



Revista Cubana de Química

ISSN: 0258-5995

revcubanaquimica@cnt.uo.edu.cu

Universidad de Oriente

Cuba

Heredia Díaz, Y.; Arias León, J. J.; García Fraga, J. M.
DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÁNEA DE CARBAMAZEPINA Y
FENOBARBITAL EN MEZCLAS SINTÉTICAS UTILIZANDO REGRESIÓN POR
MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

Revista Cubana de Química, vol. XX, núm. 1, 2008, pp. 9-18

Universidad de Oriente

Santiago de Cuba, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543713002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÁNEA DE CARBAMAZEPINA Y FENOBARBITAL EN MEZCLAS SINTÉTICAS UTILIZANDO REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

Y. Heredia Díaz,* J. J. Arias León,** J. M. García Fraga**

*Departamento de Farmacia, Universidad de Oriente, **Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología, Universidad de la Laguna, España

● Resumen

Se describió un método de calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS) para la determinación espectrofotométrica de carbamazepina (CBZ) y el fenobarbital (PB) en mezclas sintéticas. Las concentraciones de CBZ y PB se estudiaron en el intervalo 1-12 mg L⁻¹ y de 4-10 mg L⁻¹, respectivamente. Se resolvieron mezclas binarias sintéticas de carbamazepina y fenobarbital aplicando regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) a los espectros UV de orden cero y primera derivada de las mezclas. El número óptimo de factores y el intervalo de longitudes de onda se determinó en función de diferentes parámetros relacionados con la capacidad de predicción. La media de los errores relativos de predicción obtenida para la CBZ y el PB fue de 1,07 % y 0,83 %, respectivamente; y los errores relativos de predicción en la cuantificación de ambos fármacos con los modelos seleccionados, en todos los casos, fueron inferiores al 3,5 %.

Palabras clave: carbamazepina, calibración multivariada, espectrofotometría UV, fenobarbital, mínimos cuadrados parciales.

● Abstract

The partial least squares (PLS) calibration methodology was described for the spectrophotometric determination of Carbamazepine (CBZ) and Phenobarbital (PB) in synthetic mixtures. The concentration ranges used were 1-12 mg L⁻¹ and 4-10 mg L⁻¹ for CBZ and PB, respectively. A set of synthetic binary mixtures of CBZ and PB were resolved applying PLS-1 to their zero order and first derivate UV spectra signal. The optimum number of factors and the wavelengths range were determined as function of different parameters related with the prediction ability. The relative errors average obtained in the prediction set was 1,07 % and 0,83 % for CBZ and PB, respectively; and the relative errors of prediction in the quantification of both drugs by using the selected models were less than 3,5 % in all the cases.

Keywords: carbamazepine, multivariate calibration, UV spectrophotometry, partial least squares, phenobarbital.

● Introducción

El fenobarbital (PB) y la carbamazepina (CBZ) son antiepilépticos clásicos (figura 1). La CBZ es un fármaco derivado del iminoestilbeno relacionado químicamente con los antidepresivos tricíclicos del tipo de la imipramina. Se utiliza como antiepiléptico, analgésico y antimaníaco. Se metaboliza a 10-11 epoxi carbamazepina, que tiene efectos terapéuticos y tóxicos similares a los de la CBZ. La fenitoina, el fenobarbital y la primidona pueden reducir a la mitad los niveles de CBZ, y aumentan los de su metabolito activo con riesgos de efectos tóxicos./1/ El intervalo óptimo de

niveles séricos de CBZ es de $6-12\text{mgL}^{-1}$, aunque pueden ocurrir considerables variaciones /2/.

El fenobarbital es un barbitúrico de acción prolongada, utilizado en la actualidad de forma exclusiva por su actividad anticonvulsiva. Posee actividad sedante, hipnótica y anestésica. Se elimina lentamente en parte por oxidación microsómica hepática, y en parte por la orina en forma inalterada. El fenobarbital reduce los niveles de carbamazepina, etosuximida y valproato /1/. El rango de concentraciones terapéuticas en plasma es de $2-30\text{mg L}^{-1}$.

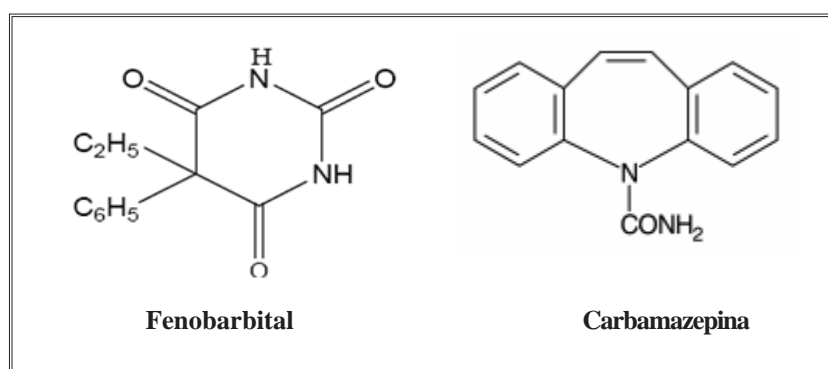


Fig. 1 Estructura química de los fármacos utilizados en este estudio.

