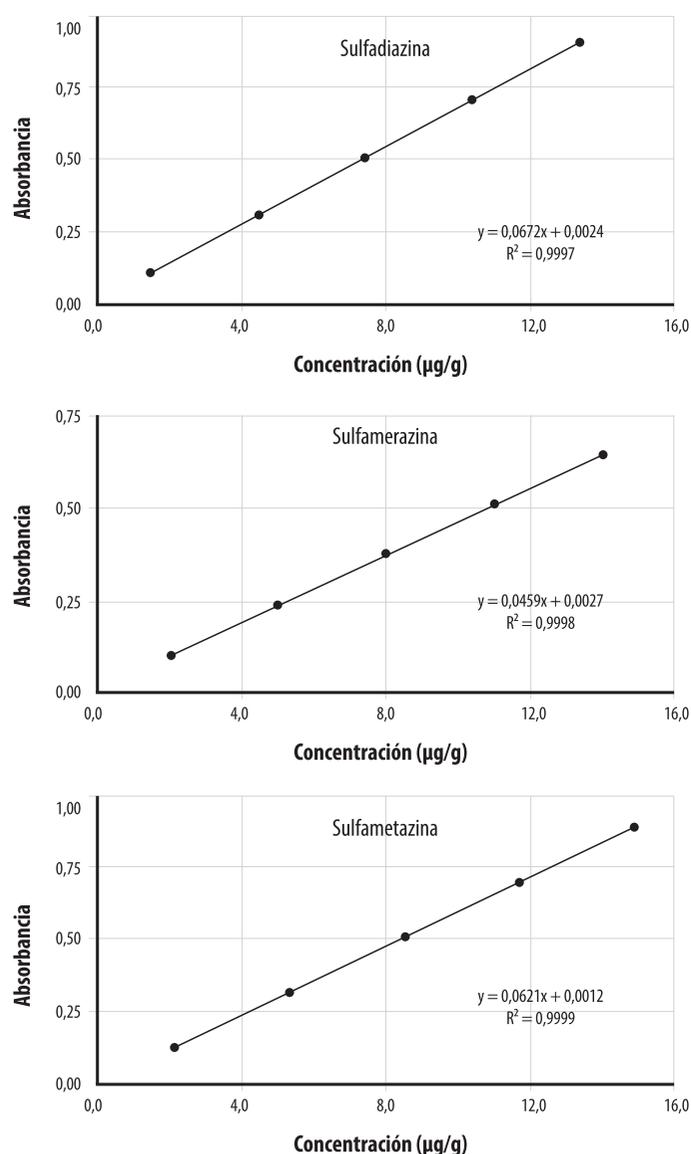


Figura 6. Curvas de calibración de SD, SMR y SMT en etanol absoluto obtenidas a una longitud de onda de 268 nm.

tadísticamente significativa entre la variable explicativa (concentración) y el error experimental. En cuanto al análisis de varianza para la regresión, mediante el test F, el F_{exp} es mayor a $F_{\text{tab}}=4,667$ con 1 grado de libertad en el numerador correspondiente a la regresión y con 13 grados de libertad en el denominador correspondientes al error residual, indicando que la pendiente es significativamente distinta de cero; y para la falta de ajuste debido a que F_{exp} es menor a $F_{\text{tab}}=3,708$ con 3 grados de libertad en el numerador y con 10 grados de libertad en el denominador correspondientes al error experimental, se demuestra linealidad entre los resultados obtenidos de la relación entre la concentración y la respuesta instrumental (absorbancia), para cada sulfonamida con un nivel de significación $\alpha=0,05$.

En cuanto al test de linealidad (Tabla 5), inicialmente se calculan los coeficientes de variación de los factores de respuesta (f).

En todos los casos, los promedios de f son aproximados a las pendientes y los coeficientes de variación son menores al 2%, lo que indica que la calibración es lineal. En cuanto a la prueba t de Student para la pendiente, se confirma lo establecido con el análisis de varianza; además la pendiente es significativamente diferente de cero para todas las sulfonamidas para un grado de significación $\alpha=0,05$ (Tablas 6 a 8) puesto que $T_{\text{exp}} > T_{\text{tab}} = 2,16$ para la pendiente.

