

V.4.3.2.1. Anàlisi dels loadings

L'avantatge del nPLS resideix en què al descompondre els dos ordres (cinètic i espectral) independentment, permet una més fàcil interpretació. Tanmateix, ens trobem davant una situació mancada de la linealitat necessària a fi de treure el màxim profit d'aquestes avantatges inherents als algorismes Multi Via. Això provoca que la capacitat d'interpretació estigui clarament disminuïda, ja que cada factor no es troba relacionat amb la contribució en solitari de cada una de les fonts de variabilitat de les dades enregistrades, sinó que és el resultat d'una combinació d'aquestes.

Per començar amb l'estudi dels diferents loadings obtinguts en la construcció dels diferents models de calibració, a les figures 5.14, 5.15 A-B i 5.16 A-B es mostra l'evolució amb el temps dels espectres de primera derivada per a diferents mostres, així com els perfils cinètics a diferents longituds d'ona. Les dades representades a la figura 5.14 es corresponen concretament a una mescla que conté sulfatiazol i sulfadiazina $3,0 \times 10^{-4}$ M, sulfamerazina $0,5 \times 10^{-4}$ M i sulfametazina $2,2 \times 10^{-4}$ M, i en les altres figures a cada una per separat a una concentració $5,0 \times 10^{-4}$ M.

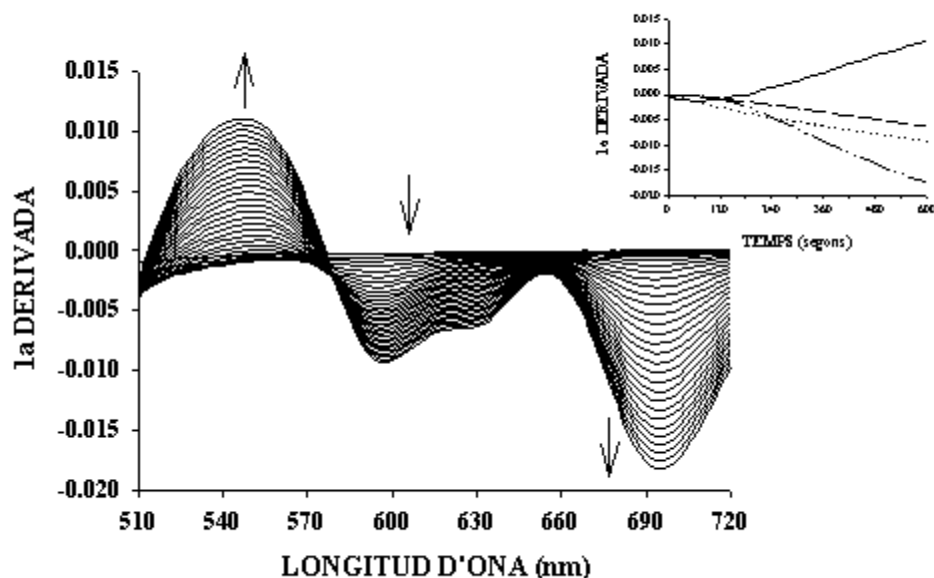


Figura 5.14. Evolució dels espectres de 1r derivada dels productes de reacció d'una mescla de sulfonamides. Perfils cinètics a 540 nm (—), 600 nm (...), 630 nm (---) i 690 nm (- -).

