



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Farmacia

Métodos de Análisis Químicos en las Farmacopeas

Manuel J. Haro Hernanz



FACULTAD DE FARMACIA
Grado en farmacia
Trabajo Fin de Grado

Métodos de Análisis Químicos en las Farmacopeas

Manuel J. Haro Hernanz

Tutora: M^a José Jara Palacios
Departamento de Química analítica
Tipología del proyecto: Revisión bibliográfica
Sevilla, 13 junio de 2019

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Definición de Farmacopea	6
1.2 Función	6
1.3 Real Farmacopea Española	7
1.3.1 <i>Evolución histórica</i>	7
1.3.2 <i>Estructura</i>	9
1.3.3 <i>Métodos analíticos</i>	11
2. OBJETIVOS	13
3. METODOLOGÍA	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1 Técnicas analíticas	15
4.1.1. <i>Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible</i>	15
4.1.2. <i>Cromatografía de Líquidos</i>	16
4.2. Principios activos	18
4.2.1 <i>Diuréticos</i>	19
4.2.2 <i>Antibacterianos</i>	20
4.3. Aplicación de la espectrofotometría en el ultravioleta y visible	22
4.3.1. <i>Furosemida</i>	23
4.3.2. <i>Hidroclorotiazida</i>	23
4.3.3. <i>Indapamida</i>	24
4.4. Aplicación de la cromatografía de líquidos	26
4.4.1. <i>Antibacterianos</i>	26
4.4.1.1. Azitromicina	26
4.4.1.2. Fosfato de clindamicina	27
4.4.1.3. Eritromicina	28
4.4.1.4. Tetraciclina	29
4.4.1.5. Hidrocloruro de vancomicina	31
4.4.2. <i>Diuréticos</i>	32
4.4.2.1. Furosemida	32
4.4.2.2. Hidroclorotiazida	32
4.4.2.3. Indapamida	33
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXO 1	40

RESUMEN

La Real Farmacopea Española es el código que establece las normas de calidad que deben cumplir los principios activos y excipientes que componen los medicamentos de uso humano y veterinario. A través de las farmacopeas se promueve el buen estado de la salud pública, ya que tratan todo lo relacionado con la elaboración, calidad, distribución y promoción de los medicamentos.

La Real Farmacopea Española se estructura en 15 apartados. El subapartado 3, *métodos analíticos*, incluye monografías validadas sobre aparatos, métodos físicos y fisicoquímicos, identificación, ensayos límite, valoraciones y ensayos biológicos, entre otros. El apartado correspondiente a los métodos físicos y fisicoquímicos incluye monografías sobre los diferentes métodos analíticos que se usan para la validación de principios activos.

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado, se han escogido dos métodos analíticos, cromatografía de líquidos y espectrofotometría de absorción en ultravioleta y visible (UV-vis), y se ha revisado su aplicación en el análisis de dos grupos terapéuticos, diuréticos y antibacterianos.

Las técnicas espectroscópicas se aplican a la determinación de diuréticos. La disolución de los preparados farmacéuticos seguido de la medida de absorbancia en la zona del espectro UV-vis, permite la identificación de la furosemida, la hidroclorotiazida y la indapamida.

En el caso de la cromatografía de líquidos aplicada a la determinación de antibacterianos y diuréticos, el procedimiento de cromatografía en fase inversa es el más utilizado. Los métodos analíticos propuestos para la determinación de azitromicina, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina y diuréticos incluyen diferentes condiciones cromatográficas, como son la composición y el flujo de la fase móvil, temperatura de columna, modo de elución y la longitud de onda de medida.

Palabras clave: Real Farmacopea Española, liquid chromatography, absorption spectroscopy, antibacterials y diuretics.

ABSTRACT

The Spanish Pharmacopoeia is a document in which establishes the quality that must be met by the active principles and excipients that make up the medicines for human and veterinary use. Through the pharmacopoeias of each country, the good state of public health is promoted by treating everything related to the preparation, quality, distribution and promotion of medicines.

The Royal Spanish Pharmacopoeia is divided into 15 sections. Subsection three, analytical methods, includes validated monographs on apparatus, physical and physicochemical methods, identification, limit assays, valuations and biological assays, among others. The monograph corresponding to the physical and physicochemical methods in turn includes monographs on the different analytical methods used for the validation of active principles.

To carry out this Final Degree Project, two analytical methods have been chosen, liquid chromatography and ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (UV-vis), and its application has been reviewed in the analysis of two therapeutic groups, diuretics and antibacterials.

Spectroscopic techniques are applied to the determination of diuretics. The dissolution of pharmaceutical preparations in basic medium or in organic solvents or complexation reaction, followed by measurement in the area of the UV-vis spectrum, allows the identification of furosemide, hydrochlorothiazide and indapamide.

In the case of liquid chromatography applied to the determination of antibacterials and diuretics, the reverse-phase chromatography procedure is the most widely applied. The proposed analytical methods for the determination of azythromycin, clindamycin, erythromycin, tetracycline, vancomycin and diuretics propose different experimental variables, such as the composition and flow of the mobile phase, column temperature, elution mode and the wavelength of the detector.

Key words: Royal Spanish Pharmacopoeia, liquid chromatography, absorption spectroscopy, antibacterials y diuretics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de Farmacopea

La palabra farmacopea proviene del griego (*φαρμακοποιία*) y literalmente significa «preparación de medicamentos». Según la Real Academia Española (RAE), una farmacopea se define como *“libro en que se describen las sustancias medicinales que se usan más comúnmente, y el modo de prepararlas y combinarlas”* (RAE, 2019).

La Real Farmacopea Española es el código que recoge las normas específicas para asegurar la calidad que deben cumplir los principios activos y excipientes que forman parte de la composición de los medicamentos tanto de uso humano como de uso veterinario, así como los métodos analíticos para su control (BOE-A-2015-467).

Una definición más extensa y completa, aunque no oficial, es: *“Una farmacopea es una colección de normas oficiales para principios activos y medicamentos. Incluye instrucciones para las pruebas de control de calidad que se deben realizar con los medicamentos y las materias primas que se usan en producción. Es una referencia vital para las personas y organizaciones que participan en la investigación, el desarrollo y el control de calidad de los medicamentos”* (EUPATI, 2019).

1.2. Función

La función de las farmacopeas, según la Academia Europea de Pacientes (EUPATI), inicialmente era garantizar la buena calidad de los medicamentos. Así, se incluían fórmulas individuales para cada medicamento, indicando la composición, el método de preparación y su precio.

En la actualidad, la función de la farmacopea continúa siendo garantizar la buena calidad de los medicamentos. Uno de los principales cambios es que el método de preparación es indicado principalmente para nivel industrial.

Las farmacopeas actuales, principalmente las europeas, incluyen información sobre normas de calidad para los principios activos, normas generales para la formulación, normas generales para la fabricación de medicamentos, monografías sobre productos acabados y la terminología (EUPATI, 2019).

1.3. Real Farmacopea Española

La Real Farmacopea Española es el compendio legal de calidad de medicamentos. Como establece la Ley 29/2006, de 26 de julio, la Real Farmacopea Española se actualiza y publica periódicamente a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), que publica en el Boletín Oficial del Estado la fecha de la puesta en vigor de los sucesivos volúmenes de la Real Farmacopea Española. La última actualización es la quinta edición publicada el 21 de enero de 2015 (BOE-A-2015-467).

1.3.1 Evolución histórica

La división de la medicina y la farmacia y de las funciones de sus profesionales es lo que hizo surgir la farmacopea. Esta división de profesionales originó la elaboración de las farmacopeas o códigos oficiales para que se armonizara el trabajo del profesional del medicamento (Castillo, 2014). En 1498 se imprimió la primera farmacopea en Florencia (Italia), que se denominó *“Nuovo receptario composto dal famosissimo Chollegio degli eximii Dottori della Arte et Medicina della ínclita ciptá di Firenze”*, más comúnmente conocida como *“Recetario Florentino”*, cuyo objetivo principal era disolver las grandes diferencias que había en Florencia respecto a la forma de preparar los diferentes medicamentos.

Los estudios realizados por De Jaime (2002) consideran que la primera farmacopea española fue la denominada *“Concordia Apothecariurum Barchinonensium”* (Figura 1), que se editó en Barcelona en el año 1511. Posteriormente, en 1935, se publicó una segunda edición con el título de *“Concordia Pharmacopolarum Barchinonensium”*. También, en 1935, se publicaron en Zaragoza dos farmacopeas, bajo la denominación de *“Concordia Aromatariorum civitatis Cesarauguste*. Al mismo tiempo, surgieron en Europa otras farmacopeas, entre las que destacan la de Nüremberg, cuyo nombre es *“Dispensatorium Pharmacopolarum”*, de 1546, la de Mantua (1559), Colonia (1565), Viena (1570), Montpellier (1579), Roma (1583) y Ferrara (1595).



