



VNiVERSiDAD DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Trabajo de Fin de máster:

MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS CLINDAMICINA, CLOTRIMAZOL Y KETOCONAZOL EN FÁRMACOS

Trabajo realizado por Francisco José Jiménez Alonso

Tutores del trabajo: Diego García Gómez y Javier Domínguez Álvarez

Índice general

1. Objetivo	1
2. Antecedentes	2
3. Metodología y fundamento teórico	11
3.1. Criterios utilizados en la búsqueda bibliográfica	11
3.2. Ketoconazol y clotrimazol	11
3.3. Clindamicina	13
3.3.1. Métodos estudiados	13
3.3.2. Método propuesto	14
4. Resultados	16
4.1. Ketoconazol y clotrimazol	16
4.2. Clindamicina	23
4.2.1. Descripción del proceso de extracción utilizado	29
4.2.2. Calibrado del método propuesto	32
4.2.3. Resultados método propuesto	34
5. Conclusiones	39
6. Synopsis	41

1. Objetivo

La electroforesis capilar ha jugado un rol muy importante en el desarrollo de las ciencias de la vida. Esta técnica, utilizada hoy día para el análisis tanto de moléculas grandes como pequeñas, tiene la capacidad de actuar como técnica complementaria o incluso llegar a rendir mejor en ciertos casos que otras técnicas analíticas tales como las asociadas a la cromatografía [1].

El objetivo de este trabajo es establecer distintos procedimientos optimizados mediante los cuales detectar y cuantificar tanto clindamicina, clotrimazol como ketoconazol en muestras comerciales mediante electroforesis capilar zonal y espectrofotometría de absorción molecular en ultravioleta-visible. Para ello se hará uso de distintas publicaciones en las que vengan descritos distintos métodos para la determinación de las sustancias de interés, así como de experiencias en el laboratorio mediante las cuales elaborar un nuevo método para la determinación de clindamicina en muestras comerciales.

Finalmente, también se estudiará la calidad de una preparación comercial de venta en Uganda, aportada por distintas entidades médicas, debido a que existen dudas sobre su composición exacta al ofrecer resultados médicos inferiores a los esperados. Esta preparación, fabricada en países con poca normativa e importada a Uganda para su comercialización, está dando peores resultados médicos que su homólogo local. Lo cual, hace plantearnos la posibilidad de que exista algún problema o diferencia en su composición que resulta necesario estudiar mediante el método analítico adecuado.

2. Antecedentes

La electroforesis capilar ha jugado un rol muy importante en el desarrollo de las ciencias de la vida. Esta técnica, utilizada hoy día para el análisis tanto de moléculas grandes como pequeñas, tiene la capacidad de actuar como técnica complementaria o incluso llegar a rendir mejor que otras técnicas analíticas tales como las asociadas a la cromatografía [1].

Definimos la electroforesis como un tipo de técnica de separación en la que los analitos se separan en función de su capacidad para moverse a través de un medio conductor bajo la influencia de un campo eléctrico.

Bajo esta premisa y en ausencia de otros efectos, algo que en la práctica no sucede, los cationes migrarán hacia el cátodo mientras que los aniones migrarán en dirección al ánodo. Las especies neutras no se verán afectadas por el campo eléctrico y permanecerán inmóviles.

La separación de los distintos analitos de una misma carga se dará en función de sus relaciones carga/radio, en la cual se favorecerá el avance de aquellos que tengan una mayor carga en un menor tamaño [2].

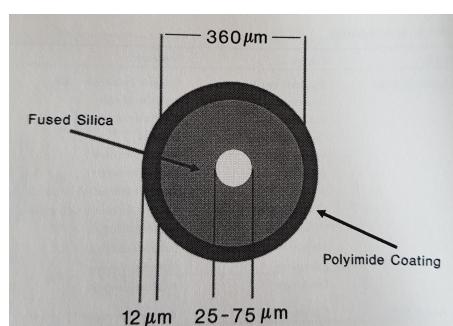


Figura 2.1: Esquema general del interior de un capilar. Imagen extraída de: [2].

Existen diversos tipos de electroforesis, dentro de las cuales están las inicialmente comentadas técnicas asociadas a la electroforesis capilar¹.

La electroforesis capilar se basa en la separación, mediante la aplicación de un campo eléctrico, de los componentes de una muestra inyectada en una solución tamponada contenida en un capilar hueco.

Siendo a lo largo de esa zona hueca del capilar, de en torno a 25–75 μm de diámetro (Fig:2.1), el lugar donde se dará el flujo de la muestra y, por tanto, su correspondiente separación.

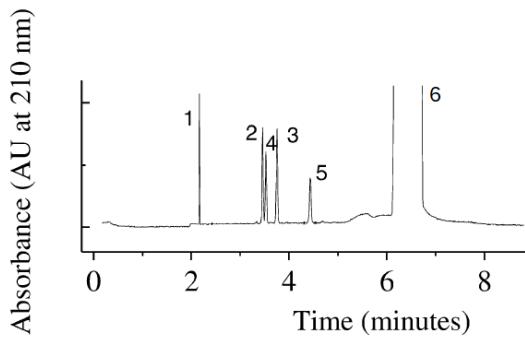


Figura 2.2: Imagen de un electroferograma con los picos asociados a los diferentes cationes detectables (del 1 al 5), así como el asociado al flujo electroosmótico (6). Imagen extraída de: [3].

La muestra, inyectada por un extremo del capilar, migrará por el mismo al aplicar un campo eléctrico a través de este. La migración de la muestra dará lugar a la separación de sus distintos componentes y a la aparición² de los mismos a diferentes tiempos. El gráfico resultante del acoplamiento de la señal analítica aportada por el detector a la salida del aparato con los diferentes tiempos de migración de los distintos componentes de la muestra se denomina electroferograma³(Fig:2.2).

¹Tales como la electroforesis capilar zonal, la electroforesis capilar en gel, la electroforesis capilar de isoelectroenfoque...

²Entendiéndose por aparición la salida de estos compuestos por el extremo contrario al que se han inyectado en el capilar.

³De naturaleza similar al cromatograma asociado a la cromatografía líquida o de gases, pudiendo dar también tanto información cualitativa como cuantitativa.

La migración de los componentes de la muestra al aplicar un campo eléctrico a través del capilar es debido a dos elementos; la movilidad electroforética, que dará lugar a la velocidad electroforética, y al flujo electroosmótico (EOF), que dará lugar a la velocidad de flujo electroosmótico [4].

La velocidad electroforética, o la velocidad asociada al movimiento de los analitos cargados en respuesta al campo eléctrico aplicado, dará lugar a que los cationes se muevan en dirección al electrodo negativo (el cátodo) y los aniones en dirección al electrodo positivo (el ánodo), quedando las especies neutras inalteradas por el mismo.

Esta velocidad electroforética viene definida por:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (2.1)$$

Siendo v_{ep} la velocidad electroforética, μ_{ep} la movilidad electroforética del soluto⁴ y E el vector de campo eléctrico asociado al campo eléctrico aplicado.

El otro contribuidor, el flujo electroosmótico, se debe a la carga superficial en la pared interna del capilar.

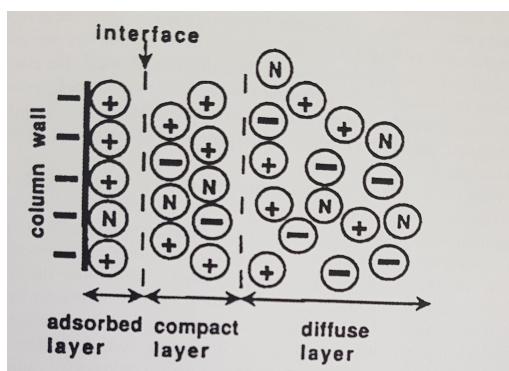


Figura 2.3: Esquema con las distintas capas formadas en el interior del capilar. Imagen extraída de: [2].

Este flujo electroosmótico generará un movimiento de la propia disolución tamponada a través del capilar en respuesta al campo eléctrico aplicado. El movimiento se debe a que, en ciertas condiciones, dentro de la disolución se formarán diferentes "capas" de disolvente con distintas cargas netas (Fig:2.3).

⁴La movilidad electroforética dependerá, a su vez, de cada soluto al depender de la relación carga/radio del soluto en cuestión.

Dado que la superficie del capilar, recubierta por sílice, tiene expuestos una gran cantidad de grupos silanol en su cara interior, pH superiores a 2 darán lugar a que parte de esos grupos silanol se encuentren cargados negativamente formando grupos silanato. Esto dará lugar a que los cationes de la propia disolución tamponada se vean atraídos por los iones silanato lo que, a su vez, inducirá la formación de diferentes "capas" extremadamente delgadas de disolvente con diferentes concentraciones iónicas a lo largo del radio del capilar [2, 4].

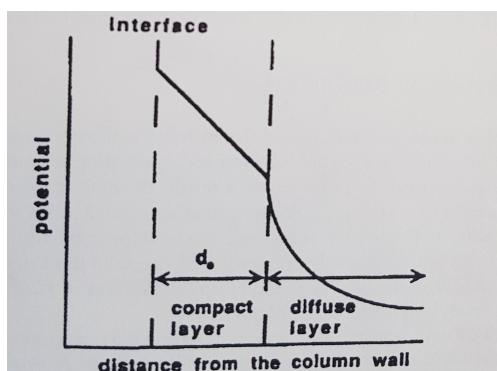


Figura 2.4: Representación esquemática de la evolución del potencial zeta con respecto a la distancia a la pared del capilar. Imagen extraída de: [2].

Los cationes más cercanos a la superficie de la pared formarán una especie de capa o superficie inmóvil, que no se verá desplazada aún ni con la aplicación del campo eléctrico. Más allá de esta pared o superficie, se formará una capa compacta y móvil con un carácter elevadamente catiónico. Cuanto más nos alejamos de la superficie del capilar, y por tanto de su carga superficial, menor se volverá el potencial zeta (Fig:2.4), asociado a esa carga superficial y más neutra se volverá la disolución.

Cuando se aplique un voltaje los iones presentes en la capa móvil se verán atraídos por uno de los dos electrodos⁵. Dado que estos iones se encuentran solvatados, se generará un movimiento en esa capa dando lugar a un flujo neto de la disolución llamado flujo electroosmótico.

A pesar de que esta doble capa tiene un grosor aproximado de 100 Å, el flujo electrosmótico que genera se transmitirá por todo el grosor del capilar.

Debido a que el flujo electrosmótico se transmite por todo el grosor del capilar, este generará un flujo en el capilar uniforme⁶. Esto, a diferencia del flujo con perfil parabólico

⁵Bajo las condiciones anteriormente descritas el flujo electroosmótico se dirigirá hacia el cátodo al tener esa primera capa móvil una mayor concentración de cationes, aunque también resulta posible invertir ese flujo electroosmótico en dirección al ánodo mediante el uso de diferentes compuestos como los surfactantes catiónicos u otros.

⁶Exceptuando los bordes en contacto directo con el capilar, donde el flujo se aproxima a cero.

formado en cromatografía líquida, afecta de forma positiva a la resolución final de la separación al evitar efectos de dispersión de los analitos dentro de la disolución.

En condiciones normales ese flujo se dará en dirección al cátodo, arrastrando junto a él la mayoría de los solutos y especies diluidas en su misma dirección [4].

Este flujo electroosmótico viene definido por:

$$v_{eof} = \mu_{ep} E \quad (2.2)$$

Siendo v_{eof} la velocidad de flujo electroosmótico, μ_{ep} la movilidad electroosmótica de la disolución tamponada utilizada⁷ y E el vector de campo eléctrico asociado al campo eléctrico aplicado.