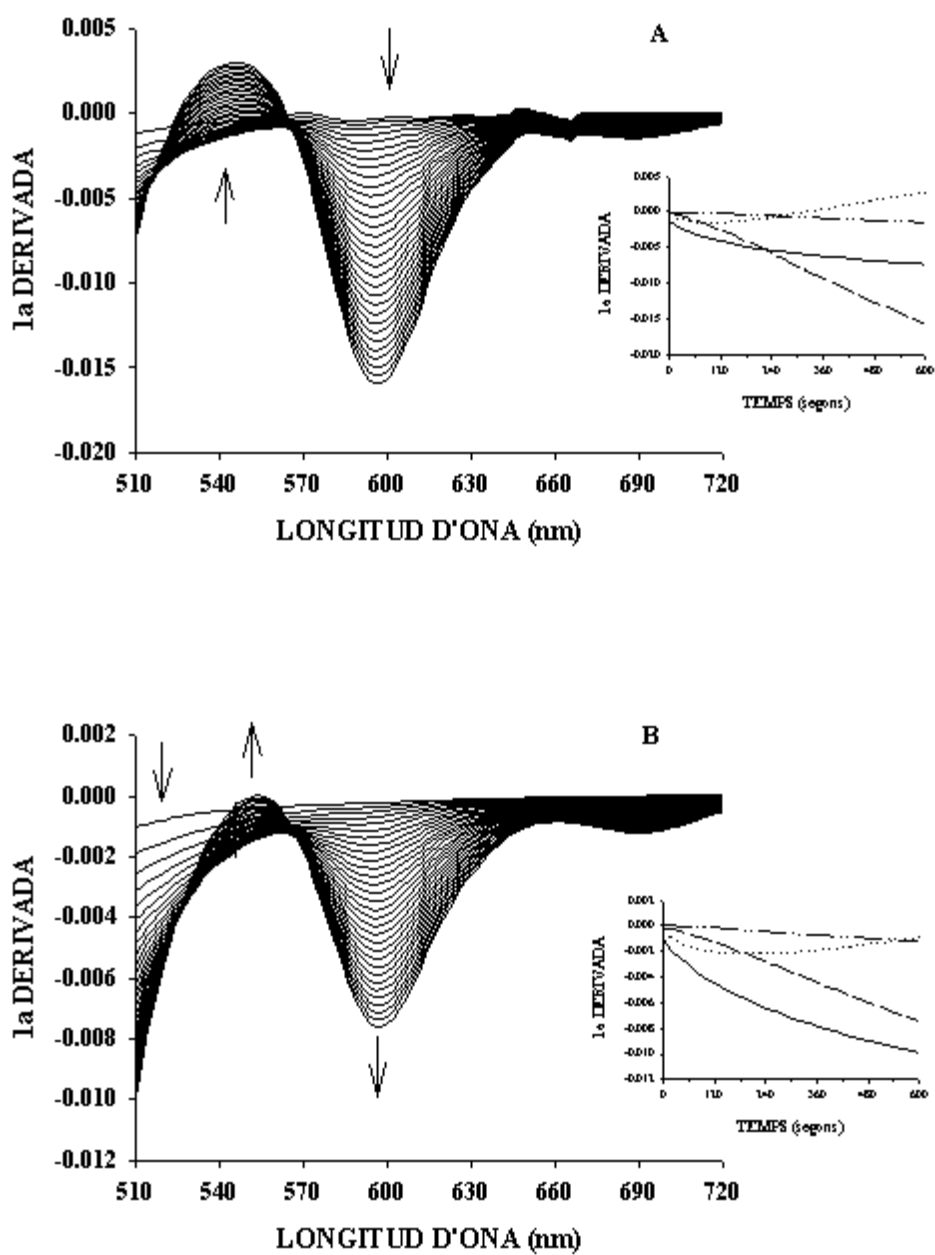


Figura 5.15 A-B. Evolució dels espectres de 1r derivada dels productes de reacció del sulfatiazol (A) i de la sulfadiazina (B). Perfils cinètics a 510 nm (—), 540 nm (...), 600 nm (---) i 690 nm (- -).

