



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES Y
DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y
ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS
EN FÁRMACOS MEDIANTE EL USO DE
TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS**

**PRESENTADA POR:
NATIVIDAD RAMOS MARTOS**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. LUIS FERMÍN CAPITÁN-VALLVEY
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ**

JAÉN, 15 DE ENERO DE 1999

ISBN 84-8439-124-8



DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN FÁRMACOS MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS

Ramos Martos

Natividad

I.S.B.N 84-8439-124-8

Centro Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud

Departamento Química Física y Analítica



Nombre y apellidos del autor

Apellidos **RAMOS MARTOS**

Nombre **NATIVIDAD**

Título de la Tesis Doctoral

**DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN FÁRMACOS
MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS**

Fecha de lectura

15 DE ENERO DE 1999

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

Centro **Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud**

Departamento **Química Física y Analítica**

Composición del Tribunal / Dirección de la tesis

Dirección de la Tesis **Dr. D. Luis Fermín Capitán-Vallvey y Dr. D. Antonio Molina Díaz**

Presidente/a del Tribunal **Dr. D. Jesus Thomas Gómez**

Vocales

Dr. D. José Manuel Cano Pavón

Dra. D^a M^a Isabel Pascual Reguera

Dr. D. Alberto Navalón Montón

Secretario/a **Dra. D^a M^a Paz Fernández-Liencre de la Torre**

Calificación obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

RESUMEN

Los métodos fluorimétricos descritos en bibliografía para la determinación de alcaloides en fármacos son muy escasos, e igual ocurre con la determinación de mezclas de principios activos en las que algún constituyente pertenezca a este grupo de sustancias. Se desarrollan diferentes métodos fluorimétricos para la determinación en mezclas binarias y ternarias de: codeína, clorhidrato de piridoxina y ácido salicílico, empleando diferentes técnicas fluorimétricas convencional, sincrónica y de derivadas.

La mezcla ternaria se resolverá mediante un método de calibración multivariante de regresión por mínimos cuadrados parciales. Se pondrá a punto un método cromatográfico (HPLC) que se utilizará como método de referencia para la determinación de estos y otros principios activos: cafeína, clorhidrato de timina y paracetamol. La determinación del ácido salicílico se llevará a cabo previa hidrólisis de la sal. Los sistemas estudiados y su posterior determinación en productos farmacéuticos han sido: codeína-ácido salicílico, codeína-clorhidrato de piridoxina y la mezcla ternaria de los tres principios activos.

Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Química Física y Analítica



*Determinación de principios activos en fármacos
mediante el uso de técnicas fluorimétricas*

NATIVIDAD RAMOS MARTOS

TESIS DOCTORAL

Jaén, 1998

**DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN FÁRMACOS
MEDIANTE EL USO DE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS**

UNIVERSIDAD DE JAÉN

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

Área de conocimiento: Química Analítica

Visado y firmado en Jaén, julio de 1998

Los directores



Prof. Dr. D. Luis Fermín Capitán-Vallvey
Catedrático del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Granada.



Prof. Dr. D. Antonio Molina Díaz
Profesor Titular del Departamento
de Química Física y Analítica de
la Universidad de Jaén.

*Memoria presentada para aspirar al grado
de Doctor en Ciencias Químicas*



Fdo. Natividad Ramos Martos

Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar, a los Dres. D. Luis Fermín Capitán-Vallvey, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Granada y D. Antonio Molina Díaz, Profesor Titular de Química Analítica de la Universidad de Jaén, para quienes la distancia no ha impedido la codirección de este Memoria.

A los Dres. D. Alberto Navalón Montón y D. Ignacio de Orbe Payá, profesores Titulares de Química Analítica de la Universidad de Granada, que en tantas ocasiones nos orientaron a lo largo del desarrollo de este trabajo e igualmente a los Dres. Monsa, Rosi y Antonio, profesores del mismo departamento, de los cuales siempre he obtenido una inestimable ayuda. Al Dr. D. Manuel Melguizo Guijarro, profesor Titular de Química Orgánica de la Universidad de Jaén, por su colaboración en la interpretación de los espectros de RMN.

A todos mis compañeros de departamento de los que siempre he obtenido muestras de apoyo, en especial a Paco Partal por su colaboración en la captación de gráficos.

A D. Francisco Aguirre Gómez y D. Óscar del Pico Hualde, de los servicios técnicos de esta Universidad.

A mi competente amigo Pepe Murillo, por su eficaz trabajo de encuadernación.

Y también, a todas aquellas personas y amigos, que en algún momento acertaron a decir, ¿Qué tal vas? o ¿Cómo va eso?, suficiente para demostrar su interés con cariño.

A todos, gracias.

A los hombres y mujeres que dedican su tarea profesional al ambicioso mundo de la investigación científica.

A mis padres.

Y con un sentimiento especial a Rafa y a nuestros hijos Rafael, Guillermo y Pablo.



ÍNDICE



OBJETO DEL TRABAJO	1
INTRODUCCIÓN	5
I. FOTOLUMINISCENCIA	9
II. FOTOABSORCIÓN Y EMISIÓN	13
III. CARACTERÍSTICAS INTRÍNSECAS DE LA FLUORESCENCIA POR EMISIÓN	19
III.1. Desplazamiento de Stokes	19
III.2. Regla de Kasha	19
III.3. Regla de la imagen especular	19
IV. INFLUENCIA DE VARIABLES EN LA FLUORESCENCIA EN DISOLUCIÓN	23
IV.1. Disolventes	23
IV.2. Temperatura	23
IV.3. Influencia de la acidez	23
IV.4. Atenuación	23
V. FLUORESCENCIA Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS MOLÉCULAS	25
VI. APLICACIONES DEL ANÁLISIS FLUORIMÉTRICO	41
VI.1. Compuestos orgánicos	42
VI.1.1. Aminas, aminoácidos e iminoácidos	42
VI.1.2. Alcaloides	47
VI.1.3. Vitaminas	51
VI.1.4. Esteroides	59
VI.1.5. Tetraciclinas	61
VI.1.6. Histamínicos	62
VI.2. Compuestos inorgánicos	62
VII. ACCIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS DROGAS SINTÉTICAS	65
VIII. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS, ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y PIRIDOXINA	67
IX. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	73

CAPÍTULO I. METODOLOGÍA DE TRABAJO	83
I. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	85
I.1. Metodología de la espectrofluorimetría en disolución.	85
I.1.1. Técnicas espectrofluorimétricas utilizadas.	86
I.1.2. Medida de la intensidad de fluorescencia.	87
I.1.3. Condiciones instrumentales.	89
I.1.4. Procedimiento operatorio.	90
I.2. Separación de los constituyentes por cambio iónico.	91
I.2.1. Soportes sólidos ensayados.	91
I.2.2. Procedimiento operatorio.	92
II. METODOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE DATOS	93
II.1. Métodos univariantes.	94
II.1.1. Estimación de los parámetros del modelo.	94
II.1.2. Validación del modelo lineal.	95
II.1.2.1. Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.	95
II.1.2.2. Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales.	96
II.1.3. Parámetros de calidad del modelo.	98
II.1.3.1. Límites de detección y cuantificación.	98
II.1.3.2. Precisión del método.	99
II.1.3.3. Sensibilidad del método.	99
II.2. Métodos multivariantes.	100
II.2.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales.	101
II.2.1.1. Selección del número óptimo de factores	102
II.2.1.2. Calidad en el ajuste del modelo.	103
II.2.1.3. Detección de muestras desechables.	104
III. VALIDACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO.	105
III.1. Comparación de la media de dos conjuntos de resultados.	105
III.2. Protocolos de validación para comprobar la exactitud. Método de adición de patrón. .	106
IV. MUESTRAS ANALIZADAS Y SU TRATAMIENTO.	109
IV.1. Muestras analizadas.	109
IV.1.1. Productos farmacéuticos.	109
IV.1.2. Muestras sintéticas.	111

IV.2.	Tratamiento de las muestras.	111
V.	EXPERIMENTAL.	113
V.1.	Reactivos, disoluciones y soportes.	113
V.2.	Instrumentación y material de laboratorio.	116
V.3.	Ordenadores y programas informáticos.	117
CAPÍTULO II.	ESTUDIO CROMATOGRÁFICO Y RESOLUCIÓN DEL SISTEMA	
	ÁCIDO SALICÍLICO, CAFEÍNA, CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA,	
	CLORHIDRATO DE TIAMINA, CODEÍNA Y PARACETAMOL	119
I.	INTRODUCCIÓN	121
II.	PRUEBAS PRELIMINARES. ASIGNACIÓN DE PICOS	127
III.	SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA	129
IV.	EFICACIA DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PROPUESTA	133
IV.1.	Factor de capacidad	133
IV.2.	Parámetro de resolución	134
IV.3.	Factor de asimetría	135
V.	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	137
VI.	CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS	139
VI.1.	Funciones de calibrado	139
VI.2.	Estudio de reproducibilidad	145
VI.3.	Límites de detección	146
VII.	APLICACIONES ANALÍTICAS	149
CAPÍTULO III.	ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE CODEÍNA, ÁCIDO SALICÍLICO	
	Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA	155
I.	CARACTERÍSTICAS FLUORESCENTES.	157
I.1.	Espectros de luminiscencia total.	157
I.2.	Espectros bidimensionales.	160

I.3.	Selección de las longitudes de onda.	162
I.4.	Condiciones instrumentales.	162
II.	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MEDIDA DE LA SEÑAL ANALÍTICA.	167
II.1.	Influencia del pH	167
II.2.	Influencia del volumen de disolución reguladora.	170
II.3.	Influencia de la fuerza iónica.	172
II.4.	Influencia de la temperatura.	174
III.	RESUMEN DE OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.	177
CAPÍTULO IV. MÉTODOS PROPUESTOS PARA DETERMINAR ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA MEDIANTE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS		179
I.	CARACTERÍSTICAS FLUORIMÉTRICAS DEL SISTEMA ÁCIDO SALICÍLICO-CODEÍNA. . .	181
I.1.	Espectrofluorimetría convencional y derivada.	184
I.2.	Espectrofluorimetría sincrónica y sincrónica derivada.	188
I.3.	Selección de las longitudes de onda para cada técnica fluorimétrica	195
I.4.	Optimización de parámetros instrumentales.	196
II.	MÉTODOS PROPUESTOS PARA DETERMINAR ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA POR ESPECTROFLUORIMETRÍA.	203
II.1.	Calibración.	203
II.1.1.	Funciones de calibrado para codeína.	203
II.1.2.	Funciones de calibrado para ácido salicílico.	208
II.2.	Parámetros de calidad.	213
II.2.1.	Límites de detección y cuantificación.	213
II.2.2.	Estudio de reproducibilidad.	215
II.3.	Resumen de parámetros analíticos.	218
III.	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS. TOLERANCIAS.	219
IV.	APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN ÁCIDO SALICÍLICO - CODEÍNA	227
CAPÍTULO V. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL SISTEMA ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA		239
I.	INTRODUCCIÓN.	241

II.	APLICACIONES ANALÍTICAS.	243
II.1.	Determinación de ácido salicílico.	243
II.1.1.	Preparación de la muestra.	243
II.1.2.	Aplicación de los métodos fluorimétricos.	243
II.1.3.	Parámetros estadísticos.	248
II.2.	Determinación de codeína.	252
II.2.1.	Estudio experimental para la separación de este analito del ácido salicílico. .	252
II.2.1.1.	Elección del cambiador iónico para la separación.	252
II.2.1.2.	Optimización del volumen inicial desechable.	254
II.2.1.3.	Estudio de fijación de ácido salicílico en la resina de cambio iónico.	256
II.2.2.	Calibración y parámetros analíticos.	258
II.2.2.1.	Función de calibrado.	258
II.2.2.2.	Límites de detección y cuantificación.	260
II.2.2.3.	Reproducibilidad del método	260
II.2.2.4.	Resumen de los parámetros analíticos	261
II.2.3.	Estudio de interferencias. Tolerancia.	262
II.2.4.	Aplicaciones analíticas.	264
II.2.4.1.	Funciones de calibrado con adición de patrón.	264
II.2.4.2.	Parámetros estadísticos.	268
 CAPÍTULO VI. ESTUDIO Y RESOLUCIÓN DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA Y CODEÍNA		273
I.	CARACTERÍSTICAS FLUORIMÉTRICAS DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA-CODEÍNA	275
I.1.	Espectrofluorimetría convencional.	278
I.2.	Espectrofluorimetría de derivadas.	281
I.3.	Optimización de parámetros que influyen en la medida de la señal analítica.	283
II.	DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA Y CODEÍNA POR ESPECTROFLUORIMETRÍA	289
II.1.	Calibración.	289
II.1.1.	Funciones de calibrado para codeína.	289
II.1.2.	Funciones de calibrado para clorhidrato de piridoxina	292
II.2.	Parámetros de calidad.	295
II.2.1.	Límites de detección y cuantificación.	295

II.2.2. Estudio de reproducibilidad.	296
II.3 Resumen de los parámetros analíticos	299
III. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS Y TOLERANCIAS.	301
IV. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA - CODEÍNA	307
V. APLICACIONES ANALÍTICAS	313
V.1. Productos farmacéuticos.	313
V.2. Productos farmacéuticos semisintéticos.	322
V.3. Fármacos sintéticos.	323
V.4. Muestras sintéticas.	323
CAPÍTULO VII. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA POR CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES	325
I. ESPECTROS EN DISOLUCIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA	329
II. FUNCIONES DE CALIBRADO PARA LOS COMPONENTES INDIVIDUALES	331
III. MATRIZ DE CALIBRACIÓN	335
IV. ETAPA DE PREDICCIÓN	341
V. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA EN FÁRMACOS	343
CONCLUSIONES	345
BIBLIOGRAFÍA	349



OBJETO DEL TRABAJO



Los métodos fluorimétricos descritos en bibliografía para determinación de alcaloides en fármacos son sorprendentemente escasos, e igual ocurre con la determinación de mezclas de principios activos en los que algún constituyente pertenezca a este grupo de sustancias.

En el presente trabajo pretendemos desarrollar diferentes métodos fluorimétricos de determinación en productos farmacéuticos de mezclas binarias y ternarias de principios activos en las que uno de los constituyentes sea siempre un alcaloide.

Basaremos la determinación en la medida de la fluorescencia nativa de los compuestos objeto de nuestro estudio. En la resolución de muestras binarias emplearemos diferentes técnicas fluorimétricas: espectrofluorimetría convencional, espectrofluorimetría sincrónica y espectrofluorimetría de derivadas.

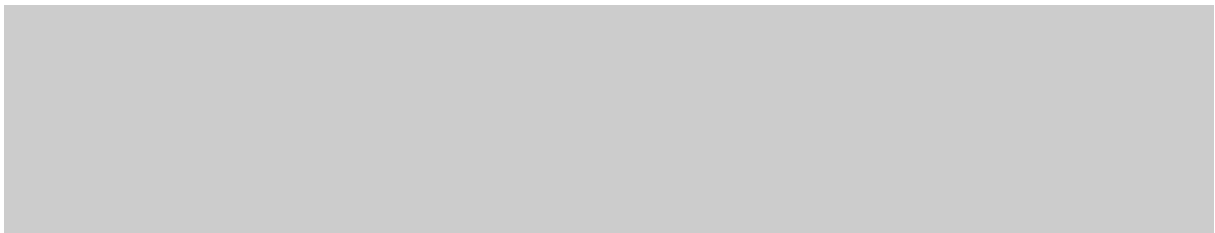
Hemos escogido para nuestro trabajo un alcaloide de uso relativamente frecuente como analgésico como es la codeína, y otros dos principios activos de amplia utilización tales, como son el ácido acetil salicílico y el clorhidrato de piridoxina, los dos primeros a su vez, se encuentran asociados con frecuencia en varios fármacos comerciales. La determinación de ácido acetil salicílico la llevaremos a cabo previa hidrólisis a ácido salicílico, como suele ser frecuente en la mayoría de los métodos de análisis de este principio activo por lo que partiremos de este último compuesto en el estudio de los sistemas abordados en la presente Memoria.

La mezcla ternaria de estos compuestos se resolverá por calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales.

Por otra parte, desarrollaremos un método cromatográfico alternativo, por cromatografía líquida de alta resolución, para la determinación de estos y otros principios que frecuentemente los acompañan y que a su vez utilizaremos como método de referencia



INTRODUCCIÓN



La luminiscencia es el término aplicado a la emisión de fotones de frecuencia ν , correspondiente a una transición $E_2 - E_1 = h\nu$, derivada de la relajación molecular producida, desde un estado electrónico de energía superior E_2 hasta un nivel E_1 , después de absorber la sustancia energía en forma de luz, calor, rayos X, energía química. Según la naturaleza de la fuente de energía para producir moléculas en estado excitado, se distinguen dos tipos de procesos luminiscentes, fotoluminiscencia y quimioluminiscencia.

La fotoluminiscencia da lugar a dos fenómenos, fluorescencia y fosforescencia, en ambos la excitación tiene lugar por absorción de fotones de la radiación incidente, pero se diferencian como se detallará más adelante, en que el caso de la fluorescencia la radiación de emisión en el proceso de relajación al estado fundamental no implica un cambio en el spin del electrón y en la fosforescencia sí.