El flujo electroosmótico depende de múltiples factores, siendo el principal el potencial zeta. Otros de estos factores son; la viscosidad, la temperatura, la fuerza del campo eléctrico utilizado, la naturaleza de la superficie del capilar utilizado, la utilización de modificadores orgánicos o polímeros de celulosa, el uso de surfactantes etc. Este potencial zeta depende principalmente del pH de la disolución. Debido a que la carga en la superficie de la pared se debe a la formación de grupos silanato, valores cercanos o inferiores a pH 2 reducirán este potencial zeta a 0 y, por tanto, reducirán o eliminarán este flujo electroosmótico. A medida que el pH de la disolución se incrementa, más grupos silanol se encontrarán completamente ionizados, mayor será el potencial zeta y, como resultado, mayor será el flujo electroosmótico [2].

Otro factor importante que también afecta al flujo electroosmótico, al estar asociado al grosor de la doble capa, es la fuerza iónica de la disolución tamponada utilizada. Dado que la fuerza iónica de la disolución está directamente relacionada con la concentración de cationes en la misma, su aumento dará lugar a una disminución del grosor de esta doble capa y, por tanto, a un menor flujo electroosmótico⁸ [2].

⁷La movilidad electroosmótica dependerá, a su vez, de forma directa del potencial zeta y la constante dieléctrica de la disolución y, de forma inversa, de la viscosidad de la misma.

⁸A pesar de que la velocidad electroosmótica depende de forma directa de la constante dieléctrica, el potencial z lo hace de forma inversa al mismo. Como relación final, el potencial zeta, y por tanto el flujo electroosmótico, disminuye cuando la fuerza iónica de la disolución incrementa [2, 4].

Regular el flujo electroosmótico resulta de gran importancia debido a que gracias a él esta técnica permite la separación de cationes, aniones y especies neutras en una única experiencia. También resulta clave en el tiempo de migración, siendo uno de los factores que más influye en la velocidad de la separación así como en la variabilidad de la misma a lo largo de diferentes experimentos. Debido a su gran influencia en el tiempo de migración, así como a la naturaleza misma de la separación basada en la suma de los vectores de velocidad asociados a la velocidad electroforética y la electroosmótica, el flujo electroosmótico también influye en gran medida en la resolución final del electroferograma y en la buena resolución de cada uno de los picos, figura 2.5.

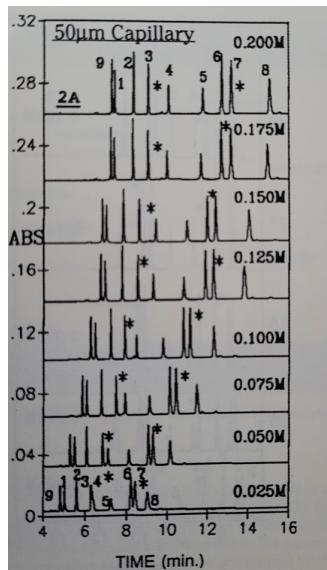


Figura 2.5: Superposición de varios electroferogramas realizados en las mismas condiciones, pero con variaciones en la fuerza iónica de la disolución de separación. Obsérvese como afecta la fuerza iónica (y, por ende, tanto el flujo electroosmótico como el tamaño efectivo del analito en su forma iónica solvatada) tanto al tiempo de la separación como a la correcta resolución de los picos. Imagen extraída de: [2].

En adición a la técnica de separación, también resulta de vital importancia el método de detección utilizado junto a esta. Múltiples instrumentos pueden acoplarse a esta técnica para realizar la detección de los distintos compuestos separados, siendo la técnica de interés en este estudio, al ser la técnica utilizada en la experiencia práctica, la espectrofotometría de absorción molecular.

Para ello, se acopla un detector de ultravioleta al tramo final del aparato de electroforesis capilar realizando una "abertura" casi en el extremo final del capilar⁹, también llamada ventana de detección, que permitirá al aparato medir la absorbancia de los compuestos que pasen por ese segmento del capilar 2.6.

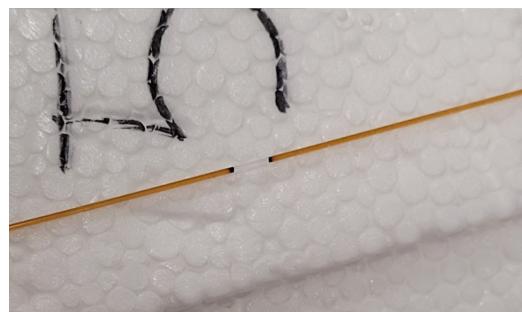


Figura 2.6: Imagen de la abertura realizada en uno de los capilares utilizados en el análisis de los fármacos.

Debido a la gran utilidad de este tipo de técnicas, la electroforesis capilar se ha ganado una gran popularidad como técnica complementaria a la cromatografía líquida de alta resolución en cierto tipo de separaciones, con la ventaja extra de requerir cantidades de muestra extremadamente reducidas así como tener asociado un gasto muy reducido de disolventes [1].

Para nuestro caso de interés; la separación y cuantificación de clindamicina, ketoconazol y clotrimazol, se han descrito varios experimentos basados en la utilización de electroforesis capilar zonal (CZE) con distintos métodos de detección [3, 5–7].

Para la clindamicina¹⁰(figura2.7); un antibiótico efectivo tanto contra bacterias aerobias gram positivas como algunas bacterias anaerobias, micoplasmas y protozoos, hemos encontrado varias publicaciones con experiencias en las cuales realizan su separación y cuantificación en diferentes mezclas o presentaciones comerciales [8].

⁹Esta abertura se realiza mediante la retirada de la capa de polimida que recubre el capilar en esa zona, la cual le aporta flexibilidad permitiéndole doblarse, mediante una resistencia eléctrica sin comprometer la estructura interna del mismo y permitiendo el paso de la radiación sin impedimentos.

¹⁰La clindamicina, cuya actividad bacteriostática deriva de su capacidad para interaccionar con la subunidad ribosomal 50S dando lugar a la inhibición de la capacidad de la bacteria para producir proteínas, se obtiene industrialmente a partir de la lincomicina, otro antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces lincolnensis* [8].

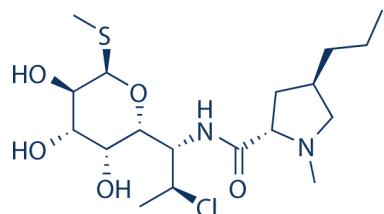


Figura 2.7: Imagen de la molécula de clindamicina.

Estas experiencias tratan la determinación de la clindamicina ya sea mediante su separación de otros fármacos similares o su cuantificación en presentaciones comerciales [6, 7]. En ambas experiencias se consigue separar la clindamicina del resto de los componentes presentes en la presentación comercial más popular del medicamento¹¹ así como, en una de las experiencias de una de las publicaciones, de otros antibióticos de la misma familia con estructuras muy similares mediante electroforesis capilar zonal utilizando distintos métodos de detección. También remarcar que, en el caso de la clindamicina, existe la complicación añadida de no presentar una absorbancia significativa por debajo de los 215 nm. Esto dificulta en gran medida su análisis mediante técnicas de separación acopladas a detectores de ultravioleta siempre que estas utilicen gran cantidad de disolventes no transparentes a longitudes de onda inferiores a 210 nm, como sería el caso en HPLC.

Por otra parte, para el ketoconazol¹² y el clotrimazol¹³(figura2.8), hemos encontrado distintas publicaciones en las que se realizan tanto la separación como la cuantificación de ambos, ya sea en mezclas conjuntas con otros antimicóticos o en presentaciones comerciales, mediante electroforesis capilar zonal acoplada a un detector de ultravioleta [3, 5].

¹¹Cápsulas de hidrocloruro de clindamicina.

¹²Un antimicótico de la familia de los derivados imidazólicos cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima encargada de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos por parte del hongo[4].

¹³Similar al ketoconazol, el clotrimazol también es un antimicótico cuya actividad antimicótica deriva de su capacidad de afectar al proceso de síntesis del ergosterol, lo que acaba inhibiendo el crecimiento fúngico [9].

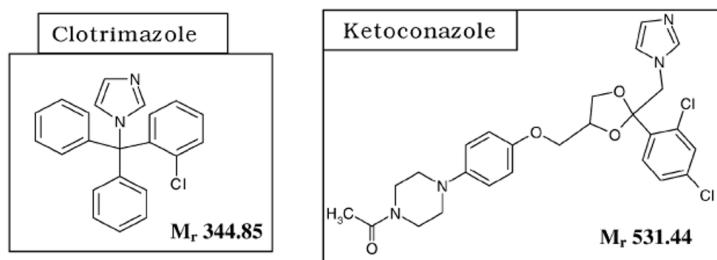


Figura 2.8: Imagen de las moléculas de clotrimazol y ketoconazol.

Más adelante, analizaremos los diferentes métodos propuestos por las cuatro publicaciones anteriormente nombradas [3,5–7], para su uso en el análisis de estas tres moléculas e intentaremos adaptar algunas de ellas para el análisis de diferentes preparaciones comerciales o de interés, así como para su uso en una muestra hospitalaria con indicios de presentar diferencias en su composición con respecto a lo descrito por su fabricante.

3. Metodología y fundamento teórico

3.1. Criterios utilizados en la búsqueda bibliográfica

Para la realización de la búsqueda bibliográfica de las publicaciones relacionadas con la separación y cuantificación de los compuestos de interés se buscaron tanto en PubMed como en Google Scholar, sin restricción de idiomas ni fecha de publicación, las publicaciones que, describiendo de forma detallada algún procedimiento práctico de separación para las moléculas de interés, aparecían al buscar: “Capillary zone electrophoresis clindamycin”, “Capillary zone electrophoresis ketoconazole” y “Capillary zone electrophoresis clotrimazole”. Se descartaron todas las publicaciones que no hicieran referencia a la separación mediante electroforesis capilar zonal de estas moléculas en preparaciones comerciales o en disoluciones con varias de las mismas.

Siempre que resultó posible, se eligieron publicaciones que hicieran referencia a experiencias que, además de utilizar el método de la electroforesis capilar, también utilizasen como método de detección la espectrofotometría de absorción molecular. Esto no resultó posible en el caso de la clindamicina.

Para este último caso, el de la clindamicina, se escogieron dos publicaciones que hacían referencia a distintas experiencias y que, detallando los distintos procesos seguidos en las mismas, permitiesen realizar su determinación en distintas preparaciones comerciales o disoluciones mediante electroforesis capilar.

3.2. Ketoconazol y clotrimazol

En el caso del ketoconazol y el clotrimazol, dos antimicóticos, se estudiaron dos publicaciones [3, 5] con distintas experiencias que detallan distintos métodos o protocolos

posibles para la determinación de ambos antimicóticos.

En el caso de [3], se realizó un estudio para la obtención de dos métodos optimizados que permiten, mediante electroforesis capilar zonal y absorbancia molecular, la separación y cuantificación de siete antifúngicos distintos de una disolución preparada ex profeso. Tanto el ketoconazol como el clotrimazol se encuentran entre los siete antifúngicos estudiados, así como otros antifúngicos de estructura similar.

Para la optimización de estos dos métodos estudiaron tanto la influencia del pH, la naturaleza del disolvente de la muestra, la concentración así como el tipo de electrolito utilizado en la disolución de separación electroforética, la temperatura a la que se realiza la separación y el voltaje aplicado durante la misma. Evaluaron las diferentes condiciones mediante la medición de distintos parámetros; la precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, para la obtención de lo que ellos consideraron las condiciones óptimas en las que realizar la separación.

En el caso de [5], de forma similar a [3], también realizaron diversos experimentos para la determinación de la concentración así como el tipo de electrolito utilizado en la disolución de separación electroforética, el disolvente de la muestra, el pH y el voltaje óptimos para realizar tanto la separación y cuantificación de unas disoluciones preparadas ex profeso con ketoconazol, clotrimazol y econazol¹ así como de preparados comerciales de nuestros dos compuestos de interés, el ketoconazol y el clotrimazol. Para la evaluación de los resultados obtenidos en la optimización del método en este estudio, evaluaron tanto el rango de linealidad, como la precisión y los límites de detección obtenidos.