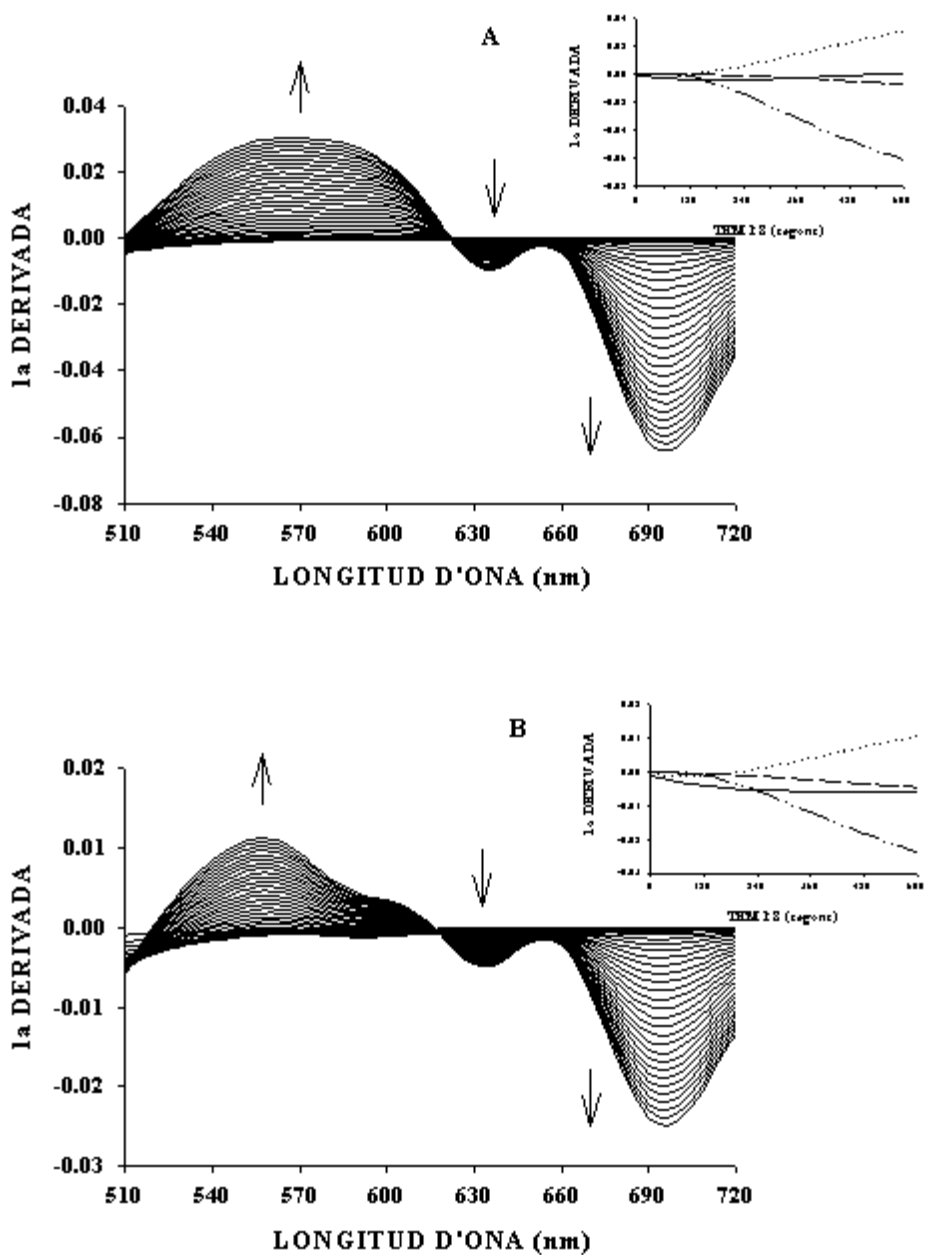


Figura 5.16 A-B. Evolució dels espectres de 1r derivada dels productes de reacció de la sulfamerazina (A) i sulfametazina (B). Perfils cinètics a 510 nm (—), 550 nm (...), 630 (--) i 690 nm(- -).