El segundo tipo de luminiscencia, como su nombre indica, producción química de luz, denominada quimioluminiscencia, se basa en la emisión de una especie excitada que se ha formado en el curso de una reacción química. En algunos casos las especies excitadas son los productos de una reacción entre el analito y un reactivo adecuado (un oxidante fuerte, ozono o peróxido de hidrógeno); el resultado es un espectro característico de un producto de oxidación del analito más que del propio analito. En otros casos el analito no interviene directamente en la reacción de quimioluminiscencia y es el efecto de inhibición de éste sobre la reacción de quimioluminiscencia lo que sirve como parámetro analítico.

Cuando la reacción química de luminiscencia transcurre en un sistema biológico donde la acción catalizadora de las proteínas incrementa la eficiencia del proceso, toma el nombre particular de bioluminiscencia.

Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectrometría de absorción. Los límites de detección típicos son del orden de 10^{-10} g L⁻¹. Otra ventaja de los métodos luminiscentes es su gran intervalo lineal de concentraciones, que es a menudo significativamente mayor que los encontrados en los métodos de absorción. La selectividad de los procedimientos de luminiscencia es a menudo mejor que la de los métodos de absorción. Los métodos de luminiscencia, sin embargo, son de mucha menor aplicación que los de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que pueden producir luminiscencia.

I. FOTOLUMINISCENCIA

La fotoluminiscencia se da en moléculas que han sido excitadas mediante una energía procedente de radiación electromagnética ultravioleta o visible; la fotoabsorción y emisión no están permitidas entre estados arbitrarios, sino la transición se establece sólo entre ciertos niveles cuánticos estacionarios permitidos. Hay dos tipos de fotoluminiscencia: fluorescencia y fosforescencia; ambos difieren en que las transiciones de la fluorescencia no implican un cambio de spin, como consecuencia tiene un tiempo de vida más corto (10^{-5} s), cesando la luminiscencia casi inmediatamente, mientras que por el contrario las emisiones de fosforescencia están acompañadas de un cambio en el spin del electrón, lo cual hace que la radiación emitida tarde un tiempo detectable después de haber acabado la irradiación, a menudo varios segundos o más, en la Figura 1, se muestra los tiempos de vida típicos de ambas situaciones.

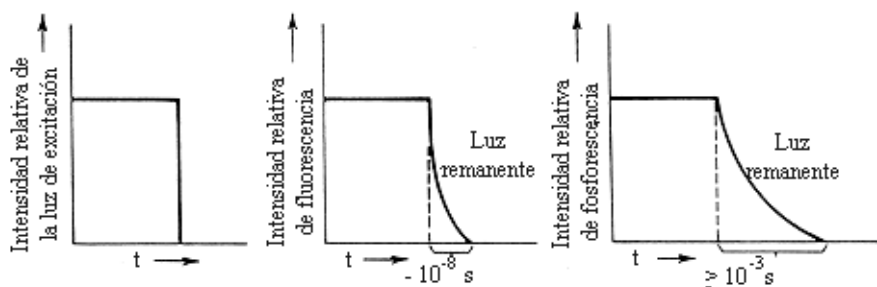


Fig. 1 Tiempo de luz remanente en fluorescencia y fosforescencia

La intensidad de la emisión F , después de la irradiación de excitación decae de acuerdo con la ecuación:

$$F = F_0 e^{-t/J} \quad [1]$$

donde:

F_0 : es la intensidad de emisión cuando la sustancia es excitada

t : tiempo de excitación de la muestra

J : tiempo de vida media del estado excitado, dado por la ecuación:

$$T = \frac{\int_0^{\infty} t \rho(t) dt}{\int_0^{\infty} \rho(t) dt} \quad [2]$$

donde $D(t)$ representa la función de caída de la radiación de emisión.

En la mayoría de los casos la fotoluminiscencia, tanto si es fosforescencia como fluorescencia, tiene una longitud de onda mayor que la utilizada para su excitación.

La medida de la intensidad de fotoluminiscencia permite la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas a nivel de traza. Actualmente el número de métodos fluorimétricos es significativamente mayor que el número de aplicaciones de los procedimientos de fosforescencia.

Recientemente el análisis fluorimétrico ha sido aplicado ampliamente en varios campos de la bioquímica, especialmente en biomedicina y análisis clínicos por su gran sensibilidad y selectividad.

La fosforescencia se observa generalmente en estado sólido a bajas temperaturas. Su sensibilidad es inferior a la fluorescencia pero la determinación de los componentes es satisfactoria realizándose a través de las medidas de sus espectros, intensidad y tiempo de vida media.

Sin embargo, durante los últimos años la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) ha sido objeto de considerable atención y ha llegado a constituir una nueva técnica analítica sensible y selectiva, resultando particularmente útil para moléculas de interés biológico, farmacéutico y clínico [1- 5].

Generalmente en las metodologías para obtener señales de fosforescencia en disolución a temperatura ambiente hay que evitar el fenómeno de atenuación (quenching), para ello se puede congelar la muestra o llevarla casi hasta sequedad por evaporación. Para aumentar la viscosidad del medio, se pueden añadir disolventes viscosos tales como glicerol (1,2,3-trihidroxipropano), disminuyendo así la colisión de las moléculas en estado triplete, otra ventaja que presenta el glicerol es que puede sustituir a disolventes polares, tales como el agua o etanol, de esta manera puede comprobarse la fosforescencia de la eosina con glicerol como disolvente.

Con carácter general, los métodos propuestos en disolución implican el uso de alguna clase de medio organizado, tales como los de la micela, soluciones micelares, donde la molécula fosforescente se sitúa en el centro y de esta manera queda protegida de colisiones con moléculas de agua y más en particular de moléculas de oxígeno, en fase acuosa. De esta forma se mantiene con seguridad la molécula en estado triplete. Un ejemplo de este tipo de compuestos son las ciclodextrinas, compuestos relacionados con el almidón y han sido muy apropiadas para trabajos de fosforescencia. Este compuesto

consiste en anillos [6] de unidades de D-glucosa, que describen perfectamente una estructura en forma de brazalete, Figura 2, con grupos hidroxilos por la parte superior e inferior, en el interior de la misma se encuentran grupos CH y uniones éter que forman la parte hidrofóbica donde queda ocluido el analito orgánico.

No obstante, recientemente se ha descrito un método de obtener fosforescencia a temperatura ambiente sin emplear ninguna clase de medio organizado [7].

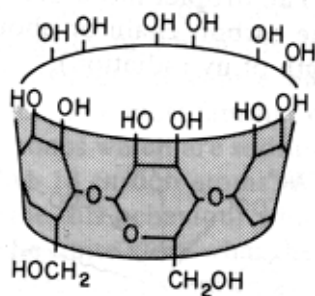


Fig. 2.

Dado que la emisión de fosforescencia se obtiene generalmente en sistemas rígidos, en los que los movimientos moleculares están restringidos y suprimida la difusión de atenuadores del estado triplete como el oxígeno o impurezas, se han desarrollado numerosos métodos fosforimétricos a temperatura ambiente basados en la fijación del analito por adsorción o químicamente enlazado sobre un soporte sólido adecuado, tal como papel [8,9], gel de sílice [10], resina de cambio iónico [11], sustrato de alcohol polivinílico [12], tanto en modo discontinuo (batch), como en flujo continuo [13], constituyendo este último caso lo que se conoce como sensores fosforescentes a temperatura ambiente.

Como ejemplo de algunos de estos métodos fosforimétricos a temperatura ambiente, podemos citar los métodos de determinación de pesticidas, empleando como soporte sólido papel Whatman nº 4, desarrollados por L.F. Capitán-Vallvey y col.. carbaril [14] y morestán [15], se determinan en aguas y otras matrices a niveles de sub-: $\mu\text{g mL}^{-1}$ depositando la disolución problema sobre el papel y después secando éste. La reproducibilidad obtenida es del orden de 2-3%. Por un procedimiento similar se determina ácido nalidíxico en orina humana [16], también a niveles de sub-: $\mu\text{g mL}^{-1}$.

II. FOTOABSORCIÓN Y EMISIÓN

A partir de la teoría de Einstein [17], un átomo o molécula solo puede absorber energía en forma de cuantos de luz, luego la radiación absorbida por mol de átomos o moléculas equivale fotoquímicamente a la siguiente expresión:

$$E = N_0 h \nu \quad [3]$$

donde: N_0 : nº de Avogadro ($6.022045 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
 ν : frecuencia de la radiación
 h : constante de Planck ($6.626176 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$)

De acuerdo con esto, la energía de excitación se transforma en un aumento de energía interna del sistema en sus distintas formas: electrónicas, vibracionales, rotacionales. Por tanto, la absorción de energía produce un cambio energético del electrón entre dos estados energéticos; estos dos estados electrónicos pueden tener dos situaciones, singlete o triplete con distintas orientaciones del spin, según se muestra en la Figura 3 y representado por el número cuántico S, de valores $\pm \frac{1}{2}$. La probabilidad de que ocurra la transición electrónica es proporcional a la expresión [4].

$$\int \phi_i \cdot \mathbf{M} \cdot \phi_j \, d\tau \quad [4]$$

donde:

ϕ_i y ϕ_j : son respectivamente las funciones de onda del estado fundamental y excitado.

\mathbf{M} : vector momento dipolar del electrón.

J : tiempo de vida media de fluorescencia

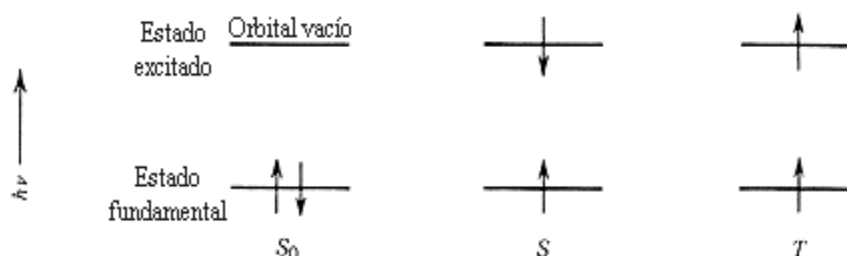


Fig. 3 El spin y el estado excitado

Los niveles energéticos vibracionales para cada nivel anterior están representados con líneas y enumerados en orden creciente de energía 0, 1, 2, 3... tal como se observa en la Figura 4.

A temperatura ambiente, las transiciones se producen entre niveles vibratorios del estado fundamental singlete E_{S_0} . Cuando la luz incide sobre una molécula, la absorción de la energía transcurre en un tiempo de 10^{-15} s, es decir casi instantáneamente, mientras que una vibración nuclear requiere de 10^{-12} s. Se puede considerar, en base al principio de Frank-Condon [18], que durante el proceso de la transición electrónica la distancia internuclear permanece invariable. El proceso inverso al estado fundamental, es posible según las siguientes situaciones.

1. En el caso de átomos gaseosos, la radiación del proceso de emisión del estado excitado E_{S_1} al fundamental E_{S_0} , se produce a la misma longitud de onda que la luz fue absorbida, no hay transiciones entre estados vibracionales de ambos niveles. Esta radiación se conoce con el término de *radiación resonante o fluorescencia de resonancia*.

2. En el caso de moléculas diatómicas, la molécula excitada experimenta procesos de relajación por conversión interna sin emisión de radiación, debido a los choques con las moléculas del disolvente, hasta el nivel vibratorio de energía más bajo en el estado excitado, curva A'- B', y vuelve al estado fundamental emitiendo energía, produciéndose el fenómeno de fluorescencia, en un tiempo aproximado de 10^{-8} s.

3. Cuando las curvas de energía potencial de los estados excitados E_{S_1} y E_{T_1} , de la molécula excitada se cruzan tal como se observa en la Figura 4, se produce una inversión en el valor del spin y un cambio en la multiplicidad de la molécula, es decir corresponde a un estado triplete, produciéndose procesos de relajación de conversión interna en A''- B'', hasta el nivel vibratorio más bajo en energía y regresa al estado fundamental emitiendo energía produciéndose el fenómeno de fosforescencia que requiere de un tiempo de 10^{-3} s.

Jablonski [19], Becker [20], Mataga y Kubota [21], Berlam [22], Zander [23] y Schwedt [24] describen con más detalle, la influencia que sobre las transiciones electrónicas tienen los niveles vibratorios y electrónicos de la molécula, todo ello, de acuerdo al diagrama de la Figura 5.

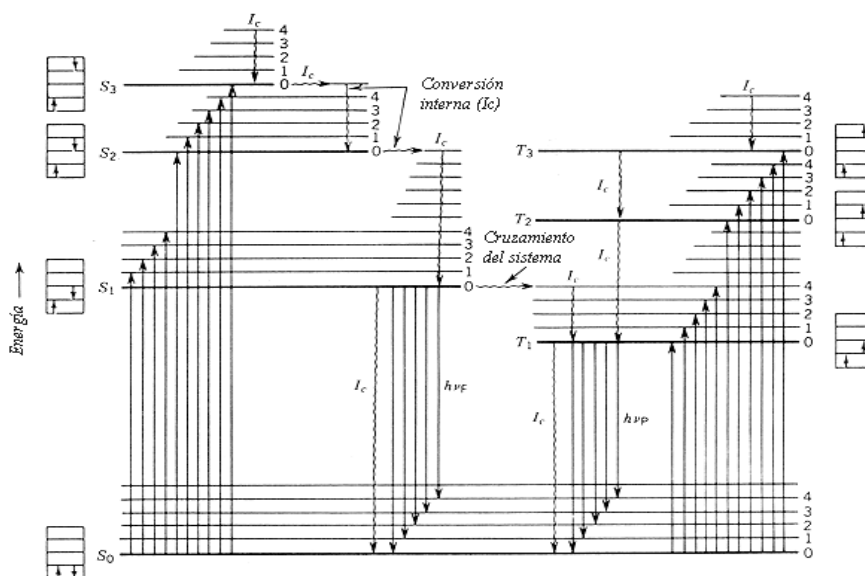


Fig. 5 Esquema de absorción y emisión de las transiciones electrónicas.

Los múltiples niveles energéticos fundamental, primero, segundo y tercero tanto del estado singlete como triplete, en el diagrama son denominados respectivamente S₀, S₁, S₂, S₃ y T₁, T₂, T₃. En cada nivel energético existen distintos niveles vibracionales de orden creciente de energía numerados 0, 1, 2, 3, y demás.

Después de la absorción, la molécula regresa en un tiempo aproximado de 10^{-12} s al nivel vibracional cero del correspondiente estado excitado S₁, si estuviera en niveles superiores de energía S₂ o S₃, se iría trasladando de un nivel a otro mediante procesos de relajación, conocidos con el término de conversión interna (I_c), señalados en el diagrama, [25 y 26].

Después de alcanzar el nivel vibratorio más bajo del nivel S₁, volvería al estado fundamental en un tiempo de 10^{-8} s, observándose el fenómeno de fluorescencia. Si la diferencia de energía potencial entre S₀ y S₁ es más grande que entre S₁ y S₂ o S₂ y S₃, la conversión interna mencionada anteriormente entre S₁ y S₀ no tiene lugar. Generalmente el proceso completo de conversión interna es antes que el de fluorescencia, la razón es que el tiempo de vida media de la fluorescencia es de 10^{-8} s.

La molécula en un estado excitado singlete, puede pasar por conversión a uno triplete. Tal conversión es producida por un cruzamiento del sistema de S₁ a T₁ [27]. El electrón después de alcanzar el nivel vibratorio más bajo del nivel T₁ por conversión interna, permanece durante un tiempo más

largo, alrededor de 10^{-3} s, volviendo al estado fundamental mediante un proceso de emisión denominado fosforescencia. Según se observa en la Figura 6, el espectro de fosforescencia corresponde siempre a longitudes de onda mayores que el de fluorescencia.

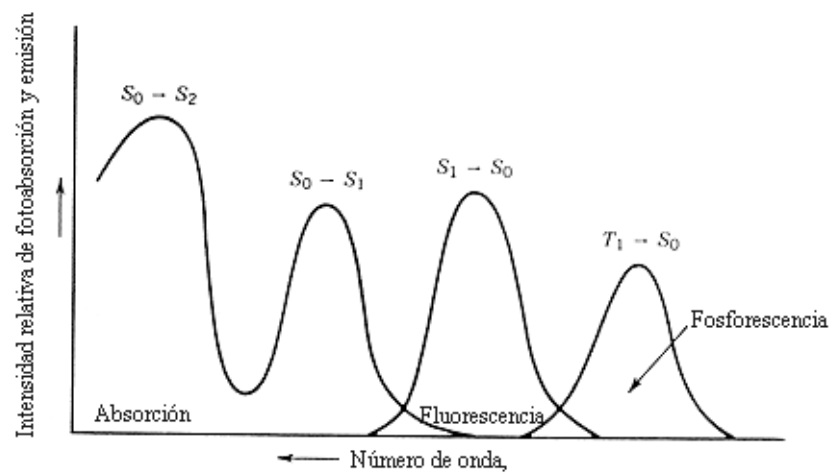


Fig. 6 Esquema de fotoabsorción y emisión

III. CARACTERÍSTICAS INTRÍNSECAS DE LA FLUORESCENCIA POR EMISIÓN

III.1. Desplazamiento de Stokes

El espectro de emisión de fluorescencia de moléculas o iones poliatómicos es de más baja energía, es decir la longitud de onda del máximo sufre un desplazamiento a valores mayores respecto de la longitud de onda de excitación. Esto se explica a través del fenómeno de conversión interna de los procesos de relajación, en los estados energéticos excitados S_1 o niveles superiores. Stokes [28], fue el primero en observar este fenómeno usando un aparato tan simple como el que se muestra en la Figura 7. Como fuente de rayos UV emplea la luz del sol, un vidrio azul como filtro de excitación, la disolución problema es quinina, por filtro de emisión un vaso de vino blanco y el ojo como detector de fluorescencia. La fluorescencia de la quinina ocurre alrededor de 450 nm y puede observarse el color visible presente.

