

Diferenciación de ácido acetilsalicílico utilizando la técnica de Espectroscopía Raman y el análisis de componentes principales

Differentiation of acetylsalicylic acid using Raman Spectroscopy technique and the principal components analysis

Juan Carlos Martínez-Espinosa^{*,**}, Nayem Amtanus-Chequer^{*}, Karen Cruz-Solano^{*}, Octavio Elias-Campos^{*}, Fabiola Flores-Amaro^{*}, Luz del Carmen Luna-Chavez^{*}, Daniel Martínez-Pedroza^{*}, Miguel Martínez-Rangel^{*}, Omar Murillo-Ayala^{*}, Lilia Paniagua-Picasso^{*}, Aldelmo Reyes-Pablo^{*}, José Luis González-Sólis^{**}

RESUMEN

Recientemente, la técnica espectroscópica Raman ha sido aplicada en áreas como médicas, farmacéuticas y nanotecnología para determinar las concentraciones y diferencias en las soluciones de compuestos orgánicos e inorgánicos. En este trabajo se analizaron las diferencias respecto a las concentraciones de los compuestos de una forma farmacéutica derivada del ácido acetilsalicílico comercial -en forma de comprimido- fabricado por 5 diferentes laboratorios. Los datos en bruto se obtuvieron a partir del ácido acetilsalicílico como principio activo; 5 muestras de diferentes laboratorios fueron analizadas. El bloque espectral se obtuvo utilizando un equipo de microscopía Raman Horiba-JY HR800 con una fuente de excitación de 830 nm y 17 mW de potencia. El algoritmo del PCA fue desarrollado en MatLab y aplicado al bloque espectral. Se concluye que la aplicación de la Espectroscopía Raman a la farmacología ofrece información sobre la efectividad farmacológica del ácido acetilsalicílico como analgésico y antipirético.

ABSTRACT

Recently, the Raman Spectroscopy technique has been applied in areas such as medical, pharmaceutical and nanotechnology to determine the concentrations and differences in the solutions such as organic and inorganic compounds. In this work, we analyzed the differences in concentrations of compounds in a pharmaceutical form derived from commercial acetylsalicylic acid tablet manufactured by 5 different laboratories. The raw data were obtained from acetylsalicylic acid as active principle; 5 samples of different laboratories were evaluated. The block of spectrum was obtained using a Raman microscopy Horiba-JY HR800 with an excitation source of 830 nm and 17 mW of power. The PCA algorithm was developed in MatLab software and applied to the spectral block. It is concluded that the application of Raman Spectroscopy to pharmacology provides information on pharmacological effectiveness of acetylsalicylic acid as analgesic and antipyretic.

INTRODUCCIÓN

La Espectroscopía Raman (ER) es una técnica analítica basada en la dispersión inelástica de luz monocromática [1]. Dicha técnica ha cobrado gran relevancia en los últimos años debido a su variedad de aplicaciones en áreas como la mineralogía, investigación forense, biología y medicina [2-4]. Actualmente es utilizada para la caracterización de fármacos, estructuras óseas, pesticidas orgánicos, entre otros [5-7].

La ER tiene un papel muy importante en el análisis de las etapas del diseño de productos farmacéuticos y proceso de producción. Las aplicaciones de la espectroscopía en este campo son la supervisión y control de procesos de fabricación a gran escala, con el fin de perfilar la distribución de ingredientes farmacéuticos activos y excipientes en diferentes etapas de un ciclo de formulación [7]. Esta técnica ofrece una incomparable discriminación de los materiales, capaz de analizar muestras líquidas y sólidas; además, es

Recibido: 3 de marzo de 2012
Aceptado: 1 de junio de 2012

Palabras clave:
Espectroscopía Raman; análisis de componentes principales; ácido acetilsalicílico.

Keywords:
Raman Spectroscopy; principal components analysis; acetylsalicylic acid.

^{*}Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingenierías. Campus Guanajuato. Instituto Politécnico Nacional. Av. Mineral de Valenciana n. 200, fracc. Industrial Puerto Interior, C. P. 36275, Silao de la Victoria, Gto., México. Tel. conmutador (55) 57 296000, ext. 81315, fax: 81450. Correo electrónico: jcmartineze@ipn.mx.