Observant les diferents figures, es pot apreciar que si bé la contribució per part de la sulfametazina i la sulfamerazina és la majoritària en tot el rang espectral, la contribució per part del sulfatiazol i sulfadiazina és molt notable en la regió centrada sobre 600 nm, especialment per temps curts de reacció. A més a més, tenim que el sentit de l'evolució espectral en aquesta zona és oposada entre les parelles sulfatiazol-sulfadiazina i sulfamerazina-sulfametazina, cosa que queda totalment reflectida en el perfil cinètic a 600 nm de la mescla representada a la figura 5.14. Inicialment aquest perfil cinètic recorda al perfil del sulfatiazol i la sulfadiazina, però a mesura que avança el temps de registre, presenta un pendent cada cop menor, atribuïble a la contribució per part de la sulfamerazina i sulfametazina un cop superat el seu temps d'inducció.

També és interessant ressaltar l'escassa discriminació entre el senyal proporcionat entre els components de cada parella de sulfonamides. Per un cantó, les màximes diferències espectrals entre el sulfatiazol i la sulfadiazina es troben localitzades al voltant de 510 nm i 690 nm, és a dir, en els dos extrems del rang espectral. Pel que fa a les altres dues espècies, tenim que hi ha certa diferència espectral localitzada en la banda situada sobre 570 nm de l'espectre de derivada.

Quant a les diferències cinètiques, cal dir que malauradament costen de veure, ja que els perfils cinètics són força paral·lels entre els dos components de cada parella.

A títol d'exemple, a les figures 5.17 A-D es mostra el primer loading cinètic i espectral del model nPLS1 de cada sulfonamides.

