

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA



**ACOPLAMIENTO DE REACCIONES
FOTOQUÍMICAS Y PROCESOS LUMINISCENTES EN
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

MARÍA DOLORES GARCÍA MARTÍNEZ

2009



**ACOPLAMIENTO DE REACCIONES
FOTOQUÍMICAS Y PROCESOS
LUMINISCENTES EN
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

*Memoria presentada para optar
al Grado de Doctora en Química*

Fdo: María Dolores García Martínez

Dña. **Pilar Viñas López-Peigrín**, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica y Directora del Departamento de Química Analítica, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “*ACOPLAMIENTO DE REACCIONES FOTOQUÍMICAS Y PROCESOS LUMINISCENTES EN CROMATOGRFÍA LÍQUIDA*” ha sido realizada por Dña. María Dolores García Martínez, bajo la inmediata dirección y supervisión de los profesores D. Tomás Pérez Ruiz y Dña. M^a del Carmen Martínez Lozano, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 12 de enero de 2009

Fdo: Dña. Pilar Viñas López-Peigrín

D. Tomás Pérez Ruiz y **Dña. M^a del Carmen Martínez Lozano**,
Catedráticos de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento
de Química Analítica, AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*ACOPLAMIENTO DE REACCIONES FOTOQUÍMICAS Y PROCESOS LUMINISCENTES EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA*”, realizada por Dña. María Dolores García Martínez, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 12 de enero de 2009

Fdo: D. Tomás Pérez Ruiz

Fdo: Dña. M^a del Carmen Martínez Lozano

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera han sido participes en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

A los Dres. D. Tomás Pérez Ruiz y Dña. M^a del Carmen Martínez Lozano por su acertada dirección y estímulo constante, que han hecho posible la realización de esta Memoria.

Al Dr. D. Jesús Martín González por su permanente disposición e incondicional ayuda.

A todos los componentes del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia por su colaboración desinteresada.

A los miembros de los otros Departamentos de la Facultad de Química (especialmente del Departamento de Química Orgánica) por la ayuda que me han prestado.

A la Fundación Séneca por la Beca concedida para la realización de esta Tesis.

A Juan y a mis padres, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí. Gracias por estar a mi lado en esta etapa de mi vida.

A mis padres y a Juan

ÍNDICE

ACOPLAMIENTO DE REACCIONES FOTOQUÍMICAS Y PROCESOS LUMINISCENTES EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

ÍNDICE

	<u>Página</u>
OBJETO Y CONTENIDO DEL TRABAJO	7
INTRODUCCIÓN	13
PARTE A	37
CAPÍTULO 1. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K POR HPLC ACOPLADA A LA GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA EN UN MEDIO MICELAR	39
1.1. Antecedentes bibliográficos.....	43
1.2. Fotoquímica de las vitaminas K en una disolución micelar de SDS	49
1.3. Separación y determinación de vitaminas K ₁ , K ₂ y K ₃ por HPLC y detección fotoquímica–fluorescente	79
1.4. Bibliografía	94

Página

CAPÍTULO 2. SEPARACIÓN DE BISFOSFONATOS POR HPLC ACOPLADA A UN PROCESO FOTOQUÍMICO-FLUORESCENTE	99
2.1. Antecedentes bibliográficos.....	103
2.2. Separación cromatográfica de los ácidos alendrónico, etidrónico, ibandrónico y risedrónico.....	112
2.3. Bibliografía.....	140
 CAPÍTULO 3. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINAS B₁ CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.....	143
3.1. Antecedentes bibliográficos.....	147
3.2. Separación y determinación de tiamina, monofosfato de tiamina y pirofosfato de tiamina	156
3.3. Bibliografía.....	177
 PARTE B: QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOGENERADA DEL RUTENIO(II)TRIS(2,2'-BIPIRIDILO)	183
Bibliografía.....	196
 CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS CON RUTENIO(III)-TRIS(2,2'-BIPIRIDILO) FOTOGENERADO	201

	<u>Página</u>
4.1. Antecedentes bibliográficos.....	205
4.2. Estudio de la quimioluminiscencia del EDTA con el Ru(bpy) ₃ ³⁺ fotogenerado en un sistema de flujo	213
4.3. Determinación FI-quimioluminiscente de otros ácidos aminopolicarboxílicos.....	225
4.4. Separación y determinación de los ácidos aminopolicarboxílicos por HPLC	227
4.5. Bibliografía	246
 CAPÍTULO 5. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMIODARONA Y DESETILAMIODARONA POR HPLC CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE	 251
5.1. Antecedentes bibliográficos.....	255
5.2. Quimioluminiscencia del Ru(bpy) ₃ ³⁺ con la amiodarona y la desetilamiodarona	258
5.3. Desarrollo del método cromatográfico	260
5.4. Bibliografía	278
 CAPÍTULO 6. DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS POR HPLC CON FOTOLISIS POST- COLUMNNA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE	 283
6.1. Antecedentes bibliográficos.....	287

	<u>Página</u>
6.2. Fotólisis del propoxur	293
6.3. Separación y determinación de pesticidas N-metilcarbamatos por HPLC con detección quimioluminiscente.....	308
6.4. Bibliografía	333
PARTE EXPERIMENTAL	337
CONCLUSIONES	357

OBJETO Y CONTENIDO DEL TRABAJO

OBJETO Y CONTENIDO DEL TRABAJO

Entre los temas de investigación abordados con especial interés en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia se encuentra la introducción de nuevos métodos analíticos aplicables a la determinación de muestras de interés biológico y ambiental.

Al abordar las investigaciones dirigidas a la realización de esta Tesis Doctoral, encuadradas dentro de este objetivo, el método escogido para la separación de los analitos en muestras complejas ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y hemos seleccionado como técnicas de detección la fluorescencia y la quimioluminiscencia acopladas a procesos fotoquímicos. Los hechos que han motivado esta elección han sido, por un lado, la alta selectividad que “per se” presentan las reacciones fotoquímicas y por otro, la sensibilidad que aportaría su acoplamiento con la detección fluorimétrica o quimioluminiscente.

La hibridación de procesos fotoquímicos y luminiscentes presenta un especial atractivo si se realiza en un sistema de flujo con el reactor fotoquímico incorporado al mismo. Así, iluminando en línea se automatiza el proceso analítico y como consecuencia se consigue mayor reproducibilidad.

Los sistemas fotoquímicos de los que partiremos como base de nuestros estudios son: a) la fotorreducción de diversas naftoquinonas en medios organizados; b) las fotooxidaciones de compuestos del fósforo, concretamente los ácidos bisfosfónicos; c) el comportamiento fotoquímico de la tiamina y sus derivados; y d) la fotooxidación del rutenio(II)tris(2,2'-bipiridilo) para su utilización como reactivo quimioluminiscente con diversos analitos, muchas veces acoplada con la fotólisis de los mismos.

Entre las sustancias objeto de estudio se encuentran:

1.- *Moléculas con actividad vitamínica* tales como las vitaminas del grupo K [**filoquinona (K₁)**, **menaquinona (K₂)** y **menadiona (K₃)**] y del grupo B₁ [**tiamina**, **monofosfato de tiamina** y **pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa)**], sustancias éstas de la mayor importancia bioquímica, cuyo papel es crítico en los seres vivos.

2.- *Sustancias con actividad farmacológica* como son los ácidos bisfosfónicos (**ácidos alendrónico**, **etidrónico**, **ibandrónico** y **risedrónico**) y la **amiodarona** y su principal metabolito **desetilamiodarona**; los primeros utilizados fundamentalmente en tratamientos de osteoporosis y la amiodarona y su metabolito como fármacos eficaces para el tratamiento de la angina de pecho y otros trastornos de tipo cardíaco.

3.- *Ácidos aminopolicarboxílicos* [**ácidos nitrilotriacético (NTA)**, **dietilentriaminopentaacético (DTPA)**, **S,S-etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS)** y **etilendiaminotetraacético (EDTA)**], especies de amplia aplicación práctica por lo que frecuentemente

son eliminadas al medio ambiente y pueden afectar a la distribución y transporte de los metales en ecosistemas acuáticos.

4.- *Pesticidas del grupo de los N-metilcarbamatos*, unos de los más ampliamente utilizados en agricultura, entre ellos **carbaril**, **propoxur**, **isoprocarb**, **promecarb** y **bendiocarb**, cuyo control en el medio ambiente y en alimentos es primordial dado su carácter tóxico.

Los nuevos métodos cromatográficos con reacciones fotoquímicas post-columna han sido optimizados y su validez se ha comprobado mediante la aplicación de los mismos en la determinación de las diferentes sustancias en muestras reales, así como con ensayos de recuperación.

Consideramos cumplidos los objetivos propuestos al iniciar esta Tesis y esperamos que las aportaciones presentadas aquí contribuyan a que la Fotoanalítica adquiera un papel más relevante en el contexto de la Química Analítica, dadas sus características singulares de selectividad y sensibilidad, esta última potenciada por los sistemas de detección luminiscentes.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Al exponer los objetivos de esta Memoria ya se ha indicado que en la misma se han propuesto esquemas de flujo que incorporan reactores fotoquímicos, con fuentes de iluminación en línea, adecuados para conseguir reacciones post-columna que impliquen a los analitos seleccionados y conduzcan a la formación de productos fáciles de detectar por métodos luminiscentes. En ocasiones hemos conseguido inducir la fluorescencia fotoquímicamente (PIF), mientras que en otros casos la radiación luminosa ha generado una especie capaz de acoplarse a un sistema quimioluminiscente.

En todos los nuevos métodos aportados la base del esquema analítico ha sido acoplar a la separación de los analitos por HPLC una reacción fotoquímica que, directa o indirectamente, provoque una alta fluorescencia o quimioluminiscencia.

La luz tiene unas propiedades que hacen que sea un reactivo ideal universal, ya que un compuesto dependiendo de su estructura puede experimentar bajo su acción una variedad de transformaciones tales como oxidación, reducción, hidrólisis, etc. Esto hace que la luz pueda ser empleada para obtener derivados de ciertos analitos con características de detección mejores, en muchas ocasiones, que con otros reactivos.

Las reacciones fotoquímicas ofrecen un medio poderoso de obtención de derivados, mejorando las propiedades cromóforas, fluoróforas o electroquímicas; además, en algunos ejemplos se producen desplazamientos en máximos de absorción, emisión o potenciales redox.

La investigación en las últimas décadas ha aportado un gran número de datos que prueban que las reacciones fotoquímicas significan la apertura de nuevas posibilidades a la Química Analítica (1-3)*. Esto no es sorprendente si se tiene en cuenta que los procesos fotoquímicos poseen características favorables que no se presentan en las reacciones químicas ordinarias. Así, por ejemplo, la *selectividad* en la activación y el *control en la velocidad del proceso* se consiguen con gran facilidad seleccionando la longitud de onda de la radiación y el flujo de la misma. Otra propiedad importante en este tipo de reacciones es que, en general, son bastante *sensibles*, permitiendo así su aplicación a la determinación de microcomponentes. En conclusión, la descomposición fotoquímica permite desarrollar métodos analíticos directos, económicos y selectivos. Los resultados conseguidos aplicando diferentes metodologías han sido recogidos en varias revisiones científicas (1-3).

Por otra parte, en los últimos años se ha experimentado un notable desarrollo en el empleo de reacciones fotoquímicas acopladas a procedimientos de flujo continuo, cromatografía y análisis por inyección en flujo (FI).

* La bibliografía de la Introducción se encuentra en la página 30.

Las reacciones fotoquímicas han sido utilizadas como un medio para hacer posible la determinación de analitos fotoactivos en matrices complejas. En algunos casos la irradiación es suficiente para producir un compuesto detectable, pero en muchas ocasiones se hace necesaria la adición de reactivos con el fin de inducir la generación del fotoproducto o para estabilizarlo. Muchos de los métodos desarrollados en sistemas estáticos (métodos de baño) se pueden adaptar a procedimientos dinámicos, principalmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (4) y análisis por inyección en flujo (5). Un ejemplo ilustrativo lo constituye la determinación de los tranquilizantes del grupo de las fenotiacinas, aprovechando que la fotooxidación de los mismos provoca una mejora de sus características fluorescentes. Estas fotorreacciones han sido aplicadas al análisis de dichos fármacos en distintos tipos de muestras utilizando procedimientos manuales (6) y posteriormente en HPLC (7-9) y en distintos esquemas FI (10-13).

Las ventajas más destacables que las reacciones fotoquímicas aportan en los sistemas dinámicos (4), y que contribuyen a su popularización, son:

- El reactivo (la luz) se introduce sin necesidad de disolvente, ni dispositivos mezcladores, con lo que se evita la dispersión. Además se simplifica la configuración del sistema.

- Las fotorreacciones son rápidas, en general. Esto permite utilizar reactores de corta longitud, lo que repercute en la obtención de picos más reproducibles. A esto contribuye notablemente el estricto control de los parámetros experimentales en FI.

- El "ruido" de fondo suele ser despreciable.

- Se evita la presencia de residuos interferentes procedentes de los reactivos.

- Los fotoprocesos son selectivos para los analitos si se seleccionan radiaciones de longitud de onda adecuada.

- Como un resultado de la alta eficiencia cuántica se mejora la sensibilidad derivada de las relativamente rápidas reacciones implicadas.

- Se facilita la automatización de los procesos y el acoplamiento de varios detectores.

Los requisitos exigidos son:

- La longitud de onda de activación no debe ser absorbida por los fotoproductos y tales productos deben permanecer estables el tiempo necesario para la detección (generalmente un minuto será suficiente).

- La fuente de luz y el diseño del reactor deben asegurar una alta eficiencia de fotoconversión.

- La lámpara debe permanecer suficientemente estable, así como el caudal en los diferentes canales, para asegurar que la luz actúa de forma uniforme y reproducible.

- Los productos de la reacción fotoquímica deben poseer características convenientes para su detección y el detector se diseñará de forma adecuada para conseguir volúmenes muertos muy bajos y de ahí menor dispersión.

Las fuentes de radiación en línea, o lo que es lo mismo los fotorreactores, se han incorporado a diversos esquemas de flujo con diferentes configuraciones de acuerdo con las características particulares de los analitos.

El Teflón (PTFE, politetrafluoroetileno) ha superado al cuarzo en la construcción de reactores fotoquímicos en sistemas dinámicos debido a que presenta una alta eficiencia desde los 200 nm. Esta alta eficiencia en la región ultravioleta se adscribe a un mecanismo de múltiples reflexiones internas, actuando como un túnel de luz, ("light tunnelling"), por el que la poca luz que penetra a través de los microporos del polímero queda retenida dentro del material, donde sufre muchas reflexiones.

El Teflón posee otras varias características favorables, además de su inusual alta eficiencia, tales como bajo costo y una fácil incorporación a los sistemas de flujo continuo, se encuentra disponible con distintos diámetros y es fácil de adaptar a diferentes geometrías. Por otra parte, el material es muy permeable al oxígeno lo que habrá que tener en cuenta a la hora de reacciones fotoquímicas en las que el oxígeno perturba.

La configuración de los reactores fotoquímicos variará de acuerdo con el tipo de fuente luminosa utilizada así como con la clase de detector seleccionado (espectrofotómetro, fluorímetro o un sistema de medida de quimioluminiscencia).

El número de publicaciones en el campo de la fotoquímica en sistemas dinámicos aún no es elevado, pero va experimentando un avance gradual y significativo conforme se confirman los excelentes resultados a que conduce y ha suministrado un medio sensible y

selectivo para la determinación de varios analitos. Así, las leucoformas de los colorantes azul de tionina y tionina, generados a través de las reacciones fotoquímicas de estos colorantes con el ácido etilendiaminotetraacético, han sido aplicadas como reductores y reactivos cromogénicos para la determinación de diversos oxidantes utilizando sistemas en flujo (14, 15). La determinación del oxalato por descomposición fotoquímica del ferrioxalato en un reactor y en la célula de flujo de un sistema dinámico ha sido publicada (16, 17). También las fenotiacinas, como ya hemos indicado, se han determinado siguiendo esta metodología de forma individual y simultánea (10-13, 16-18).

Otras sustancias de interés cuya determinación en flujo ha sido propuesta sobre la base de un proceso fotoquímico son nitrito (19), peróxido de hidrógeno (20), compuestos organoarsenicales (21), catecolaminas (22), nitroprusiato (23), emetina (24), reserpina (25), ácido ascórbico (26-28), nitrato (29), vitaminas del grupo B₂ (30), fósforo orgánico (31), carbono orgánico (32), nitrato, nitrito (33) y nitrógeno total (34) disueltos en aguas naturales, citrato (35, 36) y tartrato (36).

La fluorescencia como método de detección presenta la ventaja de la elevada sensibilidad de la técnica, que en muchos casos permite llegar a límites de detección muy bajos, siendo de aplicación relativamente sencilla.

El inconveniente más serio es el reducido número de sustancias que exhiben fluorescencia nativa. Sin embargo, a través de reacciones adecuadas se expande enormemente el campo de aplicación de la fluorimetría. Por ello, frecuentemente, los métodos

fluorimétricos se basan en algún tipo de reacción de derivatización, ya que las sustancias que no presentan fluorescencia, o lo hacen con pequeña intensidad, deben ser transformadas en compuestos fluorescentes. Esta derivatización se consigue con reacciones químicas o fotoquímicas y, en ocasiones, se puede facilitar la determinación fluorimétrica por un proceso indirecto (inhibición o fenómeno catalítico).

Los compuestos no fluorescentes se pueden convertir en fluoróforos por una amplia variedad de reacciones que incluyen formación de quelatos fluorescentes, desplazamiento de ligandos fluoróforos, formación de pares iónicos, procesos redox, catálisis enzimática, hidrólisis y varios tipos de reacciones de síntesis orgánica (condensación, condensación-ciclación, utilización de marcadores, etc.). Algunas de las estrategias indicadas pueden llevarse a cabo en esquemas de flujo incluyendo reactores fotoquímicos donde se generan especies de características fluorescentes. Así ocurre en las determinaciones de sulfonamidas (37), tiamina (38, 39), fluoruro (40) y ácido ascórbico (41), entre otros.

Los excelentes resultados a los que conduce la incorporación de un reactor fotoquímico en línea en el sistema, que permita la fototransformación de ciertos compuestos antes de la detección fluorescente, han sido puestos de manifiesto por varios investigadores (4, 42-44).

La conversión fotoquímica puede ocurrir por un mecanismo directo de fotólisis en el que el compuesto absorbe directamente la radiación o por fotólisis indirecta, proceso en el que una sustancia

adicional puede actuar como sensibilizador, transfiriendo la energía absorbida o generada a una especie activa, etc.

Como ejemplos ilustrativos de la aplicación de la fluorescencia inducida fotoquímicamente como sistema de detección en HPLC, podemos citar los buenos resultados conseguidos con esta metodología en la determinación de pesticidas. Así se ha aplicado a los herbicidas derivados de la fenilurea, que tras la separación cromatográfica se pueden detectar después de la fotólisis post-columna formando con el o-ftalaldehído (OPA) y el 2-mercaptoetanol (MERC) un indol de alta fluorescencia (45). Otros pesticidas conteniendo nitrógeno se han determinado de forma similar (46) y en muchos casos la fluorescencia se genera simplemente efectuando la fotólisis en presencia de un disolvente adecuado. Ejemplos en los que se combinan HPLC y PIF son la determinación de pesticidas derivados de los fenilcarbamatos, fenilaminas, nitrogenados, bencilureas y otros (47-52).

En los últimos años, el interés por los métodos quimioluminiscentes (QL) ha aumentado notablemente, con vistas a su aplicación a la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos en concentraciones traza (53, 54). Las principales características de los métodos quimioluminiscentes en relación con otras técnicas son el amplio intervalo de concentraciones en que se pueden aplicar y las altas sensibilidades que con ellos se alcanzan. Otra importante característica de la quimioluminiscencia es la posibilidad de realizar los análisis con una instrumentación relativamente sencilla. Además, desde la introducción del análisis por inyección en flujo, los métodos quimioluminiscentes se han hecho más atractivos, ya que con estos

sistemas es posible mezclar la muestra y los reactivos rápidamente y con un alto grado de reproducibilidad.

La quimioluminiscencia es un fenómeno que implica la emisión de luz (generalmente en la región visible o infrarroja) como resultado de una reacción química. Algunos productos de reacción se obtienen en un estado excitado y emiten luz cuando retornan a su estado fundamental. Esencialmente el proceso en el que se produce la quimioluminiscencia es idéntico al de la fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) con la excepción de que ninguna fuente de excitación es necesaria.

La quimioluminiscencia se produce en muy pocas reacciones, ya que en la mayor parte de los casos el exceso de energía de las moléculas se elimina en forma de calor. Para que una reacción química sea conveniente para quimioluminiscencia ha de cumplir los tres requisitos siguientes:

1.- Debe liberar una adecuada cantidad de energía para que se produzcan estados electrónicamente excitados.

2.- La ruta por la que la reacción transcurre debe favorecer la formación de tales estados excitados.

3.- El estado excitado debe ser luminiscente o ser capaz de transmitir energía a otra molécula luminiscente.

En la región visible la energía del fotón se encuentra entre 44 y 71 kcal mol⁻¹; en concordancia con esto, para que una reacción sea quimioluminiscente debe liberar al menos 44 kcal mol⁻¹. Esta cantidad de energía se produce en un número importante de reacciones de

oxidación–reducción, particularmente las que implican oxígeno, peróxido de hidrógeno y oxidantes fuertes.

Las velocidades de las reacciones QL varían en un amplio intervalo (desde menos de un segundo a más de un día). También es muy variable el rendimiento cuántico con que se producen.

La quimioluminiscencia puede predecirse basándose en varias reglas empíricas. Así, si un compuesto dado es fluorescente, el compuesto mismo o sus productos de oxidación son buenos candidatos a la QL, aunque esta regla tiene numerosas excepciones. También hay que indicar que muchos procesos quimioluminiscentes implican oxidación de compuestos aromáticos. En la bibliografía aparecen gran número de aplicaciones de QL, aunque en la práctica existen pocos sistemas básicos para producir luz.

Una de las ventajas de mayor interés cuando se compara la QL con la fluorescencia es el hecho de producir moléculas luminiscentes sin necesitar fuente de excitación, con lo que se evitan problemas derivados de la dispersión de la luz, excitación no selectiva o inestabilidad en la fuente de excitación. Además, los elementos esenciales para la detección de la quimioluminiscencia en flujo continuo son una célula de flujo, una cámara de mezcla de reactivos, un fotodetector y un dispositivo para adquirir y procesar los datos. Es decir, no son necesarios sistemas sofisticados.

La quimioluminiscencia presenta un interés creciente como una atractiva técnica de detección en HPLC y FI a causa de su buena selectividad, alta sensibilidad, instrumentación sencilla y económica y cortos tiempos de respuesta (55-57) y su utilidad cuando se acopla con la fotólisis de compuestos orgánicos ha sido demostrada (4, 58).

Ejemplos representativos son la determinación de antraquinonas y naftoquinonas (59) y de compuestos orgánicos alifáticos oxigenados (60) por irradiación en línea y detección del H_2O_2 producido por la quimioluminiscencia del luminol (60) o del peroxioxalato (59-61); la irradiación de ácidos orgánicos en presencia de Fe^{3+} y de UO_2^{2+} para generar Fe^{2+} , el cual puede detectarse con luminol sin necesidad de añadir oxidante (62); la imipramina genera un radical cuando se expone a la radiación UV, que directamente se puede detectar por QL (63); la irradiación de insecticidas piretoides y benzoilureas produce especies que emiten una fuerte QL en presencia de hexacianoferrato(III) y de hidróxido sódico (64, 65).

Por otro lado, la quimioluminiscencia implicando $\text{Ru(II)tris}(2,2'$ -bipiridilo) constituye un método de detección versátil para la detección de varios analitos, incluyendo ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminas alifáticas, productos farmacéuticos y pesticidas (66, 67). Todas estas aplicaciones tienen en común la formación de $\text{Ru(III)tris}(2,2'$ -bipiridilo), $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, el cual reacciona con el analito para emitir luz. El reactivo activo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ puede ser generado a partir de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ por oxidación química, electroquímica o fotoquímica y se ha comprobado que esta oxidación puede ser muy efectiva por vía fotoquímica (68-72).

De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, es evidente que la hibridación reacciones fotoquímicas–procesos luminiscentes es una metodología de grandes posibilidades en la determinación cromatográfica de especies de interés biológico o ambiental. Nosotros en esta Tesis hemos querido incluir algunos estudios dirigidos a desarrollar este campo de investigación tan prometedor. En nuestras investigaciones se han seleccionado: **1)** vitaminas (del grupo K y B₁),

2) moléculas con actividad terapéutica (ácidos bisfosfónicos, amiodarona y desetilamiodarona), **3)** ácidos aminopolicarboxílicos y **4)** pesticidas del grupo de los N-metilcarbamatos, compuestos todos ellos de primordial importancia.

Los nuevos métodos analíticos que se van a proponer se validarán y comprobarán aplicándolos a la evaluación de los diferentes analitos en muestras reales. Aunque al seleccionar para la detección cromatográfica técnicas tan sensibles como son la fluorescencia y la quimioluminiscencia los límites de detección conseguidos van a ser muy bajos, puede ocurrir que en algunos tipos de muestras el contenido de los analitos se encuentre incluso por debajo de esos límites de detección. Por este motivo, y en ocasiones como etapa de limpieza de las muestras, se realizará una preconcentración de los analitos recurriendo a la extracción en fase sólida acoplada también en línea al esquema analítico.

Las técnicas de preparación de muestras en las que se reduzcan en lo posible los disolventes orgánicos presentan un gran interés actual y pueden incluir procedimientos de "limpieza" ("clean-up") en muestras muy complejas; además, la etapa de preparación también puede llevar al analito a un nivel de concentración conveniente. Entre estas técnicas la extracción en fase sólida (SPE) ofrece grandes posibilidades. La extracción de trazas de compuesto desde una disolución acuosa a un material adsorbente fue un concepto desarrollado en el siglo XIX y sus aplicaciones han sido extensamente revisadas (73, 74). Los adsorbentes se utilizan ahora para extraer compuestos orgánicos de matrices tales como aguas, aire e incluso suelos. Un adsorbente con fuerte afinidad hacia compuestos orgánicos retendrá y concentrará estos compuestos desde

disoluciones muy diluidas o muestras gaseosas. Muchos adsorbentes son específicamente adecuados para la extracción de diferentes grupos de compuestos orgánicos con varios grados de selectividad. La primera etapa en SPE es pasar la matriz líquida a través de un cartucho de plástico (tubo) o de una membrana plana (disco), conteniendo el adsorbente disperso sobre un material soporte, para extraer el analito junto con los compuestos interferentes (75). Usualmente se utiliza primero un disolvente selectivo para eliminar interferencias y un segundo disolvente para eluir los analitos. La SPE presenta unas atractivas características comparada con la tradicional extracción con disolventes orgánicos, debido a que es simple, económica y utiliza cantidades de disolvente relativamente pequeñas. Es la técnica más ampliamente utilizada para el análisis de nuevos compuestos farmacéuticos y sus metabolitos en suero sanguíneo y en orina. Muchas veces es necesaria para eliminar constituyentes de la matriz que interfieren y para cuantificar particularmente metabolitos y drogas bioactivas en concentraciones del orden de pg ml^{-1} .

Comparada con la extracción líquido-líquido presenta como ventajas más notables las siguientes:

- Bajo costo, menor consumo de disolventes, reactivos y menos contaminación debida a los residuos.
- Recuperaciones mayores ya que la pérdida de muestra es mínima.
- Mayor seguridad puesto que no contamina.
- Manejo de muestras menores y eliminación de problemas causados por la formación de emulsiones.

- Reducción de los daños en muestras lábiles, por la mínima evaporación.

- Fácil automatización, lo que supone una importante ventaja en la aplicación al análisis de rutina. Además, puede adaptarse a la evaluación de analitos a niveles de trazas en volúmenes grandes de muestra, caso frecuente en el análisis de aguas.

La extracción en fase sólida tiene las mismas bases teóricas que el HPLC; por ejemplo, la retención y selectividad no están afectados por el tamaño de partícula, y como hemos dicho, destaca sobre todo por su rapidez y eficiencia.

En esta Tesis se ha utilizado en distintas ocasiones la SPE, unas veces con la finalidad de concentrar el analito y otras fundamentalmente como etapa de limpieza. En todos los casos el proceso ha sido automatizado acoplado el dispositivo de extracción en fase sólida en línea con el sistema de HPLC, consiguiendo así unos excelentes resultados inyectando directamente las muestras, utilizando el software Gilson 735 Sampler Controller con una interfase que permite el acoplamiento del sistema SPE con el instrumento empleado para la separación cromatográfica.

La Tesis se ha dividido en dos secciones. En la **parte A** se presentan los capítulos en los que se recogen las investigaciones realizadas empleando como sistema de detección la fluorescencia generada fotoquímicamente, caso de las vitaminas K (Capítulo 1) y de los bisfosfonatos (Capítulo 2), así como los estudios sobre el comportamiento fotoquímico–quimioluminiscente de la tiamina y de sus ésteres fosfóricos (Capítulo 3).

En la **parte B** de la Memoria se han agrupado aquellos métodos en los que aparecía el Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) fotogenerado acoplado a diversas reacciones post-columna en HPLC. En esta parte se incluyen las investigaciones realizadas con los ácidos aminopolicarboxílicos (Capítulo 4), con la amiodarona y su metabolito desetilamiodarona (Capítulo 5) y con los pesticidas N-metilcarbamatos (Capítulo 6).

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- J.M. Fitzgerald, *"Analytical Photochemistry and Photochemical Analysis"*, Decker, New York, 1971.
- 2.- A. Peter, L.J. Czanyil, *Acta Phys. Chem. Szeged*, **21** (1975) 37.
- 3.- T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, *Quim. Anal.*, **6** (1987) 150.
- 4.- J.R. Poulsen y J.W. Birks Ed., *"Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography"*, VCH Publisher, New York, 1989.
- 5.- J. Martínez Calatayud, *"Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory"*, Taylor & Francis, London, 1996.
- 6.- V.R. White, C.S. Villafranca, J.M. Fitzgerald, *Anal. Chem.*, **48** (1976) 1314.
- 7.- A.H.T.M. Scholten, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chim. Acta*, **114** (1980) 137.
- 8.- A.H.T.M. Scholten, P.L.M. Welling, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **199** (1980) 239.
- 9.- U.A.Th. Brinkman, P.L.M. Welling, G. De Vries, A.H.T.M. Scholten, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **217** (1981) 463.

-
- 10.-D. Chen, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, **116** (1991) 171.
 - 11.-J. Martínez Calatayud, C. Gómez Benito, *Anal. Chim. Acta*, **256** (1992) 105.
 - 12.-D. Chen, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta*, **38** (1991) 1227.
 - 13.-M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Automat. Chem.*, **13** (1991) 111.
 - 14.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, E. Yagüe, *Analyst*, **113** (1988) 1057.
 - 15.-H. Müller, E.H. Hansen, *Chem. Techn.*, **42** (1992) 304.
 - 16.-L.E. León, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **234** (1990) 227.
 - 17.-L.E. León, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, **115** (1990) 1549.
 - 18.-B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Talanta*, **41** (1994) 1985.
 - 19.-R. Liu, D. Liu, *Analyst*, **116** (1991) 497.
 - 20.-Z. Genfa, P. Dasgupta, W.S. Edgemon, J.N. Marx, *Anal. Chim. Acta*, **243** (1991) 207.
 - 21.-R.H. Atalian, D.A. Kalman, *Talanta*, **38** (1991) 167.
 - 22.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, O. Val, *Talanta*, **40** (1993) 1625.

-
- 23.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, O. Val, *Microchem. J.*, **52** (1995) 33.
- 24.-C. Gomez Benito, T. García Sancho, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, **279** (1993) 293.
- 25.-C. Gomez Benito, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, **245** (1991) 101.
- 26.-A. Sanz, A. Rios, M. Valcárcel, *Analyst*, **117** (1992) 1761.
- 27.-E. Luque-Pérez, A. Rios, M. Valcárcel, *Fresenius, J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 857.
- 28.-E. León, J. Catapano, *Anal. Letters*, **26** (1993) 1741.
- 29.-R. Liu, G. Liu, *Talanta*, **42** (1995) 437.
- 30.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, O. Val, *Analyst*, **119** (1994) 1199.
- 31.-I.D. McKelvie, B.T. Hart, T.T. Cardwell, R.W. Catrall, *Analyst*, **114** (1989) 1459.
- 32.-R.T. Edwards, I.D. McKelvie, P. Ferrett, B.T. Hart, J.B. Bapat, K. Koshy, *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 287.
- 33.-S. Motomizu, M. Sanada, *Anal. Chim. Acta*, **308** (1995) 406.
- 34.-I.D. McKelvie, M. Mitri, B.T. Hart, I.C. Hamilton, A.D. Stuart, *Anal. Chim. Acta*, **293** (1994) 155.
- 35.-E. Luque Pérez, A. Rios, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **366** (1998) 231.

-
- 36.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, A. Sanz, *Anal. Letters*, **31** (1998) 1413.
- 37.-M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, **269** (1992) 193.
- 38.-A.F. Danet, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, **41** (1994) 2147.
- 39.-J. López-Flores, M.L. Fernández-De Córdova, A. Molina-Díaz, *Anal. Chim. Acta*, **535** (2005) 161.
- 40.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, A. Sanz, *Analyst*, **121** (1996) 477.
- 41.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, C. Sidrach, *Analyst*, **122** (1997) 115.
- 42.-I.S. Kull, W.R. LaCourse, "*Reaction Detection in Liquid Chromatography*", I.S. Kull Ed, Marcel Dekker, New York, 1986.
- 43.-A. Coly, J.-J. Aaron, *Talanta*, **46** (1998) 815.
- 44.-J.-J. Aaron, "*Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications*", S.G. Schulman Ed., Wiley, New York, 1993.
- 45.-R.G. Luchtefeld, *J. Chromatogr. Sci.*, **23** (1985) 516.
- 46.-B.M. Patel, H.A. Moyer, R. Weinberger, *J. Agric. Food Chem.*, **38** (1990) 126.
- 47.-C.J. Miles, H.A. Moyer, *Chromatographia*, **24** (1987) 628.
- 48.- C.J. Miles, H.A. Moyer, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 220.
- 49.-B.M. Patel, H.A. Moyer, R. Weinberger, *Talanta*, **38** (1991) 913.

-
- 50.-S. Lahely, M. Bergaentzle, C. Hasselmann, *Food Chem.*, **65** (1999) 913.
- 51.-M. Martínez-Galera, T. López-López, M.D. Gil-García, J.L. Martínez-Vidal, P. Parrilla-Vázquez, *J. Chromatogr. A*, **918** (2001) 79.
- 52.-M.D. Gil-García, M. Martínez-Galera, R. Santiago Valverde, A. Galenti, S. Girotti, *J. Chromatogr. A*, **1147** (2007) 17.
- 53.-W.R. Seitz, *C.R.C. Crit. Rev. Anal. Chem.*, **13** (1981) 1.
- 54.-A. Townshend, *Analyst*, **115** (1990) 495.
- 55.-G.J. De Jong, P.J.M. Kwakman, *J. Chromatogr.*, **492** (1989) 319.
- 56.-A.M. García-Campaña, W.R.G.E. Baeyens, "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", Marcel Dekker, New York, 2001.
- 57.-M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, *J. Chromatogr. A*, **950** (2002) 1.
- 58.-I. Sahuquillo Ricart, G.M. Antón-Fos, M.J. Duart, J.V. García Mateo, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, **72** (2007) 378.
- 59.-J.R. Poulsen, J.W. Birks, G. Gubitz, P. Van Zoonen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **360** (1986) 371.
- 60.-M.S. Gandelman, J.W. Birks, *J. Chromatogr.*, **242** (1982) 21.
- 61.-I. Aichinger, G. Gubitz, J.W. Birks, *J. Chromatogr.*, **523** (1990) 163.

-
- 62.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *J. Chromatogr. A*, **1026** (2004) 57.
- 63.-S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Fujita, S. Ono, M. Suzuki, S. Takitani, M. Sonoda, Y. Sakagishi, *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 39.
- 64.-M. Martínez Galera, M.D. Gil García, R. Santiago Valverde, *J. Chromatogr. A*, **1113** (2006) 191.
- 65.-M.D. Gil García, M. Martínez Galera, R. Santiago Valverde, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387** (2007) 1973.
- 66.-R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 1.
- 67.-B.A. Gorman, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Analyst*, **131** (2006) 616.
- 68.-O. Shinozaki, N. Kunezaki, S. Yamazaki, T. Tanimura, *Chromatography*, **13** (1992) 275.
- 69.-K. Yokota, K. Saito, S. Murakami, A. Muromatsu, S. Yamazaki, *Chromatography*, (2000) 21.
- 70.-N. Niina, H. Kodamatani, H. Masunaga, S. Yamazaki, K. Saito, *Chromatography*, (2001) 22.
- 71.-H. Kodamatani, K. Saito, N. Niina, S. Yamazaki, A. Muromatsu, I. Sakurada, *Anal. Sci.*, **20** (2004) 1065.
- 72.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *J. Chromatogr. A*, **1077** (2005) 49.
- 73.-M. Dressler, *J. Chromatogr.*, **165** (1979) 167.

74.-C.F. Poole, S.A. Schuetto, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **6** (1983) 526.

75.-D. Hagen, C. Markell, G. Schmitt, D. Blevins, *Anal. Chim. Acta*, **236** (1990) 157.

PARTE A

CAPÍTULO 1

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K POR HPLC ACOPLADA A LA GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA EN UN MEDIO MICELAR

CAPÍTULO 1

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K POR HPLC ACOPLADA A LA GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA EN UN MEDIO MICELAR

	<u>Página</u>
1.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	43
1.2. FOTOQUÍMICA DE LAS VITAMINAS K EN UNA DISOLUCIÓN MICELAR DE SDS	49
1.2.1. Diseño del sistema FI.....	52
1.2.2. Estudio de las variables experimentales en el sistema FI	56
1.2.2.1. Variables químicas.....	56
1.2.2.2. Variables dinámicas.....	60
1.2.3. Determinación de filoquinona	64
1.2.4. Estudio de interferentes	67
1.2.5. Aplicaciones.....	69

	<u>Página</u>
1.3. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K ₁ , K ₂ Y K ₃ POR HPLC Y DETECCIÓN FOTOQUÍMICA- FLUORESCENTE	79
1.3.1. Optimización del sistema de detección post- columna	80
1.3.1.1. Efecto del pH	80
1.3.1.2. Efecto de la concentración de SDS.....	80
1.3.1.3. Efecto de la concentración de metanol	82
1.3.1.4. Influencia del tiempo de irradiación.....	82
1.3.1.5. Características espectrales.....	82
1.3.2. Cromatografía	83
1.3.3. Características analíticas del método.....	87
1.3.4. Aplicaciones	89
1.4. BIBLIOGRAFÍA.....	94

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K POR HPLC ACOPLADA A LA GENERACIÓN FOTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA EN UN MEDIO MICELAR

1.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

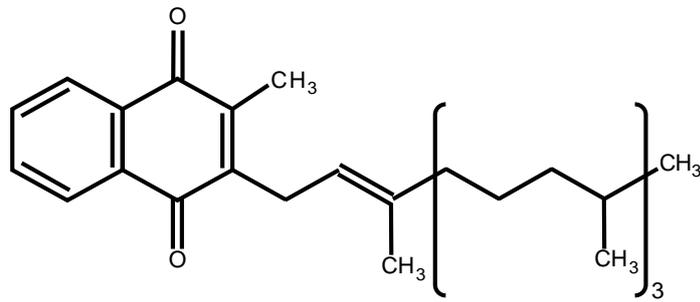
Las vitaminas K son una serie de compuestos 2-metil-1,4-naftoquinonas, los cuales tienen una cadena lateral sustituida en la posición 3.

La vitamina K es un principio esencial en la dieta para la biosíntesis normal de varios factores necesarios en la coagulación de la sangre. Fue descubierta por Heink Dam en Alemania, en 1929, quién comprobó la existencia de una especie liposoluble cuya deficiencia impedía la coagulación de la sangre en pollos, por lo que la llamó vitamina K (de *Koagulation*). Independientemente, Almquist y Stokstand describieron la misma enfermedad, así como su prevención (1)*.

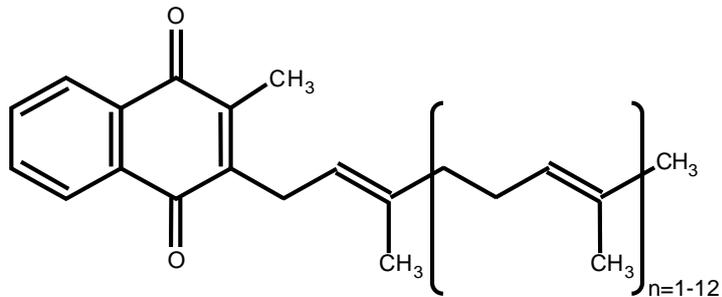
* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 94.

En la naturaleza existen dos formas: la vitamina K₁, filoquinona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona), que contiene una sola cadena lateral no saturada de 20 átomos de carbono y las diferentes formas de la vitamina K₂, menaquinona, con distintas cadenas laterales no saturadas (las más importantes son: menaquinona-4, menaquinona-6 y menaquinona-7). La vitamina K₃ (2-metil-1,4-naftoquinona), llamada menadiona, es un compuesto sintético con actividad de vitamina K que en el organismo (hígado) se convierte en un compuesto parecido a las vitaminas K₁ y K₂, con una cadena lateral de 20 átomos de carbono en posición 3.

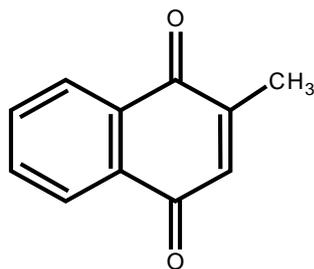
Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 1.1.



FILOQUINONA (vitamina K₁)



Serie MENAQUINONA (vitamina K₂)



MENADIONA (vitamina K₃)

Figura 1.1. Estructura de las vitaminas K.

En pequeñas cantidades la vitamina K está ampliamente distribuida en materiales biológicos. Sólo los vegetales de hoja verde tales como espinacas, berza, etc., son particularmente ricos en la vitamina (3 – 4 mg/100 g). Otros vegetales como peras o tomates contienen solamente entre 0,1 – 0,4 mg/100 g. Los tejidos animales, incluyendo hígado, tienen unos niveles similares y la leche de vaca y humana contienen 2 y 20 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ respectivamente. Los animales son incapaces de sintetizar esta vitamina, a pesar de lo cual en el hombre no se depende directamente de la dieta. Esto es debido a que cantidades considerables de vitamina K son sintetizadas por bacterias a lo largo del intestino.

Durante años se creyó que la única función de la vitamina K era la de intervenir en los procesos de coagulación de la sangre, puesto que se ha comprobado que su ausencia hace que el hígado no sintetice protrombina, el principal agente precursor de la trombina; por este motivo se conoce también a la vitamina K como factor antihemorrágico. En la actualidad se tiene la evidencia de que la vitamina K está implicada en reacciones de carboxilación de proteínas, que no están relacionadas con factores de coagulación sino que implican sistemas tan dispares como algunos relacionados con el metabolismo óseo o con la función renal (2, 3). En todos los casos la vitamina K es necesaria para que tenga lugar la reacción de γ -carboxilación de residuos específicos de glutamato, lo que posibilita que la proteína se una firmemente al calcio.

La vitamina K ayuda a convertir la glucosa en glucógeno para su almacenamiento en el hígado y juega un importante papel en la formación de los huesos y prevención de osteoporosis. En investigaciones recientes sobre cáncer se propone a la vitamina K

como un potencial inhibidor de los cánceres de pecho, ovario, riñón, colon, estómago, hígado y vejiga.

La cantidad de vitamina K que puede absorberse en el intestino delgado es muy variable, puede oscilar entre 10 y 70 % y depende de la presencia de sustancias grasas en la dieta y de la acción emulsionante de los ácidos biliares. Los tratamientos a base de antibióticos pueden esterilizar la flora bacteriana intestinal y consecuentemente son capaces de originar pérdidas de aproximadamente la mitad de la vitamina K que se ingiere en la dieta. Esto tiene gran importancia si se tiene en cuenta que el organismo humano no es capaz de almacenar o acumular la vitamina K, hecho que adquiere más interés en el caso de los recién nacidos, los cuales carecen de flora bacteriana.

Las deficiencias en vitamina K son muy raras, excepto en recién nacidos, puesto que es suficiente con la ingerida en los vegetales verdes o en hígado de bacalao; además, normalmente, se sintetiza como hemos dicho por las bacterias de la flora intestinal. En caso de déficit se pueden producir hemorragias nasales, en el aparato digestivo o en el genito-urinario. Las necesidades del adulto medio son de 80 $\mu\text{g}/\text{día}$ para los varones y 65 $\mu\text{g}/\text{día}$ para las mujeres. La vitamina K y sus metabolitos oxidados se eliminan a través de la orina y del líquido biliar y no se conocen bien sus posibles efectos tóxicos por una administración elevada.

La filoquinona es la forma más común de la vitamina K en la dieta, siendo los vegetales verdes y las plantas oleaginosas las reconocidas como mejores fuentes (4, 5). Aunque existe una base de datos significativa sobre los contenidos de filoquinona en plantas,

es necesaria más información ya que sólo unos pocos estudios se han realizado con métodos analíticos suficientemente fiables.

Los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de filoquinona incluyen espectrofotometría (6), polarografía diferencial de impulsos (7), fluorimetría (8), cromatografía gas-líquido (9) y análisis por inyección en flujo (10). Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) parece ser la metodología más apropiada. Los sistemas de detección utilizados con esta técnica han sido: espectrofotometría (11, 12), amperometría (13, 14) y fluorimetría (14-20). La fluorimetría es el método más sensible, pero, ya que la filoquinona no posee fluorescencia nativa, para detectarla por fluorescencia debe reducirse previamente a su forma dihidronaftoquinona utilizando procedimientos químicos (zinc metálico (15), borohidruro sódico (16) u octahidrotetraborato de tetrametilamonio (17)), reducción electroquímica (14, 18) o reducción fotoquímica (19, 20).

La reducción fotoquímica de la filoquinona se puede llevar a cabo iluminando con luz ultravioleta en presencia de un sustrato donador de átomos de hidrógeno y en ausencia de oxígeno (19, 20). La ausencia de oxígeno es esencial para la detección fluorescente de la vitamina K₁; en atmósfera abierta la filoquinona o bien no se reduce, y consecuentemente no se observa fluorescencia, o la fluorescencia se extingue completamente a causa del oxígeno. Recientemente se ha señalado que algunas naftoquinonas son capaces de abstraer hidrógeno de las moléculas de dodecil sulfato sódico (SDS) cuando se irradian con luz ultravioleta. Nosotros, por primera vez, hemos encontrado que la filoquinona incluso en presencia de oxígeno puede reducirse fotoquímicamente en un

sistema “on-line”, en un reactor acoplado helicoidalmente sobre una lámpara de mercurio de baja presión, cuando el metanol y el SDS están presentes. Las micelas de SDS contribuyen a mejorar la estabilidad de la filoquinona reducida, permitiendo trabajar en condiciones aerobias. Otros tensoactivos fueron también ensayados (CTAB, Brij-35, TTAB, PVA, Triton X-100) así como ciclodextrinas, comprobándose que las micelas de SDS eran el medio más efectivo para observar la fluorescencia de la forma fotorreducida de la filoquinona. Este proceso fue minuciosamente estudiado, tal como se explica en el apartado siguiente, comprobando, además, que tenía lugar con otras vitaminas K.

1.2 FOTOQUÍMICA DE LAS VITAMINAS K EN UNA DISOLUCIÓN MICELAR DE SDS

En investigaciones preliminares se encontró que las disoluciones acuosas de filoquinona (vitamina K₁) en presencia de SDS, a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, si se irradian con luz ultravioleta se pueden convertir en la forma reducida de la vitamina, muy fluorescente. Los espectros de fluorescencia de la Figura 1.2 muestran que la señal de fluorescencia sólo se obtiene cuando se utilizan micelas de SDS y luz ultravioleta.

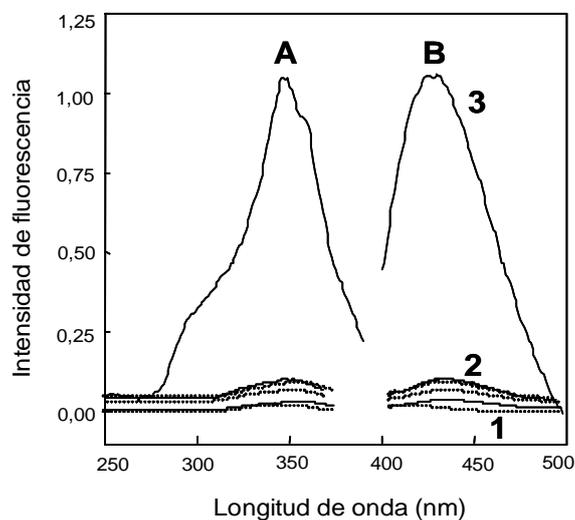
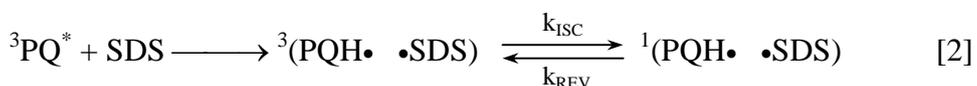


Figura 1.2. Espectros de excitación (A) y emisión (B) de fluorescencia correspondientes a la reacción entre filoquinona y SDS con (—) y sin (.....) irradiación con luz UV.

Condiciones: (1) SDS 0,1 M; (2) filoquinona 1,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$; (3) filoquinona 1,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y SDS 0,1 M.

En las reacciones fotoquímicas de compuestos tales como derivados de la benzoquinona, naftoquinona y antraquinona, se ha demostrado que las moléculas de SDS en forma de micelas actúan como buenos donadores de hidrógeno (21). La fotorreducción de filoquinona en las micelas de SDS puede considerarse que se produce a través de la siguiente secuencia de reacciones basadas en un modelo de pares de radicales (22, 23):



donde k_{ISC} y k_{REV} representan las constantes de velocidad correspondientes a los equilibrios indicados en la reacción 2.

La filoquinona (PQ) es promovida al estado triplete (${}^3\text{PQ}^*$) al ser irradiada con luz ultravioleta vía el estado singlete excitado (reacción 1). ${}^3\text{PQ}^*$ toma un átomo de hidrógeno de una molécula de SDS, dando lugar a un par radical en estado triplete, formado por un radical semiquinona protonado (PQH•) y un radical del tensoactivo (SDS•). Este par radical en el estado triplete se convierte en un par radical singlete y viceversa (reacción 2). Uno o ambos de los radicales indicados escapan del par radical singlete o del par radical triplete (reacciones 3 y 4). La filoquinona reducida (PQH₂) se forma por desproporción de la semiquinona protonada (reacción 5).

La estabilidad y fluorescencia de esta filoquinona reducida es mucho más alta que la obtenida usando los procedimientos de reducción química y electroquímica descritos en la bibliografía (14-20). Esto sugiere que las micelas de SDS crean un microentorno muy apropiado donde se alteran sustancialmente las rutas y

velocidades de reacción, mejorando la fluorescencia y la estabilidad de la especie fluorescente, lo que hace posible operar en condiciones aerobias.

La presencia de compuestos donadores de hidrógeno, tales como acetona, metanol o etanol también fue estudiada. Con estas sustancias cuando el SDS está ausente, y se trabaja en condiciones aerobias, no se observa fluorescencia. Esto se debe a la rápida oxidación del precursor del fluoróforo, la semiquinona radical (PQH•), por el oxígeno para producir filoquinona, no fluorescente, y peróxido de hidrógeno (20, 23); sin embargo, cuando las micelas de SDS están presentes, el metanol mejora la señal de fluorescencia. Así, para los estudios posteriores se seleccionó un medio micelar de SDS conteniendo metanol.

Estos estudios centrados en la filoquinona (vitamina K₁) se ampliaron a otras vitaminas del grupo K, concretamente la menaquinona (vitamina K₂) y la menadiona (vitamina K₃).

1.2.1 Diseño del sistema FI

La reacción fotoquímica de reducción de la filoquinona en presencia de metanol y de SDS a una concentración superior a la concentración micelar crítica se automatizó en un sistema de inyección en flujo con iluminación en línea. El diseño seleccionado fue el que se presenta en la Figura 1.3.

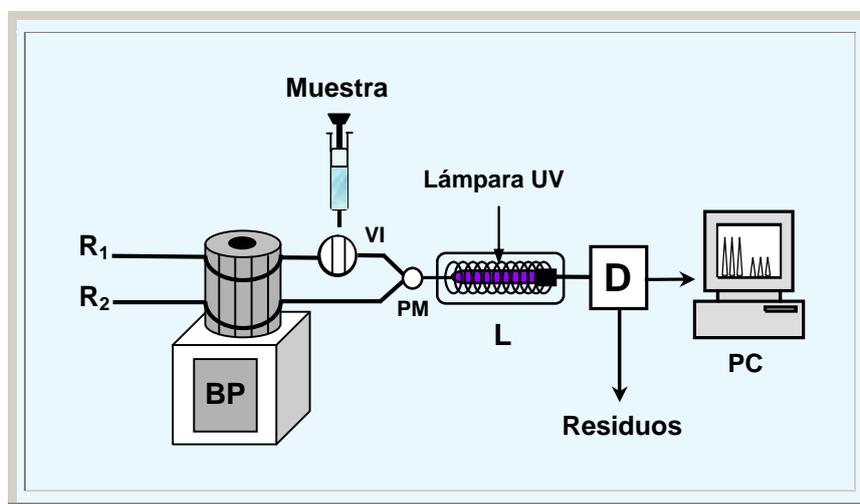


Figura 1.3. Esquema FI para la determinación de filoquinona.

BP = bomba peristáltica; R₁ = disolución reguladora acetato 0,1 M de pH 4,5; R₂ = SDS 0,1 M; VI = válvula de inyección; PM = punto de mezcla; D = detector; L = fotorreactor.

El fotorreactor se construyó con tubo de PTFE (de 0,5 mm de diámetro interno y 200 cm de longitud) formando una espiral alrededor de la lámpara de mercurio de baja presión tipo lápiz de 365 nm. El conjunto lámpara–fotorreactor se aloja en una caja metálica cuyas paredes interiores están recubiertas con espejos para aumentar por reflexión el flujo de fotones.

La muestra de filoquinona se introduce en una corriente de disolución reguladora acetato 0,1 M de pH adecuado con ayuda de una válvula de inyección. Esta corriente se une con la disolución de SDS en un punto de mezcla muy próximo al fotorreactor. Mientras pasa a través del fotorreactor la filoquinona se transforma en la

filoquinona reducida, muy fluorescente, pasando a la célula de flujo donde se excita a 346 nm, midiendo la fluorescencia emitida a 425 nm.

Realizando experiencias similares a las descritas para la filoquinona se comprobó que tanto la vitamina K₂ (menaquinona) como la K₃ (menadiona) emiten fluorescencia cuando se someten a la acción de la radiación UV en un medio micelar de SDS.

Se ha realizado un estudio comparativo de la señal fluorescente encontrada con diferentes agentes reductores frente a la obtenida en nuestro caso irradiando en un medio SDS/metanol. Los resultados se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1.
Influencia de la naturaleza del sistema de reducción sobre la fluorescencia de la filoquinona

<i>Agente reductor</i>	<i>Intensidad de fluorescencia</i>	<i>Referencia</i>
NaBH ₄	2,30	(16)
(CH ₃) ₄ NB ₃ H ₈	2,96	(24)
Zinc metálico	2,16	(15)
Metanol/ ácido ascórbico/ desoxigenación/ irradiación UV	2,80	(19)
Metanol/ desoxigenación/ irradiación UV	3,10	(21)
SDS/ metanol/ irradiación UV	4,75	Este estudio

En esta Tabla queda patente la gran sensibilidad a que conduce el proceso fotoquímico propuesto, con la ventaja adicional de eliminar la necesidad de trabajar en atmósfera exenta de oxígeno.

En estos ensayos previos las disoluciones de vitamina K eran bombeadas continuamente y mezcladas en línea con la disolución de reactivo (ambas corrientes con el mismo caudal de $0,4 \text{ ml min}^{-1}$) y a continuación se sometían a la acción de la luz ultravioleta en el fotorreactor.

El tipo de tensoactivo utilizado en la formación de micelas también se varió y se estudió la influencia de la presencia de surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos sobre la reacción fotoquímica y la estabilización del producto de la misma. La señal fluorescente en presencia de Triton X-100 o de alcohol polivinílico era la misma que en agua, mientras que con Brij-35 o con bromuro de cetiltrimetilamonio la fluorescencia disminuía. Sin embargo, tal como hemos señalado anteriormente, una intensa fluorescencia se observaba cuando la vitamina K se fotolizaba en presencia de SDS.

Como ya se ha indicado, la presencia de compuestos donadores de átomos de hidrógeno ha sido estudiada y se ha comprobado que estas sustancias no producen ningún efecto favorable sobre la fluorescencia cuando el SDS está ausente. Esto es debido a la rápida oxidación del precursor del fluoróforo, la semiquinona radical (PQH• en el caso de la filoquinona), por el oxígeno para producir PQ, no fluorescente, y peróxido de hidrógeno (20, 25, 26). Sin embargo, cuando está presente el SDS, el metanol

mejora la señal fluorescente; así, en posteriores estudios se utilizó un medio micelar de SDS en combinación con metanol.

1.2.2 Estudio de las variables experimentales en el sistema FI

Para optimizar el procedimiento experimental con el fin de proponer un nuevo método sensible y exacto para la determinación de vitaminas K, nos centramos en la filoquinona para investigar la influencia de las diferentes variables químicas y FI implicadas en el proceso. Entre las variables químicas se estudió con detenimiento el efecto que el pH y diferentes concentraciones de SDS y metanol ejercían sobre la señal fluorescente utilizando el método univariante. En relación con las variables hidrodinámicas se comprobó la influencia de los caudales que circulan por cada canal, el volumen de muestra inyectado y la longitud del fotorreactor. La optimización de las condiciones experimentales sería a su vez la base para aportar un método FI-fluorimétrico para la determinación de filoquinona.

1.2.2.1 Variables químicas

La fotorreducción de filoquinona en medio micelar de SDS se incrementa cuando aumenta la concentración de metanol hasta el 25 % (v/v), como se muestra en la Figura 1.4, siendo este valor el que se ha seleccionado para estudios posteriores.

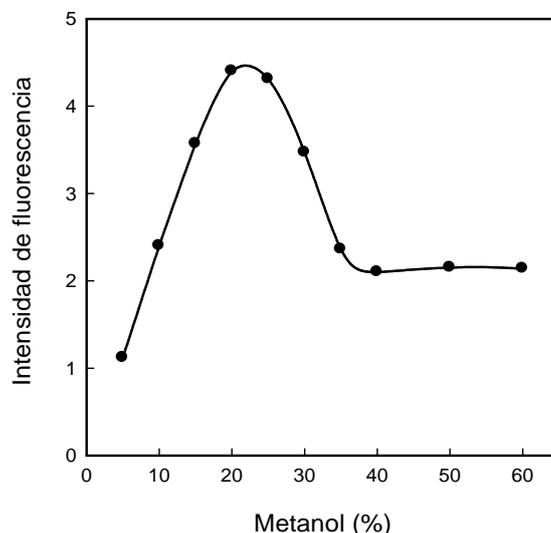


Figura 1.4. Estudio del porcentaje de metanol en las muestras.

Condiciones: $S = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; SDS $0,1 \text{ M}$; disolución reguladora fosfato $0,1 \text{ M}$ de pH 7; volumen de inyección = $200 \mu\text{l}$; caudal = $0,60 \text{ ml min}^{-1}$; fotorreactor = 200 cm .

El metanol se introducía en el sistema FI adicionado a la disolución de la muestra a la concentración de 25 % (v/v). De esta forma se evita el efecto perjudicial que el metanol tiene sobre los tubos de Tygon de la bomba.

El efecto del pH sobre la fotorreducción de la filoquinona se estudió haciendo circular por el canal R_1 del sistema de flujo diferentes disoluciones reguladoras de acetato o fosfato, de pH comprendido entre 2 y 9, y la disolución $0,1 \text{ M}$ en SDS por el canal R_2 . La intensidad de fluorescencia aumenta ligeramente cuando

aumenta el pH hasta 4,5 y a valores más altos disminuye tal como se muestra en la Figura 1.5.