Para la comparación realizada en este trabajo, con el fin de proponer dos métodos lo más optimizado posible para la separación y cuantificación tanto de ketoconazol como de clotrimazol, en muestras comerciales o en disoluciones mezcla de los mismos, mediante electroforesis capilar zonal acoplada a espectrofotometría de absorción molecular en ultravioleta-visible, se compararon los resultados obtenidos para cada una de las separaciones mediante los distintos métodos propuestos con el fin de poder extraer una propuesta para dos métodos optimizados distintos. Uno para determinación de ketoconazol y clotrimazol en muestras comerciales, y otro para su determinación en mezclas preparadas con estos y otros antimicóticos de estructura y propiedades similares.

¹El econazol es otro antimicótico de naturaleza similar al clotrimazol.

3.3. Clindamicina

En el caso de la clindamicina, dado que no se hallaron publicaciones con experiencias que realizasen la determinación mediante electroforesis capilar zonal junto a espectrofotometría de absorción molecular, se buscaron diversas publicaciones que sí contuviesen experiencias que realizasen su separación y cuantificación mediante el uso del instrumental más parecido posible al deseado. Como se ha comentado anteriormente, existe una dificultad extra para el análisis de esta molécula debido a su baja absorbancia por encima de los 215 nm. Lo cual, dificulta el uso de ciertos disolventes orgánicos en el caso de utilizar como método de detección la espectrofotometría de absorción molecular.

El objetivo del estudio de las diversas condiciones utilizadas en las distintas publicaciones encontradas es el de poder anticipar ciertas variables a la hora de diseñar el método utilizado para la separación y cuantificación de clindamicina en muestras comerciales.

La búsqueda del diseño y la obtención de este protocolo para la determinación de clindamicina se debe a la necesidad de analizar la concentración de la misma en un medicamento vendido en Uganda², del que se tienen dudas sobre su correcta preparación debido a su baja efectividad. Este análisis se realiza con el objetivo de determinar si existen o no, diferencias o variaciones en la cantidad del principio activo que contiene el fármaco con respecto a lo descrito por el propio fabricante. Para ello, se diseñará un método de extracción, análisis y cuantificación de la clindamicina que se aplicará tanto a este preparado comercial local, que parece no actuar clínicamente de la forma esperada, como a otro preparado comercial fabricado localmente en Uganda³, con el fin de realizar una comparación entre ambos preparados y así poder determinar si existen diferencias tanto en la cantidad como en la naturaleza del principio activo presente en ambos.

3.3.1. Métodos estudiados

Para este caso, el de la clindamicina, se encontraron las publicaciones [6,7] que, como ya se ha comentado anteriormente, aún sin tratar la separación y cuantificación de la

²El medicamento, comprado en Uganda, ha sido fabricado en países con poca normativa y posteriormente exportado a Uganda donde se comercializa para su uso médico.

³Medicamento de la misma naturaleza y supuesta composición que el importado, pero que sí parece cumplir con su acción clínica esperada.

clindamicina con el mismo método de detección que el seleccionado para este trabajo, sí realizaron sus experiencias utilizando la misma técnica de separación.

En el caso de [6], realizaron múltiples experimentos con el fin de obtener un método optimizado para la separación y cuantificación de clindamicina tanto en muestras comerciales como en muestras con antibióticos similares mediante electroforesis capilar zonal acoplada a una columna de detección electro-quimioluminiscente. De estos ensayos nos resultan especialmente útiles, debido a la diferencia entre su método de detección seleccionado con respecto al nuestro, las variables asociadas al proceso de separación mediante electroforesis capilar zonal. De entre estas variables de interés, las tenidas en cuenta fueron: el pH de la disolución tampón, el electrolito utilizado en la misma y el voltaje utilizado en la separación.

En la otra publicación [7], se realizaron múltiples experiencias con el fin de obtener un método optimizado para la separación y cuantificación de clindamicina así como de azitromicina y claritromicina, también moléculas con actividades antibióticas, para muestras sin matriz en las que se encontraban los tres principios activos conjuntamente.

En este último caso la separación se realizó mediante electroforesis capilar zonal, aunque con la característica especial de realizarse mediante polaridad inversa y utilizando como detector una celda medidora de conductividad. De lo expuesto por la publicación, hemos extraído diversos datos asociados a variables de interés que creemos se pueden adaptar a la separación de clindamicina de otros compuestos con propiedades similares sin la realización de la misma mediante polaridad inversa.

3.3.2. Método propuesto

El objetivo asociado a esta sección es diseñar un protocolo para la determinación de clindamicina en preparados comerciales, que será validado mediante su uso en diversas muestras comerciales provenientes de Uganda. Estas muestras requieren de un análisis de su principio activo ya que, en el caso de una de ellas, existen dudas sobre su correcta preparación debido a su baja efectividad. Esto hace necesario que, para verificar que cumplen con lo descrito por el fabricante, se requiera determinar si existen o no diferencias o variaciones en la cantidad de principio activo que contiene con respecto a lo descrito por el fabricante.

El tener que realizar esta separación en preparados comerciales implicará la necesidad de adaptar el método a la presencia de distintos excipientes o componentes que se encontrarán junto al principio en la preparación estudiada. Estos excipientes deberán tenerse en cuenta tanto en la correcta solvatación del cloruro de clindamicina como en la posterior separación del mismo, lo cual llevará también al diseño de un método de extracción que permita disolver el máximo posible de este principio activo, clindamicina, para ser posteriormente determinado mediante electroforesis capilar zonal acoplada a un dispositivo detector de fotodiodos en serie.

4. Resultados

4.1. Ketoconazol y clotrimazol

Primeramente, para estudiar de forma apropiada las propuestas realizadas en cada una de las dos publicaciones estudiadas, es necesario ilustrar algunas de las propiedades de los dos compuestos de interés. A continuación, se presentan dos tablas con algunas de sus propiedades fisicoquímicas extraídas tanto de [10–13].

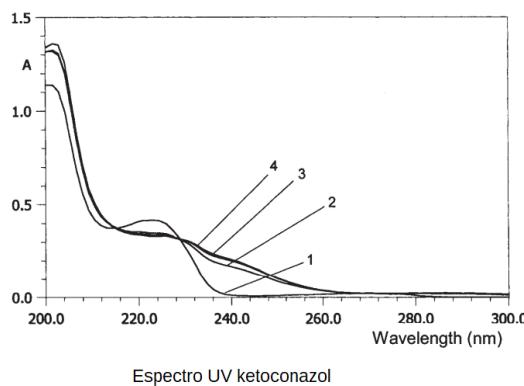
Ketoconazol			
Mw	pKa	Abs _{max} (nm)	Solubilidad agua 20°C (mg/L)
531.44	6.1/3.2	205	0.29

Clotrimazol			
Mw	pKa	Abs _{max} (nm)	Solubilidad agua 20°C (mg/L)
344.85	6.7/4.1	210	0.49

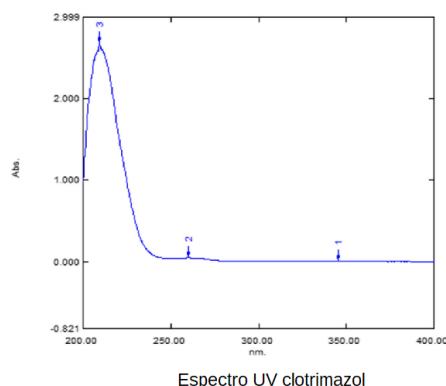
Un elemento a destacar en ambas sustancias es su baja solubilidad, algo que también reseñan ambas publicaciones. Tanto en [3] como en [5], acaban concluyendo que resulta altamente recomendable, y necesario, realizar la disolución de ambos compuestos en una disolución mixta de metanol y agua. Aun variando en ambas la proporción recomendada de cada uno de los dos disolventes, desde el 20 al 50 % en volumen de metanol, concluyen que resulta necesario el uso de una fracción de metanol junto al agua pura para disolver ambos compuestos debido a su baja solubilidad en la segunda, así como la alta volatilidad del metanol puro.

Otro dato parcialmente relacionado con el mismo, la longitud de onda utilizada para la medición de la absorción en la muestra, también se discute en ambas publicaciones. En ambas publicaciones comentan que el máximo de absorbancia para el ketoconazol y el clotrimazol se encuentra alrededor de los 200 nm, viendo en el resto de documentos y

estudios específicos al respecto que, en función de la especie iónica con la que tratemos, se encuentra más cercano a los 205-210 nm , como puede apreciarse en la figura:4.1. En este caso, en el que resulta necesaria la utilización de una fracción de metanol como disolvente, pudiera parecer que la utilización de longitudes de onda cercanas o inferiores a los 210 nm podría no resultar la idónea debido a que el propio disolvente utilizado en la muestra podría afectar a la sensibilidad del método así como a sus resultados¹.



Espectro UV ketoconazol



Espectro UV clotrimazol

Figura 4.1: Espectros de absorción molecular asociados al ketoconazol, en distintas formas iónicas, y al clotrimazol. Espectros extraídos de: [12, 13].

Finalmente, comprobamos que no afecta al resultado, o no de una manera apreciable, debido a la poca cantidad que supone este disolvente en comparación a la cantidad total del tampón de separación utilizado en esta técnica. En este caso, al utilizar un tampón de separación que sí resulta transparente a esa longitud de onda, lo que sucede es que el disolvente utilizado para la solvatación quedará concentrado en la banda asociada al flujo electroosmótico² dando, en caso de no resultar transparente en esa longitud de onda utilizada, una señal al llegar esa banda al detector. Dado que nuestros compuestos de interés poseerán una carga positiva a esos pH de trabajo, la banda asociada al metanol, y por tanto al flujo electroosmótico, aparecerá a un tiempo mayor que la de nuestros compuestos de interés sin tener porque afectarnos a la resolución de los mismos.

Para el pH se realizaron diferentes experiencias, que comprendieron los valores de

¹Esto sería debido a que el metanol, así como otros muchos disolventes orgánicos, no resultan transparentes en longitudes de onda inferiores a los 210nm.

²La señal asociada a ese flujo electroosmótico estará asociada a todos los compuestos neutros presentes en la muestra, así como disolventes utilizados para su solvatación, que no sean transparentes a la longitud de onda de trabajo.

pH entre 2.0 y 4.0 en una de las publicaciones [3] y valores cercanos a 5 en [5]. Esto se debe a la necesidad de tener un pH superior a 2.0 en la separación para que haya flujo electroosmótico³ y un pH inferior al pKa de las sustancias estudiadas para que se encuentren en forma ionizada⁴.

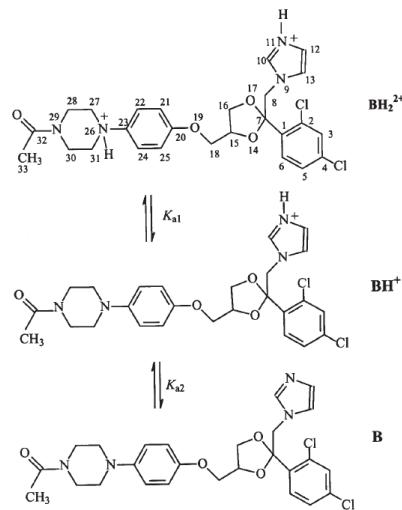


Figura 4.2: Distintas formas iónicas en las que se puede encontrar el ketoconazol. Imagen extraída de: [12].