El test de proporcionalidad indica que el intercepto no es significativamente diferente de cero puesto que $T_{\text{exp}} < T_{\text{tab}} = 2,16$ para el intercepto. Finalmente los coeficientes de correlación para la SD, SMR y SMT son 0,9999, 0,9998 y 0,9999 respectivamente; de otro lado, $T_{\text{exp}} > T_{\text{tab}} = 2,16$ para el coeficiente de correlación, indicando que éste es significativamente diferente de cero, mostrando que los datos experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal. De acuerdo a las pruebas t de Student, se rechaza la hipótesis nula para pendiente y parámetro de correlación y se acepta para el intercepto.

Para evaluar la precisión del método se evaluó la repetibilidad del instrumento y del método mismo, obteniendo para el primer caso, que el coeficiente de variación de las 12 lecturas de una solución de SD de 7,512 $\mu\text{g/g}$ en etanol, fue de 0,170%, el cual es menor al porcentaje establecido como máximo en la literatura, el cual generalmente es del 1,0% (Tabla 9) (25).

Con respecto a la repetibilidad del método, el coeficiente de variación para las siete soluciones de SD, SMR y SMT en etanol fueron de 0,32%, 0,53% y 0,47% respectivamente, los cuales se encuentran dentro de los intervalos máximos permitidos y que oscilan entre 2,0 y 3,0% (Tabla 10) (26). De acuerdo con estos resultados se puede afirmar que la metodología cumple con el parámetro de repetibilidad. Ahora bien, la ICH Q2B recomienda introducir los intervalos de confianza en los estudios de precisión (14), calculados como $\bar{x} \pm tS / \sqrt{n}$, en donde \bar{x} es la media de la serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración, t es el valor de la t Student de las tablas para $n-1$ grados de libertad y $\alpha=0,05$, n es el número de análisis y S es la desviación estándar (18).

Para el análisis de la precisión intermedia se evaluó una concentración de 8,00 $\mu\text{g/g}$ para cada una de las sulfonamidas, para lo cual se desarrolló un diseño experimental variando los factores analista y día del análisis (Tabla 11). Los coeficientes de variación globales de las respuestas obtenidas para SD, SMR y SMT fueron 0,494%, 0,337% y 0,314%, respectivamente. La prueba de Cochran demostró que los factores “analista” y “día del ensayo” no contribuyen a que se presente una diferencia estadísticamente significativa entre varianzas de las respuestas (absorbancias) de los ensayos, puesto que G_{exp} (SD=0,043; SMR=0,200 y SMT=0,057) es menor al G_{tab} ($\alpha=0,05$, $K=6$, $n=3$) = 0,6161 indicando homogeneidad de varianzas.

El análisis de varianza (ANOVA), usando un modelo de efectos o categorías fijas para el cálculo de F (27), mostró que valores de F_{exp} son mayores a los F_{tab} (Tablas 12, 13 y 14), indicando que los resultados no presentan una diferencia estadísticamente significativa, cuando el ensayo es realizado por un analista en particular o cuando se varía el día en que éste se realiza (28, 29); además, la variabilidad de los resultados no se atribuye a combinaciones día de análisis/analista.

Tabla 2.
Análisis de
varianza de la SD.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F _o	F _{tab}
Regresión	1	1,2104	1,21806	51840,06	4,667 (1, 13, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_i - k = 10$	0,29563	$2,96 \times 10^{-2}$		
Falta de ajuste	$k - 2 = 3$	$2,94 \times 10^{-4}$	$9,66 \times 10^{-5}$	$3,27 \times 10^{-3}$	3,708 (3, 10, 0,05)
Residual	13	$3,08 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-5}$		
Total	$\sum_i n_i - 1 = 14$	1,2184	0,08703		

Tabla 3.
Análisis de
varianza de la
SMR.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F _o	F _{tab}
Regresión	1	0,569	0,569	79736,41	4,667 (1, 13, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_i - k = 10$	0,14633	$1,46 \times 10^{-2}$		
Falta de ajuste	$k - 2 = 3$	$8,162 \times 10^{-5}$	$2,72 \times 10^{-5}$	$1,86 \times 10^{-5}$	3,708 (3, 10, 0,05)
Residual	13	$9,283 \times 10^{-5}$	$7,14 \times 10^{-6}$		
Total	$\sum_i n_i - 1 = 14$	0,5695	$4,07 \times 10^{-2}$		

Tabla 4.
Análisis de
varianza de la
SMT.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F _o	F _{tab}
Regresión	1	1,0412	1,0412	97554,05	4,667 (1, 13, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_i - k = 10$	0,2685	$2,69 \times 10^{-2}$		
Falta de ajuste	$k - 2 = 3$	$9,38 \times 10^{-5}$	$3,13 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-3}$	3,708 (3, 10, 0,05)
Residual	13	$1,39 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-5}$		
Total	$\sum_i n_i - 1 = 14$	1,0414	0,07438		

Tabla 5.
Coeficientes
de variación (C.V.)
de los factores
de respuesta (f).