Figura 1. La “*Concordia Apothecariorum Barchinonensium*” primera farmacopea editada en la península ibérica en el año 1511.

A partir de estas farmacopeas, en España han existido un total de 16 Farmacopeas (Tabla 1). En las ediciones sucesivas se incluyen los avances en la incorporación de nuevos principios activos y la mejora y optimización de los métodos de preparación, entre otros. Todas las ediciones se publican en castellano, lengua oficial del Estado español. Las dos primeras farmacopeas se denominaron matritenses, palabra que proviene del latín “*matritum*”, relativo a Madrid. Las cuatro siguientes farmacopeas desde 1794 hasta 1817 se denominaron hispanas y las cinco siguientes desde la publicada en 1865 a la de 1954 se denominaron Farmacopeas Españolas. En 1997 se publicó la primera Real Farmacopea Española y le sucedieron cuatro ediciones hasta la vigente publicada en 2014. Con la incorporación de España en la Unión Europea, la farmacopea española tiene que contener las principales monografías de la correspondiente edición de la farmacopea europea, por ejemplo, en la 5ª edición de la Real Farmacopea Española se recopila la información descrita en la 7ª edición de la Farmacopea Europea (Castillo, 2014).

Tabla 1. Farmacopeas españolas desde 1739.

Nº	Año de publicación	Nombre de la farmacopea
1ª	1739	<i>Pharmacopea Matritensis. Nunc primum elaborata. Matriti</i>
2ª	1762	<i>Pharmacopea Matritensis. Editio secunda. Matriti</i>
3ª	1794	<i>Pharmacopea Hispana. Matriti</i>
4ª	1797	<i>Pharmacopea Hispana. Editio secunda. Matriti</i>
5ª	1803	<i>Pharmacopea Hispana. Editio tertia. Matriti</i>
6ª	1817	<i>Pharmacopea Hispana. Quarta editio. Matriti</i>
7ª	1865	<i>Farmacopea Española. Quinta edición. Madrid</i>
8ª	1884	<i>Farmacopea Española. Sexta edición. Madrid</i>
9ª	1905	<i>Farmacopea Española. Séptima edición. Madrid</i>
10ª	1930	<i>Farmacopea Española. Octava edición. Madrid</i>
11ª	1954	<i>Farmacopea Española. Novena edición. Madrid</i>
12ª	1997	<i>Real Farmacopea Española. Primera Edición</i>
13ª	2002	<i>Real Farmacopea Española. Segunda Edición</i>
14ª	2005	<i>Real Farmacopea Española. Tercera Edición</i>
15ª	2010	<i>Real Farmacopea Española. Cuarta Edición</i>
16ª	2014	<i>Real Farmacopea Española. Quinta Edición</i>

1.3.2. Estructura

La Real Farmacopea Española se estructura en 15 apartados diferentes, los cuales se enumeran y describen brevemente a continuación:

1. Introducción: en primer lugar, se encuentra un apartado correspondiente a la presentación de la Real Farmacopea Española por parte de la directora de la AEMPS. Incluye también otros apartados con información sobre la Farmacopea Europea, la composición del Comité de la Farmacopea y el Formulario Nacional, grupos de expertos y Delegación Española en la Farmacopea Europea, y algunas instrucciones de uso de la edición española.
2. Normas generales: en este apartado hay información básica sobre la edición, definiciones, generalidades del material usado, forma de expresar diferentes parámetros, abreviaturas y símbolos, y unidades del Sistema Internacional usadas.
3. Métodos analíticos: este apartado se divide en 9 subapartados, con monografías validadas en colaboración con la AEMPS sobre aparatos, métodos físicos y

fisicoquímicos, identificación, ensayos límite, valoraciones, ensayos biológicos, valoraciones biológicas, métodos de farmacognosia y métodos de tecnología farmacéutica. Este contenido se analiza con detalle en el apartado 1.3.3. de este Trabajo Fin de Grado.

4. Materiales y envases: incluye monografías de los diferentes materiales, como por ejemplo los materiales a base de policloruro de vinilo plastificado para envases destinados a contener sangre humana y hemoderivados, y envases de vidrio para uso farmacéutico.
5. Reactivos: incluye monografías sobre los reactivos y disoluciones utilizadas, como las disoluciones tampón o reguladoras de fosfato a pH 2,0 preparada a partir de cloruro potásico y ácido clorhídrico.
6. Textos generales: este apartado se divide en 20 subapartados que incluyen monografías, con instrucciones sobre preparación y aplicación de algunas técnicas, entre las que se encuentran el polimorfismo, la cristalinidad, los patrones de referencia y la valoración de interferones, entre otras.
7. Monografías generales: incluye monografías sobre diversos productos y preparaciones, como aceites esenciales, drogas vegetales, preparaciones instantáneas para tisanas, productos alergénicos, productos de fermentación, etc.
8. Formas farmacéuticas: en este apartado están incluidas monografías sobre las diferentes formas farmacéuticas, como son comprimidos, polvo para uso oral, preparaciones bucales y nasales, entre otros.
9. Vacunas: incluye monografías de las diferentes vacunas. Se divide en dos apartados, el primero referente a las vacunas de uso humano, como las vacunas antitifoideas y contra el cólera, y el segundo a las vacunas de uso veterinario, como la vacuna contra la rabia.
10. Inmunosueros: incluye monografías de los inmunosueros. Se dividen en inmunosueros para uso humano, como la antitoxina diftérica o la antitoxina gangrenosa polivalente, y para uso veterinario, como la antitoxina tetánica.
11. Preparaciones radiofarmacéuticas: incluye monografías de las diferentes preparaciones, entre las que se pueden encontrar la solución de oxinato de indio (^{111}In) o la solución inyectable de sodio iodohipurato (^{123}I)

12. Hilos de sutura: las monografías que se incluyen en este apartado se dividen en uso humano, por ejemplo, el catgut estéril que está constituido por hilos de sutura preparados a partir de colágeno procedente de las membranas intestinales de mamíferos, y en uso veterinario, como los hilos de sutura en carrete no reabsorbibles y estériles.
13. Preparaciones homeopáticas: incluye monografías acerca de los productos de partida y el modo de preparación, así como de los ensayos para su validación, como es el caso del uso del azafrán, ajo e hierro en este tipo de preparaciones.
14. Drogas vegetales: incluye 43 monografías de drogas vegetales validadas, entre las que se encuentran, por ejemplo, la citronela, el jengibre y el orégano.
15. Monografías: en este último apartado hay monografías acerca de todos los principios activos validados e incluidos en la Farmacopea clasificados en orden alfabético.

1.3.3. Métodos analíticos

Un método analítico es la secuencia de operaciones técnicas específicas para llevar a cabo un determinado análisis químico, presentadas de forma sistémica en el orden en que deben ser realizadas (Cuadros et al., 2013).

La Real Farmacopea Española en el apartado de métodos analíticos incluye 9 subapartados que son:

1. Aparatos: incluye monografías con la descripción y uso de los diferentes aparatos, como son cuentagotas, tabla comparativa de la porosidad de los filtros de vidrio sinterizado, lámparas de radiación ultravioleta para análisis, tamices, tubos para ensayos comparativos y tubos detectores de gases.
2. Métodos físicos y fisicoquímicos: incluye 65 monografías sobre los diferentes métodos analíticos que se usan para la validación de principios activos. La lista de los métodos analíticos físicos y fisicoquímicos recogidos en la Real Farmacopea Española se encuentra en el Anexo 1.
3. Identificación: incluyen monografías sobre las diferentes técnicas para la identificación de principios activos, como la identificación por el olor o por reacciones químicas coloreadas de identificación de iones y de grupos funcionales.