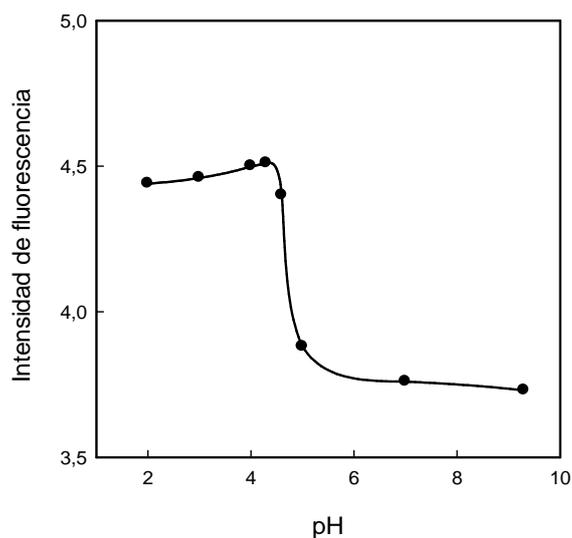


Figura 1.5. Estudio del efecto del pH sobre la reducción de la filoquinona.

Condiciones: $S = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; SDS $0,1 \text{ M}$; 25 % MeOH; volumen de inyección = $200 \mu\text{l}$; caudal = $0,60 \text{ ml min}^{-1}$; fotorreactor = 200 cm .

Los constituyentes de la disolución reguladora (acetato o fosfato) influyen muy poco en la señal fluorescente; con las disoluciones reguladoras de acetato los picos son algo más altos y por ello se seleccionó trabajar en todas las experiencias posteriores con esta reguladora. Al investigar la influencia de la concentración de la disolución reguladora se comprobó que se obtenían excelentes resultados con disoluciones acetato-acético de pH 4,5 de concentración $0,1 \text{ M}$.

Utilizando la disolución reguladora acetato 0,1 M de pH 4,5 como corriente portadora, se investigó la influencia de la concentración de SDS, pero siempre a concentraciones superiores a la micelar crítica. La eficiencia de la fotorreducción de la filoquinona (y por tanto de la intensidad de emisión fluorescente) aumentaba con la concentración de SDS hasta alcanzar una meseta, como puede observarse en la Figura 1.6. Esta constancia en la fluorescencia se mantiene entre las concentraciones 0,08 y 0,2 M de SDS, pero la señal disminuye un poco a concentraciones mayores. Se seleccionó como óptima una concentración de 0,1 M.

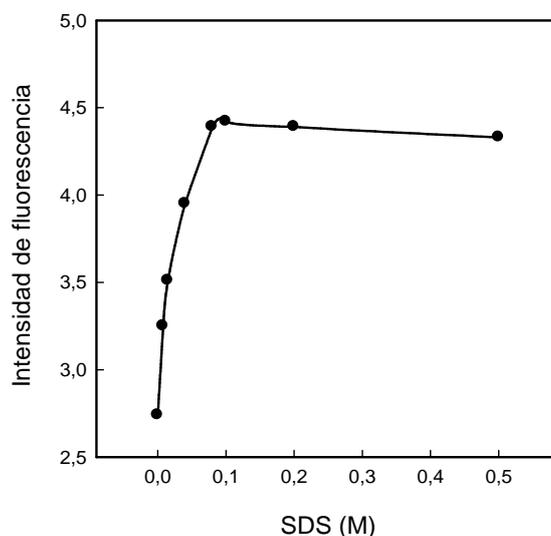


Figura 1.6. Estudio la concentración de SDS.

Condiciones: $S = 700$ V; $\lambda_{\text{ex}} = 346$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5}$ M; 25 % MeOH; disolución reguladora acetato 0,1 M de pH 4,5; volumen de inyección = 200 μ l; caudal = 0,60 ml min^{-1} ; fotorreactor = 200 cm.

1.2.2.2 Variables dinámicas

Se estudió por el método univariante el efecto que sobre la señal analítica tenía el volumen de inyección, insertando en la corriente transportadora volúmenes comprendidos entre 35 y 335 μl .

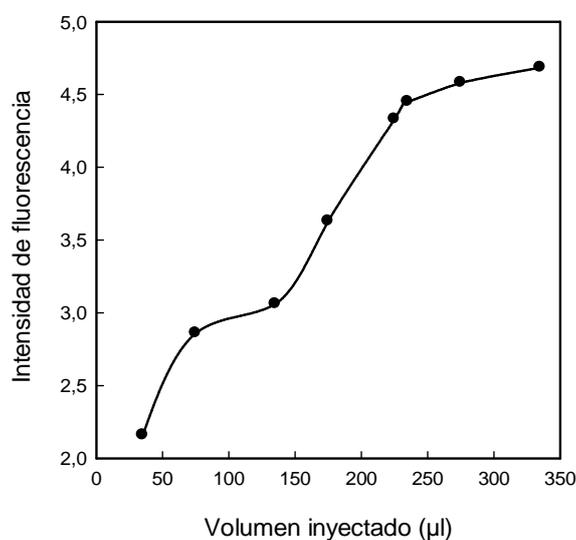


Figura 1.7. Estudio del volumen de inyección.

Condiciones: $S = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; SDS $0,1 \text{ M}$; 25 % MeOH; disolución reguladora acetato $0,1 \text{ M}$ de pH 4,5; caudal = $0,60 \text{ ml min}^{-1}$; fotorreactor = 200 cm.

De acuerdo con la gráfica de la Figura 1.7 se seleccionó el volumen de 250 μl como más conveniente, puesto que se encontraba en una zona en la que se había alcanzado una fluorescencia máxima y prácticamente constante.

Con estudios similares se escogió trabajar con un caudal de $0,74 \text{ ml min}^{-1}$, teniendo en cuenta la Figura 1.8.

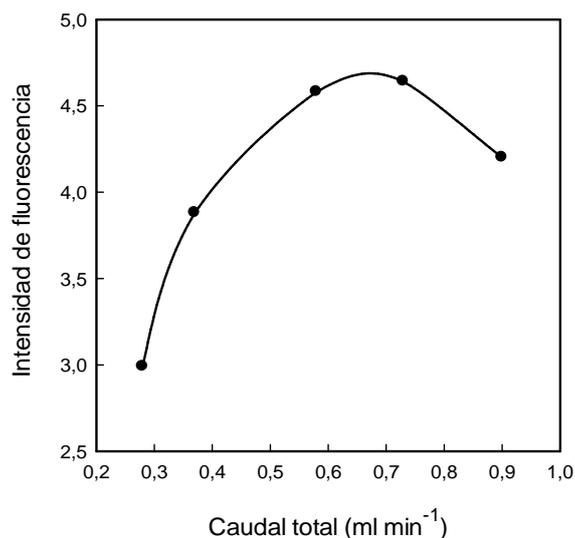


Figura 1.8. Estudio del caudal.

Condiciones: $S = 700 \text{ V}$; $\lambda_{\text{ex}} = 346 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5} \text{ M}$; SDS $0,1 \text{ M}$; 25 % MeOH; disolución reguladora acetato $0,1 \text{ M}$ de pH 4,5; volumen de inyección = $250 \mu\text{l}$; fotorreactor = 200 cm .

Finalmente, se comprobó como evolucionaba la respuesta fluorescente cuando se utilizaban reactores de diferente longitud, todos ellos iluminados totalmente. Esta variable está relacionada directamente con el tiempo de irradiación, tal como se muestra en la Figura 1.9. Se seleccionó un reactor de 150 cm que corresponde a un tiempo de irradiación de 23 s .

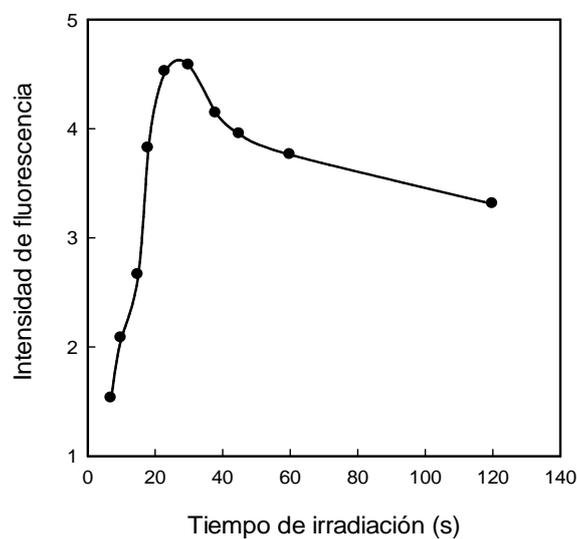


Figura 1.9. Estudio del tiempo de irradiación.

Condiciones: $S = 700$ V; $\lambda_{\text{ex}} = 346$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm; monocromadores 8/8; filoquinona $7,5 \times 10^{-5}$ M; SDS 0,1 M; 25 % MeOH; disolución reguladora acetato 0,1 M de pH 4,5; volumen de inyección = 250 μl ; caudal = 0,74 ml min^{-1} .

En la Tabla 1.2 se resumen los resultados obtenidos mediante el método univariante:

Tabla 1.2
Condiciones seleccionadas para la determinación de filoquinona
(método univariante)

<i>Canal</i>	<i>Variable</i>	<i>Valor óptimo</i>
R ₁	Reguladora acetato	
	Concentración (M)	0,1
	pH	4,5
R ₂	SDS	
	Concentración (M)	0,1
	Fotorreactor	
	Longitud (cm)	150
	Volumen de muestra (μl)	250
	Caudal total (ml min ⁻¹)	0,74

Las variables FI, caudal, longitud del fotorreactor y volumen de muestra inyectado, afectan tanto al tiempo de irradiación como a la dispersión, y por tanto, a la señal analítica. Estas variables están interrelacionadas y por este motivo nos pareció conveniente optimizarlas aplicando un método multivariante. Se seleccionó el método de Yates (27) de diseño factorial, estableciendo los niveles altos y bajos para las tres variables utilizando la información previamente obtenida por el método univariante.

De acuerdo con este estudio, un aumento del volumen de muestra inyectado así como de la longitud del fotorreactor producen

un efecto positivo mientras que un aumento del caudal repercute negativamente. Se seleccionaron entonces los nuevos niveles a estudiar para la segunda tanda de experiencias.

En la segunda serie de experiencias se seleccionaron las condiciones teniendo en cuenta esos resultados previos. En este conjunto de experiencias se comprobó que el aumento en el volumen de muestra tiene sólo un pequeño efecto positivo sobre la señal, lo que significa que los parámetros óptimos están bastante cercanos a los usados. Un aumento en el caudal tiene todavía efecto negativo, pero un aumento en la longitud del reactor no es necesario. En la serie final de experiencias se encontraron como valores óptimos: longitud del fotorreactor 200 cm, caudal $0,74 \text{ ml min}^{-1}$ ($0,37 \text{ ml min}^{-1}$ por cada canal) y volumen de muestra inyectado $275 \mu\text{l}$.

1.2.3 Determinación de filoquinona

Una vez estudiadas las condiciones para evaluar la vitamina K_1 en un sistema de inyección en flujo, aprovechamos estas investigaciones para aportar un nuevo método FI para la citada vitamina.

Utilizando las condiciones seleccionadas en los estudios previos se realizaron una serie de experiencias con diferentes disoluciones de filoquinona de concentraciones conocidas para establecer las líneas de calibrado. Cada una de las disoluciones estándares se inyectaba por triplicado y las medidas de fluorescencia se realizaron a dos niveles diferentes de sensibilidad del aparato (trabajando a 800 V y a 700 V). Aplicando 800 V al tubo

fotomultiplicador del espectrofluorímetro se encontró linealidad en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,09 y 0,90 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (2×10^{-7} – 2×10^{-6} M), mientras que con el voltaje de 700 V el intervalo lineal se sitúa entre 0,45 y 45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1×10^{-6} – 1×10^{-4} M). Las ecuaciones de las líneas rectas obtenidas por regresión fueron:

$$\mathbf{800\ V:} \quad F = (0,141 \pm 0,009) + (0,654 \pm 0,020) C \quad r = 0,9986$$

$$\mathbf{700\ V:} \quad F = (0,134 \pm 0,006) + (0,1298 \pm 0,0003) C \quad r = 0,9999$$

donde **F** representa la señal fluorescente y **C** es la concentración de filoquinona expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

En la Figura 1.10 se puede apreciar la baja señal del fondo y la buena estabilidad de la línea base.

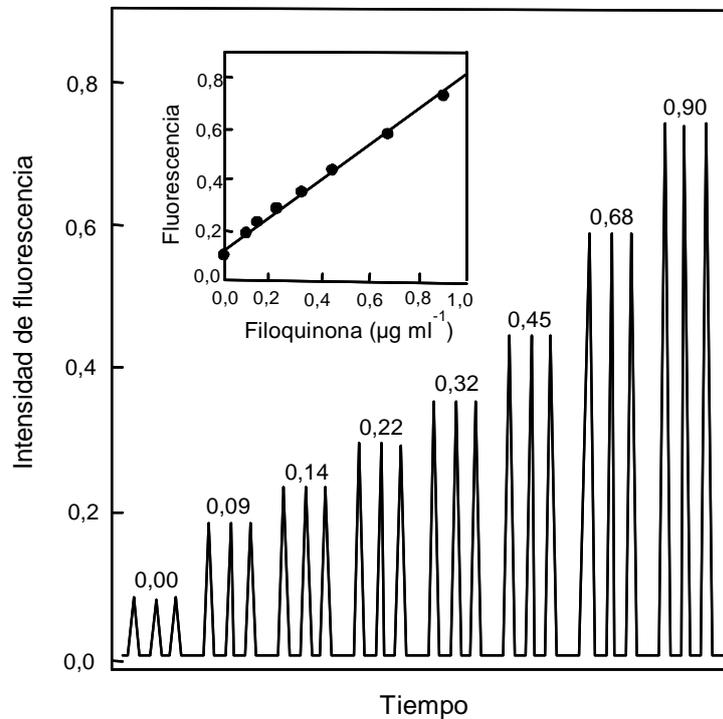


Figura 1.10. Gráfica de calibración para la determinación de filoquinona a bajas concentraciones ($S = 800 \text{ V}$).

Las concentraciones sobre los picos se expresan en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Se han evaluado los resultados numéricos obtenidos en dos series de ocho muestras con idéntico contenido en filoquinona a dos concentraciones diferentes. En la Tabla 1.3 se encuentran los resultados obtenidos en estas experiencias.

Tabla 1.3
Parámetros estadísticos en la determinación de filoquinona

X_{verd}	0,225 $\mu\text{g ml}^{-1}$	4,507 $\mu\text{g ml}^{-1}$
\bar{x}	0,225 $\mu\text{g ml}^{-1}$	4,492 $\mu\text{g ml}^{-1}$
S	$4,769 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,111 $\mu\text{g ml}^{-1}$
S_m	$1,509 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,035 $\mu\text{g ml}^{-1}$
RSD	0,67 %	0,77 %
% E	1,53 %	1,76 %
t_{exp}	0,02	0,14
t'_{exp}	0,06	0,43

El límite de detección calculado de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC (28) fue $0,05 \mu\text{g ml}^{-1}$ y la velocidad de muestreo de 90 inyecciones/hora.

La precisión entre días del método se estudió analizando tres muestras idénticas conteniendo $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de filoquinona. Durante cinco días consecutivos cada una de las muestras fue analizada diez veces cada día; la desviación estándar relativa (RSD) encontrada fue 2,1%.

1.2.4 Estudio de interferentes

Dado que el método FI aportado en este Capítulo de la Tesis tiene como finalidad principal la determinación de la vitamina K_1 en productos vegetales (verduras y frutas), se estudió la influencia que

diversas sustancias, que pudieran estar presentes en muestras reales, ejercían sobre la respuesta fluorescente de la filoquinona. Para ello se analizaron una serie de muestras conteniendo todas ellas $0,45 \mu\text{g ml}^{-1}$ de filoquinona y cantidades crecientes de cada uno de los potenciales interferentes hasta concentraciones de $2,25 \text{ mg ml}^{-1}$. En la Tabla 1.4 se muestran los límites tolerados, aceptando como cantidad máxima de especie extraña permitida aquella que no produzca un error relativo superior a $\pm 4 \%$.

Tabla 1.4
Estudio de interferentes

<i>Especie añadida</i>	<i>Máxima relación interferente/analito tolerada</i>
Acetato, alcohol bencílico, Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , NO_3^- , oxalato	> 5000
Mg^{2+} , sorbitol, tiamina	4000
Almidón, fructosa, glucosa, lactosa, Fe^{2+}	1000
Citrato, Fe^{3+}	500
Ácido esteárico*, ácido palmítico*, éster metílico del ácido margárico*, metil estearato*, nitrito	50
Ácido ascórbico	1

*Máxima relación soluble.

El anión nitrito y, fundamentalmente, el ácido ascórbico interfieren, pero estas interferencias pueden evitarse fácilmente pasando la muestra antes de la inyección a través de una minicolumna rellena con un intercambiador aniónico.

1.2.5 Aplicaciones

La validez del método propuesto fue contrastada aplicándolo a la determinación de filoquinona en muestras reales: preparados farmacéuticos y productos vegetales.

La determinación del contenido de vitamina K₁ en fármacos es muy sencilla, puesto que se comprobó que los aditivos y excipientes que acompañan a las preparaciones farmacéuticas comerciales disponibles no interfieren. En la Tabla 1.5 aparecen los resultados encontrados aplicando el método de la adición estándar.

Tabla 1.5
Determinación de filoquinona en Konakion (ampollas)

<i>Muestra^a</i> <i>(laboratorio)</i>	<i>Fabricante (mg)</i>	<i>Valor encontrado^b (mg)</i>
Konakion ampollas (Roche)	10	10,07 ± 0,22

^a Composición del medicamento (por 1 ml): filoquinona 10 mg; excipientes: ácido glicocólico, lecitina, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, agua.

^b Media de 3 determinaciones ± desviación estándar.

También se han realizado estudios de recuperación añadiendo filoquinona al medicamento, tal como se indica en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6
Estudio de recuperación de vitamina K₁ en el medicamento Konakion

<i>Añadido (μg)</i>	<i>Encontrado^a (μg)</i>	<i>% Recuperación</i>
50	49,3 ± 3,0	98,6
125	124,8 ± 2,9	99,8
200	199,0 ± 1,4	99,5
250	250,3 ± 1,3	100,1

^a Media de 3 determinaciones ± desviación estándar.

Sin embargo, como ya se ha comentado, nuestra meta era encontrar un método sencillo y seguro para evaluar la filoquinona en productos vegetales. Para estas aplicaciones la vitamina K₁ tenía que extraerse de las verduras y frutas como un paso previo a la determinación. Se ensayaron como disolventes para la extracción metanol, 2-propanol y hexano, solos y en mezclas. De estos estudios se concluyó que la extracción con hexano era reproducible, fácil de realizar y se conseguía un porcentaje de recuperación

aproximadamente de 97 ± 2 %. De ahí que la extracción con hexano sea la recomendada para las determinaciones de rutina.

Debido a la complejidad de las matrices comprobamos que era muy conveniente efectuar una purificación rápida de las muestras por extracción en fase sólida.

Disoluciones estándares de filoquinona en hexano fueron utilizadas para decidir el sistema de extracción más conveniente. Se utilizaron como fases sólidas carbón activo, C₁₈, Strata X (estireno-divinilbenceno de superficie modificada) y gel de sílice, comprobando que las recuperaciones más altas de analito se obtenían cuando se retenía sobre gel de sílice. También se estudió el tipo de disolvente más adecuado para la desorción del analito retenido en la fase sólida y para ello se compararon los resultados encontrados utilizando diversos disolventes, siendo la mezcla hexano-éter dietílico (96:4 v/v) la más conveniente.

Teniendo en cuenta la importancia que en la práctica tiene la automatización de procesos, pensamos en diseñar un sistema para la determinación de filoquinona que incorporara al esquema FI-fotoquímico ya estudiado, el proceso de preconcentración y separación por extracción en fase sólida totalmente automatizado. Esto fue posible incorporando un equipo ASPEC XLi de Gilson, tal como se muestra en la Figura 1.11.

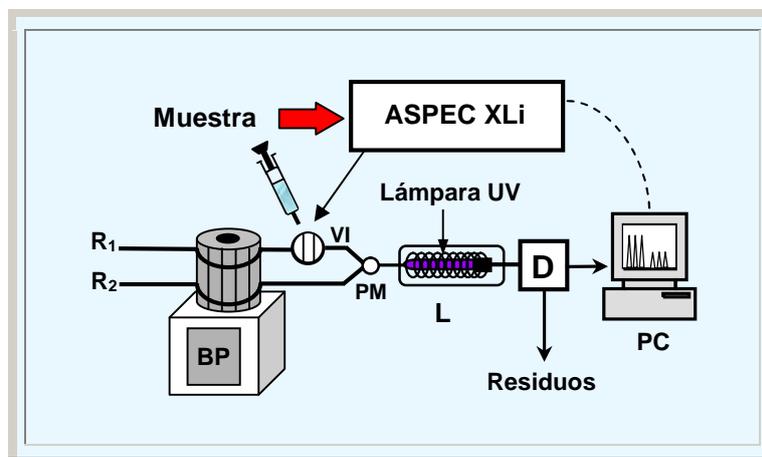


Figura 1.11. Esquema FI-SPE para la determinación de filoquinona.

La eficiencia del procedimiento automatizado se comprobó con muestras estándares de vitamina K₁ a concentraciones diferentes, utilizando 500 mg de la fase sólida (gel de sílice) en cartuchos de 6 ml, y la mezcla hexano-éter dietílico, tal como ya se ha indicado. La cantidad de eluyente fue optimizada después de realizar una serie de experiencias con diferentes volúmenes, midiendo las recuperaciones obtenidas al pasar a través de la fase sólida 10 ml de disoluciones de filoquinona en hexano. El volumen de eluyente seleccionado fue de 5 ml, volumen con el que las recuperaciones de vitamina son coincidentes con las encontradas con volúmenes mayores. Las recuperaciones de filoquinona permanecen constantes y próximas al 100 % cuando las concentraciones de sus disoluciones se encuentran en el intervalo comprendido entre 0,02 y 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tal como se muestra en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7
Estudio de recuperación de filoquinona mediante la técnica SPE

<i>Muestra</i>	<i>Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>Recuperación (%)^a</i>
1	0,02	98 \pm 4
2	0,05	99 \pm 3
3	0,10	97 \pm 2
4	0,50	98 \pm 1
5	1,00	96 \pm 2

^a Media de 4 determinaciones \pm desviación estándar.

Las muestras en las que se analizó filoquinona fueron verduras (hojas de espinacas, coles de Bruselas, brócoli y alfalfa) y frutas (pera y manzana) y todas las etapas del procedimiento analítico se realizaron bajo luz difusa para impedir la degradación de la filoquinona. El exceso de agua de las verduras y frutas se eliminó antes de la extracción envolviendo las muestras en varias capas de papel absorbente. Después de eliminar las partes no comestibles, las muestras se cortaron en porciones de 1 cm y se trituraron con una picadora de alimentos comercial. Para el análisis de espinacas, coles de Bruselas, brócoli y alfalfa, aproximadamente 1,0 g de muestra se pesó exactamente y se transfirió a un matraz de color topacio y después de añadir 10 ml de hexano, se sometió a ultrasonidos durante 15 min. En las muestras de pera y manzana,

que contienen menor cantidad de filoquinona, la muestra pesada fue de 10 g y el volumen de hexano utilizado fue de 50 ml. La mezcla homogénea fue filtrada a través de un embudo de vidrio sinterizado y el filtrado claro se evaporó a sequedad en un evaporador a vacío con un baño de agua mantenido a 40 °C.

El residuo se disolvió en 10 ml de hexano y se pasó a través de un cartucho de sílice de SPE (500 mg en un tubo de 6 ml) con un caudal de 3 ml min⁻¹. Los cartuchos de sílice se acondicionaron, antes de introducir las muestras, con 5 ml de una mezcla de hexano-éter dietílico (96:4 v/v) y 5 ml de hexano, separados por 2 ml de nitrógeno. La filoquinona retenida en la fase sólida fue lavada con 5 ml de hexano y 2 ml de nitrógeno y eluida con 5 ml de la mezcla hexano-éter dietílico (96:4 v/v) circulando con un caudal de 3 ml min⁻¹, pasando después 2 ml de nitrógeno.

El eluido se evaporó a sequedad en un evaporador al vacío bajo nitrógeno. El residuo final se disolvió primero en 0,5 ml de metanol, seguido por 1,5 ml de SDS 0,027 M. La muestra reconstituida (275 µl) conteniendo la cantidad conveniente de metanol (25% v/v) y de SDS (0,02 M) se inyectó en el sistema FI.

Los resultados encontrados en el análisis de filoquinona en vegetales aparecen recogidos en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8
Contenido de filoquinona en vegetales y frutas

<i>Muestra</i>	<i>Contenido de filoquinona (µg/100 g)</i>	
	<i>Método FI^a</i>	<i>Método HPLC (29)</i>
Espinacas	355 ± 8	359 ± 5
Brócoli	104 ± 7	107 ± 5
Alfalfa	126 ± 5	130 ± 10
Coles de Bruselas	300 ± 7	290 ± 6
Pera	14,8 ± 0,2	12,2 ± 0,4
Manzana	7,5 ± 0,6	8,9 ± 0,5

^a Media de 3 determinaciones ± desviación estándar.

También se realizó un estudio de recuperación de filoquinona, adicionando diferentes cantidades de ésta a cada una de las muestras, obteniendo resultados satisfactorios, con recuperaciones muy próximas al 100 % tal como se muestra en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9
Estudio de recuperación de filoquinona en vegetales y frutas

<i>Muestra</i>	<i>Añadido</i> ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	<i>Encontrado^a</i> ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	<i>% Recuperación</i>
Espinacas	50	48,5 \pm 0,3	97
	100	95,0 \pm 0,2	95
Brócoli	20	19,6 \pm 0,1	98
	30	29,7 \pm 0,2	99
Alfalfa	20	19,0 \pm 0,2	95
	40	39,2 \pm 0,1	98
Coles de Bruselas	50	48,5 \pm 0,2	97
	80	77,6 \pm 0,2	97
Pera	3,0	2,94 \pm 0,01	98
	1,5	1,49 \pm 0,02	99
Manzana	1,0	0,96 \pm 0,01	96
	2,0	1,92 \pm 0,03	96

^a Media de 3 determinaciones \pm desviación estándar.

En estos estudios que hemos presentado se muestra que la filoquinona se reduce eficientemente a su forma fluorescente dihidronaftoquinona por irradiación con luz ultravioleta en medio micelar. Debido a la mejora en la estabilidad y fluorescencia de esa forma reducida en las micelas de SDS, el método FI propuesto se

aplica en condiciones aerobias y presenta una alta sensibilidad, lo que significa que se puede evitar la desoxigenación de muestras y reactivos. Comparado con otros métodos fluorescentes basados en la reducción de la filoquinona por medios químicos (15-17), electroquímicos (14) y fotoquímicos (20), el método aquí presentado es más sencillo, rápido y económico, aunque es menos sensible que alguno de los presentados en la Tabla 1.10. Para ampliar la utilidad práctica del método aportado, nos centramos en el acoplamiento del método de flujo estudiado como sistema de detección post-columna en HPLC para determinar no sólo filoquinona sino otras vitaminas K.

Tabla 1.10
Características analíticas de algunos métodos para la determinación de filoquinona

<i>Método</i>	<i>Detección</i>	<i>Aeróbico</i>	<i>Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>Límite de detección</i>	<i>Referencia</i>
ASV		No	0,5 – 3	0,13 $\mu\text{g ml}^{-1}$	(30)
GLC	Captura de electrones	Sí	0,45 – 45	0,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$	(9)
HPLC	Electroquímica	No	0,02 – 0,2		(13)
HPLC	Reducción electroquímica/ fluorescencia	No		0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	(14)
HPLC	Reducción química/ fluorescencia	No		150 pg^{a}	(16)
				150 pg^{a}	(17)
				25 pg^{a}	(15)
HPLC	Reducción fotoquímica/ fluorescencia	No		1,5 ng ml^{-1}	(20)
HPLC	Absorción UV	Sí		0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$	(12)
FI	Fotoquímica/ fluorescencia indirecta	Sí		0,18 $\mu\text{g ml}^{-1}$	(10)
FI	Reducción fotoquímica en micelas de SDS/ fluorescencia	Sí	0,09 – 90	0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Este trabajo

^a Volumen de muestra inyectado no disponible.

ASV: Voltametría de redisolución anódica. GLC: Cromatografía gas-líquido.

1.3 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE VITAMINAS K₁, K₂ Y K₃ POR HPLC Y DETECCIÓN FOTOQUÍMICA–FLUORESCENTE

En la Introducción de la Memoria ya se ha comentado que las reacciones fotoquímicas post-columna han sido aplicadas con éxito como sistemas de detección en cromatografía líquida, puesto que estos métodos han demostrado alta sensibilidad y selectividad (31-33), presentando indudables ventajas cuando se comparan con otras reacciones post-columna (34). Debido a que los procesos fotoquímicos se producen a través de radicales libres intermedios, las velocidades de reacción son muy rápidas (35). Además, este tipo de reacciones tienen buena selectividad debido a que sólo un reducido grupo de analitos puede experimentar fotorreacciones (36).

En el caso de las vitaminas K se han propuesto en la bibliografía dos reactores post-columna para su detección, uno en presencia (19) y otro en ausencia de ácido ascórbico (20). En ambos trabajos se opera en condiciones anaerobias y se utiliza el metanol como fase móvil y como sustrato donador de átomos de hidrógeno.

En esta parte de la Tesis nosotros extendemos las investigaciones realizadas con las vitaminas K₁, K₂ (concretamente la menaquinona-4) y K₃ en medio micelar bajo la acción de la luz ultravioleta, en un sistema de flujo, a la detección de las mismas tras su separación en una columna cromatográfica. Estas tres vitaminas, filoquinona, menaquinona-4 y menadiona, se han seleccionado por su mayor disponibilidad e importancia dentro del grupo de las vitaminas K.

1.3.1 Optimización del sistema de detección post-columna

Para facilitar el estudio de la reacción post-columna, se realizaron experiencias sin utilizar la columna cromatográfica. Esto permite estudiar en un tiempo relativamente corto muchos parámetros experimentales. Los datos obtenidos obviamente deben ser verificados posteriormente en sistemas con columna.

1.3.1.1 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la fotorreducción de las vitaminas en presencia de SDS y metanol se ha estudiado en el intervalo comprendido entre 2 y 9. Como muestra la Figura 1.12 A, la evolución de la reacción fotoquímica es ligeramente diferente para la filoquinona, menaquinona-4 y menadiona. Un pH 4,5, conseguido con una disolución reguladora acetato 0,1 M, se ha seleccionado para posteriores experiencias.

1.3.1.2 Efecto de la concentración de SDS

Como se ha observado anteriormente, la concentración de surfactante tiene una marcada influencia sobre la estabilidad e intensidad de fluorescencia de las formas hidroquinona de las vitaminas K. La representación de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de SDS presenta una meseta entre 0,08 y 0,20 M, valor por encima del cual la fluorescencia disminuye (Figura 1.12 B). Se ha seleccionado una concentración 0,1 M en SDS.

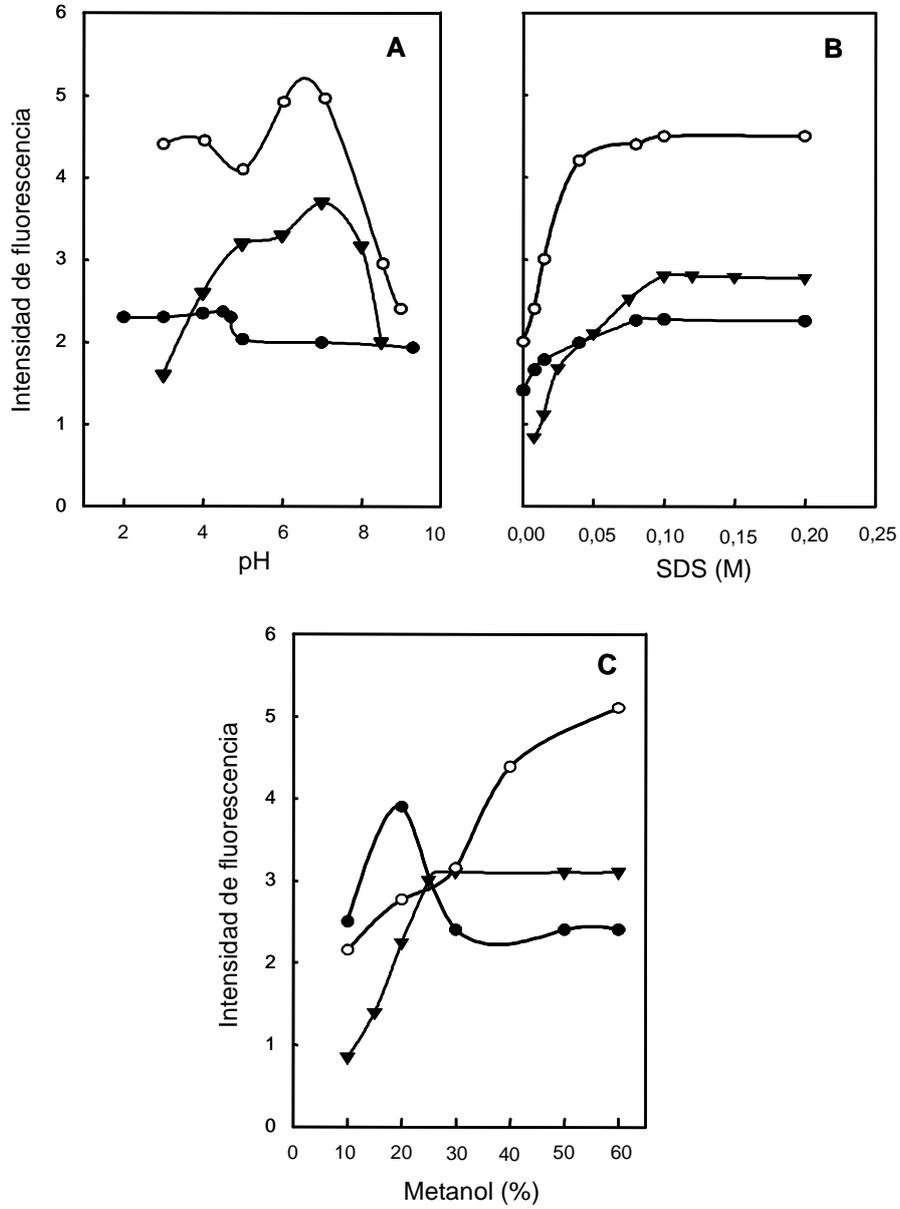


Figura 1.12. Efecto del pH (A) y de la concentración de SDS (B) y metanol (C) sobre la señal de fluorescencia.

Concentración de los analitos: 1×10^{-4} M; filoquinona (●), menaquinona (○) y menadiona (▼).

1.3.1.3 Efecto de la concentración de metanol

Como se ha indicado, la fotorreducción de las vitaminas K en medio micelar de SDS está afectada por la presencia de metanol. La Figura 1.12 C muestra que un 50 % de metanol es un buen compromiso para que las señales de fluorescencia de las tres vitaminas no difieran demasiado.

1.3.1.4 Influencia del tiempo de irradiación

El tiempo de residencia de los analitos en el fotorreactor tiene un efecto decisivo sobre la reacción fotoquímica y como consecuencia sobre la sensibilidad obtenida. El tiempo de residencia se puede seleccionar controlando el caudal (eluyente y reactivos) y/o la longitud del reactor. Un tiempo de irradiación de alrededor de 20 s era suficiente para producir la total conversión de las vitaminas en su forma hidroquinona fluorescente. Este tiempo se obtenía utilizando un reactor de 200 cm de longitud y caudales de $0,60 \text{ ml min}^{-1}$ para la fase móvil, $0,45 \text{ ml min}^{-1}$ para la corriente de SDS y $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ para la disolución reguladora acetato. Con estas condiciones y la configuración presentada en la Fig. 1.3, el contenido en metanol en el interior del fotorreactor es del 50 %.

1.3.1.5 Características espectrales

Los espectros de fluorescencia de las formas hidroquinona, en las condiciones de trabajo que hemos seleccionado, se muestran en la Figura 1.13. El orden de rendimiento de fluorescencia es filoquinona < menadiona < menaquinona. Las longitudes de onda de

excitación y de emisión seleccionadas para la detección han sido $\lambda_{\text{ex}} = 342 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 426 \text{ nm}$, con el fin de obtener las mejores señales para los tres analitos.

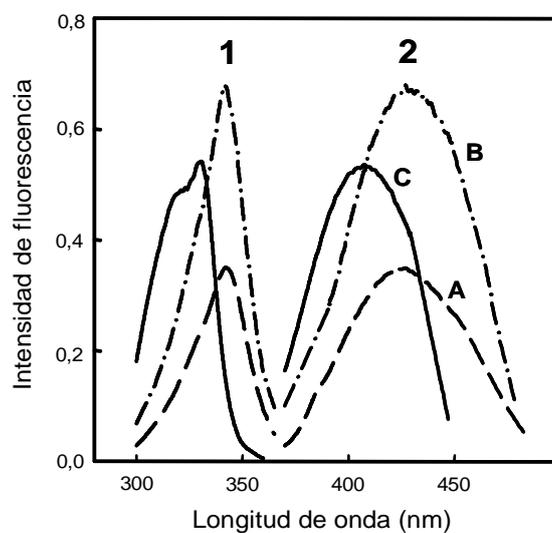


Figura 1.13. Espectros de fluorescencia de excitación (1) y de emisión (2) de las vitaminas K en metanol 50 % (v/v) y SDS 0,1 M.

(A): filoquinona; (B): menaquinona; (C): menadiona.

1.3.2 Cromatografía

Las vitaminas K se pueden separar por cromatografía tanto en fase normal como en fase reversa. En estos estudios nosotros nos hemos decantado por emplear sistemas en fase reversa por motivos de compatibilidad con el proceso fotoquímico post-columna. Se tiene

que emplear un alto contenido de modificador orgánico para conseguir tiempos de análisis cortos. Como ya se ha indicado, se seleccionó el metanol como modificador y la cantidad de agua en la fase móvil se varió entre 0 y 5 %. Para todas las relaciones agua-metanol tratadas se obtuvieron buenas separaciones, pero los tiempos de retención aumentaban considerablemente cuando lo hacía el porcentaje de agua. Así, para la vitamina K₁ se obtuvieron tiempos de retención de 17,7 min y 8,1 min para porcentajes del 99 % y metanol puro, respectivamente. Por ello, el metanol puro circulando con un caudal de 0,6 ml min⁻¹ se escogió como un compromiso entre separación, tiempo de análisis y economía.

Las figuras 1.14 A y 1.14 B muestran los cromatogramas de una disolución estándar de menadiona, menaquinona y filoquinona utilizando la detección post-columna por generación de fluorescencia por reducción fotoquímica en presencia de SDS y con detección fotométrica a 248 nm. De la comparación de los dos cromatogramas se puede afirmar que el sistema de detección propuesto debe ser empleado sin duda cuando se quiera tener una detección sensible para las vitaminas K.

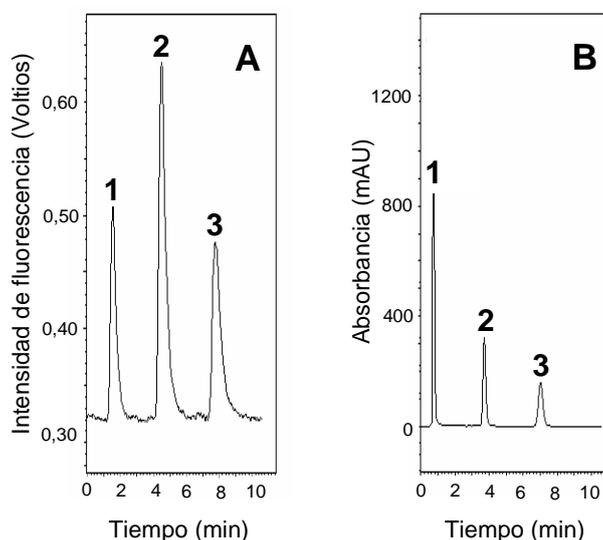


Figura 1.14. Cromatogramas de una disolución estándar de vitaminas K₁, K₂ y K₃.

(A) Reducción fotoquímica–detección fluorescente ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 342/426 nm);
(B) Detección fotométrica a 248 nm. Picos: (1) menadiona; (2) menaquinona;
(3) filoquinona.

El sistema cromatográfico consiste en un instrumento de HPLC Beckman Coulter, compuesto por un módulo de disolventes System Gold 125 NM, un detector de diodos en serie System Gold 168, una válvula de inyección Rheodyne con un lazo de 50 μ l y una columna Ultrasphere Beckman (C₁₈ 5 μ m, 45 mm x 4,6 mm). Para el control de las bombas, la integración y cuantificación, se utilizó el software 32 Karat System Gold (Beckman, versión 3.1). La fluorescencia se siguió con un espectrofluorímetro SLM-Aminco Bowman equipado con una célula de flujo FP294 Thermo Spectronic

de un volumen interno de 8 μ l y 10 mm de camino óptico, seleccionando como longitudes de onda para la excitación y emisión, 342 nm y 426 nm, respectivamente. El detector de fluorescencia se conecta al equipo de HPLC por medio de una interfase SS420x.

Todo el esquema del sistema HPLC con detección post-columna se presenta en la Figura 1.15, donde se incluye el fotorreactor formado por una espiral de 42 vueltas de tubo de PTFE (0,5 mm de diámetro interno y 200 cm de longitud), arrollado alrededor de una lámpara de mercurio de baja presión de forma de varilla de 6 W de potencia. El excelente comportamiento del PTFE frente a la irradiación con longitudes de onda inferiores a 300 nm se basa en la transferencia de la radiación difusa y el efecto de refractancia interna (tubo de luz) de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (37). En la figura también se incluye el sistema de extracción en fase sólida, ya descrito anteriormente, y que se acopló al cromatógrafo en aquellas aplicaciones del método en muestras reales en las que las vitaminas K se encontraban en concentraciones tan bajas que era preciso incluir una etapa de preconcentración.

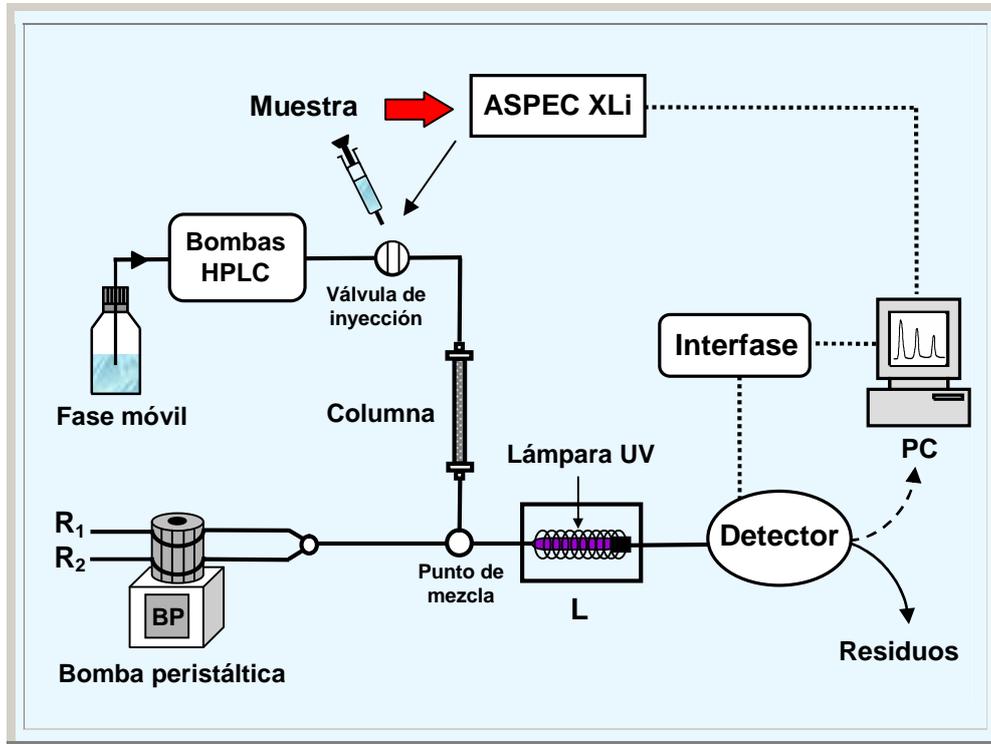


Figura 1.15. Esquema HPLC–SPE para la determinación de vitaminas K.

R₁ = Disolución reguladora acetato 0,1 M de pH 4,5; R₂ = SDS 0,1 M; fase móvil = metanol; volumen de inyección = 50 µl; L = fotorreactor (200 cm).

1.3.3 Características analíticas del método

Se inyectaron en el sistema cromatográfico disoluciones estándares de cada vitamina y se comprobó que existía una relación lineal entre áreas de pico y concentraciones de cada vitamina entre 0,1 y 10 µg ml⁻¹ de las mismas. Cada punto de la gráfica de calibrado corresponde a los valores medios obtenidos a partir de tres medidas independientes. En la Tabla 1.11 se presentan las

ecuaciones que relacionan área de pico con concentración. Además, se incluyen los límites de detección calculados para una relación señal/ruido igual a 3.

Tabla 1.11
Líneas de calibrado y límites de detección para la determinación de
vitaminas K por el método propuesto

Vitamina	A (10^5 unidades de área)	B (10^7 unidades de área / $\mu\text{g ml}^{-1}$)	r (n=10)	L.D. ^a
K ₁	- 4,87 ± 1,08	6,58 ± 0,99	0,9994	69
K ₂	5,84 ± 2,47	10,04 ± 0,24	0,9983	28
K ₃	6,89 ± 2,04	8,47 ± 0,22	0,9984	42

^a L.D.: límite de detección (S/N = 3) en pg inyectados.

La repetitividad del método fue estudiada con diez inyecciones repetidas de dos disoluciones de muestras conteniendo los analitos a dos niveles de concentración, $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Las desviaciones estándar relativas (RSD) fueron en todos los casos inferiores a 0,8 %. Los valores de RSD para los tiempos de retención durante un mismo día a cada nivel de concentración oscilaron entre 0,27 y 0,43 %, indicando una buena reproducibilidad. La precisión entre días fue estudiada analizando el contenido de vitaminas K a concentraciones de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Durante cinco días consecutivos las

muestras se inyectaron seis veces cada día y los valores de RSD para las áreas de pico fueron menores que 1,9 %.

1.3.4 Aplicaciones

La utilidad analítica del sistema de detección propuesto fue contrastada aplicando el método al análisis de vitaminas K en una variedad de muestras reales. Para cada muestra se registraron dos cromatogramas para un solo paso de la muestra a través del sistema, pues se conectaron “on-line” el detector de diodos y el sistema fotoquímico–fluorescente, con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con cada detector.

Se analizaron muestras vegetales (hojas de espinacas y coles de Bruselas). El tratamiento de estas muestras fue el descrito en las páginas 73 y 74.

También se analizó una muestra de leche enriquecida para bebés, que contenía vitamina K₁. Se pesó alrededor de 1 g de la leche en polvo y se disolvió en 15 ml de agua caliente (temperatura inferior a 40 °C). Se adicionaron 5 ml de disolución reguladora fosfato de pH 8, seguido de 1 g de lipasa y el contenido se mantuvo en agitación durante 5 min. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C, agitando brevemente a intervalos de 15 min para asegurar una digestión eficiente. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 10 ml de etanol–metanol (95:5 v/v) seguido de 1 g de carbonato sódico, mezclando bien a continuación. Después de la adición de 30 ml de hexano, los tubos se agitaron durante 5 min, centrifugando seguidamente a 2000 x g durante 10 min. A continuación, se separaron las fases y la fase superior de hexano se

limpió por extracción en fase sólida como se ha descrito anteriormente para los vegetales. El eluido de la extracción se evaporó a sequedad en evaporador a vacío bajo nitrógeno y el residuo se disolvió en 1 ml de metanol.

Además, se ha determinado la vitamina K contenida en tres productos farmacéuticos comerciales. El tratamiento de la muestra en estos casos fue el siguiente: para la determinación del contenido de vitamina K₁ contenida en ampollas de Konakion (Roche) una alícuota del producto se diluía 5000 veces con metanol. Para determinar la vitamina K₃ en Vitaendil CKP (Wasserman) se pulverizaron 6 tabletas y se pesó una cantidad equivalente a unos 0,50 mg de vitamina K₃, disolviendo en 10 ml de agua en un baño termostático a 60 °C durante 5 min con la finalidad de separar los componentes solubles en agua. Después de separar los residuos por filtración, se lavó dos veces con 2 ml de agua y finalmente se disolvió en 50 ml de metanol. Una alícuota de esta disolución se diluyó 10 veces con metanol. Para el análisis de la formulación Caprofides Hemostático (Fides-Rottapharm) una cantidad de polvo equivalente a unos 0,50 mg de vitamina K₃ se disolvió en 50 ml de metanol. Una alícuota de la misma se diluyó diez veces con metanol.

Los datos de la Tabla 1.12 muestran el contenido de filoquinona y menadiona en las muestras reales analizadas por HPLC y como puede observarse, los resultados obtenidos con la detección fotoquímica-fluorimétrica están en excelente concordancia con los obtenidos con el detector fotométrico.

Tabla 1.12
Determinación de vitaminas K en muestras reales

<i>Muestra^a</i>	<i>Analito</i>	<i>Método propuesto</i>	<i>Método de referencia</i>
Vegetales			
Espinacas	K ₁	418 ± 10 µg/100 g	413 ± 10 µg/100 g
Coles de Bruselas	K ₁	249 ± 10 µg/100 g	244 ± 10 µg/100 g
Productos farmacéuticos			
Konakion	K ₁	10,1 ± 0,1 mg ml ⁻¹	10,0 ± 0,1 mg ml ⁻¹
Caprofides	K ₃	10,2 ± 0,1 mg/sobre	9,9 ± 0,1 mg/sobre
Vitaendil CKP	K ₃	5,1 ± 0,2 mg/tableta	5,0 ± 0,2 mg/tableta
Leche para lactantes			
Nidina H.A. (Nestlé)	K ₁	0,41 ± 0,01 µg g ⁻¹	0,40 ± 0,02 µg g ⁻¹

^a Composición: **Konakion** (por 1 ml): filoquinona 10 mg; excipientes: ácido glicocólico, lecitina, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, agua. **Caprofides hemostático** (por sobre de 3 g): menadiona 10 mg; excipientes: sulfato de creatinina, sorbitol. **Vitaendil CKP** (por comprimido): menadiona 5 mg, ácido ascórbico 75 mg, rutosido 5 mg; excipientes: gluten 44,85 mg, lactosa 58,15 mg, sacarosa 174,26 mg. **Nidina H.A.**: proteínas séricas hidrolizadas, aceites vegetales, lactosa, dextrinomaltosa, sales minerales de potasio, cloro, calcio, fósforo, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y yodo, vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, A, riboflavina, B₆, tiamina, ácido fólico, K, biotina, D y B₁₂), taurina, colina, L-arginina, inositol, L-histidina y L-carnitina.

Es interesante señalar la selectividad adicional que proporciona la detección fotoquímica-fluorescente, puesto que si obtenemos dos cromatogramas consecutivamente, uno con la lámpara encendida y otro con la lámpara apagada, observaremos

que los picos correspondientes a la vitamina K desaparecen completamente cuando la lámpara está apagada.

Como conclusiones podemos afirmar que en estas investigaciones se ha demostrado que la irradiación con luz ultravioleta de las vitaminas K, en medio micelar de SDS y en presencia de metanol, conduce a la forma hidroquinona, que en esas condiciones presenta una alta fluorescencia. El medio micelar crea un microentorno en el que se estabilizan las formas reducidas de las vitaminas K con un aumento notable de fluorescencia. Esto ha hecho posible trabajar en condiciones aerobias, evitando la necesidad de desgasificar el eluyente empleado en HPLC y los reactivos. Con esta aproximación se ha desarrollado un sistema de reducción fotoquímica sencillo, eficiente y reproducible para la detección fluorescente de las vitaminas K, previamente separadas por cromatografía en fase reversa.

Comparando las características de otros métodos de cromatografía líquida que se han propuesto para estas vitaminas, que utilizan reacción post-columna y detección fluorescente (Tabla 1.13), la alternativa aquí propuesta es más simple, reproducible y estable, aunque alguno de los presentados sea un poco más sensible.

Tabla 1.13
Comparación de métodos de cromatografía líquida para la determinación de
vitaminas K con detección fluorescente

<i>Esquema de reacción</i>	<i>Analito</i>	<i>Aeróbico</i>	<i>Reactivos</i>	<i>L.D. (pg)</i>	<i>Ref.</i>
Fotorreducción	K ₁	No		30	(38)
	K ₃			20	
Fotorreducción	K ₁	No	Ácido ascórbico	150	(19)
Reducción electroquímica	K ₁ análogos	No	NaClO ₄	25-60	(14)
	K ₁ epóxido			60	
Reducción química	K ₁	No	NaBH ₄	150	(19)
		No	(CH ₃) ₄ NB ₃ H ₈	150	(39)
		No	Zn	25	(15)
		No	H ₂ /óxido de platino	25-60	(40)
	K ₁ análogos	No	Pt/metanol o etanol	2-7	(41, 42)
Fotorreducción	K ₁	Sí	Reguladora acetato/SDS	69	Este trabajo
	K ₂			28	
	K ₃			42	

L.D.: límite de detección en pg inyectados.

1.4 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Goodman & Gilman's, "*The Pharmacological Bases of Therapeutics*", McGraw-Hill, 10th ed., New York, 2001.
- 2.- J.W. Suttie en L. Machlin (Edit.), "*Handbook of Vitamins*", Marcel Dekker, New York, 2nd edn, pp 145-194, 1991.
- 3.- P.V. Hauschka, J.B. Lian, P.M. Gallop, *Trends Biochem. Sci.*, **3** (1978) 75.
- 4.- S.L. Booth, J.A.T. Pennington, J.A. Sadowski, *J. Am. Diet. Assoc.*, **96** (1996) 149.
- 5.- T. Koivu, V. Piironen, S. Entonen, P. Mattila, *J. Agric. Food Chem.*, **45** (1997) 4644.
- 6.- S.S.M. Hassan, *Methods in Enzymology*, **67** (1980) 125.
- 7.- J.P.Hart, A.M. Nahir, J. Chayen, A. Catteral, *Anal. Chim. Acta*, **144** (1982) 267.
- 8.- M. Holasova, J. Blatna, *Cesk. Farm.*, **31** (1982) 119.
- 9.- A.J. Sheppard, A.R. Prosser, W.D. Hubbard, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **49** (1972) 619.
- 10.- T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Talanta*, **50** (1999) 49.
- 11.- M.F. Lefevere, A.P. De Leenheer, A.E. Claeys, *J. Chromatogr.*, **186** (1979) 749.

- 12.-A.C. Wilson, K. Park, *J. Chromatogr.*, **277** (1998) 292.
- 13.-J.P. Hart, M.J. Shearer, P.T. McCarthy, S. Rahim, *Analyst*, **109** (1984) 477.
- 14.-J.P. Langenberg, U.R. Tjaden, *J. Chromatogr.*, **305** (1984) 61.
- 15.-Y. Haroon, D.S. Bacon, J.A. Sadowski, *J. Chromatog.*, **384** (1987) 383.
- 16.-K. Abe, O. Hiroshima, K. Ishibashi, M. Ohmae, K. Kawabe, G. Katsui, *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **99** (1979) 192.
- 17.-W.E. Lambert, A.P. De Leenheer, E.J. Baert, *Anal. Biochem.*, **158** (1986) 257.
- 18.-P.M.M. Van Haard, R. Engel, A.L.J.M. Pietersma-de Bruyn, *Clin. Chim. Acta*, **157** (1986) 221.
- 19.-M.F. Lefevere, R.W. Frei, U.T.M. Scholten, U.A.Th. Brinkman *Chromatographia*, **15** (1982) 459.
- 20.-J.R. Poulsen, J.W. Birks, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2267.
- 21.-Y. Sakaguchi, H. Hayashi, *J. Phys. Chem.*, **88** (1984) 1437.
- 22.-M. Okazaki, T. Shiga, *Nature*, **323** (1986) 240.
- 23.-M. Okazaki, S. Sakata, R. Konaka, T. Shiga, *J. Phys. Chem.* **91** (1987) 1131.
- 24.-W.E. Lambert, A.P. De Leenheer, *Anal. Chim. Acta*, **196** (1987) 247.

-
- 25.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst*, **124** (1999) 201.
- 26.-M.S. Gandelman, J.W. Birks, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **282** (1983) 193.
- 27.-J.M. Adams, in: S.J. Haswell (Ed), "*Practical Guide to Chemometrics*", Marcel Dekker, New York, pp 190-197, 1992.
- 28.-G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 712A.
- 29.-M. Careri, A. Mangia, P. Manini, N. Taboni, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **355** (1996) 48.
- 30.-J.P. Hart, S.A. Wring, I.C. Morgan, *Analyst*, **114** (1989) 933.
- 31.-J.W. Birks, "*Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*", VCH, New York, 1989.
- 32.-I.S. Krull, W.R. LaCourse, in: I.S. Krull (Ed.), "*Reaction Detection in Liquid Chromatography*", Marcel Dekker, New York, 1986.
- 33.-J.W. Birks, R.W. Frei, *Trends. Anal. Chem.*, **1** (1982) 361.
- 34.-J.M. Fitzgerald, "*Analytical Photochemistry and Photochemical Analysis*", Marcel Dekker, New York, 1971.
- 35.-R.P. Wayne, "*Principles and Applications of Photochemistry*", Oxford University Press, Oxford, 1988.
- 36.-U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, H. Lingeman, *J. Chromatogr.*, **492** (1989) 251.

-
- 37.-A.H. Scholten, P.L. Welling, U.A. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **199** (1980) 239.
- 38.-P.M.M. Van Haard, R. Ángel, A.L.J.M. Pietersma-de Bruyn, *Clin. Chim. Acta*, **157** (1986) 221.
- 39.-W.E. Lambert, A.P. De Leender, M.F. Lefevere, *J. Chromatogr. Sci.*, **24** (1986) 76.
- 40.-M. Shino, *Analyst*, **113** (1988) 393.
- 41.-M. Kamao, Y. Suhara, N. Tsugawa, T. Okano, *J. Chromatogr. B*, **816** (2005) 41.
- 42.-W.A. MacCrehan, E. Schonberger, *J. Chromatogr. B*, **670** (1995) 209.

CAPÍTULO 2

SEPARACIÓN DE BISFOSFONATOS POR HPLC ACOPLADA A UN PROCESO FOTOQUÍMICO- FLUORESCENTE

CAPÍTULO 2

SEPARACIÓN DE BISFOSFONATOS POR HPLC ACOPLADA A UN PROCESO FOTOQUÍMICO-FLUORESCENTE

	<u>Página</u>
2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	103
2.2. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ÁCIDOS ALENDRÓNICO, ETIDRÓNICO, IBANDRÓNICO Y RISEDRÓNICO	112
2.2.1. Sistema de detección post-columna.....	115
2.2.1.1. Fotooxidación de los ácidos alendrónico, etidrónico, ibandrónico y risedrónico.....	116
2.2.1.2. Formación del heteropoliácido 12-MPA	118
2.2.1.3. Oxidación de la tiamina a tiocromo	119
2.2.2. Desarrollo del método cromatográfico.....	122
2.2.2.1. Selección de la columna cromatográfica.....	122
2.2.2.2. Selección del reactivo formador de pares iónicos para la separación de bisfosfonatos.....	122

	<u>Página</u>
2.2.2.3. Efecto de la concentración de TBA	123
2.2.2.4. Efecto del pH de la fase móvil.....	124
2.2.2.5. Efecto de los modificadores orgánicos sobre la separación	125
2.2.3. Determinación de los ácidos alendrónico, etidrónico, ibandrónico y risedrónico	126
2.2.4. Validación del método	128
2.2.5. Aplicaciones	132
2.2.5.1. Análisis de bisfosfonatos en orina.....	132
2.2.5.2. Análisis de preparados farmacéuticos.....	136
2.3. BIBLIOGRAFÍA.....	140

SEPARACIÓN DE BISFOSFONATOS POR HPLC ACOPLADA A UN PROCESO FOTOQUÍMICO- FLUORESCENTE

2.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Durante décadas el pirofosfato y los polifosfatos han sido utilizados para diversos propósitos, entre ellos como aditivos en polvos para lavar, como ingredientes activos en dentífricos o añadidos al agua para evitar depósitos de carbonato cálcico. El pirofosfato y la fosfatasa alcalina están presentes en el plasma, orina, dientes y huesos, y se ha considerado su posible papel como reguladores fisiológicos en calcificación (formación) y descalcificación (destrucción) del hueso (1)*. El esqueleto humano contiene un 99 % del calcio corporal total en una forma cristalina que semeja al mineral hidroxiapatito $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ formando un enrejado que también contiene otros iones, entre ellos Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y F^- . Una vez formado el hueso está sujeto a un continuo proceso de desintegración y formación llamado “remodelamiento”, en el que intervienen las células óseas osteoblastos y osteoclastos, y que continúa toda la vida.

* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 140.

En el proceso de “resorción” sobre la superficie del hueso aparecen sitios donde se producen pequeñas cavidades; pero, una vez terminada esta fase de resorción, se empieza a reemplazar el hueso resorbido con nuevos constituyentes de la matriz ósea como colágeno, osteocalcina y otras proteínas y, posteriormente, comienza la fase de mineralización (2). En circunstancias normales, un ciclo de remodelamiento requiere unos seis meses para completarse.

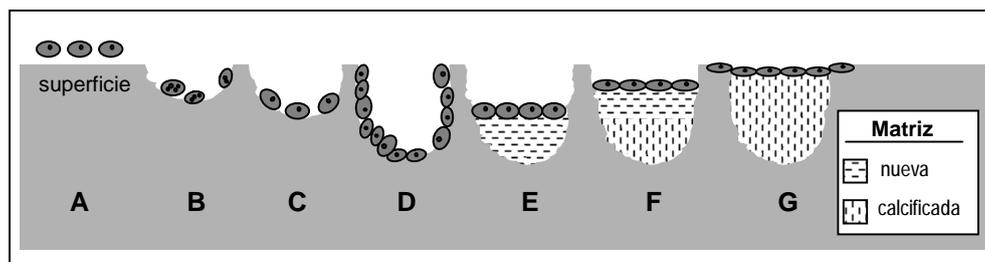


Figura 2.1. Ciclo de remodelamiento óseo.

A: Superficie trabecular en reposo; **B:** osteoclastos multinucleados hacen una cavidad de unos 20 μm ; **C:** los fagocitos mononucleares completan la resorción hasta 60 μm ; **D:** se reclutan precursores de osteoblastos en la base de la cavidad de resorción; **E:** los osteoblastos secretan matriz nueva; **F:** se sigue secretando matriz con inicio de calcificación; **G:** se completa la mineralización de la matriz nueva. El hueso ha vuelto a un estado latente, pero persiste un pequeño déficit de la masa ósea.

Cuando se completa cada ciclo de remodelamiento persisten pequeños déficit, que acumulados durante toda la vida fundamentan el fenómeno bien documentado de la pérdida de hueso vinculada a la edad. Aparte de este hecho, existen alteraciones en el proceso de

remodelamiento que se producen por diversos estímulos como insuficiencias en la dieta, hormonas y fármacos, entre otros. Los ejemplos incluyen hipertiroidismo, dosis altas de corticosteroides o de etanol y deficiencia de estrógenos.

Para el tratamiento de las alteraciones óseas se ha comprobado que los pirofosfatos y polifosfatos, administrados tanto oralmente como en inyectables, no son efectivos debido posiblemente a que estos compuestos se hidrolizan rápidamente. Por ello, entre otras alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades que afectan al esqueleto se han desarrollado otros compuestos análogos del pirofosfato, los difosfonatos o bisfosfonatos, en los que el oxígeno enlazado a los dos átomos de fósforo es reemplazado por un átomo de carbono con el resultado de una mayor resistencia a la hidrólisis debido al enlace químicamente estable P–C–P. El interés inicial de los bisfosfonatos se centró en la síntesis del ácido etano-1-hidroxi-1,1'-bisfosfónico (EHDP) y su potencial aplicación como aditivo en detergentes. Importantes efectos fisiológicos fueron descubiertos (3) y como consecuencia se sintetizaron varios ácidos bisfosfónicos y sus sales, sometiendo a evaluación sus efectos terapéuticos. La estructura general de los bisfosfonatos se presenta en la Figura 2.2.

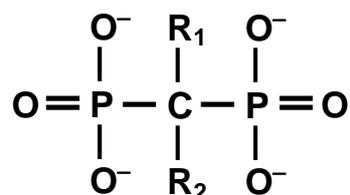


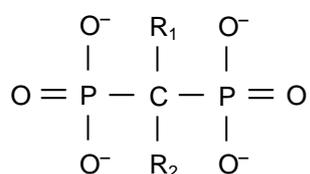
Figura 2.2. Estructura general de los bisfosfonatos.

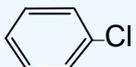
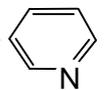
Ambos grupos fosfonato se requieren para que exista la máxima afinidad con el hueso y pueda relacionarse con la posibilidad de enlazarse/complejarse simultáneamente con más de un calcio por molécula. La afinidad con el hueso y las características antirresortivas parece ser que son propiedades independientes de estos compuestos y, posiblemente, su capacidad complejante puede simplemente servir para que estos fármacos se localicen en el lugar de los osteoblastos y osteoclastos. Es decir, el enlace en el hueso es necesario para la actividad antirresortiva, sin embargo, dos compuestos con similares capacidades enlazantes pueden mostrar diferentes propiedades antirresortivas.

En la actualidad los bisfosfonatos se utilizan en el tratamiento de pacientes con varios desórdenes que afectan al esqueleto, incluyendo osteoporosis, enfermedades de los huesos por metástasis y la enfermedad de Paget. Sus propiedades específicas varían dependiendo de la estructura de las moléculas de los diferentes bisfosfonatos, puesto que la parte bioactiva de los mismos implica la cadena R_2 de la molécula, que se considera responsable de su efecto sobre la resorción ósea puesto que pequeños cambios en esta parte de la estructura (presentada en la Figura 2.2) pueden dar lugar a grandes diferencias en sus características antirresortivas. La actuación y enlace de estos compuestos en el mineral del hueso están determinados por el ligando bi- o tridentado de la molécula. Se ha constatado que las estructuras más efectivas para enlazar con el mineral del hueso consisten en dos grupos fosfonato unidos a un átomo de carbono central y la sustitución de R_1 por un grupo hidroxilo o amino, que hace posible la formación de enlaces

tridentados. Algunos de los bisfosfonatos más importantes se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1
Estructura de los principales bisfosfonatos



	<i>Bisfosfonato</i>	<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂
1 ^a Generación	Etidronato	OH	CH ₃
	Clodronato	Cl	Cl
2 ^a Generación	Pamidronato	OH	CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
	Alendronato	OH	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂
	Tiludronato	H	-S- 
3 ^a Generación	Risedronato	OH	-CH ₂ - 

Los derivados dicloro (clodronato) e hidroxialquil (etidronato) en altas dosis inhiben la mineralización y resorción del hueso. Como se ha comentado anteriormente, la incorporación de OH en el C₁

optimiza la actividad con el hidroxapatito, así como el efecto antirresortivo. La incorporación del sustituyente 4-clorotiofenil en el C₁ también mejora la actividad antirresortiva. Esto ocurre con el tiludronato (bisfosfonato de 2^a generación) que presenta una actividad diez veces superior al alendronato, uno de los primeros compuestos sintetizados.

La presencia de una cadena alquilamino en C₁ aumenta las propiedades antirresortivas y de mineralización. La longitud de la cadena carbonada es importante y se ha comprobado que es conveniente que sea de entre 2 y 5 carbonos, siendo las más efectivas las de 3 carbonos.

Finalmente, la presencia de un nitrógeno heterocíclico (piridina) en el carbono C₁ mejora la potencia antirresortiva, como ocurre con el risedronato, fármaco de tercera generación 5000 veces más potente que el etidronato.

Se han comparado las actividades antirresortivas de algunos de estos compuestos y la potencia relativa de los mismos sigue el siguiente orden:

Risedronato > Alendronato > Pamidronato > Clodronato > Etidronato

Dada su efectividad en la prevención de las pérdidas de hueso asociadas a la osteoporosis, tratamiento de la enfermedad de Paget y, además, que alguno de ellos se administra en conjunción con agentes neoplásicos en terapias para ciertos tipos de cáncer, es evidente la necesidad de disponer de métodos analíticos sensibles, específicos y exactos que permitan la evaluación de bisfosfonatos tanto en preparados farmacéuticos como en líquidos biológicos.

Los métodos analíticos que inicialmente fueron utilizados para determinar bisfosfonatos incluyen la valoración de los ácidos bisfosfónicos como ácidos (3-5), la valoración del complejo con el Th^{4+} con el ácido diaminociclohexanotetraacético con detección fotométrica del punto final (6) y la determinación espectrofotométrica después de la conversión del bisfosfonato en fosfato, seguida de la formación de fosfomolibdato (7).

El desarrollo de procedimientos cromatográficos para el análisis de bisfosfonatos presenta como problemas principales los siguientes:

1. Los bisfosfonatos contienen dos grupos fosfato unidos a un único átomo de carbono; esto significa una dificultad para su retención sobre fases estacionarias no polares, tales como las columnas C_{18} y C_8 .

2. Estos compuestos tienen varios valores de pK_a , que se extienden en el intervalo completo de pH, haciendo difícil mantener una única especie en disolución para la separación cromatográfica.

3. Los bisfosfonatos pueden formar quelatos con iones metálicos o con superficies metálicas, produciendo picos cromatográficos con colas.

4. No son especies fáciles de detectar puesto que, en general, no presentan absorción (el ácido risedrónico es una excepción), ni fluorescencia.

5. La cromatografía de gases no es fácil de aplicar a los bisfosfonatos a causa de su baja volatilidad y naturaleza polar.

6. Además, hay que hacer notar la complicación que supone la detección simultánea de bisfosfonatos, debido a que sus estructuras son muy similares, puesto que en la mayoría de ellos la única diferencia se encuentra en la cadena R_2 de la fórmula general.

A pesar de estos inconvenientes, varios métodos cromatográficos han sido propuestos para la determinación de este tipo de sustancias, en la mayor parte de los casos dirigidos a la determinación de un único bisfosfonato. Así, el clodronato ha sido determinado por cromatografía de gases-espectrometría de masas (8); sin embargo, este método requiere derivatización y, consecuentemente, un consumo de tiempo en esta etapa previa. Por otra parte la aplicación de HPLC a los bisfosfonatos con sus dos grupos ionizables de fuerte polaridad se puede realizar utilizando cromatografía de intercambio iónico o añadiendo en la fase móvil un reactivo formador de pares iónicos (9). Como se ha señalado anteriormente, en general estos compuestos carecen de grupos cromóforos o fluoróforos y, por ello, para su detección se han propuesto métodos indirectos (espectrofotometría en el UV o fluorescencia) mediante la adición a la fase móvil de reactivos de características absorbentes o fluorescentes (10, 11).

Se han desarrollado también técnicas directas de detección en el UV o fluorescentes, introduciendo un cromóforo (12, 13) o un fluoróforo (14-16) en las moléculas del analito a través de una reacción de derivatización pre- o post-columna. De esta forma se consigue mejorar tanto la separación cromatográfica como los límites de detección. Otra alternativa es recurrir a una reacción de derivatización que introduzca un grupo electroquímicamente activo que permita la detección electroquímica (16, 17).

Hay que destacar que la aplicación del tándem cromatografía líquida–espectrometría de masas no es muy fácil en el caso de los bisfosfonatos. La experiencia ha demostrado que pueden producirse diferentes proporciones de iones cargados y promover la formación de aductos en las condiciones de ionización de la cámara de electronebulización, factores que en definitiva limitan la sensibilidad del ensayo.

La ruptura oxidativa del enlace P–C para liberar fosfato ha sido empleada para la detección de los bisfosfonatos. Tal oxidación puede efectuarse por acción del peroxidisulfato en caliente (18) o por irradiación con luz UV (19, 20). El fosfato formado reacciona con molibdato para dar ácido 12-molibdofosfórico (12-MPA), heteropoliácido que se reduce posteriormente con ácido ascórbico (18) o por irradiación (20). El azul de molibdeno formado se detecta espectrofotométricamente. Sin embargo, no hemos encontrado ninguno de estos métodos mencionados aplicado a la determinación de mezclas de bisfosfonatos. Hasta la fecha sólo aparece en la bibliografía un artículo dedicado a la determinación simultánea de varios bisfosfonatos (concretamente alendronato, etidronato, pamidronato y zoledronato) que, una vez separados con una columna C₁₈, usando como eluyente una mezcla de n-amilamina con agua–acetonitrilo, se detectan por un procedimiento de dispersión de la luz (21). El método no es muy sensible (límites de detección en el intervalo comprendido entre 15 – 18 µg ml⁻¹) y, además, el pico de elución del etidronato es muy ancho.

Consideramos de gran interés desarrollar un método que permita la determinación de distintos bisfosfonatos en una misma muestra, que se caracterice por su seguridad, robustez y, a ser

posible, sencillez, y que presente mayor sensibilidad que los procedimientos descritos en la bibliografía.

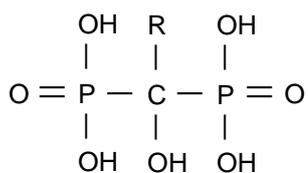
Hemos seleccionado para la separación la cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC) porque su sensibilidad es superior a la cromatografía de intercambio iónico (IEC). Dado que nuestro Equipo de investigación está familiarizado y tiene experiencias previas en estudios de fotooxidaciones asistidas con peroxidisulfato para transformar compuestos organofosforados en fosfato (22-25), decidimos utilizar esta técnica como un sistema de derivatización post-columna. Nuestra meta era establecer un método basado en RP-LC de pares iónicos con detección fluorescente para determinar bisfosfonatos (alendronato, etidronato, ibandronato y risedronato) en muestras biológicas. Para ello los bisfosfonatos eluidos de la columna se fotodegradaban a ortofosfato y reaccionaban con el anión molibdato para formar el heteropoliácido correspondiente (12-MPA), compuesto capaz de oxidar la tiamina a tiocromo, especie de intensa fluorescencia.

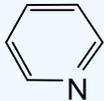
2.2 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ÁCIDOS ALENDRÓNICO, ETIDRÓNICO, IBANDRÓNICO Y RISEDRÓNICO

En la Tabla 2.2 se presenta la estructura de los cuatro ácidos bisfosfónicos seleccionados para este estudio. Éstos son ácidos tetrapróticos de fuerza moderada que a pH elevado se encuentran como aniones multivalentes (26); por ello, son muy difíciles de separar por aplicación de la cromatografía líquida en fase normal. También, debido a sus cortas cadenas alquílicas no se retienen fácilmente por fases estacionarias no polares utilizadas en fase

reversa. Por este motivo nos ha parecido que el método más conveniente para investigar su separación era la cromatografía de pares iónicos en fase reversa (RP-IPC), ya que los pares de iones con aminas cuaternarias o terciarias son mejor retenidos por fases estacionarias trabajando en fase reversa.

Tabla 2.2
Estructura de los ácidos bisfosfónicos seleccionados



<i>R</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre</i>
$(\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$	ALEN	Ácido alendrónico
CH_3	ETID	Ácido etidrónico
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2$	IBAN	Ácido ibandrónico
$\text{CH}_2 - $ 	RISE	Ácido risedrónico

Esta separación se sigue por fluorescencia empleando una técnica de derivatización post-columna con el sistema instrumental representado en la Figura 2.3.

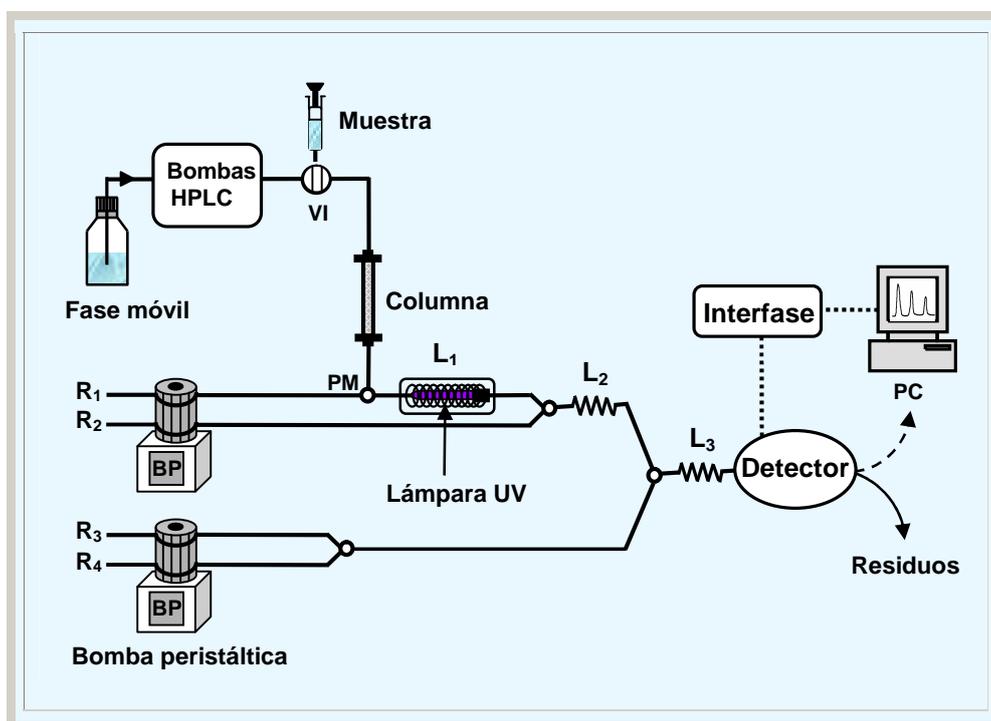


Figura 2.3. Esquema RP-IPC con detección fluorescente post-columna empleado en la determinación de bisfosfonatos.

Fase móvil = disolución reguladora borato 50 mM de pH 9 conteniendo bromuro de tetrabutilamonio 0,25 mM y EDTA 0,5 mM-acetonitrilo (97:3 v/v) (1 ml min^{-1}); R_1 = peroxidisulfato potásico 5 g l^{-1} y tetraborato sódico 19 g l^{-1} ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$); R_2 = molibdato amónico $3,9 \text{ g l}^{-1}$ y ácido nítrico 0,5 M ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$); R_3 = tiamina 1 g l^{-1} ($1,6 \text{ ml min}^{-1}$); R_4 = amoníaco 5 M ($1,6 \text{ ml min}^{-1}$); L_1 = fotorrector; L_2 y L_3 = reactores; VI = válvula de inyección; PM = punto de mezcla.

El esquema instrumental presentado en la Fig. 2.3 consiste en un equipo de cromatografía líquida Beckman Coulter compuesto por un módulo de disolventes System Gold 125 NM, un detector de diodos en serie System Gold 168 y una válvula de inyección Rheodyne. El detector de fluorescencia es un SLM-Aminco Bowman Series 2. El espectrofluorímetro está equipado con una célula de flujo FP294 Thermo Spectronic de 8 µl de volumen interno y 10 mm de paso de luz. Este fluorímetro está conectado al cromatógrafo a través de una interfase Beckman. Se han utilizado dos tipos de columnas: 1) Ultrasphere C₁₈ de Beckman y 2) Tracer Excel 120 C₈ de Teknokroma.

El sistema de detección post-columna utiliza dos bombas peristálticas Gilson Minipuls-3 para liberar los reactivos y tubos de PTFE (excepto para las bombas que son de Tygon). Se ha incluido un fotorreactor formado por una espiral de tubo de PTFE arrollado alrededor de una lámpara de mercurio Spectronic, cuya principal línea espectral está a 254 nm. La lámpara y el fotorreactor están alojados en una caja metálica cuyas paredes se han recubierto con espejos.

2.2.1 Sistema de detección post-columna

El sistema post-columna utilizado para conseguir una señal fluorescente de los bisfosfonatos se presenta en la Figura 2.3. Las etapas implicadas en el proceso son: 1) fotooxidación de los bisfosfonatos a fosfato; 2) formación del heteropoliácido 12-MPA a través de la reacción entre el ortofosfato resultante de la fotólisis y el

anión molibdato, y 3) oxidación por el 12-MPA de la tiamina a tiocromo fluorescente.

Para facilitar el estudio de las condiciones más eficientes para conseguir la máxima fluorescencia se realizaron una serie de experiencias sin utilizar columna. Estos estudios se presentan a continuación.

2.2.1.1 Fotooxidación de los ácidos alendrónico, etidrónico, ibandrónico y risedrónico

La fotólisis de compuestos orgánicos del fósforo asistida por el peroxidisulfato ha sido empleada en la determinación de un bisfosfonato, concretamente el ácido 2-tioetano-1,1-bisfosfónico, y en la de algunos fosfatos orgánicos y pesticidas organofosforados por HPLC (19, 20, 25, 27, 28) y por análisis por inyección en flujo (23, 29, 30). El alto rendimiento con que transcurren estas reacciones probablemente se debe a la presencia de radicales hidroxilo que se generan en la fotólisis del peroxidisulfato (31). Utilizando para la fotólisis una lámpara de mercurio de baja presión, se estudió la eficiencia de la fotoconversión de ALEN, ETID, IBAN y RISE a fosfato en relación con el pH del medio y con la concentración de peroxidisulfato. Las señales de fluorescencia obtenidas para cada bisfosfonato se relacionaban con la correspondiente a cantidades equivalentes de ortofosfato, comprobándose que las eficiencias de las reacciones fotoquímicas se aproximaban al 100 % cuando la concentración de peroxidisulfato era superior a $4,5 \text{ g l}^{-1}$ y se trabajaba en medios fuertemente ácidos o básicos.

A concentraciones superiores a 8,0 g l⁻¹ de peroxidisulfato se forman burbujas de oxígeno y de ozono durante la fotólisis, hecho incompatible con el sistema de detección. La estrategia adoptada implica utilizar para cada conjunto de condiciones la más alta concentración de peroxidisulfato con la que no aparezcan burbujas en la célula de detección. También, con la finalidad de minimizar la formación de burbujas de dióxido de carbono en la fotooxidación de los bisfosfonatos se trabajó en un medio básico. Finalmente, una disolución alcalina de peroxidisulfato, conteniendo 5,0 g l⁻¹ de peroxidisulfato potásico y 19 g l⁻¹ de tetraborato sódico, ajustada a pH 9, fue la seleccionada para realizar las experiencias posteriores. En esas condiciones la eficiencia de la fotólisis de los cuatro bisfosfonatos ensayados se encontraba comprendida en el rango del 70 – 100 % y, además, no se observaba aparición de burbujas.

Como es obvio, la reacción fotoquímica está muy afectada por el tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor. Los tiempos de irradiación se controlan con la longitud del fotorreactor (longitud de tubo enrollado a la lámpara en la zona de iluminación) y/o por el caudal de las corrientes portadora (el eluyente cuando el sistema está conectado a la columna cromatográfica) y de peroxidisulfato alcalino. Fue posible conseguir una alta eficiencia en la fotoconversión de ALEN, ETID, IBAN y RISE con un tiempo de irradiación de 14 s. El efecto de la longitud del fotorreactor fue examinado en el intervalo de 1 a 4 m, estableciendo un tiempo de residencia fijo de 14 s. Las mayores intensidades de fluorescencia para los cuatro analitos objeto de estudio se encontraron cuando la longitud del reactor era de 3,0 m. Por otro lado, se realizaron experiencias comprobando el efecto producido sobre las áreas de

pico cuando los caudales de la corriente portadora y de peroxidisulfato se variaban entre los intervalos $0,8 - 1,2 \text{ ml min}^{-1}$ y $1,3 - 1,7 \text{ ml min}^{-1}$, respectivamente, manteniendo fijo el caudal total (a un valor de $2,5 \text{ ml min}^{-1}$). Las mayores alturas de pico se obtenían cuando el caudal para la corriente portadora era de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ y de $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ para la disolución de peroxidisulfato.

2.2.1.2 Formación del heteropoliácido 12-MPA

Teniendo en cuenta que la reacción de molibdato con ortofosfato requiere un medio ácido, las disoluciones de molibdato se prepararon en medio ácido, comprobando que la respuesta más alta se conseguía cuando se utilizaba ácido nítrico $0,5 \text{ M}$.

Se estudió también la influencia de la concentración de molibdato en la formación del 12-MPA, empleando disoluciones de molibdato amónico en el intervalo de concentraciones comprendido entre $1,0$ y $5,0 \text{ g l}^{-1}$ disueltas en ácido nítrico $0,5 \text{ M}$. La señal aumenta gradualmente hasta una concentración de molibdato amónico igual a $3,9 \text{ g l}^{-1}$ y a partir de ese valor permanece prácticamente constante (Fig. 2.4). Se seleccionó utilizar una disolución de molibdato amónico de $3,9 \text{ g l}^{-1}$ de concentración, preparada en ácido nítrico $0,5 \text{ M}$, la cual circulaba a través del canal R_2 del esquema diseñado.

La influencia de la longitud del reactor L_2 , en el que transcurre la formación de 12-MPA, se comprobó en el rango de $0 - 200 \text{ cm}$. Un reactor de 100 cm de longitud era suficiente para obtener la máxima señal, ya que la formación del heteropoliácido tenía lugar rápidamente.

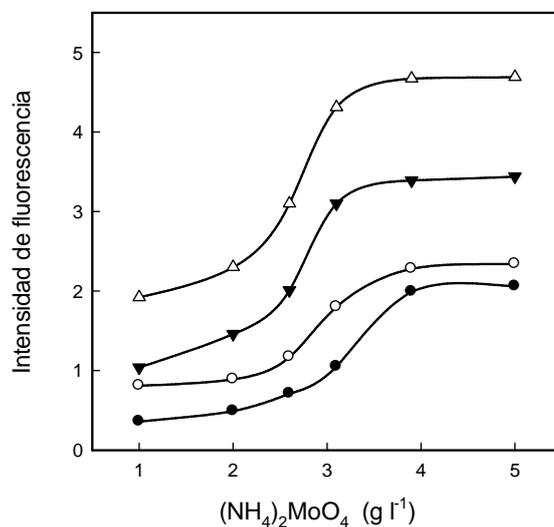


Figura 2.4. Efecto de la concentración de molibdato sobre la señal fluorescente.

Concentración de los analitos 8×10^{-6} M. (Δ) RISE; (∇) ALEN; (\circ) ETID; (\bullet) IBAN.

2.2.1.3 Oxidación de la tiamina a tiocromo

La oxidación de la tiamina a tiocromo por el 12-MPA depende del pH. La fluorescencia aumenta continuamente cuando los valores de pH se varían de 3 a 10 y por encima de ese valor permanece constante. Como la disolución emergente del reactor L_2 contenía ácido nítrico, una disolución de amoníaco 5 M (Fig. 2.5 A) se bombeaba a través del canal R_4 , de forma que el pH resultante después de la mezcla de ambas corrientes se acercara lo máximo posible al valor óptimo.

La altura de pico también estaba afectada por la concentración de tiamina. La señal fluorescente aumenta notablemente hasta una concentración de tiamina de 1 g l^{-1} , permaneciendo virtualmente constante a partir de este valor (Figura 2.5 B). Para posteriores estudios se seleccionó trabajar con disoluciones de tiamina de 1 g l^{-1} .

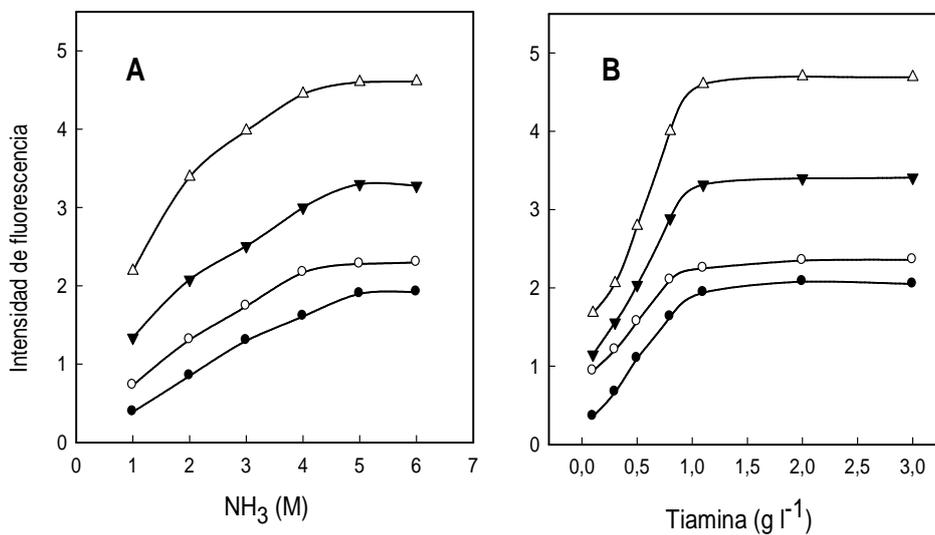


Figura 2.5. Efecto de la concentración de amoníaco (A) y de tiamina (B) sobre la señal de fluorescencia.

Concentración de los analitos $8 \times 10^{-6} \text{ M}$. (Δ) RISE; (\blacktriangledown) ALEN; (\circ) ETID; (\bullet) IBAN.

Un reactor L_3 se introdujo para mezclar la disolución de amoníaco y tiamina con 12-MPA y se observó que cuando se variaba la longitud de L_3 desde 50 a 150 cm, la señal aumentaba hasta los 100 cm, que fue la longitud seleccionada.

Los caudales de amoníaco y tiamina se variaron entre 1,0 y 2,5 ml min^{-1} , pero teniendo en cuenta que el caudal total siempre se mantenía a 3,2 ml min^{-1} . La máxima altura de pico se observó cuando se utilizaba un caudal de 1,6 ml min^{-1} en cada canal.

En estos estudios se han utilizado para las medidas de fluorescencia λ_{ex} 375 nm y λ_{em} 440 nm, de acuerdo con el espectro de fluorescencia del tiocromo (Fig. 2.6).

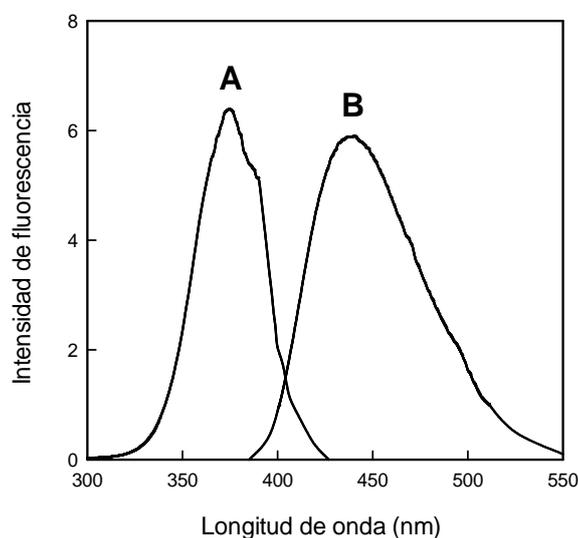


Figura 2.6. Espectros de excitación (A) y emisión (B) de fluorescencia del tiocromo.

2.2.2 Desarrollo del método cromatográfico

2.2.2.1 Selección de la columna cromatográfica

En primer término se evaluó el comportamiento de las columnas C₈ y C₁₈ como fases estacionarias para la separación de los bisfosfonatos seleccionados utilizando un reactivo tetraalquilamonio como formador de pares iónicos y acetonitrilo (4:96) como fase móvil. Se escogió la columna C₁₈ para trabajos posteriores porque conducía a una mejor separación de los bisfosfonatos y los tiempos de retención de los diferentes analitos eran más reproducibles.

2.2.2.2 Selección del reactivo formador de pares iónicos para la separación de bisfosfonatos

La naturaleza del reactivo formador de pares iónicos es de gran importancia para la eficiencia en la separación de diferentes mezclas usando PR-IPC. Generalmente, un par iónico dado se selecciona para asegurar una significativa retención sobre la columna del reactivo o del par iónico a una concentración razonable (32). Para la separación de ALEN, ETID, IBAN y RISE se investigó el comportamiento de cloruro de tetraetilamonio, cloruro de tetrabutilamonio y cloruro de tetraoctilamonio. En presencia de tetraetilamonio los cuatro bisfosfonatos eluían prácticamente cercanos al disolvente, es decir, no eran retenidos por la fase estacionaria C₁₈. Cuando se utilizaba tetrabutilamonio (TBA) los cuatro compuestos se retenían bien y sus factores de capacidad eran aceptables. Con cadenas alquílicas más largas, caso del ión tetraoctilamonio, todos los bisfosfonatos eran retenidos tan

fuertemente que no se detectaban ni siquiera después de transcurridos 40 min desde la inyección.

2.2.2.3 Efecto de la concentración de TBA

En la Figura 2.7 se muestra el efecto de la concentración del reactivo TBA sobre la retención del analito trabajando con una disolución reguladora borato de pH 9 a una concentración constante (50 mM) y un porcentaje de acetonitrilo del 4 %. Los tiempos de retención de los cuatro bisfosfonatos aumentan cuando lo hace la concentración de TBA de 0 a 0,5 mM. Una concentración de TBA 0,25 mM fue la seleccionada, ya que en estas condiciones los cuatro bisfosfonatos se separaban satisfactoriamente y los tiempos de retención no eran largos.

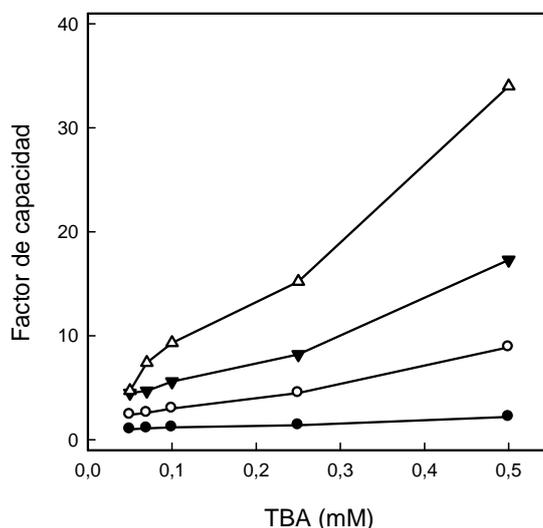


Figura 2.7. Variación de los factores de capacidad de los bisfosfonatos con la concentración de TBA en presencia de una disolución reguladora borato 50 mM de pH 9 y 4 % de acetonitrilo. (●) ALEN; (○) ETID; (△) IBAN; (▼) RISE.

2.2.2.4 Efecto del pH de la fase móvil

Los ácidos bisfosfónicos son tetrapróticos con valores de pK_a que se extienden en todo el intervalo de pH; así, el pH de la fase móvil debe utilizarse para el control de la carga aniónica, lo que tiene un efecto significativo sobre la retención y la forma del pico. En la Figura 2.8 se muestra la influencia del pH de la disolución reguladora borato sobre los factores de capacidad de ALEN, ETID, IBAN y RISE, trabajando siempre con concentraciones fijas de TBA (0,25 mM) y acetonitrilo (4 %). Se observó que a un pH 9,0 los analitos se separaban unos de otros de forma satisfactoria. Además, los picos mostraban una buena forma, quizá debido a que los analitos se encontraban mayoritariamente en una sola forma iónica con capacidad de formar pares iónicos estables con los iones positivos del TBA.

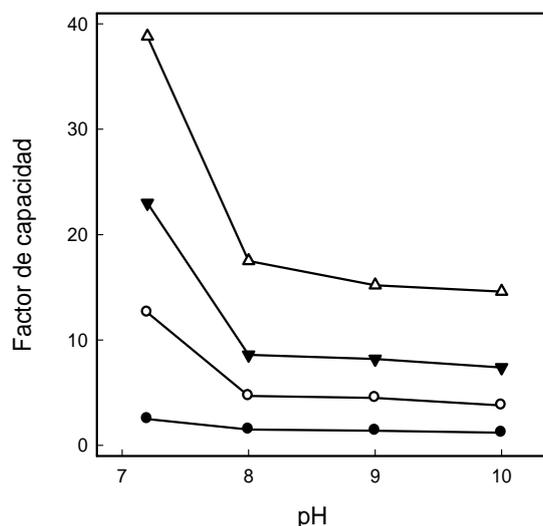


Figura 2.8. Variación de los factores de capacidad de los bisfosfonatos con el pH de la fase móvil en presencia de una disolución reguladora borato 50 mM, TBA 0,25 mM y 4 % de acetonitrilo. (●) ALEN; (○) ETID; (△) IBAN; (▼) RISE.

2.2.2.5 Efecto de los modificadores orgánicos sobre la separación

La presencia de disolventes no acuosos en la fase móvil, tales como metanol y acetonitrilo, también fue estudiada. Debido a que la sensibilidad del sistema de detección se reducía drásticamente cuando el metanol estaba presente, se seleccionó como modificador orgánico el acetonitrilo. Resultados preliminares demostraban que la forma de los picos mejoraba cuando el acetonitrilo estaba presente, y además, se comprobó que los tiempos de retención para cada uno de los analitos disminuían cuando se aumentaba la concentración de acetonitrilo, tal como queda patente en la Figura 2.9. Una separación muy buena se conseguía cuando la concentración de acetonitrilo era del 3 % y esta concentración se utilizó en todos los estudios posteriores.

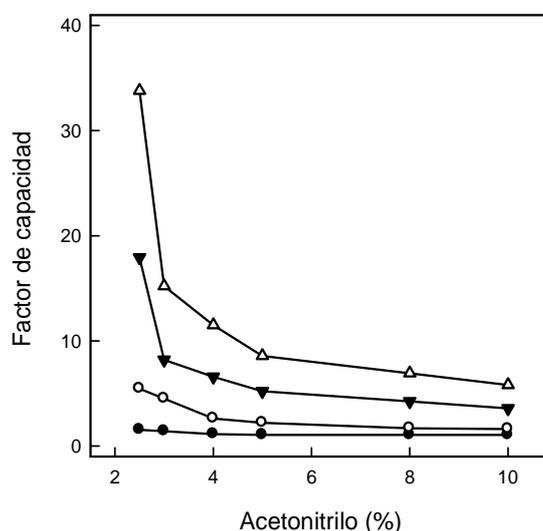


Figura 2.9. Variación de los factores de capacidad de los bisfosfonatos con el porcentaje de acetonitrilo en presencia de una disolución reguladora borato 50 mM de pH 9 y TBA 0,25 mM. (●) ALLEN; (○) ETID; (△) IBAN; (▼) RISE.

2.2.3 Determinación de los ácidos alendrónico, etidróico, ibandróico y risedróico

La separación de los cuatro ácidos bisfosfónicos se realizó sobre una columna C₁₈ (Ultrasphere ODS de 45 mm x 4,6 mm, 5 µm), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo (3 %) y disolución reguladora borato de pH 9 y de concentración 50 mM (97 %), conteniendo TBA, ajustada a pH 9 con ayuda de hidróido sódico. La concentración de TBA en la mezcla era 0,25 mM. El orden de retención en estas condiciones es ALEN < ETID < RISE < IBAN. Todos los picos cromatográficos estaban bien separados pero se observaba la presencia de colas, problema probablemente asociado a la contaminación con metales. Los bisfosfonatos tienen propiedades quelatantes muy acusadas y, por tanto, pueden interaccionar con los metales en el sistema de cromatografía líquida. Hemos comprobado que la adición de EDTA 0,5 mM a la fase móvil descrita, mejora espectacularmente la forma de los picos y, además, disminuye ligeramente los tiempos de retención de los cuatro analitos.

El eluido de la columna de LC se mezclaba con la corriente de peroxidisulfato alcalino (peroxidisulfato potásico 5 g l⁻¹ y tetraborato sódico 19 g l⁻¹; caudal 1,5 ml min⁻¹) y entonces se irradiaba bajo la luz UV a su paso por el fotorreactor donde tenía lugar la fotodegradación de los bisfosfonatos a ortofosfato. La disolución emergente del fotorreactor se unía sucesivamente a las corrientes de molibdato (molibdato amónico 3,9 g l⁻¹ y ácido nítrico 0,5 M; caudal 1,5 ml min⁻¹), tiamina (1 g l⁻¹; caudal 1,6 ml min⁻¹) y amoníaco (5 M; caudal 1,6 ml min⁻¹). Finalmente, la fluorescencia del tiocromo

formado por oxidación de la tiamina por el 12-MPA se medía a 440 nm, excitando a 375 nm.

En la Figura 2.10 se presentan los cromatogramas típicos obtenidos para los cuatro bisfosfonatos cuando se trabaja en las condiciones óptimas. Los valores de resolución para los picos adyacentes (1), (2), (3) y (4), que corresponden a ALEN, ETID, RISE e IBAN fueron 3,5, 2,7 y 4,0, respectivamente.

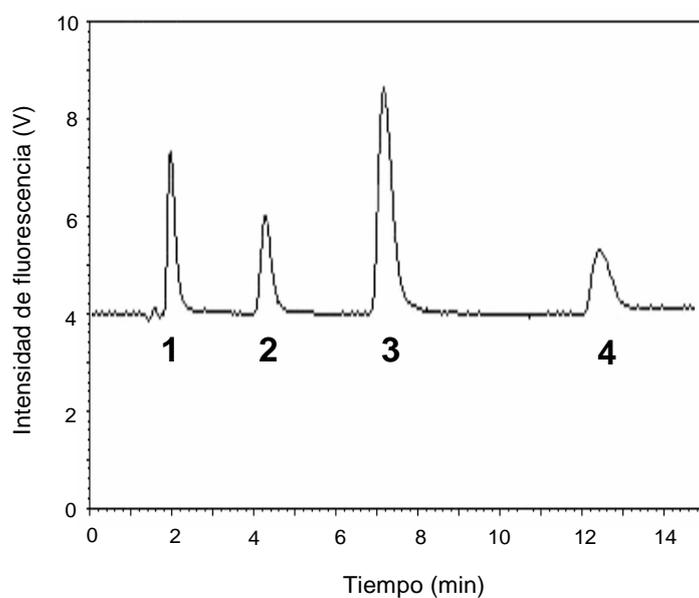


Figura 2.10. *Cromatograma típico de una disolución estándar de los cuatro bisfosfonatos.*

Picos: (1) ALEN 8,0 μ M, t_r 1,966 min; (2) ETID 8,0 μ M, t_r 4,366 min; (3) RISE 8,5 μ M, t_r 7,333 min; (4) IBAN 6,0 μ M, t_r 12,849 min.

2.2.4 Validación del método

El método RP-IPC para la determinación simultánea de ALEN, ETID, IBAN y RISE fue validado por determinación de sus principales características: linealidad, límite de detección, repetitividad, precisión, robustez y selectividad. Para comprobar la linealidad se prepararon una serie de disoluciones estándar de los bisfosfonatos en el intervalo de concentración comprendido entre 0,1 y 200 μM que fueron analizadas (al menos se utilizaron 18 muestras cubriendo el rango de concentraciones indicadas). Cada punto de las gráficas de calibrado corresponde al valor medio de tres medidas independientes de áreas de pico. La linealidad entre área de pico y concentración era buena para los cuatro analitos, lo que viene demostrado por los valores encontrados para los coeficientes de regresión (r), mayores que 0,998 en todos los casos. Los límites de detección, estimados de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC (33), fueron menores que 72 nM. En la Tabla 2.3 se presentan las ecuaciones correspondientes a las rectas de regresión obtenidas a partir de los valores experimentales, así como los límites de detección.

Tabla 2.3
Parámetros de las gráficas de calibración y límites de detección

<i>Analito</i>	<i>Rango lineal (μM)</i>	<i>Y = A + B C</i>			<i>Límite de detección (nM)</i>
		<i>A (10⁶ unidades de área)</i>	<i>B (10⁵ unidades de área/μM)</i>	<i>r</i>	
ALEN	0,10 – 6,0 (0,025 – 1,49)	1,74 ± 0,25	50,6 ± 1,0	0,9983	23
	6,0 – 100 (1,49 – 24,9)	12,6 ± 1,6	4,88 ± 0,24	0,9987	
ETID	0,20 – 6,0 (0,041 – 1,24)	2,08 ± 0,20	47,5 ± 0,7	0,9993	28
	6,0 – 80 (1,24 – 16,5)	7,29 ± 1,22	8,49 ± 0,29	0,9980	
IBAN	0,60 – 8,0 (0,19 – 2,55)	3,34 ± 0,21	41,3 ± 0,5	0,9996	72
	8,0 – 200 (2,55 – 63,8)	4,48 ± 2,14	9,65 ± 0,23	0,9986	
RISE	0,10 – 8,0 (0,028 – 2,26)	3,00 ± 0,82	134 ± 2	0,9988	13
	4,0 – 100 (1,13 – 28,3)	5,14 ± 1,12	16,7 ± 0,2	0,9995	

C: Concentración de analito en μM; A: ordenada en el origen de las rectas de calibrado; B: pendiente de las rectas de calibrado. Los datos entre paréntesis corresponden al rango de linealidad de los bisfosfonatos expresado en μg ml⁻¹.

La precisión en el día se calculó con inyecciones repetidas de dos muestras conteniendo los cuatro analitos a dos concentraciones diferentes. La desviación estándar relativa (RSD) siempre fue menor que 1,53 %. La precisión entre días se estudió analizando las muestras ya indicadas durante cinco días consecutivos. Cada muestra se inyectaba en el sistema cromatográfico tres veces cada día; la RSD para las áreas de pico fue menor que 2,25 %. Resultados más detallados se presentan en la Tabla 2.4 que se incluye a continuación.

Tabla 2.4
Precisión y exactitud

Concentración (μM)	Repetitividad		Reproducibilidad	
	RSD (%)	Exactitud (%)	RSD (%)	Exactitud (%)
Alendronato				
1,0	1,46	103,3	2,24	104,3
40,0	1,38	102,3	2,19	98,1
Etidronato				
1,0	1,32	105,0	1,73	102,9
40,0	1,16	99,8	1,42	102,8
Ibandronato				
1,0	1,53	97,7	2,25	96,6
40,0	1,44	101,7	1,93	97,1
Risedronato				
1,0	1,03	102,0	2,04	103,6
40,0	0,97	99,8	1,94	96,9

La robustez del método fue evaluada variando deliberadamente los parámetros que afectan tanto al sistema de detección como a la separación cromatográfica. Manteniendo fijas las condiciones cromatográficas en sus valores óptimos, se varió la concentración de los reactivos peroxidisulfato potásico ($4 - 6 \text{ g l}^{-1}$), molibdato amónico ($3,5 - 4,5 \text{ g l}^{-1}$), tiamina ($0,8 - 1,5 \text{ g l}^{-1}$) y amoníaco ($4,5 - 5,5 \text{ M}$), el tiempo de irradiación ($10 - 20 \text{ s}$) y la longitud de los reactores L_1 ($150 - 350 \text{ cm}$), L_2 ($80 - 150 \text{ cm}$) y L_3 ($80 - 150 \text{ cm}$) y los cambios observados para la señal fluorescente de cada bisfosfonato fueron inferiores al 10 %. Cuando los parámetros anteriores se fijaron en sus valores óptimos y se variaron las características de la fase móvil caudal ($0,8 - 1,2 \text{ ml min}^{-1}$), pH ($8,0 - 10,0$), concentración de TBA ($0,22 - 0,28 \text{ mM}$), concentración de EDTA ($0,3 - 0,7 \text{ mM}$) y porcentaje de acetonitrilo ($2,8 - 3,5 \%$), la resolución entre los picos adyacentes continuó siendo satisfactoria, pero los tiempos de retención de los analitos experimentaron variaciones de hasta un 12 %.

El método se puede considerar como muy selectivo debido a que pocos compuestos darán respuesta en este sistema de detección post-columna. Es importante hacer notar el hecho de que el fosfato, que obviamente responde a este sistema de detección post-columna, coeluye con el ALEN y, por tanto, interfiere en la determinación de este bisfosfonato. Sin embargo, cuando la concentración de fosfato es menor que diez veces la de ALEN esta interferencia puede superarse comparando la medida obtenida con la encontrada cuando con el mismo sistema cromatográfico se trabaja con la lámpara UV del fotorreactor apagada.

2.2.5 Aplicaciones

Las ventajas que aporta el sistema de detección seleccionado para seguir la separación cromatográfica de los bisfosfonatos conducen a cromatogramas muy simples a la hora de la aplicación del método propuesto a la determinación de problemas reales. Para evaluar la aplicabilidad del presente método se han analizado los bisfosfonatos en diferentes tipos de muestras: orina humana y preparados farmacéuticos.

2.2.5.1 Análisis de bisfosfonatos en orina

El aislamiento de los bisfosfonatos de la orina implica la coprecipitación de sus sales de calcio con fosfatos endógenos a pH alcalino. Por tanto, debido a que el ALEN coeluye con el fosfato, sólo se podrán determinar ETID, RISE e IBAN.

La selectividad del ensayo se demostró analizando orina humana libre de fármaco, procedente de tres donantes diferentes. En estas experiencias no se detectaron interferentes a los tiempos de retención correspondientes a ETID, RISE e IBAN en ninguno de los tres controles de orina realizados. El procedimiento seguido se describe a continuación:

Las muestras fueron enriquecidas con diferentes cantidades de bisfosfonatos para obtener una concentración final dentro de su rango terapéutico y se congelaron a -18 °C. Antes del análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min. Una alícuota de 5 ml de cada muestra se transfería a un tubo de ensayo de polipropileno y se

añadían 50 µl de cloruro cálcico 1,25 M. La adición de 65 µl de NaOH 7,5 M era necesaria para conseguir la formación de un precipitado blanco. Después de la centrifugación (a 3000 x g durante 10 min) la orina se aspiraba y el precipitado blanco se redisolvió en 50 µl de HCl 1 M. Si era necesario, se adicionaban alícuotas de 25 µl de HCl 1 M para disolver el sólido completamente. Seguidamente se adicionaban 5 ml de agua y las sales de calcio se precipitaban de nuevo por adición de 50 µl de NaOH 7,5 M. Después de la centrifugación y aspiración del sobrenadante, el residuo se disolvía en 3 ml de EGTA 0,05 M (ajustado a pH 6) para asegurar la completa disolución del precipitado y las muestras se sometían a la acción de los ultrasonidos durante 5 min. Finalmente se diluían con agua hasta 5 ml en matraz aforado.

La selectividad el ensayo se ilustra en la Figura 2.11, en la que se incluyen los cromatogramas correspondientes a un blanco de orina y esta misma muestra pero enriquecida con ETID, RISE e IBAN.

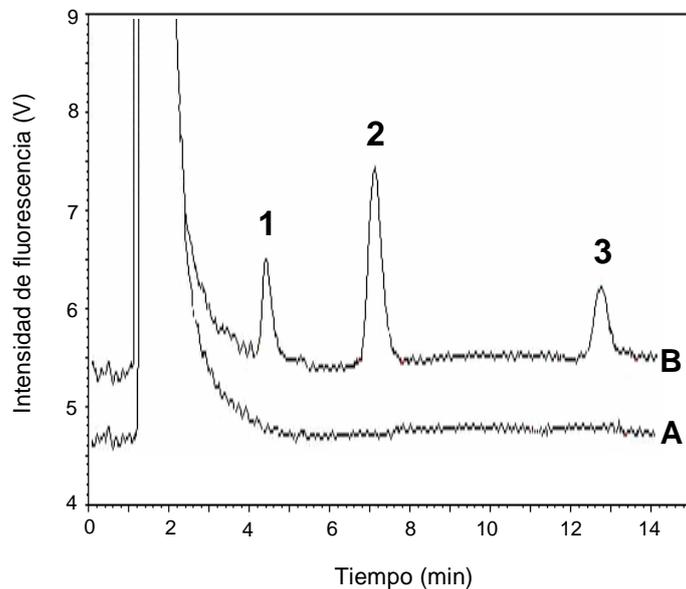


Figura 2.11. Cromatogramas de un blanco de orina (A) y orina enriquecida con los analitos (B).

(1) ETID $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$; (2) RISE $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$; (3) IBAN $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$.

En experiencias complementarias en las que se analizaron muestras de orina enriquecidas con bisfosfonatos a diferentes concentraciones se confirmó la linealidad y precisión del ensayo, puesto que con los diferentes analitos se comprobó que el área de pico dependía linealmente de la concentración de bisfosfonato presente en la muestra, en el intervalo de concentraciones comprendido entre $0,05$ y $2,0 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los coeficientes de correlación de las líneas de regresión obtenidas eran de $0,9980$ o superiores. La precisión del método se estableció para cada analito determinando

cuatro concentraciones de los mismos entre 0,1 y 1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en doce series de muestras independientes. La precisión entre días se comprobó realizando análisis en un periodo de cinco días de trabajo y siempre se encontraron valores de RSD menores de 2,95 %. Los resultados se presentan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5
Valores de recuperación y precisión del método RP-IPC para la determinación de ETID, RISE e IBAN en muestras de orina

<i>Analito</i>	<i>Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>Cantidad encontrada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
ETID	0,10	0,089	2,95	89
	0,25	0,236	0,74	94
	0,50	0,494	1,28	99
	1,0	0,960	0,87	96
RISE	0,10	0,094	1,22	94
	0,25	0,233	1,74	93
	0,50	0,491	1,13	98
	1,0	1,00	1,44	100
IBAN	0,25	0,221	1,43	88
	0,35	0,324	2,49	93
	0,50	0,451	0,75	90
	1,0	0,950	1,24	95

El procedimiento optimizado ha sido usado para determinar RISE en muestras de orina humana procedente de dos mujeres que habían recibido una dosis semanal oral de 35 mg del compuesto. La orina se comenzó a recoger inmediatamente después de la administración del fármaco y se dejó de guardar a las 24 horas siguientes a la dosis. Estas muestras se analizaron cuidadosa y repetidamente. La cantidad media excretada durante ese periodo fue de $329 \pm 6 \mu\text{g}$ ($n = 12$), resultados concordantes con valores previos referentes a la biodisponibilidad por debajo del 1 % de la dosis oral (34).

2.2.5.2 Análisis de preparados farmacéuticos

El método propuesto ha sido contrastado analizando preparados farmacéuticos comerciales que contienen alguno de estos bisfosfonatos.

El procedimiento seguido fue el siguiente: para cada preparado farmacéutico se pulverizaron finamente cuatro tabletas. Se pesaron exactamente cantidades equivalentes a 10 mg del principio activo y el sólido se colocó en un matraz aforado de 100 ml con 40 ml de agua. La disolución se sometió a la acción de los ultrasonidos durante 10 min y se diluyó hasta el enrase con agua. Después de filtrar, se diluyeron adecuadamente con agua diferentes alícuotas del filtrado para conseguir que las concentraciones de los bisfosfonatos estuvieran entre 10 y $15 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Se realizaron diez determinaciones de cada una de las muestras y los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6
Determinación de ALEN, ETID, IBAN y RISE en productos farmacéuticos

<i>Muestra^a</i> <i>(laboratorio)</i>	<i>Analito</i>	<i>Contenido declarado</i> <i>(mg/comprimido)</i>	<i>Cantidad encontrada</i> <i>(mg/comprimido)</i>
Fosamax (Merck)	ALEN	70,0	70,24 ± 0,63
Difosfen (Rubio)	ETID	164,8	165,01 ± 0,63
Bondronat (Roche)	IBAN	50,0	50,17 ± 0,48
Acrel (Vita)	RISE	32,5	32,39 ± 0,20
Actonel (Aventis)	RISE	32,5	32,58 ± 0,19

^a Composición por comprimido: **Fosamax**: alendronato sódico trihidrato 91,37 mg (equivalente a 70 mg de ácido alendróico); excipientes: lactosa anhidra, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica y estearato magnésico. **Difosfen**: etidronato disódico 200 mg (equivalente a 164,83 mg de ácido etidróico); excipientes: celulosa microcristalina, estearato magnésico, talco, glicolato de sodio y almidón. **Bondronat**: ibandronato monosódico monohidrato 56,25 mg (equivalente a 50 mg de ácido ibandróico); excipientes: lactosa monohidrato, povidona, celulosa microcristalina, crospovidona, ácido esteárico purificado, sílice coloidal anhidra; cubierta del comprimido: hipromelosa, dióxido de titanio, talco, macrogol 6000. **Acrel**: risedronato sódico 35 mg (equivalente a 32,5 mg de ácido risedróico); excipientes: lactosa monohidratada, celulosa microcristalina, crospovidona, estearato magnésico; cubierta pelicular: Dri-Klear (hipromelosa, macrogol 400, hidroxipropilcelulosa, macrogol 8000 y dióxido de silicio), Chromatone white DDB 7536W (dióxido de titanio, hipromelosa), E-172. **Actonel**: risedronato sódico 35 mg (equivalente a 32,5 mg de ácido risedróico); excipientes: lactosa monohidratada, celulosa microcristalina, crospovidona, estearato magnésico; cubierta pelicular: hipromelosa, macrogol 400, hidroxipropilcelulosa, macrogol 8000 y dióxido de silicio, dióxido de titanio, E-172.

También se llevaron a cabo ensayos de recuperación, adicionando cantidades convenientes de los analitos estándar a las muestras de tabletas pulverizadas. En la Tabla 2.7 se recogen los resultados de estas determinaciones que confirman que el método es suficientemente seguro y que los excipientes que contienen los productos comerciales no interfieren en los análisis de cada uno de los principios activos.

Como resumen del Capítulo podemos afirmar que por RP-IPC con una columna C₁₈ se consigue separar sin ambigüedad los ácidos bisfosfónicos ALEN, ETID, RISE e IBAN. La separación cromatográfica depende mucho de las condiciones experimentales (longitud de la cadena tetraalquilamonio del formador del par iónico, pH, concentración de acetonitrilo de la fase móvil acuosa). Estos parámetros experimentales han sido evaluados y optimizados para conseguir buena resolución cromatográfica y los menores tiempos de análisis posibles.

El sistema de detección post-columna es sensible y selectivo. La única sustancia endógena identificable que se ha detectado por este método es el ortofosfato.

Se ha realizado una completa validación del método considerando especificidad, linealidad, sensibilidad, precisión, seguridad, recuperación y robustez. Asimismo se ha aplicado a la determinación de bisfosfonatos en orina y en productos farmacéuticos y, además, con este método se pueden realizar estudios farmacocinéticos para evaluar la asimilación del principio activo.

Tabla 2.7
Recuperaciones de ALEN, ETID, IBAN y RISE en preparados farmacéuticos enriquecidos

<i>Producto</i>	<i>Laboratorio</i>	<i>Analito</i>	<i>Cantidad añadida (mg)</i>	<i>Cantidad encontrada (mg)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Fosamax	Merck	ALEN	2,0	2,00	100 ± 1
			4,0	4,01	100 ± 4
			6,0	5,93	99 ± 4
			8,0	8,06	101 ± 3
Difosfen	Rubio	ETID	4,0	4,03	101 ± 2
			8,0	7,85	98 ± 1
			12	12,4	103 ± 2
			20	19,8	99 ± 3
Bondronat	Roche	IBAN	4,0	4,03	101 ± 2
			8,0	7,84	98 ± 1
			12	12,0	100 ± 1
			20	19,9	100 ± 2
Acrel	Vita	RISE	2,5	2,59	104 ± 1
			5,0	5,06	101 ± 2
			10	9,70	97 ± 2
			15	15,1	101 ± 3
Actonel	Aventis	RISE	2,5	2,54	102 ± 1
			5,0	5,11	102 ± 2
			10	9,72	97 ± 5
			15	15,2	101 ± 3

2.3 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- J. DeRuiter y R. Clark, *Endocrine Module*, Spring, 2002.
- 2.- Goodman and Gilman's, "*The Pharmacological Basic of Therapeutics*", 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001.
- 3.- H. Fleisch, R. Graham, G. Russell, M.D. Francis, *Science*, **165** (1969) 1262.
- 4.- H. Wada, Q. Fernando, *Anal. Chem.*, **44** (1972) 1640.
- 5.- T. Fonong, D.J. Burton, D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 1645.
- 6.- S.J. Liggett, *Biochem. Med.*, **7** (1973) 68.
- 7.- S. Bisaz, R. Felix, H. Fleisch, *Clin. Chim. Acta*, **65** (1975) 299.
- 8.- S. Auriola, R. Kostianen, M. Ylinen, J. Mönkkönen, P. Ylitalo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7** (1989) 1623.
- 9.- R.W. Sparidans, J. den Hartigh, *Pharm. World Sci.*, **21** (1999) 1.
- 10.- R. Thompson, N. Grinberg, H. Perpall, G. Bicker, P. Tway, *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994) 2511.
- 11.- M.J. Lovdahl, D.J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A*, **850** (1999) 143.
- 12.- V. Virtanen, L.H.J. Lajunen, *J. Chromatogr.*, **617** (1993) 291.
- 13.- R.W. Sparidans, J. den Hartigh, P. Vermeij, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13** (1995) 1545.