^{**}Universidad de Guadalajara-Centro Universitario de los Lagos, Av. Enrique Díaz de León n.1144 Paseos de la Montaña, C.P. 47460, Lagos de Moreno, Jalisco, México.

particularmente adecuada para combinarse con otras técnicas de análisis, ya que proporciona un análisis no destructivo y que requiere poca o ninguna preparación de la muestra [8].

El ácido acetilsalicílico se utiliza ampliamente como analgésico y antipirético, es altamente inestable y fácilmente hidrolizado en solución acuosa [9]. Este compuesto tiene un aspecto cristalino a temperatura ambiente. De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)[10], la formulación general para preparar una tableta de ácido acetilsalicílico está definida como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1.

Formulación general de tableta de ácido acetilsalicílico (excipiente c. b. p. 1 tableta)

| Materias primas | Cantidad (mg) |
|------------------------|---------------|
| Ácido acetilsalicílico | 500,0 |
| Dextrosa | 13,0 |
| A Vicel pH 1 | 76,0 |
| Almidón | 46,0 |
| Talco | 27,0 |
| TOTAL | 662,0 |

Durante la fabricación de este fármaco, se pueden presentar diversas anomalías que no son detectadas durante el proceso y que modifican las concentraciones o las sustancias que lo conforman, obteniendo así un producto adulterado o alterado.

Ahora bien, la mayor parte del comercio de medicamentos falsificados se desarrolla en países del continente asiático. La variedad de productos falsificados también ha aumentado debido a la difusión del comercio por la Internet, que abarca una gama desconcertante de fármacos (tanto de marca comercial como genéricos). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en más del 50 % de los casos se ha comprobado que los medicamentos adquiridos a través de sitios web sin domicilio social declarado son productos falsificados. Se estima que cerca del 1 % de los medicamentos vendidos en el mercado regular mexicano (farmacias con licencia sanitaria) son falsificados, porcentaje que se eleva al 3 % en el caso del mercado informal (puestos en los mercados, depósitos clandestinos, casas acondicionadas como farmacias y pseudo-farmacias sin licencia) [11]. Partiendo de esta información, surge la inquietud de identificar las diferencias bioquímicas entre comprimidos de ácido acetilsalicílico fabricados por distintos laboratorios.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó un equipo de ER de la marca Horiba Jobin Yvon LabRAM HR 800 con una fuente de excita-

ción láser de 830 nm, un microscopio integrado Olympus con objetivo de 100X y una potencia de 17 mW. La calibración del equipo se llevó a cabo con una muestra de silicio.

Se evaluaron cinco muestras de diferentes laboratorios de tabletas de ácido acetilsalicílico (las cuales fueron adquiridas en diferentes establecimientos comerciales) y una muestra de ácido acetilsalicílico como principio activo grado técnico de la marca Meyer. Por cada muestra se obtuvieron cinco espectros apuntando el láser en diferentes regiones del fármaco, recolectando un total de 35 espectros.

El registro de los datos espectrales se realizó en el rango de 200 cm^{-1} a 2 000 cm^{-1} con una resolución 0,6 cm^{-1} , un tiempo de exposición de 10 s y un tiempo de integración de 5 s.

Se llevó a cabo la corrección de línea base a todo el bloque espectral por el método de mínimos cuadrados para eliminar el ruido de fondo, siguiendo el método propuesto por Lieber y colaboradores, y Peng y colaboradores [12-13]. Se normalizó el pico de mayor intensidad, tal y como se observa en la figura 1.

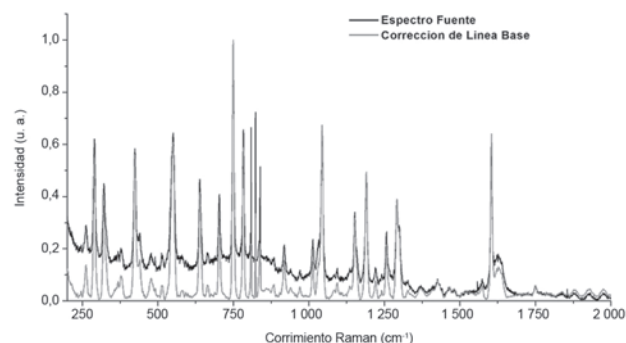


Figura 1. Corrección de línea base de espectros Raman fuentes.