La monitorización de las concentraciones plasmáticas de estos fármacos antiepilépticos es necesaria en situaciones de alto interés clínico, como por ejemplo, en casos de sospecha de incumplimiento terapéutico, evidencias de toxicidad, crisis convulsivas, ataxias, síntomas gastrointestinales, aparición de crisis recurrentes, en embarazadas durante el tercer trimestre de gestación, y por la necesidad de combinar la CBZ con un segundo fármaco con potencialidad de interactuar con el antiepiléptico, entre otras causas /3/.

Con el fin de determinar los niveles plasmáticos de carbamazepina y fenobarbital, se han desarrollado varios métodos analíticos cromatográficos: la cromatografía en capa fina /4/ cromatografía gaseosa /4-6/ y cromatografía líquida de alta resolución /7-11/.

Estos métodos analíticos descritos en la literatura requieren de una instrumentación costosa, y del empleo de cantidades relativamente altas de disolventes orgánicos contaminantes.

La aplicación de técnicas quimiométricas a datos espectrales, ha permitido la determinación rápida de los componentes en mezclas complejas sin necesidad de una separación previa para su análisis, ni de procedimientos complejos en el tratamiento previo de

las muestras. Varios autores han propuesto métodos espectroscópicos combinados con técnicas quimiométricas para la determinación analítica de carbamazepina /12-14/

En este trabajo, se propone un método espectrofotométrico ultravioleta (UV) combinado con regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), para resolver mezclas binarias de carbamazepina y fenobarbital.

● Métodos Experimentales

Aparatos e instrumentos

Los espectros fueron registrados en un espectrofotómetro de diodos en fila Hewlett-Packard HP 8453 (Avondale, PA, USA) controlado por un ordenador Vectra XA de la misma marca. En los distintos ensayos, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, y 4 mL de volumen interno.

Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro digital Crison (Barcelona, España), equipado con un electrodo doble de vidrio-calomel saturado. Se utilizó un baño de ultrasonido Selecta (R. Espinar, Sevilla, España) y una balanza analítica ANDER-182 (Pacisa S.A., Madrid, España).

Programas

El espectrofotómetro está controlado por un programa suministrado conjuntamente con el espectrofotómetro. La calibración y predicción por regresión en mínimos cuadrados parciales fueron realizada mediante la utilización del programa UNSCRAMBLER /15/.

Reactivos

Disoluciones estándar de 50 mg L⁻¹ de carbamazepina (Sigma, EEUU) y fenobarbital (Fluka, Suiza) preparadas por pesada directa de su producto comercial puro disuelto en etanol.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, y las disoluciones acuosas preparadas con agua desionizada Millipore/Milli-Q.

Procedimiento

En matraces aforados de 25 mL, se añadieron las cantidades necesarias de disolución patrón de CBZ y PB; 1 mL de hidróxido de sodio etanólico 0,1 mol L⁻¹, y agua desionizada hasta el enrase.

Los espectros de absorción se registraron en el rango 190-350 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin analito. Los espectros de absorbancia se registraron entre 190 y 350 nm

a intervalos de 1 nm (161 variables). El formato de los datos así obtenidos fue transformado convenientemente para ser posteriormente utilizados por el UNSCRAMBLER. Los espectros derivados se obtuvieron mediante la utilización de este programa, aplicando el algoritmo de Savitzky-Golay a partir de un polinomio de segundo grado.

● Resultados y discusión

La figura 2 muestra los espectros de absorción de los compuestos estudiados y su mezcla. Se aprecia un fuerte solapamiento entre el espectro de absorción de la CBZ y el PB. La primera exhibe dos máximos a las longitudes de 214 y 286 nm, y un hombro a 238 nm. El PB presenta máximos de absorción a 210 y 242 nm. Si bien a primera vista se aprecia que a longitudes de onda superiores a 290 nm se podría determinar la CBZ en presencia de PB, no existe ninguna zona del espectro en la que sea posible determinar PB en presencia de CBZ, por ello es necesario recurrir a la calibración multivariante. En nuestro caso, nos hemos decantado por el uso de regresión en mínimos cuadrados parciales (PLS), debido a las excelencias mostradas por este tipo de regresión para resolver mezclas complejas.

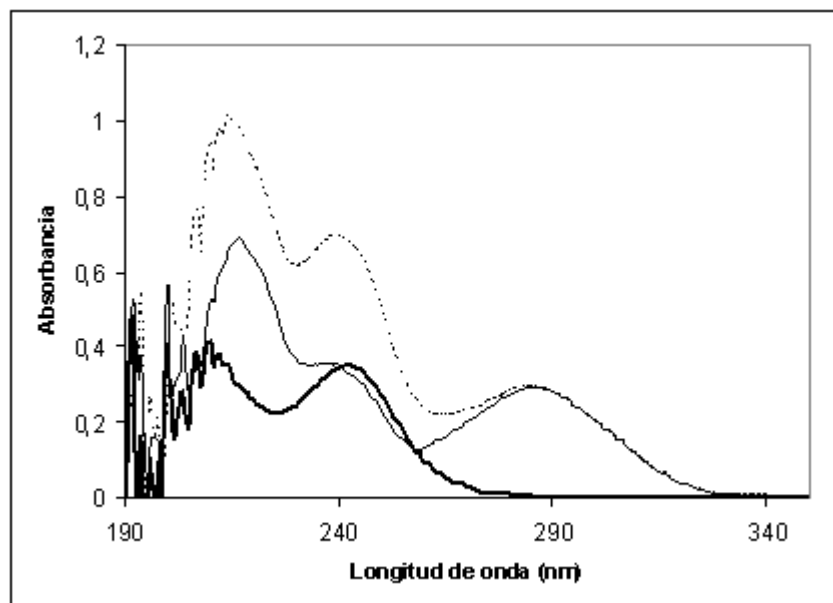


Fig. 2 Espectros de absorción en el UV de disoluciones etanólicas a pH básicos de 8 mg L⁻¹ de CBZ (—), 6 mg L⁻¹ de PB (---) y su mezcla (— · —)