4. Ensayos límite: describe la forma de realizar los ensayos especificando los reactivos, la instrumentación y el procedimiento a seguir. Así, el ensayo de cloruros se lleva a cabo con nitrato de plata en presencia de ácido nítrico y se observa la opalescencia de la disolución después de la reacción, o el ensayo para determinar cuantitativamente la suma de colesterol libre y esterificado en productos de aceite de pescado por cromatografía de gases o la determinación de metales pesados (cadmio, cobre, hierro, plomo, níquel, zinc, arsénico y mercurio) en drogas vegetales y en aceites grasos por espectroscopia de absorción atómica previa mineralización de la muestra en horno microondas.
5. Valoraciones: en este apartado se describe la forma de llevar a cabo los métodos analíticos basados en las volumetrías como, por ejemplo, la determinación del índice de acidez por volumetría ácido-base empleando hidróxido de sodio como reactivo y fenolftaleína como indicador químico.
6. Ensayos biológicos: son experimentos científicos basados en la investigación de los efectos de una sustancia en un órgano aislado o en un organismo vivo. En este apartado la farmacopea trata, entre otros aspectos, como verificar la esterilidad en los preparados farmacéuticos.
7. Valoraciones biológicas: se describen los tipos de ensayos para determinar algunas reacciones biológicas, como los métodos inmunoquímicos, que se basan en determinar la unión selectiva, reversible y no covalente entre antígenos y anticuerpos, para detectar o cuantificar la presencia de antígenos o anticuerpos.
8. Métodos de farmacognosia: se describen los ensayos a realizar en las drogas y en sustancias medicamentosas de origen natural, como por ejemplo el reconocimiento del olor y del sabor de los aceites esenciales añadiendo etanol al 90% y agitando añadiendo sacarosa pulverizada.
9. Métodos de tecnología farmacéutica: describe métodos específicos para formas galénicas. Como, por ejemplo, describe el ensayo de fluidez que tiene por objetivo determinar la capacidad de los sólidos divididos (povos y granulados) para fluir verticalmente en condiciones definidas o la resistencia de los comprimidos a la ruptura.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este TFG es realizar una revisión bibliográfica sobre los métodos analíticos en la Real Farmacopea Española. Así como conocer el campo analítico en la oficina de farmacia a través de las farmacopeas.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo son:

1. Conocer la Real Farmacopea Española mediante una revisión bibliográfica de su evolución histórica, su estructura, sus funciones y los métodos analíticos empleados en la identificación y determinación de los diferentes principios activos.
2. Revisar la aplicación de las técnicas espectroscópicas y cromatográficas de líquidos para la determinación e identificación de algunos antibacterianos y diuréticos utilizados en las preparaciones farmacéuticas.
3. Realizar una revisión bibliográfica mediante artículos científicos que utilicen las técnicas de cromatografía de líquidos y espectroscópicas en la determinación de los principios activos seleccionados.

3. METODOLOGÍA

La información para la realización de este Trabajo Fin de Grado de tipo bibliográfico sobre los métodos de análisis químicos en las farmacopeas se ha obtenido principalmente de la Real Farmacopea Española (versión online). También se han consultado libros específicos sobre las farmacopeas y métodos analíticos, y artículos de revistas científicas.

Se han seleccionado dos métodos analíticos, cromatografía de líquidos y espectrofotometría de absorción en UV-vis, para evaluar su aplicación en el análisis de diversos principios activos. La elección de estos dos métodos analíticos está basada en su amplia utilización en el análisis de principios activos en medicamentos.

Una vez realizada la selección de los dos métodos analíticos, se seleccionaron los principios activos objeto de estudio. Se han seleccionado principios activos pertenecientes a dos grupos terapéuticos, diuréticos y antibacterianos, según la clasificación ATC (acrónimo de Anatomical, Therapeutic, Chemical classification system) consultada en la web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). La selección de los principios activos se ha llevado a cabo identificando en las monografías de la Real Farmacopea Española qué grupo terapéutico incluye una gran parte de principios activos que son analizados mediante la espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible y/o la cromatografía líquida.

También se ha realizado una búsqueda de bibliografía a través del Catálogo Fama de la Universidad de Sevilla y de artículos en revistas científicas mediante las bases de datos *ScienceDirect* y *Scopus*. Las palabras claves para esta búsqueda bibliográfica han sido: *liquid chromatography, absorption spectroscopy, antibacterials, diuretics, azithromycin, clindamycin, erythromycin, furosemide, hydrochlorothiazide, indapamide, tetracycline y vancomycin.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Técnicas Analíticas

4.1.1. Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible (UV-vis)

La monografía sobre la espectrofotometría de absorción en el Uv-vis en la Real Farmacopea Española incluye la definición de la técnica, y la descripción de las partes del equipo, así como información sobre el método analítico que se aplica.

La espectroscopia de absorción en la zona del ultravioleta y visible tiene una gran aplicación en la identificación y determinación de muchas especies inorgánicas y orgánicas. El espectrofotómetro está formado por diferentes componentes: una fuente de radiación, que debe de generar una radiación continua para que incida sobre la muestra a analizar; una cubeta para la muestra, que debe de ser de un material transparente; un selector de longitudes de onda, como los monocromadores, que seleccione la longitud de onda que va a ser utilizada; y un detector, que en el caso de los espectrofotómetros de absorción transforman la señal electromagnética en una señal eléctrica (Figura 2) (Hernández y González, 2002).

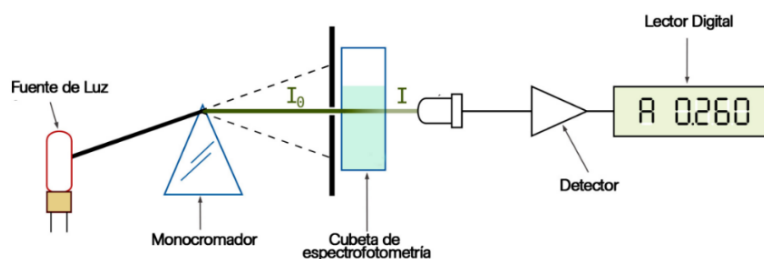


Figura 2. Componentes de un espectrofotómetro. [Extraída de: <https://espectrofotometro.online/espectrofotometria/>]

Los espectros de absorción ultravioleta y visible proporcionan información útil para llevar a cabo un análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Para la identificación cualitativa, se comparan los datos obtenidos a partir del espectro, como pueden ser los máximos, mínimos y puntos de inflexión, con los de la sustancia problema pura. Con respecto al análisis cuantitativo, la espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible es una de las técnicas más usadas. La base de la aplicación de los métodos espectroscópicos al análisis cuantitativo es la ley de Beer. La ley de Beer relaciona la absorción de la radiación electromagnética (A) con la concentración de la sustancia (c),

la distancia que recorre la luz (b) y la absorptividad (a). La absorptividad es una propiedad característica de la sustancia absorbente y depende de la longitud de onda.

$$A = abc$$

Aunque la espectrofotometría esté considerada como un método menos exacto que otros métodos clásicos de análisis, como los gravimétricos y volumétricos, su mayor sensibilidad y rapidez los hace útiles en numerosas aplicaciones. En principio, cualquier especie química que absorba radiación electromagnética en las regiones UV-vis puede ser determinada por esta técnica (Rubinson y Rubinson, 2000).

4.1.2. Cromatografía de líquidos

La monografía sobre cromatografía de líquidos en la Real Farmacopea Española incluye la definición de la técnica, y la descripción de las partes del equipo, así como información sobre el método analítico que se aplica.

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo por su gran aplicabilidad a sustancias de interés en la industria y en muchos campos de la ciencia (Skoog et al., 2003).

En la cromatografía de líquidos, la fase móvil es líquida y se hace pasar por una fase estacionaria, sólida o líquida, que está contenida en un recinto cilíndrico denominado columna.

El cromatógrafo está formado por diferentes componentes: un reservorio de fase móvil, son recipientes o depósitos que contienen los disolventes para suministrar la fase móvil; un sistema de bombeo a alta presión, cuyo principal objetivo es bombear la fase móvil a través de la columna a un flujo controlado; el sistema de inyección, es la parte la que se introduce la muestra y se encuentra entre el sistema de bombeo y la columna. La columna cromatográfica, es una de las partes fundamentales del cromatógrafo, ya que en ella se produce la separación o discriminación de los diferentes componentes de la muestra; y, por último, el sistema de detección localizado al final de la columna que proporciona información sobre los analitos que eluyen por la columna y genera un cromatograma, del que se puede obtener

información cualitativa y cuantitativa de la muestra (Figura 3) (Rubinson y Rubinson, 2000).

Hay diferentes formas de trabajar en cromatografía de líquidos que resultan beneficiosos para la separación de los diferentes componentes de la muestra. Una de ellas es la formación de gradientes de elución, que consiste en un cambio controlado de la composición de la fase móvil durante el proceso cromatográfico (Skoog et al., 2003).

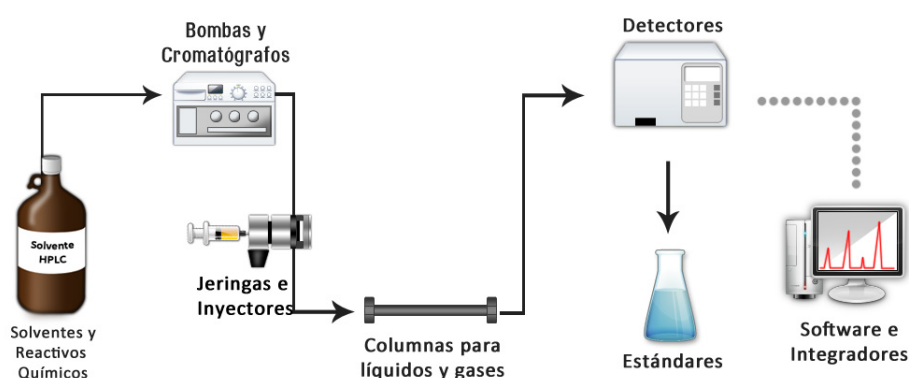


Figura 3. Componentes básicos de un sistema de HPLC. [Extraída de <https://www.cromatografia.com.mx/>]

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar atendiendo al mecanismo de interacción entre los componentes de la muestra y las dos fases, móvil y estacionaria. Esta clasificación da lugar a las cromatografías de adsorción, de exclusión molecular, de intercambio iónico, de afinidad y de partición o reparto.