Todos los espectros procesados fueron analizados en el rango de 200 cm^{-1} a 2 000 cm^{-1} . El bloque de 5 espectros de cada laboratorio fue promediado y comparado entre cada uno de ellos. El procesamiento de la información se llevó a cabo mediante el software MatLab versión 2011a y Origin 8,5.

RESULTADOS

En la figura 2 se puede observar comparativamente cada promedio espectral de cada muestra de laboratorio evaluada con respecto al principio activo.

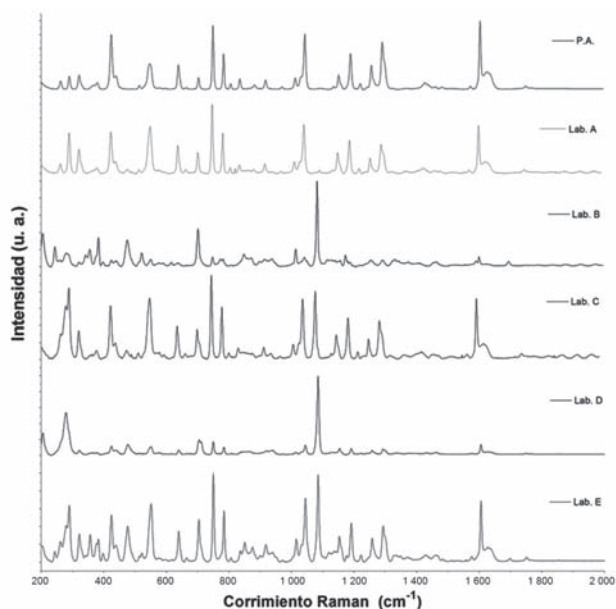


Figura 2. Comparación de los espectros Raman obtenidos a partir de la media de los datos contra el corrimiento Raman para cada laboratorio y principio activo. P. A.: principio activo; Lab.: laboratorio.

Una diferencia aritmética espectral fue llevada a cabo entre el principio activo y cada una de las muestras correspondientes a los diferentes laboratorios. Cada banda sobrepuesta en la figura 3 indica la presencia de una diferencia significativa con respecto al principio activo.

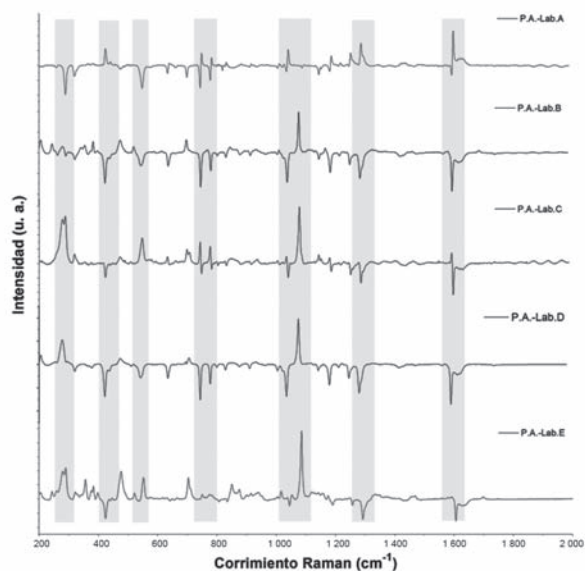


Figura 3. Comparación de las diferencias espectrales entre las intensidades de los diferentes laboratorios y el principio activo. P. A.: principio activo; Lab.: laboratorio.

El bloque espectral con la diferencia de cada espectro -con referencia al espectro del principio activo- fue evaluado mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), en el que todos los corrimientos fueron comparados entre sí para localizar diferencias y formar la matriz de covarianzas. De este modo, se encontró un nuevo espacio de coordenadas de terminado por el análisis de componentes principales.

Se observa en la figura 4 y la figura 5 que los laboratorios A y C son los que conservan las mejores características con respecto al principio activo. Por otra parte, los laboratorios B y D difieren significativamente con respecto al principio activo, sin embargo, existe homogeneidad en ellos. El laboratorio E presenta diferencias significativas con respecto al principio activo, pero también resultó inhomogéneo en el mismo (es decir, en la compactación del fármaco, las concentraciones resultaron no homogéneas).

Así también podemos verificar que la Componente Principal 1 contiene las varianzas máximas entre el principio activo y los diferentes laboratorios.