Respecto a los espectros de primera derivada, éstos tienen más picos que el de absorción, pero también están más solapados (máximo 236 nm o mínimo a 250 nm). Existe una zona donde los perfiles

de ambos fármacos son diferentes (256-284 nm) y una zona (longitudes de ondas superiores a 290 nm) donde el espectro de la mezcla coincide con el de CBZ, puesto que PB no absorbe en dicho intervalo (figura 3).

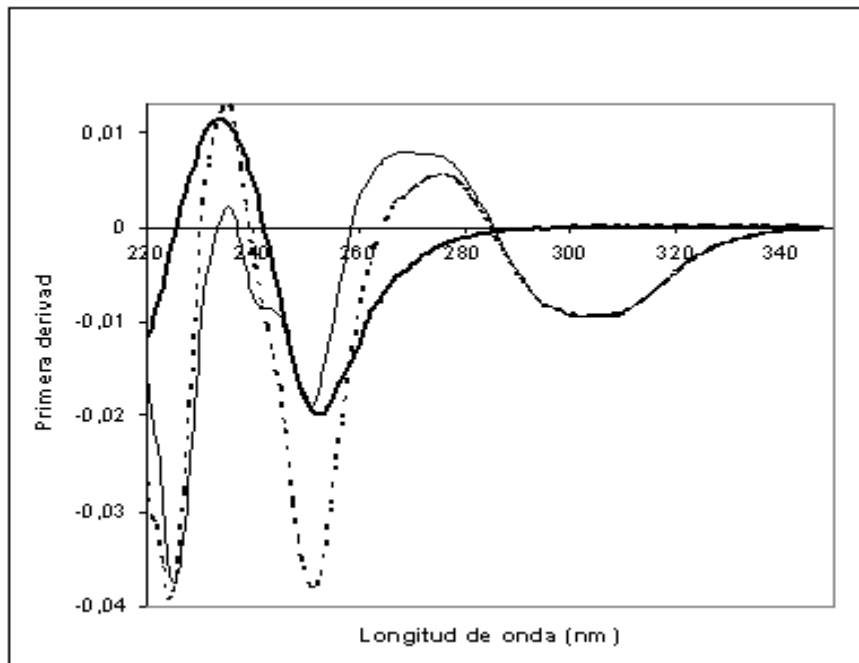


Fig. 3 Espectros de primera derivada en el UV de disoluciones etanólicas a pH básicos de 8 mg L⁻¹ de CBZ (—), 6 mg L⁻¹ de PB (—) y su mezcla (...).

El primer paso para la determinación simultánea de ambos fármacos, antes de aplicar el método de selección del mejor modelo (mejor intervalo y número de factores óptimo), consiste en la construcción de dos conjuntos de muestras: el de calibración, que permitirá realizar los modelos por PLS, y realizar la validación de los modelos obtenidos; y el conjunto de predicción, que será utilizado para evaluar la capacidad de predicción del modelo elegido como óptimo, cuando es aplicado a muestras no utilizadas en el proceso de calibración ni en el de selección del mejor modelo.

En el presente trabajo, la validación se realizó en todos los casos por validación cruzada completa, utilizando, por consiguiente, tantos segmentos como muestras que contiene el conjunto de calibración.

El conjunto de calibración está formado por mezclas binarias de CBZ y PB, siguiendo un diseño experimental factorial a tres niveles (3ⁿ, n = número de analitos), como se aprecia en la figura 4. De esta forma, los objetos o muestras del conjunto de calibración son suficientemente representativos de la población y de su variabi-

lidad. Los niveles alto y bajo de cada concentración se determinaron individualmente a partir del estudio del intervalo de linealidad de cada fármaco.

Si bien PLS puede corregir en determinados casos la falta de linealidad, aumentando el número de factores, debe de desestimarse esta posibilidad para no sobredimensionar el modelo. No obstante, al momento de calibrar, hay que tener en cuenta que se están utilizando mezclas, y la señal de las mismas no debe saturar el detector; los niveles altos de los analitos han de escogerse de forma que no se sature el detector. Sin embargo, en determinadas ocasiones es conveniente aumentar los valores de los niveles de los fármacos, aun a riesgo de saturar el detector con el objeto de obtener modelos que predigan relaciones mayores entre los analitos. En este caso, debe evitarse utilizar las zonas del espectro donde se sospeche que el detector esté saturado (falta de linealidad y aumento del ruido). Por otro lado, los valores de concentración utilizados para cada analito en el conjunto de predicción deben ser menores y mayores, res-