- 14.-G. Flesch, N. Tominaga, P. Degen, *J. Chromatogr.*, **568** (1991) 261.
- 15.-R.W. Sparidans, J. den Hartigh, W.M. Ramp-Koopmanschap, R.H. Langebroek, P. Vermeij, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16** (1997) 491.
- 16.-W.F. Kline, B.K. Matuszewski, *J. Chromatogr.*, **583** (1992) 183.
- 17.-T. Usui, T. Watanabe, S. Higuchi, *J. Chromatogr.*, **584** (1992) 213.
- 18.-P.T. Daley-Yates, L.A. Gifford, C.R. Hoggarth, *J. Chromatogr.*, **490** (1989) 329.
- 19.-S.R. Priebe, J.A. Howell, *Anal. Lett.*, **16** (1983) 1219.
- 20.-S.X. Peng, S.M. Dansereau, *J. Chromatogr. A*, **914** (2001) 105.
- 21.-Z. Xie, Y. Jiang, D-q. Zhang, *J. Chromatogr. A*, **1104** (2006) 173.
- 22.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **442** (2001) 147.
- 23.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Talanta*, **54** (2001) 989.
- 24.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Lett.*, **35** (2002) 1239.
- 25.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **540** (2005) 383.
- 26.-The Merck Index. 13th Ed. Merck & CO., INC, New Jersey, 2001.

-
- 27.-S.R. Priebe, J.A. Howell, *J. Chromatogr.*, **324** (1985) 53.
- 28.-G.W. Schieffer, *J. Chromatogr. A*, **961** (2002) 293.
- 29.-I.D. McKelvie, B.T. Hart, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, *Analyst*, **114** (1989) 1459.
- 30.-D.M.W. Peat, I.D. McKelvie, G.P. Matthews, P.M. Haygarth, P.J. Worsfold, *Talanta*, **45** (1997) 47.
- 31.-L. Dogliotti, E. Hayon, *J. Phys. Chem.*, **71** (1967) 2511.
- 32.-L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "*Practical HPLC method development*", Wiley, New York, 1997.
- 33.-M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized Guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **74** (2002) 835.
- 34.-P.T. Vallano, S.B. Shugarts, W.F. Kline, E.J. Woolf, B.K. Matuszewski, *J. Chromatogr. B*, **794** (2003) 23.

CAPÍTULO 3

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINAS B₁ CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

CAPÍTULO 3

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINAS B₁ CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

	<u>Página</u>
3.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	147
3.2. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TIAMINA, MONOFOSFATO DE TIAMINA Y PIROFOSFATO DE TIAMINA	156
3.2.1. Sistema de detección post-columna.....	159
3.2.2. Separación cromatográfica.....	164
3.2.3. Validación del método	167
3.2.4. Aplicaciones.....	170
3.2.4.1. Análisis de preparados farmacéuticos.....	170
3.2.4.2. Análisis de alimentos para bebés.....	174
3.3. BIBLIOGRAFÍA.....	177

SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VITAMINAS B₁ CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

3.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las vitaminas hidrosolubles incluyen el complejo B y el ácido ascórbico. El complejo B comprende muchos compuestos que muestran grandes diferencias en cuanto a estructura química y efecto biológico. Sin embargo, se agrupan en una clase única porque originariamente se aislaron a partir de las mismas fuentes, entre las que destacan hígado y levadura.

La tiamina (vitamina B₁) fue el primer miembro del complejo B que fue identificado. Recibe también los nombres de aneurina, factor antineurítico o antiberiberi, y está ampliamente distribuida en diferentes tipos de materiales naturales en la forma de tiamina libre (T) y como sus ésteres monofosfato (TMP), difosfato o pirofosfato (TDP) y trifosfato (TTP). En la actualidad hay una amplia evidencia documental para dos papeles independientes de la tiamina: por un lado, está perfectamente establecido el papel del pirofosfato de tiamina como coenzima (cocarboxilasa) y, por otro, la intervención

de algunas formas fosforiladas de la tiamina en el proceso de conducción del sistema nervioso (1-3)*.

La estructura de la tiamina, 3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2-hidroxietil)-4-metiltiazol, así como de sus ésteres se presenta en la Figura 3.1.

La tiamina se descompone por la acción de la luz ultravioleta (< 290 nm) y por calentamiento en medio acuoso, aumentando la velocidad de dicha descomposición con el pH. En ausencia de agua es estable al calor durante 24 horas e incluso periodos más largos.

Sus formas comerciales más frecuentes son el clorhidrato y el mononitrato de tiamina. El primero es muy higroscópico y en disolución tiene reacción ácida; el segundo, no higroscópico, se usa preferentemente para reforzar los alimentos. Ambas formas son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos.

Las fuentes más ricas en tiamina son los cereales, huevos, levadura, carne de cerdo, legumbres y algunos frutos secos; sin embargo, la mayor parte de la que hay en los cereales se pierde en la molienda.

* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 177.

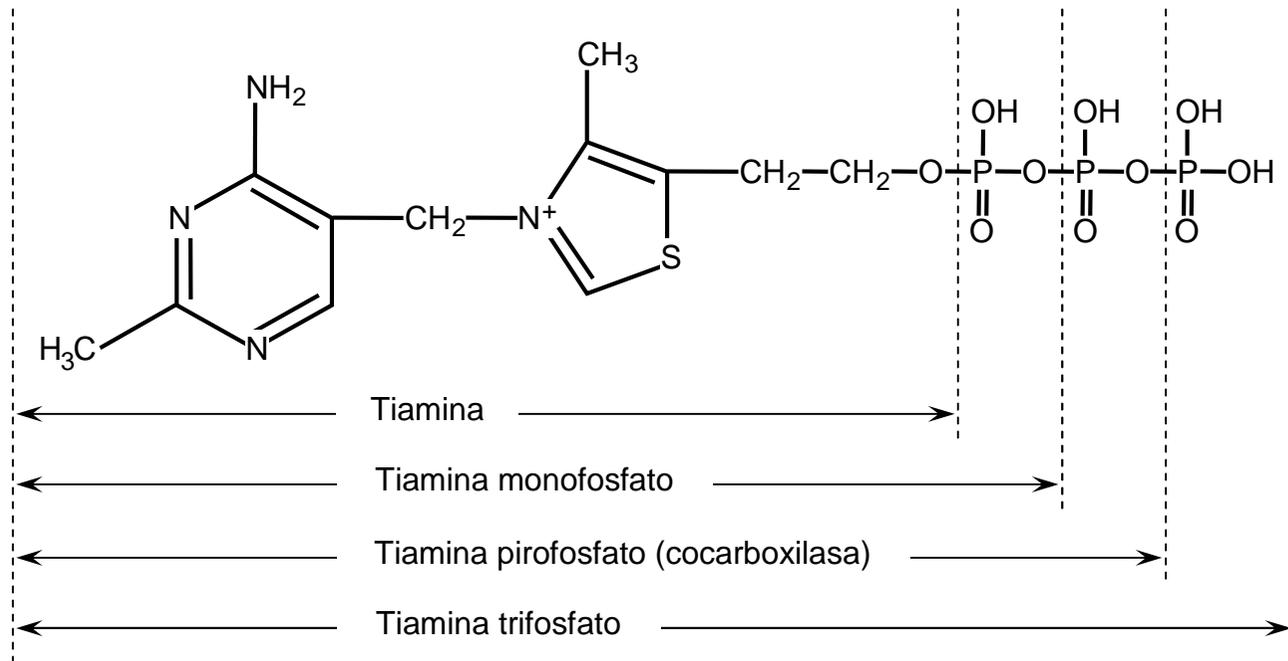
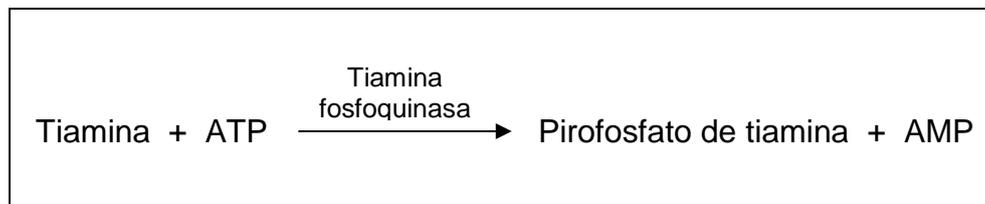


Figura 3.1. Estructura química de T, TMP, TDP y TTP.

Diversos análogos estructurales como piritiamina y oxitiamina pueden actuar como antagonistas de tiamina, originando alteraciones metabólicas características de la deficiencia de esta vitamina. La primera tiene un anillo de piridina en vez de tiazol y en la segunda el grupo amino de la piridina está sustituido por un grupo hidroxilo.

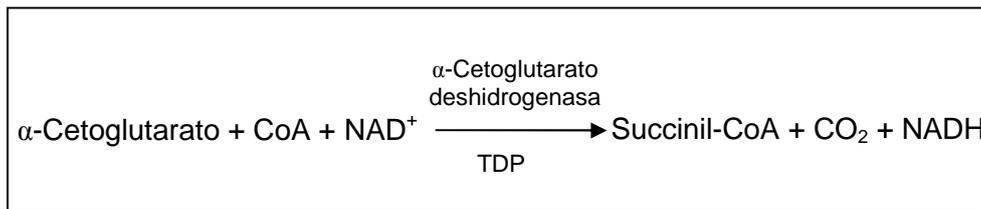
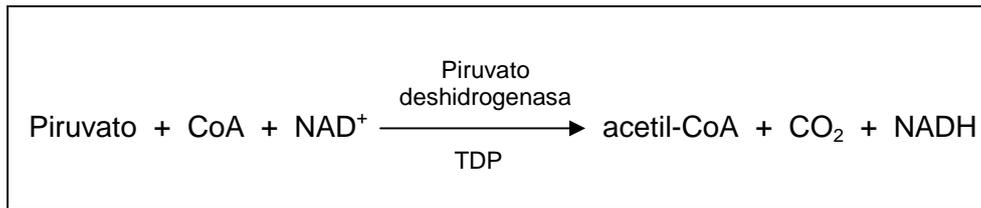
La absorción de tiamina tiene lugar en el intestino principalmente mediante transporte activo y es limitada (dosis oral máxima 2 – 5 mg), eliminándose el exceso o descomponiéndose por degradación bacteriana.

La tiamina se fosforila enzimáticamente convirtiéndose en la coenzima activa, pirofosfato de tiamina, en todas las células nucleadas:



La mayor parte se fosforila en el hígado, aunque el riñón también tiene un sistema de fosforilación muy activo. El cuerpo humano tiene una capacidad muy limitada para almacenar tiamina; su cantidad total en un sujeto sano es de unos 25 mg y los tejidos más ricos en esta vitamina son el músculo cardíaco, el cerebro, el hígado, el riñón y el músculo esquelético.

El pirofosfato de tiamina participa primariamente como transportador de grupos aldehído activos en presencia de Mg²⁺, en diversas reacciones. Entre ellas se encuentran dos descarboxilaciones oxidativas relacionadas con el ciclo de Krebs:



Además, está relacionada con la ruta de las pentosas fosfato a través de las reacciones catalizadas por transcetolasa, siendo por tanto necesaria para convertir los alimentos (carbohidratos) en energía; permite a los órganos y tejidos, como el corazón, el hígado, los músculos y el sistema nervioso, funcionar correctamente. Es también esencial para la buena asimilación de alimentos.

En el hombre, una deficiencia de tiamina produce daños neurológicos y en los casos más serios la enfermedad conocida como beriberi, de la que se han descrito varias formas clínicamente diferentes; todas ellas van acompañadas de anorexia y algunas

pueden acabar con fallos cardíacos fatales. El síndrome de Wernicke-Korsakoff es una de ellas y constituye una enfermedad neuropsiquiátrica caracterizada por parálisis de movimientos oculares y locomoción anormal, así como funciones mentales notablemente alteradas.

El beriberi apareció al modificarse los sistemas de descascarillado del arroz utilizados en Extremo Oriente, ya que en este alimento la vitamina se concentra en la cascarilla y, mientras que con el sistema antiguo parte pasaba al grano, con el nuevo tratamiento la vitamina se perdía totalmente. Es también importante tener en cuenta la presencia en algunos alimentos de enzimas capaces de degradar la tiamina. Aunque no existen grandes poblaciones con deficiencias severas, sí hay áreas en Extremo Oriente en las que su ingestión puede considerarse por debajo de lo aceptable.

Las causas de la deficiencia de tiamina incluyen dietas inadecuadas, granos no enriquecidos o ingestión de pescado conteniendo tiaminasas microbianas, las cuales destruyen hidrolíticamente a la vitamina en el tracto intestinal. El té contiene factores antitiamina que han sido detectados en otros extractos de plantas. El alcoholismo crónico es un factor que contribuye a la deficiencia no sólo de tiamina, sino también de otras vitaminas B. Finalmente, otros pacientes de riesgo son los que durante periodos prolongados sufren diálisis renal o infecciones febriles crónicas.

Los signos clínicos primarios de estas deficiencias implican los sistemas nervioso y cardiovascular. En adultos los síntomas más frecuentes son confusión mental, anorexia, debilidad muscular,

oftalmoplejía, edemas (beriberi húmedo), pérdida muscular (beriberi seco), taquicardia y aumento del corazón (4).

Por otra parte, a diferencia de otras vitaminas, se conocen algunos efectos de la hipervitaminosis de tiamina, como son un efecto sobre los nervios periféricos e hipertensión vascular.

La determinación de tiamina presenta, por tanto, un gran interés debido a su importante papel biológico, y se ha llevado a cabo a través de diversos caminos. Existen procedimientos biológicos que se han utilizado hasta fechas recientes (5-7). Entre los métodos de valoración directos, los hay que utilizan: yodo operando entre 0 y 2 °C (8), ácido perclórico en diversos medios no acuosos (9-12), reacciones con heteropoliácidos (13), valoraciones amperométricas con complejos de aniones haluros, tales como el BiI_4^- (14) y potenciométrica con AgNO_3 y un electrodo de $\text{Ag-Ag}_2\text{S}$ (15).

Por otra parte, la tiamina presenta gran actividad polarográfica y, según el soporte electrolítico, produce cuatro tipos de ondas. Una de ellas de carácter catalítico similar a la que presentan las proteínas en disoluciones amoniacaes de sales de cobalto; la segunda, también catalítica, aparece en disoluciones reguladoras de fosfato, y de las otras dos restantes, una es anódica y se produce cuando se opera a pH superior a 9, y la otra es de reducción. Wiesner (16) estudió las tres primeras y recomendó el pH 7,3 para fines analíticos.

Preticha (17) encontró un método indirecto para la determinación polarográfica de la vitamina B₁ en productos farmacéuticos, basado en la formación de un precipitado rojo con BiI_4^- que tratado con sal de Rochelle proporciona la disolución que

se polarografía. Se ha aplicado el método polarográfico a la determinación de mezclas de tiamina con sus ésteres monofosfato y pirofosfato, sin necesidad de separación previa, mediante un adecuado ajuste de pH (18), así como la polarografía diferencial de impulsos (19).

También se ha empleado un electrodo de membrana (20) que contiene un par iónico de vitamina B₁ y derivados hidrofóbicos del tetrafenilborato.

Gran interés presentan las publicaciones en las que se determina tiamina a través de métodos cinéticos (21), procesos enzimáticos (23) y espectrofotometría en fase sólida (24). Sin embargo, entre los diversos métodos de determinación de tiamina los que ocupan un lugar más destacado, por su mayor especificidad y sensibilidad, son aquellos que se basan en la obtención de tiocromo, un compuesto altamente fluorescente, producto de la oxidación de la tiamina. El tiocromo exhibe una fluorescencia azul cuya intensidad se puede relacionar cuantitativamente con la concentración inicial de tiamina.

El procedimiento más generalizado para pasar la tiamina a tiocromo consiste en su oxidación con el anión hexacianoferrato(III) en medio alcalino, seguido de la extracción desde la fase acuosa a una fase orgánica, realizando posteriormente la medida fluorimétrica. Esta técnica ha sido aplicada y modificada frecuentemente desde hace varios decenios (7, 23, 25), es el método oficial de U.S.P. y ha sido automatizado por análisis por inyección en flujo con detección fluorimétrica y quimioluminiscente (26, 27).

Otros métodos FI en los que se genera tiocromo fluorescente utilizan Hg(II) (28, 29), Cu(II) (30), resinas aniónicas cargadas con hexacianoferrato(III) (31) y oxidación electroquímica (32). También se han propuesto métodos en los que se irradia con luz ultravioleta la tiamina seguido de su detección fotométrica (33) o fluorimétrica (34-36), y otros en que se recurre a la derivatización del grupo amina primaria con o-ftalaldehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol para obtener un derivado fluorescente (37). Además, se han construido para la tiamina optosensores en flujo continuo espectrofotométricos (38, 39) y fluorimétricos (40).

La oxidación de la tiamina a tiocromo con hexacianoferrato(III) se ha utilizado acoplada a separaciones cromatográficas de esta vitamina en técnicas de derivatización pre-columna y post-columna (41-43).

La oxidación de la tiamina también puede producir emisión quimioluminiscente en sistemas de baño (44) o de flujo (27), pero los resultados muestran baja sensibilidad. También se ha obtenido respuesta quimioluminiscente electroquímicamente sobre un electrodo de platino, que mejoraba en presencia del colorante Rodamina B (45). Se han desarrollado sensores quimioluminiscentes basados en el efecto inhibitor que la tiamina ejerce sobre sistemas luminol-periodato (46) y luminol-hexacianoferrato(III) (47). El efecto favorable de la tiamina sobre la reacción luminol-peróxido de hidrógeno ha sido aprovechado para la determinación de tiamina en un sistema de inyección en flujo (48). La irradiación UV de la tiamina ha sido empleada en un método FI-QL de esta vitamina; posiblemente, los fotofragmentos de tiamina emiten luz por oxidación con permanganato en medio ácido (49).

En este Capítulo se describe por primera vez la implementación, como sistema de detección post-columna para las vitaminas B₁, de una reacción quimioluminiscente inducida fotoquímicamente. El método se basa en el fuerte efecto activador que provocan los fotoproductos generados por la fotólisis de la tiamina sobre la reacción luminol–permanganato. Este efecto se ha comprobado que también se produce con los otros derivados de la T, el pirofosfato (TDP) y el monofosfato (TMP). Aunque probablemente también el trifosfato de tiamina (TTP) actuaría de forma similar a los otros compuestos, no nos ha sido posible conseguir el producto estándar TTP puro, por lo que al diseñar el trabajo de investigación nos hemos centrado exclusivamente en separar y detectar tiamina, monofosfato de tiamina y pirofosfato de tiamina para proponer un método sensible, específico y rápido para evaluar estas vitaminas.

3.2 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TIAMINA, MONOFOSFATO DE TIAMINA Y PIROFOSFATO DE TIAMINA

Comprobado el efecto favorable que la tiamina fotolizada, bajo la radiación UV, producía sobre la quimioluminiscencia del sistema luminol–permanganato en medio básico, nos propusimos investigar el efecto de diversas variables experimentales sobre el proceso global con el fin de utilizarlo como una nueva forma de detección para las vitaminas B₁ (T, TMP y TDP) una vez separadas por HPLC. Previamente se habían realizado experiencias que confirmaban un comportamiento similar de la TMP y la TDP, después de sometidas a fotólisis, en relación con el sistema quimioluminiscente luminol–permanganato. Para llevar a cabo todos los estudios se diseñó el

esquema instrumental que se presenta en la Figura 3.2. Consiste básicamente en un instrumento de cromatografía líquida de Beckman Coulter compuesto por un módulo de bombas System Gold 125 NM, un detector de diodos en serie System Gold 168 (este detector acoplado al sistema comercial nos sirve para estudios comparativos) y una válvula de inyección Rheodyne 7725. La columna seleccionada fue RP-Amida C₁₆ de 5 µm de tamaño de partícula y 15 cm de longitud. También se utilizó una guarda-columna empaquetada con la misma fase estacionaria. El detector de quimioluminiscencia utilizado consta básicamente de un tubo fotomultiplicador modelo 814, de Photon Technology Internacional, y una célula Hellma 170.700 QS (dos ventanas; volumen interno 31 µl y 0,5 mm de paso de luz) colocada en posición adyacente, lo más cerca posible del tubo fotomultiplicador. Además, el sistema lleva un espejo para recoger la máxima luz posible. Esta célula expone una relativa gran superficie frente al tubo fotomultiplicador (ver página 345 de la Parte Experimental).

Se deben extremar las precauciones para que la célula y el tubo fotomultiplicador estén lo más próximos posible. La señal quimioluminiscente producida en la célula de flujo se detecta sin discriminación de longitudes de onda y el detector va conectado al equipo de cromatografía por medio de una interfase SS420x.

Para la adquisición y tratamiento de datos se utilizó un ordenador personal IBM con el software 32 Karat de Beckman.

El sistema de detección post-columna (esquemático en la Figura 3.2) está formado por dos bombas peristálticas Gilson Minipuls-3 para la adición de reactivos, un fotorreactor construido

con tubo de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno arrollado alrededor de una lámpara de mercurio de baja presión, tipo lápiz, Spectronic (50 mm de longitud x 5 mm de diámetro) de 6 W, cuya principal línea espectral era a 254 nm.

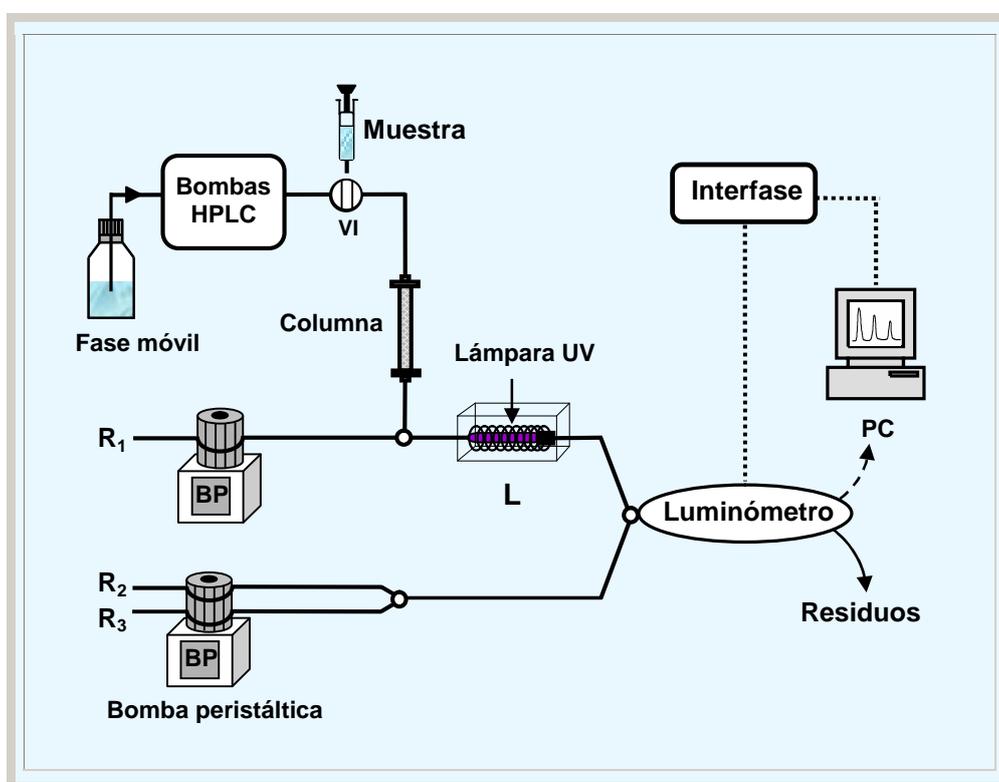


Figura 3.2. Esquema HPLC con detección quimioluminiscente post-columna empleado en la determinación de tiamina y sus ésteres TMP y TDP.

Fase móvil = disolución reguladora fosfato 25 mM de pH 7 ($1,1 \text{ ml min}^{-1}$);
 R₁ = CTAB 5 mM ($1,8 \text{ ml min}^{-1}$); R₂ = permanganato potásico 5 μM ($1,8 \text{ ml min}^{-1}$);
 R₃ = luminol 8 μM y disolución reguladora fosfato 0,2 M de pH 11,2 ($1,8 \text{ ml min}^{-1}$);
 L = fotorreactor; VI = válvula de inyección.

3.2.1 Sistema de detección post-columna

El principio de la detección post-columna es conseguir que los productos resultantes de la fotólisis de T, TMP y TDP aumenten fuertemente la débil emisión quimioluminiscente producida durante la oxidación del luminol por el permanganato en medio básico. Las corrientes de los dos reactantes se mezclan continuamente en la célula de flujo y la débil señal QL se registra continuamente como una línea base. Cuando las tiaminas fotolizadas en línea son introducidas en el sistema de flujo, la intensidad de quimioluminiscencia mejora proporcionalmente a la concentración de vitamina B₁ fotoirradiada.

Con objeto de establecer las condiciones óptimas para conseguir límites de detección lo más bajos posibles, se ha estudiado el efecto de varios parámetros experimentales sobre el sistema quimioluminiscente en flujo utilizando el esquema presentado en la Figura 3.2, pero eliminando la columna cromatográfica para mayor simplicidad en los estudios.

Las concentraciones de luminol y de permanganato potásico fueron parámetros importantes en los experimentos. El efecto de diferentes combinaciones en la concentración de luminol (entre 2 y 20 μM) y permanganato potásico (entre 1 y 50 μM) fue estudiado. Los resultados experimentales mostraron que la máxima relación entre la señal quimioluminiscente y la señal del blanco se obtenía cuando se utilizaban disoluciones 8 μM de luminol y 5 μM de KMnO_4 .

La señal quimioluminiscente estaba afectada de forma importante por el pH de las disoluciones en el fotorreactor y en la célula de flujo. La influencia del pH sobre la fotólisis de la tiamina fue

el primero de estos efectos estudiado; para ello se bombearon a través del canal de la muestra (Fig. 3.2) disoluciones reguladoras fosfato 0,02 M de diferentes valores de pH, pero se mantenía siempre el pH de 11 en la célula de flujo. Se encontró que la intensidad de quimioluminiscencia aumentaba hasta pH 7, observándose una meseta para los valores de pH comprendidos entre 7 y 9, y al aumentar a valores superiores de pH en el reactor fotoquímico la señal disminuía (Fig. 3.3). En las experiencias siguientes siempre se trabajó con la disolución reguladora fosfato de pH 7.

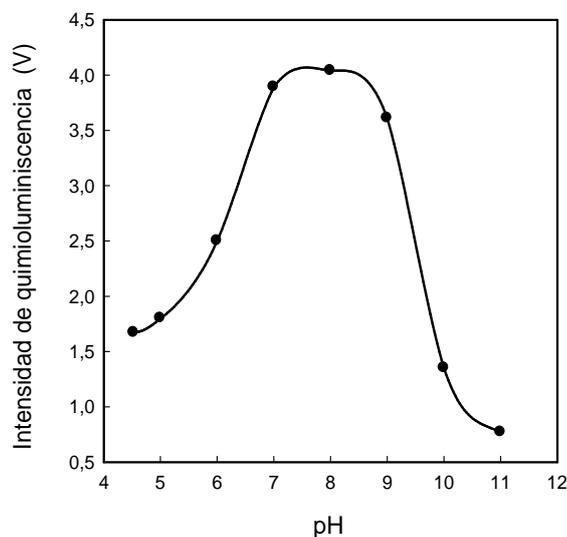


Figura 3.3. Efecto del pH en el fotorreactor sobre la señal quimioluminiscente.

(●) Quimioluminiscencia corregida con el blanco de una disolución de T 1 μ M.

Una vez seleccionado el pH óptimo para la fotólisis de las tiaminas, se comprobó la influencia del pH en la célula de flujo sobre la quimioluminiscencia. Para ello se prepararon disoluciones de luminol (8 μM) en disoluciones reguladoras fosfato de diferentes valores de pH. En la Figura 3.4 queda patente que las señales de quimioluminiscencia de la reacción luminol- MnO_4^- , en presencia y en ausencia de tiamina, aumentan cuando lo hace el pH del medio. Un pH de 11,2 fue el escogido como un compromiso entre sensibilidad y valor del blanco.

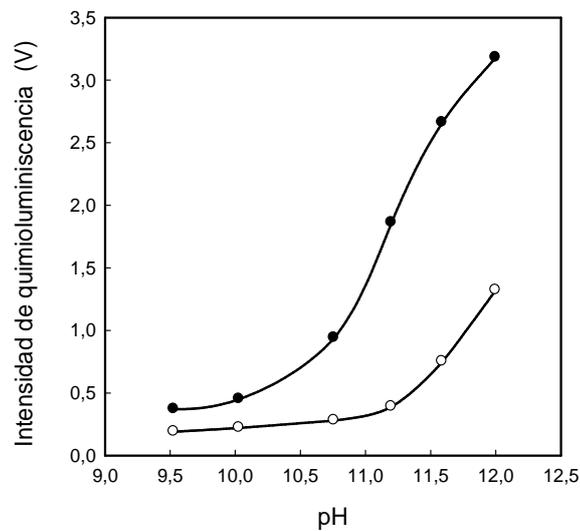


Figura 3.4. Efecto del pH en la célula de flujo sobre la señal quimioluminiscente.

(●) Tiamina 1 μM ; (○) blanco

Los agregados micelares han sido empleados repetidamente para manipular el entorno de los analitos y reactivos y para controlar la reactividad, equilibrios y rutas de diferentes procesos químicos y fotoquímicos (50, 51). En nuestro caso hemos examinado el posible efecto que sobre la quimioluminiscencia podría producir la presencia de distintos surfactantes catiónicos (bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)), aniónicos (dodecilsulfato sódico (SDS)) y no iónicos (Brij-35, alcohol polivinílico y Triton X-100). Los estudios demostraron que el CTAB ejercía un efecto favorable en la fotólisis de las tiaminas y en la reacción quimioluminiscente y que la quimioluminiscencia aumentaba con la concentración de CTAB hasta 0,01 M. Para mayores valores de concentración la intensidad de quimioluminiscencia disminuía. Las mayores diferencias entre la señal quimioluminiscente en presencia y en ausencia de tiaminas fotolizadas se observaron para una concentración en CTAB 0,005 M, que fue la seleccionada.

Tabla 3.1
Estudio del tipo de tensoactivo

<i>Tensoactivo^a</i>	<i>Intensidad de quimioluminiscencia (V)</i>		
	<i>Línea base</i>	<i>Tiamina</i>	<i>QL neta</i>
SDS	0,69	2,14	1,45
PVA	1,49	5,12	3,63
Brij-35	saturada (>14)		
Triton X-100	0,46	0,59	0,13
CTAB	2,24	7,56	5,32
TTAB	2,66	6,97	4,31

^a Todos los tensoactivos se ensayaron a una concentración superior a su concentración micelar crítica.

El tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor influye de forma importante sobre la reacción fotoquímica y, obviamente, sobre la sensibilidad obtenida. El tiempo de irradiación se controlaba por la longitud y/o por los caudales de las corrientes de la muestra y del tensoactivo CTAB. Debido a que la fotólisis de T, TMP y TDP es muy rápida, la señal analítica sólo disminuye un 15 % cuando el caudal se varía entre 2,1 y 4,2 ml min⁻¹. Las señales QL más altas frente a blancos bajos se encontraron cuando se trabajó con caudales de 1,1 ml min⁻¹ para la corriente de muestra y de 1,8 ml min⁻¹ para la de CTAB, utilizando un fotorreactor de 100 cm.

El caudal total es un importante parámetro para la emisión quimioluminiscente en la célula de flujo. Si se mantenía constante el tiempo de residencia del analito en el fotorreactor, la intensidad de QL aumentaba cuando lo hacía el caudal que fluye por la célula. Un caudal total de $6,5 \text{ ml min}^{-1}$ fue el seleccionado, porque con caudales mayores aumentaba mucho la presión en los tubos de flujo y en las conexiones, además de provocar un excesivo consumo de reactivos. En orden a asegurar una buena eficiencia en la fotólisis de las tiaminas, los caudales con que circulan la muestra (el efluente cuando el sistema de detección está conectado a la columna cromatográfica) y el CTAB se fijaron a $1,1 \text{ ml min}^{-1}$ y $1,8 \text{ ml min}^{-1}$, respectivamente; como consecuencia, el caudal de los reactivos quimioluminiscentes debía ser $3,6 \text{ ml min}^{-1}$ ($1,8 \text{ ml min}^{-1}$ por cada canal).

3.2.2 Separación cromatográfica

En la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía, la separación de T, TMP y TDP se ha llevado a cabo utilizando columnas C_{18} . Los problemas que presenta esta fase estacionaria cuando se trabaja en las condiciones de fase reversa son: 1) asegurar la separación de las vitaminas B_1 fosforiladas, polares, del pico de inyección, 2) obtener suficiente resolución entre TDP y TMP y 3) conseguir un tiempo de retención para T razonablemente corto. Han sido propuestas técnicas en fase normal o con pares iónicos pero presentaban problemas inherentes en relación con la preparación de la fase móvil, con la estabilización y con el tiempo de vida de la columna. Recientemente, se ha utilizado la columna RP-amida C_{16} para la separación de las vitaminas B_1 utilizando

derivatización a tiocromo pre- y post-columna (52-54). Estas técnicas han empleado la detección espectrofotométrica (52) y fluorescente (53, 54).

Nosotros decidimos evaluar las posibles ventajas de este tipo de columna RP-amida C₁₆ analizando T, TMP y TDP utilizando la derivatización fotoquímica post-columna y detección QL, después de adaptar las condiciones cromatográficas convenientemente.

La fase móvil seleccionada no solamente debía ser adecuada para la separación de las tiaminas, sino que, además, debía ser compatible con el sistema de detección post-columna. En la bibliografía referente a la separación de estas vitaminas con columnas amida C₁₆ utilizan como fase móvil mezclas de disoluciones reguladoras fosfato con metanol o acetonitrilo. Cuando nosotros ensayamos estas mezclas binarias encontramos que la señal quimioluminiscente disminuía drásticamente en el caso del acetonitrilo, efecto que estaba relacionado directamente con la concentración de acetonitrilo. La presencia de metanol afectaba a la señal quimioluminiscente, los tiempos de retención para las tres vitaminas disminuían y además, la resolución entre TDP y TMP no era buena. De ahí que nos decidiéramos a utilizar disoluciones reguladoras fosfato al 100 % y comprobamos su comportamiento en la separación cromatográfica de las tiaminas a diferentes valores de pH. Los mejores resultados se obtuvieron con la disolución reguladora fosfato de pH 7, de concentración 0,025 M. El caudal de la fase móvil se fijó a 1,1 ml min⁻¹ porque este valor corresponde al valor óptimo encontrado para el canal de la muestra en el sistema de detección y, además, TDP, TMP y T estaban bien separadas.

La Figura 3.5 muestra un cromatograma típico obtenido con una disolución estándar de las vitaminas; como puede observarse la señal del fondo es bastante baja y la completa separación de los analitos se consigue en menos de 7 minutos. Además, los valores de resolución para los picos consecutivos TDP/TMP y TMP/T fueron de 1,6 y 2,7, respectivamente.

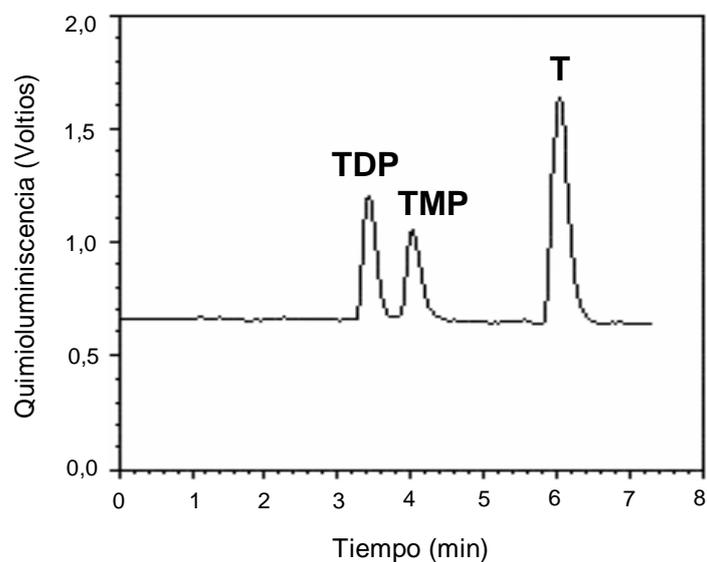


Figura 3.5. Cromatograma típico de una disolución estándar conteniendo T (0,25 μ M), TMP (0,50 μ M) y TDP (0,50 μ M) bajo las condiciones óptimas.

3.2.3 Validación del método

El método cromatográfico propuesto para la determinación de T, TMP y TDP fue validado determinando características tales como linealidad, límite de detección, precisión y selectividad.

De acuerdo con los estudios anteriores, el procedimiento experimental, esquematizado en la Fig. 3.2, consistió en realizar la separación utilizando como fase móvil una disolución reguladora fosfato de pH 7 que fluye con un caudal de 1,1 ml min⁻¹. El eluido de la columna cromatográfica se une a la corriente de CTAB 5 mM, que circula con un caudal de 1,8 ml min⁻¹, y pasan a través del fotorreactor donde se fotoderivatizan los analitos. La disolución procedente del fotorreactor se une con la corriente de luminol (8 µM en luminol y 0,2 M en disolución reguladora fosfato de pH 11,2; caudal 1,8 ml min⁻¹) y permanganato (5 µM; caudal 1,8 ml min⁻¹) mezclados previamente en un punto lo más cercano posible a la célula de flujo de quimioluminiscencia.

Para comprobar la linealidad se prepararon una serie de disoluciones estándares de T, TMP y TDP, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 2000 nM, las cuales fueron analizadas (al menos se utilizaron 18 muestras cubriendo el rango de concentraciones indicado). Cada punto de las gráficas de calibración corresponde a la media de tres valores independientes medidos en los picos correspondientes a cada vitamina. La linealidad entre área de pico y concentración se confirmó con las tres vitaminas y era muy buena, con coeficientes de regresión (r) mayores de 0,999 en todas las gráficas de calibración. Los límites de

detección estimados de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC fueron menores que 4,8 nM (55).

En la Tabla 3.2 se presentan las ecuaciones de regresión, así como otros parámetros de interés.

Tabla 3.2

Gráficas de calibrado y límites de detección del método HPLC–QL propuesto

<i>Parámetro</i>	<i>T</i>	<i>TMP</i>	<i>TDP</i>
Ordenada en el origen (10 ⁶ unidades de área)	-0,87 ± 0,20	-1,08 ± 0,16	-2,25 ± 0,40
Pendiente (10 ⁴ unidades de área/nM)	8,79 ± 0,08	1,04 ± 0,02	1,63 ± 0,02
Coeficiente de regresión	0,9998	0,9994	0,9995
Rango de linealidad (nM)	10 – 1000	100 – 2000	100 – 2000
Límite de detección (nM)	0,61	4,76	2,97

La precisión en el día se calculó con los datos obtenidos a partir de diez inyecciones repetidas de disoluciones a dos concentraciones diferentes y la desviación estándar relativa (RSD) siempre fue menor que 1,14 %. La precisión entre días se estudió analizando las muestras anteriores durante cinco días consecutivos. Cada muestra se inyectaba tres veces cada uno de los días; los valores de RSD para el área de pico de cada tiamina fueron

menores que 1,86 %. Los resultados detallados se encuentran recogidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3
Precisión y exactitud

Concentración (μM)	Repetitividad		Reproducibilidad	
	RSD (%)	Exactitud (%)	RSD (%)	Exactitud (%)
T				
0,25	0,89	99,08	1,60	97,17
1,0	0,81	98,75	1,52	95,14
TMP				
0,50	1,09	100,64	1,86	98,36
2,0	1,13	99,06	1,84	97,90
TDP				
0,50	1,14	97,73	1,65	99,02
2,0	1,06	96,36	1,59	100,55

El método puede considerarse muy selectivo ya que muy pocas sustancias responden a este sistema de detección post-columna. Otras vitaminas como biotina, cianocobalamina, nicotinamida, riboflavina, retinol, colecalciferol, ácido pantoténico, tocoferol y ácido fólico no dan señal quimioluminiscente. El ácido ascórbico y la piridoxina sólo dan quimioluminiscencia a

concentraciones elevadas, y además, no interfieren porque en el proceso cromatográfico no aparecen a los tiempos de retención correspondientes a las vitaminas B₁.

3.2.4 Aplicaciones

Las características de este sistema de detección conducen a unos cromatogramas muy sencillos cuando se analizan T, TMP y TDP en muestras reales. Para evaluar la aplicabilidad del presente método para la determinación de estos compuestos hemos analizado distintos preparados farmacéuticos y productos para la nutrición de bebés enriquecidos con vitaminas.

Los picos cromatográficos obtenidos con las muestras seleccionadas se identificaron comparando espectros y datos de tiempos de retención con los estándares correspondientes. Después de identificar las vitaminas B₁ y una vez confirmada la ausencia de efecto matriz, se cuantificaron los analitos en las diferentes muestras.

3.2.4.1 Análisis de preparados farmacéuticos

Se aplicó el método propuesto a siete formulaciones multivitaminicas en distintos formatos: tabletas, cápsulas e inyectables. Después de pulverizar finamente algunas tabletas en un mortero de porcelana, se pesaron exactamente porciones adecuadas de las mismas que se disolvieron en agua en matraces aforados de 100 ml y se diluyeron exactamente con agua ultrapura. En el caso de las ampollas una alícuota de 500 µl se transfirió

cuantitativamente al matraz aforado de 100 ml y se diluyó hasta el enrase con agua. Alícuotas de esta disolución se diluyeron posteriormente con agua ultrapura de forma conveniente para que la concentración final de los analitos estuviera comprendida entre 0,2 – 0,4 μ M.

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de las siete formulaciones farmacéuticas analizadas y los contenidos declarados por los laboratorios correspondientes. El test de Wilcoxon se escogió para comparar los resultados con los valores indicados por los fabricantes. Los valores obtenidos con un intervalo de confianza del 95 % ($W = 16$; $T+ = 22$; $T- = -6$; $P = 0,219$) demostraron que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos y los valores etiquetados. La precisión en el día, expresada como RSD, fue de 1,08 % y la precisión entre días se calculó a partir de los datos obtenidos durante cinco días consecutivos y el valor medio fue de $\pm 1,54$ % ($n = 100$).

La Figura 3.6 muestra los cromatogramas obtenidos cuando se inyectan muestras de tres de los fármacos analizados; queda patente la simplicidad de los mismos y la ausencia de interferencias.

Tabla 3.4
Determinación de vitaminas B₁ en formulaciones farmacéuticas

Muestra (laboratorio) ^a	Contenido declarado	Cantidad añadida (mg)	Cantidad encontrada (mg)	% Rec.
Benerva (Bayer)	100 mg/ampolla	–	100,33	100 ± 1
		50	144,67	96 ± 3
		100	202,62	101 ± 1
Perfus multivitamínico (Rius Garriga)	15 mg/ampolla	–	15,13	101 ± 1
		5	19,78	99 ± 2
		10	25,29	101 ± 1
Hidroxil B ₁₂ -B ₆ -B ₁ (Almirall Prodesfarma)	250 mg/tableta	–	250,60	100 ± 1
		50	298,17	99 ± 2
		100	343,80	98 ± 2
Dynamín (ERN)	2 mg/tableta	–	2,04	102 ± 3
		1	3,04	101 ± 2
		2	3,87	97 ± 2
Menalgil B ₆ (Menarini)	250 mg/tableta	–	249,78	100 ± 1
		100	344,32	98 ± 1
		200	462,51	103 ± 2
Nervobión 5000 (Merck)	100 mg/ampolla	–	100,20	100 ± 1
		50	152,06	101 ± 1
		100	196,64	98 ± 3
Pluribios (Madariaga)	10 mg/cápsula	–	9,96	100 ± 1
		5	14,53	97 ± 2
		10	20,04	100 ± 4

^a Composición: **Benerva** (por 1 ml): clorhidrato de tiamina 100 mg; excipientes: glicerol, NaH₂PO₄, NaHCO₃, fenol, agua. **Perfus multivitamínico** (por 3 ml): clorhidrato de tiamina 15 mg, ácido ascórbico 150 mg, retinol palmitato 3000 UI, colecalciferol 300 UI, riboflavina-5-fosfato sódico 4,11 mg, nicotinamida 30 mg, clorhidrato de piridoxina 4,5 mg, D-pantenol 7,5 mg, α-tocoferil acetato 1,5 mg; excipientes: polisorbato 80, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, NaHCO₃, agua. **Hidroxil B₁₂-B₆-B₁** (por tableta): clorhidrato de tiamina 250 mg, clorhidrato de piridoxina 250 mg, hidroxicobalamina 500 mg; excipientes no especificados. **Dynamín** (por tableta): clorhidrato de tiamina 2 mg, cafeína 30 mg, clorhidrato de piridoxina 2,5 mg, cianocobalamina 2 mg, ácido fólico 400 mg, L-glutamina 50 mg; excipientes: sacarosa, manitol, almidón, sílice coloidal, celulosa microcristalina, estearato magnésico, copolímero de metacrilato de butilo, 2-dimetilaminoetilo y metilo (1:2:1), goma arábiga, CaCO₃, E-122, cera blanca, cera carnauba. **Menalgil B₆** (por tableta): clorhidrato de tiamina 250 mg, clorhidrato de piridoxina 250 mg, cianocobalamina 1000 mg; excipientes: celulosa microcristalina, palmitoestearato de glicerol, CaHPO₄, estearato magnésico, alcohol polivinílico, TiO₂, talco, lecitina, E-124, goma xantán, carnoisina. **Nervobión 5000** (por 3 ml): clorhidrato de tiamina 100 mg, clorhidrato de piridoxina 100 mg, cianocobalamina 5 mg; excipientes: alcohol bencílico, NaOH, KCN, agua. **Pluribios** (por cápsula): difosfato de tiamina 10 mg; retinol acetato 5000 IU; riboflavina-5-fosfato sódica 10 mg; nicotinamida 25 mg, ácido ascórbico 200 mg, tocoferol acetato 30 mg; excipientes: celulosa microcristalina, TiO₂, negro brillante, E-102.

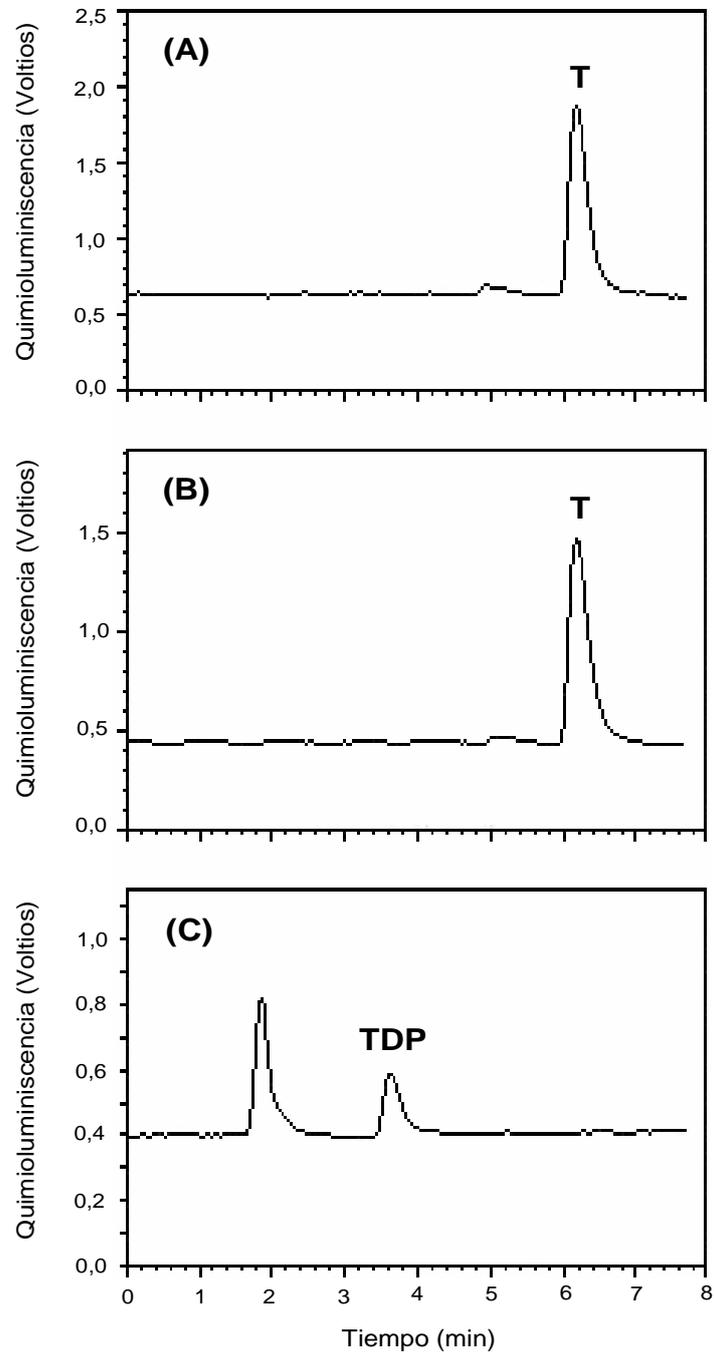


Figura 3.6. Cromatogramas de diferentes fármacos.

(A) Hidroxil B₁₂-B₆-B₁; (B) Menalgil B₆; (C) Pluribios.

3.2.4.2 Análisis de alimentos para bebés

El procedimiento usado para la preparación de las muestras fue similar al descrito por el *Analytical Methods Committee* (56). Lo describiremos brevemente: 10 g de muestra exactamente pesada se introdujeron en un frasco de vidrio ámbar y se le añadieron 25 ml de ácido clorhídrico 0,1 M. La mezcla se homogeneizó agitando durante 1 min y sometiénola a la acción de ultrasonidos durante 10 min. A continuación se calentó en un baño de agua a 90 °C durante 30 min y se dejó enfriar. Entonces se ajustó el pH entre 4 y 4,5 con disolución de acetato sódico 2 M y se añadieron 0,1 g de taka-diastasa. La suspensión se mantuvo a 50 °C en un baño de agua en agitación durante 2 horas y después se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 50 % (peso/volumen) y de nuevo se calentó a 90 °C durante 10 min. Después de enfriar y ajustar el pH a 7 con disolución de hidróxido sódico 5 M, la muestra se transfirió a un matraz aforado de 100 ml y se diluyó con agua ultrapura. Se tomaron alícuotas de esta disolución que se filtraron sucesivamente a través de un papel Whatman nº 4 y de un filtro cromatográfico de nylon de 0,45 µm antes de inyectar en el cromatógrafo.

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos en la aplicación del método propuesto a productos de nutrición para bebés y, como puede observarse, están en excelente acuerdo con los valores declarados. La precisión entre días, correspondiente a cinco días consecutivos, daba un valor medio de RSD de 1,88 %. La Figura 3.7 muestra el cromatograma correspondiente a una de las muestras analizadas.

Tabla 3.5
Determinación de tiamina en alimentos para bebés

<i>Muestra (proveedor)^a</i>	<i>Contenido declarado</i>	<i>Cantidad añadida (µg)</i>	<i>Cantidad encontrada (µg)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Nidina H.A. (Nestlé)	3,60 µg g ⁻¹	–	3,586	100 ± 2
		0,5	4,227	103 ± 4
		1,0	4,474	97 ± 5
		2,0	5,639	101 ± 2
Hero Baby 1 (Hero)	5,23 µg g ⁻¹	–	5,247	100 ± 1
		0,5	5,525	96 ± 2
		1,0	6,091	98 ± 3
		2,0	7,345	102 ± 2

^a Composición: **Nidina H.A.**: proteínas séricas hidrolizadas, aceites vegetales, lactosa, dextrinomaltosa, sales minerales de potasio, cloro, calcio, fósforo, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y yodo, vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, A, riboflavina, B₆, tiamina, ácido fólico, K, biotina, D y B₁₂), taurina, colina, L-arginina, inositol, L-histidina y L-carnitina. **Hero Baby 1**: Suero lácteo desmineralizado, aceites vegetales, leche descremada, lactosa, minerales, lecitina, vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, B₁, B₆, A, B₂, ácido fólico, K, biotina, D₃ y B₁₂), taurina, inositol, colina y carnitina.

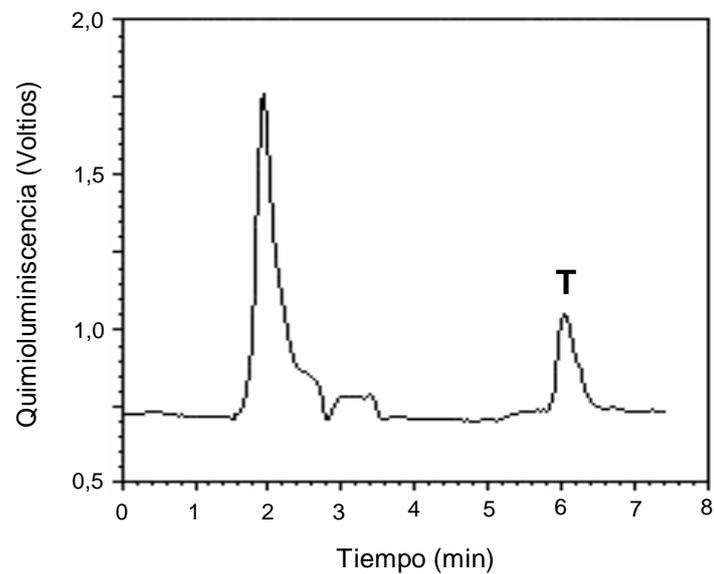


Figura 3.7. Cromatograma de un alimento para bebés (Hero Baby 1).

De todo lo anteriormente expuesto podemos afirmar que las características analíticas del nuevo método son muy satisfactorias en cuanto a precisión y reproducibilidad y comparables en sensibilidad a otros métodos sensibles. Como la mayoría de las vitaminas no dan señal quimioluminiscente con nuestro sistema de detección, o la producen muy débil, el procedimiento propuesto es muy recomendable para la determinación de vitaminas B₁ en el campo farmacéutico y en la industria alimentaria.

3.3 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- R. Marcus, A.M. Coulston in J.G. Hardman, L.E. Limbird (eds.), Goodman and Gilman's, "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*", 10th edition, McGraw-Hill, New York, 2001.
- 2.- C.J. Gubler, in L.J. Machlin (ed.), "*Handbook of vitamins*", Marcel Dekker, New York, 1991, pp 234-276.
- 3.- Y. Itokawa, *J. Appl. Nutrition*, **29** (1977) 5.
- 4.- N.W. Tietz, "*Textbook of Clinical Chemistry*", Saunders Company, Cánada, 1986.
- 5.- H.G.K. Westebrink, *Z. Vitaminforsch*, **13** (1943) 218.
- 6.- E. Hoff-Jorgensen, B. Hansen, *Acta Chem. Scand.*, **9** (1955) 562.
- 7.- R. Patrick y J.F.H. Wright, *Analyst*, **74** (1949) 303.
- 8.- K. Kalinowski, Z. Sykulska, *Acta Polon. Pharm.*, **16** (1959) 111.
- 9.- C.W. Pifer, E.G. Wollish, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, **40** (1951) 609.
- 10.- A. Llopis, *Galencia Acta* (Madrid), **8** (1955) 115.
- 11.- P. kerny, J.P. Billon, F. Bigeard, *Ann. Pharm. Fr.*, **17** (1959) 284.
- 12.- S. Cholvy, *Ann. Pharm. Fr.*, **18** (1960) 138.
- 13.- J.A. Sánchez, *Anal. Real Acad. Farm.*, **13** (1947) 377.

-
- 14.-J. Mativo, *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. A*, **20** (1957) 157.
 - 15.-S.S.M. Hassan, E. Elnemma, *Talanta*, **36** (1989) 1011.
 - 16.-K. Wiesner, *Casopis Ceskenho Lékarnictra*, **57** (1944) 76.
 - 17.-R. Pleticha, *Anal. Chem.*, **24** (1952) 916.
 - 18.-T. Vergara, D. Marín, J. Vera, *Anal. Chim. Acta*, **120** (1980) 347.
 - 19.-K. Kishore, P.N. Moorthy, K.N. Rao, *Indian J. Chem.*, **17** (1979) 206.
 - 20.-G.H. Zhang, T. Imato, Y. Asano, T. Sonoda, H. Kobayashi, N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 1644.
 - 21.-T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, M. Hernández Lozano, *An. Quim., Ser. B*, **78** (1982) 241.
 - 22.-J.K. Edijala, *Analyst*, **104** (1979) 637.
 - 23.-Association of Vitamin Chemist, “*Methods of Vitamin Assay*”, Interscience, New York, 1966.
 - 24.-P. Ortega Barrales, M.L. Fernández-De Córdova, A. Molina-Díaz, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 271.
 - 25.-“*Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*”, 13th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 1980.
 - 26.-B.O. Karlberg, S. Thelander, *Anal. Chim. Acta*, **114** (1980) 129.
 - 27.-N. Grekas, A.C. Calokerinos, *Talanta*, **37** (1990) 1043.

-
- 28.-C. Martínez-Lozano, T. Pérez-Ruiz, V. Tomás, C. Abellán, *Analyst*, **115** (1990) 217.
- 29.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, A. Guillén, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34** (2004) 551.
- 30.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, I. Ibarra, *Talanta*, **39** (1992) 907.
- 31.-J. Martínez Calatayud, C. Gómez Benito, D. Giménez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8** (1990) 667.
- 32.-K. Kusube, K. Abe, O. Hiroshima, Y. Ishiguro, S. Ishikawa, H. Hosida, *Chem. Pharm. Bull.*, **31** (1983) 3589.
- 33.-A.F. Dănet, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, **41** (1994) 2147.
- 34.-H. Chen, J. Zhu, X. Cao, Q. Fang, *Analyst*, **123** (1998) 1017.
- 35.-J.J. Aaron in S.G. Schulman (ed), "*Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications*" (part 3), Wiley, New York, 1993, p 85.
- 36.-J.W. Birks, R.W. Frei, *Trends Anal. Chem.*, **1** (1982) 361.
- 37.-P. Viñas, C. López-Erroz, F.J. Cerdán, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, *Mikrochim. Acta*, **134** (2000) 83.
- 38.-P. Ortega Barrales, M.L. Fernández-De Córdoba, A. Molina-Díaz, *Anal. Chim. Acta*, **376** (1998) 227.
- 39.-P. Ortega Barrales, A. Domínguez Vidal, M.L. Fernández-De Córdoba, A. Molina-Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25** (2001) 619.

-
- 40.-J. López-Flores, M.L. Fernández-De Córdoba, A. Molina-Díaz, *Anal. Chim. Acta*, **535** (2005) 161.
- 41.-M. Kimura, B. Panijpan, Y. Itokawa, *J. Chromatogr.*, **245** (1982) 141.
- 42.-B.L. Lee, H.Y. Ong, C.N. Ong, *J. Chromatogr.*, **567** (1991) 71.
- 43.-S. Sander, A. Hahn, J. Stein, G. Rehner, *J. Chromatogr.*, **558** (1991) 115.
- 44.-G.P. Chernysh, R.P. Poponina, V.I. Buntushkin, *J. Anal. Chem. USSR*, **31** (1976) 1475.
- 45.-C. Zhang, G. Zhou, Z. Zhang, M. Aizawa, *Anal. Chim. Acta*, **394** (1999) 165.
- 46.-Z.H. Song, S. Hou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28** (2002) 683.
- 47.-Z.H. Song, S. Hou, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **47** (2002) 747.
- 48.-J. Du, Y. Li, J. Lu, *Talanta*, **57** (2002) 661.
- 49.-A. Wasiełczuk, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Lett.*, **37** (2004) 3205.
- 50.-J.H. Fendler, "*Membrane Mimetic Chemistry*", Wiley, New York, 1982.
- 51.-T.E. Riehl, C.L. Malehorn, W.L. Hinze, *Analyst*, **111** (1986) 931.
- 52.-P. Viñas, C. López-Erroz, N. Balsalobre, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. B*, **757** (2001) 301.