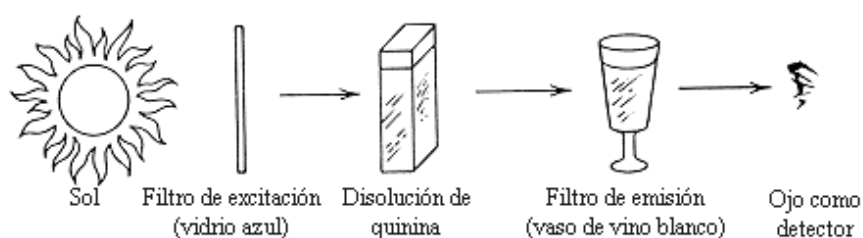


Fig. 7 Esquema del fenómeno de Stokes

III.2 Regla de Kasha

Kasha [29] encontró que la intensidad de fluorescencia o fosforescencia en compuestos orgánicos es independiente de la longitud de onda de excitación, es decir de la energía de excitación. En otras palabras, si la molécula es excitada desde el estado S_0 a un estado superior S_1 , la emisión de fluorescencia o fosforescencia solo se produce desde el nivel más bajo de vibración bien del nivel S_1 o T_1 . Esta regla solo es aplicable a compuestos orgánicos en estado líquido o gaseoso.

III.3 Regla de la imagen especular

El espectro de fluorescencia puede tener dos naturalezas, espectro de fluorescencia de excitación E_x , que relaciona la intensidad de fluorescencia con la variación de longitud de onda de excitación para una longitud de onda de emisión fija, y el espectro de emisión de fluorescencia, E_m que indica la relación entre la intensidad de fluorescencia con la variación de la longitud de onda de emisión a una longitud de onda de excitación fija.

La Figura 8, es un ejemplo de absorción y fluorescencia tomando como referencia las curvas de energía potencial en función de la distancia internuclear, para los distintos estados energéticos de la Figura 5. Cuando este espectro se representa gráficamente con el coeficiente de extinción en ordenada y el número de onda en abscisa, el espectro de emisión es la imagen especular del primero. Estos resultados no contradicen las reglas previstas de Stokes y Kasha.

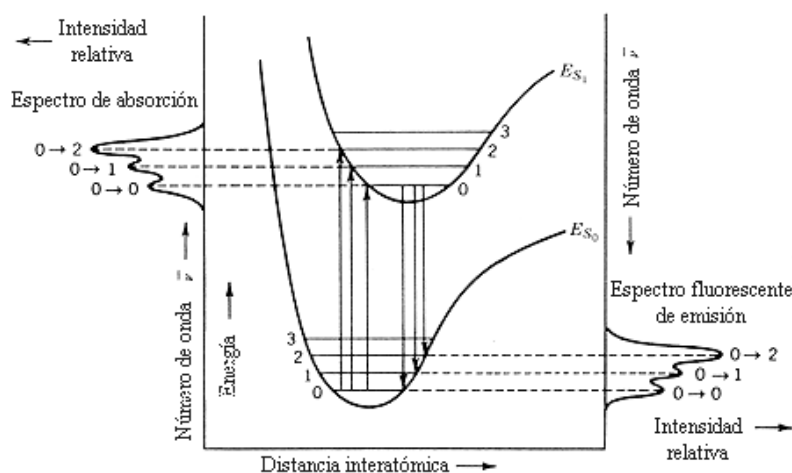


Fig. 8 Análisis de las gráficas de energía potencial en función de la distancia interatómica para las transiciones electrónicas de los espectros de absorción y de fluorescencia (emisión).

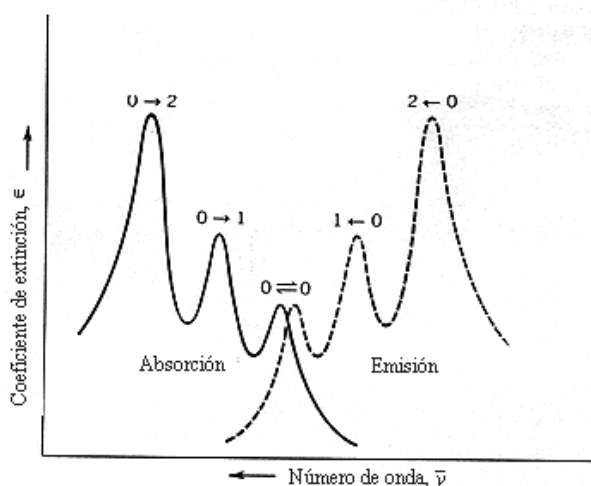


Fig. 9 Relación entre los espectros de fluorescencia de absorción y emisión.

Obviamente los tres picos del espectro de absorción de la Figura 9 corresponden a las transiciones electrónicas desde el nivel fundamental S_0 a los niveles vibracionales 0,1 y 2 del nivel excitado S_1 de la Figura 8, y los tres picos del espectro de emisión corresponden a las transiciones desde

el nivel de vibración más bajo del estado S_1 a los estados vibracionales de números cuánticos 0,1 y 2 respectivamente del estado S_0 . En otras palabras, en la Figura 9, los tres máximos (060), (061) y (062) corresponden al espectro de absorción, y (070), (170) y (072), al espectro de emisión de fluorescencia. La Figura 10, muestra como ejemplo, los espectros correspondientes al perileno.

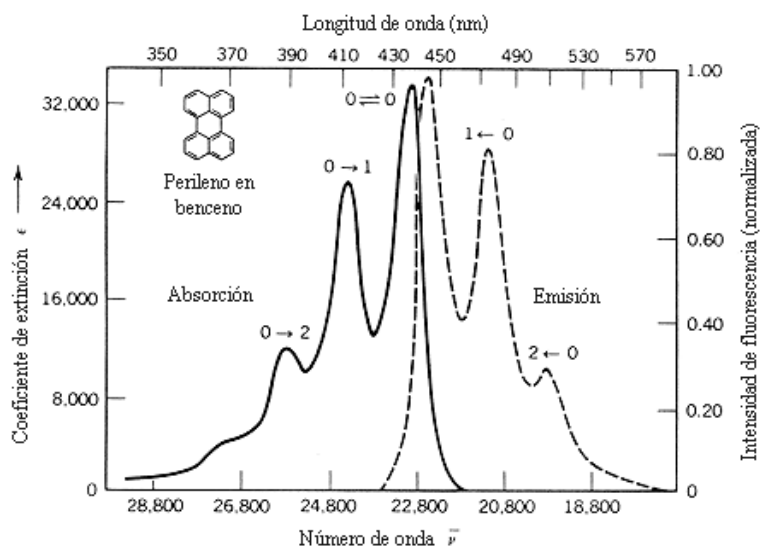


Fig. 10 Espectros de fluorescencia de emisión y absorción del perileno

IV. INFLUENCIA DE VARIABLES EN LA FLUORESCENCIA EN DISOLUCIÓN

IV.1 Disolventes.

Las características fluorescentes de las sustancias se ven afectadas en gran medida por los disolventes de distintas formas, puede existir interacción entre las moléculas del soluto y disolvente, haber transferencia de electrones entre fluoróforo y disolvente en función de la polaridad de éste, atracción electrostática entre los dipolos, dispersiones y enlaces por puentes de hidrógeno entre ellos.

La fluorescencia de una especie disminuye en presencia de disolventes que contienen átomos pesados, pues las interacciones orbital spin favorecen la velocidad de formación de estado triplete.

Cuando la contribución de los fenómenos de conversión interna y cruzamiento entre sistema están afectados por la presencia del disolvente, el espectro de emisión de fluorescencia tiene una eficiencia variable [20 ,30].

IV.2 Temperatura.

Los valores altos de temperatura de la disolución, influyen disminuyendo la intensidad de fluorescencia [31,32] debido a un aumento de la probabilidad de colisión intermolecular y pérdida de energía potencial desactivando las radiaciones. También es una consecuencia de trabajar a temperaturas altas, el desplazamiento producido en el espectro de fluorescencia de la longitud de onda de emisión, por lo cual es conveniente para realizar medidas de fluorescencia trabajar a temperaturas bajas.

IV.3 Influencia de la acidez.

Van Durem [30] y Schulman [33] explican con detalle la dependencia de la fluorescencia con el pH, generalmente el valor del pH tiene influencia sobre los espectros de emisión y excitación cuando hay transferencia de protones.

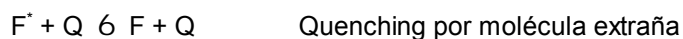
IV.4 Atenuación.

Cuando un fluoróforo coexiste con algunas sustancias se observa una disminución acusada de la intensidad de fluorescencia, debido a la desactivación de las radiaciones por colisión o a otros factores, tales fenómenos son denominados de "quenching" [34].

El proceso de desactivación quenching se describe de la forma siguiente, denominando F al fluoróforo y Q al quencher:



Fotoexcitación y emisión



Proceso de Quenching



En general existe dificultad para predecir la probabilidad de que una sustancia sea atenuada por otra conocida, solo podemos saber que dos moléculas reaccionan para dar una especie no fluorescente. Sin embargo, como principio general puede aplicarse a moléculas que pueden inducir el paso a estados de excitación triplete; generalmente es el resultado de la formación de un complejo. Entre los compuestos que pueden actuar como atenuadores quencher se encuentran, compuestos orgánicos con átomos pesados (especialmente halógenos), y especies paramagnéticas presentes en todo tipo de muestras en disolución.

A continuación se describen algunas de las principales causas que pueden producir el efecto quenching:

1. Elementos de transición, particularmente en forma iónica de metales coloreados como Cr^{+3} , Fe^{+3} y Cu^{+2} , y aniones como Br^- , I^- y NO_3^- .
2. Generalmente la intensidad de fluorescencia del fluoróforo en estado líquido o gaseoso, decrece a medida que aumenta la concentración hasta alcanzar cierto valor. Este fenómeno se conoce como "quenching de concentración".
3. La intensidad de fluorescencia es variable en función de las propiedades de los disolventes. Pero además en disolventes que posean grupos tales como C=C ó C=O, el efecto quenching es menor que en disolventes con grupos C-N, C-Cl ó C-Br.

V. FLUORESCENCIA Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS MOLÉCULAS

Una vez que en apartados anteriores hemos visto como la presencia de otros constituyentes en la disolución tales como el disolvente y agentes atenuantes al igual que factores como pH y temperatura afectan a la señal de fluorescencia, a continuación vamos a estudiar la influencia que la estructura química molecular tiene sobre el comportamiento fluorescente tanto de especies inorgánicas como orgánicas.

En principio hay que hacer notar que el número de compuestos orgánicos que pueden ser excitados en solución y emitir fluorescencia directamente es mucho mayor que el de especies inorgánicas.

Durante largo tiempo se ha estado investigando para establecer la relación entre la fluorescencia y la estructura de las moléculas [20, 35-39]. Por ejemplo, aunque la fenolftaleína y piridina no son fluorescentes, sí se observa que al añadir un enlace $-O-$ a la fenolftaleína y un anillo bencénico a la piridina, tal como se observa en la Figura 11, se convierten en fluoresceína y quinoleína respectivamente, siendo fluorescentes. Como resultado de muchas investigaciones realizadas, se ha encontrado que los requisitos para la fluorescencia, es poseer necesariamente un coeficiente de extinción molar alto, así como que se produzcan con facilidad transferencias electrónicas intramoleculares durante el tiempo de la fotoabsorción, y a continuación en el proceso de emisión del estado excitado singlete al estado fundamental también singlete, que la mayoría de las transiciones sean efectivas.

Seguidamente se describen resumidamente algunos resultados experimentales interesantes.

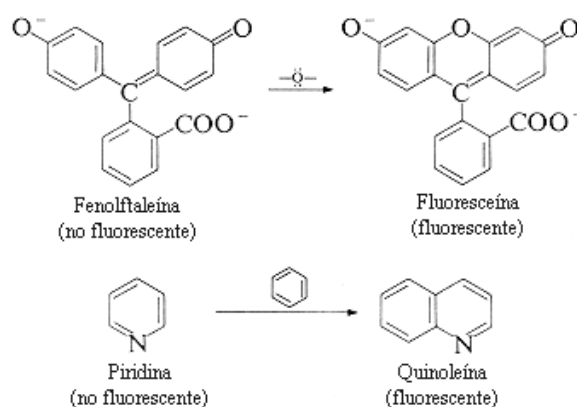


Fig. 11 Relación entre fluorescencia y estructura química.

La fluoresceína con un puente de oxígeno, presenta fluorescencia. La eosina tal como se muestra en la Figura 12, tiene una estructura plana y es un fluoróforo natural, que presenta fluorescencia verde en medio alcalino.

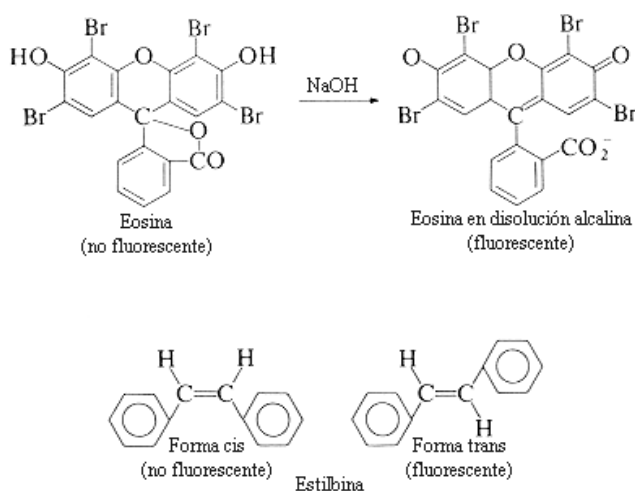


Fig. 12 Estructuras planas de eosina y estilbina

Gotô [40], que observó que la fluoresceína y eosina son fluoróforos intrínsecos, aplicó dichas características fluorescentes al análisis fluorimétrico. Posteriormente Foster [35], indicó que los fenómenos de fluorescencia están relacionados con las estructuras planas de las moléculas orgánicas y en este sentido Kasha [41], encontró que la intensidad de fluorescencia disminuía al añadir un sustituyente que altere la estructura plana.


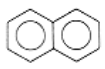

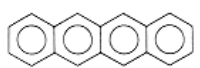
Weller [42] y Hercules [43] encontraron que la forma trans de la estilbina presenta fluorescencia, mientras que su isómero cis, no es fluorescente, la razón está en la dificultad de formar una estructura plana, en este último caso. Dichos isómeros, se representan en la Figura 12.

Yoshida y Oda [44] interpretan que la fluorescencia de los compuestos orgánicos está relacionada con su estructura química en base a los siguientes conclusiones experimentales:

1. Una molécula conteniendo dobles enlaces conjugados con estructuras resonantes muestra fluorescencia.

En efecto, algunos fluoróforos de anillos aromáticos condensados tienen una fluorescencia mayor que sus correspondientes de cadena en la molécula. La intensidad de fluorescencia aumenta con el número de enlaces conjugados, ello se observa en la Tabla 1.

Tabla 1 Características fluorescentes de algunos hidrocarburos aromáticos condensados

Sustancia		Longitud de onda máxima [nm]		Rendimiento cuántico de fluorescencia
		λ_{ex}	λ_{em}	
Benceno		205	278	0.11
Naftaleno		286	321	0.29
Antraceno		365	400	0.46
Tetraceno		390	480	0.60

2. Una molécula puede ser fluorescente cuando exista algún sustituyente que varíe la densidad electrónica en su estructura resonante. En la práctica cuando el sustituyente posee un efecto mesómero, se produce un gran incremento de la intensidad de fluorescencia. En particular, los grupos auxocromos causan un gran incremento en la fotoabsorción. El efecto mesómero puede ser $+M_f$, donde la transferencia electrónica se produce sobre el anillo, creándose carga positiva sobre el sustituyente en el anillo bencénico y $-M_f$ ocurriendo lo contrario, creación d carga positiva sobre el anillo y negativa en el sustituyente.

Los grupos $-OR$, $-NH_2$, tienen efecto $+M$ y $-CN$, CO , $-M$, donde R puede ser un H o grupo alquilo. Los grupos auxocromos $-OH$, $-OR$, y $-NH_2$ tienen un par de electrones apareados sobre el átomo adyacente, esto es el "átomo llave" [27], sobre el núcleo bencénico u otros hidrocarburos aromáticos.