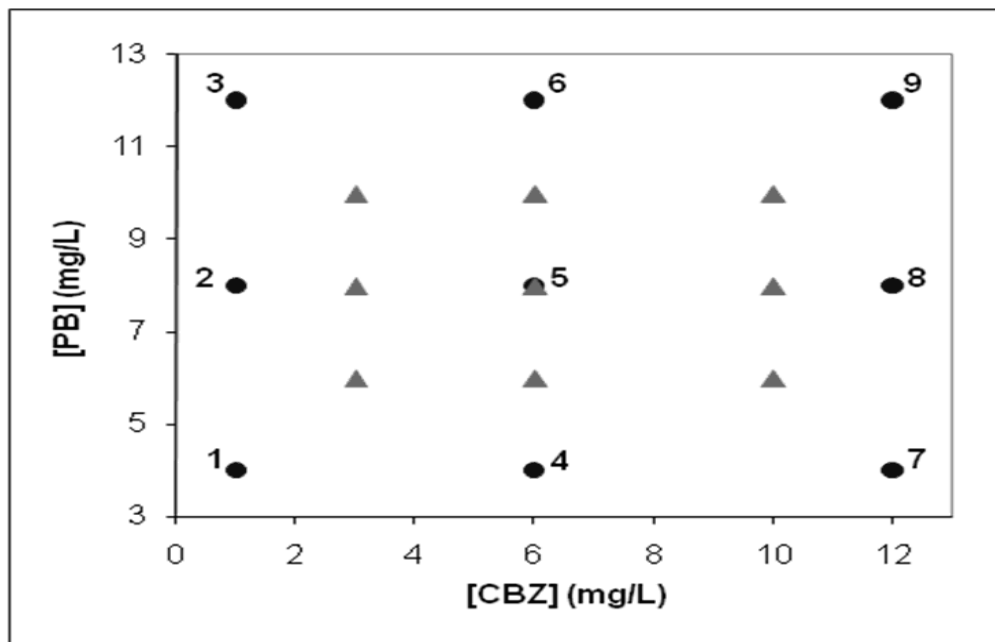


Fig. 4 Diseño del conjunto de calibración(●) y del conjunto de predicción (Δ).

pectivamente, que el máximo y el mínimo utilizados para el conjunto de calibración, puesto que no se puede predecir fuera del intervalo donde se ha realizado la calibración.

Antes de proceder a la construcción de los diferentes modelos por PLS1 (un modelo para cada analito), se realizó una primera calibración por PLS2 (regresión que permite la determinación simultánea de los dos analitos) para intentar estudiar el comportamiento de las diferentes variables. Para ello, se construyeron diferentes modelos centrandos los datos, y utilizando como método de validación la corrección según la influencia.

La representación gráfica de la varianza de los residuales vs influencia, y la distribución normal de los residuales, así como los propios datos anómalos dados por el programa y el valor de los coeficientes, nos permitieron eliminar las variables inferiores a 226 nm. Estas variables se corresponden con longitudes de onda donde absorbe el etanol (las disoluciones tienen un altísimo porcentaje de etanol, éste fue seleccionado como medio disolvente teniendo en cuenta la solubilidad de los fármacos estudiados, su transparencia en la mayor parte del espectro UV, las ventajas económicas por su bajo costo y su baja toxicidad) y un pequeño intervalo (pico máximo de los espectros) donde la absorbancia es, incluso, superior a 2,0. Utilizar estos valores de absorbancia nos permitió determinar simultáneamente los analitos en mezclas cuya relación de concentraciones sea de hasta 1:12,

utilizando zonas del espectro donde la señal es inferior al valor de saturación del detector.

Con el objeto de comparar, de forma objetiva, los resultados obtenidos, fue necesario disponer de algún parámetro que refleje la bondad de los mismos.

La bibliografía describe muchos de estos parámetros, pero en el presente trabajo utilizaremos tres: el RMSEP ofrecido por UNSCRAMBLER; el PRESS (suma de los cuadrados de los errores de predicción) que es uno de los más ampliamente utilizados en la bibliografía y, por último, el RSEP o media de los errores relativos, que es el estadístico más empleado para valorar una predicción.

Determinación de CBZ en mezclas binarias

Una vez realizados los ensayos preliminares, se construyeron diferentes modelos de PLS1 para la determinación de CBZ, centrandos los datos respecto al valor medio, y validando los diferentes modelos obtenidos por validación cruzada completa.

La tabla 1 recoge los resultados obtenidos en la determinación de CBZ y PB por PLS1, utilizando los mejores modelos encontrados tanto para los espectros de absorbancia, como para los de primera derivada. El mejor modelo encontrado cuando se utilizaron espectros de absorción resultó ser el

correspondiente al intervalo 290-320 nm, zona espectral donde el PB no absorbe, por lo que era previsible que se obtuvieran muy buenos resultados para la CBZ. En el modelo correspondiente a los espectros de absorción se observa, que la predicción de las muestras utilizadas para

construir el modelo proporciona errores relativos inferiores a 1,3 % cuando el nivel de concentración de CBZ es medio o alto, pero presentan errores elevados (superiores al 8,0 %), cuando las muestras tienen niveles bajo de CBZ.