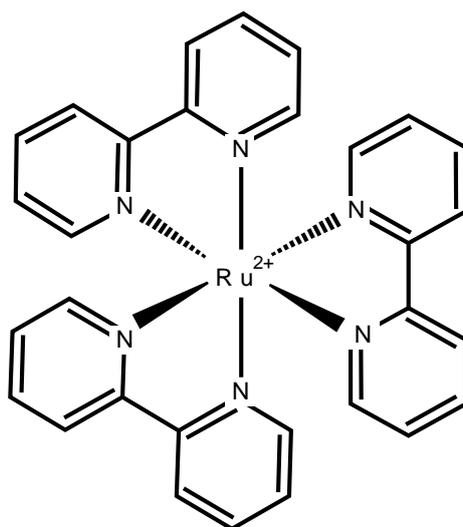
- 53.-P. Viñas, C. López-Erroz, N. Balsalobre, M. Hernández-Córdoba, *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003) 3222.
- 54.-F. Batifoulier, M.-A. Verny, C. Besson, C. Demigné, C. Rémésy, *J. Chromatogr. B*, **816** (2005) 67.
- 55.-M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized Guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **74** (2002) 835.
- 56.-Analytical Methods Committee, *Analyst*, **125** (2000) 353.

PARTE B

QUIMIO-LUMINISCENCIA FOTOGENERADA DEL RUTENIO(II)TRIS(2,2'-BIPYRIDILO)

QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOGENERADA DEL RUTENIO(II)TRIS(2,2'-BIPIRIDILO)

El estudio de la luminiscencia de los complejos de los iones del rutenio con el bipyridilo es un tema que ha atraído la atención de numerosos investigadores desde hace varias décadas (1, 2)*. Las sales de Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, fueron sintetizadas por primera vez en 1936, año en el que se publicó un trabajo en el que se recogen también las propiedades ópticas de las mismas (3).

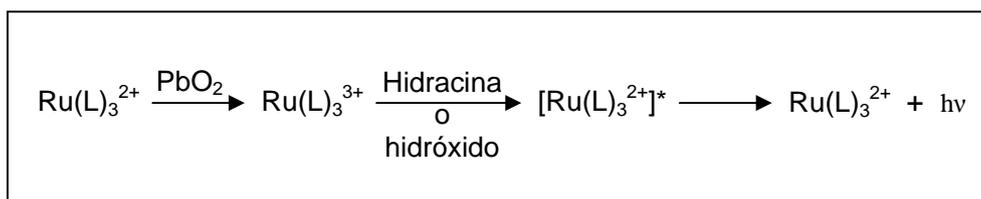


* La bibliografía de este apartado se encuentra en la página 196.

Las disoluciones de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ eran capaces de emitir luminiscencia a 580 nm al excitarlas a 460 nm y esta fluorescencia natural sirvió de base para su empleo como indicadores fluorescentes redox (4, 5).

Sin embargo, se debe a Hercules y Lytle la primera comunicación acerca de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ inducida químicamente (6, 7).

En esos estudios dirigidos a evaluar la capacidad de emitir luminiscencia de varios complejos de rutenio (II) con ligandos polipiridinas (L), se comprobó que si el ligando era el bipyridilo se podía producir, en condiciones adecuadas, el siguiente proceso:



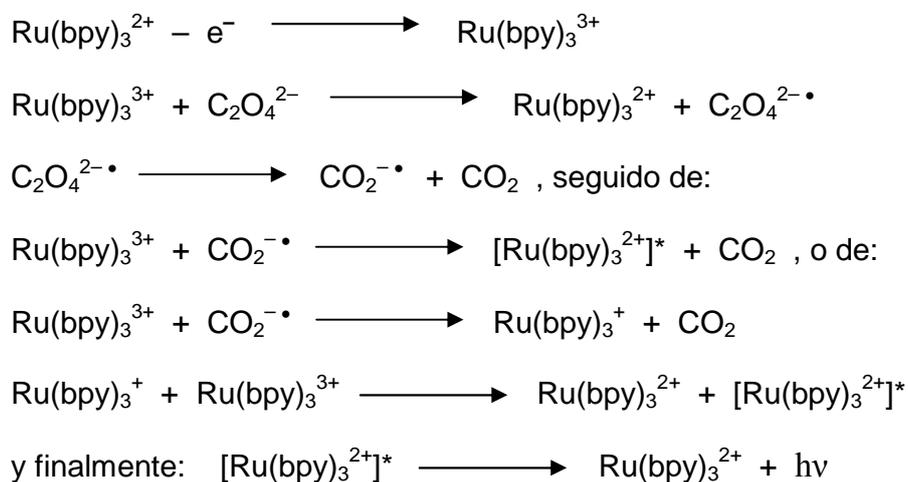
dando lugar a una intensa luminiscencia naranja.

Cuando el ligando L era diferente (entre los ensayados se encontraba la 1,10-fenantrolina) el proceso de emisión era tan poco intenso que su detección era difícil. Hay que resaltar que la quimioluminiscencia emitida presentaba el máximo de emisión a 610 nm, longitud de onda que corresponde prácticamente con el máximo de emisión del espectro de fosforescencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (8). En estos trabajos previos de quimioluminiscencia (6, 7) los autores comprobaron que era posible emplear varios de los

diferentes oxidantes habitualmente utilizados (una notable excepción es el peróxido de hidrógeno) para el paso inicial al $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Sin embargo, en relación con el reductor, necesario en las etapas posteriores, no son eficaces muchos de los reductores comunes (SO_3^{2-} , $\text{Ti}(\text{III})$, $\text{Sn}(\text{II})$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, etc.) e incluso en los casos en que se utilizaba la hidracina los resultados variaban notablemente dependiendo de la concentración de reactivo, así como de las condiciones experimentales. A partir de esas primeras observaciones (6) se han realizado gran número de estudios acerca de la quimioluminiscencia del $\text{Ru}(\text{II})$ -(bipiridilo)₃ y se puede considerar que el mecanismo general corresponde a una reacción entre $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ para producir $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$ y en ese estado excitado el complejo puede emitir radiación naranja al pasar al estado fundamental.

El $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ es una especie estable en disolución. En cuanto a los complejos $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ se pueden electrogenerar por reducción a -1,3 V y oxidación a 1,3 V, respectivamente. Por otra parte estas especies pueden formarse, tal como se ha comentado, con reacciones apropiadas con especies oxidantes o reductoras.

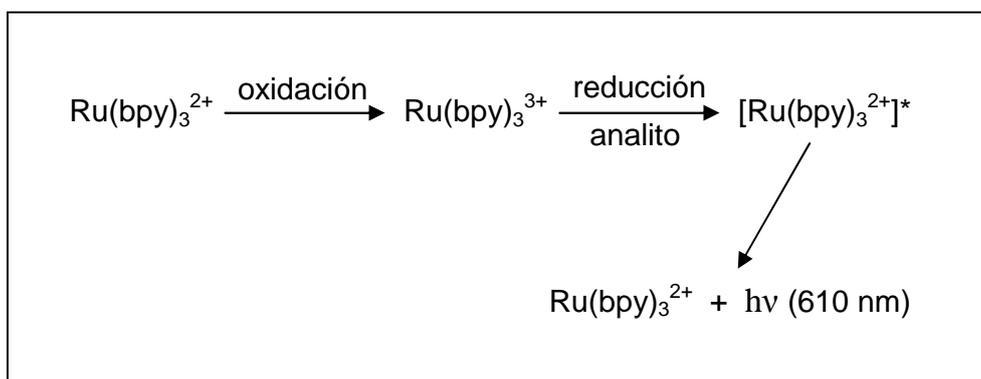
En el caso de que el reductor sea el oxalato (una de las especies más estudiadas) el mecanismo propuesto es el siguiente:



Diversos autores, que han realizado estudios espectroscópicos sobre estas especies, coinciden en afirmar que la especie excitada responsable de la emisión luminosa es el estado triplete, el cual se alcanza a través de un proceso de transferencia de carga entre el ligando y el ión metálico. Así, la quimioluminiscencia naranja brillante observada a partir del $[\text{Ru(bpy)}_3^{2+}]^*$ es un raro ejemplo de fosforescencia inducida químicamente en disolución.

Aunque el descubrimiento de la quimioluminiscencia del Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo) se remonta a unas cuatro décadas, su utilidad sólo había sido demostrada para un limitado número de aplicaciones analíticas, hasta épocas recientes. Después de un lento crecimiento, en la actualidad se publican una media de más de veinte artículos por año sobre el uso del Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo) en la

determinación de diversos analitos (2). En todos los casos, sin embargo, la metodología general responde a la siguiente secuencia:



Es decir, en todas las aplicaciones de esta quimioluminiscencia primero se produce el reactivo oxidante, Ru(bpy)_3^{3+} , y a continuación la reducción de esa especie con la sustancia a analizar, para producir la emisión luminosa. Independientemente del método de oxidación seleccionado, la intensidad de quimioluminiscencia depende de la eficiencia y mecanismo con que tenga lugar la reducción, por el propio analito, del Ru(bpy)_3^{3+} para dar $[\text{Ru(bpy)}_3^{2+}]^*$. Finalmente la medida de la intensidad de luz emitida se relacionará con la concentración de analito. El notable aumento del empleo de este sistema quimioluminiscente se ha atribuido a su capacidad para producir luz sin desoxigenación y operando en un medio acuoso.

Entre los métodos empleados para obtener el reactivo oxidante activo Ru(bpy)_3^{3+} se incluyen los electroquímicos, los químicos y los fotoquímicos, cada uno con sus peculiaridades y

consiguiente repercusión en la eficiencia de la quimioluminiscencia final.

La **generación electroquímica** es, con notable diferencia, el método más frecuentemente utilizado para obtener $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ a partir de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Se sigue alguno de los procedimientos siguientes:

- a) Oxidación electroquímica
- b) Electroquimioluminiscencia “in situ”

En el primero de los métodos el reactivo se genera en un lugar diferente al de la interacción con el analito, mientras que en el segundo tanto la producción del reactivo como la subsiguiente quimioluminiscencia tienen lugar dentro de la célula electroquímica.

Las primeras aplicaciones analíticas del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ se remontan a 1978 cuando se empleó en la determinación de algunos compuestos farmacéuticos (9). Incluso, años más tarde, se comercializó un analizador voltamétrico para oxidar el reactivo para aplicaciones en análisis por inyección en flujo y en HPLC (10, 11). Otros tipos de generación electroquímica han sido propuestos posteriormente, movidos por la intención de encontrar condiciones experimentales más favorables y eliminar algunos de los inconvenientes que la generación electroquímica provoca (12-16).

Mucho más común es el método de generación “in situ” de electroquimioluminiscencia, tema del que se han publicado varias revisiones (17-20) y que ha sido aplicado al análisis de un importante número de sustancias (1, 2) tales como oxalato, ácidos orgánicos, aminas, aminoácidos y proteínas, etc. La generación electroquímica

“in situ” ha sido utilizada en el 90 % de las aplicaciones analíticas publicadas hasta 1998 (1).

Para la **generación química** de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ a partir de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se han conseguido resultados eficientes con los oxidantes ácido nítrico concentrado, dióxido de plomo, cerio (IV), cloro y permanganato (3, 6, 20, 21). Este tipo de generación del reactivo ha sido mucho menos utilizado en aplicaciones analíticas que el método electroquímico (22-27), quizá motivado por la dificultad que presenta producir un suministro constante y estable de reactivo (1). Sin embargo, en las publicaciones recientes aparecen un 30 % de trabajos en los que se emplea la generación química utilizando como oxidantes permanganato potásico, sulfato de cerio (IV) o dióxido de plomo. Este desplazamiento hacia la generación química puede justificarse por la relativa simplicidad de la instrumentación requerida y el aumento de la tendencia a que el reactivo se una con el oxidante lo más cerca posible de la célula de detección.

Yamazaki y colaboradores (28) describieron una nueva forma de **generar el reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ por fotooxidación del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en presencia de peroxidisulfato**, y este sistema fue aplicado a la detección post-columna en HPLC para detectar alcoholes, aminas y otros derivados (28-31), aunque generalmente en estos casos se aplica la fotogeneración externa del reactivo. La fotogeneración en línea ha sido seleccionada por nuestro Grupo de Investigación para la evaluación de las mezclas cisteína–cistina y del antiarrítmico amiodarona en sistemas de inyección en flujo (32, 33).

Las aplicaciones analíticas de la emisión quimioluminiscente del Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) han sido ampliadas a sustancias que normalmente no reaccionan con el citado reactivo, pero que pueden derivatizarse para dar especies reactivas que interaccionan de forma eficaz y conducen a la quimioluminiscencia. Estos procesos de derivatización se pueden producir a través de oxidaciones químicas o electroquímicas.

Nuestro Grupo de Investigación ha abordado en los últimos años la generación fotoquímica de Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) en un sistema de flujo donde en ocasiones reactivo, analito y disolución reguladora en presencia de peroxidisulfato pasan a través de un fotorreactor de luz ultravioleta (254 nm) antes de alcanzar el detector. Este método novedoso presenta unas ventajas comparables a la metodología electroquímica "in situ". En los sistemas propuestos, los analitos pueden ser derivatizados oxidativamente para producir quimioluminiscencia con el reactivo, que a su vez también se ha generado fotoquímicamente en un mismo sistema dinámico (34-36).

La emisión quimioluminiscente del Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo) como sistema de detección en separaciones cromatográficas y por electroforesis capilar ha sido aplicada en numerosas ocasiones por su excelente sensibilidad y, puesto que en la mayoría de los casos el reactivo se generaba electroquímicamente, en los últimos diez años uno de los focos de atención de los investigadores ha sido mejorar el diseño de células electroquímicas para la generación "in situ" de Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo), adecuadas para su incorporación a HPLC y en sistemas de electroforesis capilar (37-45). Los problemas que surgen más frecuentemente se refieren a la pérdida de sensibilidad

debida a la dilución en el proceso de electrogeneración, a la imposibilidad de mantener limpio el electrodo de trabajo, etc. Por este motivo el método más sencillo y común para acoplar la quimioluminiscencia de Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo) a separaciones cromatográficas es la generación electroquímica externa. Otros sistemas utilizados que mejoran la señal incluyen desgasificadores antes del detector, eliminación, cuando sea posible, del metanol como fase móvil para disminuir la radiación fondo, etc.

En otros casos se ha propuesto como alternativa la generación química de la especie de Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo), por ejemplo con permanganato potásico; en el caso de alcaloides, el reactivo oxidante actúa también oxidando los alcaloides, que así conducen a la quimioluminiscencia (46). Yamazaki y col., siguiendo las directrices de sus trabajos previos, utilizan la generación fotoquímica del reactivo, generalmente preparado por fotólisis externa e incorporado después en un sistema de flujo para detectar diferentes especies separadas por HPLC (28-31, 47).

En esta parte de la Tesis se presentan diversos estudios relacionados con la quimioluminiscencia del Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo) en los que se genera la forma oxidada mediante un proceso fotoquímico y la emisión se produce cuando se mezcla el producto de la fotólisis con el analítico o con un derivado del mismo, también formado por fotólisis, en un sistema dinámico. Se han realizado investigaciones con los analitos siguientes: agentes aminopolicarboxílicos (EDTA y compuestos relacionados), el antiarrítmico amiodarona y su metabolito desetilamiodarona y pesticidas del grupo de los N-metilcarbamatos.

Así, los estudios realizados se presentan en los Capítulos 4, 5 y 6 de la Tesis, que constituyen la parte B de la misma.

El Capítulo 4 se refiere a los ácidos aminopolicarboxílicos. En él inicialmente se investiga el comportamiento del EDTA con el Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) fotogenerado en un sistema de inyección en flujo, considerando la influencia de diversas variables y proponiendo un nuevo método analítico que permita la determinación segura y rápida de la especie indicada.

Consecuencia de estos estudios ha sido la posterior separación de ácidos aminopolicarboxílicos, concretamente EDTA, NTA, EDDS y DTPA, por HPLC con detección quimioluminiscente. La finalidad de estas investigaciones fundamentalmente era encontrar un método muy sensible y seguro para evaluar la mezcla de estos ácidos en muestras reales, concretamente en aguas, problemática de gran interés.

El Capítulo 5 corresponde a la separación y determinación de amiodarona y de su metabolito activo, la desetilamiodarona, especies de gran interés terapéutico. Se ha realizado un estudio de la quimioluminiscencia de estas sustancias con el Ru(bpy)₃³⁺ fotogenerado, que se aplica a la detección post-columna después de la separación de las mismas por HPLC.

En el Capítulo 6 se expone el comportamiento del Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) cuando actúa con los pesticidas del grupo N-metilcarbamatos (propoxur, carbaril, carbofuran, promecarb e isoprocarb) previamente fotolizados, proceso que provoca una intensa quimioluminiscencia. Se seleccionó el propoxur como modelo para realizar un exhaustivo estudio en un sistema de

inyección en flujo, que incluyera la influencia de los diferentes parámetros químicos y dinámicos sobre la quimioluminiscencia. Una consecuencia importante de estas investigaciones ha sido la separación y determinación de los distintos pesticidas mediante HPLC y detección quimioluminiscente gracias a la descomposición fotoquímica post-columna de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 1.
- 2.- B.A. Gorman, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Analyst*, **131** (2006) 616.
- 3.- F.H. Burstall, *J. Chem. Soc.*, (1936) 173.
- 4.- B. Kratochvil, D.A. Zatko, *Anal. Chem.*, **36** (1964) 527.
- 5.- B. Kratochvil, M.C. White, *Anal. Chim. Acta*, **31** (1964) 528.
- 6.- D.M. Hercules, F.E. Lytle, *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (1966) 4745.
- 7.- F.E. Lytle, D.M. Hercules, *Photochem. Photobiol.*, **13** (1971) 123.
- 8.- F.E. Lytle, D.M. Hercules, *J. Am. Chem. Soc.*, **91** (1969) 253.
- 9.- W.K. Nonidez, D.E. Leyden, *Anal. Chim. Acta*, **96** (1978) 401.
- 10.- J.B. Noffsinger, N.D. Danielson, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 865.
- 11.- J.B. Noffsinger, N.D. Danielson, *J. Chromatogr.*, **387** (1987) 520.
- 12.- S.N. Brune, D.R. Bobbitt, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 166.
- 13.- S.N. Brune, D.R. Bobbitt, *Talanta*, **38** (1991) 419.
- 14.- K. Uchikura, *Chromatography*, **11** (1990) 102.
- 15.- K. Uchikura, M. Kirisawa, *Chromatography*, **15** (1994) 232.

-
- 16.-K. Tsukagoshi, K. Miyamoto, E. Saiko, R. Nakajima, T. Hara, K. Fujinaga, *Anal. Sci.*, **13** (1997) 639.
- 17.-F. Bolletta, S. Bonafede, *Pure Appl. Chem.*, **58** (1986) 1229.
- 18.-J. González Velasco, *Bull. Electrochem.*, **10** (1994) 29.
- 19.-A.W. Knight, G.M. Greenway, *Analyst*, **119** (1994) 879.
- 20.-W.Y. Lee, *Mikrochim. Acta*, **127** (1997) 19.
- 21.-I. Rubistein, C.R. Martin, A.J. Bard, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 1580.
- 22.-G.A. Barbieri, G.B. Bonino, *Rend. Accad. Naz. Lin. Clas. Sci. Fis. Mat. Nat.*, **8** (1948) 561.
- 23.-Z. He, X. Liu, Q. Luo, X. Yu, Y. Zeng, *Anal. Sci.*, **11** (1995) 415.
- 24.-N.W. Barnett, T.A. Bowser, R.D. Gerardi, B. Smith, *Anal. Chim. Acta*, **318** (1996) 309.
- 25.-N.W. Barnett, T.A. Bowser, R.A. Russell, *Anal. Proc.*, **32** (1995) 57.
- 26.-Z. He, H. Gao, L. Yuan, Q. Luo, Y. Zeng, *Analyst*, **122** (1997) 1343.
- 27.-J.M. González, G.M. Greenway, T. McCreedy, S. Qijun, *Analyst*, **125** (2000) 765.
- 28.-O. Shinozaki, N. Kunezaki, S. Yamazaki, T. Tanimura, *Chromatography*, **13** (1992) 275.
- 29.-S. Yamazaki, K. Ozaki, K. Saito, T. Tanimura, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **18** (1995) 68.

-
- 30.-S. Yamazaki, R. Chiba, K. Uchikura, T. Tanimura, *Chromatography*, **16** (1995) 322.
- 31.-S. Yamazaki, T. Shinozaki, T. Tanimura, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **21** (1998) 315.
- 32.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Talanta*, **58** (2002) 987.
- 33.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, J. Martín, E. Ruiz, *J. Pharm. Biom. Anal.*, **42** (2006) 143.
- 34.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **476** (2003) 141.
- 35.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst*, **127** (2002) 1526.
- 36.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **541** (2005) 69.
- 37.-K. Saito, S. Murakami, S. Yamazaki, A. Muromatsu, S. Hirano, T. Takahashi, K. Yolota, T. Nojiri, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 43.
- 38.-C. Yi, P. li, Y. Tao, X. Chen, *Microchim. Acta*, **147** (2004) 237.
- 39.-X. Chen, C. Yi, M. Li, X. Lu, Z. Li, P. Li, X. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **466** (2002) 79.
- 40.-X. Chen, W. Chen, Y. Jiang, L. Jia, X. Wang, *Microchem. J.*, **59** (1998) 427.

-
- 41.-H.P. Hendrickson, P. Anderson, X. Wang, Z. Pittman, D.R. Bobbitt, *Microchem. J.*, **65** (2000) 189.
- 42.-D.R. Bobbitt, W.A. Jackson, H.P. Hendrickson, *Talanta*, **46** (1998) 565.
- 43.-X. Wang, D.R. Bobbitt, *Talanta*, **53** (2000) 337.
- 44.-X. Wang, D.R. Bobbitt, *Anal. Chim. Acta*, **383** (1999) 213.
- 45.-K. Tsukagoshi, N. Okuzono, R. Nakajima, *J. Chromatogr. A*, **958** (2002) 283.
- 46.-C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, K.M. Essery, *Aust. J. Chem.*, **57** (2004) 1001.
- 47.-S. Yamazaki, K. Ban'í, T. Tanimura, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **22** (1999) 487.

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍlicos CON Ru(III)TRIS(2,2'-BIPIRIDILO) FOTOGENERADO

CAPÍTULO 4
DETERMINACIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE ÁCIDOS
AMINOPOLICARBOXÍLICOS CON Ru(III)TRIS(2,2'-BIPIRIDILO)
FOTOGENERADO

	<u>Página</u>
4.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	205
4.2. ESTUDIO DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DEL EDTA CON EL Ru(bpy) ₃ ³⁺ FOTOGENERADO EN UN SISTEMA DE FLUJO.....	213
4.2.1. Optimización de las condiciones experimentales	215
4.2.2. Determinación de EDTA en un sistema de inyección en flujo	217
4.2.2.1. Aplicaciones analíticas.....	220
4.3. DETERMINACIÓN FI-QUIMIOLUMINISCENTE DE OTROS ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS.....	225
4.4. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS POR HPLC	227
4.4.1. Separación cromatográfica.....	231

	<u>Página</u>
4.4.2. Gráficas de calibrado y características del método.....	234
4.4.3. Efecto de los iones metálicos	236
4.4.4. Aplicación del método al análisis de ácidos aminopolicarboxílicos en muestras reales.....	239
4.4.4.1. Determinación de APCAs en aguas.....	239
4.4.4.2. Determinación de EDTA en salsas	242
4.5. BIBLIOGRAFÍA.....	246

DETERMINACIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS CON Ru(III)TRIS(2,2'-BIPIRIDILO) FOTOGENERADO

4.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los ácidos aminopolicarboxílicos (APCAs) tienen gran capacidad para formar complejos solubles en agua con iones divalentes y trivalentes (1, 2)*, razón por la que estos compuestos sintéticos tienen un amplio número de aplicaciones industriales y domésticas.

El ácido aminopolicarboxílico más importante es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un reactivo analítico bien conocido y ampliamente utilizado. Forma complejos solubles en agua con la mayoría de los iones metálicos, de ahí su uso en Química Analítica como valorante y agente enmascarante.

El EDTA y el ácido nitrilotriacético (NTA), compuestos relacionados, fueron sintetizados y producidos por *I.G. Farbenindustrie* a mediados de los años treinta y nombrados como Trilón A y Trilón B, respectivamente (2). Puesto que formaban

* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 246.

compuestos estables con calcio y magnesio, se sugirió su empleo para ablandar el agua y como agentes auxiliares en tintorería por su capacidad de complejar metales pesados. Los estudios teóricos sobre este tipo de complejantes de características singulares se iniciaron a principios de los años cuarenta por Bejrrum y Leden (2). Un poco más tarde Schwarzenbach publicó una serie de trabajos y una importante monografía (1) y West (3) describió 78 compuestos similares.

En esta Tesis hemos centrado nuestras investigaciones en los siguientes ácidos aminopolicarboxílicos: ácido nitrilotriacético (NTA) ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido S,S-etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), cuyas fórmulas aparecen en la Figura 4.1.

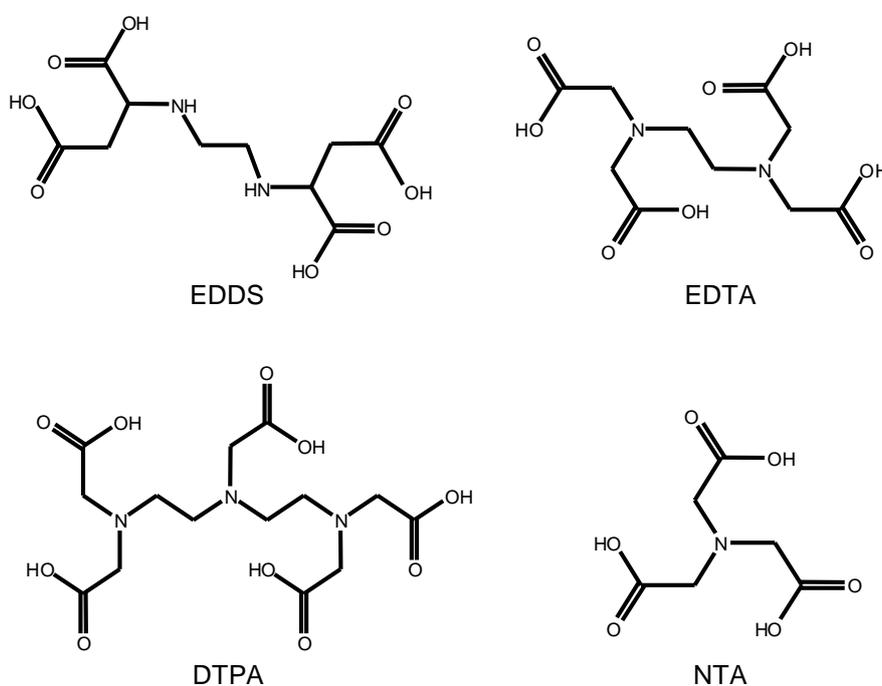


Figura 4.1. Estructuras de EDDS, EDTA, DTPA y NTA.

En la actualidad, los ácidos aminopolicarboxílicos no sólo tienen interés como reactivos analíticos, sino que son ampliamente utilizados en diversos campos, destacando sus aplicaciones industriales, farmacéuticas y agrícolas. La aplicación industrial de estos agentes incluye la producción de metales, acabados textiles, manufactura de pieles, gomas, fármacos, polímeros, pulpa y papel (4, 5). Además, estos compuestos se adicionan a los fertilizantes para asegurar que micronutrientes tales como Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} permanezcan solubles bajo las condiciones de los suelos alcalinos (6); se utilizan para sustituir a los fosfatos en los detergentes (7) y para inhibir el oscurecimiento enzimático de los alimentos mediante la complejación del cobre de la enzima polifenoloxidasasa (8).

Debido a que los APCAs se aplican fundamentalmente en medios acuosos, su uso generalizado conduce, como resultado final, a su liberación en el medio ambiente, siendo muy importante su presencia en aguas residuales y experimentando procesos de degradación de diferentes tipos (9). Los procesos de transformación de los APCAs en el medio ambiente han sido estudiados en profundidad para los dos compuestos más ampliamente utilizados, el EDTA y el NTA. Se ha llegado a la conclusión de que mientras el NTA se degrada por acción bacteriana tanto en condiciones aerobias como anaerobias, el EDTA es mucho más resistente a la biodegradación medioambiental (10).

Una vez liberados en el medio ambiente los APCAs pueden afectar a la distribución y transporte de los metales en los ecosistemas acuáticos. Así, en el caso del EDTA, resistente a la biodegradación, se ha demostrado que en las aguas naturales existe en forma de iones negativamente cargados, con protones o con

iones metálicos, y que no es adsorbido por los ácidos húmicos, sílice, caolín y sedimentos de los ríos. Su fuerte capacidad quelatante puede jugar un importante papel en la distribución y transporte de los metales pesados en medios acuáticos, además de producir un aumento de la concentración de estos metales en los citados medios, debido a dos causas, primero su capacidad para disolver a éstos desde los sedimentos en que se encuentran y segundo impedir su precipitación.

Los efectos que los compuestos aminopolicarboxílicos ejercen sobre la salud no están determinados, aunque se cree que no tienen carácter tóxico, por ello se utilizan adicionados a mayonesas, ensaladas, champiñones y carnes en conserva, aprovechando su capacidad de secuestrar los iones metálicos. Así, el EDTA se adiciona, frecuentemente en forma de sal disódica o calcio disódica a las formulaciones farmacéuticas o en alimentos a causa de su estabilidad, compatibilidad y baja toxicidad. En los productos farmacéuticos mejora la acción de preservativos y antibacterianos y estabiliza la acción de los antioxidantes (11). En alimentos (por ejemplo verduras, envasados, encurtidos, setas en conserva, mayonesas y ensaladas aliñadas) el EDTA se adiciona con la finalidad de impedir su deterioro, preservar el color, olor y sabor. Su acción se basa en la complejación de los iones metálicos que catalizan reacciones de oxidación y en la inactivación de enzimas que causan oscurecimiento (oscurecimiento enzimático). Por todo ello, el uso de EDTA y otros agentes quelatantes del mismo tipo está estrictamente regulado en Estados Unidos por la *U.S. Food and Drug Administration* y otras importantes Agencias.

Otras aplicaciones del EDTA están relacionadas con los extensos estudios encaminados a encontrar compuestos de hierro que puedan ser incorporados a alimentos enriquecidos. El complejo EDTA-Fe(III) tiene ciertas ventajas frente a otras formas de aporte de hierro, principalmente su alta biodisponibilidad; se ha comprobado que la absorción por el organismo de este hierro es la misma si se administra el quelato en disolución o mezclado en los alimentos. Además, el compuesto no produce efectos adversos sobre el color o el sabor de los alimentos. Sin embargo, una vez que el hierro ha sido absorbido (lo que se mejora cuando los alimentos contienen ácido ascórbico) el EDTA puede formar complejos con otros micronutrientes, conduciendo eventualmente a deficiencias nutricionales al dejar a otros metales no disponibles para la absorción.

En la industria farmacéutica el EDTA además de utilizarlo como antioxidante, se emplea para evitar el envenenamiento con metales pesados (12). En estos casos el EDTA se añade generalmente como sal disódica y funciona complejando los metales pesados que muchas veces son catalizadores de oxidaciones (13).

El amplio uso del EDTA queda patente en el consumo anual de esta sustancia. Como ejemplo podemos atender a las cifras referidas a 1999 en Europa y en Estados Unidos, año en que se consumieron 35000 toneladas y 50000 toneladas de EDTA, respectivamente.

De lo anteriormente expuesto, queda claro el impacto ambiental de los APCAs y la necesidad de disponer de métodos

sensibles y selectivos para su determinación en diferentes tipos de muestras reales.

El EDTA ha sido analizado utilizando diferentes métodos analíticos, los cuales han sido revisados por Sillanpää y Sihvonen (14). La determinación volumétrica es comúnmente aplicada a productos farmacéuticos (15), aunque métodos espectrofotométricos (16, 17), polarográficos (18), polarografía diferencial de impulsos (19), polarografía de onda cuadrada (20), voltametría de redisolución (21), valoraciones catalíticas (22, 23), fluorimetría (24) y electroforesis capilar (25) han sido utilizados. Dentro de las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida de alta resolución (26-28) es más conveniente y preferida a la cromatografía de gases (14, 29) ya que en este último caso el EDTA requiere la conversión previa en ésteres alquílicos para conseguir la volatilidad. Recientemente ha sido propuesto un sensor quimioluminiscente para la determinación de EDTA (30).

También el análisis por inyección en flujo se ha empleado para la evaluación de EDTA, siguiendo diferentes estrategias. Así, se ha utilizado un electrodo de carbono trabajando a 1,5 V frente a E.C.S. para la detección amperométrica (31) y un electrodo indicador de alambre de cobre para la detección potenciométrica (32). También se ha aprovechado el efecto acelerante que ejerce el EDTA sobre la velocidad de la reacción redox del Cu(II) con el Fe(II) en presencia de neocuproína para la determinación espectrofotométrica indirecta del EDTA en un sistema FI (16). El efecto inhibitor del EDTA sobre la acción catalítica del Cu(II) en la oxidación de la hidrazona de la 2,2'-dipiridil cetona por el peróxido de hidrógeno ha sido utilizado para su determinación fluorimétrica (33).

Muchos de los métodos empleados en la determinación de EDTA han sido aplicados a otros ácidos aminopolicarboxílicos; los primeros registrados fueron los volumétricos, espectrofotométricos y electroquímicos (14), aunque las diferentes formas de la cromatografía han desplazado a estos métodos. La cromatografía de gases utilizando ionización con llama, espectrometría de masas y detectores específicos de nitrógeno ha sido aplicada (14, 34-38), pero como antes comentábamos, estos métodos requieren la conversión de los APCAs en ésteres metílico, etílico, propílico o butílico para hacerlos volátiles, lo que implica un procedimiento de preparación muy laborioso y lento (14).

En los métodos de cromatografía líquida, la separación de los APCAs se realiza habitualmente con columnas de fase reversa o por cromatografía iónica. En el caso de la técnica en fase reversa generalmente se añade un reactivo adecuado para formar un par iónico a la fase móvil para convertir el analito en un componente neutro (39, 42), mientras que en el caso de la cromatografía iónica los APCAs son ionizados a aniones polivalentes que presentan alta afinidad con resinas intercambiadoras de iones (43, 44).

Los métodos de detección en HPLC más utilizados son la espectrofotometría en el ultravioleta de los complejos formados entre los analitos, actuando como ligandos, y los iones metálicos Fe(III) o Cu(II) (14, 40-44). En estos casos, otros iones metálicos presentes en la muestra pueden competir para formar quelatos y, por tanto, causar interferencias. La detección amperométrica empleando electrodos de pasta de carbón ha sido propuesta por Dai y Helz (45) para determinar APCAs en su forma ácida. Alta sensibilidad se ha conseguido con detección fluorescente, después de una reacción

post-columna con formación de compuestos ternarios con lutecio y 8-hidroxiquinoleína (46), y con la aplicación de la espectrometría de masas (27) o ICP–MS (26).

Ya se han comentado las ventajas que la detección quimioluminiscente puede aportar en las separaciones por HPLC en términos de sensibilidad y especificidad. Asimismo, nos hemos centrado en esta parte de la Tesis en la aplicación de la quimioluminiscencia del Ru(II)tris(2,2'-bipiridilo), sistema de detección que hasta la fecha no se ha utilizado con los APCAs, excepto para el ácido iminodiacético, usando en este caso la electroluminiscencia (47). Con estos antecedentes la meta de estas investigaciones fue desarrollar un método analítico para APCAs aplicable a una amplia variedad de muestras y capaz de alcanzar límites de detección muy bajos para el análisis de concentraciones sub-micromolares. Para conseguir este objetivo hemos escogido la detección quimioluminiscente del Ru(bpy)₃²⁺; en un sistema post-columna el Ru(bpy)₃³⁺ generado por oxidación fotoquímica “on-line” del Ru(bpy)₃²⁺ con peroxidisulfato reaccionaría con los ácidos aminopolicarboxílicos procedentes de la columna cromatográfica para dar una intensa quimioluminiscencia.

Como paso previo, en estos estudios era imprescindible investigar de forma exhaustiva el comportamiento de los APCAs seleccionados con el sistema QL mencionado. Dada la importancia del EDTA hemos realizado los estudios con esta especie, tomada como modelo para conseguir optimizar todas las variables implicadas en el proceso de emisión quimioluminiscente.

En la bibliografía queda constancia de que el EDTA no produce quimioluminiscencia con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, excepto cuando está presente un oxidante potente, tal como el Ce(IV) (30); este oxidante probablemente juega un importante papel: oxidar el complejo de Ru(II) a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ y oxidar el EDTA formando radicales intermedios de suficiente energía para reaccionar con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, como ocurre con otros ácidos carboxílicos (48), para generar la emisión QL. Sin embargo, nosotros hemos comprobado que se produce una fuerte quimioluminiscencia cuando $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, generado por fotooxidación en línea del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ con peroxidisulfato, se mezclaba con EDTA, luminiscencia que se podía emplear para la determinación de EDTA en un sistema de inyección en flujo, o utilizar como sistema de detección en cromatografía líquida.

4.2 ESTUDIO DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA DEL EDTA CON EL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ FOTOGENERADO EN UN SISTEMA DE FLUJO

Con el fin de optimizar todas las variables implicadas en el proceso de emisión quimioluminiscente se diseñó un sistema FI adecuado para conseguir la máxima señal posible.

En la configuración presentada en la Fig. 4.2 se ha seleccionado trabajar en el modo reverso con el fin de economizar en lo posible el gasto de reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

La máxima señal quimioluminiscente se obtenía cuando las corrientes de muestra y reactivos se mezclaban dentro de la célula de flujo.

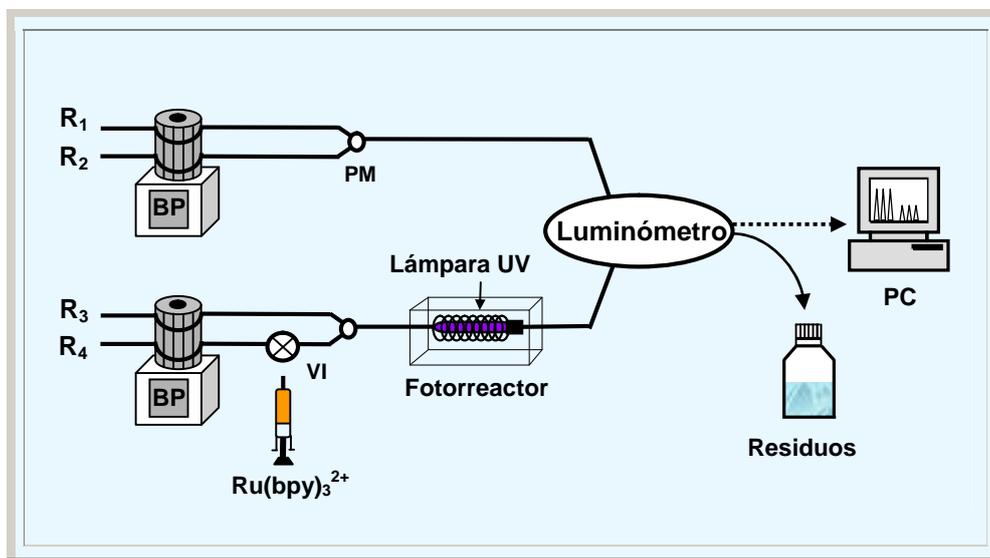


Figura 4.2. Esquema FI para la determinación de EDTA.

R_1 = muestra ($1,2 \text{ ml min}^{-1}$); R_2 = disolución reguladora fosfato 80 mM de pH 6,8 ($0,9 \text{ ml min}^{-1}$); R_3 = peroxidisulfato 1,5 mM y disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7 ($1,4 \text{ ml min}^{-1}$); R_4 = agua ($1,4 \text{ ml min}^{-1}$); volumen de inyección = $235 \mu\text{l}$ de $Ru(bpy)_3^{2+}$ 2 mM.

El sistema FI utiliza dos bombas peristálticas Gilson Minipuls 3 para bombear las disoluciones de reactivos. La disolución de $Ru(bpy)_3^{2+}$ se inyecta con una válvula de inyección Omnifit. La célula de flujo está construida con cuarzo e incorpora tres puertas (dos de entrada y una de salida) que permiten una mezcla eficaz de reactivos dentro de la misma, mejorando el rendimiento y eficacia de la señal quimioluminiscente. La medida de quimioluminiscencia se realiza con un luminómetro Camspec CL-2 unido al espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2 con la finalidad de

utilizar su software para la adquisición y control de datos. El fotorreactor consiste en un tubo de PTFE arrollado helicoidalmente a una lámpara de mercurio de baja presión que trabaja a 6 W, cuya principal línea espectral es a 254 nm.

4.2.1 Optimización de las condiciones experimentales

Se realizaron una serie de estudios dirigidos a establecer las condiciones de reacción más convenientes para la determinación FI-QL de EDTA. Las condiciones para la fotogeneración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ utilizadas han sido: $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2 mM y peroxidisulfato 1,5 mM a pH 5,7, que ya habían sido optimizadas en investigaciones realizadas anteriormente, y con las que se consigue una alta eficiencia de fotogeneración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ con tiempos de irradiación del orden de 8 s (49).

La influencia de diferentes variables químicas y dinámicas sobre la reacción quimioluminiscente entre el EDTA y el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotogenerado ha sido examinada con atención. Como el pH de las disoluciones parece ser la variable más importante a tener en cuenta para la emisión QL, se realizó un estudio dirigido a examinar el impacto del pH en la señal, con la finalidad de encontrar la mayor sensibilidad posible.

Los datos obtenidos para la señal QL del EDTA a diferentes valores de pH se muestran en la Fig. 4.3. Aunque la señal QL corregida, teniendo en cuenta el blanco, aumenta conforme lo hace el pH, no pueden utilizarse valores superiores a 7,5 ya que en esas condiciones la señal del blanco sería muy grande debido a que los iones hidroxilo reaccionarían con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ pasándolo a

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ con emisión quimioluminiscente. El pH seleccionado en la célula de flujo fue de 6,5, obtenido haciendo circular por el canal R_2 una disolución reguladora 0,08 M de fosfato ajustada a pH 6,8, que después de mezclada con las otras corrientes deja un pH muy próximo al valor óptimo 6,5.

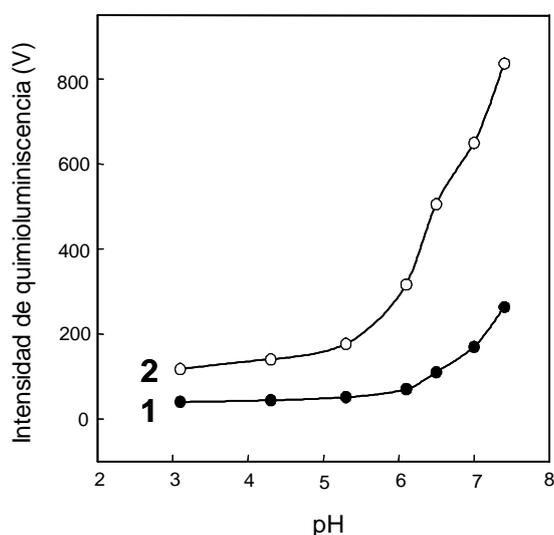


Figura 4.3. Efecto del pH sobre la reacción QL del sistema $\text{EDTA}/\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$.

(1) Señal del blanco; (2) $\text{EDTA } 1 \times 10^{-6} \text{ M}$

La velocidad de reacción y el tiempo de residencia de la especie emisora en la célula de flujo son determinantes al considerar el efecto que el caudal ejerce en la señal QL. La quimioluminiscencia va aumentando hasta alcanzar un caudal total de $4,9 \text{ ml min}^{-1}$, pero disminuye a caudales mayores. Con la finalidad de asegurar la conversión eficiente de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, los caudales de la

disolución portadora del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y la de peroxidisulfato se mantuvieron a $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ y se utilizó un fotorreactor de 175 cm de longitud. Los caudales de las corrientes de la disolución reguladora fosfato y de la muestra se variaron entre $0,6$ y $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, teniendo siempre en cuenta que el caudal total se mantuviera en $4,9 \text{ ml min}^{-1}$. La máxima señal se obtenía cuando las disoluciones de la reguladora fosfato y de la muestra circulaban con los caudales de $0,9$ y $1,2 \text{ ml min}^{-1}$, respectivamente.

La influencia del volumen de inyección del reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ sobre la señal quimioluminiscente se estudió cambiando el lazo de la válvula de inyección en el intervalo comprendido entre $35 \mu\text{l}$ a $335 \mu\text{l}$. Se observó que la respuesta quimioluminiscente aumentaba rápidamente con el tamaño del lazo hasta unos $235 \mu\text{l}$, valor por encima del cual las variaciones en la señal eran prácticamente inapreciables. Por ello, se consideró que $235 \mu\text{l}$ era el volumen más conveniente para la inyección del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en el sistema FI.

4.2.2 Determinación de EDTA en un sistema de inyección en flujo

Aunque nuestra meta era utilizar la quimioluminiscencia del EDTA con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ como sistema de detección post-columna en las separaciones por HPLC, consideramos que el sistema QL optimizado podría aplicarse directamente para la determinación FI del EDTA con muy buena sensibilidad. Por ello, trabajando en las condiciones antes señaladas se procedió a establecer los parámetros analíticos del nuevo método, utilizando para la cuantificación la altura de pico como señal analítica. Se comprobó

que existía una relación lineal entre la señal quimioluminiscente y la concentración en el intervalo comprendido entre 7×10^{-8} M a 3×10^{-6} M. El límite de detección calculado de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC (50) era $7,2 \times 10^{-9}$ M. La repetitividad se calculó a dos concentraciones de analito 4×10^{-7} M y 2×10^{-6} M ($n = 10$ para cada concentración), para las que la desviación estándar relativa fue 0,88 % y 0,74 %, respectivamente. La reproducibilidad del método fue estudiada analizando, durante cinco días, tres disoluciones de EDTA de la misma concentración (1×10^{-6} M). Cada día se realizaban tres análisis de cada una de las disoluciones; la desviación estándar relativa fue 1,5 %. La velocidad de muestreo también se determinó y es de 200 muestras/hora.

La selectividad del método se estudió preparando disoluciones conteniendo 1×10^{-6} M de EDTA y aumentando el contenido de diferentes compuestos que pueden encontrarse en las muestras reales a las que el método se pensaba aplicar, fundamentalmente colirios y salsas. La tolerancia a cada especie extraña era tomada como la máxima cantidad que conduce a un error menor del 3 % en la señal analítica quimioluminiscente, comparada con la correspondiente al analito solo. Los iones sodio, potasio, cloruro, sulfato y nitrato se toleraban en grandes cantidades (el máximo ensayado ha sido 100 veces la concentración del analito). Aunque el ácido ascórbico y el citrato dan quimioluminiscencia con el sistema estudiado, un exceso de dos veces la concentración de EDTA puede tolerarse en las condiciones de trabajo recomendadas.

Debido a las propiedades complejantes del EDTA, los iones metálicos interfieren porque la señal QL se reduce en su presencia

de acuerdo con la concentración de ión metálico presente. En el estudio de este tipo de interferencia se seleccionaron seis cationes: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cd(II), Cu(II) y Fe(III). Se prepararon una serie de muestras que contenían siempre EDTA a la concentración 1 μ M y cantidades variables de cada uno de los iones indicados. Después de acidificar hasta pH 2,5 con ácido clorhídrico 0,1 M, las muestras se pasaron a través de una minicolumna de intercambio catiónico bajo la forma hidrógeno. La minicolumna de 12 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno, estaba rellena con la resina Dowex 50 W X 8 y la disolución pasaba a través de ella antes de ser bombeada al canal R₁ del esquema FI presentado en la Figura 4.2. La tolerancia a cada uno de los cationes se estableció con los mismos criterios que hemos indicado para otros interferentes, es decir, admitiendo un error con respecto a la señal del analito puro que no supere el ± 3 %.

Se comprobó que los iones calcio y magnesio no producían interferencias (máxima relación ensayada 100:1); los iones cinc, cadmio y cobre se toleraban hasta relaciones de 50:1. Sin embargo, en presencia de Fe(III) la señal quimioluminiscente se reducía en proporción a la cantidad de Fe(III) añadido y desaparecía cuando la concentración de Fe(III) era la misma que la de EDTA. No obstante, era posible determinar EDTA hasta con un exceso de Fe(III) en la proporción 5:1, si se adicionaba ácido ascórbico a las muestras antes de su paso por la columna de intercambio; en esas condiciones se produce la reducción del Fe(III) a Fe(II) por el ácido ascórbico y ese Fe(II) forma con el EDTA un complejo más débil ($\log \beta = 14,3$) que el Fe(III) ($\log \beta = 25,1$).

4.2.2.1 Aplicaciones analíticas

El método FI-QL propuesto ha sido aplicado con éxito a la determinación de EDTA en colirios oftálmicos y en diferentes tipos de muestras de salsa.

En el caso de las muestras de colirio simplemente se diluyeron adecuadamente con agua ultrapura, se filtraron e inyectaron en el sistema FI sin ningún tratamiento adicional.

Para el análisis de EDTA en muestras de salsa (en nuestro caso mayonesa y alioli) se pesaron cantidades convenientes de las mismas (aproximadamente 10 g) y se mezclaron con 50 ml de agua para extraer a continuación con 20 ml de diclorometano. Después de centrifugar (30 min a 1000 x g) se descargaba la capa orgánica y la fase acuosa se centrifugaba de nuevo durante 10 minutos. La fase acuosa resultante se filtraba a través de un filtro Millipore de 0,45 μm y se diluía apropiadamente con agua ultrapura en matraz aforado. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 4.1 y se han comparado con los obtenidos utilizando el método de referencia basado en HPLC (40) y aplicando el análisis estadístico con el test-t y test-F. Se puede afirmar con el 95 % de confianza que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos métodos.

Tabla 4.1
Determinación de EDTA en muestras reales

<i>Tipo de muestra^a</i>	<i>Método propuesto^b</i>	<i>Método de referencia^b</i>
<i>Preparaciones farmacéuticas</i>		
Colirio oftálmico LLOrens	20,27 ± 0,08 mg ml ⁻¹	20,16 ± 0,06 mg ml ⁻¹
<i>Salsas</i>		
Mayonesa Prima	33,1 ± 0,5 mg kg ⁻¹	32,6 ± 0,3 mg kg ⁻¹
Alioli Chovi	n.d. ^c	n.d. ^c

^a Composición: **Colirio oftálmico LLOrens**: edetato disódico (20 mg ml⁻¹), fosfato monosódico, fosfato disódico, nitrato de fenilmercurio y agua ultrapura. **Mayonesa Prima**: aceite de girasol 65 %, yema de huevo 8,5 %, vinagre, azúcar, sal, almidón de maíz, jugo de limón, sorbato potásico, goma xantana, β-caroteno, EDTA y antioxidante BHA. **Alioli Chovi**: aceite vegetal, huevo, ajo 8 %, sal, limón y sorbato potásico.

^b Media ± desviación estándar (n = 4).

^c No detectado.

Con las mismas muestras analizadas se han realizado estudios de recuperación. Tres cantidades diferentes de EDTA se adicionaron a cada una de las muestras reales analizadas para determinar su recuperación. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2 e indican que el método propuesto se puede aplicar satisfactoriamente a la determinación de EDTA en este tipo de muestras.

Tabla 4.2
Recuperación de EDTA en colirio oftálmico y salsas

Muestra	Concentración añadida	Método propuesto		Método de referencia	
		Concentración encontrada ^a	Recuperación ^b (%)	Concentración encontrada ^a	Recuperación ^b (%)
<i>Productos farmacéuticos</i>					
Colirio oftálmico	2,0 ^c	1,86 ± 0,07	93 ± 4	1,92 ± 0,04	96 ± 2
	3,0 ^c	2,91 ± 0,05	97 ± 2	2,85 ± 0,03	95 ± 1
	4,0 ^c	4,05 ± 0,08	101 ± 3	3,96 ± 0,07	99 ± 2
<i>Salsas</i>					
Mayonesa	30 ^d	28,8 ± 0,8	96 ± 3	29,1 ± 0,5	97 ± 2
	50 ^d	50,1 ± 0,8	100 ± 2	49,1 ± 0,9	98 ± 2
	65 ^d	63,7 ± 0,6	98 ± 1	64,3 ± 0,8	99 ± 1
Alioli	30 ^d	29,7 ± 0,5	99 ± 2	29,0 ± 0,5	97 ± 2
	50 ^d	48,5 ± 0,9	97 ± 3	49,1 ± 0,4	98 ± 1
	65 ^d	63,1 ± 0,9	97 ± 2	65,7 ± 0,8	101 ± 1

^a Media ± desviación estándar (n = 3).

^b Recuperación ± desviación estándar (n = 3).

^c Concentración expresada en mg ml⁻¹.

^d Concentración expresada en mg kg⁻¹.

Podemos afirmar que la quimioluminiscencia que produce el EDTA con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotogenerado combinada con el FI permite el desarrollo de un método analítico de alta sensibilidad, rápido y reproducible, aplicable con excelentes resultados a la determinación de este compuesto en formulaciones farmacéuticas y en salsas.

Comparando este método con otros propuestos para el EDTA, concretamente métodos FI o el sensor QL, queda patente que el aquí presentado es más sencillo y rápido, más sensible que la mayoría de los presentados en la Tabla 4.3 y justo como el de mayor sensibilidad de la misma.

Tabla 4.3
Características analíticas de algunos métodos para la determinación de EDTA

<i>Método (ref.)</i>	<i>Detección</i>	<i>Rango lineal (M)</i>	<i>L.D. (M)</i>	<i>Comentarios</i>
Sensor (30)	Quimioluminiscencia	$6,6 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-6}$	Membrana bicapa conteniendo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y $\text{Ce}(\text{IV})$ sobre un soporte de poliéster. Tiempo de vida: 3 días
FI (31)	Amperometría	$3,0 \times 10^{-8} - 3,0 \times 10^{-5}$		Electrodo de carbono vitrificado a 1,25 V (US. SCE)
FI (32)	Potenciometría		1×10^{-5}	Electrodo indicador de alambre de cobre
FI (16)	Fotometría	$2 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$		Reacción redox entre $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{II})$ en presencia de neocuproína
FI (33)	Fluorescencia	$6,8 \times 10^{-7} - 3,4 \times 10^{-6}$		Oxidación por H_2O_2 de la hidrazona de la 2,2'-dipiridil cetona catalizada por $\text{Cu}(\text{II})$
FI (este trabajo)	Quimioluminiscencia	$7 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-6}$	$7,2 \times 10^{-9}$	Reacción QL entre EDTA y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotogenerado

4.3 DETERMINACIÓN FI-QUIMIOLUMINISCENTE DE OTROS ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS

Hemos comprobado que el método FI-QL propuesto también da buenos resultados en la evaluación de otros ácidos aminopolicarboxílicos, concretamente EGTA (ácido etilenglicol-bis-(2-amino etil éter)tetraacético), DCTA (ácido 1,2-diaminociclohexano-tetraacético), DTPA, NTA y EDDS. Las condiciones experimentales optimizadas con el EDTA son igualmente convenientes para la determinación de los citados agentes complejantes, hecho favorable teniendo en cuenta que nuestro propósito es incorporar la detección fotoquímica quimioluminiscente en la separación de APCAs por HPLC. En la Tabla 4.4 se presentan los resultados del análisis estadístico de los datos experimentales encontrados con todos los analitos, así como las ecuaciones de las rectas de regresión calculados a partir de las gráficas de calibrado. Como queda patente, el método es muy sensible para la determinación de todos los analitos, particularmente para NTA ($LD \approx 1,8 \text{ nM}$).

Tabla 4.4
Gráficas de calibración, límites de detección y precisión

<i>Analito</i>	<i>Ordenada en el origen (mV)</i>	<i>Pendiente (10⁸ mV/M)</i>	<i>r (n=10)</i>	<i>Rango lineal (μM)</i>	<i>L.D.^a (nM)</i>	<i>Repetitividad^b (RSD, %)</i>
EDTA	-32 ± 11	4,86 ± 0,08	0,9992	0,07 – 3	7,2	0,88
EGTA	21 ± 4	14,3 ± 0,1	0,9998	0,02 – 1	2,5	1,08
NTA	16 ± 7	21,4 ± 0,2	0,9998	0,02 – 0,8	1,8	0,71
DTPA	4,3 ± 4	10,4 ± 0,3	0,9989	0,04 – 1	5,3	1,24
DCTA	-44 ± 26	6,87 ± 0,32	0,9980	0,06 – 2	5,8	0,99
EDDS	-111 ± 25	13,4 ± 0,4	0,9988	0,1 – 1	3,0	1,32

^a L.D.: Límite de detección.

^b Los valores de RSD han sido obtenidos a partir de 10 inyecciones repetidas de las siguientes muestras: EDTA, EDDS, DCTA (4x10⁻⁷ M) y EGTA, NTA, DTPA (8x10⁻⁸ M).

4.4 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS AMINOPOLICARBOXÍLICOS POR HPLC

El sistema para la separación cromatográfica de APCAs se presenta en la Figura 4.4. La meta de estas investigaciones, como ya se ha comentado, era desarrollar un procedimiento de separación por HPLC para APCAs que se pudiera aplicar a diferentes tipos de muestras y que alcanzara límites de detección convenientes para el análisis de concentraciones sub-micromolares. Para alcanzar estos objetivos hemos escogido como detección la quimioluminiscencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. En un sistema post-columna el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, generado por fotooxidación en línea del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ con peroxidisulfato, reacciona con los ácidos aminopolicarboxílicos procedentes de la columna cromatográfica para dar fuerte quimioluminiscencia. Se han seleccionado para este estudio los siguientes APCAs: el EDTA y el DTPA considerados de baja biodegradabilidad y el NTA y EDDS que son fácilmente degradables. Para el sistema de detección post-columna se han considerado los resultados de los estudios realizados en el análisis por inyección en flujo de EDTA en el que se optimizaron las condiciones químicas y dinámicas para conseguir señales quimioluminiscentes elevadas.

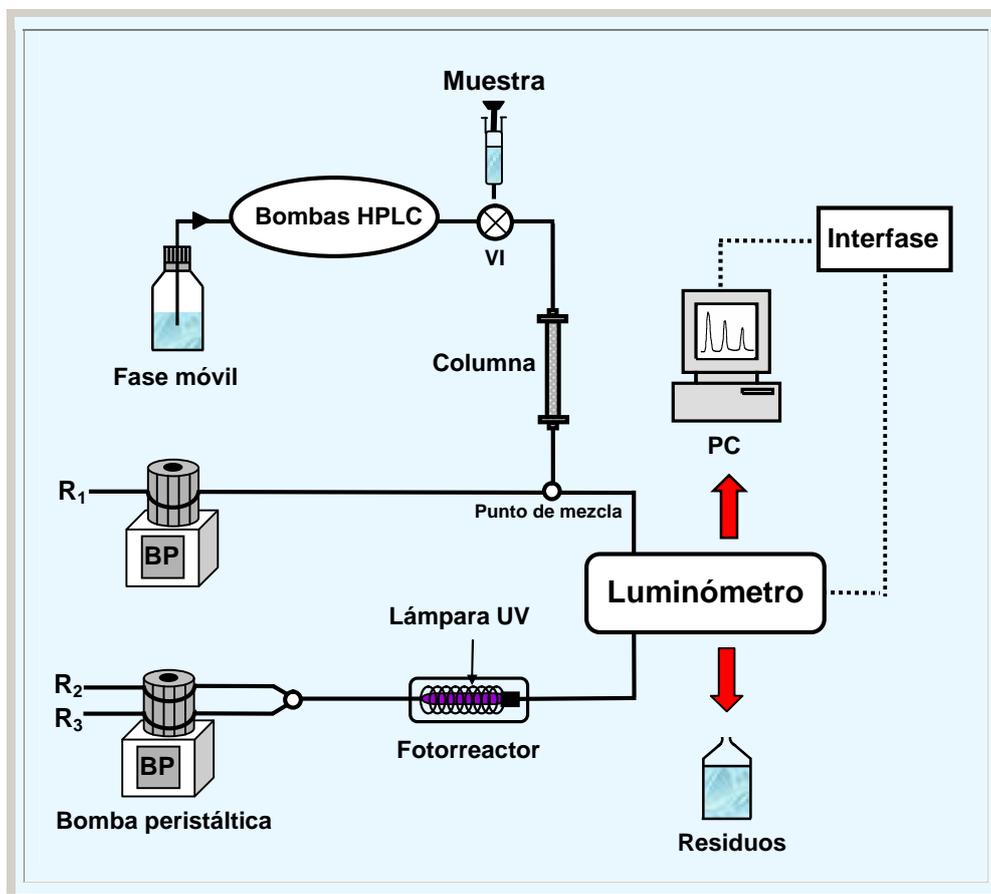


Figura 4.4. Esquema HPLC–QL para la determinación de APCAs.