En este caso, al tener dos pKa's, las moléculas podrán encontrarse en 3 formas distintas, como puede verse en la figura:4.2. Esto hará que las moléculas varíen enormemente sus tiempos de migración en función de en que rango de pKa trabajemos, lo cual hace que resulte interesante realizar los estudios dentro de cada uno de los rangos de pKa's presentes.

Como podemos observar en la figura 4.3, en el caso de trabajar con una muestra con diferentes antimicóticos de estructuras o propiedades fisicoquímicas similares, deberíamos utilizar pH inferiores en los que, a pesar de necesitar mayores tiempos de análisis⁵, se obtienen picos mejor resueltos. También cabe destacar que en el caso de contar con una muestra comercial sin otros antimicóticos similares, como es el terbinafine, o con el ke-

³Siendo 2 el pH mínimo necesario para que se dé un potencial zeta, asociado a la ionización de la propia superficie interna de la pared del capilar, suficiente para darse ese flujo electroosmótico.

⁴En caso de no utilizar un pH inferior, las sustancias no se encontrarían en forma catiónica y no se separarían del pico asociado al flujo electroosmótico al no contar durante la separación con el componente asociado a la velocidad electroforética.

⁵El aumento en el tiempo de migración al reducir el pH se debe, principalmente, a la reducción de la velocidad asociada al flujo electroosmótico.

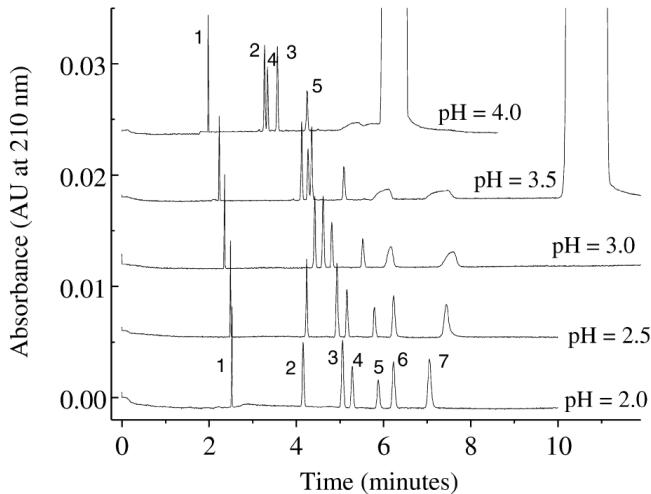


Figura 4.3: Superposición de los electroferogramas asociados a cada una de esas experiencias, siendo los picos 2 y 3 el ketoconazol y el clotrimazol respectivamente (tampón fosfato 0.025 M, 15kV, detección a 210 nm y a 25°C de temperatura). Imagen extraída de: [3].

toconazol y el clotrimazol mezclados, la separación puede efectuarse a pH más elevados reduciendo bastante el tiempo de análisis sin comprometer la correcta resolución de los picos asociados a cada uno de ellos.

En el caso de estudiar los efectos de distintos electrolitos a distintas concentraciones, con o sin aditivos, en los tampones de separación, vemos que existen diferencias significativas tanto en los tiempos de migración obtenidos, así como en la resolución y la eficiencia de la separación.

Vemos que, en este caso, el tampón de separación que mejor funciona es el tampón fosfato. Siendo este, el que mejores resultados da al obtener un mayor número de platos teóricos y una mayor resolución en cada uno de los picos, tabla 4.4. Otro tampón que también funciona muy bien es el que contiene como electrolito el ácido fórmico, o una mezcla de este con ácido acético. Aún dándose una pequeña reducción de la resolución en los picos obtenidos, la utilización de este electrolito reduce los tiempos de migración sin afectar de forma significativa a la correcta resolución de los picos.

Finalmente, para el estudio de los distintos voltajes posibles para la separación, se realizan una serie de experiencias con distintos voltajes comprendidos entre 15 y 30kV. En este caso vemos que un aumento del voltaje da como resultado una disminución del

	Ketoconazole	Clotrimazole	Terbinafine	Verapamil	GW-product	Itraconazole	Running electrolyte
Time (min)	4.2	4.9	5.2	5.8	6.2	7.2	0.025 M Phosphate
Plates	106 000	98 000	91 000	72 000	48 000	26 000	pH 2.31
Resolution		12.8	3.3	8.6	5.2	7.4	64 µA
Time (min)	4.2	4.8	5.0	5.8	6.2	7.6	0.050 M
Plates	128 000	107 000	104 000	80 000	48 000	25 000	pH 2.30
Resolution		12.0	3.7	11.5	5.5	8.3	107 µA
Time (min)	4.9	5.5	5.7	6.8	7.3	9.1	0.100 M
Plates	130 000	112 000	106 000	81 000	49 000	25 000	pH 2.32
Resolution		9.0	3.4	14.5	5.1	9.3	185 µA
Time (min)	2.8	3.2	3.3	3.5	3.8	4.2	0.050 M Formic acid
Plates	47 000	50 000	45 000	31 000	31 000	19 000	pH 2.55
Resolution		9.1	1.9	3.0	2.7	4.1	24 µA
Time (min)	3.0	3.6	3.7	4.0	4.3	4.8	0.100 M
Plates	64 000	61 000	49 000	37 000	41 000	25 000	pH 2.30
Resolution		11.6	2.2	3.6	3.2	4.8	36 µA
Time (min)	3.3	4.0	4.3	4.6	4.9	5.4	0.200 M
Plates	77 000	76 000	72 000	57 000	51 000	35 000	pH 2.15
Resolution		14.6	2.8	4.4	3.5	5.3	49 µA

Figura 4.4: Tabla con los distintos tiempos de migración, platos teóricos y resolución asociados a cada señal obtenida con los distintos electrolitos. Imagen extraída de: [3].

rendimiento de la separación a la vez que disminuye de forma significativa el tiempo necesario para la realización de la misma. También remarcar que el uso de voltajes elevados, mayores de 25kV, genera intensidades también elevadas, de más de 130µA, que junto a la pérdida de capacidad de separación y de sensibilidad nos permiten afirmar que el uso de voltajes superiores a 25kV no resulta adecuado en muestras complejas al utilizar este tipo de condiciones de separación⁶.

Por tanto podemos ver que en función del tipo de muestra, de si resulta una muestra con múltiples moléculas con propiedades fisicoquímicas similares⁷ o, si por el contrario, se trata de una muestra sin otras moléculas con propiedades similares a las del analito de interés, necesitaremos manejar dos métodos distintos que permitan realizar la determinación de estos compuestos de forma óptima.

En el caso de trabajar con una muestra que contenga una mezcla de clotrimazol y ketoconazol con otras estructuras con propiedades fisicoquímicas similares que puedan aparecer a tiempos parecidos, debemos utilizar un método que aun necesitando tiempos

⁶Medio de separación formado por tampón fosfato 0.025 M, temperatura utilizada en el capilar de 30°C, método de inyección de la muestra hidrodinámica durante 5 segundos, pH 2.3.

⁷Propiedades fisicoquímicas similares a tener en cuenta a la hora de realizar la separación serían: el pKa, el máximo de absorbancia, la relación carga/radio etc.

de separación mayores nos permita realizar la separación de forma eficiente y la obtención de picos con una buena resolución.

Un muy buen protocolo a seguir en este caso, que viene recogido en [3], sería el que utiliza como disolvente de separación tampón fosfato 0.025 M (a pH 2.3), voltaje de 20kV, temperatura de 30°C, longitud de onda de detección a 210 nm, e inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5 segundos. Utilizando estas condiciones en un aparato modelo Beckman 5510, con un detector de fotodiodos en serie y un capilar de 30 cm de longitud y 75 µm de diámetro obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad, límites de detección y cuantificación para el clotrimazol y el ketoconazol:

Separación con tampón fosfato			
Compuesto	Rango de linealidad (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Clotrimazol	0.5-15.0	0.12	0.40
Ketoconazol	0.5-15.0	0.20	0.62

Apareciendo, primeramente, el pico de ketoconazol seguido del pico de clotrimazol. Siguiendo este protocolo se obtienen unos buenos resultados con límites de detección y cuantificación adecuados así como un buen rango de linealidad, necesitando la separación, bajo estas condiciones y con este instrumental, unos 4 minutos para completarse⁸.

Este, por tanto, resultaría un muy buen protocolo para la determinación del ketoconazol y el clotrimazol en muestras en las que además se encuentren distintos compuestos con propiedades fisicoquímicas similares a las de estos dos analitos.

En el caso de trabajar en una muestra que contenga el clotrimazol y/o el ketoconazol sin otras moléculas con propiedades fisicoquímicas similares que puedan aparecer a tiempos parecidos, podemos permitirnos el uso de un método que permita realizar la separación a tiempos muy cortos sin tener que comprometer la eficacia de la separación y la resolución de los picos. Este sería el caso de una muestra comercial que contendría, principalmente, el principio activo de interés junto a algunos excipientes de propiedades fisicoquímicas muy diferentes al analito de interés.

Un buen ejemplo de ello sería la separación de una muestra que contenga; ketoconazol, clotrimazol y econazol, sin ninguna otra molécula presente.

⁸Momento en el cual ya han aparecido tanto el pico del ketoconazol como el clotrimazol.

En este caso, utilizado por [5], un protocolo interesante sería el que utiliza para la separación un tampón de ácido acético 0.075M (a pH 5.18), voltaje de 25kV, temperatura de 25ºC, detección a 196 nm, e inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5 segundos. Utilizando estas condiciones también en un modelo Beckman 5510, con un detector de fotodiodos en serie y un capilar de 40 cm de longitud y 75 μ m de diámetro obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad, límites de detección y cuantificación tanto para el clotrimazol como el ketoconazol:

Separación con tampón ácido acético			
Compuesto	Rango de linealidad (μ M)	LOD (μ g/ml)	LOQ (μ g/ml)
Clotrimazol	0.8-12.0	0.16	0.53
Ketoconazol	0.8-12.0	0.33	1.13

Invirtiéndose, en este caso, el orden de aparición de los picos⁹, apareciendo primamente el pico de clotrimazol, seguido del pico de ketoconazol. Siguiendo este protocolo con el instrumental indicado, se obtienen unos límites de detección y cuantificación superiores a los obtenidos en el anterior protocolo, requiriendo un mayor tiempo para realizar la separación¹⁰(5 minutos hasta la aparición del ketoconazol). En este caso, podría resultar interesante estudiar y comprobar en el laboratorio las siguientes variaciones para el diseño de una alternativa basada en este protocolo:

- Aumentar el voltaje de 25kV a 30kV. Lo cual reduciría el tiempo de separación pudiendo permitir de igual forma resolver correctamente todas las señales de interés ya que, en este caso de estudio, no habría otros analitos con propiedades fisicoquímicas similares que den señal en estos tiempos.
- Desplazar la banda longitud de onda utilizada para la detección de los 195 nm a los 210/215 nm. El utilizar una banda más cercana a los máximos de absorbancia de los compuestos de interés nos podría permitir obtener una mayor sensibilidad

⁹Esta inversión en la aparición de los picos se debe, principalmente, al cambio en la forma iónica presente en la separación de cada uno de los dos compuestos entre los dos métodos expuestos debido a los distintos pH utilizados.

¹⁰Hay que tener en cuenta que, además de la variación introducida por las diferentes condiciones experimentales debidas al protocolo, en este caso la longitud del capilar utilizado es un 25 % mayor, lo cual alargará el proceso de separación hasta la aparición de la señal debido a que la muestra debe recorrer un 25 % más de recorrido hasta llegar al detector.

y por tanto unos posibles menores límites de detección y cuantificación, además de permitir alejarnos de longitudes de onda donde gran parte de los compuestos orgánicos dan señal al no resultar transparentes.

Aplicar estas variaciones al protocolo antes mencionado, podría dar lugar a un método muy interesante de ser comprobado para la separación y cuantificación de ketoconazol y clotrimazol en muestras comerciales que no contengan otros principios activos de propiedades fisicoquímicas similares.