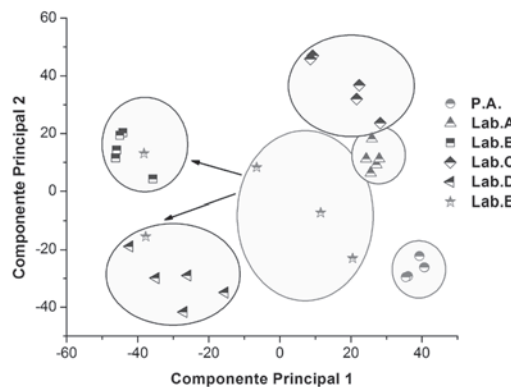


Figura 4. PCA aplicado a los 35 espectros procesados: Componente Principal 1 versus Componente Principal 2. P. A.: principio activo; Lab.: laboratorio.

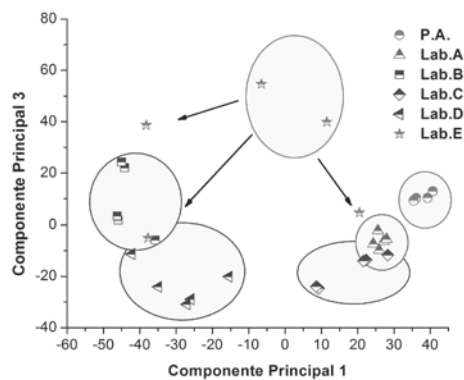


Figura 5. PCA aplicado a los 35 espectros procesados: Componente Principal 1 versus Componente Principal 3. P. A.: principio activo; Lab.: laboratorio.

También fue observada una buena distribución al graficar las tres primeras componentes principales (figura 6). Aquí se observa como los laboratorios A y C son los de mayor calidad con respecto a los demás laboratorios analizados. De tal suerte, podemos deducir que el de menor calidad es el laboratorio E.

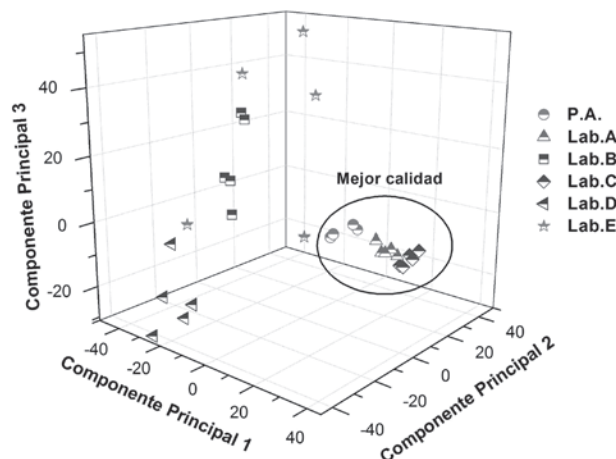


Figura 6. PCA aplicado a los 35 espectros procesados: Componente Principal 1 versus Componente Principal 2 versus Componente Principal 3. P. A.: principio activo; Lab.: laboratorio.

Se localizaron las diferencias más pronunciadas entre los espectros de laboratorios, menos principio activo, para asociar los principales grupos funcionales y componentes químicos de la molécula (para así comparar las diferencias entre los 5 laboratorios).

Las bandas asociadas para cada intensidad que marcó diferencia son mostradas en la tabla 2. Al comparar los espectros de las muestras tomadas de diferentes laboratorios, se encontró un perfil espectral similar entre ellos, denotando significativas variaciones, lo que indica que las diferencias son cambios en la composición de la muestra.

Tabla 2. Frecuencias Raman asociadas a las diferencias espectrales localizadas.

| Corrimiento Raman (cm ⁻¹) | Asignación |
|---------------------------------------|--|
| 281-290 | δs(CC), cadenas alifáticas |
| 420-430 | ν(S=S) |
| 550 | ν(C-Cl) |
| 747 | ν(C-Br) |
| 785 | ν(C(alifáticos)-S) |
| 1 040-1 050 | ν((C)SO(-C)) |
| 1 080-1 090 | ν(C(aromáticos)-S) |
| 1 290-1 295 | V(CC), cadenas alifáticas, alicíclicos |
| 1 605 | ν(C=N) |