Sulfonamidas	f	S _f	C.V. (%)
SD	0,068	0,00072	1,06
SMR	0,046	0,00034	0,73
SMT	0,062	0,00057	0,91

Tabla 6.
Parámetros
estadísticos para
la linealidad de
la SD.

Parámetro	Valor	Desviación estándar	Hipótesis nula	Hipótesis alterna	T _{exp}	T _{tab} (gl=15-1=14; α=0,05)
Intercepto (a)	0,0024	0,0025	H ₀ :a=0	H ₁ :a≠0	0,938	2,160
Pendiente (b)	0,0672	0,0003	H ₀ :b=0	H ₁ :b≠0	226,801	2,160
Correlación (r)	0,9999	0,00487	H ₀ :r=0	H ₁ :r≠0	205,371	2,160

Tabla 7.
Parámetros
estadísticos para
la linealidad de la
SMR.

Parámetro	Valor	Desviación estándar	Hipótesis nula	Hipótesis alterna	T _{exp}	T _{tab} (gl=15-1=14; α=0,05)
Intercepto (a)	0,00274	$1,472 \times 10^{-3}$	H ₀ :a=0	H ₁ :a≠0	1,859	2,160
Pendiente (b)	0,0459	$1,625 \times 10^{-4}$	H ₀ :b=0	H ₁ :b≠0	282,376	2,160
Correlación (r)	0,9998	$2,672 \times 10^{-3}$	H ₀ :r=0	H ₁ :r≠0	374,163	2,160

Tabla 8. Parámetros estadísticos para la linealidad de la SMT.

Parámetro	Valor	Desviación estándar	Hipótesis nula	Hipótesis alterna	T _{exp}	T _{tab} (gl=15-1=14; α=0,05)
Intercepto (a)	0,00124	1,801x10 ⁻³	H ₀ :a=0	H ₁ :a≠0	0,689	2,160
Pendiente (b)	0,06213	1,989x10 ⁻⁴	H ₀ :b=0	H ₁ :b≠0	312,336	2,160
Correlación (r)	0,9999	3,267x10 ⁻³	H ₀ :r=0	H ₁ :r≠0	306,0490	2,160

Tabla 9. Repetibilidad del sistema instrumental.

Solución de SD (µg/g)	Absorbancia	Solución de SD (µg/g)	Absorbancia	
7,512	0,497	7,512	0,499	
	0,498		0,500	
	0,498		0,497	
	0,498		0,498	
	0,498		Promedio	0,499
	0,499		S	0,001
	0,499		C.V. (%)	0,170
	0,499			

Tabla 10. Repetibilidad del método (7 réplicas).

N° de análisis	A (SD)	µg/g (Calc)	A (SMR)	µg/g (Calc)	A (SMT)	µg/g (Calc)
1	0,505	7,48	0,370	8,00	0,500	8,03
2	0,508	7,52	0,372	8,05	0,495	7,95
3	0,506	7,49	0,367	7,94	0,498	8,00
4	0,507	7,51	0,371	8,02	0,499	8,02
5	0,509	7,54	0,372	8,05	0,496	7,97
6	0,505	7,48	0,372	8,05	0,501	8,05
7	0,505	7,48	0,370	8,00	0,500	8,03
Promedio		7,50		8,02		8,00
S		0,02		0,04		0,04
C.V. (%)		0,32		0,53		0,47
Intervalo de confianza		7,50±0,02		8,02±0,04		8,00±0,04

Tabla 11. Precisión intermedia.

Instrumento	Analista	N°	Día 1 (8,0 µg/g)			Día 2 (8,0 µg/g)			Día 3 (8,0 µg/g)		
			SD	SMR	SMT	SD	SMR	SMT	SD	SMR	SMT
Espectro-fotómetro UV/VIS	A ₁	1	0,542	0,376	0,502	0,551	0,373	0,501	0,543	0,373	0,501
		2	0,544	0,374	0,500	0,545	0,376	0,503	0,545	0,374	0,502
		3	0,542	0,374	0,502	0,546	0,375	0,504	0,542	0,376	0,503
		C.V. (%)	0,213	0,308	0,230	0,587	0,408	0,304	0,281	0,408	0,199
	A ₂	1	0,544	0,375	0,506	0,548	0,375	0,505	0,543	0,374	0,503
		2	0,542	0,373	0,503	0,542	0,372	0,500	0,541	0,376	0,502
		3	0,54	0,374	0,501	0,542	0,373	0,503	0,542	0,373	0,502
		C.V. (%)	0,369	0,267	0,500	0,637	0,409	0,501	0,185	0,408	0,115
C.V. (%) Precisión intermedia			SD	0,494	SMR	0,337	SMT	0,314			