El método propuesto y pendiente de comprobación en el laboratorio, utilizaría para la disolución del compuesto una mezcla de metanol en agua de entre un 40/60 % del volumen y para la separación; un tampón de ácido acético 0.075 M (a pH 5.18), un voltaje de 30kV, una temperatura de 25ºC, una longitud de onda para la detección de 210 nm, e inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5 segundos.

4.2. Clindamicina

Primeramente, de nuevo, para estudiar de forma apropiada tanto la molécula, así como las distintas propuestas realizadas por [6] y [7] a la hora de diseñar un método para la determinación de la clindamicina, es necesario ilustrar algunas de las propiedades del compuesto de interés. A continuación, se presentan una tabla con algunas de sus propiedades fisicoquímicas extraídas de [14, 15].

Clindamicina			
Mw	pKa	Abs _{max} (nm)	Solubilidad agua 20ºC y pH 7.2 (mg/L)
425.0	7.72	205	30.61

En este caso vemos que, a pesar de tener la clindamicina una mayor solubilidad en disoluciones acuosas que los anteriores compuestos estudiados, el clotrimazol y el ketoconazol, esta resulta también prácticamente insoluble en disoluciones acuosas en su forma neutra y que, por tanto, será necesario utilizar disolventes orgánicos o disoluciones con un pH inferior a su pKa para poder solvatar su forma ionizada.

También remarcar, como ya se comentó anteriormente, que el máximo de absorción de la clindamicina se encuentra alrededor de los 205 nm, pasando a tener una absorción muy baja por encima de los 215 nm y casi completamente nula por encima de los 225 nm, como puede verse en la figura 4.5 [15].

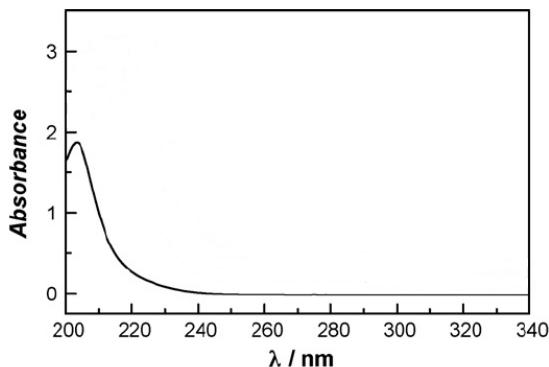


Figura 4.5: Espectro de absorción molecular asociado a la clindamicina en su forma cationica (pH 7.5). Espectro extraido de: [6]

En este caso, al utilizar electroforesis capilar zonal, esto no resulta un inconveniente al poder utilizar como disolventes de separación compuestos que, a diferencia de la mayoría de los disolventes orgánicos, sí resulten transparentes a esas longitudes de onda.

En el caso de las dos publicaciones consultadas, trabajando cada una de ellas con un método distinto para la separación de la clindamicina mediante la electroforesis capilar zonal, ambas trabajan con tampones con pH inferiores a 7.7 (7.5 y 6.4) y, por tanto, con la forma ionizada de la clindamicina.

En el caso de [6], se realizó la separación de distintas muestras comerciales de cloruro de clindamicina mediante el uso de un tampón fosfato 0.050 M (a pH 7.5), con un voltaje de 15kV, inyección electrocinética y utilizando como detector una columna de detección electro-quimiolumisioncente.

Utilizando estas condiciones en un aparato modelo MPI-B CE-ECL, con un capilar de 42 cm de longitud efectiva y 25 μm de diámetro interno, fueron capaces de cuantificar la cantidad de clindamicina de 3 muestras comerciales con una variación de entre el 1.9 y el 2.2 % con respecto a lo que la muestra declaraba contener.

De igual forma, en [7], realizaron también la determinación de clindamicina pero, en este caso, mediante polaridad inversa. Para realizar este procedimiento, añadieron ciertos aditivos al tampón de separación de tal forma que el flujo electroosmótico en lugar de realizarse en dirección al cátodo, se realizase en dirección al ánodo. Esto dio como lugar a la separación de igual forma de la clindamicina del resto de los componentes de la muestra

pero, en este caso, apareciendo su pico después del pico asociado al flujo electroosmótico¹¹, como se puede apreciar en el electroferograma asociado a la figura 4.6.

También remarcar que, como se puede observar en el electroferograma anteriormente mencionado, en este caso los picos se asocian a cambios de la conductividad del medio y no a la absorbancia de los distintos compuestos al utilizarse como detector una celda medidora de conductividad.

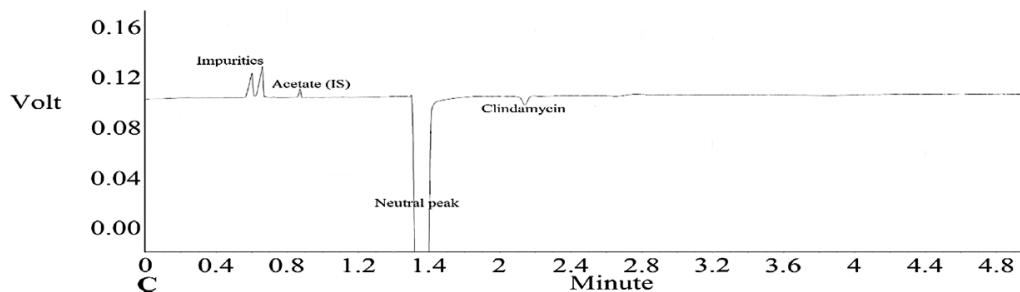


Figura 4.6: Electroferograma asociado a la separación clindamicina, electroferograma extraído de: [7].

En este método, el tampón utilizado para la disolución de separación fue una mezcla de ácido etanosulfónico (0.020 M), L-histidina (0.040 mM) y bromuro de cetiltrimetilamonio (0.0006 M) a un pH 6.39. En el caso del resto de variables: el voltaje utilizado en la separación fue de 30kV, la temperatura de 25ºC, inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5 segundos, y un capilar de longitud efectiva de 32 cm y 75 µm de diámetro interno.

Aplicando estas condiciones en un aparato modelo Beckman, fueron capaces de determinar la clindamicina con un variación en la precisión del 3.7 %, un límite de detección de 38 µg/ml y un límite de cuantificación de 60 µg/ml con tiempos de análisis de entorno a 3 minutos.

En este caso, resulta interesante remarcar la diferencia en los pH utilizados para el análisis de la clindamicina en comparación de los utilizados en el análisis del ketoconazol y el clotrimazol, permitiendo, debido al mayor pKa de la clindamicina, realizar separaciones eficientes a pH mayores y, por tanto, a tiempos menores con un mismo voltaje ¹².

¹¹Señal que contendrá todas las moléculas neutras y cuyo movimiento únicamente dependerán del propio flujo electroosmótico y no de sus velocidades electroforéticas.

¹²Debido a la mayor velocidad del flujo electroosmótico asociado, entre otras cosas, al pH de la disolución tampón de separación.

Como podemos ver, los dos métodos difieren mucho en las condiciones y los resultados obtenidos. Aun no resultando directamente comparables, debido a la utilización no sólo de distintas condiciones en la separación sino también de distintos métodos de detección en la misma, podemos afirmar que en este caso que el protocolo planteado en [6], puede resultar de mayor utilidad a la hora de preparar un método para la determinación de clindamicina en muestras comerciales.

Una vez analizadas y estudiadas las distintas propuestas y experiencias realizadas por otros grupos de investigación, se procedió al desarrollo de un método propio para la determinación de la clindamicina en las muestras comerciales anteriormente nombradas. Para ello, era necesario establecer tanto las condiciones como la composición del medio de separación, así como diseñar un método de extracción que permitiese recuperar la mayor cantidad posible del analito de interés, la clindamicina, de la muestra a estudiar.

Para el correcto desarrollo del método planteado, también se estudió la composición de las distintas muestras a estudiar.

Como se ha comentado anteriormente, las muestras comerciales a analizar eran dos. Una de ellas, la importada (Imp), genera dudas sobre su calidad de preparación y/o composición dados los inferiores resultados en cuanto efectividad médica obtenidos en su uso sanitario con respecto a su homólogo de producción local. La otra muestra a analizar, producida localmente (Loc), es una muestra comercial de composición muy similar a la de la muestra importada, pero que sí está dando los resultados médicos esperados para este tipo de medicamentos.

Las composiciones declaradas por los fabricantes de ambas muestras son las siguientes:

Composición medicamento local por cápsula (Loc)		
Clorohidrato de clindamicina (mg)	Riboflavina (mg)	Excipiente para cápsulas N (mg)
300	91.7	1.3

Composición medicamento importado por cápsula (Imp)		
Clorohidrato de clindamicina (mg)	Lactosa (mg)	Sílice anhidra/estearato de magnesio/otros excipientes
300	No declarado	No declarado

Como se volverá a comentar más adelante, uno de los principales problemas con respecto a la composición de las muestras comerciales a la hora de determinar la clindamicina

fue la presencia de sílice en las mismas¹³. A causa del método de preparación del propio medicamento, parte del principio activo queda adsorbido sobre la sílice afectando a la disolución y extracción del principio activo, la clindamicina, mediante el uso de disolventes acuosos u orgánicos al no resultar soluble la propia sílice en ellos. Esto acaba derivando en la imposibilidad de determinar de forma precisa la cantidad de clindamicina de la muestra¹⁴ mediante el uso de esta técnica. Para solucionar este problema, se acabó optando por la utilización de una disolución con la capacidad de disolver la propia sílice liberando de esta forma el principio activo que pudiera haber adsorbido sobre la misma.

Una vez estudiadas las distintas experiencias disponibles en la bibliografía, así como la composición de la muestra, se realizó el diseño del método utilizado para el análisis de las mismas. Nuestro método propuesto, y utilizado, para la determinación de clindamicina de muestras comerciales fue el siguiente:

- Para la disolución de separación electroforética se utilizó tampón fosfato (dihidrogenofosfato sódico) 0.050 M, con pH 5.5 ajustado con hidróxido de sodio.
- El voltaje utilizado durante la separación electroforética fue de 30kV.
- La introducción de la muestra se realizó mediante inyección hidrodinámica a 0.7 psi (50 mbar) durante 10 segundos.
- La longitud de onda utilizada para la detección fue de 195 ± 10 nm, siendo la longitud de onda de referencia¹⁵ 400 ± 50 nm.

Por la parte instrumental, los aparatos utilizados para la electroforesis capilar fueron los siguientes:

- El capilar utilizado fue de 48 cm de longitud efectiva y 50 μm de diámetro interno, de la marca Polymicro.

¹³Presente en ambas muestras al incluir el excipiente para cápsulas N también en su composición sílice.

¹⁴Debido a las características asociadas al método de separación utilizado, electroforesis capilar, no resulta posible la introducción de materia sólida no disuelta en el aparato. Esto obliga a realizar una separación y eliminación de todo sólido no disuelto, con la consecuente pérdida de analito que haya quedado adsorbido o retenido en él.

¹⁵El detector realizará el cálculo de la cantidad total de radiación absorbida mediante el cálculo de la diferencia entre la radiación absorbida en la longitud de onda a 195 ± 10 nm y la longitud de onda de referencia a 400 ± 50 nm.

- El aparato de electroforesis capilar utilizado fue un modelo HP3DCE de la marca comercial Agilent Technologies.
- El detector acoplado al aparato de electroforesis y utilizado para las separaciones fue un dispositivo DAD (detector de fotodiodos en serie) de la misma marca comercial Agilent Technologies.
- El software utilizado para los cálculos de las áreas de los picos así como para el procesamiento de los electroferogramas fue el HP Chemstation con la versión B04.01.