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE CBZ EN MEZCLAS DE CBZ Y PB POR PLS1

Muestra	Añadido (mg L ⁻¹)		Absorbancia (290 – 320 nm)		Primera derivada (290 – 320 nm)		
	CBZ	PB	Encontrado ± s	Error relativo (%)	Encontrado ± s	Error relativo (%)	
Calibración	1	1,00	4,00	1,13 ± 0,12	-13,00	1,02 ± 0,03	-2,00
	2	1,00	8,00	0,92 ± 0,07	8,00	0,97 ± 0,03	3,00
	3	1,00	12,00	0,90 ± 0,10	10,00	0,99 ± 0,03	1,00
	4	6,00	4,00	5,95 ± 0,06	0,83	5,99 ± 0,03	0,17
	5	6,00	8,00	6,08 ± 0,12	-1,33	5,97 ± 0,05	0,50
	6	6,00	12,00	6,08 ± 0,04	-1,33	6,08 ± 0,04	-1,33
	7	12,00	4,00	11,96 ± 0,06	0,33	11,98 ± 0,04	0,17
	8	12,00	8,00	12,04 ± 0,06	-0,33	12,02 ± 0,03	-0,17
	9	12,00	12,00	11,95 ± 0,06	0,42	11,98 ± 0,04	0,17
Predicción	10	3,00	6,00	3,24 ± 0,16	8,00	3,08 ± 0,03	-2,67
	11	3,00	8,00	3,36 ± 0,26	-12,00	3,10 ± 0,02	-3,33
	12	3,00	10,00	3,21 ± 0,19	-7,00	3,03 ± 0,03	-1,00
	13	6,00	6,00	6,11 ± 0,13	-1,83	5,98 ± 0,03	0,33
	14	6,00	8,00	6,23 ± 0,20	-3,83	6,03 ± 0,02	-0,50
	15	6,00	10,00	6,16 ± 0,15	-2,67	6,01 ± 0,02	-0,17
	16	10,00	6,00	10,27 ± 0,24	-2,70	10,03 ± 0,03	-0,30
	17	10,00	8,00	10,33 ± 0,40	-3,30	9,94 ± 0,04	0,60
	18	10,00	10,00	10,45 ± 0,39	-4,50	10,07 ± 0,03	-0,70
RMSEP			0,17			0,14	
PRESS-cal			0,233			0,10	
PRESS-val			0,840			0,17	
RSEC			3,95			0,94	
RSEP			5,09			1,07	

Por otro lado, la misma tabla muestra los resultados obtenidos para un conjunto de muestras no utilizadas en la calibración, el conjunto de predicción, que nos permitirá evaluar mejor la capacidad de predicción del modelo seleccionado. Se observa, que los errores relativos obtenidos son inferiores al 4,5 % para los niveles de concentración medio y alto, pero son elevados para el nivel bajo (> 8 %); por tanto, cabría pensar que el valor del nivel bajo no es adecuado para calibrar pues produce errores elevados en el proceso de predicción. Sin embargo, si en lugar de utilizar los espectros de absorción se utilizan los espectros derivados, no se llega a la misma conclusión.

Para obtener los espectros derivados, se realizó la derivada de cada espectro de absorción aplicando el método de Savitzky-Golay sobre un polinomio de segundo grado. Si se observa la tabla 1, que también contiene los resultados obtenidos para la calibración y predicción de CBZ en las mezclas a partir de los espectros derivados, se puede ver que los errores relativos con estos espectros derivados disminuyen considerablemente respecto a los obtenidos cuando la calibración se realiza utilizando los espectros de absorción. Es de destacar, que la predicción del nivel bajo, tanto en la matriz de calibración, como en la de predicción, se resuelve en todos los casos con

errores inferiores al 3,3 %. Por tanto, la utilización de espectros derivados permite la determinación de CBZ en el intervalo de concentración utilizado, con resultados satisfactorios. En este sentido, todos los parámetros de los modelos obtenidos cuando se utilizan los espectros derivados son mejores. Así, el PRESS de calibración y predicción se reduce dos y cinco veces, respectivamente, y el RSEC y el RSEP cuatro veces en ambos casos.

En todo momento sólo fue necesario utilizar un factor para explicar satisfactoriamente el modelo; aplicando el test de Haaland y Thomas /16/ se confirma que éste es el número óptimo de factores. No obstante, parece casi obvio que un único factor explique satisfactoriamente el modelo, pues en esta zona del espectro sólo absorbe la CBZ; por tanto, utilizar un número mayor de factores llevaría a sobredimensionar el modelo con los riesgos que ello conlleva.

En los intervalos estudiados que incluían longitudes de onda donde el PB sí absorbe, era necesario utilizar dos factores para predecir satisfactoriamente;

no obstante, en todos los casos se obtuvieron peores resultados que en el intervalo 290-320 nm.

Usando un solo factor, el modelo explica el 99,99 % de la varianza inicial de la matriz de concentraciones, lo cual es plenamente satisfactorio.

Determinación de PB en mezclas binarias

La búsqueda del mejor modelo para la determinación de PB en presencia de CBZ, se realizó de la misma manera que se describe en el apartado anterior para la CBZ.

Se estudiaron diferentes modelos en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 226 y 276 nm, zona del espectro en la que absorbe el PB y está libre de ruido (zona de absorción del etanol y de saturación del detector). Al igual que con la CBZ, todos los modelos fueron centrados respecto a la media, y validados por validación cruzada completa, en todos los casos se calibró usando PLS1. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para los mejores modelos obtenidos empleando tanto espectros de absorbancia como derivados.