La cromatografía de adsorción se basa en las interacciones entre el soluto y los lugares activos fijados sobre un sólido absorbente que se utiliza como fase estacionaria. La separación se produce como consecuencia de la distinta intensidad de las interacciones.

En la cromatografía de exclusión molecular, la fase estacionaria es un sólido inerte que contiene pequeños poros que retienen a las moléculas del soluto por su tamaño. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas y del tamaño de los poros.

La cromatografía de afinidad es un tipo especial de cromatografía, utilizada especialmente en bioquímica, en la que un sólido tiene enlazado a un llamado ligando de afinidad que puede ser, por ejemplo, un inhibidor enzimático o un anticuerpo. Son interacciones muy específicas entre el soluto y la fase estacionaria.

En la cromatografía de intercambio iónico la fase estacionaria es un sólido, en cuya superficie existen grupos funcionales cargados positiva o negativamente que puede intercambiarse con iones contenidos en la fase móvil. La fase estacionaria que se utiliza en estas columnas suele ser un copolímero de estireno-divinilbenceno, que es tratado apropiadamente para agregarle los grupos funcionales (CI). La fase móvil suele ser una disolución acuosa tamponada y la separación de los componentes de la muestra se produce por la competencia que se establece entre los iones de la fase móvil y los iones del analito por los centros activos de la fase estacionaria (Hernández y González, 2002).

En cromatografía líquida pueden distinguirse dos tipos generales de métodos cromatográficos según la naturaleza de la fase móvil: por una parte, cuando la fase móvil es de naturaleza no polar, y la fase estacionaria es fundamentalmente polar, se denominan sistemas normales o de fase normal. Por otra parte, si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, el sistema se denomina como de fase reversa o inversa (Hernández y González, 2002).

El procedimiento de cromatografía de reparto en fase inversa es el más ampliamente utilizado. Se dispone de gran cantidad de fases estacionarias no polares siendo las más comunes las columnas formadas por partículas de gel de sílice con grupos apolares enlazados a los grupos silanol. Las columnas más utilizadas son las C18 y C8 que tienen cadenas de hidrocarburos de 18 y 8 carbonos, respectivamente, unidas a los grupos silanos del soporte. La fase móvil polar más utilizada es la mezcla de tampones acuosos con acetonitrilo o metanol. La separación en este tipo de cromatografías se produce por la diferente solubilidad de los componentes de la muestra entre las dos fases.

4.2 Principios activos

Como se ha descrito en la sección 3. *Metodología*, la selección de los principios activos se ha llevado a cabo identificando en las monografías de la Real Farmacopea Española qué grupo terapéutico incluye una gran parte de principios activos que son analizados mediante espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible y/o cromatografía líquida. A partir de dicha búsqueda se han seleccionado tres principios activos del grupo de los diuréticos: la furosemida, la hidroclorotiazida y la indapamida (para la espectrofotometría ultravioleta y visible y para la cromatografía líquida), y

cinco principios activos del grupo de los antibacterianos: azitromicina, fosfato de clindamicina, eritromicina, tetraciclina e hidrocloreto de vancomicina (para la cromatografía líquida).

En los apartados 4.2.1 y 4.2.2 se expone la información sobre los diuréticos y antibacterianos seleccionados obtenida de las monografías de la Real Farmacopea Española.

4.2.1 Diuréticos

Los diuréticos se definen como sustancias que producen una eliminación de agua y electrolitos del organismo a través de la orina.

Según la clasificación ATC pertenecen al subgrupo C03 del grupo C: sistema cardiovascular.

Furosemida: se clasifica como un diurético de techo alto del subgrupo sulfonamidas, monofármacos (C03CA) (Figura 4). Es un diurético del asa, antihipertensivo. La furosemida es un diurético del asa que inhibe el cotransporte de sodio, potasio y cloruro, y en menor medida de calcio y magnesio, en la rama ascendente del asa de Henle, impidiendo la reabsorción de dichos electrolitos. Su principal efecto es aumentar la cantidad de orina, ayudando a reducir la presión sanguínea. Se encuentra en forma de polvo cristalino, blanco o casi blanco. Con respecto a su solubilidad, es prácticamente insoluble en agua, soluble en acetona, bastante soluble en etanol al 96%.

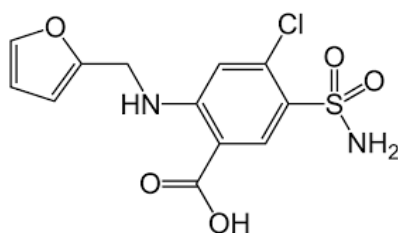


Figura 4. Estructura química de la furosemida.

Hidroclorotiazida: se clasifica como un diurético de techo bajo con ahorradores de potasio (C03EA) (Figura 5). Es un diurético tiazídico, antihipertensivo. Favorece la eliminación de sodio, cloruro y agua. Su principal efecto es aumentar la cantidad de orina, ayudando a reducir la presión sanguínea. Se encuentra en forma de polvo

cristalino, blanco o casi blanco. Con respecto a su solubilidad, es muy poco soluble en agua, soluble en acetona y bastante soluble en etanol al 96%.

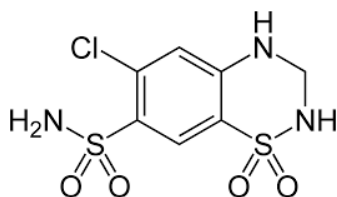


Figura 5. Estructura química de la hidroclorotiazida.

Indapamida: es un diurético sulfamídico, antihipertensivo (C03BA) (Figura 6). Está relacionado estructuralmente con las tiazidas, que aumenta la eliminación de sodio, cloruro y agua. Su principal efecto, como todos los anteriores, es aumentar la cantidad de orina producida. Se encuentra en forma de polvo blanco o casi blanco. Con respecto a su solubilidad, es prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol al 96%.

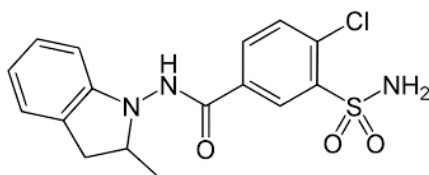


Figura 6. Estructura química de la indapamida.

4.2.2 Antibacterianos

Los antibacterianos se definen como un grupo de medicamentos que sirven para combatir las infecciones causadas por bacterias.

Según la clasificación ATC pertenecen al subgrupo J01 del grupo J: antiinfecciosos para uso sistémico.

Azitromicina: antibacteriano macrólido perteneciente al grupo de los azálidos (J01FA) (Figura 7). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica mediante su unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma e inhibiendo la translocación de los péptidos. Tiene forma de polvo blanco o casi blanco. Con respecto a la solubilidad, es prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol y en cloruro de metileno.

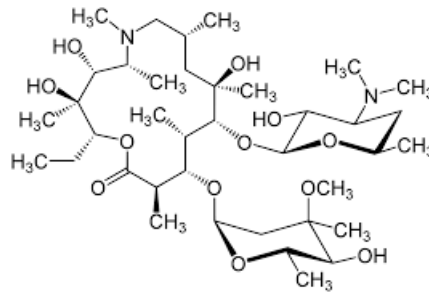


Figura 7. Estructura química de la azitromicina.

Fosfato de Clindamicina: antibacteriano perteneciente al grupo de las lincosamidas con acción bacteriostática (J01FF) (Figura 8). Produce inhibición de la síntesis proteica bacteriana. Tiene forma de polvo blanco, ligeramente higroscópico. Con respecto a la solubilidad, es fácilmente soluble en agua y muy poco soluble en etanol al 96%.

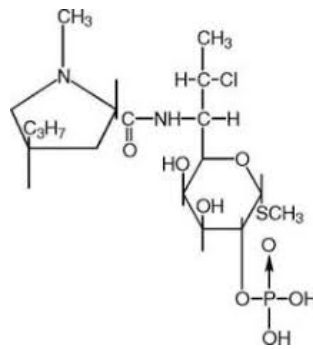


Figura 8. Estructura química de la clindamicina.

Eritromicina: antibacteriano perteneciente al grupo de los macrólidos con acción bacteriostática (J01FA) (Figura 9). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica mediante su unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma, lo que un bloqueo de la transpeptidación. De esta forma impide la elongación de la cadena peptídica durante la síntesis de proteínas. Se puede encontrar en forma de polvo blanco o ligeramente amarillo, o en forma de cristales incoloros o ligeramente amarillos. Es poco soluble en agua, pero fácilmente soluble en etanol al 96%.