Una vez planteadas tanto las condiciones como la composición del medio de separación, se puso a prueba el protocolo diseñado en diferentes muestras patrón de clindamicina. Aún careciendo las muestras analizadas en este punto de matriz, también se les aplicó las mismas condiciones que a las muestras comerciales con el objetivo de asegurarse que el proceso de extracción, descrito en la sección posterior, o cualquier otro tratamiento previo a la separación no afectaba negativamente resultado de la misma alterando los resultados esperados.

Un ejemplo de uno de estos análisis, realizado mediante la utilización del protocolo propuesto, viene recogido en el electroferograma de la figura 4.7.

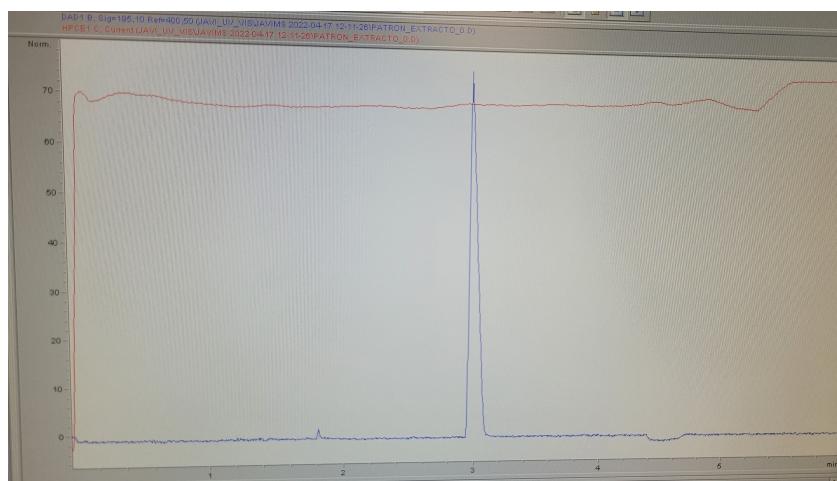


Figura 4.7: Electroferograma obtenido del análisis de una muestra patrón, siendo el pico azul el correspondiente a la clindamicina y la señal roja la evolución de la intensidad de la corriente eléctrica registrada en los electrodos.

Como puede observarse del electroferograma obtenido, mediante este protocolo se

obtiene un único pico en el minuto 3 asociado a la clindamicina y, por tanto, parece ser que el método planteado permite su detección y determinación, siempre y cuando no haya en la muestra interferentes que puedan comigrar con el analito.

También se puede ver que, debido a la ausencia de otras señales en otros tiempos, el tratamiento previo realizado a la muestra no introduce ningún elemento adicional cuyo rango de absorción le permita aparecer en el electroferograma (figura 4.7).

Otro punto a remarcar es que, debido a las características del método utilizado¹⁶, podemos ver cómo se produce una ligera señal negativa entre el minuto 4 y 5. Esta señal negativa, asociada en este caso al pico del flujo electroosmótico, se debe a que en ese momento la disolución absorbía más en el rango de longitudes de onda de referencia (400 ± 50 nm) que en las de absorción (195 ± 10 nm), dando lugar a una señal negativa que forma una ligera depresión en el electroferograma.

Finalmente, vemos que se da una variación importante en la intensidad de la corriente eléctrica registrada en los electrodos entorno al minuto 5. Esto sucede debido a que, tras inyectar a presión el bolo de muestra, los compuestos iónicos que este contiene en el interior migrarán según sus velocidades electroforéticas y electroosmóticas, saliendo fuera del mismo y empobreciendo este en compuestos iónicos formando una zona de baja conductividad. Esto dará a lugar a que su salida, tras ser arrastrado por el flujo electroosmótico y salir por el otro extremo del capilar¹⁷, de lugar a una recuperación de la conductividad por parte de la disolución contenida en el capilar (a la conductividad asociada al electrolito utilizado) y por tanto una variación de la corriente eléctrica registrada.

Realizada esta comprobación final, se procedió a la preparación de los patrones utilizados para el calibrado y al análisis de las muestras de interés que se describirán más adelante.

4.2.1. Descripción del proceso de extracción utilizado

Como ya se ha comentado en múltiples ocasiones anteriormente, dado que las muestras objetivo de análisis son fármacos comerciales, estos contendrán, aparte del analito de

¹⁶Principalmente debido a asociar longitud de onda de referencia a 400 ± 50 nm y la de absorción a 195 ± 10 nm.

¹⁷Existe esta diferencia de tiempo con respecto a la señal obtenida por el espectrofotómetro y la variación de la intensidad de la corriente a causa de haber varios centímetros entre la ventana de detección y el final del capilar.

interés, otros compuestos que formarán una matriz de la cual será necesario extraer el analito a analizar. Por tanto, será necesario diseñar un proceso de extracción, integrado en un proceso general de tratamiento de la muestra, que permita recuperar la mayor cantidad posible del analito de interés de la muestra de estudio. En nuestro caso, al contar en ambas presentaciones comerciales con la misma presentación en forma de cápsulas con excipientes muy similares, el mismo proceso de extracción podrá ser aplicado a ambos tipos de muestra para la extracción del analito de interés.

En este caso en concreto, la mayor dificultad se encontró en uno de los excipientes presentes en ambas fórmulas, la sílice, sobre el cual quedaba parcialmente adsorbido el principio activo al disolver el resto de los componentes. Dado que parte del compuesto quedaba retenido en la sílice, finalmente se optó por disolver la propia sílice. Esto se realizó mediante el uso de ácido fluorhídrico, lo cual permitió la disolución de la sílice, la liberación de la clindamicina adsorbida en ella y su posterior extracción.

El proceso de tratamiento de la muestra utilizado para las muestras comerciales de clindamicina fue el siguiente (ver figura:4.8):

Para el proceso de tratamiento de la muestra utilizado, primeramente, tras pesar la cápsula del fármaco, se retiró la protección en forma de cápsula dura de gelatina en la cual estaba contenida la clindamicina. A continuación, se pesó la cápsula vacía y se obtuvo la cantidad de contenido de la cápsula mediante la diferencia, colocando 0.0100 g del fármaco obtenido en un pesasustancias de polietileno. En ese mismo pesasustancias de polietileno, y mediante el uso de una micropipeta, se colocaron 500 μ L de ácido fluorhídrico 2 M para disolver el fármaco (incluida la sílice presente en este con la clindamicina adsorbida). Tras esto, se traspasó la disolución a un tubo cónico de polietileno de 15 mL que estuvo contenido en un baño de agua a 50°C durante 10 minutos. Pasados los 10 minutos, se añadieron 1.5 mL de agua ultrapura (UHQ) y se agitó el tubo cónico de polietileno durante 10 segundos, apareciendo un precipitado formado, principalmente, por la sílice que se disolvió al principio. Tras la agitación, se volvió a colocar en el baño de agua a 50°C durante otros 10 min. Finalmente, se centrifugó para separar por completo los sólidos restantes en la disolución, se cogieron alícuotas de 100 μ L de la muestra y se diluyeron en 300 μ L de agua ultrapura. De la disolución final resultante, se recogieron 70 μ L que se introdujeron en el microvial de polietileno utilizado para la inyección de la muestra en el aparato de electroforesis capilar zonal.

Por tanto, al final, con respecto a la disolución inicial de $500 \mu\text{L}$ en la que hemos disuelto los 0.0100 g del fármaco, tendremos una disolución diluida a una concentración 16 veces menor que la concentración inicial con la que trabajaremos en el aparato de electroforesis capilar.

Utilizando este método de extracción en 4 muestras distintas de concentración conocida de clindamicina, obtenidas a partir de una misma muestra preparada ex profeso mediante el uso de un estándar de clindamicina, se obtuvieron, como de nuevo se verá más adelante junto al resto de parámetros de calibración, unos índices de recuperación de; 93,26 %, 89,70 %, 90,92 % y 87,25 %, siendo por tanto la media de recuperación obtenida utilizando este proceso de extracción del 90 %.

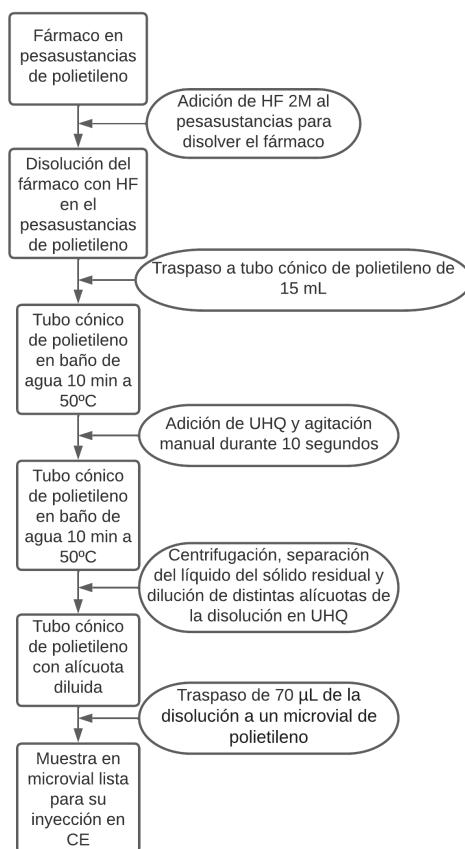


Figura 4.8: Esquema gráfico del proceso de tratamiento de la muestra.

4.2.2. Calibrado del método propuesto

Para la calibración del método y, por tanto, la realización de una recta de calibrado, se realizó el análisis por triplicado de 5 patrones externos de clindamicina a los que se les aplicó el mismo proceso de extracción aplicado al resto de muestras analizadas.

Esto se debe a que, suponiendo que el índice de recuperación (90 %) obtenido anteriormente en la extracción de los fármacos se debe a las limitaciones del propio proceso de extracción y no a pérdidas asociadas a distintos trasvases o pasos del material de un contenedor a otro (del pesasustancias al tubo cónico, etc.), el uso de el propio proceso de extracción en los patrones, obviando fases de trasvase, nos permitirá reflejar en la propia recta del calibrado ese índice de recuperación asociado al método. Esto dará lugar a que, al ver ya reflejada esa perdida en la propia recta de calibrado , los resultados obtenidos a partir de esta ya corrijan esa pérdida asociada al proceso de extracción.

Los distintos patrones se prepararon mediante una única muestra inicial de clindamicina de calidad estándar analítico, que fue procesada mediante el método de extracción antes descrito, a partir de la cual se separaron 5 disoluciones distintas a distinta concentración. Estas 5 disoluciones patrón con distinta concentración fueron las que se analizaron por triplicado para la formación de la recta de calibrado.

El proceso detallado de la preparación de las muestras patrón fue el siguiente:

- Primeramente, se preparó una disolución madre inicial de 912,96 ppm de clindamicina en 25 ml.
- A continuación, se añadieron distintas alícuotas de la disolución madre anteriormente preparada (100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L y 500 μ L) en 5 tubos cónicos distintos a los que se les aplicó el proceso de extracción anteriormente descrito, añadiendo distintas cantidades de cada uno de los reactivos anteriores. A cada una de las muestras, se les añadió 25 μ L de ácido fluorhídrico 2 M y distintas cantidades de agua ultrapura (UHQ) hasta sumar 1 ml total de disolución (875 μ L, 775 μ L, 675 μ L, 575 μ L y 475 μ L).
- Finalmente, se obtuvieron 5 muestras patrón de: 91,296 ppm, 182,592 ppm, 273,888 ppm, 365,184 ppm y 456,480 ppm.

- Estos 5 patrones fueron analizados por triplicado mediante el protocolo antes descrito por electroforesis capilar zonal, obteniendo unos resultados mediante los cuales se realizó la recta de calibrado.

Los parámetros de calidad asociados a la recta de calibrado realizada con las disoluciones anteriormente descritas se recoge en la siguiente figura:4.9.