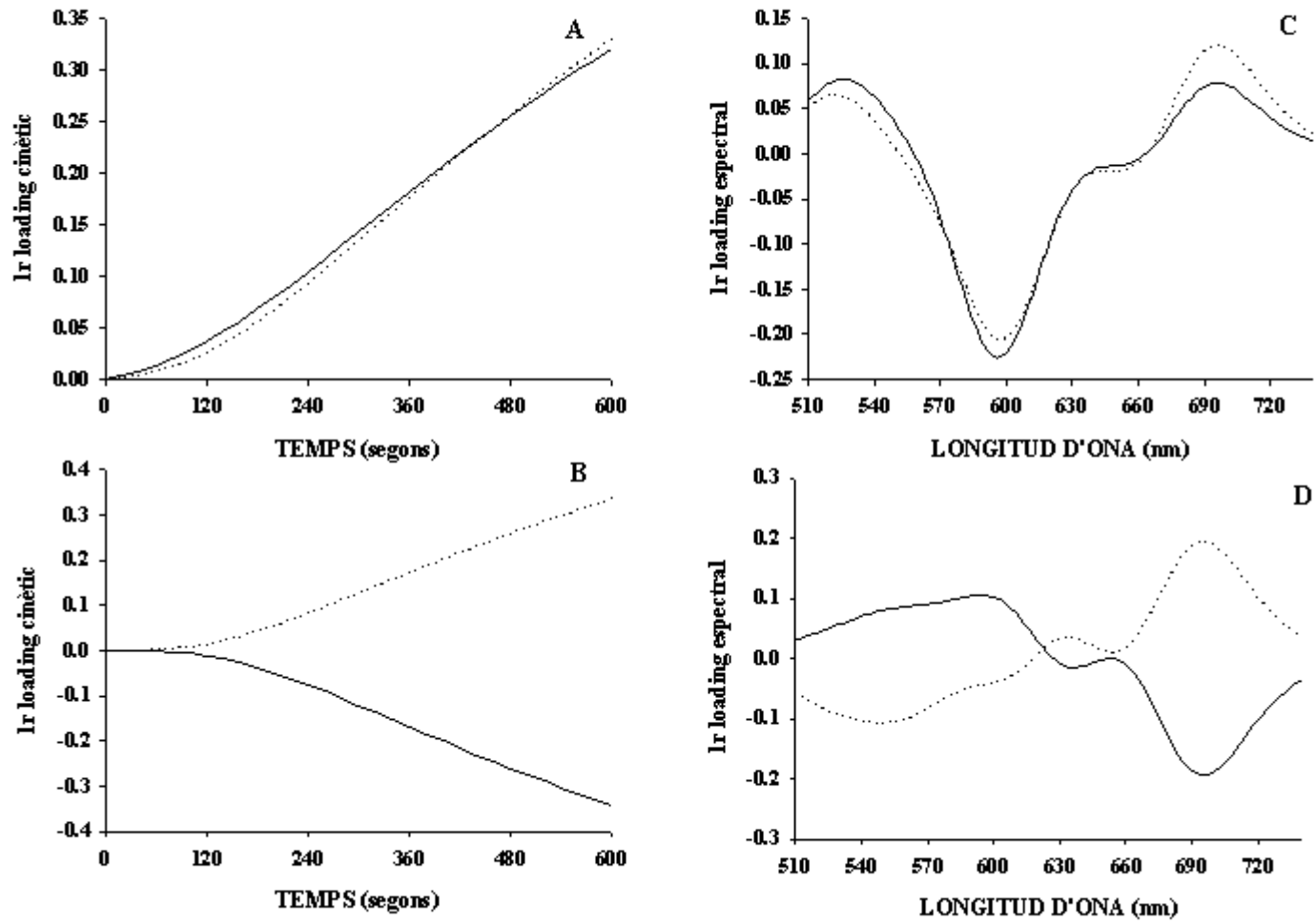


Figura 5.17 A-D. Representació del primer loading associat a l'ordre de mesura cinètic i espectral pels models nPLS1 del sulfatiazol (—) i sulfadiazina (...) (A i C), i de la sulfamerazina (—) i sulfametazina (...) (B, D).

V.4.3.2.1.1. Parella sulfatiazol-sulfadiazina

Si es passa a un estudi més en detall dels loadings associats a les espècies sulfatiazol i sulfadiazina, es troba una gran similitud entre els loadings cinètics, atribuïble al fet que en ells s'inclou informació força relacionada (figura 5.17 A). Però aquests loadings no són del tot paral·lels, i és evident pensar que estan modelant les diferències cinètiques existents entre el sulfatiazol i la sulfadiazina. En el cas del sulfatiazol s'assoleixen valors de la variància explicada del 94,3% amb els tres primers loadings, si bé que per la sulfadiazina únicament del 42,8%.

En relació als loadings espectrals, es veu clarament que el primer d'ells recorda totalment als espectres de la primera derivada dels productes de reacció del sulfatiazol i la sulfadiazina (figura 5.17 C), fent-se molt més evidents les diferències que hi ha en els seus extrems. La resta de loadings també mostren petites diferències que permeten assolir una bona resolució per aquestes espècies, però per la seva forma, sembla que siguin barreges dels espectres derivats de les quatre sulfonamides.

V.4.3.2.1.2. Parella sulfamerazina-sulfametazina

Respecte als loadings associats a les espècies sulfamerazina i sulfametazina, és de destacar l'enorme similitud entre els loadings cinètics (figura 5.17 B), encara que són de signe oposat, cosa que indica que aquestes dues sulfonamides presenten escassa discriminació cinètica. També es veu la presència d'un període d'inducció important que concorda clarament amb les dades experimentals.

Pel que fa als loadings espectrals, el primer d'ells s'assembla molt a l'espectre de la primera derivada dels productes de reacció de la sulfamerazina i la sulfametazina (figura 5.17 D), i curiosament, el segon loading recorda totalment als espectres de la primera derivada de les altres dues espècies contingudes en la mescla. Quant als següents loadings, aquests presenten una estructura complexa resultat de la combinació dels espectres de totes les espècies contingudes en la mescla. Alguns d'ells són idèntics per la sulfamerazina i la sulfametazina, però també n'hi ha que són diferents. Aquests darrers segurament estan modelant les diferències espectrals existents i permeten arribar a resoldre les mescles de les dues sulfonamides estudiades.

V.4.3.2.1.3. Conclusions

Com a conclusió de tot aquest estudi, es pot dir que les diferències entre el senyal cinètic i espectral proporcionat per les espècies sulfatiazol i sulfadiazina són suficients per ser resoltes per mitjà de les tècniques de calibració multivariable, si bé que l'escassa contribució d'aquesta última fa que es confongui amb el soroll provocat per fonts de variabilitat més importants, no podent arribar a les bones prediccions assolides per el sulfatiazol.