Tabla 12. Análisis de varianza para la precisión intermedia de la SD.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio(CM)	F ₀	F _{tab}
Analistas	An. - 1 = 1	1,422×10 ⁻⁵	1,422 ×10 ⁻⁵	2,753	3,493 (1, 12, 0,05)
Días	D. - 1 = 2	4,044×10 ⁻⁵	2,022×10 ⁻⁵	3,914	4,351 (2, 12, 0,05)
Interacción	(An. - 1)(D - 1) = 2	5,778×10 ⁻⁶	2,889×10 ⁻⁶	0,559	3,493 (2, 12, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_j - k = 12$	6,200×10 ⁻⁵	5,167×10 ⁻⁶		
Total	$\sum_i n_j - 1 = 17$	1,224×10 ⁻⁴	7,203×10 ⁻⁶		

Tabla 13. Análisis de varianza para la precisión intermedia de la SMR.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio(CM)	F ₀	F _{tab}
Analistas	An. - 1 = 1	2,000×10 ⁻⁶	2,000×10 ⁻⁶	1,029	3,493 (1, 12, 0,05)
Días	D. - 1 = 2	4,444×10 ⁻⁷	2,222×10 ⁻⁷	0,114	4,351 (2, 12, 0,05)
Interacción	(An. - 1)(D - 1) = 2	1,333×10 ⁻⁶	6,667×10 ⁻⁷	0,343	3,493 (2, 12, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_j - k = 12$	2,333×10 ⁻⁵	1,944×10 ⁻⁶		
Total	$\sum_i n_j - 1 = 17$	2,711×10 ⁻⁵	1,595×10 ⁻⁶		

Tabla 14. Análisis de varianza para la precisión intermedia de la SMT.

Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio(CM)	F ₀	F _{tab}
Analistas	An. - 1 = 1	2,722×10 ⁻⁶	2,722×10 ⁻⁶	0,925	3,493 (1, 12, 0,05)
Días	D. - 1 = 2	7,778×10 ⁻⁷	3,889×10 ⁻⁷	0,132	4,351 (2, 12, 0,05)
Interacción	(An. - 1)(D - 1) = 2	3,444×10 ⁻⁶	1,722×10 ⁻⁶	0,585	3,493 (2, 12, 0,05)
Error experimental	$\sum_i n_j - k = 12$	3,533×10 ⁻⁵	2,944×10 ⁻⁶		
Total	$\sum_i n_j - 1 = 17$	4,228×10 ⁻⁵	2,487×10 ⁻⁶		

Conclusiones

Con base en los parámetros analíticos evaluados, el método espectrofotométrico en el ultravioleta propuesto es adecuado para la cuantificación de las tres sulfonamidas estudiadas (SD, SMR y SMT), en estudios de solubilidad en las mezclas cosolventes MeOH + W, EtOH + W y PrOH + W y, además, en los solventes puros, mediante el método de agitación de frasco. De hecho, el método propuesto ya ha sido utilizado en la determinación de la solubilidad de estas tres sulfonamidas en mezclas cosolventes etanol + agua a diferentes temperaturas (30, 31).

Agradecimientos

Al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por facilitar los equipos e instalaciones utilizados en el desarrollo de esta investigación.