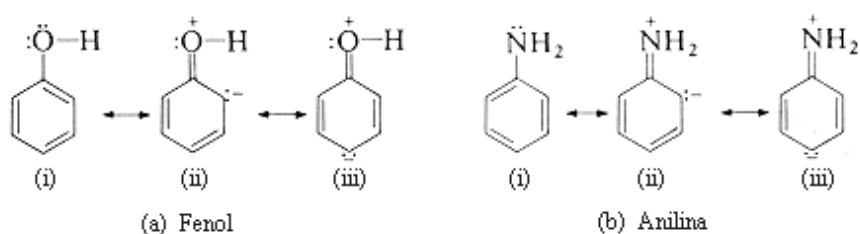


Fig. 13 Estructuras resonantes del fenol y anilina

En la Figura 13, se muestran las estructuras resonantes del fenol y anilina con el grupo -OH o -NH₂ con efecto mesómero +M, donde se observa una mayor densidad electrónica en la posición orto en ambos compuestos y siendo posiciones de ataque para reactivos electrofílicos. Por otro lado, en las estructuras resonantes del benzonitrilo, en el que el -CN está como sustituyente en el anillo, Fig. 14, la densidad electrónica es transferida desde el núcleo bencénico al sustituyente. Lo mismo ocurre en el caso de la acetofenona. De este modo, el anillo será ahora susceptible de ataques nucleofílicos. En la tabla 2, se muestran los efectos que sobre la intensidad de fluorescencia tienen distintos sustituyentes con efectos +M o -M.

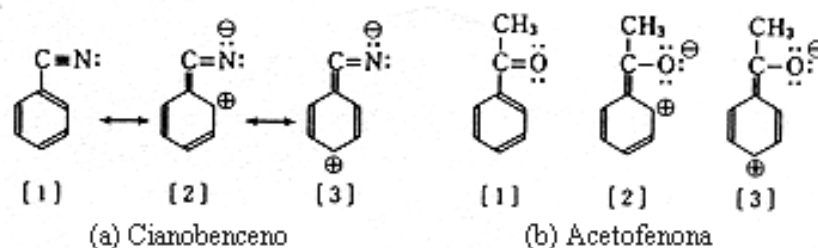


Fig. 14 Estructuras de resonancia de cianobenceno y acetofenona.

Tabla 2 Efecto de los sustituyentes en la intensidad de fluorescencia

Sustituyente	Efecto en la intensidad de fluorescencia
-OH, -OCH ₃ , -OC ₂ H ₅	Aumento
-COOH, -CH ₂ -COOH	Descenso
-N(CH ₃) ₃ ⁺	Marcada reducción
-SH, -F, -Cl, -Br, -I	Descenso
-NH ₂ , -NHR, -NR ₂	Aumento
-NO ₂ , -NO	Extinción total
-CN	Aumento
-SO ₃ H	Invariable
=CO, -CHO	Descenso
Alquilo	Aumento o descenso ligeros

Como consecuencia, una especie química orgánica podría poseer fluorescencia nativa siempre que su estructura química bien sea plana o presente enlaces conjugados.

En el caso de las especies inorgánicas la lista de compuesto de interés analítico es interminable, sin embargo el número de ellos que presentan fluorescencia nativa es limitado. Sólo los iones de los lantánidos y actínidos presentan fluorescencia directamente, además del talio en presencia del ión cloruro y el estaño en ácido sulfúrico.

La mayor parte son fluorescentes en estado sólido pero, Sm, Eu, Gd, Tb y Dy lo son en disolución. La característica común para ambas series de elementos es la presencia de la capa **f** incompleta de electrones, pudiendo promocionarlos dentro del nivel **f**, mediante absorción de luz UV; en el estado excitado no es fácil desactivarlos por conversión interna o por colisión. Explicar por qué estos procesos no radioactivos son ineficaces es algo complejo, pero este hecho debe estar relacionado con las propiedades de los electrones 4f, que al estar en la región interna respecto de los electrones 5s y 5p, quedan apantallados por estos de las influencias externas. Por esta razón, las transiciones entre orbitales 4f son muy poco afectadas por el entorno, y dan espectros de emisión que son líneas espectrales, características más bien de los espectros atómicos que de los moleculares, en contraste con los espectros de emisión de compuestos orgánicos en los que hay implicados más de una transición electrónica.

La fluorescencia de emisión de los lantánidos es débil lo que hace que sean analitos fluorescentes poco importantes, aunque su interés analítico sea grande. Por otro lado, algunos lantánidos son de particular interés por sus excelentes propiedades espectroscópicas especiales y además porque pueden usarse como marcadores de especies fluorescentes para compuestos orgánicos.

Los actínidos presentan gran interés comercial y los métodos analíticos empleados generalmente son radioquímicos. Sin embargo los métodos espectrofluorimétricos se emplean siempre para el más frecuente de ellos, el uranio. La especie química más importante en disolución es el uranilo UO_2^{+2} , que exhibe una fluorescencia verde, excitando con luz azul, la intensidad varía ampliamente en presencia de diferentes aniones y en particular en medio sulfúrico.

En general la sensibilidad que puede alcanzarse empleando métodos fluorescentes con los iones simples es baja y en la práctica se prefieren métodos por derivación. Podemos citar la fluorescencia producida por la fluorita, de composición química fluoruro de calcio, otro es el caso del cuarzo, donde la fluorescencia la produce el aluminio como impureza y no la propia sílice. Este es un hecho habitual de los compuestos inorgánicos en estado sólido, comprobándose como sus equivalentes sintéticos no producen fluorescencia.

Métodos de derivación

Como se ha comentado en apartados anteriores, el alcance de la fluorescencia nativa es verdaderamente bastante amplio y de gran importancia analítica, sin embargo gran número de fluoróforos emiten a una longitud de onda relativamente baja en la región UV, donde hay gran dificultad para evitar las interferencias entre ellos. Como consecuencia es conveniente emplear métodos de derivación para mejorar la selectividad, bien por la selección de la reacción entre el analito y reactivo o desviando la fluorescencia a regiones donde la interferencia sea menor.

Quizás el ejemplo más simple de un derivado fluorescente es el complejo entre un ión metálico y una molécula orgánica donadora. Lo ideal es que ambos componentes sean no fluorescentes, así cuando el complejo se forma, la fluorescencia puede observarse con facilidad. En la práctica se puede admitir cierta fluorescencia natural de los componentes con tal de que ésta sea débil y se produzca a una longitud de onda alejada de la del complejo. La formación del complejo puede emplearse con dos propósitos, para determinar el ión metálico, siendo la molécula orgánica el reactivo o viceversa. El primero es más común, pero recientemente se está prestando mucha atención al empleo de metales, particularmente lantánidos, como "sondas" para determinar especies orgánicas en matrices complejas.

A continuación pasamos a describir algunos tipos de derivaciones tanto para especies inorgánicas como orgánicas.

Especies inorgánicas

1. Reactivos fluorimétricos para análisis

El modo más efectivo para la formación del complejo fluorescente con el reactivo complejante es, aquél en el cual el metal forma enlaces en dos posiciones, originando un anillo (complejo quelato). Normalmente el reactivo requiere la presencia de dos grupos funcionales: un grupo con un hidrógeno ácido y el otro un átomo que porte un par de electrones sin compartir. El hidrógeno ácido procede generalmente de un grupo -OH fenólico o ácido, y el átomo portador oxígeno, nitrógeno o azufre. Para que el complejo sea estable es necesario que el anillo sea de cinco o seis miembros. En la reacción siguiente se muestra un ejemplo característico entre el salicilaldehído y un ión metálico.

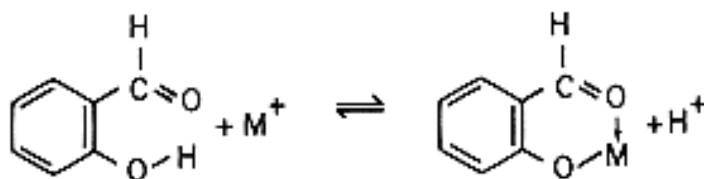


Fig . 15 Reacción entre el salicilaldehído y un ión metálico.

La formación del anillo incrementa con la rigidez de la molécula y con el tamaño del cromóforo y por lo tanto la absortividad.

El reactivo 8-hidroxiquinoleína (oxina) Figura 16 , forma un gran número de complejos que sirven de base para determinaciones colorimétricas, gravimétricas y fluorimétricas, pues muchos de ellos son fluorescentes, incorporándole en la posición cinco el grupo sulfónico $-\text{HSO}_3$, mejora su empleo como reactivo en disolución acuosa.

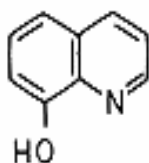


Fig. 16 8-hidroxiquinoleína (oxina)

En los complejos con oxina el anillo es de cinco miembros. En el caso de magnesio y aluminio los complejos no tienen carga; cuando el complejo que se forma es neutro es posible extraerlo en un disolvente orgánico como cloroformo, este es un proceso muy útil ya que permite separarlo de complejos cargados, de otros metales e iones que pudieran interferir en el análisis. Esta es la mejor forma de conseguir que la formación del complejo sea selectiva. En otros casos el reactivo puede hacerse más selectivo en base al control de variables como pH y factores estéricos.

Algunos ejemplos de complejos fluorescentes y sus propiedades se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Complejos fluorescentes típicos

Metal	Reactivo	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{em.}$ (nm)	Límite de detección (mgA^{-1})
Aluminio	Rojo de Alizarina	470	580	0.007
Berilio	Morina	420	525	0.01
Magnesio	8-Hidroxiquinoleína	420	530	0.01
Manganeso	Ácido carmínico	467	556	0.9
Estaño	3-Hidroflavona	415	495	0.004
Zinc	8-Quinolinol	375	517	0.5

La gran mayoría de métodos fluorescentes que existen de determinación de especies inorgánicas corresponden a la formación de complejos binarios con reactivos orgánicos, tal como los ejemplos que acabamos de ver. Aunque menos usados debemos emplear también, la formación de complejos ternarios con reactivos orgánicos, como por ejemplo la determinación de ión borato con morina y oxalato. Aunque menos frecuentes caben citar también otros tipos de métodos fluorimétricos como los basados en: a) reacciones de sustitución; b) reacciones redox; c) reacciones catalíticas y enzimáticas no cinéticas; d) métodos basados en atenuación (queching) de fluorescencia.

2. Sondas inorgánicas para análisis orgánico

Aunque es posible invertir el papel de analito y reactivo en la formación de complejos, de modo que el componente orgánico puede determinarse empleando el ión metálico como reactivo, esta no parece ser una alternativa prometedora dada la alta especificidad de los reactivos orgánicos. Sin embargo es posible determinar algunos compuestos, de esta manera y el ión metálico en estas circunstancias es denominado "sonda".

Esta técnica es potencialmente muy útil y ha despertado un gran interés en la investigación, para descubrir complejos de iones metálicos y otros analitos en particular, en presencia de otras especies que requieran el mínimo de operaciones necesarias para conseguir la especificidad deseada.

El complejo formado debe poseer propiedades muy características de manera que pueda identificarse y medirse con facilidad, aún cuando haya una gran fluorescencia de fondo por parte de la muestra. La emisión de fluorescencia debe ocurrir a longitudes de onda por encima de 500 nm, ya que la fluorescencia de fondo es más intensa por debajo de 350 nm. Los complejos de los lantánidos tienen

una línea característica que generalmente aparecen en la región visible.

Europio y terbio muestran prometedoras expectativas pues forman complejos útiles con proteínas y otros compuestos de interés biológico, esto es de una significancia relevante porque los análisis de muestras de origen biológico, originan grandes problemas de interferencias y además por los altos valores del blanco. El espectro de emisión de otros complejos de lantánidos, es idéntico virtualmente al del ión libre, pero la intensidad aumenta 10^5 veces, en el caso del terbio.

Aunque la emisión del complejo terbio/proteína, tiene una vida media alta, no se trata estrictamente de fosforescencia, porque no se origina desde el estado triplete. El hecho es que la emisión consiste en un espectro de líneas que es esencialmente el mismo para todos los complejos y el ión libre, lo que indica que las transiciones electrónicas ocurren entre los niveles electrónicos del átomo.

En los complejos de los principales elementos del grupo, la emisión está asociada con transiciones electrónicas localizadas predominantemente en la parte orgánica de la molécula, por lo que el espectro que se observa es típico de bandas moleculares.

Para complejos de metales de transición el comportamiento esperado es intermedio y muy pocos son fluorescentes. Cuando presenten fluorescencia su eficacia es muy baja y la emisión puede ser atómica o molecular. El mecanismo de estos procesos se muestran en la Figura 17, que puede ayudar a comprender el comportamiento de los complejos metálicos. En los diagramas los niveles a los que el electrón promociona en un orbital atómico están indicados como a_1 y a_2 , S_1 y T_1 , son los estados singlete y triplete excitados del complejo.

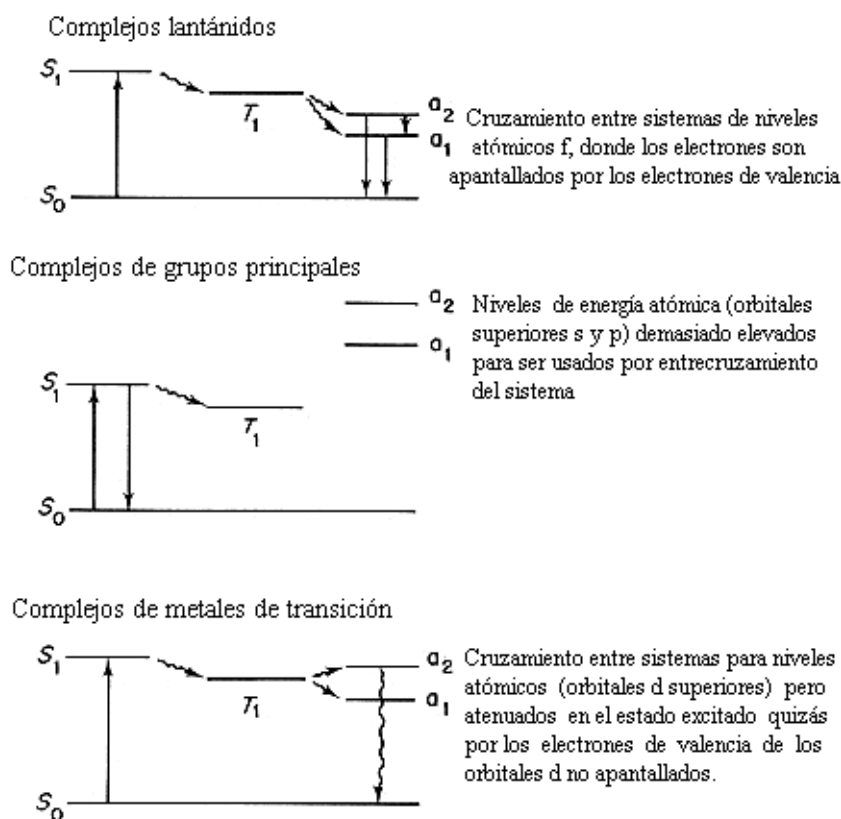


Fig. 17 Diagrama de niveles de energía para complejos metálicos.

3. Derivaciones de no-metales y aniones

Los elementos no metálicos y especies aniónicas, suponen en general cierto problema respecto a los metales pues no forman fácilmente complejos coordinados que permitan su determinación por vía espectrofluorimétrica (o espectrofotométrica).

Los métodos fluorimétricos mejores conocidos son para boro y selenio, que mediante reacciones de condensación conducen a la formación de anillos. Un ejemplo puede ser el producto de condensación entre el ácido bórico y la benzoína, Figura 18.

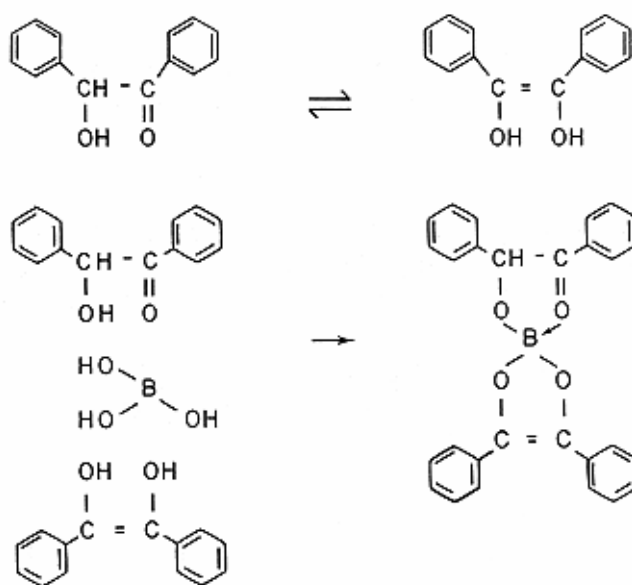


Fig. 18 Reacciones de condensación

Cabe citar también algunos métodos específicos para iones tales como cianuro, sulfuro, fluoruro y fosfato, alguno de los cuales se recogen en la Figura 19

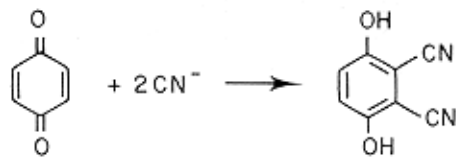
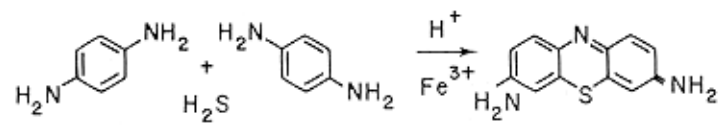
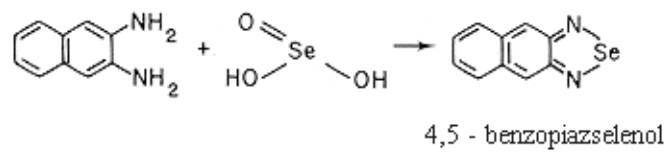
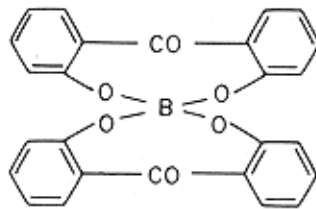


Fig. 19 Reacciones de condensación

Especies orgánicas

Como anteriormente hemos mencionado es considerable el número de compuestos orgánicos con fluorescencia nativa que se pueden medir directamente. Cuando la longitud de onda de emisión es baja, < 300 nm, surgen algunos problemas por las interferencias de otros posibles compuestos presentes.