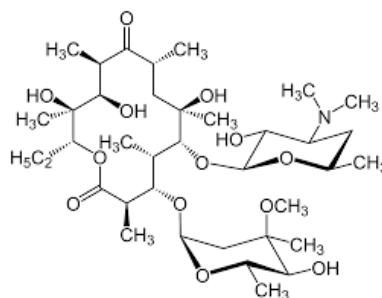


Figura 9. Estructura química de la eritromicina.

En segundo lugar, se han incluido y discutido algunos estudios científicos referentes a cada principio activo en los que se usa la espectrofotometría UV-vis como técnica de identificación.

Toda la información referente a la aplicación de la espectrofotometría en el UV-vis para el análisis de los principios activos seleccionados se muestra de forma resumida en la Tabla 2.

4.3.1. Furosemida

En la Real Farmacopea Española se propone la identificación de la furosemida en una muestra por espectroscopia de absorción en el UV-vis, disolviendo la muestra en hidróxido sódico. En esta disolución se registra el espectro de absorción en la zona de 220 a 350 nm de longitud de onda. Posteriormente, se calcula la relación de absorbancias a 228 y 270 nm (A_{270} / A_{228}) teniendo este valor que estar comprendido entre 0,52 a 0,57.

En investigaciones científicas determinan furosemida en comprimidos por espectroscopia, tras una reacción de complejación con cobre (II) a pH 3,2; el complejo formado se mide a 790 nm (Colcú, 2006). Las reacciones de complejación de la furosemida con otros metales han sido útiles para su determinación por espectrofotometría en diferentes formas farmacéuticas (Espinosa et al., 2008), así forma complejos de color rojo con el hierro a pH 5,2 que presenta absorción a 513 nm (Zivanovic et al., 1990) o con el plomo a pH 10 con absorción a 527 nm (Agatonovic-Kustrin et al., 1990).

4.3.2. Hidroclorotiazida

Para la identificación de la hidroclorotiazida según la Real Farmacopea Española, la muestra se disuelve en hidróxido de sodio. En esta disolución se registra el espectro de absorción en la región comprendida entre 250 y 350 nm. Se calcula la relación de las absorbancias medidas a 273 y 323 nm (A_{273} / A_{323}) y el valor tiene que estar comprendido entre 5,4 y 5,7.

La hidroclorotiazida es un principio activo que se utiliza frecuentemente en las formulaciones farmacéuticas con antihipertensivos. La determinación en estas mezclas puede realizarse con éxito por espectrofotometría de absorción en el rango del UV-vis.

Así, Abdelwahab (2016) desarrolla un método espectrofotométrico para la determinación de carvedilol e hidroclorotiazida y Gangola et al. (2011) en la mezcla con telmisartán.

4.3.3. Indapamida

En la identificación de la indapamida en la Real Farmacopea Española, la muestra se disuelve en etanol al 96%. En esta disolución se registra el espectro de absorción en la región espectral de 220 a 350 nm. Se mide la absorbancia a 242 nm y se correlaciona con la concentración del principio activo mediante la calibración con patrones.

En comprimidos conteniendo indapamida, Süslü y Altinöz (2002) desarrollan un método espectrofotométrico realizando medidas en el rango de longitudes de onda de 200 a 350 nm. Como en el caso de la hidroclorotiazida, es frecuente asociar este principio activo con antihipertensivos y también se pueden determinar aplicando los métodos espectroscópicos. Erk (2001) propone un método para la determinación del perindopril con la indapamida en comprimidos seleccionando las longitudes de onda de 226 y 255 nm para la determinación del perindopril y la indapamida, respectivamente.

Tabla 2. Espectrofotometría de absorción en UV- visible.

<i>Principio activo</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Longitud de onda (nm)</i>	<i>Referencia</i>
<i>Furosemida (C03CA)</i>	Disolución en medio básico	220 a 350	Real Farmacopea Española
	Reacción de complejación con cobre (II) a pH 3,2	790	Colcú, 2006
	Reacción de complejación con hierro a pH 5,2	513	Zivanovic et al., 1990
	Reacción de complejación con plomo a pH 10	527	Agatonovic-Kustrin et al., 1990
<i>Hidroclorotiazida (C03AA)</i>	Disolución en medio básico	250 a 350	Real Farmacopea Española
	Disolución en disolvente orgánico (metanol)	200 a 350	Adelwahab, 2006
	Disolución en medio básico	273	Gangola et al., 2011
<i>Indapamida (C03BA)</i>	Disolución con disolvente orgánico (etanol)	220 a 350	Real Farmacopea Española
	Disolución en disolvente orgánico (metanol)	226 a 255	Süslü y Altinöz, 2002

4.4. Aplicación de la cromatografía de líquidos

En este apartado se estudia la aplicación de la cromatografía de líquidos al análisis de los principios activos pertenecientes al grupo de los antibacterianos y de los diuréticos. Por una parte, se ha realizado un resumen de las características del método de análisis para cada principio activo según su monografía de la Real Farmacopea Española. Se han citado diversos aspectos, como son la disolución de la muestra, la columna utilizada, la temperatura de la columna y la longitud de onda que se ha utilizado para la detección, entre otros.

Por otra parte, se han incluido y discutido algunos estudios científicos referentes a cada principio activo en los que se usa cromatografía líquida como técnica de separación, identificación y/o cuantificación.

Toda la información referente a la aplicación de la cromatografía líquida para el análisis de los principios activos seleccionados se muestra de forma resumida en la Tabla 3.

4.4.1 Antibacterianos

4.4.1.1. Azitromicina

En la Real Farmacopea Española se propone la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos. La disolución del preparado farmacéutico se realiza en una disolución de dihidrogenofostato de amonio ajustado a pH 10,0 con amoniaco y posteriormente diluye con una disolución mezcla de acetonitrilo y metanol. El volumen de inyección de la muestra es de 50 μ L.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,25 m \times 4,6 mm, 5 μ m), el flujo de fase móvil es de 1,0 mL/min y la temperatura de la columna es de 60 °C. Para la separación se utiliza un gradiente de elución en 93 min, siendo la fase móvil A una disolución de hidrogenofosfato de sodio anhidro ajustada a pH 8,9 con ácido fosfórico diluido o con disolución diluida de hidróxido de sodio y la fase móvil B es una mezcla de metanol y acetonitrilo (25:75 v/v). La detección de la azitromicina se realiza midiendo a 210 nm con un detector de absorción UV- Vis.

Yang et al. (2009) desarrollan un método cromatográfico para determinar azitromicina en colirios. La muestra se diluye con agua purificada antes de su inyección en el cromatógrafo de líquidos y 20 μ L es el volumen de inyección de la muestra. Para la

separación utilizan una columna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) que se mantiene a 25 °C. La elución es en isocrático, siendo la fase móvil una mezcla de tres disoluciones; dihidrogenofosfato de amonio (0.045 M, pH 3.0 ajustado con ácido fosfórico), acetonitrilo 47:15 (v/v) y heptano-1-sulfonato de sodio 0,02 M. La detección se realiza a 210 nm. En la Figura 12 se muestra un cromatograma obtenido en una muestra de colirio siguiendo las condiciones experimentales validadas por estos autores, siendo el pico que eluye a 12 min de tiempo de retención el correspondiente a azitromicina.

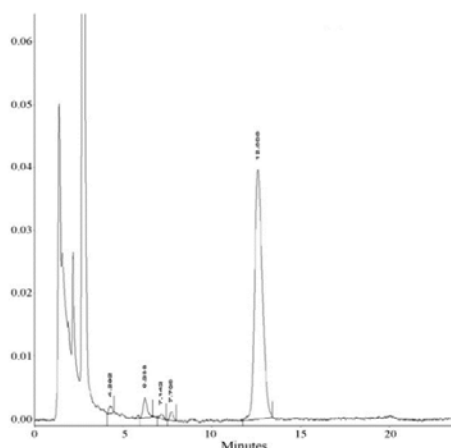


Figura 12. Cromatograma de una disolución de colirio obtenido siguiendo las condiciones experimentales validadas por Yang et al. (2009).

Al-Rimawi y Khara (2010) desarrollan un método para determinar azitromicina en preparados farmacéuticos empleando el mismo procedimiento que el propuesto por Yang et al. (2009) a excepción de la fase móvil, que está constituida por una mezcla de tampón fosfato (pH 7,5) y metanol (20:80 v/v).