Fase móvil = ácido sulfúrico 20 mM (1 ml min^{-1}); R_1 = disolución reguladora fosfato 80 mM de pH 7,3 ($0,9 \text{ ml min}^{-1}$); R_2 = peroxidisulfato potásico 1,5 mM y disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7 ($1,4 \text{ ml min}^{-1}$); R_3 = $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2 mM ($1,4 \text{ ml min}^{-1}$).

Las mayores señales en la fotogeneración del complejo de Ru(III) se obtuvieron en estudios previos con las siguientes condiciones: $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2 mM y peroxidisulfato 1,5 mM a pH 5,7.

La señal QL depende de forma drástica del pH de la reacción entre el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ y el compuesto que contiene el grupo amino, en nuestro caso DTPA, EDDS, EDTA y NTA, por lo que estos agentes se hicieron reaccionar con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 8, comprobando en estas experiencias un aumento de la señal QL cuando lo hace el pH, tal como queda patente en la Figura 4.5. Aunque las condiciones alcalinas son favorables, no conviene trabajar a pH superior a 7,5 debido a que los iones hidroxilo, que también reaccionan con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, producirían un aumento de la señal del fondo.

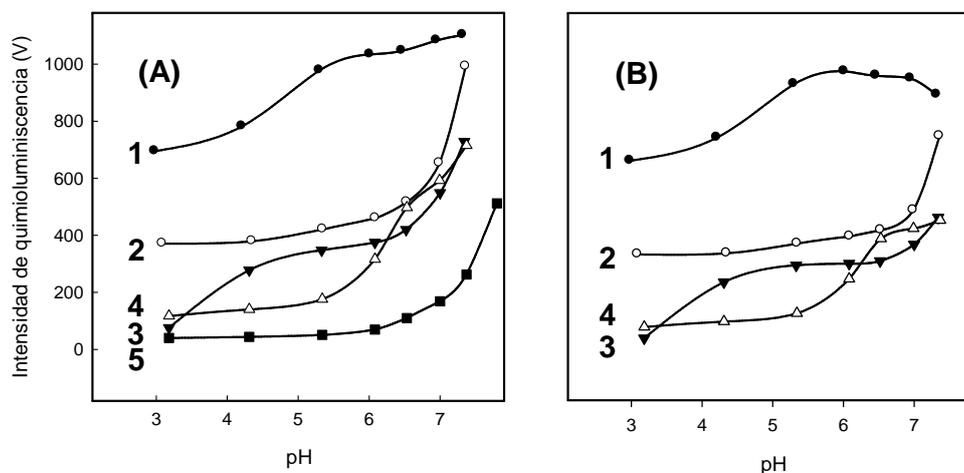


Figura 4.5. Efecto del pH (A) sobre la intensidad de QL de NTA (1), EDDS (2), DTPA (3) y EDTA (4). Señal del blanco (5). (B): señal QL corregida con el fondo.

Condiciones: $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2 mM; concentración de los analitos 5×10^{-7} M excepto EDTA (1×10^{-6} M).

La separación cromatográfica se ha llevado a cabo con un sistema de HPLC que consiste en un módulo de disolventes System Gold 125 NM de Beckman Coulter y una válvula de inyección Rheodyne 7725 con un volumen de 50 μl . El detector de quimioluminiscencia fue un luminómetro Camspec CL-2 conectado al equipo de HPLC por medio de una interfase SS420x de Beckman. Se utilizó un ordenador personal IBM con el software 32 Karat para la adquisición y tratamiento de los datos.

Dos tipos de columnas se han empleado en las separaciones de APCAs: una Mediterranea Sea₁₈ (5 μm , 15 cm x 0,46 cm) de Teknokroma y una PRP-1 (poliestireno-divinilbenceno) (5 μm , 25 cm x 0,41 cm) de Hamilton.

Un parámetro de gran interés en la emisión quimioluminiscente es el caudal a través de la célula de flujo. La influencia de esta variable sobre la quimioluminiscencia era necesario estudiarla de nuevo al incorporar al esquema analítico de análisis en flujo el sistema de HPLC. Así, el efecto del caudal se investigó utilizando dos bombas peristálticas, eliminando para estas experiencias la bomba cromatográfica del esquema presentado en la Figura 4.4. La intensidad de QL aumenta hasta alcanzar un caudal total de 4,7 ml min^{-1} , pero queda nivelado a valores mayores. Con la finalidad de asegurar la eficiencia en la fotoconversión de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ los caudales de las disoluciones de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y de peroxidisulfato se mantuvieron a 1,4 ml min^{-1} , mientras que el caudal de la disolución reguladora fosfato se varió entre 1,5 y 2,1 ml min^{-1} . Como la máxima señal quimioluminiscente se consiguió con un caudal de 1,9 ml min^{-1} y como la disolución reguladora se incorpora al sistema con un caudal de 0,9 ml min^{-1} en el sistema definitivo de

tres bombas (incluyendo la del cromatógrafo), se ha escogido un caudal de 1 ml min^{-1} para el eluyente como el valor óptimo en las siguientes experiencias.

4.4.1 Separación cromatográfica

Las separaciones por HPLC de los APCAs se han realizado siguiendo dos modos, bien utilizando las columnas para fase reversa (RP) o por cromatografía iónica. En el caso de la fase reversa un reactivo formador de pares iónicos se añade a los analitos con el fin de transformarlos en componentes neutros (14, 28, 41). Estos reactivos son sales de alquilamonio y pueden dar directamente quimioluminiscencia con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotogenerado y, por tanto, son incompatibles con el sistema de detección que hemos seleccionado. Otro camino es trabajar con una fase móvil con bajo pH (45); en este caso la separación se basa en las fracciones en equilibrio de las respectivas especies sin carga. Nosotros hemos escogido esta última alternativa ya que es compatible con el sistema de detección QL seleccionado y, además, las interferencias que podrían producir los cationes disueltos son mínimas en esas condiciones.

Se han utilizado columnas de fase reversa tanto de sílice enlazada (C_{18}) como de estireno-divinilbenceno (PRP-1). La columna PRP-1 se recomienda para los valores de pH más bajos, aunque en general las fases C_{18} son más eficientes. Los mejores resultados se han conseguido con una columna $5 \mu\text{m-C}_{18}$ (Mediterranea Sea₁₈ de Teknokroma), ya que trabajando con ella las separaciones son buenas y no se observan cambios significativos en los tiempos de

retención ni en las anchuras de los picos al menos durante 1-2 meses e incluso operando a pH 1,0.

El efecto de la composición de la fase móvil sobre la señal QL de los APCAs ha sido estudiado. Se han comparado disoluciones de los ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y tricloroacético del mismo pH y hemos llegado a la conclusión de que el ácido sulfúrico es el mejor eluyente puesto que conduce a una buena separación y las señales quimioluminiscentes son más altas.

El efecto del pH del eluyente sobre los tiempos de retención de los APCAs fue investigado en el intervalo de pH comprendido entre 1,0 y 4,0. Las gráficas que muestran los tiempos de retención se corresponden con la representación de las fracciones de equilibrio de las respectivas especies no cargadas en función del pH, tal como aparecen en la Figura 4.6 para los casos del EDTA y del NTA. Estos datos confirman que la retención es debida a especies sin carga. El eluyente empleado finalmente fue una disolución 20 mM de ácido sulfúrico (pH 1,47). La Figura 4.7 muestra un cromatograma típico obtenido a partir de una disolución estándar. Queda patente la eficiente separación de los cuatro compuestos, así como la baja señal de fondo, siendo importante destacar que todos los analitos fueron eluidos en menos de 5 minutos.

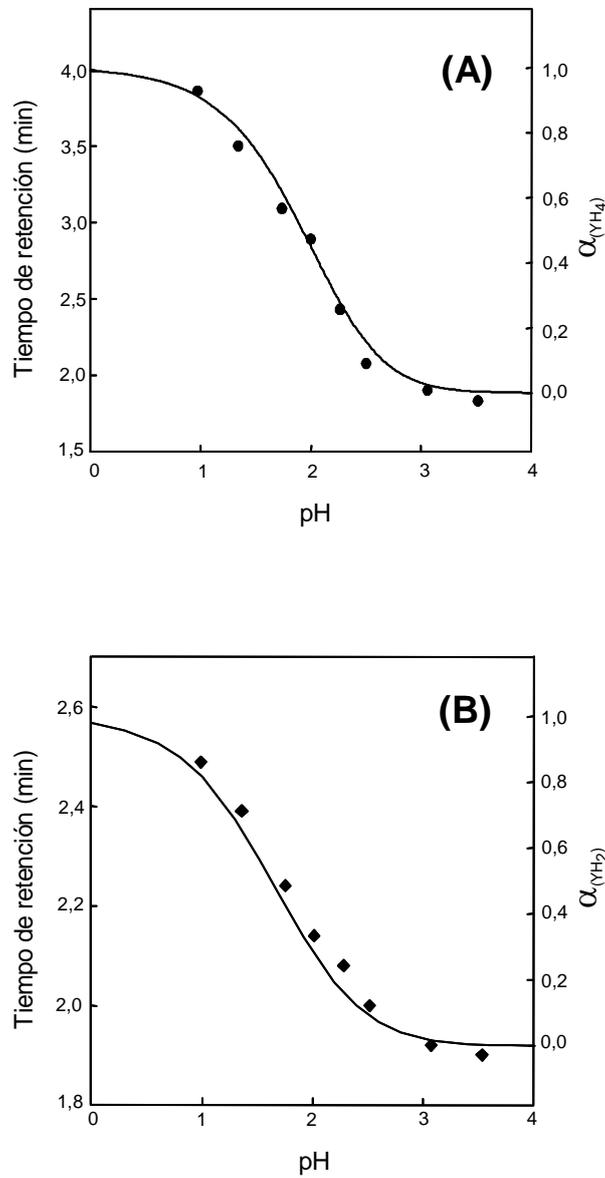


Figura 4.6. Efecto del pH de la fase móvil sobre los tiempos de retención.

La línea continua representa la fracción de equilibrio de las especies no cargadas, calculada usando los valores de K_a de las referencias 1 y 2. (A) EDTA; (B) NTA.

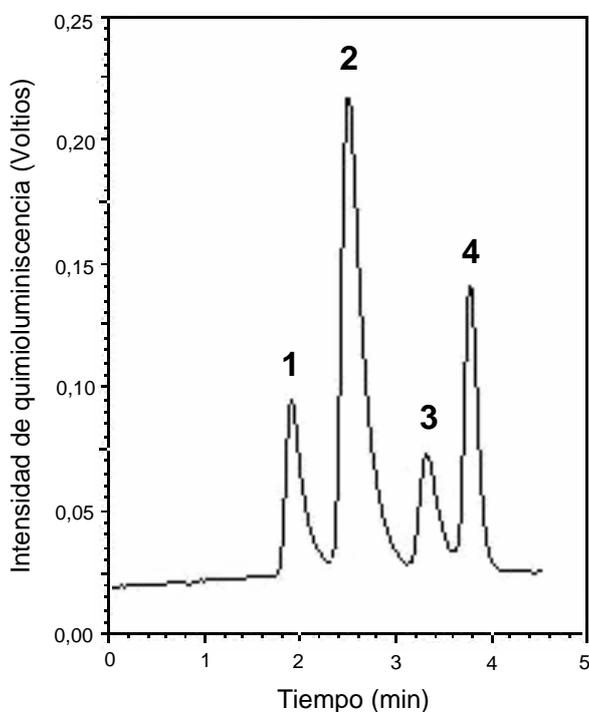


Figura 4.7. Cromatograma de una disolución estándar de APCAs.

Concentración e identificación de picos: (1) = EDDS 6×10^{-7} M; (2) = NTA 4×10^{-7} M; (3) = DTPA 6×10^{-7} M; (4) = EDTA 2×10^{-6} M. Las condiciones cromatográficas y del sistema post-columna son las descritas en la Fig. 4.4.

4.4.2 Gráficas de calibrado y características del método

Operando en las condiciones experimentales óptimas, establecidas anteriormente, se construyeron las líneas de calibrado para los cuatro APCAs objeto de estudio. Se utilizaron disoluciones estándares de diferentes concentraciones para cada analito: de

8×10^{-9} a 1×10^{-5} M para el NTA, 4×10^{-8} a 1×10^{-5} M para el EDDS y DTPA y 7×10^{-7} a 4×10^{-5} M para el EDTA. Los cuatro analitos presentaban buena linealidad cuando se representaba área de pico frente a concentración, como lo demuestra el hecho de que los coeficientes de regresión (r) eran mayores que 0,999 en todas las gráficas. Los límites de detección, calculados como tres veces la desviación estándar del blanco dividido por la pendiente de la recta de calibrado, fueron muy bajos como muestra la Tabla 4.5 que se presenta, en la que aparecen además de estos parámetros, los obtenidos en estudios de repetitividad. La desviación estándar relativa se calculó a partir de diez inyecciones repetidas de disoluciones de una muestra con los analitos presentes en las siguientes concentraciones 7×10^{-7} M para NTA, 1×10^{-6} M para EDDS y DTPA y 7×10^{-6} M para EDTA y en todos los casos era menor del 1,3 %. Los valores de RSD para los tiempos de retención obtenidos en un mismo día indican una buena reproducibilidad, puesto que su variación se encuentra entre 0,12 y 0,25 %. La precisión entre días del método se ha estudiado analizando una muestra que contenía NTA ($6,5 \times 10^{-7}$ M), EDDS ($7,5 \times 10^{-7}$ M), DTPA ($8,5 \times 10^{-7}$ M) y EDTA ($7,0 \times 10^{-6}$ M). Durante cinco días consecutivos esta muestra se inyectó 10 veces cada uno de los días. Los valores de RSD encontrados fueron menores de 2,1 % para las áreas de pico y menores de 0,99 % para los tiempos de retención.

Tabla 4.5
Características analíticas del método HPLC–QL propuesto para la
determinación de APCAs

<i>Analito</i>	<i>Intervalo lineal (μM)</i>	<i>L.D.^a (nM)</i>	<i>Precisión (RSD, %)</i>	
			<i>Repetitividad</i>	<i>Reproducibilidad</i>
NTA	0,008 – 10	0,9	0,71	2,10
EDDS	0,04 – 10	2,7	0,95	1,36
DTPA	0,04 – 10	2,9	1,30	1,80
EDTA	0,7 – 40	80	0,62	1,14

^a L.D.: Límite de detección.

4.4.3 Efecto de los iones metálicos

Debido a las fuertes características quelatantes de DTPA, EDDS, EDTA y NTA no se encuentran en las muestras medioambientales como ácidos libres sino complejados con diferentes iones metálicos. Esto significa que la presencia de cationes en las muestras puede alterar la separación y detección QL de estos compuestos. Para el estudio de este tipo de interferencias hemos seleccionado seis cationes: Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cd(II), Cu(II) y Fe(III). Las muestras conteniendo siempre una concentración 10 μM del agente complejante se prepararon con concentraciones diferentes de cada uno de los iones indicados y a continuación se registraron los correspondientes cromatogramas. Se comprobó que

con Ca(II) y Mg(II) hasta valores de concentración de 1000 μM no cambian los cromatogramas de los APCAs, es decir, que ninguna interferencia aparece en el caso de analizar aguas naturales. Los iones Zn(II), Cd(II) y Cu(II) se toleran hasta una concentración 100 μM . Sin embargo, la presencia de Fe(III) produce una reducción de los picos cromatográficos proporcional a la concentración de Fe(III) presente e incluso llegan a desaparecer cuando la concentración de Fe(III) es la misma que la de agente complejante.

Cuando los iones metálicos se encuentran presentes a concentraciones más altas que los límites tolerables, que aparecen en la Tabla 4.6, las muestras que contienen tanto los iones metálicos libres como complejados se someten a una operación de percolado a través de una columna rellena con una resina de intercambio catiónico (Dowex 50 W X 8). Los cationes son, entonces, retenidos en la columna, mientras que los complejos pasan a través de ella sin impedimento. La disolución resultante sólo contiene el catión en la forma de complejo 1:1 con estos ligandos y, consiguientemente, es apropiada para el análisis.

Dado que el Fe(III) es el mayor interferente para nuestro método analítico hemos prestado especial atención a investigar la forma de eliminar en lo posible este grave inconveniente. Con esta finalidad se adicionaron a las muestras ácido ascórbico y Cu(II), después de haber pasado por la columna de intercambio catiónico. El ácido ascórbico reduce el Fe(III) a Fe(II), el cual forma con los agentes complejantes estudiados un complejo más débil que el Cu(II). Después de la reducción, la disolución se pasa de nuevo a través de la columna de intercambio iónico, donde el Fe(II) y el exceso de Cu(II) son retenidos.

Tabla 4.6
Efectos de los iones metálicos sobre los picos cromatográficos de EDTA,
NTA, DTPA y EDDS

<i>Analito</i>	<i>Ión metálico</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>t_R (min)</i>	<i>Altura de pico</i>
NTA	—		2,55	1
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	100	2,55	1
		1000	2,57	0,99
	Zn ²⁺ /Cd ²⁺	10	2,56	1
		100	2,55	0,92
	Cu ²⁺	10	2,54	1
		100	2,55	0,99
	Fe ³⁺	1000	2,54	0,75
		1	2,55	0,92
		5	2,55	0,56
10			0	
EDTA	—		3,65	1
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	100	3,65	0,99
		1000	3,65	0,98
	Zn ²⁺ /Cd ²⁺	100	3,63	1
		10	3,65	1
	Cu ²⁺	100	3,66	0,98
		1000	3,66	0,39
		1	3,65	0,90
		5	3,63	0,45
	10		0	
DTPA	—		3,32	1
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	1000	3,32	0,99
		10	3,32	1
	Zn ²⁺ /Cd ²⁺	10	3,32	1
		10	3,32	1
	Fe ³⁺	1	3,33	0,91
10		0		
EDDS	—		2,05	1
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺	100	2,05	1
		1000	2,06	0,99
	Cu ²⁺	10	2,08	1
		20	2,10	0,90

Muestras: Disoluciones de DTPA, EDDS, EDTA y NTA 10 μM en agua ultrapura; columna C₁₈; pH de la fase móvil = 1,47; caudal = 1 ml min⁻¹; t_R = tiempo de retención en minutos. Los datos de altura de pico en presencia de iones metálicos han sido normalizados a los datos en ausencia de iones metálicos dividiendo los primeros entre los últimos.

4.4.4 Aplicación del método al análisis de ácidos aminopolicarboxílicos en muestras reales

Las características del sistema de detección QL seleccionado nos permiten obtener unos cromatogramas muy sencillos para la determinación de APCAs en muestras reales. La utilidad analítica del método fue comprobada determinando estos ácidos aminopolicarboxílicos en aguas y el EDTA en salsas comerciales.

4.4.4.1 Determinación de APCAs en aguas

Para evaluar la validez del método propuesto para la determinación de APCAs en muestras de aguas naturales, se recogieron muestras de diferente procedencia. Todas las muestras fueron filtradas (con filtros de membrana de 0,45 μm) antes de la inyección en el cromatógrafo. Ninguna de las muestras analizadas daba picos cromatográficos que interfirieran con los correspondientes a los APCAs. Las muestras fueron enriquecidas con tres concentraciones diferentes de cada uno de los APCAs. En la Tabla 4.7 se presentan los valores encontrados para la recuperación de los ácidos, así como los valores de RSD correspondientes en tres tipos de aguas. Como puede observarse valores de concentración tan bajos como 4×10^{-9} M pueden analizarse en aguas naturales utilizando una etapa de preconcentración, con la que se puede llegar a un factor de enriquecimiento de 25.

Tabla 4.7
Determinación de DTPA, EDDS, EDTA y NTA en muestras de agua

<i>Procedencia del agua</i>	<i>Analito</i>	<i>Añadido (nM)</i>			<i>Encontrado^a (nM)</i>		
Grifo	NTA	4 ^b	5 ^b	200	3,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	199 ± 8
	DTPA	10 ^b	20 ^b	1000	9,8 ± 0,1	18,0 ± 0,7	953 ± 18
	EDTA	400 ^b	500 ^b	2000	398 ± 20	490 ± 21	2038 ± 8
Pozo	NTA	5 ^b	6 ^b	200	4,8 ± 0,2	5,9 ± 0,2	196 ± 10
	EDDS	20 ^b	30 ^b	2000	19,4 ± 0,3	24,7 ± 0,8	1962 ± 20
	DTPA	20 ^b	30 ^b	2000	17,6 ± 0,4	28,8 ± 0,7	1864 ± 34
	EDTA	500 ^b	600 ^b	3000	490 ± 22	576 ± 27	2974 ± 14
Riego	NTA	5 ^b	6 ^b	200	5,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	198 ± 9
	EDDS	20 ^b	30 ^b	2000	20,0 ± 0,6	27,9 ± 0,7	1981 ± 17
	DTPA	20 ^b	30 ^b	2000	19,2 ± 0,4	29,4 ± 0,5	1962 ± 12
	EDTA	500 ^b	600 ^b	3000	500 ± 18	586 ± 30	2910 ± 35

^a Media ± desviación estándar (n = 4).

^b Las muestras fueron concentradas 25 veces.

En muchas muestras las interferencias debidas a los cationes disueltos eran despreciables al estar presentes en bajas concentraciones. Si algún catión se encuentra en alta concentración, mayor que el límite tolerable, es preciso suprimir la interferencia por intercambio iónico.

El procedimiento experimental para el análisis de aguas es el siguiente:

Las muestras de agua recogidas (agua de grifo, de pozo y procedente de riego) se filtran con un filtro de membrana de 0,45 μm y se almacenan en frascos de PTFE a 4 $^{\circ}\text{C}$. Si los iones metálicos están presentes a niveles superiores a los tolerables, las muestras se pasan a través de la columna de intercambio catiónico con la resina Dowex 50 W X 8 en la forma Na^+ para que los iones metálicos no complejados queden retenidos.

Una etapa de preconcentración se requiere cuando las muestras contienen los APCAs a los valores de concentración de las zonas más bajas de las líneas de calibrado. En esos casos de 50 a 250 ml de la muestra (de acuerdo con las concentraciones esperadas) se llevan al rotavapor y se reducen a un volumen entre 2 y 3 ml. El volumen resultante se diluye a 10 ml en matraz aforado con agua ultrapura.

Las muestras reforzadas con APCAs se prepararon midiendo 5 ml de disolución estándar (conteniendo entre 4×10^{-3} y 3,0 μmoles de cada APCA) en un matraz aforado y completando hasta 1000 ml con la muestra de agua.

4.4.4.2 Determinación de EDTA en salsas

Se estudiaron previamente las posibles interferencias que en este tipo de muestras pueden presentarse debido a otras sustancias que coexisten con el EDTA, tales como ácido ascórbico y ácido cítrico, preservativos comunes que se adicionan a los alimentos envasados. En estos casos se comprobó que no existían efectos interferentes ya que el tiempo de retención del EDTA era de 3,6 min, mientras que los tiempos de retención del ácido ascórbico y del ácido cítrico eran 4,2 y 7,2 min, respectivamente. Además, tanto el ácido ascórbico como el ácido cítrico producen con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ una señal quimioluminiscente mucho más débil que el EDTA, ya que las áreas de pico correspondientes a estos compuestos fueron aproximadamente un 5 % de la correspondiente al EDTA a una concentración 100 veces menor.

Para el análisis de muestras de mayonesa y alioli se siguió el procedimiento de extracción líquido-líquido para eliminar las sustancias lipofílicas, tal como ya se ha descrito en el apartado 4.2.2.1.

La validez del procedimiento HPLC-QL propuesto para este tipo de muestras se ha comprobado mediante el análisis de mayonesa y alioli a los que se había adicionado previamente EDTA. Las recuperaciones encontradas oscilan entre el 89 y el 103 %, como se refleja en la Tabla 4.8, valores que demuestran la seguridad del método.

Tabla 4.8
Recuperación de EDTA en salsas

<i>Tipo de muestra^a</i>	<i>EDTA encontrado (mg kg⁻¹) n = 3</i>	<i>EDTA añadido (mg kg⁻¹)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Mayonesa Prima	32,5 ± 0,6	—	
		30	89 ± 2
		50	102 ± 2
		65	101 ± 1
Alioli Chovi	n.d. ^b	—	
		30	103 ± 2
		50	95 ± 4
		65	98 ± 3

^a Composición: **Mayonesa Prima**: aceite de girasol 65 %, yema de huevo 8,5 %, vinagre, azúcar, sal, almidón de maíz, jugo de limón, sorbato potásico, goma xantana, β-caroteno, EDTA y antioxidante BHA. **Alioli Chovi**: aceite vegetal, huevo, ajo 8 %, sal, limón y sorbato potásico.

^b No detectado.

Como resumen de este Capítulo podemos concluir que el método cromatográfico con detección quimioluminiscente aquí estudiado para la determinación de DTPA, EDDS, EDTA y NTA presenta excelentes características analíticas. El método permite la determinación sensible y simultánea de estos APCAs en aguas, ofreciendo un amplio intervalo de linealidad, bajos límites de detección, unido a tiempos de análisis cortos. Además, el bajo pH de la fase móvil reduce drásticamente las interferencias de los iones

metálicos presentes en las aguas. Con una etapa de preconcentración se pueden medir fácilmente niveles de concentración de analito tan bajos como ng l^{-1} utilizando 250 ml de la muestra de agua. También el procedimiento ha sido aplicado con muy buenos resultados al análisis de salsas.

Cuando este método se compara con métodos HPLC que emplean otros sistemas de detección, tales como absorbancia en el UV, fluorescencia, ICP y espectrometría de masas, tal como se indica en la Tabla 4.9 se observa que nuestro método presenta como características favorables tiempos más cortos para el análisis y simplicidad, y la sensibilidad es comparable a la del más sensible de los otros métodos presentados en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9
Comparación de algunos métodos de HPLC para la determinación de APCAs

<i>Referencia</i>	<i>Analito</i>	<i>Especie detectada</i>	<i>Método</i>	<i>Detección</i>	<i>Rango lineal (μM)</i>	<i>L.D. (μM)</i>
(40)	EDTA	EDTA – Fe(III)	RP	UV	1,3 – 2630	7,9
(41)	EDTA	EDTA – Cu(II)	RP	UV	23,9 – 609	
(43)	EDTA	EDTA – Fe(III)	IC	UV	0 – 1700	0,68
(27)	EDTA	EDTA – Fe(III)	RP	MS		3,4x10 ⁻³
(51)	EDDS	EDDS – FMOC	RP	Fluorescencia	0,01 – 10	0,01
(28)	EDTA, DTPA	complejo de Fe(III)	RP	MS/MS		3,4x10 ⁻³
(52)	EDTA, DTPA	complejo de Fe(III)	IC	UV		3,4x10 ⁻²
(45)	EDTA, EDTA, DTPA		RP	Amperometría	0 – 10	0,5
(46)	EDTA, DTPA, EGTA, NTA, DCTA	DCTA–Lu(III)–HQS	RP	Fluorescencia	0,05 – 10	2,5x10 ⁻²
Este trabajo	EDTA, DTPA, EDDS, NTA		RP	QL	0,008 – 40	9x10 ⁻⁴ / 8x10 ⁻²

RP: Cromatografía en fase reversa. IC: Cromatografía iónica. FMOC: 9-fluorenilmetil cloroformiato. MS: Espectrometría de masas. QL: Quimioluminiscencia. HQS: Ácido 5-sulfónico-8-hidroxiquinoleína.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- G. Schwarzenbach, H. Flaschka, "*Complexometric Titrations*", Methuen, Londres, 1969.
- 2.- R. Pribil, "*Analytical Applications of EDTA and Related Compounds*", Pergamon Press, New York, 1972.
- 3.- T.S. West, "*Complexometry with EDTA and related reagents*", British Drug Houses, Doole, England, 1969.
- 4.- M. Sillanpää, *Chemosphere*, **33** (1996) 293.
- 5.- T.P. Knepper, *Trends. Anal. Chem.*, **22** (2003) 708.
- 6.- M. Deacon, M.R. Smyth, L.G.M.Th. Tuinstra, *J. Chromatogr. A*, **659** (1994) 349.
- 7.- W. Buchberger, P.R. Haddad, P.W. Alexander, *J. Chromatogr. A*, **558** (1991) 181.
- 8.- J.D. McCord, A. Kilara, *J. Food Sci.*, **48** (1983) 1479.
- 9.- M. Bucheli-Witschel, T. Egli, *FEMS Microbiol Rev.*, **25** (2001) 69.
- 10.- T. Egli, *J. Biosci. Bioeng.*, **92** (2001) 89.
- 11.- A.S. Kord, I. Tumanova, W.L. Matier, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13** (1995) 575.
- 12.- J. Wynn, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16** (1970) 807.
- 13.- J. Bauer, D. Heathcote, S. Krogh, *J. Chromatogr.*, **369** (1986) 422.

- 14.-M. Sillanpää, M.-L.Sihvonen, *Talanta*, **44** (1997)1487.
- 15.-Farmacopea Europea 2ª Ed., Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2003.
- 16.-H. Itabashi, K. Umetsu, N. Teshima, K. Satoh, T. Kawashima, *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 213.
- 17.-T. Hamano, Y. Mitsuhashi, N. Kojima, N. Aoki, M. Shibata, Y. Ito , Y. Oji, *Analyst*, **118** (1993) 909.
- 18.-F. Belal, F.A. Aly, M.I. Walash, A.O. Mesbah, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17** (1998) 1249.
- 19.-R.J. Stolzberg, *Anal. Chim. Acta*, **92** (1977) 139.
- 20.-Z. Stojek, J. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **53** (1981) 847.
- 21.-A. Voulgaropoulos, N. Tzivanakis, *Electroanalysis*, **4** (1992) 647.
- 22.-A. Gómez-Hens, M. Ternero, D. Pérez-Bendito, M. Valcárcel, *Mikrochim. Acta*, **71** (1979) 375.
- 23.-A. Moreno, M. Silva, D. Pérez Bendito, M. Valcárcel, *Analyst*, **109** (1984) 249.
- 24.-Y.C. Lee, *Anal. Biochem.*, **293** (2001) 120.
- 25.-S. Pozdniakova, R. Ragauskas, A. Dikcius, A. Padarauskas, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363** (1999) 124.
- 26.-A.A. Ammann, *J. Chromatogr. A*, **947** (2002) 205.
- 27.-A. Dodi, V. Monnier, *J. Chromatogr. A*, **1032** (2004) 87.

-
- 28.-J.B. Quintana, T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A*, **1145** (2007) 110.
- 29.-J. Gardiner, *Analyst*, **102** (1977)120.
- 30.-Y. Taferssiti Zarouila, M.C. Valencia Mirón, L.F. Capitán-Vallvey, *Mikrochim. Acta*, **157** (2007) 63.
- 31.-A.G. Fogg, M.A. Fernández-Arciniega, R.M. Alonso, *Analyst*, **110** (1985) 1201.
- 32.-P.W. Alexander, P.R. Haddad, M. Trojanowicz, *Anal. Chim. Acta*, **171** (1985)151.
- 33.-F. Lazaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **321** (1985) 467.
- 34.-W.A. Aue, C.R. Hastings, K.O. Gerhardt, J.O. Pierce, H.H. Hill, R.F. Moseman, *J. Chromatogr.*, **72** (1972) 259.
- 35.-C. Schaffner, W. Giger, *J. Chromatogr.*, **312** (1984) 413.
- 36.-R.M. Cassidy, R. Harpur, S. Elchuk, *J. Chromatogr.*, **190** (1980) 188.
- 37.-V.T. Wanke, S.H. Eberle, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **20** (1992) 192.
- 38.-Y. Nishikawa, T. Okumura, *J. Chromatogr. A*, **690** (1995) 109.
- 39.-G.A. Perfetti, C.R. Warner, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62** (1979) 1092.
- 40.-D.L. Venezky, W.E. Rudzinski, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 315.

- 41.-J. De Jong, A. Van Polanen, J.J.M. Driessen, *J. Chromatogr.*, **553** (1991) 243.
- 42.-B. Nowack, F. G. Kari, S.U. Hilger, L. Sigg, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 561.
- 43.-J. Harmsen, A. Van Den Toorn, *J. Chromatogr.*, **249** (1982) 379.
- 44.-C. Randt, R. Wittlinger, W. Merz, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **346** (1993) 728.
- 45.-J. Dai, G.R. Helz, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 301.
- 46.-L. Ye, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A*, **739** (1996) 307.
- 47.-J.S. Ridlen, G. J. Klopf, T.A. Nieman, *Anal. Chim. Acta*, **341** (1997) 195.
- 48.-R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 1.
- 49.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst*, **127** (2002) 1526.
- 50.-G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, **55** (1983) 712A.
- 51.-S. Tandy, R. Schulin, M.J.-F. Suter, B. Nowack, *J. Chromatogr. A*, **1077** (2005) 37.
- 52.-C. Randt, J. Klein, W. Merz, *Vom Wasser*, **84** (1995) 61.

CAPÍTULO 5

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMIODARONA Y DESETILAMIODARONA POR HPLC CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

CAPÍTULO 5
SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMIODARONA Y
DESETILAMIODARONA POR HPLC CON DETECCIÓN
QUIMIOLUMINISCENTE

	<u>Página</u>
5.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	255
5.2. QUIMIOLUMINISCENCIA DEL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ CON LA AMIODARONA Y LA DESETILAMIODARONA.....	258
5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	260
5.3.1. Optimización de las condiciones de reacción	261
5.3.2. Optimización de las condiciones para la separación por HPLC.....	264
5.3.3. Procedimiento experimental	267
5.3.4. Líneas de calibrado y características analíticas.....	268
5.3.5. Aplicaciones.....	271
5.3.5.1. Determinación en suero sanguíneo.....	271

	<u>Página</u>
5.3.5.2. Determinación de amiodarona en productos farmacéuticos.....	275
5.4. BIBLIOGRAFÍA.....	278

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMIODARONA Y DESETILAMIODARONA POR HPLC CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

5.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La amiodarona, 2-butil-3-benzofuranil-[4-(2-dietilamino)etoxi]-3,5-diiodofenilcetona, es una droga compleja con características singulares diversas. Originalmente su interés estaba relacionado con su efectividad en los casos de angina de pecho como consecuencia de que ralentiza la velocidad cardíaca y dilata los vasos sanguíneos, incluyendo las arterias coronarias. En época más reciente ha sido reconocida como un potente fármaco antiarrítmico con acciones que afectan a varias familias diferentes de receptores. La amiodarona ha sido descrita como un fármaco antiarrítmico de la clase III, pero realmente sus efectos incluyen múltiples mecanismos de acción (1)*. Generalmente se la considera como el fármaco de elección para el tratamiento de re-entrada en taquicardias asociadas con el síndrome Wolf-Parkinson-White (2). Los datos farmacocinéticos indican que la amiodarona se distribuye extensamente y se enlaza a los tejidos, con un tiempo de vida media prolongado (unos 28 días) (3).

* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 278.

El metabolismo de la amiodarona no está aún completamente dilucidado. Su principal metabolito es la desetilamiodarona, molécula resultante de la N-desetilación catalizada por los enzimas hepáticos citocromo P450 (4, 5). Este metabolito es farmacológicamente activo y contribuye a los efectos antiarrítmicos (6). Las estructuras de la amiodarona y de la desetilamiodarona se presentan en la Figura 5.1.

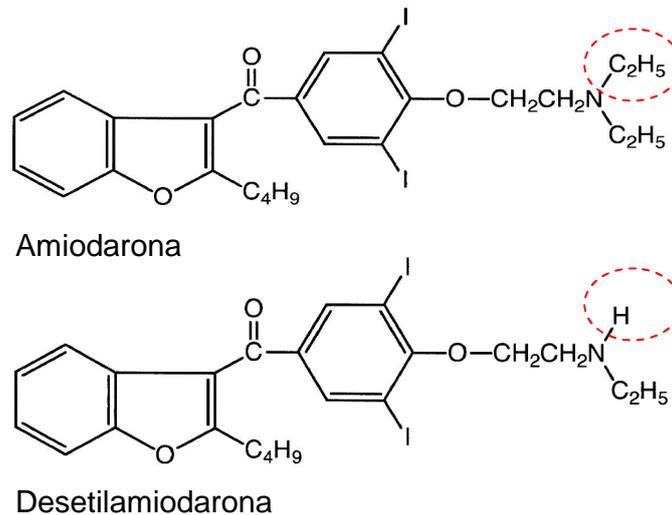


Figura 5.1. Estructuras de amiodarona y desetilamiodarona.

Los efectos adversos conocidos de la amiodarona incluyen hipo- e hipertiroidismo, fibrosis pulmonar, así como toxicidad cutánea, neurológica y gastrointestinal (7-9). Algunos de estos efectos secundarios están estrechamente relacionados, lo que sugiere la

necesidad de aplicar a los pacientes las dosis efectivas más bajas posibles y realizar un seguimiento consciente del fármaco. De lo anteriormente expuesto queda patente la necesidad de disponer de métodos analíticos aplicables al análisis de rutina para la amiodarona y la desetilamiodarona, que permitan su cuantificación segura, específica y sensible.

Se han descrito métodos útiles para la determinación de amiodarona en preparaciones farmacéuticas que incluyen las valoraciones potenciométricas (10), espectrofotometría (11, 12), espectroscopia infrarroja (13), fluorimetría (14), métodos electroquímicos (15, 16) y cromatografía líquida (17, 18).

La determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma humano ha sido abordada por HPLC (19-23), por electroforesis capilar (24), así como por cromatografía micelar electrocinética (25), utilizando en todos los casos la absorbancia en el UV como sistema de detección. Este tipo de detección presenta como defecto su falta de especificidad. El acoplamiento del HPLC con la espectrometría de masas (LC-MS) o el tándem LC-MS/MS han sido aplicados a la determinación específica y sensible de la amiodarona y de su metabolito (26, 27).

Dado el interés creciente que ha despertado la aplicación de sistemas de detección QL en HPLC, debido a sus excelentes características de sensibilidad y especificidad, nos propusimos resolver las mezclas amiodarona/desetilamiodarona por HPLC acoplado a un sistema de detección fotoquímico-quimioluminiscente, concretamente incorporando el reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ formado por fotogeneración a partir de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y peroxidisulfato, especie que,

como se ha expuesto en el anterior Capítulo, nos había conducido a excelentes resultados analíticos en la determinación de ácidos aminopolicarboxílicos.

5.2 QUIMIOLUMINISCENCIA DEL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ CON LA AMIODARONA Y LA DESETILAMIODARONA

En una etapa previa a la separación cromatográfica de la amiodarona y de su metabolito, se investigó el comportamiento de estas sustancias cuando en un sistema de flujo se incorporan a un canal por el que circula $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotogenerado en las condiciones ya optimizadas en trabajos anteriores. Se comprobó que para conseguir una eficaz emisión quimioluminiscente era necesario que los analitos, amiodarona y desetilamiodarona, también experimentaran un proceso de fotólisis. En estos estudios previos se utilizó el diagrama FI que se presenta en la Fig. 5.2.

Inicialmente se empleó un sistema FI reverso para minimizar el consumo de la disolución de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, de elevado precio. Es decir, la configuración FI consistía en dos corrientes: una de la muestra sobre la que se inyectaba el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y otra de peroxidisulfato situada al pH seleccionado con ayuda de una disolución reguladora. Ambas corrientes se mezclaban antes de alcanzar un fotorreactor construido con PTFE arrollado en espiral alrededor de una lámpara de mercurio tipo lápiz. Sin embargo, el esquema de flujo se cambió posteriormente por otro más conveniente para el análisis, el presentado en la Fig. 5.2, en el que tanto la muestra (amiodarona o desetilamiodarona) como el reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se insertan simultáneamente en el sistema con ayuda de dos válvulas

rotatorias, la muestra sobre una disolución reguladora y el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ sobre la corriente de peroxidisulfato a pH 5,7. Ambas corrientes son fotolizadas antes de unirse en la célula de quimioluminiscencia para reaccionar y emitir luz.

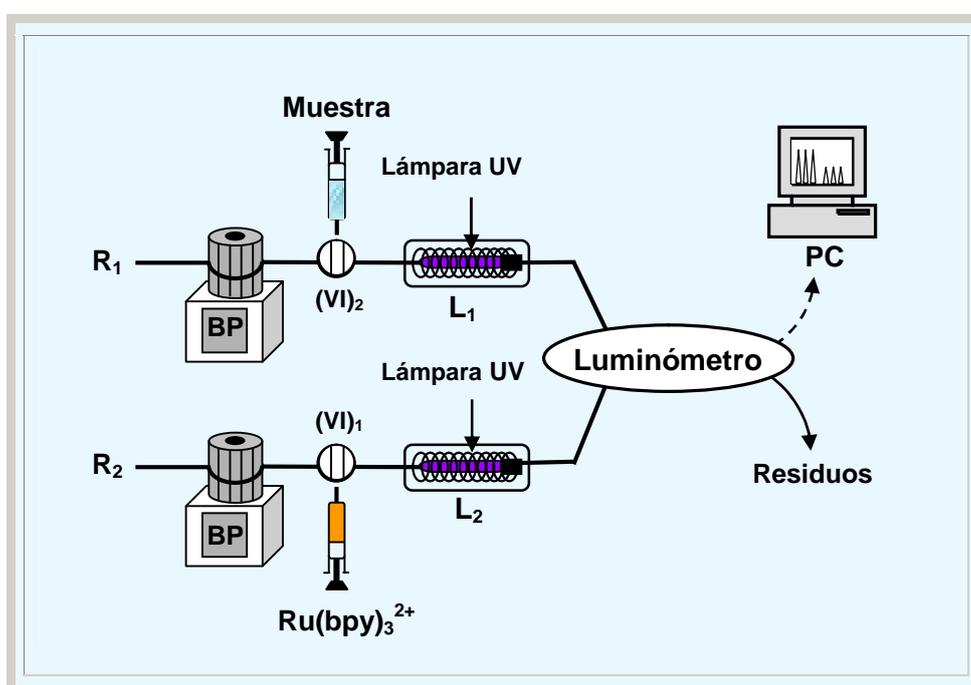


Figura 5.2. Esquema FI para la determinación de amiodarona.

Ya se ha demostrado en estudios previos (28) que el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ puede reaccionar con una amplia variedad de aminas alifáticas para generar una luz amarilla-anaranjada con un tiempo de vida de menos de 1 s. Esta quimioluminiscencia es debida,

probablemente, a que el radical de la amina, formado cuando reduce al $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, reacciona bien con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ o con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ adicional para formar $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]^*$ que emite luz cuando vuelve al estado fundamental (29). En este mecanismo está claro que la amina debe contener sustituyentes que favorezcan la formación de radicales activos; sin embargo, los sustituyentes no deben estabilizar a los radicales formados, puesto que en ese caso serían inactivos con el ión $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ (30). Esta afirmación queda evidente cuando se consideran aminas aromáticas y aminas aromáticas sustituidas en las que el radical, o carga positiva, puede ser deslocalizado con efectividad y que no presentan quimioluminiscencia (31).

Nosotros hemos observado que la amiodarona y la desetilamiodarona no producen señal quimioluminiscente en presencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, a pesar de que estas sustancias contienen grupos funcionales amina secundaria y amina terciaria, respectivamente. Teniendo en cuenta este hecho, decidimos estudiar si cuando estas moléculas eran sometidas a la acción de la luz UV existía la posibilidad de un cambio en sus estructuras moleculares y de que tuviera lugar la reacción quimioluminiscente. Efectivamente, se comprobó que las dos especies fotoirradiadas previamente producían una señal QL muy intensa con el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$.

5.3 DESARROLLO DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Estos estudios se programaron teniendo en cuenta ante todo la necesidad de compatibilizar las condiciones adecuadas para la separación cromatográfica de la amiodarona y su metabolito y las de la reacción quimioluminiscente post-columna. Por ello se realizó una

optimización rigurosa y secuencial en varias etapas, utilizando el esquema experimental de la Fig. 5.3.

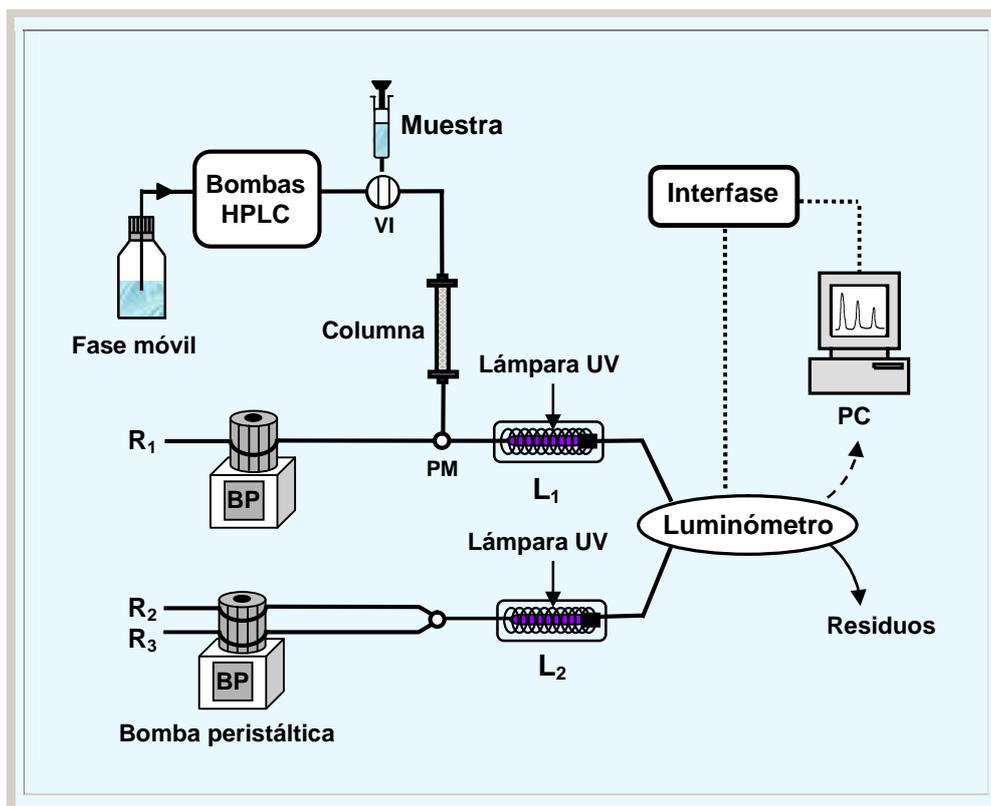


Figura 5.3. Esquema HPLC–QL propuesto para la determinación de amiodarona y desetilamiodarona.

5.3.1 Optimización de las condiciones de reacción

La generación del reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ se llevó a cabo sobre la base de estudios previos realizados por nuestro equipo (32, 33). En el

procedimiento propuesto, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y peroxidisulfato circulaban por canales separados impulsados por la bomba peristáltica y emergían en el fotorreactor L_2 .

La reacción quimioluminiscente entre el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ y la amiodarona o la desetilamiodarona depende de la fotoconversión del analito en el fotoproducto activo y su posterior interacción con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Dos parámetros muy importantes afectan al rendimiento de la reacción de derivatización de estos analitos: por una parte, el tiempo de irradiación y, por otra, el disolvente utilizado. Nuestros estudios en baño habían demostrado que la señal quimioluminiscente aumentaba con el tiempo de irradiación hasta los dos minutos de fotólisis. Este comportamiento es el que ocurre cuando se utilizan las mezclas binarias agua-metanol y agua-etanol. En presencia de acetona la quimioluminiscencia aumenta extraordinariamente, por ello se estudió la influencia de la concentración de acetona entre 0,5 y 10 %. Una concentración final en acetona del 2 % en la célula de flujo fue la seleccionada puesto que era suficiente para alcanzar una eficiencia conveniente en la fotoderivatización de ambos analitos; las concentraciones mayores de acetona provocaban unos elevados valores del blanco.

A intensidad de irradiación constante, el tiempo de iluminación afecta a la reacción fotoquímica y de ahí a la sensibilidad obtenida. El tiempo de residencia del analito en el fotorreactor L_1 se puede seleccionar controlando el caudal de la corriente portadora y/o la longitud del reactor. Una buena señal QL se obtenía utilizando un reactor de 100 cm y un caudal en la corriente portadora de $2,5 \text{ ml min}^{-1}$.

La eficiencia de la emisión de luz en la reacción entre el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ y la amiodarona o desetilamiodarona derivatizadas fotoquímicamente está afectada por el pH de manera importante. En la Figura 5.4 se muestran los valores de quimioluminiscencia obtenidos a diferentes valores de pH, así como las señales de los blancos correspondientes a cada pH. Aunque un aumento en el pH provoca un aumento en la quimioluminiscencia, no es conveniente trabajar a pH superiores a 7,5 a causa de que en esas condiciones las señales debidas al blanco también aumentan mucho como resultado de que los iones hidroxilo reducen el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ con emisión quimioluminiscente (34). Para conseguir un pH adecuado en la célula de flujo se hacía circular por el canal R_1 una disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 8.

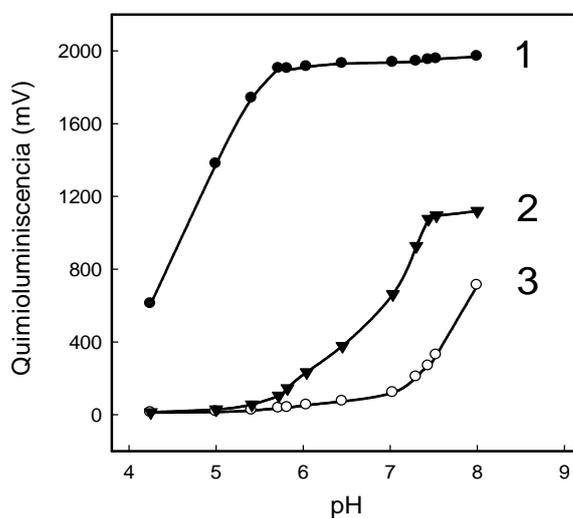


Figura 5.4. Efecto del pH sobre la intensidad de quimioluminiscencia de la amiodarona (1) y la desetilamiodarona (2). Emisión del blanco (3).

Condiciones: concentración de los analitos $1,5 \times 10^{-5}$ M; $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2×10^{-3} M.

El caudal es un parámetro de gran importancia para la detección de la emisión de quimioluminiscencia en la célula de flujo. La influencia del caudal fue estudiada utilizando para mayor sencillez un sistema de dos bombas peristálticas, eliminando para estas experiencias la bomba cromatográfica del esquema representado en la Figura 5.3. Si se mantiene constante el tiempo de residencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y del analito en los fotorreactores, la intensidad de quimioluminiscencia aumenta cuando lo hace el caudal. Un caudal global de $6,1 \text{ ml min}^{-1}$ ha sido el seleccionado, ya que caudales mayores producen demasiada presión en los tubos de flujo y en las conexiones, junto con un gasto excesivo de reactivos. Con la finalidad de asegurar la eficiencia en la fotoconversión de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, el caudal del complejo de rutenio (II) y del peroxidisulfato se fijaron a su valor óptimo, $1,8 \text{ ml min}^{-1}$; de ahí que el caudal del portador deba ser $2,5 \text{ ml min}^{-1}$. Como para el esquema HPLC–QL la disolución reguladora fosfato de pH 8 debía circular a un caudal de $1,7 \text{ ml min}^{-1}$, se ha escogido para el eluyente como caudal óptimo el de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Con todos estos valores para los diferentes caudales es como se efectuaron las experiencias posteriores.

5.3.2 Optimización de las condiciones para la separación por HPLC

Teniendo en cuenta el tipo de detección seleccionado, acoplamiento HPLC con un sistema fotoquímico–quimioluminiscente, la fase móvil que se utilice no sólo debe ser adecuada para una buena separación de los analitos, amiodarona y desetilamiodarona, sino que también debe ser compatible con la reacción quimioluminiscente.

Varias fases móviles han sido empleadas en diversas ocasiones para la separación de estas sustancias utilizando columnas en fase reversa. En la mayoría de los métodos se trabaja con una fase móvil en modo isocrático, generalmente acetonitrilo o metanol combinados con disoluciones acuosas de hidróxido amónico (35), sulfato amónico (36), acetato amónico (18), fosfato disódico (37) y ácido acético (38). En ocasiones el éter etílico ha sido empleado junto con el metanol (19, 20). Nosotros comprobamos que las mezclas binarias metanol-sulfato amónico acuoso, reguladas a pH 6,8 eran convenientes para la buena separación de los citados analitos y, además, eran compatibles con el sistema quimioluminiscente. A continuación se realizó un estudio para establecer la concentración más adecuada de la disolución de sulfato amónico en el rango comprendido entre 10 - 50 mM, seleccionando trabajar con una disolución 17 mM para obtener resultados óptimos. Otro estudio de interés fue comprobar la composición más conveniente de la fase móvil comparando los resultados obtenidos con diferentes mezclas binarias metanol-sulfato amónico 17 mM. Como consecuencia de las experiencias realizadas, una composición de metanol-sulfato amónico de 92:8 fue la seleccionada, ya que conduce a muy buena resolución para la amiodarona y desetilamiodarona con tiempos apropiados de análisis. Se ensayaron diferentes caudales de eluyente (0,6, 0,8, 1,0 y 1,2 ml min⁻¹) y se comprobó que la señal aumenta ligeramente cuando lo hace el caudal de la fase móvil pero la separación es peor. Por tanto, se seleccionaron los caudales de 0,8 ml min⁻¹ para el eluyente y de 1,7 ml min⁻¹ para la disolución reguladora fosfato, como un compromiso entre sensibilidad y resolución.

En la Tabla 5.1 se muestran los valores óptimos encontrados para cada una de las variables estudiadas.

Tabla 5.1
Valores óptimos para las variables del sistema HPLC–QL propuesto para la
determinación de amiodarona y desetilamiodarona

<i>Variable</i>	<i>Valor óptimo</i>
<i>Cromatografía</i>	
Composición de la fase móvil	Metanol–(NH ₄) ₂ SO ₄ 17 mM de pH 6,8 (92:8)
Caudal de la fase móvil	0,8 ml min ⁻¹
Volumen de inyección	50 µl
<i>Sistema de detección</i>	
Fotorreactores	L ₁ (100 cm x 0,5 mm) L ₂ (200 cm x 0,5 mm)
Canal R ₁	Disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 8, acetona 5 % (1,7 ml min ⁻¹)
Canal R ₂	Peroxidisulfato 1,5 mM y disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7 (1,8 ml min ⁻¹)
Canal R ₃	Ru(bpy) ₃ ²⁺ 2 mM (1,8 ml min ⁻¹)

5.3.3 Procedimiento experimental

Para la separación cromatográfica se ha utilizado un sistema instrumental Beckman Coulter compuesto por un módulo de disolventes System Gold 125 NM, un detector de diodos en serie System Gold 168 y una válvula de inyección Rheodyne 7725 con un lazo de 50 μ l. La columna analítica utilizada ha sido la Mediterranea C₁₈ de Teknokroma, precedida por una guarda-columna de Teknokroma. La fase móvil consistía en una mezcla metanol-sulfato amónico 17 mM a pH 6,8, en la proporción 92:8 y circulaba con un caudal de 0,8 ml min⁻¹. Para detectar la quimioluminiscencia se ha utilizado un luminómetro Camspec CL-2 con una célula de flujo de tres puertas, conectado al equipo de HPLC por medio de una interfase SS420x. Un ordenador personal IBM con el software 32 Karat (Beckman) se empleó para la recogida y el tratamiento de datos. Dos bombas peristálticas Gilson Minipuls-3 se encargaban de impulsar las corrientes de reactivos.

En el sistema post-columna se incorporaron dos fotorreactores, cada uno consistente en tubos de PTFE (de 0,5 mm de diámetro interno y de longitudes $L_1 = 100$ cm y $L_2 = 200$ cm) enrollados alrededor de las lámparas de mercurio de baja presión Spectronic, de forma de lápiz (50 mm de longitud x 5 mm de diámetro). Las lámparas de 6 W presentan la principal línea espectral a 254 nm. Los fotorreactores se alojan en una caja metálica cubierta con espejos para aumentar el flujo de fotones por reflexión.

El eluido de la columna de HPLC se mezclaba con una disolución reguladora de fosfato 50 mM de pH 8 conteniendo un 5 %

de acetona, que fluía con un caudal de $1,7 \text{ ml min}^{-1}$, y era irradiado con la luz UV al pasar por el fotorreactor L_1 ; así los analitos se transformaban en especies capaces de reaccionar con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ para dar quimioluminiscencia. El efluente de la fotólisis del reactor L_1 se dirigía finalmente a una entrada de la célula de quimioluminiscencia.

En la línea de fotogeneración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, se bombeaban a unos caudales de $1,8 \text{ ml min}^{-1}$, en canales independientes, disoluciones de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 2 mM y de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1,5 mM en disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7. Ambas corrientes se unían en el fotorreactor L_2 en el que se formaba $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ que se dirigía hacia la otra entrada de la célula de flujo. Así, la mezcla de las disoluciones procedentes de L_1 y L_2 tiene lugar en el interior de la célula donde se obtiene una alta señal quimioluminiscente.

5.3.4 Líneas de calibrado y características analíticas

Operando en las condiciones experimentales seleccionadas, recogidas en la Tabla 5.1, y utilizando el sistema presentado en el esquema de la Figura 5.3, se construyeron líneas de calibrado utilizando doce estándares cubriendo todo el rango lineal y analizando cada punto por triplicado. Se demostró que existía una buena linealidad (valores de $r > 0,999$) entre área de pico y concentración, para la amiodarona y para la desetilamiodarona, tal como se resume en la Tabla 5.2, en los intervalos de concentración comprendidos entre $0,1$ y $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ y $0,5$ y $25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Los límites de detección y cuantificación se calcularon mediante un estudio estadístico, siguiendo el criterio de

3 y 10 veces la desviación estándar de la señal correspondiente a diez disoluciones del blanco dividida por la pendiente de la línea de calibrado. La desviación estándar relativa en el mismo día se calculó utilizando diez disoluciones idénticas conteniendo $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de amiodarona y $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de desetilamiodarona; siempre se encontraron valores inferiores al 0,9 %. La precisión entre días del método se estudió analizando una de las muestras anteriores durante cinco días consecutivos; cada día la muestra se inyectaba tres veces y los valores de RSD para estos ensayos fueron menores que 1,6 %.

Tabla 5.2

Características analíticas del método HPLC–QL propuesto (obtenidas utilizando disoluciones estándares)

<i>Analito</i>	<i>Y = A + B C</i>			<i>Límite de detección (µg ml⁻¹)</i>	<i>Precisión</i>	
	<i>A (10⁵ unidades de área)</i>	<i>B (10⁵ unidades de área /µg ml⁻¹)</i>	<i>r</i>		<i>Repetitividad (RSD, %)</i>	<i>Reproducibilidad (RSD, %)</i>
Amiodarona	8,3 ± 2,3	16,0 ± 0,1	0,9996	0,02	0,9 ^a	1,6 ^a
Desetilamiodarona	1,5 ± 0,5	2,86 ± 0,05	0,9992	0,11	0,8 ^b	1,1 ^b

C: Concentración analítica en µg ml⁻¹; A: ordenada en el origen de las líneas de calibración ± desviación estándar; B: pendiente de las líneas de calibración ± desviación estándar.

Concentración de los analitos: (a) 2 µg ml⁻¹; (b) 10 µg ml⁻¹.