Las técnicas desarrolladas basadas en fenómenos de fotoluminiscencia han experimentado un aumento en el número de aplicaciones de métodos directos. Sin embargo el incremento más significativo en los tipos de muestras que pueden ser analizadas por fluorescencia, se ha logrado a partir de derivaciones, las cuales producen fluorescencia a valores de longitudes de onda por encima de donde las interferencias causan problemas; pueden aplicarse tanto a compuestos con fluorescencia nativa, y con baja longitud de onda de emisión como a aquellos que no son fluorescentes.

Aunque se han desarrollado “sondas inorgánicas” para alguna clase de analito orgánicos. La mayoría de las derivaciones orgánicas implican el uso de reactivos puramente orgánicos. El derivado suele tener un sistema B extendido respecto al analito, por lo que absorbe y emite a longitudes de onda más altas. En algunos casos, el reactivo aporta el sistema básico B que se extiende al formar el derivado quedando la fluorescencia exenta de cualquier emisión del propio reactivo. Otra característica que exaltaría la fluorescencia del derivado sería la formación de anillos que incrementan la rigidez de la molécula. El analito y reactivo tienen que ser enlazados generalmente por algún tipo de reacción de condensación, en la cual pequeñas moléculas como H₂O y HCl, son productos de eliminación, como se muestran en las siguientes reacciones:

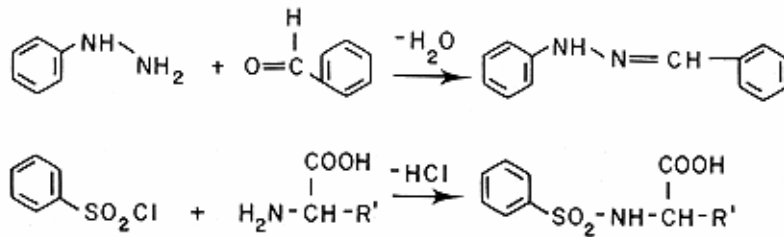


Fig. 20 Reacción de condensación,

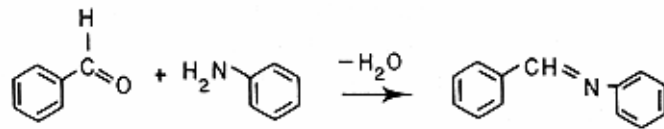


Fig 21 Reacción de condensación con dobles enlaces conjugados.

En algunos casos la reacción puede formar un doble enlace que extiende el sistema B ya existente, como se muestra en la reacción anterior, Fig. 21.

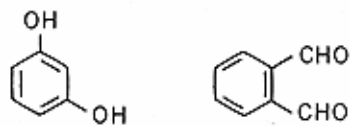


Fig. 22 Derivados aromáticos

Cabe decir que, un reactivo puede lograr la formación de un anillo cerrado si dispone de ciertos grupos situados de forma apropiada en algunos puntos de la molécula, Fig.22. Un ejemplo de este tipo, lo muestra la reacción entre el resorcinol y el ácido málico, Figura 23.

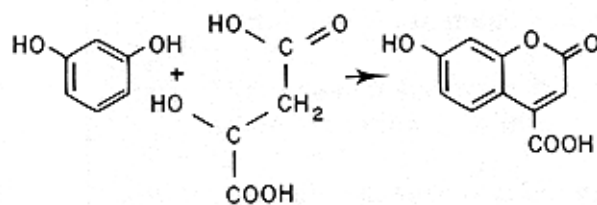


Fig. 23 Reacción entre el resorcinol y ácido málico

Finalmente, indicar que muchos compuestos orgánicos de interés bioquímico por ejemplo, no son fluorescente, además la intensidad de fluorescencia de ciertos fluoróforos nativos en

macromoléculas orgánicas tales como las proteínas es generalmente más baja, que la de los fluoróforos derivados.

Ciertas técnicas relativamente recientes [45,46] en las que se combinan compuestos no fluoróforos con otros fluorescentes (fluoróforos marcadores) para obtener nuevos productos fluorescentes, han sido ampliamente adoptados en química bioanalítica debido a que sus propiedades permiten elegir la condiciones experimentales adecuadas y también porque la intensidad de fluorescencia de estos fluoróforos marcadores para determinaciones fluorimétricas es en general, mayor que la de muchos fluoróforos nativos. Por ejemplo la técnicas de fluoróforos marcadores han sido empleadas para la determinación de diferentes aminas primarias [47], para aminoácidos [48], ácidos graso [49, 50] y otros.

En la Figura 24, se muestran varios fluoróforos marcadores y a continuación se describen alguno ejemplos.

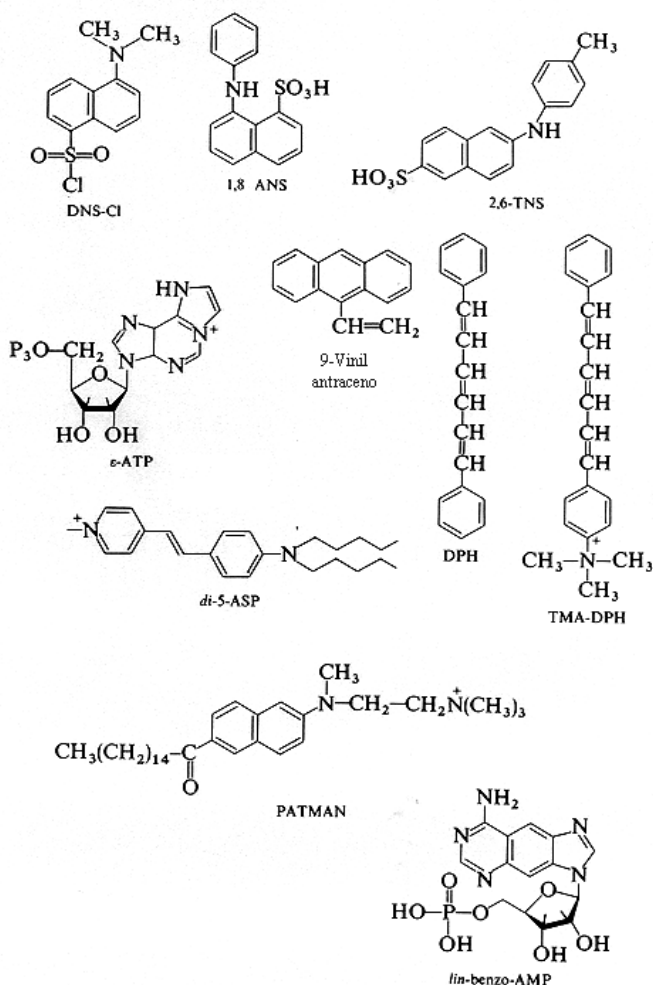


Fig. 24 Fluoróforos marcadores

Los fluoróforos marcadores han servido ampliamente para marcar proteínas. Las inmunoglobulinas marcadas con fluoresceína, se aplican con frecuencia en microscopía fluorescente dado su gran rendimiento cuántico de fluorescencia y su resistencia a la fotodegradación.

Los ácidos carboxílicos, de los constituyentes ácidos que existen en el cuerpo, juegan un importante papel en muchas reacciones de tipo fisiológico, como en los procesos metabólicos y en estados de enfermedad. Estos incluyen prostaglandinas ácidos bílicos, ácidos " -cetoácidos y otros.

En la Figura 25, se muestra una reacción marcadora de fluorescencia entre un fluoróforo el 9-antradiazometano (ADAM) [51] y un ácido carboxílico:

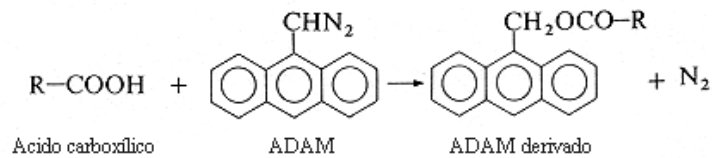


Fig. 25 Reacción marcadora de fluorescencia.

VI. APLICACIONES DEL ANÁLISIS FLUORIMÉTRICO.

En la actualidad, los avances en métodos de extracción y separación selectiva junto con el desarrollo de técnicas instrumentales de gran especificidad y sensibilidad, han permitido recientemente el análisis de residuos en medios biológicos a bajas concentraciones con precisión.

En concreto, los métodos fluorimétricos han cobrado un interés creciente [52-62] en algunas ciencias como son, bioquímica, biomedicina, farmacología y análisis clínicos, debido a su buena selectividad y gran sensibilidad.

En el caso que nos ocupa de esta Memoria, la aplicación en fármacos es de especial interés. El análisis fluorimétrico se emplea para la determinación cuantitativa de analitos en un gran número de fármacos dada la extrema sensibilidad de las medidas de fluorescencia, que la hacen apropiada para los bajos niveles de concentración, nanogramo, picogramo, en que se encuentran los analitos en materiales biológicos, procedentes de las dosis de fármacos con distintos fines, tóxicos o terapéuticos así como para el control de calidad de los mismos.

La espectrofluorimetría se emplea como método de detección, después de la extracción mediante un análisis automatizado para determinar fármacos en orina; también los análisis de luminiscencia ofrecen muchas y buenas ventajas en análisis forenses [63 ,64].

En el caso de los fármacos las matrices suelen ser muy complejas , ya que pueden reunir en su composición componentes de muy diversa naturaleza, por tanto el empleo de patrones internos, es particularmente importante en los ensayos de muestras biológicas, evitando así las posibles interferencias.

Otras de la dificultades que aparecen a menudo en la determinación de fármacos, son las bajas concentraciones de las dosis terapéuticas y la similitud espectral entre los metabolitos de los fármacos, no obstante la resolución de los espectros no siempre se consigue para la identificación de los especies presentes en los fármacos, con idénticos grupos funcionales o estructuras similares. Muchas drogas pueden tener componentes de interés bioquímico no fluorescentes, pero la fluorescencia se puede alcanzar por derivación (apartado VI.1.2).

A continuación, se describen los ejemplos más sobresalientes de compuestos de naturaleza inorgánica y orgánica que son objeto de determinación fluorimétrica tanto nativa como por derivación, aplicadas en general a fluidos biológicos y en productos farmacéuticos.

VI.1 Compuestos orgánicos

VI.1.1 Aminas, aminoácidos e iminoácidos

Algunas aminas con átomos de nitrógeno sobre el sistema aromático como pirimidinas, purinas, indoles..., que se representan en la Figura 26, se pueden determinar debido a su fluorescencia nativa.

La espectrofluorimetría ha sido aplicada, a purinas y pirimidinas, la guanina tiene una fluorescencia suficientemente intensa y específica para ser determinada en ácidos nucleicos y otras mezclas. Metilaminoguanina y dimetilaminoguanina son aún más intensas.

Las medidas de fluorescencia pueden ser empleadas por su gran sensibilidad para determinar la pureza de purinas y pirimidinas [65]; varios productos disponibles en el mercado, que parecen ser puros por otros procedimientos, contienen suficiente cantidades de impurezas como para distorsionar la excitación y el espectro de fluorescencia.

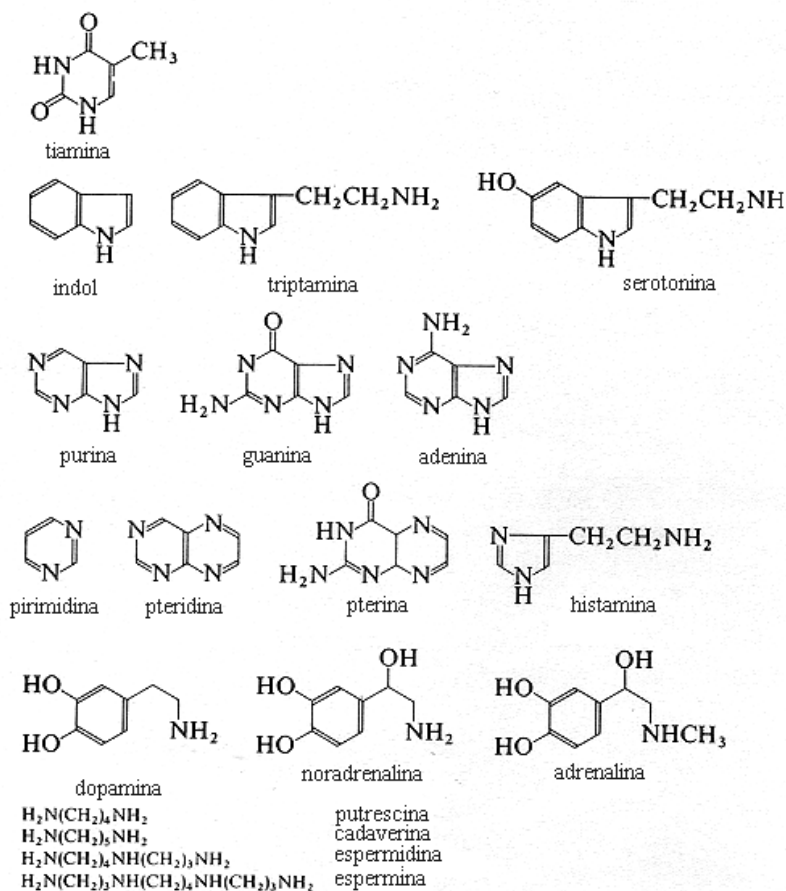


Fig. 26 Estructura de algunas aminas

La fluorescencia nativa de indoles es también suficiente para su determinación cuantitativa. Para indoles que nos están sustituidos en el anillo, el sistema emite a 348 nm, siendo la muestra excitada a 287 nm, han sido evaluados por Tealer y Weber [66]. Kaiser y col [67], han determinado 2,3-bis(4-metoxifenil)indoles en suero, orina y heces. Datos espectrales para algunos de estos compuestos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características fluorescentes para algunas aminas

Compuestos	Longitud de onda (nm)	
	Excitación	Emisión
Aminas aromáticas		
Catecolaminas	285	325
o-Metilcatecolaminas	285	335
Triptamina	285	360
Indolaminas	287	348
Indoles	320-330	415-420
Purinas, pirimidinas y coenzimas		
Purina	285	370
Adenina	265	380
Adenosina, ADP, ATP	272	390
Guanina	275	360
Isocuanina	300	360
Tiamina	290	380
NADH	340	460

Los aminoácidos manifiestan una fluorescencia nativa, pero su extinción molecular difiere de su eficiencia cuántica. Ocurre el fenómeno de una forma natural en las proteínas, pero solo al triptófano y tirosina en disolución acuosa [68], cuyas estructuras se representan en la Figura 27, muestran una fluorescencia apreciable, según se recoge en la Tabla 5. El triptófano es el aminoácido más fluorescente presente en la proteínas, es un fluoróforo natural muy sensible y que puede variar en función del entorno, de hecho el espectro de emisión de fluorescencia se desplaza, debido quizás a la formación de enlaces con ligandos y por la asociación con sustancias endógenas y exógenas y su fluorescencia es siempre menor en las proteínas.

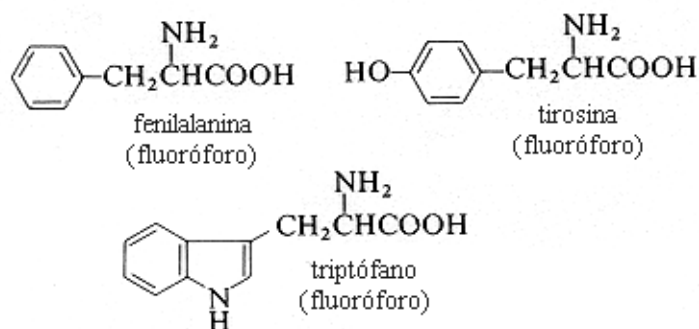


Fig. 27 Estructuras de algunos aminoácidos aromáticos

Tabla 5. Características fluorescentes de aminoácidos aromáticos

Aminoácido	Excitación	Emisión	Eficiencia de fluorescencia
	nm	nm	[%]
Triptófano	287	348	20
Tirosina	275	303	21
Fenilamina	260	282	04

La naturaleza fluorescente de alguno de estos aminoácidos puede incrementarse con la adición de algunos disolventes orgánicos [69] como por ejemplo etanol o dimetilsulfóxido a la disolución acuosa (Froehlich), Tabla 6.

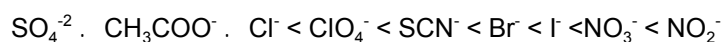
Tabla 6. Cambios en la intensidad de fluorescencia por adición de disolventes orgánicos. (Valores relativos de intensidad en disolución acuosa)

Aminoácido	Intensidad de fluorescencia relativa					
	[% Etanol]			Dimetilsulfóxido[%]		
	10	25	50	10	25	50
5-Hidroxi-triptófano	1.21	1.30	1.49	1.17	1.31	1.42
p-aminofenilalanina	1.22	1.48	1.72	1.50	2.11	2.82
3-Aminotirosina	1.20	1.28	1.50	1.08	1.25	2.00
3-Metoxitirosina	1.23	1.41	1.51	1.09	1.16	1.22

En este medio, la formación de complejos entre las moléculas en el estado excitado con moléculas de agua, se reducen dando lugar a un incremento de la intensidad de fluorescencia. Este efecto además, según se observa en la tabla, depende del grupo funcional en el anillo aromático y del resto de la cadena alifática.