En quant a les altres dues sulfonamides, dir que s'han pogut arribar a resoldre gràcies a les petites diferències espectrals, ja que les cinètiques no semblen que siguin suficients.

V.4.3.3. CONSTRUCCIÓ DE MODELS ANN

Com a última etapa en la construcció dels models de calibració, s'assagen les xarxes neuronals artificials (ANNs), les quals a diferència dels anteriors algoritmes, presenten una elevada eficiència per a resoldre sistemes amb un fort caràcter no-lineal.

Les millores més importants es busquen especialment en les prediccions de la sulfadiazina, atès als pitjors resultats obtinguts per aquest analít que mostra una contribució menor al senyal total mesurat. Així doncs, per aquest analít, s'assagen models del tipus PCR-ANN i PLS-ANN, els quals són construïts utilitzant els mateixos intervals de longituds d'ona i de temps que els models PLS anteriors.

Inicialment s'escull el número de nodes de la capa oculta, mantenint constant els altres paràmetres de la xarxa com ara el número de scores en la capa d'entrada.

Un cop fixades les neurones de la capa oculta, es realitza també la selecció del número de scores òptim a introduir en la capa d'entrada de les xarxes PCR-ANN i PLS-ANN construïdes. Per a fer-ho s'agafen diferents combinacions dels scores, eliminant aquells que mostren una correlació amb la concentració de SDZ inferior a 0,1. Els millors resultats s'obtenen amb un model ANN-PLS, d'arquitectura (12, 4, 1), que proporciona un valor de RSEP%, per les mostres del conjunt extern de 8,3, és a dir, pràcticament el mateix valor que els obtinguts anteriorment. Aquesta no-millora indica que el menor ajust en la quantificació de la sulfadiazina no és deguda a la no-linealitat sinó a la reproduïbilitat intrínseca del sistema cinètic.

Generalitzant aquesta conclusió, podem dir que el desenvolupament de models ANN només es justifica quan l'error de predicció del PLS és netament superior a la reproduïbilitat del sistema.

V.4.4. ANÀLISI DE SULFONAMIDES EN MOSTRES COMERCIALS

Com en els altres capítols d'aquesta memòria, la darrera etapa del treball experimental consisteix en demostrar l'aplicabilitat del mètode cinètic posat a punt, en mostres comercials que contenen mescles de les sulfonamides estudiades.

A la taula 5.8 es mostra el contingut mig (en mg per ml de mostra) amb el seu interval de confiança per un nivell de significació del 95%, de les sulfonamides contingudes en les dues formulacions farmacèutiques analitzades, per aplicació dels models PLS1.

Per la mostra comercial Coccitaber®-N, els resultats es corresponen perfectament amb els valors especificats en la etiqueta pel fabricant. En canvi, per l'altra mostra comercial GranadilSulfa®, els resultats no s'assemblen amb els valors nominals que es troben descrits per aquesta mostra. L'anàlisi cinètic efectuat no només rebel·la un contingut mot superior en sulfadiazina, sinó que sorprenentment també posa de manifest l'absència de la sulfamerazina en aquesta formulació i la presència en el seu lloc de la sulfametazina.

Després de comprovar que no hi ha res estrany en els residuals de les prediccions d'aquestes mostres que pugui fer pensar que no són iguals a les mostres preparades al laboratori, es creu que segurament hi ha un error per part del fabricant. És més, el fet que s'hagués demostrat anteriorment que l'existència de les quatre sulfonamides pot ser afirmada amb una elevada probabilitat en mescles contingudes dins dels intervals de concentració definits per les mostres de calibració, i la simple observació de la figura 5.18 on es comparen els espectres d'una mostra de GranadilSulfa® i una mostra sintètica, ens obliga a portar a terme una comprovació experimental del contingut i composició de la dissolució GranadilSulfa® per mitjà d'un mètode de referència.