TABLA 2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE PB EN MEZCLAS DE CBZ Y PB POR PLS1

Muestra	Añadido (mg L ⁻¹)		Absorbancia (226 - 276 nm)		Primera derivada (260 - 286 nm)		
	CBZ	PB	Encontrado ± s	Error relativo (%)	Encontrado ± s	Error relativo (%)	
Calibración	1	1,00	4,00	3,95 ± 0,12	1,38	3,95 ± 0,07	1,15
	2	1,00	8,00	8,04 ± 0,07	-0,48	8,01 ± 0,06	-0,09
	3	1,00	12,00	12,02 ± 0,08	-0,20	12,00 ± 0,07	0,03
	4	6,00	4,00	3,95 ± 0,08	1,25	3,95 ± 0,06	1,35
	5	6,00	8,00	7,95 ± 0,14	0,58	8,06 ± 0,10	-0,74
	6	6,00	12,00	12,08 ± 0,07	-0,69	12,07 ± 0,07	-0,60
	7	12,00	4,00	4,11 ± 0,07	-2,68	4,06 ± 0,08	-1,57
	8	12,00	8,00	8,02 ± 0,07	-0,20	8,02 ± 0,07	-0,20
	9	12,00	12,00	11,88 ± 0,07	0,97	11,89 ± 0,06	0,95
Predicción	10	3,00	6,00	6,07 ± 0,16	-1,12	6,13 ± 0,06	-2,08
	11	3,00	8,00	8,11 ± 0,24	-1,36	8,23 ± 0,09	-2,81
	12	3,00	10,00	10,03 ± 0,20	-0,27	10,10 ± 0,06	-0,98
	13	6,00	6,00	6,08 ± 0,15	-1,40	6,16 ± 0,09	-2,63
	14	6,00	8,00	7,91 ± 0,21	1,09	7,99 ± 0,08	0,19
	15	6,00	10,00	10,02 ± 0,21	-0,22	10,06 ± 0,07	-0,64
	16	10,00	6,00	5,99 ± 0,21	0,10	6,08 ± 0,09	-1,25
	17	10,00	8,00	7,86 ± 0,38	1,70	7,97 ± 0,11	0,35
	18	10,00	10,00	9,98 ± 0,38	0,19	10,10 ± 0,08	-1,04
RMSEP			0,12			0,10	
PRESS-cal			0,20			0,18	
PRESS-val			0,23			0,35	
RSEC			0,93			0,74	
RSEP			0,83			1,33	

El mejor modelo obtenido cuando se utilizaron espectros de absorbancia fue el correspondiente con el intervalo 226-276 nm, es decir, el intervalo completo. Si bien, observando la forma de los espectros cabría pensar que los modelos que utilizan los intervalos similares al 258-276 nm, podrían ser los mejores, ya que el perfil de los espectros de ambos analitos es muy diferente en este intervalo (mientras que la señal de la CBZ aumenta al aumentar la longitud de onda, para el PB la señal disminuye al aumentar la longitud de onda), se obtiene un RMSEP para el intervalo 258-276 nm de 0,183, mientras que para el intervalo 226-276 nm fue de 0,116 (significativamente diferente).

En general, los resultados obtenidos para el intervalo 226-276 son muy buenos (para el conjunto de calibración los errores relativos son inferiores al 1,5 %, excepto para la muestra 7 de calibración que vale 2,68 %. En el caso de la muestra 7 debe tenerse en cuenta, que esta muestra tiene la mayor ratio CBZ/PB y estando el PB en defecto, por lo que es lógico que le corresponda el mayor error de todas las muestras. En el caso de la predicción, los errores relativos obtenidos con este modelo también son muy buenos, siendo en todos los casos inferiores al 1,4 %.

En la tabla 2 en los resultados obtenidos cuando se utiliza el intervalo 260-286 nm en los espectros de primera derivada, muestran que el parámetro usado para optimizar el modelo RMSEP, no difiere significativamente entre

ambos modelos: 0,12 cuando se usan espectros de absorbancia, y 0,10 cuando se usan los derivados. Lo mismo ocurre para el PRESS de la calibración: 0,20 y 0,18 para espectros de absorbancia y derivados, respectivamente.

Diferencias sustanciales se observan al comparar los parámetros relacionados con las predicciones: los valores obtenidos para los espectros de absorción son muy inferiores a los obtenidos para los espectros derivados. Esta situación no es frecuente, normalmente el modelo que mejor predice las muestras de calibración es también el modelo que mejor predice muestras que no han sido utilizadas para calibrar, con la excepción de modelos sobredimensionados, en los que se utilizan más factores de los que realmente son necesarios.

En el caso que ocupa esta investigación, tanto cuando se usan los espectros derivados, como los de absorbancia, el número óptimo de factores fue dos y la inclusión de un tercer factor según el test de Haaland y Thomas, no evidenciaba la mejora del modelo. Esto, unido a la posibilidad de sobredimensionar el modelo, hizo que se utilizaran sólo dos factores.

Para reforzar esta elección, se puede añadir que la varianza explicada por el modelo, a medidas que se incluye un nuevo factor (tabla 3), no sólo no mejora a partir de dos factores, sino que empeora. Así, cuando se seleccionan sólo dos factores la varianza explicada por el modelo fue del 99,91 y 99,78 % de la varianza inicial de los datos para los modelos correspondientes a los espectros de absorción y de derivada, respectivamente, que pueden ser considerados satisfactorios.