También podemos citar el ejemplo del NADH es una forma reducida del dinucleótido adenina nicotinamida (NAD), liberado en las células como coenzima y NAD^+ es la forma oxidada de éste. NADH es un fluoróforo con gran intensidad de fluorescencia, con una absorción y emisión máxima a 340 nm y 450 nm respectivamente, mientras que NAD^+ no es fluorescente. El fluoróforo NADH, a veces puede presentar efecto quenching por colisión con otros núcleos de adenina, pero cuando está unido a una proteína su fluorescencia aumenta cuatro veces, explicado por el cambio de su estructura química en su unión con la proteína.

Altekar [70] ha estudiado el efecto que tiene la presencia de sales neutras sobre el espectro de fluorescencia de las proteínas. Generalmente los aniones producen efecto quenching sobre la proteína fluorescente y puede considerarse la secuencia siguiente:



Para la determinación de derivados de aminoácidos suele emplearse o-ftalaldehído y otros reactivos fluorogénicos. En la Tabla 7 se muestra una relación de compuestos derivados que también pueden ser determinados mediante métodos fluorimétricos.

Tabla 7. Compuestos derivados de aminas, aminoácidos y otros.

Compuestos	Reactivo	Referencia
Aminas primarias	Quelato salicilaldehído-difenil borano	71
Aminas primarias alifáticas	1-Pirenealdehído	72
	2-Fluorenoaldehído	72
Aminas primarias y secundarias	4-(6-Metilbenzotiazol-2-il)fenilisocianato	73
Aminas primarias y secundarias alifáticas	9-Isotiocianatoacridina	74
Aminas secundarias	2-Metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furanona	75
Aminas terciarias	9.10-Dimetoxiantraceno-2-sulfonato	76, 77
Aminas primarias, aminoácidos	Fluorescamina	78-83
	5-Isotiocianato-1,8-naftalenodicardobil,4-metilfenilimida	84
Aminas, aminoácidos	Cloruro Dansil	85-88
	Cloruro Bansil	89
	Cloruro-NBD	90
	Ninidrina	91
	Piridoxal	92
	Fluoresceína-isotiocianato	93
	2,3-Difenil-1-indanona	94
	2,4-Butadiona	95
Péptidos	o-Ftalaldehído	96-98
	o-Ftalaldehído	99,100
	Ninidrina	91
	Cloruro Dansil	101
	Cloruro Bansil	89
	Fluorescamina	102
Proteínas	Fluorescamina	82, 102
	Fluoresceína-isotiocianato	93
	4-Dimetilamino-4'-isotiocianostilbeno	103
	Ácido 2-tolueno-naftaleno-6-sulfónico	104
Poliaminas	Cloruro Dansil	101
	o-Ftalaldehído	105,106
Aminas Biogénicas	o-Ftalaldehído	107-109
Carbamatos	Cloruro NBD	110
Acilaminas	N-(1-naftil)etilendiamina	111
Nitrosaminas	Cloruro NBD	112,113
Azúcares aminados	Ninidrina	91,114
	Piridoxal	115

VI.1.2. Alcaloides.

Los alcaloides son sustancias que se encuentran en las plantas y tienen estructura generalmente heterocíclicas, con átomos de nitrógeno, según se observa en la Figura 28.

Muchos alcaloides pueden determinarse en disoluciones acuosas o de disolventes orgánicos dada su fluorescencia nativa [116-120]. En la Tabla 8 se resumen algunos datos espectrales.

Tabla 8 Características fluorescentes para alcaloides

Alcaloide	Longitud de onda [nm]		Referencia
	Excitación	Emisión	
Reserpina	300	375	121
Rescinamima	310	400	122
Quinina	250	350/450	121
Papaverina	320	348	122
Narcotina	335	400	122
Sales de balforodinium	310	345	123
Sales de Plastidesminium	310	448	123

Gürkan [124] proporciona datos de fluorescencia para alcaloides tales como reserpina, yohimbina, y boldina en diferentes disolventes y distintos valores de pH, así como, los límites de detección comprendidos entre 0.5-5.0 ng/ml, recogidos en la Tabla 9.

El análisis cuantitativo de los alcaloides digoxina y digitoxina en medio sulfúrico después de su extracción, son descritos por Naik y col. [125], con límites de detección a nivel de microgramo.

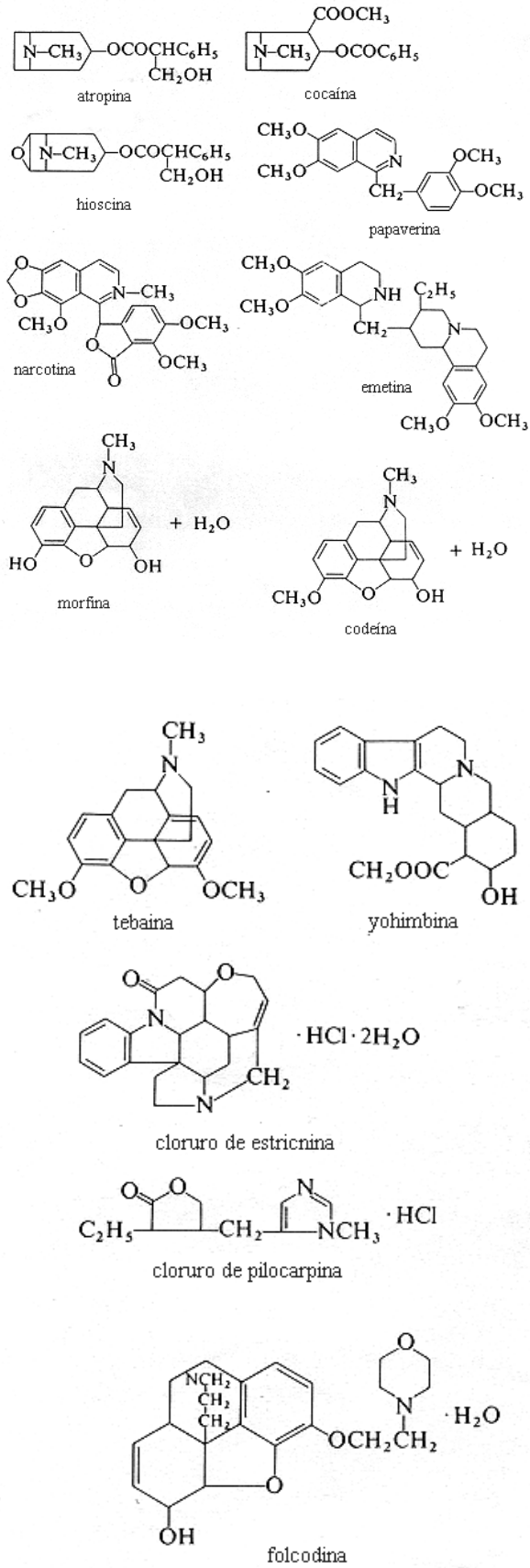


Fig. 28 Estructura de algunos alcaloides.

Montagu-Bourin y col. [123], describen un método para determinar sales de *balfourodinium* y *plastydesminium* en células de *Choisya ternata*, estos alcaloides son previamente separados mediante la formación previa de complejos con azul de bromotimol por TLC, empleando como fase móvil EtOAc-HCOOH-H₂O (10:1:1) en placas de silica-gel, midiendo por último su fluorescencia. También se han determinado en extracto de plantas con una recuperación del 95%. Montagu describe un método para la determinación fluorimétrica en extractos de plantas Rutaceae, de otros dos alcaloides, furoquinolina y piranoquinolina.

Tabla 9 Aplicaciones fluorimétricas para determinar alcaloides

Alcaloide	Solución	Longitud de onda [nm]		Límite de detección (ngAcm ⁻³)	Referencia
		Excitación	Emisión		
Reserpina	0.05 M, H ₂ SO ₄	304,365	445	0.5	98
Yohimbina	pH 10	285	370	5	98
Boldine	0.05 M, H ₂ SO ₄	308	375	3	98
	pH 10	330	420	1	98
	Etanol	312	350	2	98
Digoxina	H ₂ SO ₄ (conc.)	390	420		99
Digitoxina	H ₂ SO ₄ (conc.)	418	435		99
Emetina	0.05 M, H ₂ SO ₄	283	318		100
Cefalina	0.05 M, H ₂ SO ₄	283	318		100
Pilocarpina		395	450	2.8	101
Folcodina	Derivatización	395	450	0.5	101
Cocaína	con ác. acético,	395	475	0.1	101
Estricnina	anh. acético	420	450	0.5	101

La determinación fluorimétrica de alcaloides *ipecacuanha* en productos farmacéuticos lo propone Hassan [126], para ello diluye el extracto con ácido sulfúrico 0.05 M y las raíces trituradas con DMSO. Las soluciones son analizadas por fluorimetría, excitando a 283 nm y emitiendo a 318 nm.

Los principales alcaloides emetina y cefalina, presenta una intensidad de fluorescencia con un máximo para valores de pH comprendido entre 1-6, y un rango dinámico lineal para 0.4-2 : g/ml. Las recuperaciones son del 98.98% y desviaciones estándar < 0.01%.

Los espectros de fluorescencias para disoluciones de atropina, cocaína e hioscina aplicadas a fármacos son examinados por Hetherington y col. [127], los parámetros de excitación y emisión depende de la estructura y configuración de las tropinas.

El análisis fluorimétrico de opiáceos, es descrito por Chalmers y Waads [122]. Después de la extracción de los alcaloides con CHCl_3 a pH 9, la papaverina y narcotina muestran diferentes espectros con máximos a 320/348 nm y 335/400 nm, respectivamente. Cuando se añade ácido tricloroacético, la longitud de onda del máximo de emisión para la papaverina se desplaza y la intensidad se reduce, mientras que la narcotina se incrementa. La morfina y codeína se determinan en disolución acuosa.

La determinación de morfina y otros alcaloides relacionados con ella, los describe McLeon y West [128].

Es un modelo de reacción fluorogénica, de la dimerización oxidativa de la morfina para convertirla en pseudo morfina de características fluorescentes, tal como se indica en la Figura 29.

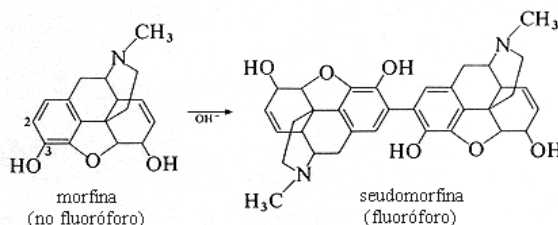


Fig. 29 Dimerización oxidativa de morfina en pseudomorfina.

El rango dinámico lineal para la calibración está comprendido entre 10^{-3} - 10^{-6} M y el límite de detección es 5×10^{-7} M. El procedimiento es selectivo y libre de interferencias para el mayor número de los alcaloides del opio, esto ha hecho posible la determinación directa de morfina en Papaveretum en tabletas, inyecciones y ampollas.

Algunos alcaloides con grupos aminos ternarios pueden derivarse, para análisis fluorimétrico mediante la mezcla con ácido malónico y anhídrido acético [129]. La condensación requiere de 15 minutos a 80°C, alcanzando gran selectividad para este grupo de alcaloides. Los límites de detección encontrados oscilan entre (0.1-2.8) ng/mL.

Raoy Tandon[130], describen la aplicación del ácido malónico/anhídrido acético como reactivo para la determinación espectrofluorimétrica de los alcaloides del opio, morfina, narcotina, codeína, papaverina y teabina. La disolución de alcaloides se calienta con el anhídrido acético entre (80-85)°C, durante 20 minutos, después se enfría, se añade etanol y se mide la intensidad de fluorescencia. La fluorescencia permanece constante durante dos horas para la papaverina y # 3 horas para el resto de los alcaloides. Los límites de detección varían entre (0.5-4.0) ng/ml. Sin embargo, hay varias interferencias en esta determinación, debida quizás a la presencia de aminas terciarias, glucosa, cloruro sódico, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro potásico y acetato de magnesio. Agua y otros disolventes hidroxilados inhiben la reacción si están presentes desde el principio.

Szabo y Karacsony [131], proponen un método simultáneo "in situ", para la determinación de ergolenos y algunas ergolinas. El método se basa en la reacción fluorogénica con o-ftalaldehido- H_2SO_4 . Separándose mediante TLC, empleando placas de DC-Alufolien de silica gel, aplicando 5 : L de muestra y desarrollando la placa con EtOAc-MeOH (65:35), secándolos a continuación en la oscuridad durante 5 minutos y revelándolos inmediatamente con el reactivo. Las manchas son estables y pueden ser escaneadas después de varias horas. La intensidad de las ergolinas es superior en estas condiciones a la de los ergolenos. La curva de calibrado es lineal para el intervalo 10-200 ng/: L y el método permite un límite de detección de 1 ng/: L para la ergolina.

VI.1.3 Vitaminas.

Las vitaminas son el primer grupo de compuestos de mayor importancia biológica, que pueden ser ensayados fluorimétricamente.

En la Tabla 10 se recogen algunas características espectrales, de ciertas vitaminas.

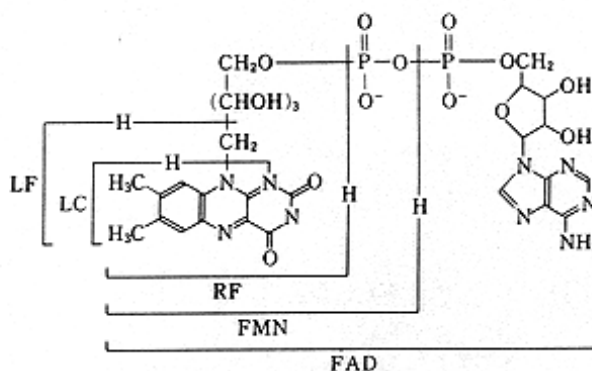
Tabla 10 Características fluorescentes para vitaminas

Vitamina	Longitud de onda [nm]		Referencia
	Excitación	Emisión	
A/etanol	327	510	132
A/acetato	360	508	133
B ₂ (riboflavina)	370	455-520	133
B₆ (vitámeros)			
Piridoxina	340	400	134
Piridoxamina	335	400	134
Piridoxal	330	385	134
B ₁₂	275	305	135
C(ácido ascórbico)		No Fluorescente	
E(" -tocoferol)	295	340	133
ácido p-Aminobenzoico	294	345	135
Nicotinamida		No fluorescente	
Ácido fólico	365	450	135

La vitamina A absorbe en la región próxima al UV debido a su estructura con un sistema polieno conjugado, como se observa en la Figura 33. El límite de detección para su determinación fluorimétrica está alrededor de 1 ng/ml.

Kahan [136] propone un método para la determinación de vitamina A basado en su fluorescencia nativa. Otro procedimiento fluorimétrico para determinar también vitamina A en tejidos y plasma humano es descrito por Drujan y col. [137]. Después de la extracción de la vitamina A de la sangre con etanol/dietil-éter, a una alícuota se le evapora la capa del disolvente, y se disuelve en cloroformo/n-butanol.

La vitamina B₂, es el término genérico para los tres vitámeros derivados de la flavina: riboflavina (RF), flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD). Las dos últimas son fosforiladas y se muestran en la Figura 30.



LF, lumiflavina; LC, lumicromo; R, riboflavina
 FMN, flavina mononucleótida; FAD; flavina adenina dinucleótida

Fig. 30 Estructura de los vitámeros de la flavina

Esta vitamina, se encuentra en muchos alimentos principalmente como FAD en hojas vegetales, carnes, pescados huevos, leche y productos lácteos [138]. La riboflavina (RF) tomada con alimentos es fosforilada a FMN por la mucosa intestinal durante la absorción, para ser convertida de nuevo a FAD en las células de los tejidos. FMN y FAD, han sido llamadas "enzimas amarillas" [139] que combinadas con cierta proteína, sirve como coenzima en la mayor parte de los procesos de oxidación-reducción, catalizada por la enzima flavina. Cuando estas enzimas amarillas (flavoproteínas), han sido reducidas al formar parte de una reacción de oxidación-reducción, disminuyen su color debido quizás a los dos átomos de hidrógeno contiguos en el núcleo de la isoalloxazina, sustancia responsable del color de las flavinas, como se muestra en la Figura 31.