Referencias

- Delgado, A.; Minguillón, C.; Joglar, J. Introducción a la Química Terapéutica. 2ª. ed. Madrid: Díaz de Santos S. A., 2003, pp. 461-467.
- Perlovich, G. L.; Ryzhakov, A. M.; Strakhova, N. N.; Kazachenko, V. P.; Schaper, K. J.; Raevskya, O. A. Thermodynamic aspects of solubility and partitioning processes of some sulfonamides in the solvents modeling biological media. *J. Chem. Thermodynamics*. 2014. **69**: 56-65.
- Delgado, D. R. Estudio termodinámico de la solubilidad de algunas sulfonamidas sódicas en mezclas cosolventes etanol + agua. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 2010.
- Wang, X. L.; Wan, K.; Zhou, C. H. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. *Eur. J. Med. Chem.* 2010. **45**: 4631-4639.
- Krátký, M.; Vinsová, J.; Volková, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolaríková, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 2012. **50**: 433-440.
- Aulton, M. E. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2ª. ed. Madrid: Elsevier, 2004.
- Yu, H.; Tao, Y.; Chen, D.; Wang, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Dai, M.; Liu, Z.; Wang, X.; Yuan, Z. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. *J. Chromatogr. B*. 2011. **879**: 2653-2662.
- Yun-Hong, H.; Yang, X.; Qing-Hua, H.; Yu-Sheng, C.; Bi Bai, D. Determination of sulfadiazine residues in pork by molecular imprinted column coupling with high performance liquid chromatography. *Chin. J. Anal. Chem.* 2012. **40**: 1011-1018.
- Cioroiu, B. I.; Lazar, M.; Bello-López, M. A.; Fernández-Torres, R. Identification of the specified impurities of silver sulfadiazine using a screening of degradation products in different stress physico-chemical media. *Talanta*. 2013. **116**: 653-662.
- Higuchi, T.; Connors, K. A. Phase-solubility techniques. En: Charles N. Reilley (editor), *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, vol. 4. New York: John Wiley & Sons, 1965, pp. 117-212.
- Jouyban, A. *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.
- Ermer, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. **24**: 755-767.
- The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology, November 2005. Disponible: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- ICH. Q2B: Analytical Validation-Methodology, November 1996.
- Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Obenchain Jr., J. R.; Gallipeau, J. A. R.; D'Arecea, M. A. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13th edition. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., 2001, pp. 1586-1589.
- Moffat, A. C.; Jackson, J. V.; Moss, M. S.; Widdop, B. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs: In Pharmaceuticals, Body Fluid, and Post-Mortem Material*. London: The Pharmaceutical Press, 1986, p. 979.
- US Pharmacopeia. 30th. revision. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention Inc., 2007, p. 680.
- Aguirre, L.; García, F. J.; Junca, T.; Fontanet, M.; Roca, M.; Carbó, M.; Sanfeliu, A.; Pomar, M.; Pérez, P.; Ochoa, C.; Sánchez, M.; Forn, M.; Serrat, M.; Gonfaus, M. *Validación de Métodos Analíticos*. Barcelona: AEFI, 2001.
- Vessman, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996. **14**: 867-869.
- Persson, B. A.; Vessman, J. The use of selectivity in analytical chemistry – Some considerations. *Trends Anal. Chem.* 2001. **20**: 526-532.
- Gómez, S. M.; Martínez, J. A.; Martínez, F. Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes. *Quim. Nova*. 2010. **33**: 1794-1799.
- Noyes, A. A.; Whitney, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 1897. **19**: 930-934.
- Dokoumetzidis, A.; Macheras, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int. J. Pharm.* 2006. **321**: 1-11.
- Siepmann, J.; Siepmann, F. Mathematical modeling of drug dissolution. *Int. J. Pharm.* 2013. **453**: 12-24.
- Mora, C. P.; Tello, M. E.; Martínez, F. Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2006. **35**: 81-105.
- Association of Official Analytical Chemists. *Statistical Manual of the AOAC*, 12th. ed. Washington, 1975, p. 1094.
- Morales, P. Análisis de variancia con dos criterios de clasificación (diseños factoriales). Facultad de Ciencias Humanas y Sociales, Universidad Pontificia Comillas, España, 2009.
- Morantes, M.; Vargas, M.; Figueroa, F. S.; Sierra, N.; Barbosa, H. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de fenobarbital en una suspensión extemporánea. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2010. **39**: 68-78.
- Berrió, M.; Trujillo, M.; Vallejo, B. M.; Barbosa, H. J. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de warfarina sódica en una preparación extemporánea. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2013. **42**: 122-133.
- Delgado, D. R.; Martínez, F. Solution thermodynamics of sulfadiazine in ethanol + water mixtures. *J. Mol. Liq.* 2013. **187**: 99-105.
- Delgado, D. R.; Martínez, F. Solubility and solution thermodynamics of sulfamerazine and sulfamethazine in some ethanol + water mixtures. *Fluid Phase Equilib.* 2013. **360**: 88-96.

Article citation:

Delgado, D. R.; Rodríguez, G. A.; Martínez, J. A.; Rojas, J. H.; Martínez, F. Validación de una metodología analítica empleando espectrofotometría ultravioleta para el estudio de la solubilidad de algunas sulfonamidas en mezclas cosolventes alcohol + agua. *Rev. Colomb. Quím.* 2013. **42**(3): 31-40.