	Parámetros/Conc. Muestras ^a	Clindamicina ^a
PARÁMETROS DE CALIDAD		
	Coefi. Corre.	0.99849
	Pend., AU L mg⁻¹	0.28111 (0.00253)
	Ord.Orig, AU	0.0189 (0.7658)
	LOD / LOQ^bmg L⁻¹	8.99 / 27.24
Reproducibilidad ^c Conc.mues./%	368 mg L ⁻¹	4%
Índices de recuperación ^g	368 mg L ⁻¹	90% (3%)

^a Concentraciones expresadas como ppm (mg/L). Desviaciones estándar entre paréntesis.

^b Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se han calculado para 3 y 10 veces el ruido de fondo.

^c Reproducibilidad obtenida a partir de las muestras patrón (3 inyecciones).

^g El índice final se ha calculado mediante la media de 3 inyecciones.

Figura 4.9: Tabla con todos los parámetros de calidad del método de determinación propuesto.

Como podemos observar, el método propuesto dio unos muy buenos resultados en cuanto los parámetros de la recta de calibración se refiere, así como en la reproducibilidad.

También remarcar que los límites de detección y cuantificación obtenidos, de 8,99 y 27,24 ppm respectivamente, son más que suficientes para analizar las muestras de interés

dado que el analito, siempre según la información del fabricante, se encontrará entorno a los 400 ppm a la hora de realizar la determinación.

4.2.3. Resultados método propuesto

Como recordatorio a lo ya comentado anteriormente, el objetivo final de esta sección del trabajo es analizar dos tipos de muestras catalogadas como de producción local (Loc) e importada (Imp). La muestra importada genera dudas sobre su composición exacta, mientras que la de producción local ha estado dando los resultados adecuados y esperados para este tipo de fármacos. El planteamiento inicial para este proceso fue el realizar un análisis individual de distintas cápsulas para cada una de las preparaciones y comparar los resultados obtenidos tanto con lo declarado por los propios fabricantes como entre sí. Esto nos permitiría determinar si existen diferencias significativas, en cuanto a la presencia del principio activo se refiere, entre las dos muestras y con respecto a lo que deberían contener ambas.

Por tanto, una vez planteadas las condiciones utilizadas en la separación, el proceso de extracción de la muestra y obtenida la recta de calibrado, se procedió a realizar el análisis de las muestras de interés.

Comenzamos con la idea de realizar un primer análisis en el que, de forma individual, se determinaría la cantidad de clindamicina en seis cápsulas de cada una de las dos preparaciones comerciales de interés.

Primeramente, se pesaron cada una de las doce cápsulas sin manipular, tras lo cual se extrajo el contenido de las mismas. Se pesaron los recubrimientos ya vacíos y de la diferencia entre las cápsulas sin manipular y las cápsulas vacías se obtuvo la cantidad de muestra a analizar.

Aquí ya se encontró un segundo problema, además del de la sílice, al verse que los pesos obtenidos del interior de los fármacos clasificados como locales tenían una enorme variación entre ellos a diferencia de los importados que no presentaban casi variación.

Datos obtenidos en análisis de cápsulas individuales		
Tipo de cápsula	Cápsulas locales	Cápsulas importadas
Peso interno (g)	0.4119	0.3355
Peso interno (g)	0.4100	0.3411
Peso interno (g)	0.2880	0.3464
Peso interno (g)	0.3926	0.3515
Peso interno (g)	0.3987	0.3477
Peso interno (g)	0.4133	0.3443
Media (g)	0 .3858	0.3444
Desviación estándar (g)	± 0.04858	± 0.005575
C.I.95 % (g)	0.39 ± 0.05	0.344 ± 0.006
Error relativo (%)	± 13	± 1.7

En estos casos la variación presente dentro de las muestras es de un 13% en las preparaciones locales mientras que en las preparaciones importadas era de un 1,7%. Aún descartando el dato anómalo que ofreció un peso extremadamente bajo en una cápsula local (0.2880 g), la variación dentro de las muestras locales rondan el 2.8%.

Como puede verse, existe una gran variación en el contenido de cada uno de los preparados locales. Esto puede o no afectar a la cantidad de clindamicina presente en cada fármaco, al depender de si estas variaciones dependen simplemente de la cantidad de excipientes presentes en el fármaco o si son variaciones en la cantidad total del mismo incluyendo la clindamicina.

Debido a estas enormes diferencias entre distintas cápsulas de un mismo preparado, se decidió cambiar de estrategia y realizar en análisis mediante el uso de un conjunto de cápsulas de cada preparado. Esto se debe a que el objetivo principal del análisis es determinar la cantidad de clindamicina presente en las muestras y ver si esta se asemeja o difiere de lo descrito por el fabricante, lo cual resultaría complicado con unas variaciones tan elevadas de masa como las que plantea el proceso anterior. Por tanto, para reducir la posibilidad de obtener un dato extremadamente anómalo debido a la enorme variabilidad presente en las cápsulas locales, en este nuevo método se utilizarían un conjunto de las cápsulas ya pesadas, cinco, y se trabajaría con el material reunido de ese conjunto o “pool” de cápsulas de una misma preparación.

A continuación, se obtendría el extracto del fármaco y se procedería a la determinación de la clindamicina de ese conjunto de cápsulas por cuadruplicado mediante el método

antes descrito, calculando finalmente la cantidad de clindamicina por cápsula utilizando las medias de contenido por cápsula obtenidas en el anterior análisis (Tabla de pesos individuales).

Por tanto, se obtuvo la masa interna del “pool” o conjunto de pastillas tanto para las cápsulas de producción local como para las importadas juntando el contenido de cinco cápsulas para cada preparación y se les aplicó a cada una de las muestras el proceso de extracción antes descrito adaptando las cantidades utilizadas al peso analizado.

Finalmente, se procedió a su análisis mediante electroforesis capilar zonal por cuadriplicado.

Un ejemplo de los electroferogramas obtenidos de los extractos puede verse en la figura 4.10.

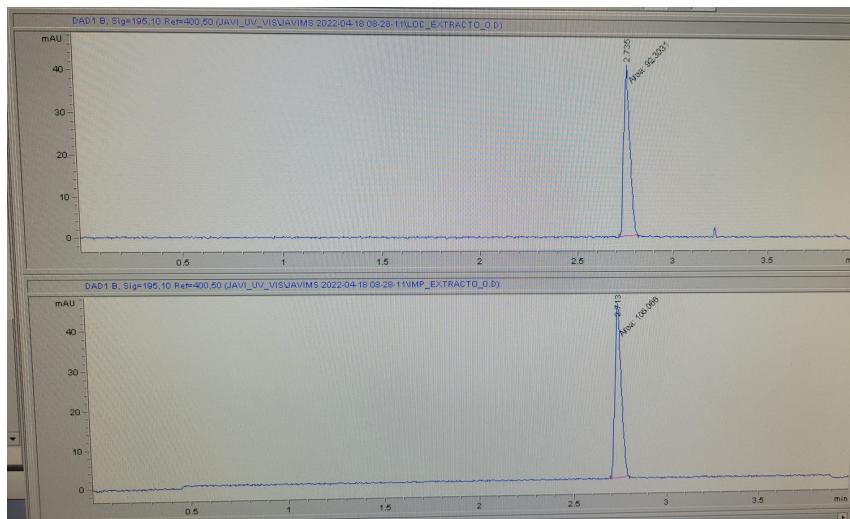


Figura 4.10: Imagen de dos de los electroferogramas obtenidos, siendo el electroferograma superior de una muestra catalogada como de producción local y el inferior de una muestra importada. En ambos aparece un único pico correspondiente a la clindamicina. Las condiciones utilizadas en la separación fueron: tampón fosfato a pH 5.5, voltaje 30 kV, inyección hidrodinámica 0.7 psi 10 segundos, longitud de onda para la detección a 195 ± 10 nm y referencia a 400 ± 50 nm.

Como se puede observar en los dos electroferogramas mostrados en la figura 4.10, la separación se llevó a cabo sin problemas y con picos perfectamente resueltos sin ningún tipo de interferencia apreciable. Obtenidos los electroferogramas, se procedió a la integración de los picos obtenidos y al cálculo de las concentraciones de clindamicina de cada una de

las muestras mediante la recta patrón obtenida.

Datos finales obtenidos		
Tipo de cápsula	Cápsulas locales	Cápsulas importadas
Masa analizada del "pool"(mg)	104.2	98.0
Masa media cápsula (mg)	385.8	344.4
Desviación estándar masa cápsula (mg)	± 48.58	± 5.575
C.I.95 % cápsula (mg)	390 ± 50	344 ± 6
Promedio masa clindam. (mg/"pool")	77.61342	85.59876
Desviación estándar (mg/"pool")	1.0933	1.5333
C.I.95 % (mg/"pool")	78 ± 2	86 ± 2
Masa clindam. (mg/cápsula)	287	301
Desviación estándar (mg/cápsula)	36	7
C.I.95 % (mg/cápsula)	290 ± 40	300 ± 10

Obteniendo finalmente como resultados, con un 95 % de confianza, que la pastilla de fabricación local tiene una concentración de 290 ± 40 mg de clindamicina por cápsula, mientras que la importada tiene una concentración de 300 ± 10 mg de clindamicina por cápsula .

Teniendo en cuenta la cantidad de clindamicina declarada por cada uno de los distintos fabricantes de las mismas, ambos declaran aportar 300 mg de la misma en cada una de sus cápsulas, y viendo los resultados obtenidos, podemos afirmar que ambas preparaciones contienen cantidades sin diferencias significativas a las declaradas, aun existiendo (en el caso de las cápsulas de fabricación local) una gran variabilidad experimental en la cantidad de fármaco encontrado en algunas de las cápsulas analizadas.

Debido a que se obtienen contenidos sin diferencias significativas al contenido declarado en ambas preparaciones, se plantea la posibilidad de que la diferencia clínica observada entre ambas muestras se deba a la presencia de proporciones diferentes de los enantiómeros de la clindamicina entre ambos preparados. Como verificación final, se realizaron unos estudios de rotación óptica para comprobar que la clindamicina presente en ambos fármacos es la forma eutómera¹⁸ dextrógira.

Para ello, se realizaron las mediciones tanto de una muestra patrón como de una muestra del fármaco local y una del importado. Las mediciones se realizaron mediante un

¹⁸Siendo el eutómero, el enantiómero con la mayor actividad farmacológica deseada.

polarímetro a una longitud de onda de 589 nm, siendo fórmula que permite calcular la concentración del enantiómero de interés la siguiente:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha_{obs}(\text{grados})}{L(dm)C(g/ml)} \quad (4.1)$$

Siendo $[\alpha]$ la rotación específica del enantiómero estudiado, T la temperatura utilizada (25°C), $[\lambda]$ la longitud de onda utilizada (589nm), α_{obs} la rotación observada medida por el polarímetro, L la longitud del tubo de paso y C la concentración de la disolución en ese enantiómero.

De esta medición final, realizada disolviendo las muestras en 2 ml de ácido fluorhídrico 0.5 M, se obtuvo que ambas muestras presentaban una concentración similar del eutómero tal y como puede verse en la siguiente tabla.

Datos medición polarímetro			
Tipo de cápsula	Patrón	Cápsulas locales	Cápsulas importadas
Masa de la cápsula analizada (mg)	NA	410.0	341.1
Masa analizada de la cápsula (mg)	80	102.7	103.9
Rotación obtenida ($^{\circ}$)	+0.601	+0.650	+0.706
Masa eutómero muestra analizada (mg)	80	86.5	94.0
Masa eutómero cápsula (mg)	NA	345	309

Por tanto, las muestras no presentaban diferencias significativas en la proporción de enantiómero con respecto a lo esperado que explican la diferente actividad farmacológica entre la muestra de fabricación local y la muestra importada¹⁹.