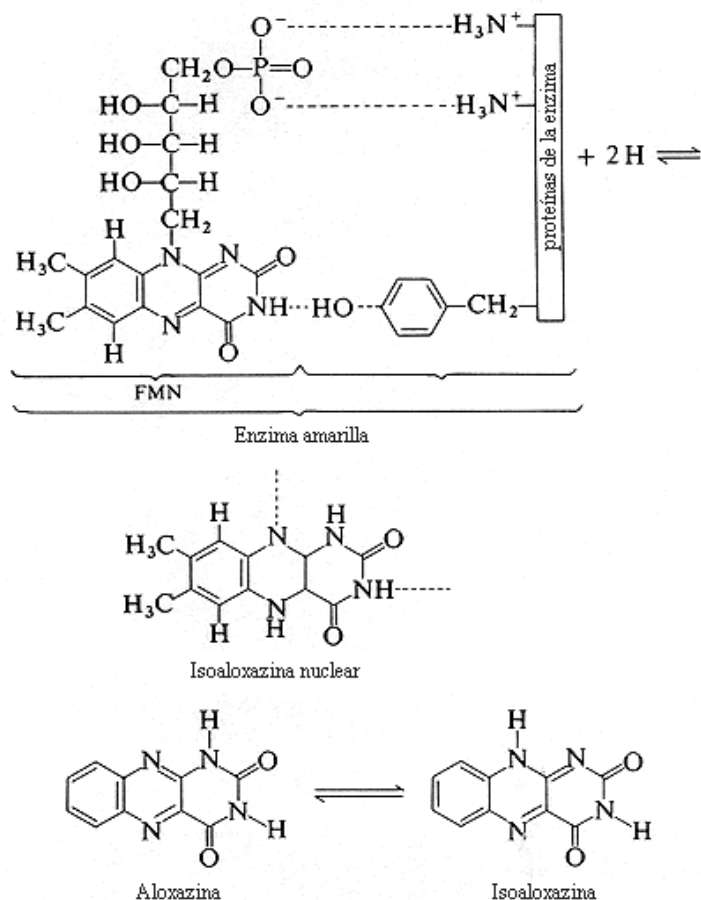


Fig. 31 Estructuras de enzimas amarillas e isoalloxazina de las flavinas

Las flavinas derivadas, RF, FMN y FAD tienen una fluorescencia amarillo-verdosa y su espectro de fluorescencia de emisión [139] es similar para las tres. Sin embargo, el rendimiento cuántico de RF y FMN es aproximadamente de 0.24 mientras que el correspondiente para FAD vale 0.02 quizás por la formación de un quenching intramolecular entre la adenina y el fluoróforo isoalloxazina. RF es inestable en soluciones acuosas irradiadas y descompuesta a lumicromo (LC) en soluciones ácidas o neutras y a lumiflavina en disoluciones básicas. LC y LF son productos de fotodescomposición que poseen fluorescencia, a LF en particular, se le aplican métodos de análisis fluorimétricos [140] para determinación de vitamina B₂ dada su gran intensidad de fluorescencia.

La vitamina B₂, se puede determinar también en base a su fluorescencia nativa, según Bessey [141] y Weber [142]. Udenfriend [134], propone varios procedimientos fluorimétricos, para determinarla separándola previamente de la sangre, así como algunos compuestos relacionados con ella.

Riboflavina y tiamina son determinadas por Ryan e Ingle [143] en cereales de desayuno, orina, píldoras, usando como detector un diodo array. La determinación de tiamina se consigue través de la reacción mostrada en la Figura 32, que la convierte en tiocromo. La tiamina se determina en productos farmacéuticos por un método propuesto por J. Martínez Calatayud [144].

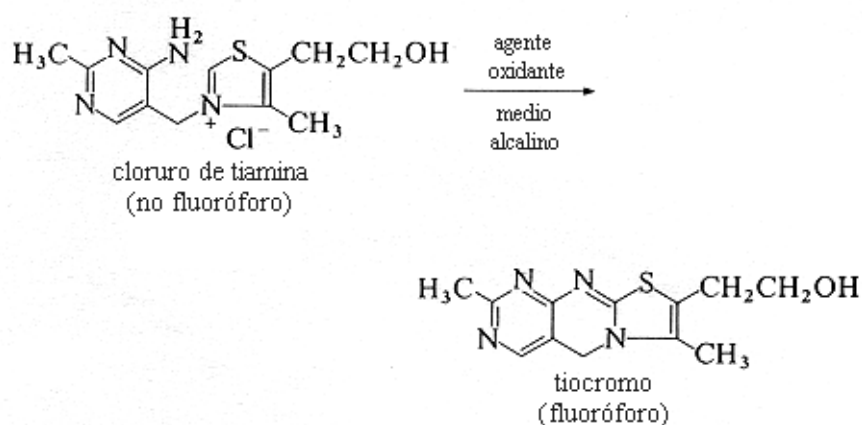


Fig. 32 Conversión de vitamina B₁ (tiamina) en tiocromo.

Las vitaminas piridoxina, piridoxamina y piridoxal, que pertenecen al grupo de la vitamina B₆, se determinan fluorimétricamente en muestras de sangre, por el método propuesto por Coursin [145]. La variación de la intensidad de fluorescencia, las longitudes de onda de excitación y emisión en función del pH, han sido estudiadas por Bridges y col. [146].

Chen [147], en su trabajo recoge la influencia que tiene la temperatura sobre la fluorescencia de los compuestos de la vitamina B₆, comprobando que la intensidad de fluorescencia de la piridoxamina y piridoxina cambia más que para la piridoxina. Así ocurre en los estudios realizados para la determinación cuantitativa de la mezcla de estos vitámeros y sus derivados. Las características fluorescentes de estos compuestos se recogen con más detalle en el trabajo de Udenfriend [148].

La vitamina B₁₂, no exhibe fluorescencia en la región del visible, pero sí presenta una banda en la región UV según Duggan [149].

La determinación fluorimétrica de tocoferoles ofrece varias ventajas tales como su gran sensibilidad y especificidad. Una desventaja sin embargo, deriva del hecho de que " y \$ tocoferoles muestran el mismo espectro de excitación de fluorescencia, pero su intensidad molar de fluorescencia cambia con su coeficiente de extinción molar. Por esta razón el análisis de mezclas de estos compuestos resulta ser complicadas (Udenfriend).

Los procedimientos para la determinación de tocoferoles en sangre son descritos con detalle por Duggan [149] y también por Udenfriend [148].

A continuación, en la Figura 33, se representan las estructuras de algunas vitaminas con sistemas aromáticos sustituidos, en los que es necesario la derivación para su determinación fluorimétrica, bien porque sean moléculas que no poseen fluorescencia, sea insuficiente o porque sencillamente se quiera conseguir mayor sensibilidad.

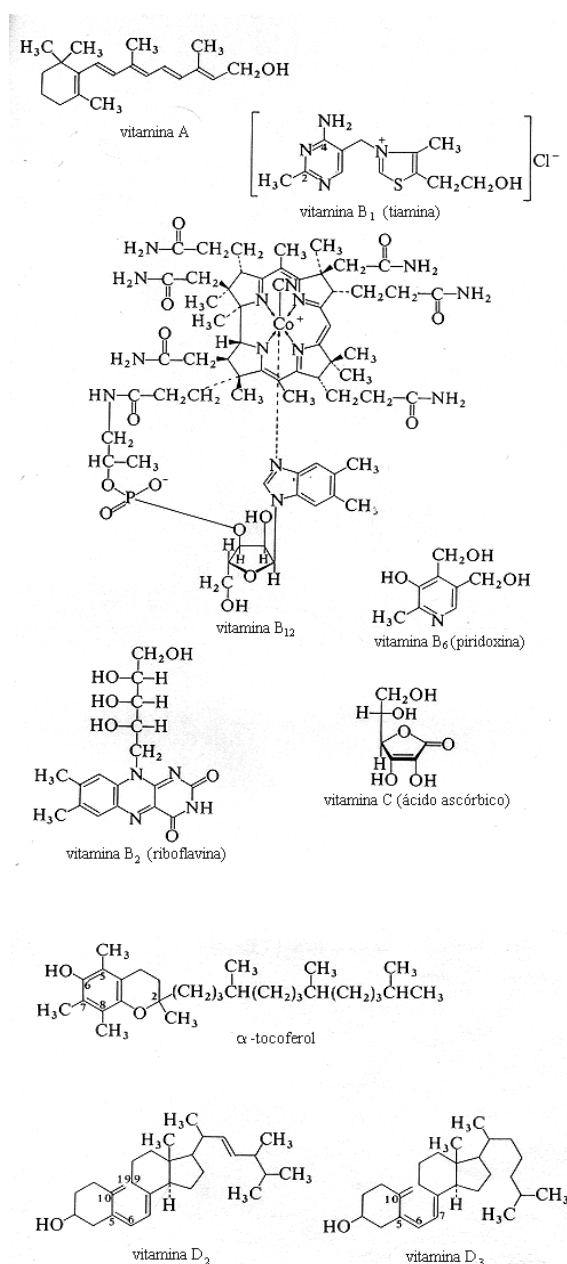


Fig. 33 Fórmula estructural de algunas vitaminas.

Onhesorge y Rodgers [150] así como los de Yagi y col. [151], son procedimientos para determinar tiamina en sangre, tejidos, orina y otras matrices. Mientras que Burch [152] propone un método para la determinación total de tiamina en sangre. Como agente oxidante en medio alcalino se emplea ferricianuro potásico y el tiocromo se extrae, con hexanol, después de eliminar el exceso de oxidante con un reductor.

Hay otros sistemas automáticos descritos por Muiruri y col. [153] y también por Pelletier y Madere [154] para determinar tiamina, con la formación de tiocromo.

Karlberg y Thelander [155] describen un sistema automático de inyección en flujo, para determinar también vitamina B₁, convertida en tiocromo con una frecuencia de muestreo de 70 muestras por hora, los resultados hallados están de acuerdo con los obtenidos manualmente y tiene un valor de alrededor de 1% para la desviación estándar.

La determinación de nicotinamida que no es fluorescente, se puede conseguir de dos formas como se muestran en las reacciones siguientes, tal y como proponen los autores Scudi [156], Friedemann [157], Huff [158] y Burch [159].

La vitamina C (ácido ascórbico), no fluorescente reacciona con o-fenilendiamina para formar una quinoxalina derivada fluorescente. Deustch y Weeks [160] realizaron la primera aplicación para determinación cuantitativa de vitamina C en disolución. Las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión eran respectivamente 350 y 432 nm, el método es muy sensible y específico, permitiendo la presencia de gran número de vitaminas.

La vitamina D₂ y D₃ se convierten en productos fluorescentes al ser tratados con ácidos, como el tricloroacético, que son excitados a 390 nm y emiten entre 470-480 nm según trabajos realizados por Jones [161] y Chen [162].

La tiamina se determina con mayor sensibilidad fluorimétrica convirtiéndola en lumiflavina, en medio alcalino, según la reacción descrita por Warburg [163], Fig. 34.

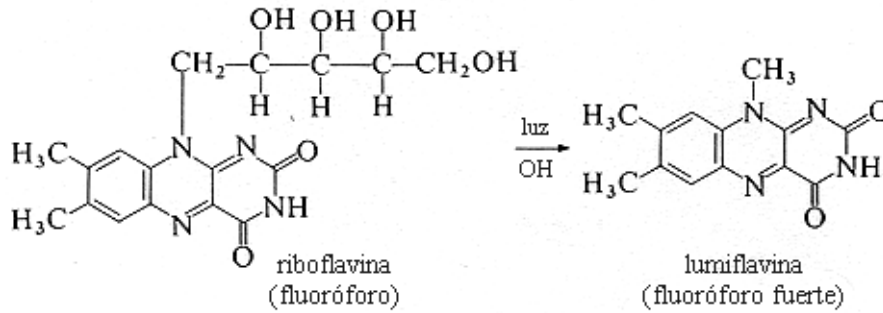


Fig. 34 Conversión fotoquímica de riboflavina en lumiflavina.

Otro procedimiento para la determinación total de flavina como lumiflavinas es el propuesto por Yagi [164], las flavinas son extraídas de la disolución alcalina a pH 11, con agua caliente, a continuación irradiadas mediante una lámpara fluorescente durante 30-60 minutos, luego acidificada y por último se extrae la flavina con cloroformo.

Allfrey [165] describe un método para la determinación de ácido fólico (ácido pteroilglutámico) en tejidos de plantas y animales, mediante la oxidación con permanganato potásico, obteniéndose un producto fluoróforo, altamente fluorescente, el ácido 2-amino-4-hidroxipteridina-6-oico, Fig. 35. En presencia de pigmentos interferentes es necesario aislar el producto de oxidación cromatográficamente en Florisil y eluido con tetraborato sódico a pH 4.

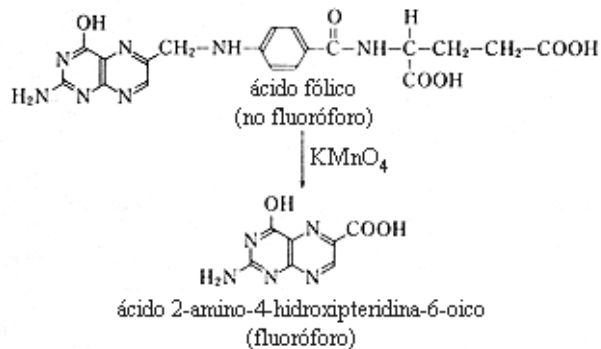


Fig. 35 Oxidación del ácido fólico con permanganato

VI.1.4. Esteroides

Los esteroides son compuestos naturales con un sistema de cuatro anillos condensados. En disolución ácida casi todos los esteroides muestran una intensidad de fluorescencia baja que depende de la concentración del ácido, temperatura y otras variables.

A continuación se citan algunos métodos de determinación para esteroides.

Estrógenos

Tienen, como se muestra en la Figura 36, una estructura distinta con un anillo aromático y un grupo fenólico. La estructura fenólica tiene dos efectos para los métodos de análisis a proponer:

1. Pueden extraerse de disoluciones orgánicas con disoluciones acuosas alcalinas y separarse así de otros esteroides.
2. Generalmente constituyen un solo grupo, siendo todos fluorescentes.

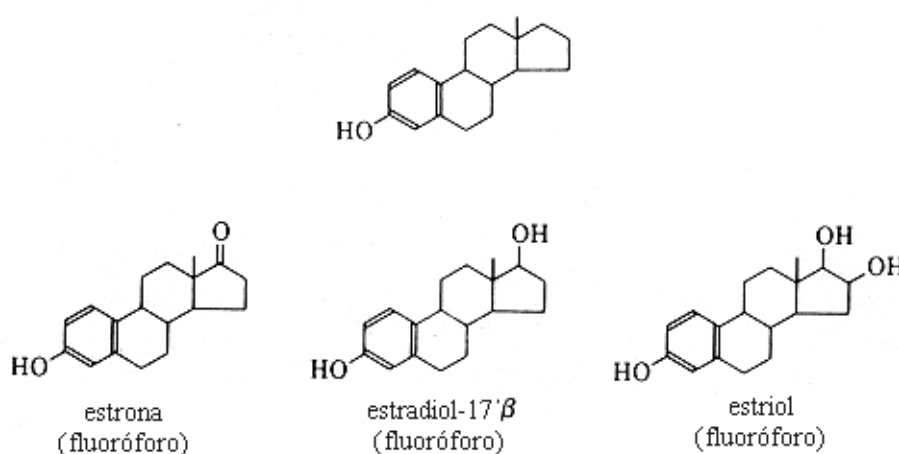


Fig. 36 Sistema básico de estrógeno y estructuras de estrógenos.

La Tabla 11 recoge las características fluorescentes para algunos estrógenos, según Udefriend [134].

Tabla 11 Características fluorescentes para estrógenos

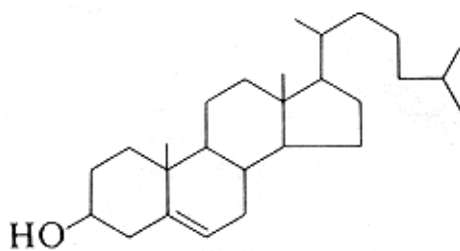
Estrógeno	Longitud de onda [nm]		Intensidad relativa
	Excitación	Emisión	
17β-Estradiol	285	330	100
Estrona	285	325	13
Equilina	290	345	10
Equilenina	250,290,340	370	1000

Bramhall y Britten [166], describen una aplicación para determinar estrógenos en muestras de orina después de precipitarlos con sulfato de amonio y extraerlos, la concentración está alrededor de 2 : g/mL.

Kober [167] propone un método para su determinación empleando ácido sulfúrico, que es modificada por Ittrich [168,169]. Existe además un método de Kober-Ittrich [148,170-171] para la determinación de estrógenos en análisis clínico.

Colesterol.

La formación de fluoróforos en ácido sulfúrico puede ser también aplicada para el análisis fluorimétrico de colesterol cuya estructura se representa en la Figura 37.

**Fig. 37** Estructura del colesterol.

Albert y Lowry [172], describen un microprocedimiento fluorimétrico aplicado a muestras de tejidos, después de la extracción con etanol, y evaporación del etanol del extracto; el residuo se disuelve con una mezcla de tricloroetano y anhídrido acético mezclado con ácido sulfúrico. La fluorescencia se mide después de 1 ó 2 horas. Como la cantidad de colesterol es bastante superior a la de otros esteroides presentes, no suele haber problemas de interferencias.

McDougal y Farmer [173] modifican el método anterior para su aplicación a muestras de sangre y Koval [174], para determinarlo en muestras de suero. No obstante existe otro método propuesto por Solow y Freeman [175] para aplicación en sueros.

Fruchart [176], presenta un método automatizado para el análisis fluorimétrico en suero, cuyos valores de longitudes de onda de excitación y emisión son respectivamente 405 y 485 nm.

VI.1.5. Tetraciclinas

Cabe citar también este tipo de compuestos de gran interés en la elaboración de productos farmacéuticos con finalidades terapéuticas, cuya estructura representada en la Figura 38, presenta un sistema resonante que le da características fluorescentes y la posibilidad de formar un gran número de compuestos derivados, que pueden ser determinados mediante métodos fluorimétricos, aplicados a fármacos o materiales biológicos.