4.4.1.2. Fosfato de clindamicina

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en la fase móvil, siendo la fase móvil una disolución de acetonitrilo y una disolución de dihidrogenofosfato de potasio previamente ajustada a pH 2,5 con ácido fosfórico. El volumen de inyección es de 20 μL.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,25 m x 4,6 mm, 5-10 μm) y un flujo de fase móvil de 1,0 mL/ min. La cromatografía se realiza en isocrático. La detección de la clindamicina se realiza midiendo a 210 nm en un detector de absorción UV- Vis.

Batzias et al. (2004) desarrollan un método analítico para la determinación cuantitativa de la clindamicina en muestras de sangre, donde la sangre fue desproteinizada con acetonitrilo y la clindamicina fue extraída con diclorometano. La cromatografía se hizo con una columna C18 en presencia de hidrogeno sulfato de tetra-n-butilamonio. Las medidas se realizaron a 195 nm.

Platzer y White (2005) realizaron la determinación de clindamicina en comprimidos, además estudiaron las impurezas y la uniformidad con respecto a la concentración en los comprimidos. El estudio se realizó con una columna C18 y la fase móvil está compuesta de una disolución de carbonato y acetonitrilo a pH 10,5. La detección de la clindamicina se realizó a 214 nm.

4.2.1.3. Eritromicina

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en una disolución de metanol y una disolución tampón de fosfato a pH 7,0. El volumen de inyección es de 100 µL.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es de intercambio iónico con una fase estacionaria de copolímero estireno-divinilbenceno (0,25 m x 4,6 mm, 8 µm) y un flujo de fase móvil de 2,0 mL/min. La temperatura de la columna es de 70 °C. La fase móvil es una disolución de hidrogenofosfato de potasio ajustada a pH 9,0 con ácido fosfórico, agua, 2-metil-2-propanol y acetonitrilo. La detección de la eritromicina se realiza midiendo a 215 nm en un detector de absorción UV- Vis.

Deubel y Holzgrabe (2006) desarrollaron un método para la determinación de las impurezas de la eritromicina usando la cromatografía de líquidos. La temperatura de la columna que usan, en comparación con la que está descrita en la farmacopea, es de 25 °C, ya que ponen de manifiesto que a temperaturas superiores a 60 °C la eritromicina es inestable. Las muestras de eritromicina fueron analizadas en una columna C18, distinta a la utilizada en la farmacopea, y una fase móvil de fosfato de potasio, acetonitrilo y metanol a pH 8,0. La detección de la eritromicina se realizó a 215 nm.

Hassib et al. (2011) desarrollaron dos métodos para la determinación de la eritromicina y el trimetoprin en comprimidos, ambos principios activos formulados en la misma forma farmacéutica. Los métodos validados fueron la cromatografía de

líquidos y la espectroscopia. En el caso de la cromatografía, usaron una columna C18 en modo isocrático, siendo la fase móvil una disolución de dihidrogenofosfato de potasio, acetonitrilo y agua (25:100:50 v/v/v) a pH 9,0. La detección de la eritromicina se realizó a 210 nm y la del trimetoprim a 280 nm (Figura 13).

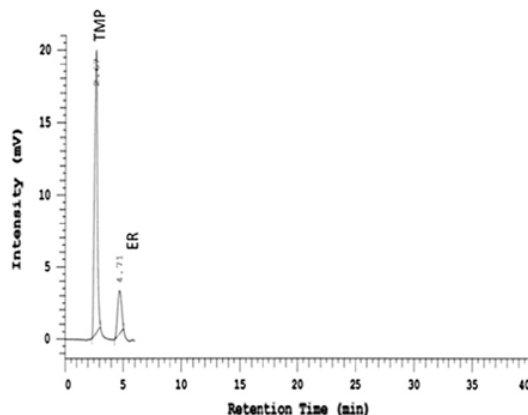


Figura 13. Cromatograma publicado por Hassib et al., (2011), correspondiente a una mezcla de eritromicina (ER) y trimetoprim (TMP) aplicando el método validado.

4.2.1.4. Tetraciclina

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en ácido clorhídrico. El volumen de inyección es de 20 μ L.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,25 m x 4,6 mm, 8 μ m) y un flujo de fase móvil de 1,0 mL/min. La temperatura de la columna es de 60 $^{\circ}$ C. La fase móvil se prepara mezclando 2-metil-2 propanol, hidrogenofosfato de potasio, hidrogenosulfato de tetrabutilamonio y edetato de sodio, ajustando el pH a 9,0 con hidróxido de sodio. La detección de la tetraciclina se realiza midiendo a 254 nm en un detector de absorción UV- Vis.

Gbylik-Sikorska et al. (2019) desarrollan y validan un método analítico para la determinación simultánea de 45 antibacterianos por cromatografía de líquidos, entre los que están las tetraciclinas. Para la extracción de los analitos en *Agaricus bisporus* (champiñón común) proponen una extracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos y agitación, seguido de la separación y evaporación del sobrenadante. Posteriormente, el residuo seco obtenido se disuelve en ácido fórmico al 0,1% y se filtra antes de su inyección en el cromatógrafo (Figura 14).

Para la separación cromatográfica de los antibacterianos utilizan una columna C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μ m) y un flujo de fase móvil de 0,5 mL/min. Para la separación establecen un gradiente de elución con dos fases móviles. La fase móvil A esta compuesta por una mezcla de acetonitrilo y metanol (80:20 v/v) y la fase móvil B en una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1%.

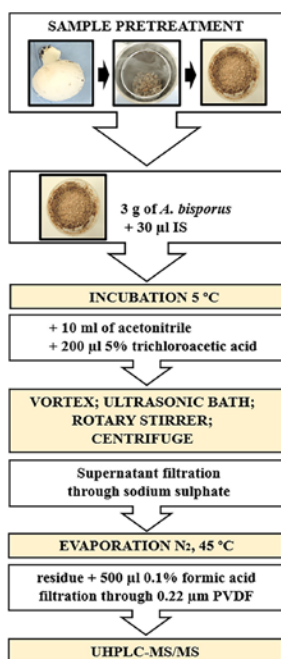


Figura 14. Esquema de preparación de muestra para el análisis por cromatografía de líquidos.

Mamani et al. (2009) desarrollaron un método para la determinación de antimicrobianos en leche de vaca usando la cromatografía líquida como técnica de determinación. Algunos de los antimicrobianos que identificaron fueron las tetracilinas, las sulfonamidas y el cloranfenicol, entre otros. Para su análisis usaron una columna C18 en medio isocrático, siendo la fase móvil la mezcla de una disolución acuosa de acetato de sodio, cloruro de calcio, ácido etilendiaminotetracético y de una fase orgánica de metanol y acetonitrilo (75:25 v/v). Para la detección de los antimicrobianos se usaron tres longitudes de onda 260 nm para la detección de sulfametazina (SMZ), sulfaquinoxalina (SQX) y sulfametoxazol (SMX); 311 nm para el cloranfenicol (CLP) y 385 nm para la oxitetraciclina(OTC), tetraciclina (TC) y clortetraciclina (CTC) (Figura 15).

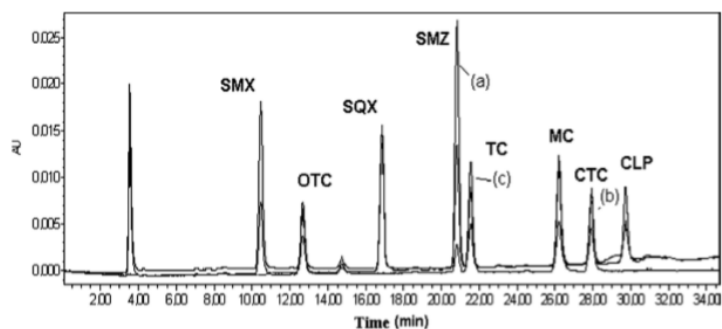


Figura 15. Cromatograma publicado por Mamani et al., (2009), correspondiente a una mezcla de antimicrobianos aplicando el método validado.

4.2.1.5. Hidrocloruro de vancomicina

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en la fase móvil A. El volumen de inyección es de 20 μ L.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,25 m x 4,6mm, 5 μ m) y un flujo de fase móvil de 1,0 mL/min. Para la separación se utiliza un gradiente de elución de 22 min, siendo la fase móvil A una disolución de trietilamina con agua y ajustada a pH 3,2 con ácido fosfórico, tetrahidrofurano y acetonitrilo; y la fase móvil B tiene la misma composición que la fase móvil A, pero tiene mayor cantidad de acetonitrilo. La detección de la vancomicina se realiza midiendo a 280 nm en un detector de absorción UV- Vis.

Ye et al. (2008) desarrollaron un método para la determinación de vancomicina y ceftazidima en el líquido cerebroespinal usando la cromatografía de líquidos. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C18 en medio isocrático, usando como fase móvil una disolución de acetonitrilo llevada a pH 3,5 con un tampón fosfato. La temperatura de la columna es de 25 $^{\circ}$ C y la detección se llevó a cabo a 240 nm.