TABLA 3. VARIANZA EXPLICADA POR LOS MODELOS SELECCIONADOS EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE FACTORES

	Absorbancia (226 - 276 nm)	Primera derivada (260 - 286 nm)
Inicial	0	0
Un factor	0,26	33,33
Dos factores	99,91	99,78
Tres factores	99,88	99,78
Cuatro factores	99,79	99,71

Puesto que la diferencia entre usar espectros derivados o de absorción no afecta significativamente a los modelos a la hora de predecir, se eligió como óptimo el modelo que utiliza los espectros de absorbancia entre 226 y 276 para predecir concentraciones de PB en presencia de CBZ.

Por otro lado, el estudio detallado de los scores (figura 5) llevaría a concluir que el primer factor del modelo está relacionado con la señal total. Así, las

muestras se sitúan horizontalmente (factor 1) según la concentración total de CBZ y PB que contengan las muestras; por ello la muestra 9 (nivel alto de CBZ y de PB) es la que posee un score 1 mayor y la muestra 1, la que lo tiene menor (nivel bajo de CBZ y de PB). En esta figura se puede observar que todas las muestras están agrupadas en función de la concentración de cada uno de los analitos.

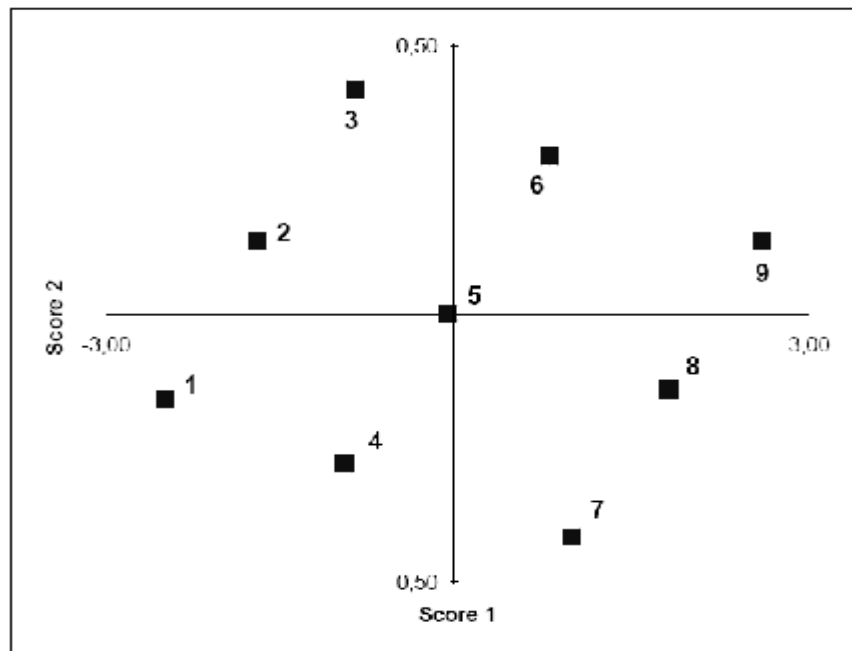


Fig. 5 Representación del Score 1 vs Score 2 para el modelo de PLS1 aplicado a la determinación de PB entre 226 – 276 nm en mezclas de PB + CBZ.

La relación del factor 1 con la concentración total está, a su vez, avalada por el X-loading obtenido para el factor 1 (figura 6), que se corresponde con la suma de los espectros individuales de los analitos en estudio. Por otro lado, la representación gráfica de los coeficientes de regresión del modelo obtenido para un

factor se recoge en la figura 6, donde se puede observar que la señal que se obtiene se corresponde con el espectro del PB en el intervalo del espectro estudiado. Este hecho refrenda el propio principio en el que se basa el modelo de regresión de PLS: buscar la dirección en la que la varianza sea máxima y esté relacionada con la concentración del analito.

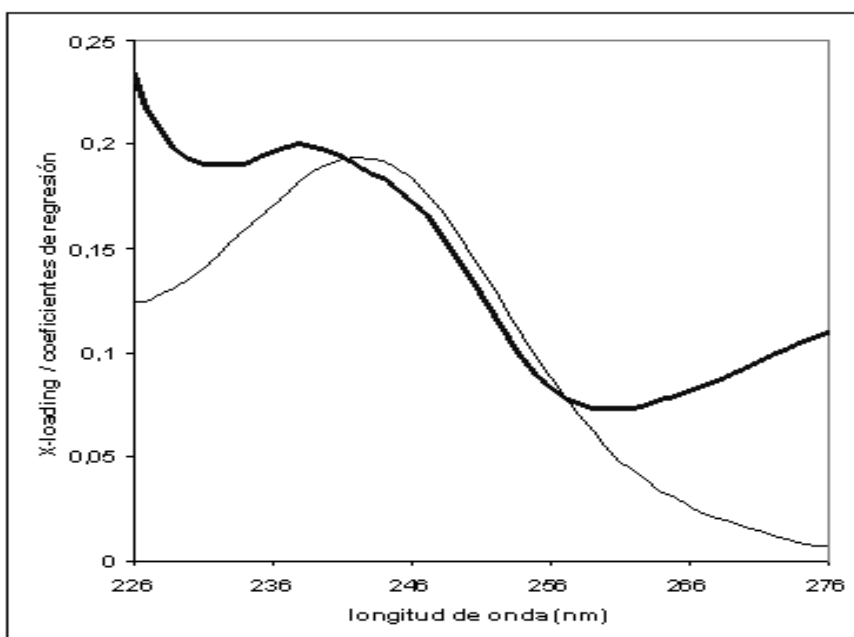


Fig. 6 Representación gráfica de los x-loading (—) y los coeficientes de regresión (---) para la determinación de PB por PLS1 entre 226-276 nm en los espectros de absorción.