D'aquesta manera es posa a punt un mètode HPLC basat en el proposat per Goeht et al.[Goeht, 1978]. La correcta separació de les quatre sulfonamides s'assoleix amb una columna de fase reversa C₁₈ Kromasil 100 (15 × 0,46 cm, 5 μm, Tracer), i la fase mòbil que s'utilitza és una barreja 1% àcid acètic-acetonitril (88+12) amb un cabal volumètric de 1 ml × min⁻¹. La

detecció de les espècies es fa als màxims de cada sulfonamida. A les figures 5.19 A-B es mostren els cromatogrames corresponents a una dissolució de la mescla comercial GranadilSulfa (figura 5.19 A), i d'una mescla que conté les quatre sulfonamides (figura 5.19 B). Es pot veure clarament l'absència de la sulfamerazina i la presència de la sulfametazina, cosa que es comprova mitjançant l'addició a la mostra comercial una quantitat de sulfametazina, i la observació dels espectres d'absorbància de cada pic.

Els resultats obtinguts d'aquests anàlisi són idèntics als resultats trobats pel mètode proposat en aquest treball. Ambdós mètodes confirmen que és la sulfametazina la que es troba present en el preparat comercial, encara que sigui la sulfamerazina la que es trobi en el prospecte. Un resultat semblant de confusió entre la sulfamerazina i la sulfametazina es troba descrit en la bibliografia [Galeano Diaz, 1996].

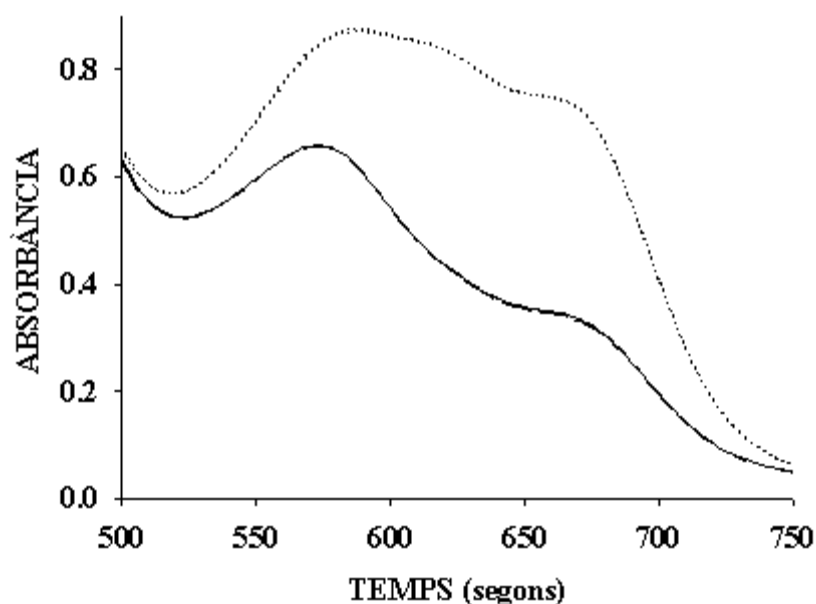


Figura 5.18. Espectres de la mescla de reacció als 20 min, per GranadilSulfa (—) (---), i per una mostra preparada al laboratori (...) que conté la mateixa composició que la detallada a l'etiqueta.

Taula 5.8. Contingut mig de les sulfonamides (en mg per ml de mostra) i el seu corresponent interval de confiança a $\alpha = 0,05$ en les dues formulacions farmacèutiques, obtingut a partir dels models PLS1 (n=6).

	PLS1			
	Sulfatiazol	Sulfadiazina	Sulfamerazina	Sulfametazina
COCCITABER®-N(50/—/30/120 mg×ml ⁻¹)	53 ± 1	1 ± 3	27 ± 1	116 ± 3
GRANADILSULFA® (100/50/50/— mg×ml ⁻¹)	101 ± 4	87 ± 10	-2 ± 1	57 ± 5