5.3.5 Aplicaciones

Las características del sistema de detección quimioluminiscente propuesto conducen a cromatogramas muy sencillos cuando se aplica el método a la determinación de amiodarona y su metabolito en muestras reales. Para evaluar la aplicabilidad del método aquí aportado se analizaron estos analitos en suero humano y en preparados farmacéuticos comerciales.

5.3.5.1 Determinación en suero sanguíneo

A las muestras de suero se les adicionaron diferentes cantidades de ambos analitos (amiodarona y desetilamiodarona) entre 0,5 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, concentraciones que, de acuerdo con la bibliografía, corresponden a valores observados en el plasma después de una dosis oral de 400 mg de amiodarona.

El procedimiento a seguir era muy sencillo: 1 ml de la muestra se colocaba en un tubo de ensayo, añadiéndole 2 ml de acetonitrilo para precipitar las proteínas. El tubo se agitaba durante 30 s y se mantenía 10 min a temperatura ambiente, centrifugando a continuación a 3000 x g durante 2 min. Seguidamente, el líquido sobrenadante se transfería a un evaporador a vacío, evaporando hasta sequedad bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo final se disolvía en metanol para proceder al análisis.

Experiencias previas confirmaron la linealidad y precisión de los resultados obtenidos para las áreas de pico en los ensayos realizados con muestras de suero reforzadas con amiodarona y desetilamiodarona en el amplio intervalo de concentraciones

estudiado. Los coeficientes de correlación de las rectas de regresión fueron de 0,999 o superiores. La precisión del método se calculó determinando cuatro concentraciones entre 1 y 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en ocho series de muestras independientes y los resultados se presentan en la Tabla 5.3. Los datos de precisión día a día en un periodo de cinco días de trabajo fueron de RSD < 1,3 % en todos los casos.

Tabla 5.3
Estudios de recuperación en suero sanguíneo

<i>Analito</i>	<i>Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>Cantidad encontrada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
Amiodarona	1,0	0,97	0,72	97 ± 2
	1,5	1,45	0,85	97 ± 3
	2,0	1,96	0,31	98 ± 2
	2,5	2,38	0,35	95 ± 2
Desetilamiodarona	1,5	1,45	1,09	97 ± 4
	2,0	1,92	0,94	96 ± 3
	2,5	2,47	0,67	99 ± 1
	3,0	2,91	1,32	97 ± 3

Una muestra de suero procedente de un paciente varón que había recibido una dosis diaria de 400 mg de amiodarona al menos durante un mes se analizó repetidamente. Los resultados dieron como valor medio $1,98 \mu\text{g ml}^{-1}$ (SD = 0,05; n = 6) para la amiodarona y $1,52 \mu\text{g ml}^{-1}$ (SD = 0,07; n = 6) para la desetilamiodarona.

La Figura 5.5 muestra los cromatogramas típicos para un blanco de suero y otra muestra de suero conteniendo los analitos, utilizando tanto la detección fotométrica a 242 nm como la detección quimioluminiscente. Como puede observarse los cromatogramas obtenidos con el sistema de detección QL aquí propuesto son más simples debido a la ausencia de otros picos y como consecuencia aumenta la selectividad del sistema de detección.

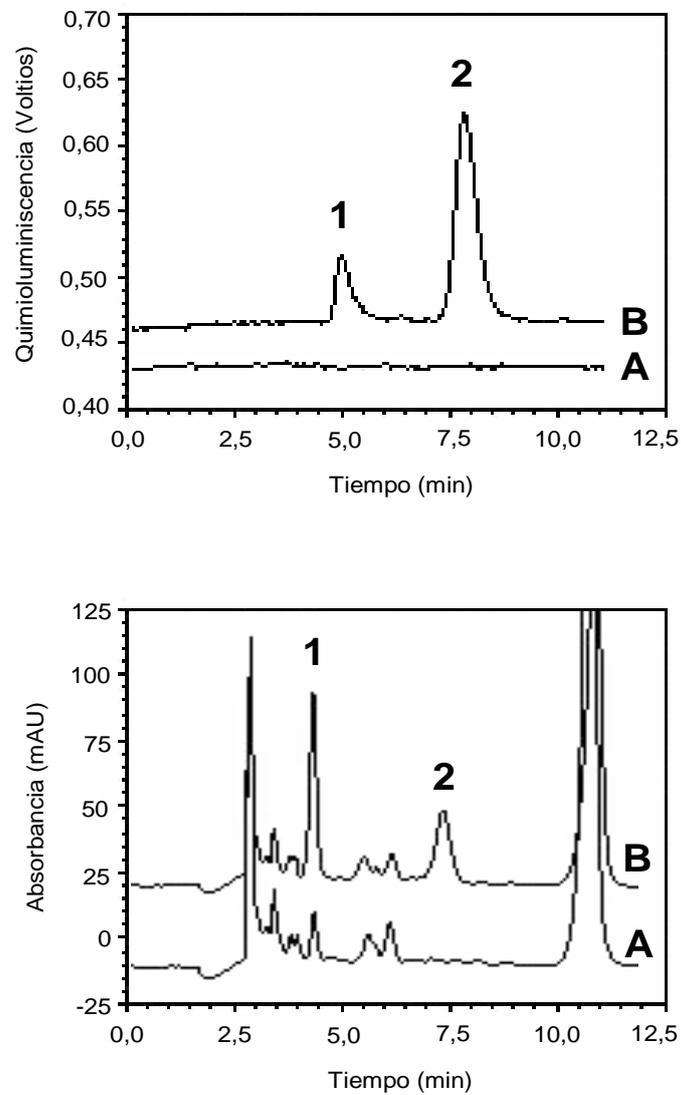


Figura 5.5. Cromatogramas de (A) un blanco de suero sanguíneo humano y (B) suero con amiodarona ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) y desetilamiodarona ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Arriba: detección quimioluminiscente. Abajo: detección fotométrica a 242 nm.
Picos: (1) desetilamiodarona; (2) amiodarona.

5.3.5.2 Determinación de amiodarona en productos farmacéuticos

El mismo método HPLC–QL ha sido utilizado para determinar amiodarona en formulaciones farmacéuticas comerciales.

Diez tabletas de amiodarona se pesaron y pulverizaron. Una porción exactamente pesada equivalente a 50 mg de amiodarona fue disuelta en 50 ml de metanol y tratada durante 5 min con ultrasonidos, diluyendo a continuación hasta 100 ml con metanol. Después de filtrar, alícuotas del filtrado fueron posteriormente diluidas con metanol, de forma que la concentración del analito estuviera en el rango comprendido entre 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los resultados obtenidos se incluyen también en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4
Determinación de amiodarona en formulaciones farmacéuticas

Muestra (fabricante) ^a	Contenido declarado	Amiodarona encontrada	
		Método propuesto ^b	Método de referencia ^c
Trangorex / Ampollas (Sanofi-Synthelabo)	50 mg ml ⁻¹	49,1 ± 0,6	49,5 ± 0,4
Trangorex / Comprimidos (Sanofi-Synthelabo)	200 mg/comprimido	196 ± 3	197 ± 2

^a Composición: **Trangorex ampollas** (por 3 ml): clorhidrato de amiodarona 150 mg; excipientes: alcohol bencílico, Tween 80 y agua. **Trangorex comprimidos** (por comprimido): clorhidrato de amiodarona 200 mg; excipientes: lactosa, almidón, estearato magnésico, povidona y sílice coloidal.

^b Media de 4 determinaciones ± desviación estándar.

^c Método HPLC con detección UV (39).

Como resumen de las aplicaciones realizadas podemos afirmar que el método HPLC–QL propuesto para la determinación de amiodarona y desetilamiodarona es sencillo y sensible, permite la separación de estos compuestos en menos de nueve minutos y conduce a excelentes resultados analíticos en muestras de interés farmacéutico y, lo que es de mayor interés, cuando se aplica a la evaluación de estas sustancias en suero sanguíneo.

En la Tabla 5.5 se resumen las características analíticas de distintos métodos cromatográficos y electroforéticos encontrados en la bibliografía para estos analitos, y como puede observarse, el método propuesto presenta límites de detección parecidos a los que emplean HPLC, MEKC y CZE con detección ultravioleta. La combinación HPLC y MS/MS es de mejor sensibilidad pero mucho más cara.

La principal ventaja de la derivatización post-columna basada en la irradiación UV para generar fotoproductos a partir de los analitos y el complejo activo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, es que los analitos se separan en su forma original sin necesidad de una reacción de derivatización completa (asumiendo la reproducibilidad) y que los productos de la fotólisis no necesitan ser estables durante mucho tiempo.

Además, destacamos nuevamente las principales características de los cromatogramas obtenidos con el sistema de detección propuesto, que son la gran estabilidad y baja señal de la línea base, así como la ausencia de picos interferentes.

Tabla 5.5
Características analíticas de algunos métodos de determinación de
amiodarona y desetilamiodarona

Ref.	Técnica	Detección	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Límite de detección (ng ml^{-1})	
			AMIO	DESAMIO	AMIO	DESAMIO
(19)	NP – LC	UV	0,1 – 5		50	
(22)	RP – LC	UV	0 – 20	0 – 20	160	160
(39)	RP – LC	UV	0,1 – 5	0,1 – 5	25	25
(21)	RP – LC	UV	0,5 – 3	0,5 – 3	50	50
(27)	RP – LC	ESI/MS/MS	0,05 – 5	0,05 – 5	1	0,5
(24)	CZE	UV	0,23 – 5,6	0,19 – 4,6	51	49
(25)	MEKC	UV	0,08 – 20	0,08 – 20	4,6	5,1
Este trabajo	RP – LC	QL	0,1 – 50	0,5 – 25	20	110

AMIO = Amiodarona. DESAMIO = Desetilamiodarona. RP–LC = Cromatografía líquida en fase reversa. NP–LC = Cromatografía líquida en fase normal. MEKC = Cromatografía micelar electrocinética. CZE = Electroforesis capilar en zona. UV = Detección UV. ESI/MS/MS = Espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización. QL = Detección quimioluminiscente.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- D.M. Roden, in: Goodman and Gilman's, "The Pharmacological Basic of Therapeutics", 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 953-956.
- 2.- S. Nattel, M. Talajic, *Drugs*, **36** (1988) 121.
- 3.- D.W. Holt, G.T. Tucker, P.R. Jackson, G.C.A. Story, *Am. Heart J.*, **106** (1983) 840.
- 4.- G. Fabre, B. Julian, B. Saint-Auber, H. Joyeux, Y. Berger, *Drug Metab. Dispos.*, **21** (1993) 978.
- 5.- K. Ohyama, M. Nakajima, S. Nakamura, N. Shimada, H. Yamazaki, T. Yokoi, *Drug Metab. Dispos.*, **28** (2000) 1303.
- 6.- R.T. Pallandi, T.J. Campbell, *J. Pharmacol.*, **92** (1987) 97.
- 7.- B.N. Singh, K. Nademanee, *Am. Heart J.*, **106** (1983) 857.
- 8.- J.J. Heger. E.N. Prystowsky, D.p. Zipes, *Am. Heart J.*, **106** (1983) 931.
- 9.- T. Peter, A. Hamer, W.J. Mandel, D. Weiss, *Am. Heart J.*, **106** (1983) 943.
- 10.-Real Farmacopea Española, Ministerio de Sanidad y Consumo, 2^a ed., 2002, pp. 729-730.
- 11.-T.S. Rao, P.S.N.H. Ramachandra Rao, A.V.S.S. Prasad, C.S.P. Sastry, *Oriental J. Chem.*, **17** (2001) 407.

- 12.-N. Rahman, N.A. Khan, S.N.H. Azmi, *Anal. Sci.*, **20** (2004) 1231.
- 13.-R. Jensen, E. Peuchant, I. Castagne, A.M. Boirac, G. Roux, *Spectroscopy*, **6** (1988) 63.
- 14.-E. Mohamed, E.K. Naglaa, M.A. Bahia, M.G. Nashua, *Bull. Fac. Pharm.*, **36** (1998) 1.
- 15.-R.V. Ball, G.M. Eckert, F. Gutmann, D.K.Y. Wong, *Electroanalysis*, **8** (1996) 66.
- 16.-R.I. Stefan, H.Y. Aboul-Enien, G.E. Baivlescu, *Sens. Actuators*, **37** (1996) 141.
- 17.-A.M. Di Pietra, V. Cavrini, R. Gatti, M.A. Raggi, *Pharm. Res.*, **5** (1988) 709.
- 18.-P.M. Lacroix, N.M. Curran, W.-W Sy, D.K.J. Gorechi, P. Thibault, P.K.S. Blay, *J. AOAC Int.*, **77** (1994) 1447.
- 19.-R.J. Flanagan, G.C.A. Storey, D.W. Holt, *J. Chromatogr.*, **187** (1980) 391.
- 20.-M. Bliss, M. Mayersohn, P. Nolan, *J. Chromatogr.*, **381** (1986) 179.
- 21.-C. Pham Huy, S. Costa, S. Nany, J.R. Claude, M. Hamon, *Anal. Lett.*, **24** (1991) 603.
- 22.-M.A. Jandreski, W.E. Vanderslice, *Clin. Chem.*, **39** (1993) 496.
- 23.-H.R. Ha, P. Kozlik, B. Stieger, L. Bigler, F. Follath, *J. Chromatogr. B*, **757** (2001) 309.
- 24.-C.-H. Zhang, Y. Aebi, W. Thormann, *Clin. Chem.*, **42** (1996) 1805.

-
- 25.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, *Chromatographia*, **56** (2002) 63.
- 26.-S.W. Myung, Y.J. Chang, H.K. Min, D.H. Kim, M. Kim, T.K. Kang, E.A. Yoo, Y.T. Sohn, Y.H. Yim, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14** (2000) 2046.
- 27.-M. Kollroser, C. Schober, *J. Chromatogr. B*, **766** (2002) 219.
- 28.-R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 1.
- 29.-J.B. Noffsinger, N.D. Danielson, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 865.
- 30.-A.W. Knight, G.M. Greenway, *Analyst*, **121** (1996) 101 R.
- 31.-M.E. Bolden, N.D. Danielson, *J. Chromatogr. A*, **828** (1998) 421.
- 32.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst*, **127** (2002) 1526.
- 33.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **476** (2003) 141.
- 34.-D.M. Hercules, F.E. Lytle, *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (1996) 4745.
- 35.-J.M. Trivier, J. Pommery, C. Libersa, J. Caron, M. Lhermitte, *J. Chromatogr.*, **579** (1992) 269.
- 36.-C.N. On, C.L. Rognerud, L.T. Duong, V.L. Frawley, *Clin. Chem.*, **36** (1990) 532.
- 37.-A.A. Al-Dhawaile, *Anal. Lett.*, **28** (1995) 2391.

- 38.-N. Hanioka, Y. Saito, A. Soyama, M. Ando, S. Ozawa, J. Sawada,
J. Chromatogr. B, **774** (2002) 105.
- 39.-T.A. Plomp, M. Engels, E.O. Robles de Medina, R.A.A. Maes,
J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **273** (1983) 379.

CAPÍTULO 6

**DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS
N-METILCARBAMATOS POR HPLC
CON FOTOLISIS POST-COLUMNA Y
DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE**

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS POR HPLC CON FOTOLISIS POST-COLUMNNA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

	<u>Página</u>
6.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	287
6.2. FOTOLISIS DEL PROPOXUR.....	293
6.2.1. Determinación de propoxur	297
6.2.2. Estudio de interferencias	298
6.2.3. Procedimiento de extracción en fase sólida	299
6.2.4. Análisis de muestras de agua	302
6.2.5. Análisis de propoxur en frutas y verduras.....	306
6.3. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS POR HPLC CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.....	308
6.3.1. Fotolisis de los pesticidas N-metilcarbamatos	310
6.3.2. Optimización del sistema acoplado HPLC–QL	311

	<u>Página</u>
6.3.3. Procedimiento experimental.....	318
6.3.4. Validación del método.....	319
6.3.5. Aplicaciones.....	322
6.3.5.1. Análisis de muestras de agua.....	322
6.3.5.1.1. Aplicación a muestras de agua reales.....	325
6.3.5.2. Análisis de muestras de fruta.....	328
6.4. BIBLIOGRAFÍA.....	333

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS POR HPLC CON FOTOLISIS POST-COLUMNA Y DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

6.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los N-metilcarbamatos (NMCs) constituyen un importante grupo de pesticidas ampliamente utilizados en agricultura que se caracterizan por su relativamente corta persistencia en el medio ambiente. Existen en el mercado aproximadamente una treintena de estos pesticidas asequibles comercialmente, siendo los más comunes propoxur, carbaril, promecarb, isoprocarb y bendiocarb. Sus residuos pueden aparecer en frutas, verduras y aguas superficiales y, por tanto, existe un posible riesgo para el consumidor, potenciado por la alta solubilidad en agua que presentan algunos de ellos, por ejemplo el propoxur. Por ello, los valores admitidos de residuos de estos pesticidas están regulados por organismos internacionales. Por ejemplo, el *European Drinking Water Directory* impone un límite en algunos de 0,1 ng ml⁻¹.

La cromatografía líquida (HPLC) es la técnica preferida para evaluar en general los pesticidas N-metilcarbamatos, ya que muchos

de ellos carecen de la estabilidad térmica necesaria para su determinación por cromatografía de gases. Para HPLC no se requiere en principio ninguna derivatización y en las muestras acuosas se pueden analizar los pesticidas directamente o después de una preconcentración, siendo muy adecuado para estos compuestos aplicar la cromatografía líquida en fase reversa (1-3)*.

En la determinación de pesticidas NMCs por HPLC el método de detección más común, hasta 1990, era la medida de la absorbancia en el ultravioleta (4). Sin embargo, esta detección en el ultravioleta está sujeta a interferencias de sustancias que acompañen a la muestra y también a problemas de sensibilidad para algunos compuestos, dos factores que limitaban en parte su utilidad en el análisis de muestras medioambientales (5).

La hidrólisis post-columna y la derivatización de los NMCs acoplada con la detección fluorescente se ha aplicado para muestras con matrices complejas tales como plantas, suelos, carnes y también aguas (6-9). Reacciones post-columna fueron descritas por primera vez por Moye y col. (10), que hidrolizan los NMCs con NaOH a 90 °C para formar metilamina (MA), proceso seguido por la condensación con o-ftalaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (MERC) para producir un compuesto isoindol de elevada fluorescencia. Esta técnica es la base del *EPA Method 531* (11). Modificaciones posteriores incluyen un reactor catalítico en fase sólida, consistente en una columna de resina intercambiadora de aniones mantenida a una temperatura entre 100 y 120 °C (12), un reactor fotolítico en el ultravioleta (13) o

* La bibliografía de este Capítulo se encuentra en la página 333.

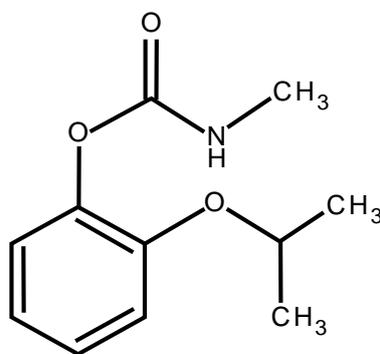
el empleo de sales de amonio cuaternarias (14) para acelerar la hidrólisis antes de la derivatización con OPA-MERC.

Otras metodologías utilizadas son HPLC acoplado a espectrometría de masas (LC-MS) o el tándem espectrometría de masas-masas (LC-MS/MS), técnicas que se han aplicado a la identificación y cuantificación de NMCs y otros pesticidas polares y térmicamente lábiles (2, 15, 16). La razón es que el avance en años recientes de la LC-MS ha mejorado notablemente la posibilidad de identificación y/o confirmación de estos tipos de compuestos en concentraciones muy bajas (17, 18).

Nosotros pensamos en separar los pesticidas N-metilcarbamatos por HPLC y emplear como sistema de detección la quimioluminiscencia del rutenio(II)tris(2,2'-bipiridilo), generando la especie activa $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ fotoquímicamente, siguiendo la metodología introducida en esta sección de la Tesis y que nos ha aportado tan buenos resultados analíticos al aplicarla en la determinación de otras especies separadas por HPLC. En este caso será necesario acoplar ese proceso con la fotólisis de los pesticidas para transformarlos en metilamina, compuesto activo frente al rutenio(III)tris(2,2'-bipiridilo).

Los estudios previos necesarios para optimizar las condiciones en que los pesticidas N-metilcarbamatos que pretendíamos separar y determinar (propoxur, carbaril, promecarb, isoprocarb y bendiocarb) condujeran a una elevada señal quimioluminiscente se llevaron a cabo con el insecticida propoxur, que se seleccionó como sustancia piloto.

El propoxur (o-isopropilfenil-N-metilcarbamato) es un insecticida compatible con la mayoría de los insecticidas y fungicidas, excepto los alcalinos. Se utiliza para combatir una variedad de insectos (hormigas, cucarachas, grillos, moscas y mosquitos) y puede emplearse para controlar su presencia en aplicaciones relacionadas con la agricultura, en parques y jardines públicos y privados, etc. Su estructura se presenta en la Figura 6.1.



PROPOXUR

Figura 6.1. Estructura del pesticida propoxur.

El propoxur se presenta en varios tipos de formulaciones y productos, incluyendo concentrados para emulsiones, polvos, cebos, aerosoles, preparados para fumigación y gránulos. Una exposición aguda a este pesticida, por ejemplo por ingestión, produce inhibición de la colinesterasa de las células rojas sanguíneas y puede conducir a síntomas colinérgicos leves, incluyendo visión borrosa, náuseas, vómitos, sudoración y taquicardia; sin embargo, estos efectos son

transitorios. Debido a todo lo anteriormente expuesto, su presencia en aguas y productos vegetales ha de estar controlada y la introducción de métodos sensibles y selectivos para su determinación está plenamente justificada.

Los métodos espectrofotométricos para determinar propoxur se fundan básicamente en su hidrólisis alcalina seguida del acoplamiento del derivado fenólico con diferentes agentes de diazotación (19-21) para producir especies fuertemente coloreadas.

El análisis por inyección en flujo también ha sido aplicado en los últimos años para la determinación de este tipo de pesticidas (22-24). El propoxur se ha evaluado por procedimientos FI basados en su hidrólisis y posterior acoplamiento con p-aminofenol formando un colorante que permite la medida espectrofotométrica (25-27). También se ha desarrollado un procedimiento basado en la acción inhibidora que el insecticida ejerce sobre la actividad enzimática de la colinesterasa (28).

El propósito de nuestras investigaciones, como ya se ha comentado, es conseguir optimizar en un sistema FI la fotoconversión del propoxur en metilamina, que a continuación reacciona con rutenio(III)tris(2,2'-bipiridilo), también fotogenerado "on-line", para provocar su quimioluminiscencia.

La configuración FI seleccionada para realizar esos estudios se muestra en la Figura 6.2.

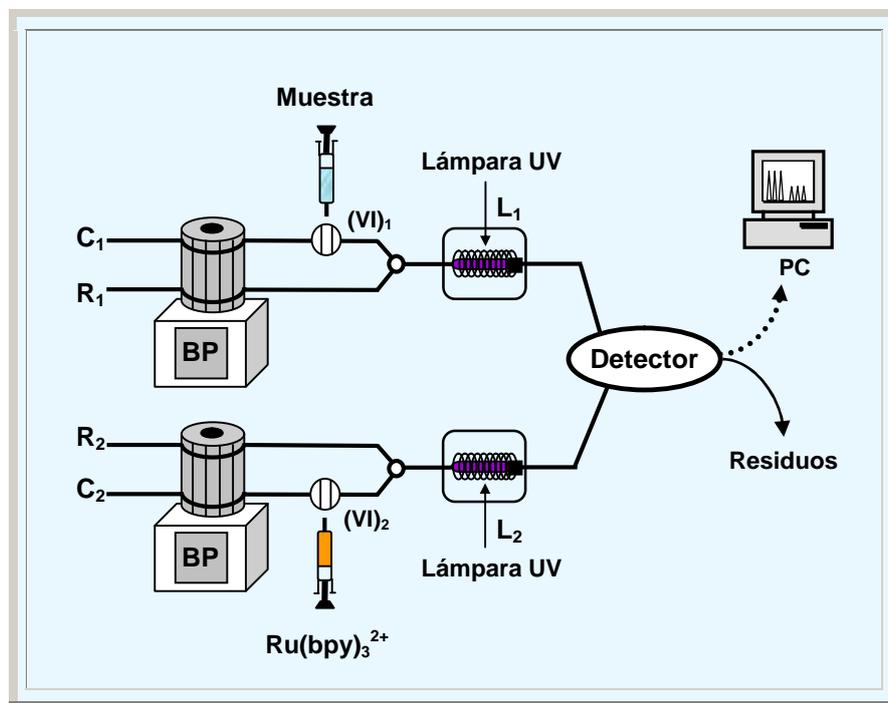


Figura 6.2. Esquema FI para la determinación de propoxur.

BP = bomba peristáltica; C_1 y C_2 = agua; R_1 = disolución reguladora fosfato; R_2 = peroxidisulfato potásico y disolución reguladora fosfato; $(VI)_1$ y $(VI)_2$ = válvulas de inyección; L_1 y L_2 = fotorreactores.

El sistema tiene cuatro canales y trabaja en la forma de zonas emergentes. Se utilizan dos bombas peristálticas (Gilson Minipuls-3) para impulsar los reactivos a través del sistema. La muestra y la disolución de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se inyectan simultáneamente en dos corrientes portadoras de agua, con la ayuda de dos válvulas de inyección Omnifit. El portador que contiene la muestra se dirige hacia el fotorreactor L_1 , donde tiene lugar la degradación del propoxur a metilamina. El otro canal, donde se inyecta $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, se

une con una corriente de peroxidisulfato antes del fotorreactor L_2 para conseguir la oxidación de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. La confluencia de las dos corrientes emergentes de los reactores L_1 y L_2 en el interior de la célula de flujo conduce a una intensa emisión luminosa. Los fotorreactores, como hemos indicado anteriormente, se preparan con tubo de PTFE enrollado helicoidalmente alrededor de una lámpara de mercurio cuya principal línea espectral es a 254 nm.

6.2 FOTOLISIS DEL PROPOXUR

Los pesticidas N-metilcarbamatos cuando se someten a la acción de una radiación luminosa UV de suficiente intensidad conducen a la formación de metilamina, según ha sido contrastado en la bibliografía (13, 15). Este proceso fotoquímico constituye una gran ventaja si se compara con la hidrólisis alcalina a altas temperaturas, base del protocolo analítico propuesto en el método EPA (11). Sin embargo, el rendimiento de la fotodescomposición es bajo. Por ello, para acelerar este proceso se ha utilizado la acetona con muy buenos resultados. La acetona es un excelente sensibilizador del estado triplete, que favorece la fotólisis de estos pesticidas (29, 30).

Una vez comprobada la fotodescomposición del propoxur, nuestro objetivo fue estudiar la influencia de las variables que afectan a esa conversión fotoquímica del pesticida en metilamina, con el sistema de inyección en flujo ya propuesto, comparando la altura de pico registrada con propoxur con la obtenida en las mismas condiciones inyectando cantidades equivalentes de metilamina.

Cuando la altura de pico correspondiente al propoxur fuera idéntica a la obtenida con metilamina, la eficiencia de la fotoconversión sería del 100 %. En todos los estudios de optimización, la concentración de propoxur fue de $2 \mu\text{g ml}^{-1}$.

La velocidad de la reacción aumenta cuando lo hace la concentración de acetona en la disolución de propoxur, tal como se comprobó realizando un estudio con porcentajes de acetona comprendidos entre 1 y 20 %. Se seleccionó un porcentaje de acetona del 5 % para estudios posteriores. Este porcentaje era suficiente para conseguir una eficiencia conveniente en el proceso de fotoconversión; mayores concentraciones de acetona conducen a señales del blanco demasiado elevadas.

La influencia del pH se investigó en el intervalo de pH comprendido entre 2,0 – 7,5 utilizando disoluciones reguladoras Britton-Robinson. Valores de pH más altos no han sido considerados, puesto que los iones hidroxilo pueden reducir al $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ con la consiguiente reacción quimioluminiscente (31). Se comprobó que los mejores resultados se producen trabajando a pH 6,5; a este pH la fotoconversión es cercana al 100 % y la señal del blanco es pequeña. En todos los estudios posteriores se ha utilizado para controlar el pH una disolución reguladora fosfato de pH 6,5 de concentración 0,05 M.

A intensidad luminosa constante, el tiempo de iluminación tiene un efecto decisivo sobre la reacción fotoquímica que experimenta el bolo de muestra en el reactor fotoquímico y, por tanto, sobre la sensibilidad analítica obtenida. Ese tiempo de fotólisis se puede controlar a través del caudal del canal donde se inyecta la

muestra y el de la disolución reguladora y/o variando la longitud del reactor. Se ensayaron diferentes tiempos de irradiación entre 7 y 25 s, comprobándose que para una irradiación de 9 s ya se consigue una eficiencia cercana al 100 % para la conversión fotolítica del propoxur.

La velocidad de la reacción quimioluminiscente y el tiempo de residencia de la especie emisora de luz en la célula de detección determina la extensión en que la quimioluminiscencia depende del caudal. La máxima señal quimioluminiscente se encuentra cuando el caudal total es de $4,9 \text{ ml min}^{-1}$.

La longitud del reactor y los caudales de cada uno de los canales se ajustaron de nuevo, teniendo en cuenta que los tiempos de irradiación para la muestra y el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ deben ser de 9 s y que el caudal total óptimo es de $4,9 \text{ ml min}^{-1}$. Además, las disoluciones fotolizadas deben alcanzar el interior de la célula quimioluminiscente al mismo tiempo.

El efecto del volumen de muestra inyectada se examinó entre 35 y 335 μl . La altura de pico aumenta cuando lo hace el tamaño del lazo de la válvula de inyección hasta un valor de 235 μl , por encima del cual permanece casi constante. Así, el volumen de inyección seleccionado para la muestra de propoxur fue de 235 μl . Este mismo volumen, 235 μl , era el que se inyectaba del reactivo rutenio(II)-tris(2,2'-bipiridilo) en el esquema propuesto de zonas emergentes.

Las variables relacionadas con la fotooxidación del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, tales como concentración del reactivo y del peroxidisulfato, pH del medio, etc., ya han sido optimizadas anteriormente.

Los valores más convenientes para todos estos parámetros experimentales se presentan en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1
Condiciones para la determinación de propoxur por el método FI propuesto

<i>Canal</i>	<i>Variable</i>	<i>Valor óptimo</i>
C ₁	Caudal (ml min ⁻¹)	1,4
	Volumen de muestra (μl)	235
	Fotorreactor L ₁ (cm)	200
C ₂	Caudal (ml min ⁻¹)	1,2
	Ru(bpy) ₃ ²⁺	
	Concentración (M)	2x10 ⁻³
	Volumen de inyección (μl)	235
	Fotorreactor L ₂ (cm)	190
R ₁	Disolución reguladora fosfato	
	Concentración (M)	0,05
	pH	6,5
	Caudal (ml min ⁻¹)	1,1
R ₂	Peroxidisulfato	
	Concentración (M)	1,5x10 ⁻³
	Disolución reguladora fosfato	
	Concentración (M)	0,05
	pH	5,7
	Caudal (ml min ⁻¹)	1,2

6.2.1 Determinación de propoxur

Trabajando con las condiciones experimentales seleccionadas (Tabla 6.1) y con el montaje FI propuesto en la Figura 6.2, se comprobó que existía una relación lineal entre la señal quimioluminiscente y la concentración de propoxur en el intervalo comprendido entre 0,05 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

La recta de regresión obtenida a partir de una serie de diez experiencias es:

$$QL = (144,8 \pm 1,3) + (12,9 \pm 0,6) C \quad r = 0,9990$$

donde **QL** es la intensidad de quimioluminiscencia y **C** es la concentración expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Los límites de detección y cuantificación, calculados como el valor medio de la señal del blanco más tres y diez veces su desviación estándar, fueron de 5 ng ml^{-1} y 36 ng ml^{-1} , respectivamente.

La repetitividad se evaluó con dos concentraciones de propoxur, 0,5 y 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$, encontrando que las desviaciones estándar relativas (para $n = 10$ en cada concentración) eran 0,82 y 0,40 %, respectivamente. También se estudió la reproducibilidad del método analizando seis disoluciones de propoxur de idéntica concentración (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a lo largo de cinco días diferentes. Cada día se realizaron tres inyecciones de cada una de las disoluciones y la desviación estándar relativa encontrada fue 2,1 %. Finalmente se comprobó la frecuencia de muestreo en el método analítico propuesto, que corresponde a 160 muestras/hora.

6.2.2 Estudio de interferencias

La influencia de especies extrañas fue estudiada preparando una serie de disoluciones conteniendo $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de propoxur y concentraciones crecientes del potencial interferente. En la Tabla 6.2 se muestran los resultados encontrados. La tolerancia a cada una de las especies extrañas se tomó como la mayor cantidad que producía una variación menor de $\pm 3 \%$ en la señal analítica del propoxur.

Tabla 6.2
Estudio de interferentes en la determinación FI-QL de propoxur

<i>Especie añadida</i>	<i>Máxima relación interferente/analito tolerada</i>
Br^- , Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} y Al^{3+}	> 500
Malatión, metamidofos, ácido dimetilarsínico	200
Paraquat, diquat, nabam, urea, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Cr^{3+}	100
Hg^{2+} y Mn^{2+}	50

Obviamente la presencia de aminas interfiere en el método analítico. Sin embargo, el procedimiento propuesto puede utilizarse sin ningún problema con muestras en las que las aminas estén presentes; basta, en estos casos, con realizar dos inyecciones, una con la lámpara apagada y otra con la lámpara encendida. El primer

pico corresponde a la señal de las aminas, mientras que la señal correspondiente a la cantidad total de propoxur más las aminas es la que se obtiene cuando se ha producido la fotólisis. Este método de sustracción es válido ya que hemos comprobado que la señal quimioluminiscente de las aminas permanece constante después de la irradiación.

Dados los buenos resultados encontrados para propoxur, nos propusimos aplicar el método a la evaluación de este insecticida en muestras reales. Sin embargo, teniendo en cuenta los bajos niveles de concentración de propoxur que van a encontrarse en muestras tales como aguas, verduras y frutas, decidimos realizar un estudio para extraer el analito y concentrarlo, seleccionando la técnica de extracción en fase sólida (SPE). Precisamente esta técnica ha sido ampliamente utilizada con pesticidas y con matrices complejas (1,2), ya que, además de concentrar el analito, la extracción en fase sólida evita, en muchos casos, potenciales interferencias de la matriz de la muestra (efecto "clean-up").

6.2.3 Procedimiento de extracción en fase sólida

Una serie de experiencias iniciales se dirigieron a encontrar el tipo de material adsorbente más adecuado para la preconcentración del propoxur. Los ensayos de adsorción se realizaron utilizando cartuchos empaquetados con 500 mg del material adsorbente estudiado en cada caso. Se hacía pasar a través del cartucho una disolución estándar de propoxur de $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se recogían fracciones de 5 ml (fracción no retenida); simultáneamente, se tomaba un volumen de la muestra original (fracción total) y ambas

fracciones se analizaban por el método propuesto en el sistema FI y la diferencia de señales suministraba la eficiencia de adsorción del material utilizado. De los diferentes materiales adsorbentes ensayados, sólo el carbón activo (EnviCarb) y el octadecilo (DSC-18) exhiben una eficiencia de adsorción próxima al 100 %.

Para establecer el volumen adecuado de muestra que puede pasar y retenerse en la fase sólida, diferentes volúmenes (hasta un valor de 500 ml) de una disolución estándar de propoxur se pasaron a través de cartuchos conteniendo 500 mg de EnviCarb o de DSC-18 y alícuotas de los eluidos fueron analizadas en el sistema FI. En ningún caso se detectaron señales quimioluminiscentes en la fracción no adsorbida; por tanto, un volumen de hasta 500 ml de muestra puede utilizarse con ambos tipos de materiales adsorbentes.

Para seleccionar el eluyente se realizaron experiencias con varios disolventes orgánicos de diferente polaridad, entre ellos, metanol, acetonitrilo y diclorometano, comprobando que la desorción del propoxur retenido en el adsorbente DSC-18 era efectiva con metanol (eficiencia de elución $98,2 \pm 0,8$ %), mientras que con el EnviCarb los mejores resultados se conseguían trabajando con una mezcla diclorometano–metanol (eficiencia de elución $90,5 \pm 0,7$ %).

Para aumentar el factor de preconcentración, se evaporaba a sequedad el eluido bajo una suave corriente de aire y se reconstituía con agua ultrapura con el 5 % de acetona. Un volumen de 500 μ l era el mínimo requerido para reconstituir la muestra antes de inyectarla en el sistema FI. Finalmente, se estudió el efecto del volumen de eluyente utilizado, trabajando con volúmenes comprendidos entre

1 y 5 ml. La señal quimioluminiscente aumentaba hasta los 2 ml y a partir de este valor no se obtenía ningún cambio en la señal quimioluminiscente, ya que el eluido, una vez seco, siempre se reconstituía en un volumen fijo (500 μ l) de agua con el 5 % de acetona. Los datos presentados en la Tabla 6.3 indican que se obtienen buenas recuperaciones utilizando como materiales de adsorción tanto DSC-18 como EnviCarb y como eluyentes metanol o diclorometano–metanol (80:20, v/v), respectivamente.

Tabla 6.3
Recuperación (%) de propoxur en muestras de agua ultrapura fortificadas con el pesticida

<i>Eluyente</i>	<i>Concentración</i>			
	<i>1 ng ml⁻¹</i>		<i>2 ng ml⁻¹</i>	
	<i>EnviCarb</i>	<i>DSC-18</i>	<i>EnviCarb</i>	<i>DSC-18</i>
Metanol	80	97	82	98
Acetonitrilo	72	85	70	86
Diclorometano	87	92	88	91
Diclorometano–metanol (80:20, v/v)	90	88	93	86

Valores determinados para 500 ml de disoluciones estándares conteniendo propoxur a dos niveles de concentración.

6.2.4 Análisis de muestras de agua

Dado que el límite establecido para el propoxur en aguas para el consumo humano no puede llegar a $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$, para este tipo de análisis el paso previo de preconcentración de las muestras es imprescindible para alcanzar niveles de sensibilidad por debajo de los límites legales. Por ello elegimos para estos propósitos la extracción en fase sólida con cartuchos de DSC-18 y metanol como eluyente porque en estas condiciones la recuperación para propoxur era próxima al 100 %. Es necesario aclarar que el agua residual sobre el cartucho no se eliminaba a causa de la baja volatilidad del eluyente. Por ello, en el protocolo programado para el sistema automático de extracción en fase sólida que utilizamos, se añadió una etapa con aire seco antes de la elución para evitar ese inconveniente.

El método FI-QL con preconcentración “on-line” se aplicó a la determinación de propoxur en diferentes tipos de aguas. En la Figura 6.3 se presenta el esquema FI-SPE utilizado para realizar esos estudios.

Como hemos dicho, todas las etapas de extracción se realizaron automáticamente con el ASPEC XLi (Gilson), que utiliza presiones positivas para eluir en SPE con la capacidad añadida de inyectar las muestras directamente en el sistema FI. El instrumento va equipado con dos frascos que contienen metanol y la mezcla diclorometano–metanol (80:20 v/v), respectivamente. Otro frasco de reserva contiene agua ultrapura. Todo el sistema se controla con un software (Gilson 735 Sampler) que permite interaccionar con el sistema FI.

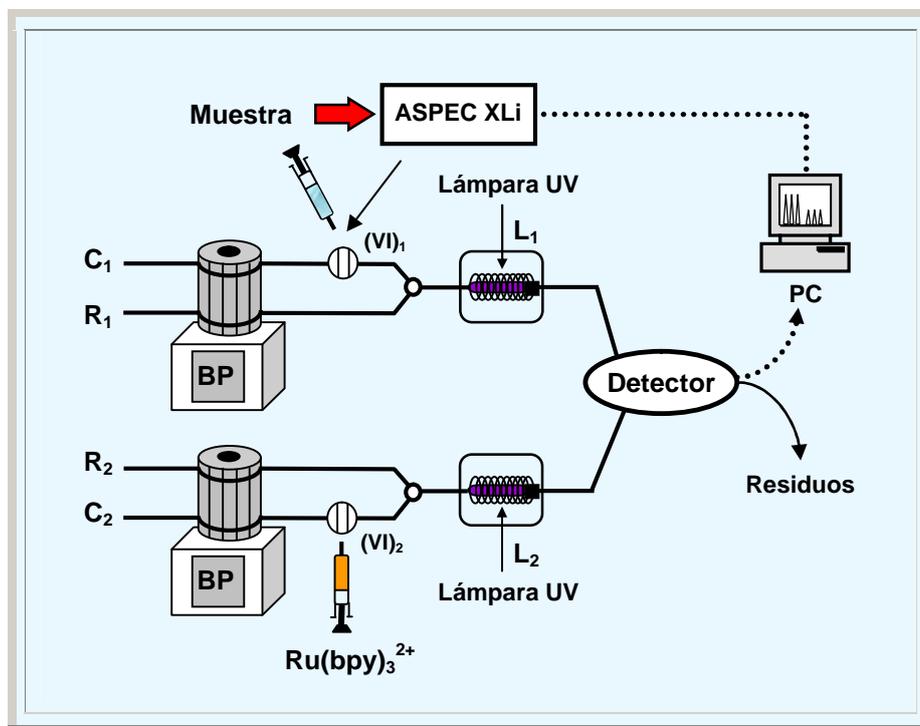


Figura 6.3. Esquema FI-SPE para la determinación de propoxur.

El procedimiento para el análisis de aguas es el siguiente:

Las muestras de agua se conservaban adicionando ácido acético glacial para alcanzar un pH 3 con el fin de evitar la posible degradación del propoxur y se almacenaban en el refrigerador (4 °C). Antes de la extracción, el pH de la muestra se ajustaba a 6 con hidróxido sódico 0,1 M. Los cartuchos de octadecilo de 500 mg de capacidad en un recipiente de 6 ml (Supelco) se acondicionaban pasando 3 ml de metanol seguidos de 3 ml de agua, separados por 0,5 ml de aire, antes de introducir la muestra. A continuación se

pasaban 500 ml de la muestra de agua a través del cartucho a un caudal de 10 ml min^{-1} usando una bomba Gilson 306 que era controlada por el software del ASPEC. El cartucho se lavaba con el paso de 1 ml de agua y se secaba con el paso de 10 ml de aire a un caudal de 5 ml min^{-1} para eliminar las trazas de agua. El propoxur retenido en la fase sólida se eluía con 2 ml de metanol a 3 ml min^{-1} , seguido de 1 ml de aire. El eluido se evaporaba a sequedad a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante el paso de una corriente de aire durante 10 min. El residuo se disolvía en 25 μl de acetona seguido de 475 μl de agua ultrapura; 235 μl de la muestra reconstituida se inyectaban, finalmente, en el sistema FI.

Ensayos preliminares con 500 ml de cada una de las muestras de agua revelaron la ausencia de pesticidas N-metilcarbamatos en las mismas; por ello, las muestras se fortificaron con propoxur y se analizaron utilizando el método de adición estándar. En la Tabla 6.4 se encuentran registradas las recuperaciones de propoxur obtenidas en diferentes muestras de agua mineral, agua del grifo, agua de pozo y agua procedente de riegos a las que se habían adicionado diferentes cantidades del insecticida, aplicando el procedimiento FI propuesto, así como un método de referencia cromatográfico con detección fluorescente (11).

Tabla 6.4
Recuperación de propoxur en muestras de agua

<i>Tipo de agua</i>	<i>Añadido ($\mu\text{g l}^{-1}$)</i>	<i>Método FI</i>		<i>Método HPLC de referencia (11)</i>	
		<i>Encontrado^a ($\mu\text{g l}^{-1}$)</i>	<i>Recuperación^b (%)</i>	<i>Encontrado^a ($\mu\text{g l}^{-1}$)</i>	<i>Recuperación^b (%)</i>
Mineral	0,10	0,10 \pm 0,01	100 \pm 10	0,10 \pm 0,01	100 \pm 10
	0,20	0,19 \pm 0,01	95 \pm 6	0,20 \pm 0,01	100 \pm 5
	0,50	0,52 \pm 0,02	104 \pm 4	0,51 \pm 0,01	102 \pm 2
Grifo	0,15	0,14 \pm 0,01	93 \pm 7	0,15 \pm 0,01	100 \pm 7
	0,50	0,48 \pm 0,02	96 \pm 4	0,49 \pm 0,01	98 \pm 2
	1,00	0,99 \pm 0,05	99 \pm 5	1,01 \pm 0,03	101 \pm 3
Pozo	0,50	0,49 \pm 0,03	98 \pm 6	0,51 \pm 0,02	102 \pm 4
	5,00	5,05 \pm 0,05	101 \pm 1	4,90 \pm 0,05	98 \pm 1
	10,0	9,8 \pm 0,5	98 \pm 5	9,9 \pm 0,2	99 \pm 2
Riego	1,00	1,02 \pm 0,01	102 \pm 1	0,99 \pm 0,01	99 \pm 1
	5,00	4,85 \pm 0,09	97 \pm 2	4,90 \pm 0,08	98 \pm 2
	20,0	19,6 \pm 0,4	98 \pm 2	19,8 \pm 0,2	99 \pm 1

^a Media de tres determinaciones \pm desviación estándar.

^b Recuperación \pm desviación estándar.

6.2.5 Análisis de propoxur en frutas y verduras

La determinación de residuos de propoxur en frutas y verduras para asegurar que cumplen la normativa de seguridad para el consumo humano, requiere la homogeneización completa de la muestra para extraer totalmente los residuos del insecticida. Para seleccionar el disolvente más adecuado para la extracción de propoxur se ensayaron disolventes de diferente polaridad desde el agua al éter de petróleo. La estrategia más efectiva era seleccionar el disolvente que condujera a una extracción máxima de analito y que la co-extracción de otras especies fuera mínima. El diclorometano se comportó como un excelente disolvente para la extracción de propoxur de frutas y verduras. Los extractos de las muestras requieren un procedimiento preliminar de limpieza antes de la determinación, con el fin de eliminar posibles interferentes. La etapa de “clean-up” se realizó aplicando la extracción en fase sólida, utilizando EnviCarb como adsorbente y una mezcla de diclorometano–metanol (80:20, v/v) como eluyente; con este procedimiento se recuperaba entre el 85 – 93 % de propoxur, además, en ausencia de interferentes. El método FI propuesto se aplicó al análisis de muestras de manzana, pera, pepino y coles de Bruselas. Los resultados que se presentan en la Tabla 6.5 muestran que los residuos de propoxur encontrados con el método aportado están en excelente acuerdo con los resultados obtenidos cuando se aplica el método de referencia de cromatografía líquida (11).

Tabla 6.5
Recuperación de propoxur en frutas y vegetales

Tipo de muestra	Añadido (mg kg ⁻¹)	Método FI		Método HPLC de referencia (11)	
		Encontrado ^a (mg kg ⁻¹)	Recuperación ^b (%)	Encontrado ^a (mg kg ⁻¹)	Recuperación ^b (%)
Pera	0,35	0,31 ± 0,03	89 ± 9	0,34 ± 0,02	97 ± 5
	0,50	0,46 ± 0,05	92 ± 10	0,48 ± 0,01	96 ± 2
Manzana	0,20	0,17 ± 0,02	85 ± 8	0,19 ± 0,01	95 ± 5
	0,80	0,71 ± 0,05	89 ± 6	0,78 ± 0,03	98 ± 4
Pepino	0,30	0,27 ± 0,02	90 ± 6	0,29 ± 0,01	97 ± 4
	0,40	0,37 ± 0,02	93 ± 5	0,38 ± 0,01	95 ± 3
Coles de Bruselas	0,60	0,55 ± 0,02	92 ± 4	0,61 ± 0,02	102 ± 4
	1,00	0,88 ± 0,04	88 ± 4	0,96 ± 0,02	96 ± 2

^a Media de tres determinaciones ± desviación estándar.

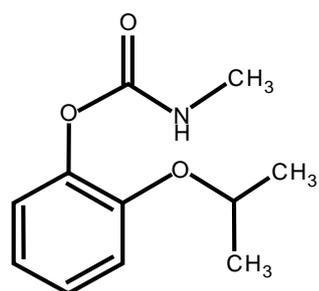
^b Recuperación ± desviación estándar.

Las aplicaciones prácticas que hemos llevado a cabo nos confirman la validez del sistema FI-QL propuesto. Como características esenciales del método destacaríamos que es simple, económico, sensible (límite de detección = 5 ng ml⁻¹) y rápido (velocidad de muestreo de 160 muestras/hora).

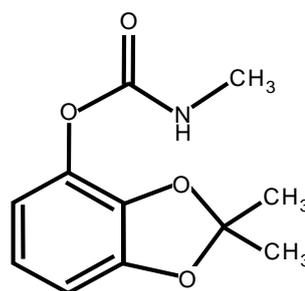
Los bajos niveles de propoxur permitidos en la legislación vigente para aguas y alimentos requieren la utilización de muestras preconcentradas, por lo que se consiguen excelentes resultados cuando se acopla la extracción en fase sólida como etapa previa, totalmente automatizada, al proceso de determinación. Con este tipo de preconcentración cuando se tratan “on-line” 500 ml de agua se puede llegar a límites de detección de 5 ng l⁻¹. En el caso de los alimentos se ha llegado a un límite de detección aproximadamente de 10 µg kg⁻¹.

6.3 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS N-METILCARBAMATOS POR HPLC CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

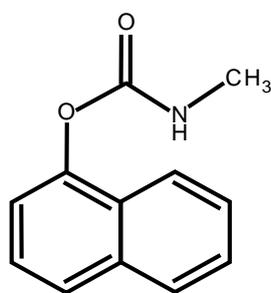
Como indicábamos en la introducción de este Capítulo, la meta de nuestro trabajo era separar y cuantificar los NMCs bendiocarb, carbaril, promecarb, isoprocarb y propoxur en muestras reales y, en una fase previa, para optimizar las condiciones que permitieran la detección quimioluminiscente de los mismos acoplada a su fotólisis post-columna, se había seleccionado al propoxur en un sistema FI. En la Figura 6.4 se presentan las estructuras de estos pesticidas.



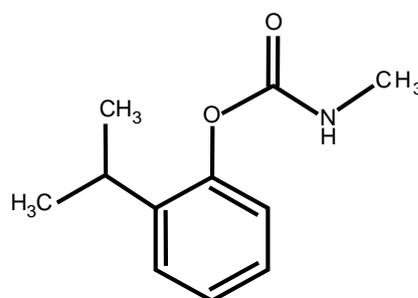
PROPOXUR



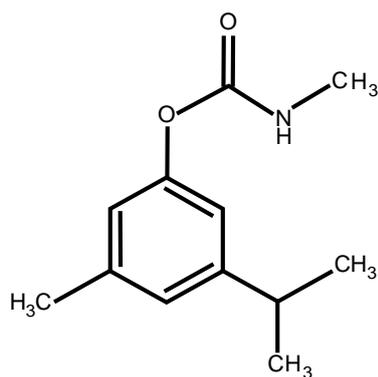
BENDIOCARB



CARBARIL



ISOPROCARB



PROMECARB

Figura 6.4. Estructuras de los pesticidas N-metilcarbamatos estudiados.

6.3.1 Fotolisis de los pesticidas N-metilcarbamatos

Los cinco pesticidas ensayados sometidos a fotolisis producen metilamina. No obstante, el rendimiento encontrado en la fotodescomposición depende en gran medida del disolvente utilizado, lo que sugiere que el entorno del soluto es muy importante en el mecanismo de fotolisis. Por ello, se estudió la reacción de fotolisis en presencia de los disolventes que habitualmente se utilizan más en HPLC (agua, acetonitrilo y metanol). La cantidad de MA obtenida en la fotolisis de estos pesticidas era siempre más alta en agua que en acetonitrilo y metanol. También se realizaron experiencias utilizando mezclas binarias agua-acetonitrilo y agua-metanol; se comprobó que la fotoconversión de NMC a MA disminuye cuando aumenta el porcentaje de disolvente orgánico. Sin embargo, la presencia de acetona, un excelente sensibilizador del estado triplete, mejora significativamente la formación de MA en todos los casos.

En un sistema FI similar al utilizado para el propoxur (Fig. 6.2) se ha estudiado la influencia de las variables que afectan a la conversión fotoquímica inyectando muestras de 250 μl de cada pesticida (1×10^{-5} M) en la corriente de disolución reguladora fosfato (50 mM en dihidrógenofosfato sódico ajustada a diferentes pH ente 2,0 y 7,5). Valores más altos de pH no se ensayaron ya que el ión hidroxilo puede actuar con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ para dar $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y, por tanto, emitir quimioluminiscencia. La eficiencia de la reacción fotoquímica de los pesticidas NMCs aumenta cuando lo hace el pH. Un pH 6,5 fue considerado adecuado porque a este valor la fotoconversión de los pesticidas a MA era alta y la señal del fondo baja.

La velocidad de la reacción aumenta con la concentración de acetona en la disolución de pesticida. Diferentes concentraciones fueron ensayadas, entre 0,5 – 5 %. Al final, una concentración de acetona del 2 % (v/v) fue la seleccionada, ya que era suficiente para encontrar una eficiencia adecuada en la fotogeneración de metilamina a partir del pesticida; mayores concentraciones de acetona producían señales del blanco más altas.

Con una intensidad de irradiación fija, el tiempo de iluminación tiene un efecto decisivo sobre la reacción fotoquímica. El tiempo de residencia del analito en el fotorreactor L₁ puede seleccionarse controlando el caudal de la corriente portadora y/o la longitud del reactor. Un tiempo de irradiación de 9 s era suficiente para encontrar eficiencias entre el 68 – 98 % en la fotoconversión de los pesticidas NMC en MA y fue seleccionado como un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis. Este tiempo se consiguió utilizando un reactor de 200 cm de longitud y un caudal de 2,6 ml min⁻¹ en la corriente portadora.

6.3.2 Optimización del sistema acoplado HPLC–QL

En las separaciones de los pesticidas NMCs por cromatografía líquida con detección quimioluminiscente se ha de tener en cuenta que la fase móvil no sólo debe de ser adecuada para conseguir una buena separación de los pesticidas, sino que también ha de ser compatible con la reacción quimioluminiscente. Varias fases móviles se han propuesto en la bibliografía como útiles para la separación de NMCs con las columnas RP C₁₈ o C₈ y las mezclas de metanol o de acetonitrilo con agua han sido las más

ampliamente utilizadas. Cuando se ensayaron estas mezclas binarias en nuestro esquema de detección comprobamos que la relación señal/ruido (S/N) disminuía notablemente cuando aumentaba la cantidad de disolvente orgánico. Este problema se pudo solventar fácilmente mediante la oxidación “on-line” post-columna del disolvente orgánico.

De entre todos los oxidantes ensayados (peróxido de hidrógeno, bromato, Ce(IV), periodato y dicromato) se consiguieron los mejores resultados con el periodato potásico, que conduce a un aumento significativo en la señal QL porque la señal del blanco se reduce al mismo nivel que el obtenido con agua, mientras que la fotoconversión de NMC a MA también mejora. Por ello, en el sistema propuesto el eluyente procedente de la columna cromatográfica se une a la corriente de periodato antes de pasar por el fotorreactor L₁, según el esquema presentado en la Figura 6.5.

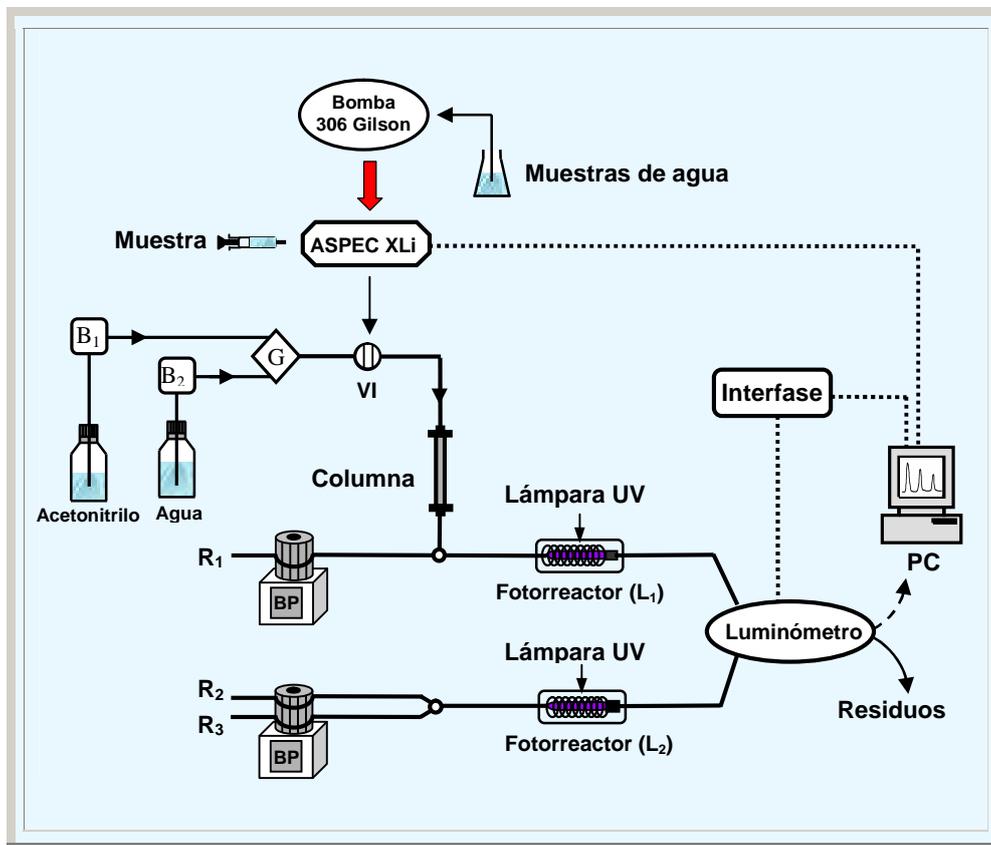


Figura 6.5. Esquema HPLC-QL para la determinación de N-metilcarbamatos acoplado a un sistema de extracción en fase sólida.

B₁ = bomba cromatográfica 1; B₂ = bomba cromatográfica 2; G = gradiente; BP = bomba peristáltica; R₁ = periodato potásico 1mM, disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 6,5 y acetona 2 % (v/v); R₂ = peroxidisulfato 1,5 mM y disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7; R₃ = Ru(bpy)₃²⁺ 2 mM; L₁ y L₂ = fotorreactores; VI = válvula de inyección.

La mezcla acetonitrilo–agua se seleccionó como fase móvil más conveniente porque conducía a unas separaciones y formas de pico mejores que las obtenidas cuando se empleaba la mezcla metanol–agua.

Las condiciones para la determinación cromatográfica de NMCs con detección quimioluminiscente se optimizaron con el fin de obtener la mejor resolución y límites de detección lo más bajos posibles. A continuación se estudió la influencia de la concentración de periodato en el sistema de detección post-columna. Cuando la concentración de periodato se encontraba en el intervalo comprendido entre 0,8 y 2 mM la intensidad de quimioluminiscencia era máxima; concentraciones mayores producían picos más bajos, los cuales presentaban, además, poca reproducibilidad. La concentración de periodato seleccionada fue 1 mM.

El efecto de la concentración de acetona sobre la quimioluminiscencia se investigó con disoluciones conteniendo entre 0,5 y 5 % de la misma, comparando las relaciones S/N encontradas en cada caso. La intensidad de QL aumenta cuando lo hace el porcentaje de acetona en la disolución que está siendo bombeada a través del canal R₁, pero la mejor relación S/N se conseguía trabajando con un 2 % de acetona.

La concentración de acetonitrilo en la fase móvil se varió entre 20 y 50 % y se comprobó que con concentraciones de acetonitrilo superiores al 25 % los picos correspondientes a propoxur y bendiocarb se solapaban; además, el tiempo de retención del promecarb era demasiado largo (aproximadamente 34 min). Sin embargo, utilizando elución por gradiente se obtenían buenas

separaciones, tiempos de análisis adecuados y las máximas señales relativas de QL. Por ello, en la aplicación del método se programó el instrumento para que al principio una fase móvil con el 22 % de acetonitrilo pasara durante 11 minutos para separar propoxur, bendiocarb y carbaril; a continuación el eluyente, en un tiempo aproximado de 0,3 minutos, pasara a tener un 40 % de acetonitrilo y se mantuviera circulando durante 7 minutos con esta concentración para eluir el isoprocarb y el promecarb. La Figura 6.6 muestra un cromatograma típico obtenido en estas condiciones a partir de una disolución estándar de NMCs.