Retomando la figura 5 en ella se puede ver, que las muestras se sitúan verticalmente (score 2) según la relación entre las concentraciones de los analitos; en este sentido, las muestras 3 y 7 son las que tienen valores del score 2 más diferentes, pues se corresponden con niveles de concentración CBZ-PB de bajo-alto y alto-bajo, respectivamente. Por ello, las muestras con igual nivel (la 1, la 5 y la 9: bajo-bajo, medio-medio y alto-alto, respectivamente) se sitúan próximas a valores cero del score 2. El hecho de que las agrupaciones de la figura 5 no estén totalmente horizontales o verticales, viene determinado porque las absorptividades a las diferentes longitudes de ondas no son de igual magnitud para los diferentes analitos, ni tampoco lo son los valores de concentración para cada nivel. Así, por ejemplo, la muestra 7 tiene un mayor valor de scores 1 que la 5, y ésta, a su vez es mayor que la de la 3, pues la señal del espectro de la muestra 7 es mayor que la del 5, y ésta que la del 3.

La combinación de la espectrofotometría UV con regresión por mínimos cuadrados parciales, permitió la determinación analítica exacta y precisa de la carbamazepina y el fenobarbital en mezclas binarias sintéticas. El modelo que permitió obtener los mejores resultados en la predicción de CBZ en presencia de PB, fue el construido en la región espectral de 290-320 nm, con un factor, obteniéndose un error relativo medio de predicción de 1,07 % cuando se utilizaron espectros de primera derivada. El modelo PLS obtenido en la región del espectro de absorción de 226-276 nm con dos factores garantizó la mejor calidad en la predicción del PB en mezclas sintéticas con la CBZ, obteniéndose un error relativo medio de predicción de 0,83 %.



Bibliografía

1. J.A. Armijo Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos. En: Farmacología Humana (J. Flórez Dr.), Third Edition, Masson S.A., España, 493-97 (1997).
2. A. Goodman Gilman, J.G. Hardman, L.E. Limbrid. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Edition, Mc Graw-Hill, New York, Chapter 21, 528-30 (2001).
3. T.V. Jiménez, A.V. Casabó, C.V. Sancho Manual de procedimientos de farmacocinética clínica, Thrid Edition. AFAHPE, España, VI.22-VI.23 (1998).
4. Clarke's isolation and identification of drug in pharmaceutical, body fluids, and post-mortem material, Second Edition, The Pharmaceutical Press, London, 884 (1986).
5. W.R. Kulpmann, M. Oellerich "Monitoring of therapeutic serum concentrations of antiepileptic drugs by a newly developed gas chromatographic procedure and enzyme immunoassay (EMIT): a comparative study" J. Clin. Chem. Clin. Biochem 19/5: 249-58 (1981).
6. W.R. Kulpmann "A gas-chromatographic method for the determination of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin and primidone in the same extract of serum" J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18/4: 227-32 (1980).
7. S.J. Rainbow, C.M. Dawson, T.R. Tickner "Direct serum injection high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin" J. Chromatogr. 527/2: 389-96 (1990).
8. J. Martens, P. Banditt "Validation of the analysis of CBZ and its 10,11-epóxido metabolite by HPLC from plasma. Comparison with GC and the enzyme-multiplied immunoassay technique" J. Chromatogr. Biomed Appl. 131/1: 169-73 (1993).
9. R. Mandrioli, F. Albani, G. Casamenti, et al. "Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients" J. Chromatogr. B 762: 109-16 (2001).
10. A. Martinavarró, M.E. Capella, M. Gil, et al. "Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples" Clin. Chem. 48/10: 1696-702 (2002).
11. P. Kishore, K. Rajnarayana, M.S. Reddy, et al. "Validated high performance liquid chromatographic methods for simultaneous determination of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine in human serum" Arzneimittelforschung, 53/11: 763-68 (2003).
12. M.S. Cámara, C. Mastrandea, H.C. Goicochea "Chemometrics-assisted simple UV-spectroscopic determination of carbamazepine in human serum and comparison with references methods" J. Biochem. Biophys. Methods 64: 153-66 (2005).
13. G.M. Escandar, D. González, A. Espinosa, et al. "Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on nylon support and fluorescence detection" Anal. Chim. Acta 506: 161-70 (2004).
14. Z. Rezaei, B. Hemmateenejad, S. Khabnadideh, et al. "Simultaneous spectrophotometric determination of carbamazepine and phenytoin in serum by PLS regression and comparison with HPLC" Talanta 65: 21-8 (2005).
15. Unscrambler 7.01 Computer-Aided Modelling A/S, Trondheim, Norway (1998).
16. D.M. Haaland, E.V. Thomas "Partial Least-Squares Methods for Spectral Analysis I. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information" Anal. Chem. 60:1193-202 (1988).