López et al. (2007) desarrollaron un método para la determinación de cefepime, vancomicina e imipenen en la sangre de pacientes quemados usando la cromatografía líquida. Estos principios activos son utilizados como tratamiento en quemaduras. El método desarrollado fue en columna C18 y en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil fue una disolución de acetonitrilo a pH 5,0. La detección se llevó a cabo a 230 nm.

4.2.2. Diuréticos

4.2.2.1. Furosemida

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en la fase móvil, que está constituida por una disolución de dihidrogenofosfato de potasio y ceftriaxona, ajustándola a pH 7,0 con amoníaco y después se le añade propanol. El volumen de inyección es de 20 µL.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,25 m x 4,6 mm, 5 µm) y un flujo de fase móvil de 1 mL/min. La detección de la furosemida se realiza midiendo a 238 nm en un detector de absorción UV- Vis.

Los estudios científicos revisados también utilizan la cromatografía de reparto en fase inversa, así Basavaiah et al. (2005) utilizan una columna C18 (0,25 m x 4,6 mm, 5 µm) y una fase móvil de acetonitrilo y ácido ortofosfórico al 0,1% (pH 3) en condiciones isocráticas con un flujo de 1 mL/min. La furosemida se detecta a 233 nm.

Las mismas condiciones experimentales propone Semaan et al. (2005), excepto la fase móvil, que en este caso está compuesta de una disolución de metanol y tampón fosfato a pH 5,5. La longitud de onda para la determinación, en este caso, es de 237 nm.

4.2.2.2. Hidroclorotiazida

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en una disolución de acetonitrilo y metanol y una disolución tampón de fosfato a pH 3,2. El volumen de inyección es de 10 µL.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,1 m x 4,6 mm, 3 µm) y un flujo de fase móvil de 0,8 mL/min. Para la separación se utiliza un gradiente de elución de 30 minutos. Hay dos fases móviles, siendo la fase móvil A una disolución tampón fosfato a pH 3,2 a la que se le añade metanol y tetrahidrofurano; la fase móvil B es una disolución de metanol con tampón fosfato a pH 3,2 y tetrahidrofurano. La detección de la hidroclorotiazida se realiza midiendo a 224 nm en un detector de absorción UV-vis.

Tengli et al. (2013) desarrollaron un método cromatográfico para determinar hidroclorotiazida, amlodipino y losartan en comprimidos. Para la separación utilizan una columna CN (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente. La fase móvil es

una disolución de acetonitrilo y dihidrogenofosfato de potasio (pH 2,7) con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 230 nm.

4.2.2.3. Indapamida

Para la determinación de este principio activo por cromatografía de líquidos se disuelve el preparado farmacéutico en una disolución de volúmenes iguales de acetonitrilo y metanol y añadirle después una disolución de edetato de sodio. El volumen de inyección es de 10 μ L.

La columna utilizada para la separación cromatográfica es una C18 (0,20 m x 4,6 mm, 5 μ m) y un flujo de fase móvil de 2 mL/min. La temperatura de la columna es de 40 °C. La fase móvil es una disolución de ácido acético glacial, acetonitrilo, metanol y una disolución de edetato de sodio. La detección de la indapamida se realiza midiendo a 254 nm en un detector de absorción UV-vis.

Erk (2001) propone un método cromatográfico para determinar perindopril e indapamida utilizando una columna C18 (15 cm x 6 mm, 5 μ m). Utilizaron condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una disolución de acetonitrilo y tampón fosfato a pH 2,4 y un flujo de 1 mL/min. La detección de la indapamida fue 215 nm.

Tabla 3. Cromatografía de Líquidos.

<i>Principio activo</i>	<i>Muestra</i>	<i>Columna</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Flujo (mL/min)</i>	<i>Tª (°C)</i>	<i>λ (nm)</i>	<i>Referencia</i>
Azitromicina (J01FA)	Disolución en medio básico (amoniacal)	C18	Fase A: disolución de hidrogenofosfato de sodio anhidro ajustada a pH 10 Fase B: disolución de metanol y acetonitrilo	1,0	60	210	Real Farmacopea Española
	Disolución en agua	C18	Disolución de dihidrogenofosfato de amonio, acetonitrilo y heptano-1-sulfonato de sodio	-	25	210	Yang et al., 2009
	Disolución en agua	C18	Disolución de metanol y tampón fosfato	1,0	60	210	Al- Rimawi y Kharo, 2010
Fosfato de clindamicina (J01FF)	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de acetonitrilo y dihidrogenofosfato a pH 2,5.	1,0	-	210	Real Farmacopea Española
	Disolución con disolvente orgánico (acetonitrilo)	C18	Disolución con acetonitrilo y en presencia de tetra-n-butilamonio	1,0	40	195	Batzias et al., 2004
	Disolución en medio básico	C18	Disolución con carbonato y acetonitrilo a pH 10,5	1,0	-	214	Platzer y White, 2005
Eritromicina (J01FA)	Disolución en medio neutro	Cl	Disolución de hidrogenofosfato de potasio, agua, 2-metil-2-propanol y acetonitrilo	2,0	70	215	Real Farmacopea Española
	Disolución en medio básico	C18	Disolución de acetonitrilo y metanol	1,0	25	315	Deubel y Holzgrabe, 2006
	Disolución con disolventes orgánicos	C18	Disolución de dihidrogenofosfato de potasio, acetonitrilo y agua	1,0	25	210	Hassib et al., 2011
Tetraciclina (J01AA)	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de 2-metil-2-propanol, hidrogenofosfato de potasio, hidrogenosulfato de tetrabutilamonio y edetato de sodio	1,0	60	254	Real Farmacopea Española
	Disolución en medio ácido	C18	Fase A: acetonitrilo y metanol Fase B: disolución acuosa de ácido fórmico	0,5	-	-	Gbylik-Sikorska et al., 2019
	Disolución en medio neutro	C18	Disolución acuosa de acetato de sodio, cloruro de calcio, ácido etilendiaminotetracético y una fase orgánica de metanol y acetonitrilo.	0,7	-	260, 311 y 385	Mamani et al., 2009
	Disolución en medio ácido	C18	Fase A: disolución de trietilamina con agua, ácido fosfórico, tetrahidrofurano y acetonitrilo.	1,0	-	280	Real Farmacopea Española

Hidrocloruro de vancomicina (J01XA)			Fase B: misma composición que la fase A, pero mayor cantidad de acetonitrilo.				
	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de acetonitrilo llevada a PH 3,5 con un tampón fosfato	1,0	25	240	Ye et al., 2008
	Disolución con disolvente orgánico (acetonitrilo)	C18	Disolución en acetonitrilo a pH 5,0.	0,8	-	230	López et al., 2007
Furosemida (C03CA)	Disolución en pH neutro	C18	Disolución de dihidrogenofosfato de potasio, ceftriaxona y propanol	1,0	-	328	Real Farmacopea Española
	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de acetonitrilo y ácido fosfórico al 0,1%.	1,0	-	233	Basavaiah et al., 2005
	Disolución con disolvente orgánico (etanol)	C18	Disolución de metanol con tampón fosfato	1,0	-	190 a 380	Semaan et al., 2005
Hidroclorotiazida (C03AA)	Disolución en medio ácido	C18	Fase A: disolución de tampón fosfato a PH 3,2 con metanol y tetrahidrofurano Fase B: mismos componentes que la fase A pero diferentes cantidades	0,8	-	224	Real Farmacopea Española
	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de acetonitrilo y dihidrogenofosfato de potasio	1,0	-	230	Tengli et al., 2013
Indapamida (C03BA)	Disolución ¿¿?¿?	C18	Disolución de ácido acético glacial, acetonitrilo, metanol y edetato de sodio	2,0	40	254	Real Farmacopea Española
	Disolución en medio ácido	C18	Disolución de acetonitrilo y tampón fosfato	1,0	-	215	Erk, 2001