La velocidad de la reacción quimioluminiscente y el tiempo de residencia en la célula de flujo de la especie que emite la luz determinan la extensión en que la intensidad de quimioluminiscencia depende del caudal. La máxima señal quimioluminiscente se obtenía con un caudal total de $4,9 \text{ ml min}^{-1}$. La longitud de los fotorreactores y los caudales de la fase móvil y de cada una de las disoluciones que circulan por cada canal del sistema post-columna se ajustaron teniendo en cuenta que los tiempos de irradiación debían de ser de alrededor de 9 s para la muestra y el reactivo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Los valores óptimos encontrados para cada parámetro se presentan en la Tabla 6.6.

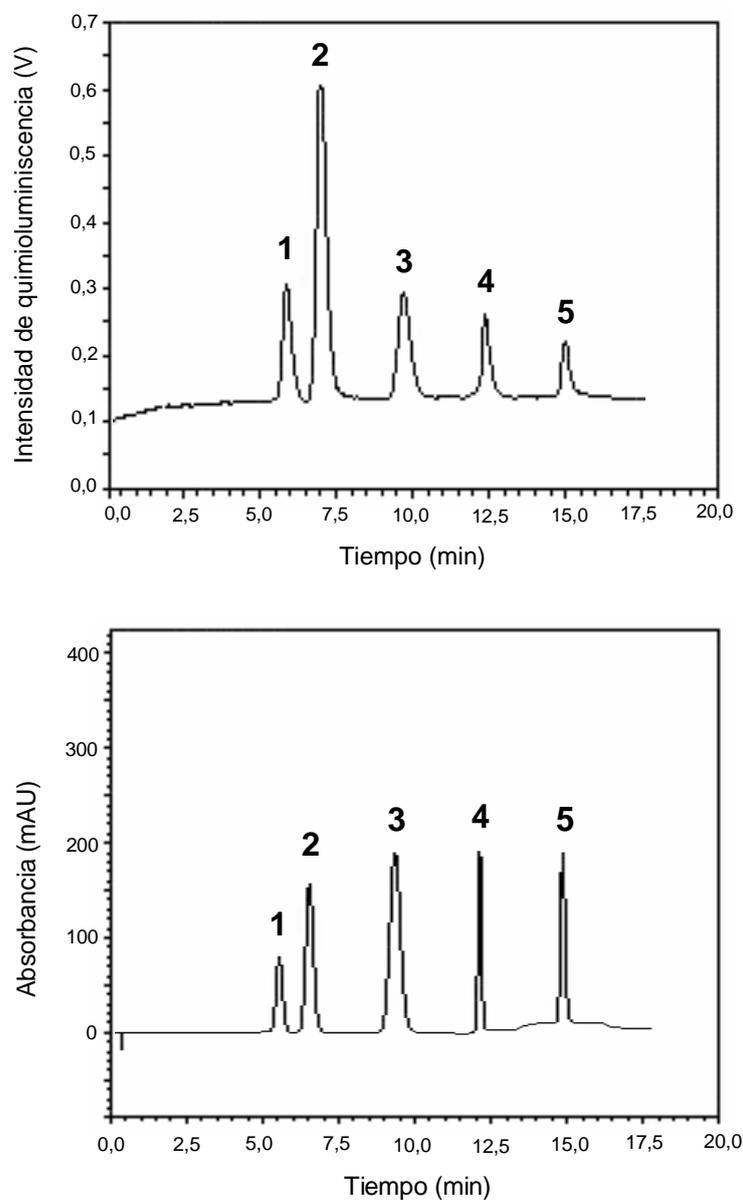


Figura 6.6. Cromatogramas de una disolución estándar de NMCs 4×10^{-6} M.

Arriba: detección quimioluminiscente; abajo: detección fotométrica a 210 nm. Identificación de picos: (1) propoxur; (2) bendiocarb; (3) carbaril; (4) isoprocarb; (5) promecarb. Las condiciones experimentales son las descritas en la Tabla 6.5.

Tabla 6.6
Valores óptimos de las variables del sistema HPLC–QL propuesto para la
determinación de NMCs

<i>Variable</i>	<i>Valor óptimo</i>
<i>Cromatografía</i>	
Composición de la fase móvil	0–11 min acetonitrilo–agua (22:78, v/v) y 11–18 min acetonitrilo–agua (40:60)
Caudal de la fase móvil	1,2 ml min ⁻¹
Volumen de inyección	50 µl
<i>Detección</i>	
Canal R ₁	Periodato 1 mM, disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 6,5 y acetona 2 % (1,4 ml min ⁻¹)
Canal R ₂	Peroxidisulfato 1,5 mM y disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7 (1,2 ml min ⁻¹)
Canal R ₃	Ru(bpy) ₃ ²⁺ 2 mM (1,1 ml min ⁻¹)
Fotorreactores	L ₁ (200 cm x 0,5 mm) L ₂ (175 cm x 0,5 mm)

6.3.3 Procedimiento experimental

El esquema del sistema analítico se ha presentado en la Figura 6.5. La columna utilizada en el equipo de HPLC es una Beckman Ultrasphere C₁₈ (5 μm, 45 mm x 4,6 mm). Las fases móviles utilizadas han sido mezclas de agua (A) y acetonitrilo (B). Las condiciones de elución aplicadas fueron: 0–11 minutos de elución isocrática con 22 % de B; 11–18 minutos de elución isocrática con 40 % de B y finalmente, reacondicionamiento de la columna pasando la mezcla de 22 % de B durante 5 min. El caudal del eluyente era de 1,2 ml min⁻¹. Para suministrar los disolventes se utilizó un módulo System Gold 125 NM de Beckman Coulter. Las muestras se inyectaban manualmente con una válvula Rheodyne modelo 7725 o automáticamente con el Aspec XLi de Gilson. La separación cromatográfica de los pesticidas NMCs se realizó a temperatura ambiente e inyectando volúmenes de muestra de 50 μl y como detector quimioluminiscente se utilizó un luminómetro Camspec-CL 2 equipado con una célula de tres puertas.

La detección quimioluminiscente se consigue con un sistema de flujo, situado después de la columna cromatográfica, que incorpora dos reactores fotoquímicos y dos bombas peristálticas Gilson Minipuls. Los dos fotorreactores consisten en tubos de PTFE de 0,5 mm de diámetro interno y 200 cm de longitud (L₁) y 175 cm (L₂) enrollados alrededor de una lámpara de mercurio de baja presión (Spectronic) con forma de lápiz (50 mm de longitud x 5 mm de diámetro). La lámpara funciona con 6 W de potencia y la principal línea espectral se centra en 254 nm. Ambos fotorreactores se alojan en unas cajas metálicas cubiertas con espejos para aumentar el flujo de fotones por reflexión.

El eluido procedente de la columna de HPLC se mezcla con la disolución oxidante y es irradiado en su paso por el fotorreactor L₁, donde los NMCs se degradan a MA. La disolución oxidante era KIO₄ 1 mM en una disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 6,5, conteniendo un 2 % de acetona y circulaba con un caudal de 1,4 ml min⁻¹. La disolución procedente de la fotólisis en L₁ pasa directamente por una de las entradas de la célula de flujo. Para la generación de Ru(bpy)₃³⁺ "on-line" se bombean por dos canales independientes disoluciones que contienen Ru(bpy)₃²⁺ 2 mM y K₂S₂O₈ 1,5 mM en disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7 con caudales de 1,1 ml min⁻¹ y 1,2 ml min⁻¹, respectivamente. Ambas corrientes se unen antes de pasar por el fotorreactor L₂, en el que se forma Ru(bpy)₃³⁺, el cual es dirigido hacia otra entrada de la célula de flujo. Así la mezcla de la metilamina y el Ru(bpy)₃³⁺ fotogenerados ocurre en la célula de flujo, obteniéndose una alta señal quimioluminiscente. Los datos del detector quimioluminiscente son almacenados en un ordenador personal equipado con una interfase Beckman SS420x y procesados utilizando el software 32 Karat (Beckman).

6.3.4 Validación del método

El método HPLC–QL para la determinación de pesticidas NMCs ha sido validado determinando características tales como linealidad, repetitividad y precisión. Para comprobar la linealidad en las respuestas quimioluminiscentes se analizaron una serie de disoluciones patrón conteniendo cada uno de los pesticidas en el intervalo de concentración entre 0,1 y 25 µg ml⁻¹ (se utilizaron al menos diez muestras cubriendo ese intervalo). La relación entre

área de pico y concentración era lineal para todos los pesticidas, como muestra el hecho de que los coeficientes de regresión fueran siempre superiores a 0,999. Las ecuaciones correspondientes a las rectas de regresión, así como otros parámetros característicos, se presentan en la Tabla 6.7.

Las desviaciones estándar relativas (RSD) en un día, ensayadas con diez disoluciones idénticas de los cuatro pesticidas a una concentración de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, fueron siempre inferiores a 1,31 %. Los valores de RSD para los tiempos de retención en un mismo día oscilaban entre 0,05 y 0,29 %. También se estudió la reproducibilidad del método analizando muestras conteniendo $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada uno de los analitos durante 5 días consecutivos en los que la muestra se inyectaba tres veces cada día. En estos estudios los valores de RSD calculados para las áreas de pico y tiempos de retención fueron menores que 2,9 % y 0,58 %, respectivamente.

Tabla 6.7

Gráficas de calibración, límites de detección y precisión del método HPLC-QL propuesto para la determinación de NMCs

NMC	Y = A + B C			Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Precisión (RSD)	
	A (10^4 unidades de área)	B (10^5 unidades de área/ $\mu\text{g ml}^{-1}$)	r		Repetitividad (%)	Reproducibilidad (%)
Propoxur	5,5 ± 3,0	1,18 ± 0,02	0,9991	0,020	0,64 ^a	2,3 ^b
Bendiocarb	7,1 ± 7,0	4,05 ± 0,06	0,9992	0,004	0,93 ^a	2,7 ^b
Carbaril	3,9 ± 3,0	1,79 ± 0,03	0,9995	0,018	0,79 ^a	2,2 ^b
Promecarb	-2,3 ± 1,0	0,33 ± 0,01	0,9990	0,042	1,31 ^a	2,8 ^b
Isoprocarb	5,9 ± 1,8	0,37 ± 0,01	0,9990	0,040	1,09 ^a	2,9 ^b

C: Concentración de analito en $\mu\text{g ml}^{-1}$; A: ordenada en el origen de las líneas de calibración \pm desviación estándar; B: pendiente de las líneas de calibración \pm desviación estándar. Concentraciones de analitos: (a) $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; (b) $15 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Aunque las aminas y algunos compuestos teniendo un grupo amina también producen luminiscencia bajo las condiciones propuestas en nuestros estudios, esto no constituye ningún problema puesto que eluyen generalmente muy cerca del frente del disolvente. Si existe algún interferente que coeluye (a concentraciones menores que 60 veces las de NMC), este efecto puede ser obviado comparando la señal QL que se obtendría con el mismo sistema HPLC pero con la lámpara ultravioleta del fotorreactor apagada.

6.3.5 Aplicaciones

Las características del sistema de detección conducen a cromatogramas muy sencillos, útiles para la determinación de pesticidas NMCs en muestras reales. Hemos comprobado la utilidad analítica determinando los pesticidas en frutas y distintos tipos de muestras de agua, incluyendo aguas de bebida.

6.3.5.1 Análisis de muestras de agua

Como antes se ha indicado, la máxima concentración individual de pesticidas NMCs en aguas de bebida admitida por el *European Drinking Water Directory* es $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ (32); de ahí que se requiera una etapa previa de preconcentración antes de la determinación HPLC–QL en orden a alcanzar la sensibilidad adecuada por debajo de los límites legales. Nosotros, como hemos indicado al tratar la determinación FI del propoxur, hemos considerado que la extracción en fase sólida era la técnica de

preconcentración más eficaz para todos estos pesticidas, atendiendo a criterios de simplicidad, rapidez, fácil automatización y economía.

En el desarrollo de la metodología a seguir por extracción en fase sólida se investigaron varios parámetros experimentales utilizando agua ultrapura fortificada con los pesticidas seleccionados. Se comprobó que se obtenían óptimos resultados para propoxur, carbaril, promecarb y bendiocarb cuando la muestra de agua pasaba a través del cartucho de SPE a 10 ml min^{-1} . A caudales por encima de 20 ml min^{-1} era evidente la elución de los pesticidas propoxur y bendiocarb, como se confirmó analizando las muestras de agua recogidas después de su paso a través del cartucho. Comparando las capacidades de retención de diferentes materiales adsorbentes se llegó a la conclusión de que únicamente carbón activo (EnviCarb) y octadecilo (DSC-18) exhiben una elevada eficiencia de adsorción. El disolvente más adecuado para la elución es el acetonitrilo, porque eluye a todos los analitos del cartucho, es miscible con el agua y adecuado para el análisis de los pesticidas por cromatografía líquida en fase reversa.

La recuperación de los pesticidas NMCs es constante con volúmenes de muestra que atraviesan el cartucho de extracción entre 10 y 500 ml. Cuando un volumen de 500 ml de muestra de agua ultrapura fortificada, con 0,5, 2,0 y $10 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada uno de los N-metilcarbamatos, pasa a través de un cartucho de C_{18} , las recuperaciones encontradas están comprendidas entre 99 – 96 % (RSD = 0,64 %) para el propoxur, 97 – 94 % (RSD = 0,74 %) para bendiocarb, 99 – 97 % (RSD = 0,49 %) para carbaril y 94 – 91 % (RSD = 0,81 %) para promecarb, y los límites de detección se encuentran entre 3,9 y $36,7 \text{ ng l}^{-1}$. Hay que indicar que en el caso del

isoprocarb la extracción en fase sólida no es eficiente, lo que provocaba un notable descenso en la señal quimioluminiscente. Este hecho se atribuyó a la posible descomposición de este pesticida en la fase de evaporación en caliente, motivo por el que en la aplicación del método cromatográfico a muestras de agua no se incluyó el isoprocarb.

El procedimiento experimental a seguir para la preconcentración de los pesticidas en muestras de agua es el siguiente:

Las muestras de agua recogidas se conservan adicionando ácido acético para obtener pH 3 con la finalidad de evitar la posible degradación de los NMCs y se almacenan en el refrigerador a 4 °C. Posteriormente, se ajusta el pH de la muestra a 6 con disolución de hidróxido sódico 0,1 M antes de su preconcentración por extracción en fase sólida. Los cartuchos C₁₈ de 500 mg de capacidad con un depósito de 6 ml (Supelco; Sigma-Aldrich Química) se acondicionan con 2 ml de acetonitrilo, seguido por 3 ml de agua ultrapura, separados por 0,5 ml de aire antes de la aplicación de la muestra. A continuación pasan a través del cartucho 500 ml de la muestra a un caudal de 10 ml min⁻¹ utilizando una bomba Gilson 306 controlada por el software del Aspec XLi. El cartucho se lava con 2 ml de agua ultrapura y se seca pasando 10 ml de aire a un caudal de 6 ml min⁻¹ para eliminar las trazas de agua. El pesticida retenido en el sólido se eluye con 2 ml de acetonitrilo a 3 ml min⁻¹ seguido por 6 ml de aire a 6 ml min⁻¹. El eluido se evapora a sequedad a 75 °C pasando sobre él una corriente de aire durante 10 min. El residuo se disuelve primero con 110 µl de acetonitrilo, seguido por 390 µl de agua

ultrapura y 50 µl de esta disolución son inyectados por el equipo Aspec en el sistema de HPLC.

Todas las etapas de extracción se llevaron a cabo automáticamente con el Aspec XLi, el cual utiliza en la elución presiones positivas para automatizar la SPE, con la ventaja añadida de que las muestras pueden inyectarse directamente en el sistema de HPLC "on-line". El software utilizado (735 Sampler de Gilson) permite el acoplamiento del sistema de extracción con el HPLC.

6.3.5.1.1 Aplicación a muestras de agua reales

Siguiendo los procedimientos descritos para la preconcentración y análisis por HPLC de los NMCs, se aplicó el método a la determinación de los pesticidas bendiocarb, carbaril, promecarb y propoxur en muestras de agua de diferente procedencia. Un ensayo preliminar con 500 ml de cada una de las aguas reveló que estos pesticidas no estaban presentes en las muestras (Fig. 6.7 A). Las muestras se fortificaron, entonces, con dos cantidades diferentes de cada uno de los pesticidas y se procedió a la preconcentración por SPE y separación cromatográfica. Los resultados encontrados están recogidos en la Tabla 6.8, donde se puede comprobar que se obtienen recuperaciones de los analitos comprendidas entre el 90 y el 102 %. La Fig. 6.7 B muestra el cromatograma obtenido con un agua procedente de riego a la que se habían adicionado los cuatro pesticidas NMCs citados anteriormente, todos ellos a la concentración de 5 µg l⁻¹. Con fines comparativos, también se han incluido los cromatogramas obtenidos con detección fotométrica.

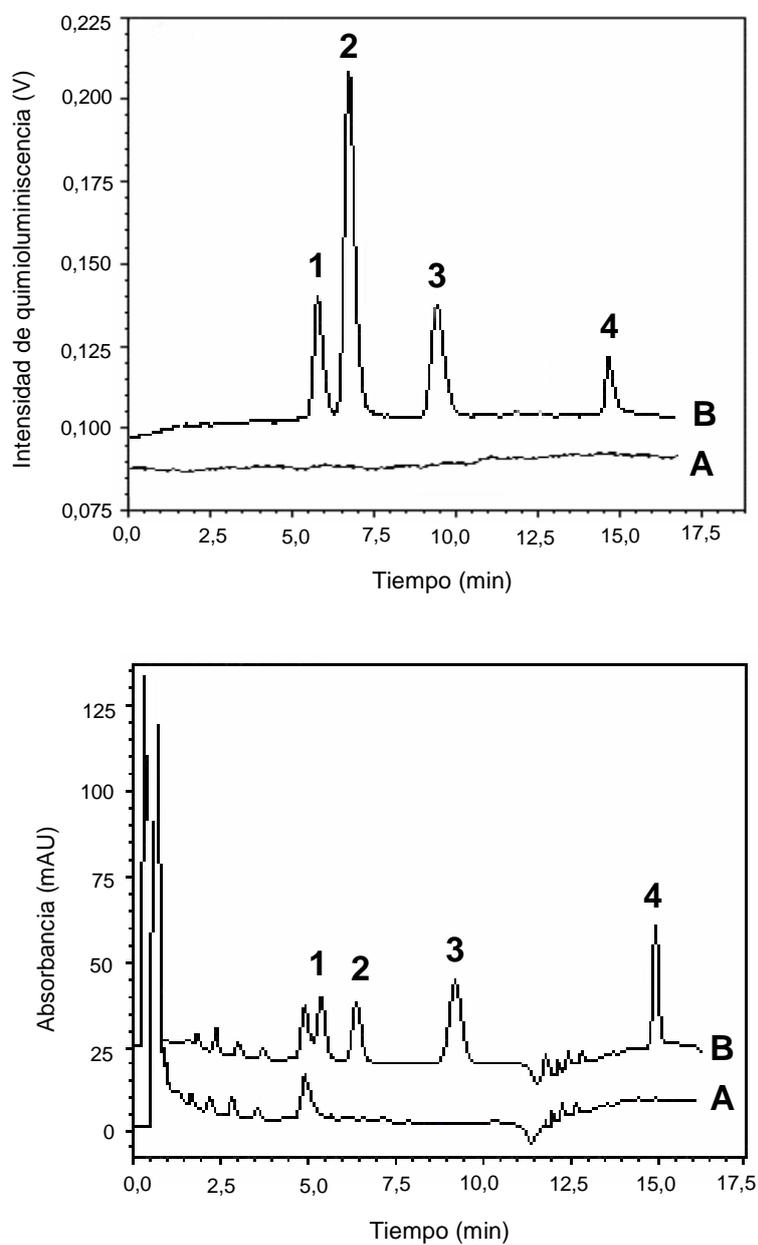


Figura 6.7. Cromatogramas de una muestra de agua de riego: (A) sin enriquecer; (B) enriquecida con $5,0 \mu\text{g l}^{-1}$.

Arriba: detección quimioluminiscente; abajo: detección fotométrica a 210 nm.
Picos: (1) propoxur; (2) bendiocarb; (3) carbaril; (4) promecarb.

Tabla 6.8
Análisis de muestras de agua enriquecidas con NMCs

<i>Tipo de agua</i>	<i>Pesticida</i>	<i>Añadido ($\mu\text{g l}^{-1}$)</i>		<i>Encontrado^a ($\mu\text{g l}^{-1}$)</i>		<i>Recuperación^b (%)</i>	
Mineral	Bendiocarb	0,10	1,0	0,094 ± 0,008	0,99 ± 0,01	94 ± 8	99 ± 1
	Carbaril	0,10	1,0	0,097 ± 0,002	0,98 ± 0,02	97 ± 2	98 ± 2
	Promecarb	0,10	1,0	0,092 ± 0,003	0,94 ± 0,03	92 ± 3	94 ± 3
	Propoxur	0,10	1,0	0,099 ± 0,003	1,02 ± 0,02	99 ± 3	102 ± 2
Grifo	Bendiocarb	0,10	5,0	0,098 ± 0,004	4,81 ± 0,09	98 ± 4	96 ± 2
	Carbaril	0,10	5,0	0,098 ± 0,001	4,99 ± 0,09	98 ± 1	100 ± 2
	Promecarb	0,10	5,0	0,091 ± 0,006	4,64 ± 0,06	91 ± 6	93 ± 1
	Propoxur	0,10	5,0	0,096 ± 0,002	4,90 ± 0,05	96 ± 2	98 ± 1
Pozo	Bendiocarb	1,0	5,0	0,95 ± 0,01	4,63 ± 0,05	95 ± 1	93 ± 1
	Carbaril	1,0	5,0	0,98 ± 0,02	4,91 ± 0,05	98 ± 2	98 ± 1
	Promecarb	1,0	5,0	0,90 ± 0,03	4,58 ± 0,08	90 ± 3	92 ± 2
	Propoxur	1,0	5,0	0,99 ± 0,02	4,92 ± 0,09	99 ± 2	98 ± 2
Riego	Bendiocarb	1,0	5,0	0,95 ± 0,01	4,90 ± 0,05	95 ± 1	98 ± 1
	Carbaril	1,0	5,0	0,97 ± 0,03	4,97 ± 0,09	97 ± 3	99 ± 2
	Promecarb	1,0	5,0	0,93 ± 0,03	4,55 ± 0,09	93 ± 3	91 ± 2
	Propoxur	1,0	5,0	1,01 ± 0,04	4,83 ± 0,08	101 ± 4	97 ± 2

^a Media ± desviación estándar (n = 3).

^b Recuperación ± desviación estándar (n = 3).

6.3.5.2 Análisis de muestras de fruta

En el caso de las frutas la extracción de los pesticidas implica una extracción líquida con diclorometano asistida por ultrasonidos. Además, se recomienda utilizar a continuación la extracción en fase sólida, utilizando EnviCarb como material adsorbente; así se combina una etapa de limpieza de la muestra (*clean-up step*) con altas recuperaciones (del orden de 93 - 80%) y ausencia de sustancias coloreadas que podrían absorber la radiación quimioluminiscente.

Al aplicar el método se seguía el siguiente procedimiento:

En unos ensayos previos se comprobó que las frutas utilizadas (pera y manzana) procedentes del mercado local, no contenían pesticidas NMCs (Fig. 6.8 A). Para la preparación de muestras de fruta enriquecidas con los pesticidas, se eliminaron las partes no comestibles y las frutas fueron cortadas en trozos de 1 cm y picadas con un aparato comercial de cocina. Varias porciones de 10 g fueron fortificadas con diferentes cantidades (entre 10 y 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de los pesticidas NMCs y, después de mantener las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente, se sometieron a agitación con ultrasonidos con 50 ml de diclorometano durante 15 minutos. La masa homogénea resultante se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y el filtrado claro se pasó por un cartucho EnviCarb (Supelco, 500 mg con depósito de 6 ml). Los cartuchos de carbón activo se acondicionaron con 5 ml de diclorometano-metanol (80:20 v/v) seguido por 2 ml de metanol, separados por 6 ml de aire, antes de la aplicación de la muestra. Los pesticidas NMCs retenidos fueron eluidos con 1 ml de metanol a

3 ml min⁻¹, seguido de 3 ml de aire, 5 ml de la mezcla diclorometano–metanol (80:20) y 3 ml de aire. El eluido se evaporó hasta sequedad a 50 °C por el paso de una corriente de aire durante diez minutos. El residuo final fue disuelto en 500 µl de una mezcla acetonitrilo–agua e inyectado en el sistema de HPLC, siguiendo el mismo procedimiento indicado anteriormente.

Los datos de la Tabla 6.9 muestran que las recuperaciones de los pesticidas en manzana y pera son independientes del pesticida y de su concentración. Los límites de detección encontrados en el análisis de fruta fueron tan bajos como 0,5 µg kg⁻¹.

La Fig. 6.8 B muestra el cromatograma obtenido con una muestra de manzana a la que se habían adicionado los cuatro pesticidas, todos ellos a la concentración de 0,5 mg kg⁻¹.

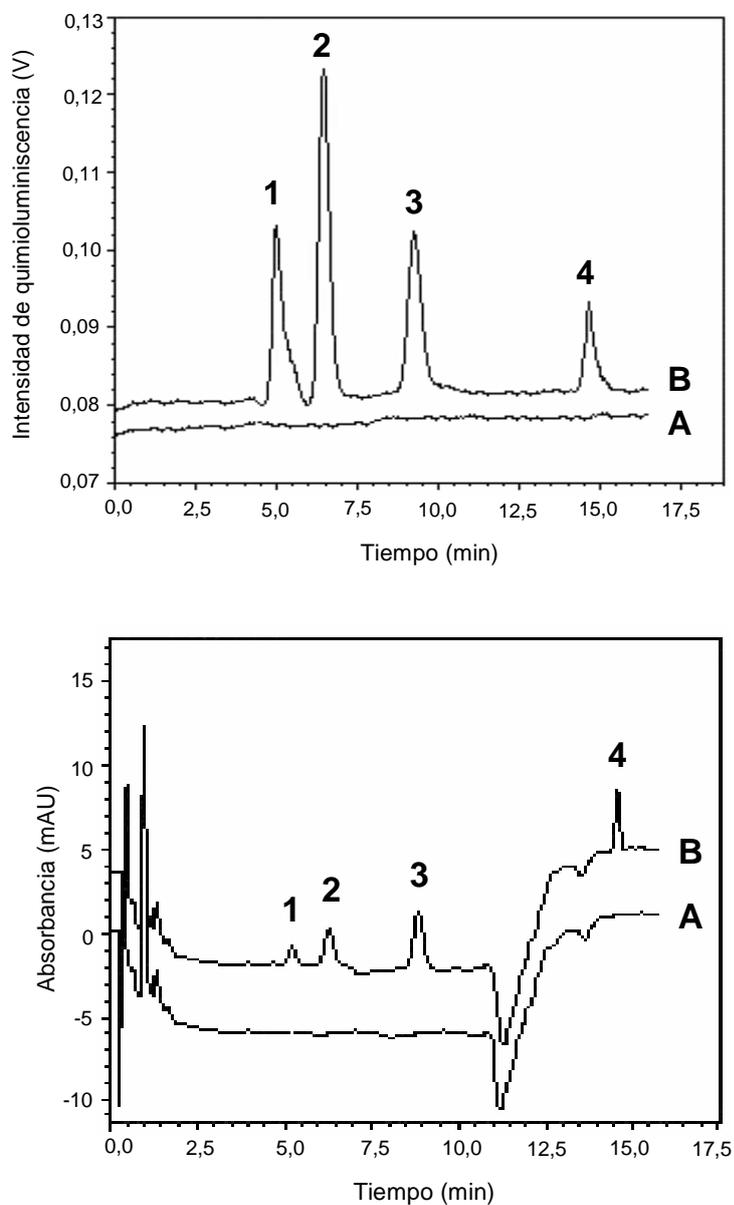


Figura 6.8. Cromatogramas de una muestra de manzana: (A) sin enriquecer; (B) enriquecida con $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

Arriba: detección quimioluminiscente; abajo: detección fotométrica a 210 nm.
Picos: (1) propoxur; (2) bendiocarb; (3) carbaril; (4) promecarb.

Tabla 6.9
Análisis de muestras de fruta enriquecidas con los pesticidas NMCs

Muestra	Pesticida	Añadido (mg kg ⁻¹)		Encontrado ^a (mg kg ⁻¹)		Recuperación ^b (%)	
Manzana	Bendiocarb	0,100	0,25	0,084 ± 0,009	0,22 ± 0,02	84 ± 5	88 ± 3
	Carbaril	0,100	0,25	0,087 ± 0,008	0,23 ± 0,02	87 ± 6	92 ± 5
	Promecarb	0,100	0,25	0,083 ± 0,006	0,20 ± 0,04	83 ± 5	80 ± 7
	Propoxur	0,100	0,25	0,089 ± 0,009	0,21 ± 0,03	89 ± 4	84 ± 6
Pera	Bendiocarb	0,15	0,40	0,13 ± 0,01	0,32 ± 0,04	87 ± 3	80 ± 8
	Carbaril	0,15	0,40	0,13 ± 0,01	0,37 ± 0,01	87 ± 4	93 ± 3
	Promecarb	0,15	0,40	0,12 ± 0,02	0,34 ± 0,02	80 ± 9	85 ± 3
	Propoxur	0,15	0,40	0,14 ± 0,01	0,35 ± 0,05	93 ± 5	88 ± 5

^a Media ± desviación estándar (n = 3).

^b Recuperación ± desviación estándar (n = 3).

Como resumen de los estudios expuestos podemos afirmar que, una vez optimizadas las condiciones de fotoconversión de los pesticidas NMCs a MA y la fotooxidación de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, se obtiene un método HPLC con detección quimioluminiscente para la determinación de pesticidas NMCs que destaca por su alta sensibilidad y selectividad y gran estabilidad de las señales.

Comparando con el método de HPLC con detección UV, la sensibilidad del método propuesto es mayor y los cromatogramas son más simples debido a la presencia de pocos picos, tal como se observa en las Figuras 6.7 y 6.8. El método de HPLC que emplea la hidrólisis básica post-columna de los pesticidas NMCs para producir MA, seguido de la reacción de la MA con el reactivo OPA para formar un derivado isoindol de características fluorescentes, muestra una sensibilidad menor que el método aquí presentado. Además, la formación de MA por vía fotoquímica es más sencilla que la hidrólisis básica.

Hay que destacar que en el esquema de preconcentración en línea propuesto los problemas debidos a pérdidas de analito o de contaminación son mínimos, ya que el extracto se puede inyectar automáticamente en el sistema cromatográfico.

6.4 BIBLIOGRAFÍA

- 1.- A. de Kok, M. Hiemstra, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **623** (1992) 265.
- 2.- B.D. McGarvey, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 89.
- 3.- S.S. Yang, A.I. Goldsmith, I. Smetena, *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 3.
- 4.- A.D. Thruston, EPA-R2-72-079, US Environmental Protection Agency, Office of Research and Monitoring, Corvallis OR, 1972.
- 5.- C.M. Sparacino, J.W. Hines, *J. Chromatogr. Sci.*, **14** (1976) 549.
- 6.- S.S. Yang, I. Smetena, *J. Chromatogr. A*, **664** (1994) 289.
- 7.- K.M.S. Sundaram, J. Curry, *J. Chromatogr. A*, **672** (1994) 117.
- 8.- V.A. Simon, K.S. Pearson, A. Taylor, *J. Chromatogr.*, **643** (1993) 317.
- 9.- M. Hiemstra, A. de Kok, *J. Chromatogr. A*, **667** (1994) 155.
- 10.-H.A. Moye, S.J. Scherer, P.A.St. John, *Anal. Lett.*, **10** (1977) 1049.
- 11.- U.S. Environmental Protection Agency, Method 531, 1985, EPA/600/4-851054.
- 12.-L. Nondek, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal.Chem.*, **55** (1983) 1466.

- 13.-C.J. Miles, H.A. Moye, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 220.
- 14.- J.J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, *Anal. Chim. Acta*, **541** (2005) 111.
- 15.- D.A. Volmer, *J. Chromatogr. A*, **794** (1998) 129.
- 16.-E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, *Anal. Chem.*, **73** (2001) 5441.
- 17.-M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr.*, **871** (2000) 43.
- 18.-K. Granby, J. Hinge, H. Bjerre, *Anal. Chim. Acta*, **520** (2004) 165.
- 19.-C.S.P. Sastry, D. Vijaya, D.S. Mangala, *Analyst*, **112** (1987) 75.
- 20.-D.V. Naidu, P.R. Naidu, *Talanta*, **37** (1990) 629.
- 21.-K.S. Kumar, K. Suvardhan, D. Rekha, B. Jayaraj, P. Chiranjeevi, *Helv. Chim. Acta*, **88** (2005) 1022.
- 22.-M. Trojanowicz, "Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications", World Scientific, London, 2000, pp 318-319.
- 23.-J.L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, **179** (1986) 497.
- 24.-A. Coly, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, **392** (1999) 255.
- 25.-K.D. Khalaf, J. Sancenón, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, **266** (1992) 119.
- 26.-M. de la Guardia, K.D. Khalaf, V. Carbonell, A. Morales-Rubio, *Anal. Chim. Acta*, **308** (1995) 462.

-
- 27.-L. Alvarez-Rodriguez, J. Esteve-Romero, I. Escrig-Tena, M.C. García Alvarez-Coque, *J. AOAC Intern.*, **82** (1999) 937.
- 28.-L. Pogačnik, M. Franko, *Talanta*, **54** (2001) 631.
- 29.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Anal. Chim. Acta*, **476** (2003) 141.
- 30.-T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Analyst*, **127** (2002) 1526.
- 31.-D.M. Hercules, F.E. Lytle, *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (1996) 4745.
- 32.-<http://eur-lex.europa.eu>

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS

Separación cromatográfica

La separación de los analitos se ha realizado utilizando un instrumento de cromatografía líquida de alta resolución de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), compuesto por un módulo de disolventes **System Gold 125 NM** y un detector de diodos en serie **System Gold 168**, conectados a un ordenador personal IBM provisto del software **32 Karat** de Beckman Coulter para el control de las bombas, la integración y cuantificación. Para la introducción manual de las muestras se utilizó una válvula de inyección **Rheodyne 7725i** (Bensheim, Alemania).

Tipos de columnas utilizadas:

- Columna Ultrasphere ODS (5 μm , 4,5 cm x 4,6 mm) de Beckman Coulter.

- Columna Ultrasphere ODS (5 μm , 25 cm x 4,6 mm) de Beckman Coulter.

- Columna Mediterranea Sea₁₈ C₁₈ (5 μm, 15 cm x 4,6 mm) de Teknokroma (Barcelona, España).

- Columna Tracer Excel 120 C₈ (5 μm, 15 cm x 4,6 mm) de Teknokroma.

- Columna PRP-1 poli(estireno-divinilbenceno) (5 μm, 25 cm x 4,1 mm) de Hamilton (Nevada, USA).

- Columna Discovery RP Amida C₁₆ (5 μm, 15 cm x 4 mm) de Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Sistemas de detección post-columna

Los componentes utilizados en los distintos esquemas propuestos para la detección fotoquímica–luminiscente son:

Bombas peristálticas **Gilson Minipuls 3** (Villiers-le-Bel, Francia) provistas de tubos de Tygon para bombear las disoluciones.

Válvulas de inyección, tubos de PTFE (0,5 mm de diámetro interno) y conectores para análisis por inyección en flujo de la casa **OMNIFIT** (Cambridge, Reino Unido).

Minicolumnas adaptables a los esquemas de flujo rellenas con resinas de intercambio iónico Dowex 50 W X 8 y Dowex 1 X 8 (Fluka; Buchs, Suiza).

Fuentes de iluminación y reactores fotoquímicos: para la fotólisis en la zona ultravioleta se utilizaron lámparas de tipo lápiz **SPECTROLINE** modelo **36-380** ($\lambda_{em} = 365$ nm) y modelo **11SC-1 OP** ($\lambda_{em} = 254$ nm) de SPECTRONICS CORPORATION

(Westbury, NY, USA), con una fuente de alimentación **SCT-1A/F**, también de SPECTRONICS CORPORATION. Éstas son lámparas de descarga de vapor de mercurio a baja presión, de 5,3 cm de longitud y 6 W de potencia y tienen los dos electrodos en un mismo extremo. Se caracterizan por su pequeño tamaño, estabilidad y larga vida (aprox. 5000 horas) y su carcasa de cuarzo fundido tiene una excelente transmisión en el ultravioleta. Los espectros de emisión de los dos tipos de lámparas utilizados se presentan en la Figura 1. Además, van cubiertas de un filtro tubular que absorbe la luz visible y permite la transmisión de luz ultravioleta.

Para la construcción del reactor fotoquímico se enrolla un tubo de PTFE sobre la lámpara y de esta forma se consigue una eficaz iluminación de la muestra. Todo el conjunto se aloja en una caja metálica, diseñada por nuestro Equipo de Investigación, cuyas paredes interiores están recubiertas con espejos para aumentar el flujo luminoso por reflexión.

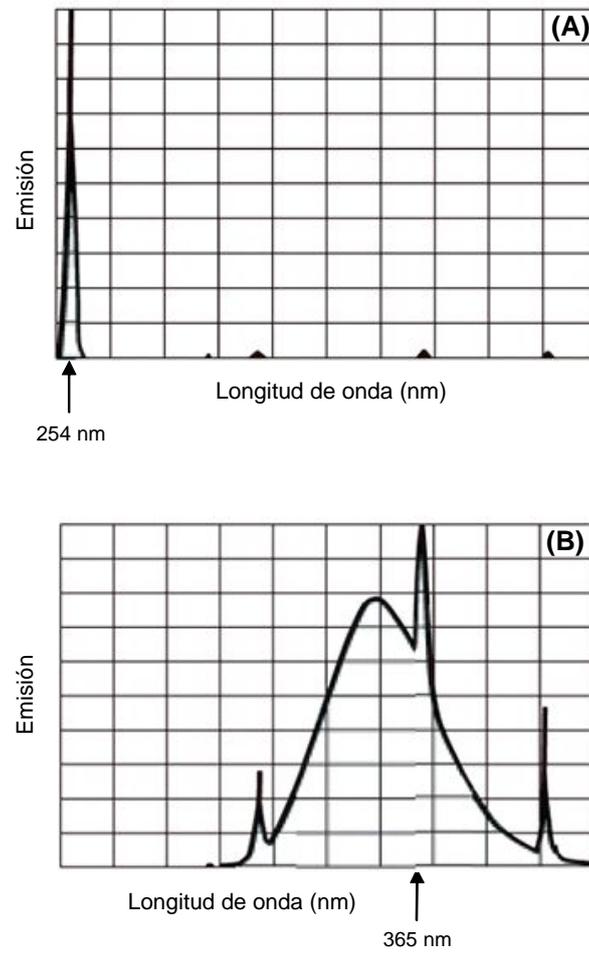


Figura 1. *Espectros de emisión de las lámparas.*

(A): Lámpara modelo 11SC-1; (B): lámpara modelo 36-380.

Para la detección de los analitos en el sistema post-columna se utilizaron los siguientes detectores, conectados al instrumento de HPLC a través de una interfase **SS420x** de Beckman:

- Espectrofluorímetro **AMINCO-BOWMAN Series 2** (Urbana, IL, USA), con corrección de espectros, conectado a un ordenador provisto del software SLM AB2 para medidas de fluorescencia, dotado de una cubeta de flujo **HELLMA 176.052 QS** (Müllheim, Alemania) de 25 μ l de volumen interno para medidas en análisis por inyección en flujo (Fig. 2) o de una cubeta **FP294 Thermo Spectronic** de un volumen interno de 8 μ l y 10 mm de camino óptico para las medidas cromatográficas.



Figura 2. Célula de flujo para fluorescencia 176.052 QS (Hellma).

- Luminómetro **Camspec CL-2** (Cambridge, Reino Unido) conectado al espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2 con la finalidad de utilizar su software para la adquisición y control de

datos. Este instrumento está dotado de una célula de flujo de cuarzo de 60 μl de volumen interno, con tres puertas (dos de entrada y una de salida) que permiten una mezcla eficaz de reactivos dentro de la misma, mejorando el rendimiento y eficacia de la señal quimioluminiscente, cuyo esquema se muestra en la Figura 3.

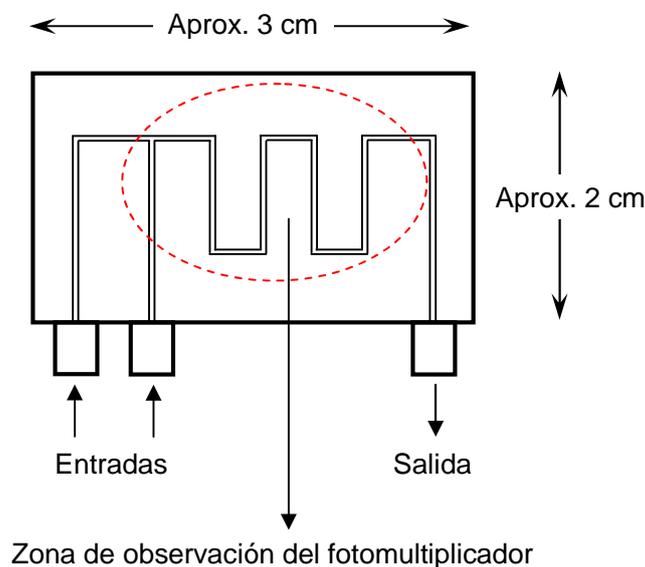


Figura 3. Esquema de la célula de flujo del luminómetro Camspec CL-2.

- Luminómetro diseñado por nuestro Equipo de Investigación y construido por Microbeam (Barcelona, España). El instrumento está compuesto básicamente por un tubo fotomultiplicador **modelo 814** de **Photon Technology International** (Monmouth Junction, NJ,

USA) y una célula de flujo **Hellma 170.700 QS** (Figura 4) que consta de dos ventanas y posee un volumen interno de 31 μl y un camino óptico de 0,5 mm. El instrumento está conectado al espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2 con la finalidad de utilizar su software para la adquisición y el tratamiento de los datos.



Figura 4. Célula de flujo para quimioluminiscencia 170.700 QS (Hellma)

Extracción en fase sólida

Cuando se aplicó la extracción en fase sólida a las muestras se realizó de forma automática empleando un equipo **ASPEC XLi** de Gilson (Middleton, WI, USA), provisto de un brazo robótico **183 XL**, una bomba **402 SYRINGE PUMP** que consta de dos jeringas de 5 y 10 ml para suministrar y dispensar los líquidos del sistema y la muestra, una bomba externa **306 PUMP** de Gilson para dispensar grandes volúmenes de muestra, una válvula de alta presión **Bio-chem INC** de tres vías que permite introducir aire comprimido en

los tubos colectores y ayuda a concentrar las fracciones eluidas, y una válvula de inyección **RHEODYNE 7010** para la inyección directa de las muestras en el cromatógrafo. Además, el instrumento dispone de un dispositivo de aluminio en el que se sitúan los tubos colectores, acoplado a un termostato, que ha sido diseñado por nuestro Equipo de Investigación con la finalidad de seleccionar la temperatura adecuada para eliminar rápidamente los disolventes orgánicos de la elución, y llevar las muestras a sequedad. El instrumento de SPE está conectado a un ordenador equipado con el software **735 Sampler** de Gilson.

Para concentrar y purificar las muestras se utilizaron cartuchos de extracción rellenos con diferentes fases sólidas:

- Cartuchos de gel de sílice Spe-ed (500 mg, 6 ml) de Applied Separations (Allenton, PA, USA).
- Cartuchos de carbón activo Supelclean ENVI-Carb (500 mg, 6 ml) de Supelco.
- Cartuchos de C₁₈ Discovery DSC-18 (500 mg, 6 ml) de Supelco.
- Cartuchos de C₈ Discovery DSC-8 (500 mg, 6 ml) de Supelco.
- Cartuchos de Strata-X (200 mg, 3 ml) de Phenomenex (Torrance, CA, USA).

Otro equipamiento

Espectrofotómetro de doble haz visible-UV **UNICAM UV2** (Cambridge, Reino Unido), conectado a un ordenador provisto del software **vision 3.0**, con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, para el registro de espectros de absorción.

Potenciómetro **PRECISA pH 900** (Dietikon, Suiza) con electrodo de vidrio combinado para medidas de pH.

Baños de ultrasonidos **Bransonic 4** (Danbury, USA) de 14 W de potencia y **Selecta modelo 3000683** (Barcelona, España) de 110 W de potencia.

Centrífugas **Heraeus Sepatech** (Osterode, Alemania) y **Hettich Zentrifugen** (Tuttlingen, Alemania).

Baño termostático **Precis-term (Selecta)**.

Placa agitadora-calefactora (**Selecta**).

Rotavapor **Heidolph VV2000** (Schwabach, Alemania).

Sistema de purificación de agua Milli-Q de **Millipore Ibérica** (Madrid, España), para la obtención de agua desmineralizada, empleada para la preparación de todas las disoluciones acuosas.

DISOLUCIONES Y REACTIVOS

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico y en todos los casos se utilizó agua purificada en un sistema Milli-Q (Millipore Ibérica) para la preparación de las disoluciones. Además, las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0,45 μm (Millipore).

Disoluciones de analitos:

Disolución de *filoquinona* de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo el correspondiente producto Sigma (Madrid, España) en metanol. Esta disolución se guardó en frasco topacio a 4 °C.

Disolución de *menaquinona-4* de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la cantidad apropiada del producto Sigma en metanol. Esta disolución se guardó en frasco topacio a 4 °C.

Disolución de *menadiona* de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la cantidad apropiada de la vitamina (Sigma) en metanol. Esta disolución se guardó en frasco topacio a 4 °C.

Disolución de *ácido alendrónico* de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la correspondiente sal sódica (Sigma) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó protegida de la luz a 4 °C.

Disolución de *ácido etidrónico* de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la sal disódica del ácido (Sigma) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *ácido ibandrónico* de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la cantidad apropiada de la sal sódica del ácido, cedida

amablemente por Roche Diagnostic GmbH (Mannheim, Alemania), en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *ácido risedrónico* de 100 µg ml⁻¹, preparada disolviendo en agua bidestilada la sal sódica del ácido, adquirida de Chemicals-International (www.chemicals-international.com). Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *tiamina* (1x10⁻³ M), preparada disolviendo clorhidrato de tiamina (Sigma) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *monofosfato de tiamina* (1x10⁻³ M), preparada disolviendo la cantidad adecuada del producto Sigma en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, protegida de la luz.

Disolución de *pirofosfato de tiamina* (1x10⁻³ M), preparada disolviendo la cantidad apropiada del producto Sigma en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *ácido etilendiaminotetraacético* (EDTA) 1x10⁻³ M, preparada disolviendo la cantidad adecuada de la sal disódica (Fluka) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *ácido etilenglicol-bis-(2-amino etil éter)tetraacético* (EGTA) 1x10⁻³ M, preparada disolviendo la correspondiente cantidad de la sal tetrasódica (Sigma) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *ácido etilentriaminopentaacético* (DTPA) 1×10^{-3} M, preparada disolviendo la cantidad adecuada del producto Fluka en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *ácido nitrilotriacético* (NTA) 1×10^{-3} M, preparada disolviendo el producto Fluka en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *ácido 1,2-diaminociclohexanotetraacético* (DCTA) 1×10^{-3} M, preparada disolviendo el producto Fluka en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *ácido S,S'-etilendiamino-N,N'-disuccínico* (EDDS) 1×10^{-3} M, preparada disolviendo la cantidad adecuada del producto Fluka en agua bidestilada. Esta disolución se guardó en un recipiente de plástico.

Disolución de *amiodarona* de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la cantidad apropiada de clorhidrato de amiodarona (Sigma) en metanol. Esta disolución se guardó en frasco topacio a 4°C .

Disolución de *desetilamiodarona* de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, preparada disolviendo la cantidad apropiada del producto suministrado por Sanofi-Synthelabo (Sisteron, Francia) en metanol. Esta disolución se guardó a 4°C preservada de la luz.

Disolución de *propoxur* de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ en acetona al 5 %, preparada disolviendo el producto Riedel-de Haën (Seelze, Alemania)

en la cantidad apropiada de acetona y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *propoxur* de 150 µg ml⁻¹ en acetonitrilo al 30 %, preparada disolviendo el producto Riedel-de Haën en la cantidad apropiada de acetonitrilo y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *bendiocarb* de 150 µg ml⁻¹ en acetonitrilo al 30 %, preparada disolviendo el pesticida (Riedel-de Haën) en la cantidad apropiada de acetonitrilo y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, protegida de la luz.

Disolución de *carbaril* de 150 µg ml⁻¹ en acetonitrilo al 30 %, preparada disolviendo el sólido suministrado por Riedel-de Haën en la cantidad apropiada de acetonitrilo y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, preservada de la luz.

Disolución de *promecarb* de 150 µg ml⁻¹ en acetonitrilo al 30 %, preparada disolviendo el producto Riedel-de Haën en la cantidad apropiada de acetonitrilo y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C, protegida de la luz.

Disolución de *isoprocarb* de 150 µg ml⁻¹ en acetonitrilo al 30 %, preparada disolviendo el producto Riedel-de Haën en la cantidad apropiada de acetonitrilo y diluyendo con agua bidestilada. Esta disolución se guardó a 4 °C preservada de la luz.

Las disoluciones de trabajo de menor concentración de estos compuestos se prepararon diariamente por dilución conveniente de la disolución estándar en matraz aforado. En el caso de disoluciones

inestables, se conservaron en el refrigerador para minimizar la degradación.

Otras disoluciones

Disolución de *fosfato* (1×10^{-3} M), preparada disolviendo K_2HPO_4 (Fluka) en agua bidestilada.

Disolución de *metilamina* (1×10^{-3} M) preparada disolviendo la cantidad adecuada del producto Merck (Darmstadt, Alemania) en agua bidestilada.

Disolución de *peroxidisulfato potásico* (5 g l^{-1}) y tetraborato sódico (19 g l^{-1}), preparada disolviendo los productos Fluka en agua bidestilada.

Disolución de *tiamina* de 1 g l^{-1} , preparada disolviendo clorhidrato de tiamina (Sigma) en agua bidestilada. Esta disolución se guardó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, protegida de la luz.

Disolución de *molibdato amónico* ($3,9 \text{ g l}^{-1}$) en HNO_3 0,5 M, preparada disolviendo el producto Fluka en la cantidad apropiada de ácido nítrico (Merck) y diluyendo con agua bidestilada.

Disolución de *amoníaco* 5 M, preparada por dilución en agua bidestilada a partir del producto Merck.

Disolución de *cloruro de tetrabutilamonio* (TBACl) 0,25 M, preparada disolviendo la cantidad adecuada del producto Fluka en agua bidestilada.

Disolución de *luminol* 0,01 M, preparada disolviendo el sólido (Fluka) en la cantidad adecuada de disolución de NaOH 1 M y diluyendo con agua bidestilada.

Disolución de *permanganato potásico* 0,02 M, preparada disolviendo el sólido (Sigma) en agua hirviendo y filtrando la disolución resultante a través de lana de vidrio. Esta disolución se almacenó en frasco de color topacio protegida de la luz.

Disolución de *peroxidisulfato potásico* 1,5 mM en disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 5,7, preparada disolviendo el sólido (Fluka) en la cantidad adecuada de disolución reguladora.

Disolución de $Ru(bpy)_3^{2+}$ 2 mM, preparada por disolución de $Ru(bpy)_3Cl_2 \cdot 6H_2O$ (Fluka) en agua bidestilada. Esta disolución se almacenó protegida de la luz.

Disolución de *ácido sulfúrico* 0,02 M, preparada por dilución del producto Fluka en agua bidestilada.

Disolución de *sulfato amónico* 17 mM de pH 6,8, preparada disolviendo el producto Sigma en agua bidestilada y ajustando el pH a 6,8 con disolución de NaOH.

Disolución de *periodato potásico* 1 mM en disolución reguladora fosfato 50 mM de pH 6,5 y 2 % de acetona, preparada disolviendo el sólido (Prolabo; Barcelona, España) en las cantidades adecuadas de disolución reguladora y acetona (Romil).

Se utilizaron diversas disoluciones reguladoras en amplios intervalos de pH y concentración:

Disoluciones *reguladoras acetato* de diferente pH. Se prepararon a partir de acetato sódico 0,1 M (Fluka) y la cantidad adecuada de ácido acético 0,1 M para alcanzar el pH deseado, que se comprobó con un electrodo de vidrio.

Disoluciones *reguladoras fosfato* de distintos pH y concentraciones. Se prepararon a partir de ácido fosfórico (Probus; Barcelona, España), dihidrógenofosfato sódico (Fluka) o hidrógenofosfato potásico (Fluka) y suficiente cantidad de disolución de hidróxido sódico para alcanzar el pH deseado, que se comprobó con el electrodo de vidrio.

Disoluciones *reguladoras Britton-Robinson* de diferentes pH, preparadas a partir de una disolución 0,2 M en los ácidos bórico (Sigma) acético (Riedel-de Hæn) y fosfórico (Probus) a la que se añadieron diferentes cantidades de hidróxido sódico hasta alcanzar el pH deseado, que se comprobó con el electrodo de vidrio.

Disoluciones *reguladoras borato* de distintos pH y concentraciones. Se prepararon a partir de ácido bórico (Sigma) y suficiente cantidad de disolución de hidróxido sódico 1 M para alcanzar el pH deseado, que se comprobó con el electrodo de vidrio.

Disoluciones *reguladoras carbonato* de diferentes valores de pH, preparadas a partir de carbonato o bicarbonato sódico (Sigma).

Disoluciones de *hidróxido sódico* (Sigma) y *ácido clorhídrico* (Merck) se usaron para ajustar el pH de las disoluciones reguladoras.

Disoluciones de los tensoactivos *dodecilsulfato sódico* (Sigma), *Brij-35* (Sigma), *alcohol polivinílico* (Merck), *Triton X-100* (Fluka),

bromuro de cetiltrimetilamonio (Sigma), *bromuro de tetradeciltrimetilamonio* (Sigma) y *ciclodextrinas* (Sigma), preparadas a partir de los correspondientes reactivos por disolución en agua bidestilada.

Otras disoluciones de diferentes sales inorgánicas y compuestos orgánicos para el estudio de interferencias.

Distintos disolventes orgánicos de grado HPLC: acetonitrilo, metanol y acetona obtenidos de Romil, y diclorometano, hexano y éter dietílico obtenidos de Lab-Scan (Dublín, Irlanda).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se demuestran las ventajas que presenta la hibridación de reacciones fotoquímicas y luminiscentes cuando se acoplan como sistema de detección en cromatografía líquida, aportando métodos sensibles y específicos para la determinación de diversas sustancias de interés biológico y ambiental.

2. Las vitaminas K, filoquinona (K_1), menaquinona (K_2) y menadiona (K_3), son fotoactivas bajo la acción de la luz ultravioleta. Nosotros hemos demostrado que la irradiación de las vitaminas en micelas de SDS y en presencia de metanol conduce a la formación de las formas hidroquinonas, de alta fluorescencia. El microentorno creado por el medio micelar estabiliza las formas reducidas de las vitaminas K con un aumento notable de fluorescencia, lo que hace posible trabajar en condiciones aerobias. Estos estudios han permitido desarrollar un sistema de detección fotoquímico-fluorescente sencillo, eficiente y reproducible para las vitaminas K, una vez separadas por cromatografía líquida en fase reversa. El método ha sido aplicado al análisis de las citadas vitaminas en muestras reales: productos farmacéuticos, vegetales y leche para lactantes. En los casos en que los analitos se encuentran en concentraciones muy bajas se ha incorporado al esquema analítico un proceso de extracción en fase sólida totalmente automatizado,

que permite preconcentrar las muestras antes de su paso por la columna cromatográfica.

3. Se ha conseguido la separación y determinación cromatográfica, sensible y segura, de los ácidos bisfosfónicos alendrónico, etidrónico, ibandrónico y risedrónico, especies de gran interés en el tratamiento de trastornos que afectan al esqueleto. La detección fluorescente se basa en la fotooxidación de los bisfosfonatos en presencia de peroxidisulfato bajo la acción de la luz ultravioleta. En este proceso se genera fosfato, que en un sistema dinámico forma el anión fosfomolibdato, capaz de oxidar la tiamina a tiocromo, muy fluorescente. La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna C₁₈ en presencia de tetrabutilamonio. El método ha sido validado y su efectividad se ha comprobado aplicándolo al análisis de bisfosfonatos en preparados farmacéuticos comerciales y en orina.

4. La fotólisis de las vitaminas B₁, tiamina (T), monofosfato de tiamina (TMP) y pirofosfato de tiamina (TDP), ha sido acoplada al sistema quimioluminiscente luminol–permanganato en medio básico. El estudio demuestra que los fotoproductos de las vitaminas B₁ ejercen un fuerte efecto activador en la emisión quimioluminiscente. Este proceso quimioluminiscente inducido fotoquímicamente ha sido implementado como sistema de detección post-columna en la separación cromatográfica de T, TMP y TDP con excelentes resultados, como se ha demostrado cuando ha sido contrastado aplicándolo al análisis de vitaminas B₁ en muestras reales, concretamente preparados multivitamínicos y alimentos infantiles.

5. En la parte B de la Tesis nuestra atención se ha centrado en la fotogeneración “on-line” de Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) y su aplicación como reactivo quimioluminiscente para la detección en cromatografía líquida. Se han seleccionado diferentes clases de compuestos para evaluar sus posibilidades: ácidos aminopolicarboxílicos, que directamente reaccionan con el Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo) para dar una intensa quimioluminiscencia; los antiarrítmicos amiodarona y su metabolito desetilamiodarona, los cuales conducen a buenas señales quimioluminiscentes cuando también ellos se someten a la irradiación ultravioleta; finalmente, pesticidas N-metilcarbamatos que por fotólisis generan metilamina, especie capaz de producir emisión quimioluminiscente muy intensa con el Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo), reactivo que a su vez se ha obtenido por fotólisis en línea.

En la separación cromatográfica de los ácidos aminopolicarboxílicos, con el método de detección quimioluminiscente mencionado, se han conseguido excelentes resultados analíticos en las determinaciones de DTPA, EDDS, EDTA y NTA, haciendo posible su evaluación en aguas de forma rápida, con elevada sensibilidad y selectividad. También se ha aplicado el método al análisis de salsas.

La separación y determinación de amiodarona y su metabolito desetilamiodarona con detección fotoquímica-quimioluminiscente ha permitido, como aplicación más importante, la evaluación de estos analitos en suero sanguíneo con gran exactitud en sólo nueve minutos. El método es muy sensible y el sistema de detección propuesto conduce a unos cromatogramas en los que merece

destacarse la ausencia de picos interferentes, así como la gran estabilidad y baja señal de la línea base.

Finalmente, el último Capítulo de la Tesis se ha dedicado a la separación de los pesticidas N-metilcarbamatos, propoxur, bendiocarb, carbaril, isoprocarb y promecarb, aportando un nuevo método cromatográfico para su separación con el acoplamiento de dos reacciones fotoquímicas en el esquema dinámico; por una parte, la descomposición de los pesticidas para liberar metilamina, y por otra, la generación del reactivo quimioluminiscente Ru(III)tris(2,2'-bipiridilo). Los resultados de las investigaciones han permitido introducir un sistema muy eficaz para el análisis de este tipo de pesticidas en diferentes matrices. Además, en este caso se ha aumentado extraordinariamente la sensibilidad del método, mediante la incorporación al proceso de una etapa de extracción en fase sólida, totalmente automatizada, que hace posible aplicar el procedimiento al análisis de los citados pesticidas en agua, donde el *European Drinking Water Directory* impone un límite de $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$.

6. En resumen, podemos afirmar que la hibridación de reacciones fotoquímicas y procesos luminiscentes (concretamente fluorescencia y quimioluminiscencia) constituye una alternativa analítica de grandes posibilidades cuando se incorpora como sistema de detección en cromatografía líquida.