Como planteamiento a futuro, se propone realizar estudios de polimorfismo para ver si, en este caso, la diferencia de actividades observadas entre las formas farmacéuticas local e importada se deben a encontrarse los cristales de estas en distintas formas polimórficas. Estos estudios podrían realizarse mediante estudios por difracción de rayos X de los sólidos contenidos en el interior de las distintas cápsulas.

¹⁹Según los fabricantes, el medicamento debe contener 300 mg de clindamicina en la forma eutómera para resultar efectivo, lo cual cumplen ambas preparaciones. Esto, por tanto, no explica la falta de actividad que presenta la preparación importada.

5. Conclusiones

Este trabajo ha servido como estudio general de los métodos analíticos basados en electroforesis capilar para la determinación de tres principios activos, pudiéndose dividir su contenido en dos partes:

- Una primera parte, orientada a una discusión general de las distintas propuestas bibliográficas encontradas para la determinación tanto de ketoconazol, clotrimazol como clindamicina en distintos tipos de muestras mediante electroforesis capilar zonal. Esta discusión ha servido como punto de partida para la proposición de dos métodos o protocolos para la determinación de estos dos primeros analitos en distintos tipos de preparaciones, así como para la elaboración de un tercer protocolo para la determinación de clindamicina en distintas muestras comerciales.
- La segunda parte, se ha centrado en la determinación de la clindamicina en dos muestras comerciales distintas con composiciones muy similares. Esta parte ha tenido como objeto de estudio principal una muestra comercial importada a Uganda y fabricada en países con poca normativa, cuya eficacia farmacológica no está siendo la esperada. Para ello, se ha analizado su contenido en clindamicina y se ha comparado tanto con lo descrito por el fabricante como con la cantidad contenida en otro tipo de muestra comercial que sí está cumpliendo con su actividad farmacológica.

Por tanto, las propuestas extraídas de la primera parte pueden resumirse en:

- Un protocolo extraído de [3], que permite la determinación tanto de ketoconazol como clotrimazol en muestras con otros compuestos con propiedades químico-físicas similares. Utilización de un disolvente de separación de tampón fosfato 0.025 M (ajustado a pH 2.3), voltaje de 20kV, temperatura de 30ºC y detección a 210 nm.

- Un protocolo pendiente de validación en el laboratorio, que permitiría la determinación tanto de ketoconazol como clotrimazol en muestras comerciales. Utilización de un disolvente de separación de tampón de ácido acético 0.075 M (ajustado a pH 5.18), voltaje de 30kV, temperatura de 25ºC y detección a 210 nm.
- Un protocolo que permite la determinación de clindamicina en muestras comerciales, verificado mediante el análisis de diversas muestras de interés. Utilización de un disolvente de separación de tampón fosfato 0.050 M (ajustado a pH 5.5), voltaje de 30kV, temperatura de 25ºC, longitud de onda de detección a 195 nm y longitud de onda de referencia a 400nm.

Del análisis realizado en la segunda parte puede extraerse que las muestras importadas a Uganda, de las cuales existen dudas en su composición debido a su falta de efectividad farmacológica, no presentan diferencias significativas en la concentración o pureza enantiomérica de la clindamicina presente en ellas con respecto a otros fármacos fabricados localmente con clindamicina importada de la UE que sí presentan la actividad esperada por los mismos o con lo declarado por el propio fabricante. Análisis adicionales pueden realizarse en un futuro para verificar que la distinta actividad se pueda o no deber a otro tipo de variables presentes en los fármacos, tales como la presencia de distintas formas polimórficas. Este último aspecto podría ser estudiado mediante el uso de técnicas de difracción de rayos X de los sólidos contenidos en el interior de las distintas cápsulas.

Finalmente, me gustaría reseñar que la consideración conjunta de las dos partes del trabajo muestra que la electroforesis capilar zonal supone una técnica de separación extremadamente potente, versátil y capaz de actuar como técnica complementaria a otras técnicas analíticas, pudiendo incluso llegar a rendir mejor que éstas en ciertos casos.

6. Synopsis

In this assignment we carried out a study of different optimized procedures to detect and quantify clindamycin, clotrimazole and ketoconazole in commercial samples by capillary electrophoresis.

The assignment has been divided into different parts, each part focused on one of the different molecules of interest.

Firtsly, this study will be carried out by analyzing the methods proposed by four scientific articles and adapting this methods to the desired objectives.

Different experiments have also been carried out in the laboratory to verify one of the methods proposed for the analysis of one of the molecules of interest (clindamycin).

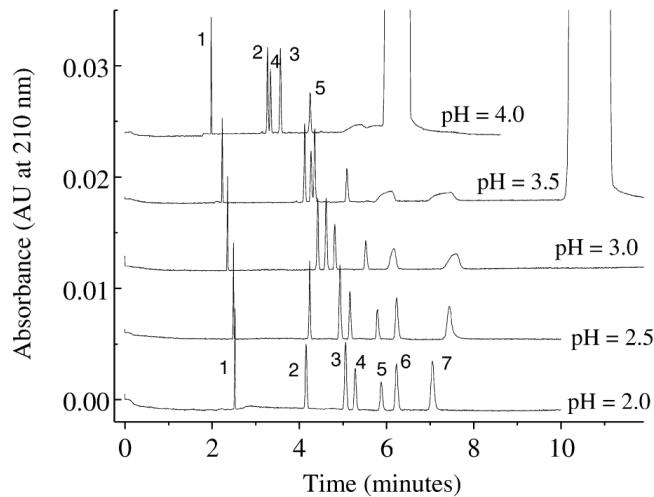


Figura 6.1: Superposed electropherograms associated with different experiments for the determination of ketoconazole and clotrimazole. Different pH have been tested to see the effects in the separation. Image from: [3].

Secondly, the quality of some commercial preparations provided by different medical

entities from Uganda have been studied to verify their composition.

These drugs have been studied since one of them has not been giving the expected medical results. This assignment will carry out a determination of the main active principle of this drug through one of the methods devised in the previous part to verify its correct preparation.

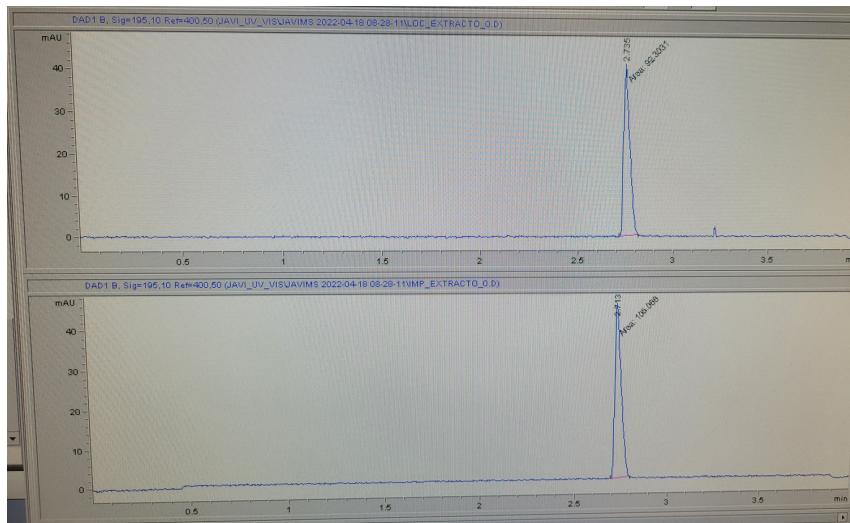


Figura 6.2: Image of two of the electropherograms obtained, being the upper electropherogram from a sample of the local preparation and the lower one from the imported sample. The conditions used for this separation were: phosphate buffer at pH 5.5, voltage 30 kV, hydrodynamic injection 0.7 psi 10 seconds, wavelength for detection at 195 ± 10 nm and reference at 400 ± 50 nm.

For the first part, three different methods have been developed for the determination of both clotrimazole, ketoconazole and clindamycin.

- Firstly, a method that allows the determination of both ketoconazole and clotrimazole in samples without matrix. This method uses a separation solvent of 0.025 M phosphate buffer (adjusted to pH 2.3), a voltage of 20 kV, a temperature of 30°C and ultraviolet detection at 210 nm.
- Secondly, a method that allows the determination of both ketoconazole and clotrimazole in commercial samples. This method uses a separation of 0.075 M acetic acid buffer (adjusted to pH 5.18), a voltage of 30 kV, a temperature of 25°C and ultraviolet detection at 210 nm.

- Thirdly, a method that allows the determination of clindamycin in commercial samples verified by the analysis of diverse commercial samples of interest. This method uses a separation solvent of 0.050 M phosphate buffer (adjusted to pH 5.5), a voltage of 30 kV, a temperature of 25°C and a detection wavelength of 195 nm with the reference wavelength at 400 nm.

Finally, from the analysis of the commercial preparations provided by different medical entities from Uganda we obtain the different concentrations of clindamycin in these samples.

With these concentrations we determine that the imported commercial preparation does not present significant differences with the concentration declared by the manufacturer. These values do not explain its underperformed medical efficacy.

Final data obtained		
Capsule type	Local capsules	Imported capsules
Analyzed mass of the pool (mg)	104.2	98.0
Mean mass of capsule (mg)	385.8	344.4
Standard deviation capsule mass (mg)	±48.58	±5.575
C.I.95 % capsule (mg)	390±50	344±6
Average clind. mass (mg/pool)	77.61342	85.59876
Standard deviation (mg/pool)	1.0933	1.5333
C.I.95 % (mg/pool)	78±2	86±2
Clindamycin mass (mg/capsule)	287	301
Standard deviation (mg/capsule)	36	7
C.I.95 % (mg/capsule)	290±40	300±10

Additionaly, it is proposed to carry out future tests (such as X-ray diffraction analysis) to study if the low activity in this preparation is due to other types of variables present in the drugs.

Bibliografía

- [1] J. S. Toraño, R. Ramautar, and G. Jong, *Journal of Chromatography B*, 2019, **1118–1119**, 116–136.
- [2] ed. R. Weinberger, *Practical capillary electrophoresis.*, Academic Press, A harcourt science and technology company, 2000.
- [3] A. L. Crego, M. L. Marina, and J. L. Lavandera, *Journal of chromatography. A*, 2001, **917(1-2)**, 337–345.
- [4] D. Harvey, *Electrophoresis*, Chemistry libretexts, 2021.
- [5] A. Arranz, C. Echevarría, J. M. Moreda, A. Cid, and J. F. Arranz, *Journal of chromatography. A*, 2000, **871(1-2)**, 399–402.
- [6] J. Wang, Z. Peng, J. Yang, X. Wang, and N. Yang, *Talanta*, 2008, **75,3**, 817–823.
- [7] P. Paul, T. Duchateau, G. C. Sänger-van, E. Adams, and A. Van Schepdael, *Journal of separation science*, 2017, **40(17)**, 3535–3544.
- [8] J. Spízek and T. Rezanka, *Applied microbiology and biotechnology*, 2004, **64(4)**, 455–464.
- [9] P. D. Crowley and H. C. Gallagher, *Journal of applied microbiology*, 2014, **117(3)**, 611–617.

- [10] Pubchem compound summary for cid 3823, ketoconazole <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketoconazole>, 2022.
- [11] Pubchem compound summary for cid 2812, clotrimazole <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clotrimazole>, 2022.
- [12] P. M. Vojic, P. Gordana, D. M. Sladic, and L. B. Pfendt, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2005, **70**.
- [13] S. Kalshetti and K. Rao, *Futur J Pharm Sci*, 2021, **7**, 1–9.
- [14] Pubchem compound summary for cid 2786, clotrimazole <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/clindamycin>, 2022.
- [15] A. Mohamed, A. Elsayed, O. Ahmed, S. Amin, and A. Ali, *Pharmaceutics*, 2017, **9**, 7.