Se identificó una diferencia en el rango de 281 cm⁻¹ -290 cm⁻¹, donde se propician los enlaces C-C de cadenas alifáticas. En el rango de 420 cm⁻¹-430 cm⁻¹, también se localizaron diferencias asociadas a enlaces S-S. En este caso, en la molécula del principio activo a estudiar (ácido acetilsalicílico) no existen este tipo de enlaces S-S, por lo tanto, se trata del excipiente o vehículo que contiene la muestra. Así también, en el corrimiento 550 cm⁻¹, existe la unión C-Cl, lo cual indica que existe una composición diferente a la del ácido acetilsalicílico. En la banda 747 cm⁻¹ y 785 cm⁻¹ se presentaron diferencias que no corresponden a la molécula original del ácido acetilsalicílico, presentando enlaces C-Br y C-S dentro de un enlace alifático, respectivamente. En el corrimiento 1040 cm⁻¹-1050 cm⁻¹, se comienzan a presentar los anillos que componen la molécula del fármaco (si bien es cierto que podemos encontrar anillos unidos a oxígeno, grupos metilos, ácidos carboxílicos e incluso a un mismo carbono, como se encuentra en los siguientes rangos de corrimientos 1 080 cm⁻¹-1 090 cm⁻¹, 1 290 cm⁻¹ - 1 295 cm⁻¹, 1 605 cm⁻¹).

CONCLUSIONES

La Espectroscopía Raman en conjunto con el análisis de componentes principales forma una herramienta potente para el estudio de fármacos en la industria farmacéutica. Por otra parte, estas herramientas pueden ser aplicadas para llevar a cabo un control de calidad bajo los estándares establecidos para cada fármaco. De forma similar, es posible encontrar diferentes concentraciones de principio activo, así como el uso de diferentes vehículos y excipientes aplicando la ER y el análisis multivariado.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 45 488 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social.

REFERENCIAS

- [1] Das, R. S. and Agrawal, Y. K. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy* 57: pp. 163-176.
- [2] Whiteside, P. T., Luk, S. Y., Madden-Smith, C. E., Turner, P., Patel, N. and George, M. W. (2008). Detection of low levels of amorphous lactose using H/D exchange and FT-Raman spectroscopy. *Pharm Res* 25(11): pp. 2650-2656.
- [3] Huang, Z., Chen, X., Chen, Y., Chen, J., Dou, M., Feng, S., Zeng, H. and Chen, R. (2011). Raman spectroscopic characterization and differentiation of seminal plasma. *J Biomed Opt* 16(11): p. 110501.

- [4] Hoehse, M., Paul, A., Gornushkin, I. and Panne, U. (2012). Multivariate classification of pigments and inks using combined Raman spectroscopy and LIBS. *Anal Bioanal Chem* 402(4): pp. 1443-1450.
- [5] Cluff, G. M., Short, M. A., Lui, H., McLean, D. I., Zeng, H., Korbelikb, M. and Chen, M. X. (2009). Comparison of connective tissue invaded by Lewis lung carcinoma to healthy connective tissue by means of micro-Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc* 40: pp. 1087–1090.
- [6] El-Abassy, R. M., Donfack, P. and Materny, A. (2009). Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *Journal of Raman Spectroscopy* 40(9): pp. 1284–1289.
- [7] Gordon, K. C. and McGoverin, C. M. (2011). Raman mapping of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 417: pp. 151–162.
- [8] Gómez, O. (2011). *Application of Raman Spectroscopy to Analytical study of Drugs*. Trabajo de grado, Ingeniería superior de Telecomunicación. Universidad Politécnica de Catalunya. España.
- [9] Nishioka, F., Nakanishi, I., Fujiwara, T. and Tomita, K. I. (1984). The Crystal and Molecular Structure of the β -Cyclodextrin Inclusion Complex with Aspirin and Salicylic Acid. *Journal of Inclusion Phenomena* 2: pp. 701-714.
- [10] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) (2009). Secretaría de Salud.
- [11] Organización Mundial de la Salud (OMS) (2010). *Recopilación de artículos*. Vol. 88: pp. 241-320.
- [12] Lieber, C. A. and Mahadevan-Jansen, A. (2003). Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Applied Spectroscopy* 57(11): pp. 1363-1367.
- [13] Peng, J., Peng, S., Jiang, A., Wei, J., Li, C. and Tan, J. (2010). Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction. *Analytica Chimica Acta* 683: pp. 63–68.