5. CONCLUSIONES

1. La Real Farmacopea Española es de gran utilidad en el campo del análisis farmacéutico, ya que establece cuáles son los métodos analíticos más adecuados para la determinación y el control de calidad de los principios activos que forman parte de las preparaciones farmacéuticas.
2. La cromatografía de líquidos puede ser aplicada al análisis de antibacterianos (azitromicina, clindamicina, eritromicina, tetraciclina y vancomicina) y diuréticos (furosemida, hidroclorotiazida e indapamida); y la espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y visible al análisis de diuréticos. La Real Farmacopea Española indica qué características y condiciones son las más adecuadas para realizar la determinación de los principios activos citados.
3. En general, los trabajos de investigación científica sobre identificación de los principios activos seleccionados utilizan la cromatografía de líquidos y la espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y visible con las condiciones establecidas por la Real Farmacopea Española, aunque presentan diferencias en algunos parámetros específicos.
4. La identificación de furosemida, hidroclorotiazida e indapamida mediante técnicas espectroscópicas se lleva a cabo principalmente disolviendo los preparados farmacéuticos en medio básico, en disolventes orgánicos o realizando una reacción de complejación, y midiendo a longitudes de onda entre 200 y 790 nm.
5. La cromatografía de líquidos en fase inversa es la más utilizada para la determinación de antibacterianos y diuréticos. Las principales diferencias en el análisis de estos principios activos se encuentran en las condiciones cromatográficas: composición de la fase móvil, flujo, modo de elución, temperatura de la columna y longitud de onda de detección.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Academia Europea de Pacientes (EUPATI) (en línea). [consultado en febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.eupati.eu/es/>
- Abdelwahab NS. Spectrophotometric methods for simultaneous determination of Carvedilol and Hydrochlorothiazide in combined dosage form. Arab J Chem. 2016; 9: S355-S360.
- Agatonovic-Kustrin S, Zivanovic LJ, Radulovic D, Pecanac D. Spectrophotometric determination of furosemide and its palladium(II) complex. J Pharm Biomed Anal. 1990; 8: 983-986.
- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). (en línea). [consultado en marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/>
- Al-Rimawi F, Kharoia M. Analysis of azithromycin and its related compounds by RP-HPLC with UV detection. J Chromatogr Sci. 2010; 48: 86-90.
- Basavaiah K, Chandrashekar U, Nagegowda P. Rapid titrimetric and sepectrophotometric determination of furosemide in formulations using bromate-bromide mixture and methy orange. Indian J Chem Technol. 2005; 12: 149–155.
- Batzias GC, Deli GA, Koutsoviti-Papadopoulou M. A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum. J Pharm Biomed Anal. 2004; 32: 545-554.
- BOE de 21/1/2015. Orden SSI/23/2015, de 15 de enero, por la que se aprueba la 5ª edición de la Real Farmacopea Española y la 2ª edición del Formulario Nacional.
- Castillo B. De las farmacopeas de ayer y hoy. Zaragoza. Discurso de presentación. Academia de Farmacia. 2014.
- Colcū A. Spectrophotometric determination of Furosemide in pharmaceutical dosage forms using complex formation with Cu (II). J Analyt Chem. 2006; 61: 748-754.
- Cuadros L, Gámiz L, Carrasco A, Ruiz C. Glosario de Términos Analíticos, 1º ed. GRASECA; 2013.
- De Jaime JL. Bibliografía Farmacéutica: Farmacopeas. Valencia. Universidad Cardenal Herrera- CEU. 2002.

- Deubel A, Holzgrabe U. Development of an enhanced separation of erythromycin and its related substances by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 43: 493-498.
- Erk N. Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 26: 43-52.
- Espinosa BM, Ruiz-Sánchez AJ, Sánchez-Rojas F, Bosch-Ojeda C. Recent developments in analytical determination of furosemide. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48: 519-532.
- Gangola R, Kaushik S, Sharma P. Spectrophotometric simultaneous determination of hydrochlorothiazide and telmisartan in combined dosage form. *J Appl Pharm Sci.* 2011; 01: 46-49.
- Gbylik-Sikorska M, Gajda A, Nowacka-Kozak E, Posyniak A. Simultaneous determination of 45 antibacterial compounds in mushrooms - *Agaricus bisporus* by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2019; 1587:111-118.
- Hassib ST, Farag AE, Elkady EF. Liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of erythromycin stearate and trimethoprim in tablets. *Bull Fac Pharm Cairo Univ.* 2011; 49: 81-89.
- Hernández L, González C. *Introducción al análisis instrumental.* 1ª ed. Ariel S.A. Barcelona; 2002.
- López KJ, Bertoluci DF, Vicente KM, Dell'Aquila AM, Jorge-Santos SRC. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 2007; 860:241-245.
- Mamani MC, Reyes FG, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem.* 2009; 117: 545-552.
- Platzer DJ, White BA. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 41: 84-88.

- Real Academia Española. (2019). Diccionario de la Real Academia Española. 23ª ed. Consultado en <http://www.rae.es>
- Real Farmacopea Española. (en línea). [consultado en febrero, marzo, abril, mayo y junio de 2019]. Disponible en: <https://extranet.boe.es/farmacopea/index.php>
- Rubinson K, Rubinson J. Análisis Instrumental. 1ª ed. Pearson Educacion, S.A.; Madrid; 2000.
- Semaan FS, Santos AJ, Lancas FM, Cavalheiro E T. Rapid HPLC-DAD determination of furosemide in tablets using a short home-made column. Anal Lett. 2005; 38: 1651-1658.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw-Hill; 2003.
- Süslü I, Altinöz S. Two derivative spectrophotometric determinations of indapamide in pharmaceutical dosage forms. J Pharm Biomed Anal. 2002; 30: 357-364.
- Tengli AR, Gurupadayya, Soni N. Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC. Int J Chem Anal Sci Tech Res. 2013; 4: 33- 38.
- Yang ZY, Wang L, Tang X. Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. J Pharm Biomed Anal. 2009; 49: 811-815.
- Ye G, Caia X, Wang B, Zhou Z, Yu X, Wang W, Zhang J, Wang J, Dong J, Jiang Y. Simultaneous determination of vancomycin and ceftazidime in cerebrospinal fluid in craniotomy patients by high-performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal. 2008; 48: 860-865.
- Zivanovic L, Agatonović S, Radulović D. Spectrophotometric determination of furosemide as its Fe(III) complex in pharmaceutical preparations. Mikrochim Acta. 1990; 100: 49-54.

Anexo I. 2. Métodos analíticos: 2.2. Métodos físicos y físicoquímicos incluidos en la Real Farmacopea Española

- 2.2.1. Limpidez y grado de opalescencia de los líquidos
- 2.2.2. Grado de coloración de los líquidos
- 2.2.3. Determinación potenciométrica del pH
- 2.2.4. Correspondencia entre la reacción del medio, el pH aproximado y la coloración de algunos indicadores
- 2.2.5. Densidad relativa
- 2.2.6. Índice de refracción
- 2.2.7. Rotación óptica
- 2.2.8. Viscosidad
- 2.2.9. Método del viscosímetro capilar
- 2.2.10. Viscosidad - Método del viscosímetro rotatorio
- 2.2.11. Intervalo de destilación
- 2.2.12. Punto de ebullición
- 2.2.13. Determinación de agua por arrastre
- 2.2.14. Punto de fusión - Método del tubo capilar
- 2.2.15. Punto de fusión - Método del tubo capilar abierto
- 2.2.16. Punto de fusión - Método de la fusión instantánea
- 2.2.17. Punto de gota
- 2.2.18. Punto de solidificación
- 2.2.19. Valoración amperométrica
- 2.2.20. Valoración potenciométrica
- 2.2.21. Fluorimetría
- 2.2.22. Espectrometría de emisión atómica
- 2.2.23. Espectrometría de absorción atómica
- 2.2.24. Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo
- 2.2.25. Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta y en el visible
- 2.2.26. Cromatografía en papel
- 2.2.27. Cromatografía en capa fina
- 2.2.28. Cromatografía de gases
- 2.2.29. Cromatografía de líquidos
- 2.2.30. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular
- 2.2.31. Electroforesis
- 2.2.32. Pérdida por desecación
- 2.2.33. Espectrometría de resonancia magnética nuclear
- 2.2.34. Análisis térmico
- 2.2.35. Osmolalidad
- 2.2.36. Determinación potenciométrica de la concentración iónica mediante electrodos selectivos
- 2.2.37. Espectrometría de fluorescencia por rayos X
- 2.2.38. Conductividad
- 2.2.39. Distribución de la masa molecular de los dextranos
- 2.2.40. Espectrofotometría en el infrarrojo cercano
- 2.2.41. Dicroísmo circular
- 2.2.42. Densidad de sólidos
- 2.2.43. Espectrometría de masas
- 2.2.44. Carbono orgánico total en agua destinada a uso farmacéutico
- 2.2.45. Cromatografía de fluidos supercríticos
- 2.2.46. Técnicas de separación cromatográfica
- 2.2.47. Electroforesis capilar
- 2.2.48. Espectrometría Raman
- 2.2.49. Método del viscosímetro de caída de bola
- 2.2.54. Isoelectroenfoco
- 2.2.55. Cartografía peptídica
- 2.2.56. Análisis de aminoácidos
- 2.2.57. Espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo
- 2.2.58. Espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inductivo
- 2.2.59. Análisis de glicanos de glicoproteínas
- 2.2.60. Punto de fusión - Método instrumental
- 2.2.61. Caracterización de sólidos cristalinos por microcalorimetría y calorimetría de disolución
- 2.2.64. Identificación de péptidos por espectrometría de resonancia magnética nuclear
- 2.2.65. Valoración voltamétrica