Fig. 38 Estructura de las tetraciclinas.

Se pueden citar distintos trabajos basados en la formación de complejos con iones metálicos como el Ca-barbital-tetraciclina [177]. La tetraciclina se puede medir fluorimétricamente a 460 nm [178], en sangre y suero de personas y animales formando un complejo con el berilio en una proporción 6:1 (Be:TC). Hall [179] forma extraños iones fluorescentes Al-tetraciclinas para la determinación simultánea en plasma de mezclas que contienen clorotetraciclina, demetilclorotetraciclina y tetraciclina, en concentraciones de 0.1 mgA^{-1} .

Kally y Hogt [180] han descrito otro método, para la resolución de mezclas de tres componentes en antibióticos (tetraciclina, clorotetraciclina y demetilclorotetraciclina), en fluidos biológicos.

Existen otros tipos de compuestos orgánicos de las mismas características terapéuticas como son las ampicilinas y amoxicilinas con propiedades fluorescentes, podemos citar los trabajos realizados por Jusko [181], que mide la fluorescencia de un fluoróforo amarillo, obtenido mediante hidrólisis ácida a altas temperaturas.

Miyazaki y col [182] obtienen un producto fluorescente a partir de ácido α -aminobencilpenicilloico en solución neutra, conteniendo cloruro de mercurio a 40°C, derivatizándose de este modo la ampicilina, aplicándose el método en soluciones acuosas en orina y sangre.

Barbhaiya y col [183], desarrollan un ensayo rápido para determinar amoxicilina en plasma, basado en la formación de un complejo fluorescente derivado en medio básico y medido en presencia de 2-metoxietanol, este método presenta la ventaja, que se aplica a fármacos donde va acompañado de otros principios activos como teofilina, codeína, y paracetamol entre otros.

VI.1.6. Histamínicos

En término general, este grupo de compuestos orgánicos se determinan fluorimétricamente por métodos de derivación, citaremos a título de ejemplo [184], donde se emplean reacciones de oxidación con H_2O_2 , o [185] que emplea como reactivo cianuro de bromo.

VI.2. Compuestos inorgánicos

La espectroscopía de luminiscencia moderna tiene su origen en las observaciones de Brewster en el año 1833, sobre las propiedades emisivas del ión uranilo. Esta información sirvió a Stokes para sus principios espectroscópicos y a Becquerel para su trabajo sobre radioactividad [186].

Posteriormente la fluorescencia fue descubierta en extractos vegetales, obtenidos a partir de la madera del *lignum nephriticum* y de otros muchos extractos de plantas [188].

Con el descubrimiento de que una amplia variedad de moléculas orgánicas exhibían fluorescencia, la mayoría de las investigaciones fueron dirigidas al estudio de la luminiscencia de estos compuestos. Al comienzo del siglo XX y paralelamente al desarrollo de la Química Inorgánica como disciplina, se dirigieron de nuevo los trabajos hacia materiales inorgánicos.

La mayoría de los avances más importantes de esta época fueron hechos por Nichols y Homes [189] en su minuciosa investigación sobre las propiedades luminiscentes de los compuestos de uranilo. La naturaleza del fenómeno no pudo comprenderse en su totalidad en esta época, ya que ello suponía estudios de fenómenos cuánticos, en un momento en que estaba naciendo la teoría de Bohr. No obstante, el carácter de picos agudos, característicos del espectro de luminiscencia del uranilo (en contraste con los espectros de bandas anchas que muestran los compuestos orgánicos) quedó claramente establecido en aquel momento.

Las investigaciones sobre el uranilo, reciben mayor atención durante el transcurso del Proyecto Manhattan, donde se lleva a cabo un exhaustivo estudio espectroscópico [188].

El número de compuestos inorgánicos que exhiben algún tipo de fenómeno de luminiscencia es verdaderamente asombroso, las causas de emisión encontradas son muy variables y como consecuencia, la interpretación teórica de los procesos varía con la naturaleza de las transiciones de emisión. Por ejemplo, algunos procesos luminiscentes son totalmente intrínsecos al material y en otros casos lo originan cantidades presentes de iones metálicos a nivel de traza. A esto hay que añadir los sistemas en los que se emplea derivación [189].

Crookes ensayando con rayos catódicos, descubrió que los lantánidos podían exhibir luminiscencia. Urbain encontró que recubriendo el cátodo de un tubo de rayos catódicos con óxidos metálicos dopados con trazas de Eu(III), se producía luminiscencia en la zona roja del espectro [190].

Este descubrimiento sirvió para utilizar el fenómeno de cátodoluminiscencia, así denominado, como un método nuevo de identificación de muchos elementos aún desconocidos, dado el gran número de líneas espectrales [191].

Los niveles de energía de los lantánidos son conocidos hace algún tiempo, las intensidades de absorción y emisión son generalmente bastante sensibles [192-194]. Los tiempos de vida media asociados al fenómeno de luminiscencia son del orden de microsegundo [195], por lo que debe ser clasificado como proceso fosforescente.

Para Eu(III) y Tb(III) [196], la luminiscencia se produce en disolución acuosa con gran intensidad.

Hay que destacar que el análisis teórico de las propiedades espectroscópicas de los iones lantánidos, se hacen con frecuencia a altos niveles de sofisticación; el análisis espectral de los lantánidos está recogido en una revisión que contempla un extenso contenido de datos experimentales, donde se recogen las asignaciones realizadas [197].

Existen compuestos de distinta composición química que producen el fenómeno de cátodoluminiscencia, como pueden ser sistemas de vanadato, $YVO_4:Eu$ [198], $LuVO_4$ [199].

También se encuentran casos de óxidos y oxisulfuros como $Y_2O_3:Eu$ [200] y $Y_2O_2S:Eu$ [201]; sulfuros de Zn y Cd [202] y [203], de $(CaMg)S:Eu$ [204] y MGa_2S_4 (donde $M = Ca, Sr, Ba$ y Pb) [205], empleando Eu(III) o Ce(III) como activadores; sistemas con aluminatos $Y_3Al_5O_{12}$ y Er(III) [206], Ce(III) [207] o Eu(III) [208] como activadores de cátodoluminiscencia.

Para finalizar las aplicaciones de la luminiscencia a los compuestos inorgánicos, podremos citar un segundo grupo de compuestos donde el proceso de excitación tiene lugar en esencia en una lámpara de fluorescencia, siendo de naturaleza distinta al de cátodoluminiscencia. La luz ultravioleta se genera en un tubo de descarga de gases, (generalmente con pequeñas cantidades de mercurio añadidas) con un fosforóforo que absorba alrededor de 250 nm, con un activador que posea suficiente absorción a esta longitud de onda y sea directamente excitado. La descripción de este proceso se encuentra desarrollada con detalle [209], también Butler [210] da a conocer el fundamento y tecnología de los fosforóforos de las lámparas fluorescentes.

A modo de ejemplo, las propiedades de Eu(III) [211] y Tb(III) [212], hacen que puedan ser utilizados como activadores en distintos sistemas, $M_3B_2O_6$, (siendo $M = Ca, Sr, Ba$), en medio alcalino exhibiendo fluorescencia en varios subsegundos [213] donde la estabilidad y eficiencia del lantánido como activador aumenta con la presencia de oxígeno [214,215].

Otros sistemas a considerar pueden ser aluminatos y galatos, que tienen gran importancia e interés comercial para la producción de lámparas fosforescentes como pueden ser $MAI_2O_4:Eu$ y $MAI_2O_{19}:Eu$ (donde $M = Ca, Sr$ o Ba) [216]. Lo mismo le ocurre a sistemas con silicatos por su eficiencia; la luminiscencia de $MSiO_4:Eu$, $M_3SiO_5:Eu$, $M_2MgSi_2O_7$ y $M_3Si_2O_8:Eu$ (donde $M = Ca, Sr$ o Ba), han sido estudiada con detalle [217]. La eficiencia de estos fosforóforos suele ser bastante alta y la máxima emisión puede variar entre 435 y 600 nm.

Por último, se mencionan algunos sistemas de fosfatos, molibdatos y volframatos, materiales que también son de interés en la producción de lámparas comerciales. Citaremos, la activación en medio alcalino el Eu(II) de pirofosfatos alcalinotérreos $M_2P_2O_7$ (donde $M = Ca$ o Sr) [218], en $Ca_3(PO_4)_2$ [219], $(Mg,Sr)_3(PO_4)_2:Eu$ [220], en los compuestos Z_2WO_6 o Z_2MoO_6 donde Z es un ión trivalente [221]. Se han estudiado con gran detalle, los sistemas $R_2MoO_6:Eu(III)$ (donde $R = La, Gd$ o Y) [222]. Existen también gran variedad de polímeros de molibdatos y volframatos del tipo $Ba_2La_2Mg(WO_6)_2$ y $Ba_6Y_2(WO_6)_3$ [223] que emiten con gran intensidad. El molibdeno y wolframio forman complejos fluorescentes con el ácido carmínico que posteriormente se fija en una resina intercambiadora lo que permite su determinación.

VII. ACCIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS DROGAS SINTÉTICAS.

La farmacología es la ciencia que estudia las drogas, entendiéndose por droga o fármaco en su acepción general y amplia, toda sustancia que tiene acción sobre los seres vivos. En esta forma no existe sustancia que escape a esa definición, por lo que debe limitarse el concepto de la manera que se sigue, y que se refiere a la medicina.

Droga o fármaco, desde el punto de vista médico, es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación tratamiento o prevención de las enfermedades del hombre u otros animales o sea en beneficio de los mismos. Esta definición corresponde a la establecida por el Grupo Científico de la Organización Mundial de la Salud y así el término droga se hace sinónimo de medicamento, como asimismo lo establece el citado Grupo Científico, esta sinonimia está universalmente aceptada [224,225], aunque las drogas pueden denominarse también agentes farmacológicos.

El origen de las drogas deriva de los tres reinos de la naturaleza [224], vegetal, animal y mineral (drogas naturales) pero la inmensa mayoría es producida por síntesis, (drogas sintéticas), siendo actualmente este cuarto estado el más importante en farmacología.

Las drogas sintéticas, es decir aquellas que el químico obtiene mediante síntesis, en compuestos orgánicos, sobrepasa en número a todos los otros fármacos derivados de los tres reinos de la naturaleza, las drogas naturales. Estas drogas sintéticas, que se obtienen por síntesis total a partir de sustancias sencillas [226], no tienen relación desde el punto de vista químico con las naturales y deben distinguirse de las drogas semisintéticas obtenidas por síntesis parcial, o sea por modificación química de las drogas naturales.

Los vegetales poseen un considerable número de constituyentes, farmacológicamente efectivos o principios activos [225,227] y otros inactivos. Algunos de estos compuestos son entidades químicas definidas, por ejemplo los alcaloides, mientras que otros son de composición química indefinida, a veces mezclas de sustancias pero que forman grupos verdaderos, especialmente debido a sus caracteres físicos [227].

Las drogas son capaces de modificar las funciones celulares [225], ya sea aumentándolas -estimulación-, disminuyéndolas -depresión-, o aumentándolas violentamente con producción de lesión anatómica -irritación-, estas acciones se producen especialmente por reacciones que dan lugar a enlaces químicos entre las drogas y ciertos componentes celulares, grupos químicos denominados receptores, situados preferentemente, no todos, en la superficie de las células.

No es de extrañar pues, que existan relaciones entre la estructura química de las drogas y su acción farmacológica [228], y que en general, sustancias de constitución similar posean acciones también similares [228]. Hasta cierto punto y aunque los conocimientos son aún limitados, puede preverse la acción farmacológica de un compuesto estudiando su estructura química, y este hecho ha sido el punto de partida para obtener, por vía sintética drogas nuevas [229], que constituyen adelantos importantes con respecto a las ya existentes de acción similar, llegando a ser incluso más eficaces y rápidas. También se ha llegado al conocimiento de drogas sintéticas con acciones nuevas. Cuando se conozca en su totalidad las leyes que rigen las relaciones entre estructura química y acción farmacológica, será posible la obtención de drogas que produzcan todas las acciones que se deseen.

La mayoría de las drogas de acción farmacológica definida son ácidos o bases [230] y dicha acción depende del grado de ionización. Ahora bien, alguna de ellas -fenoles, ácidos carboxílicos- actúan en su forma no ionizada, mientras que otras -compuestos de amonio cuaternario, lo hacen en su forma ionizada [231], en el primer caso, la actividad farmacológica disminuye con la ionización y en el segundo sucede lo contrario.

VIII. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS: ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y PIRIDOXINA.

Ácido salicílico.

El efecto medicinal de la corteza del sauce y otras plantas se conoce desde hace siglos en varias culturas. El ingrediente activo de la corteza de sauce es un glucósido amargo llamado *salicilina*, aislado por primera vez en forma pura por Leroux en 1829. Por hidrólisis, la salicina libera glucosa y alcohol salicílico; este último puede ser convertido en ácido salicílico tanto *in vivo* como por manipulación química y también se preparó con aceite de gaulteria y de extractos de otras plantas, incluso *Spirala ulmaria*. La síntesis de este ácido se logró con fenol en 1860 (Kolbe y Lautemann)[232]. El enorme éxito de esta droga llevó a Hoffman, un químico empleado por Bayer, a preparar ácido acetil-salicílico basado sobre el trabajo previo, en olvido, de Gerhardt en 1853. La demostración de sus efectos antiinflamatorios, le valieron para ser introducido en medicina por Dreser en 1899 bajo el nombre de aspirina, motivado por la especie vegetal Spirea de la cual se preparó por primera vez el ácido salicílico. Los salicilatos sintéticos desplazaron rápidamente a los de origen natural, más costosos.

El ácido salicílico, ácido ortohidroxibenzoico, representado en la Figura 39, es tan irritante que solo puede usarse externamente y por ello varios derivados de este ácido se han sintetizado para el uso sistémico. Son los salicilatos [233-235], que forman dos grandes grupos, los ésteres del ácido salicílico obtenidos por sustitución en el grupo carboxílico y los ésteres de salicilatos de ácidos orgánicos, en los que el grupo carboxilo del ácido salicílico se conserva y la sustitución se hace en el grupo OH.

Los salicilatos actúan siempre en virtud de su contenido en ácido salicílico. Las sustituciones en el grupo carboxilo o hidroxilo modifican la potencia o toxicidad del compuesto. La posición orto del grupo OH es un aspecto importante para la acción del salicilato. Las sustituciones en el anillo bencénico están dando lugar en la actualidad a nuevos derivados de los salicilatos, como puede ser el diflunisal.

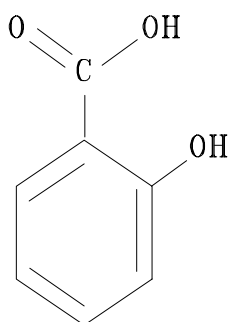


Fig. 39 Estructura del ácido salicílico.

En cuanto a sus propiedades farmacológicas [224] pueden ser distintas, analgésicas se utilizan más que ninguna otra para aliviar el dolor, aunque de poca intensidad, como son cefaleas, mialgias, artralgias y otros dolores que surgen de estructuras tegumentarias y estructurales. El uso crónico no produce tolerancia ni adicción, y la toxicidad es menor que la de los analgésicos más potentes.

También son analgésicos [236], antiinflamatorios [237] y antipiréticos, disminuyen la temperatura corporal elevada, aumentan el consumo de oxígeno y el índice metabólico. En dosis tóxicas, estos compuestos tienen un efecto pirético que produce sudoración.

Los efectos del salicilato sobre la respiración son de fundamental importancia porque contribuye a las serias perturbaciones del equilibrio ácido-base que caracterizan al envenenamiento por esta clase de compuestos. Las dosis terapéuticas máximas de salicilatos aumentan el consumo de oxígeno y la producción de CO_2 en los animales de experimentación y en el hombre, los pacientes con envenenamiento con salicilatos, pueden presentar un notable aumento del volumen respiratorio y se produce alcalosis respiratoria.

Las dosis terapéuticas de salicilatos pueden tener distintos efectos sobre problemas de tipo cardiovascular, metabólicos, endocrinos, gastrointestinal [232] pudiendo causar en este caso, ulceración gástrica y hasta hemorragia en los animales de experimentación y en el hombre, ésta es indolora y produce a menudo pérdida de sangre en las heces y ocasionalmente anemia por deficiencia de hierro.

Los salicilatos ingeridos por vía oral se absorben rápidamente en parte en el estómago, pero principalmente en el intestino delgado superior. La absorción está determinada por muchos factores, particularmente la desintegración y disolución si se toman tabletas, el pH en las superficies mucosas y el tiempo de vaciamiento gástrico. Después de su absorción los salicilatos se distribuyen en casi todos

los tejidos del organismo y en casi todos los líquidos transcelulares, principalmente por procesos pasivos dependientes del pH.

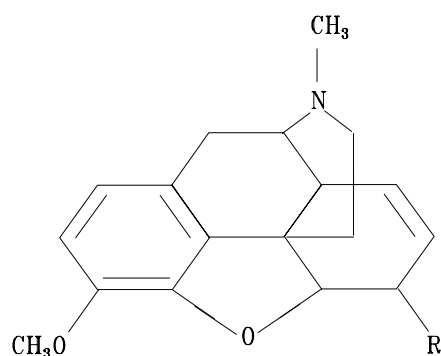
Los salicilatos se excretan principalmente por el riñón [236]. Los estudios realizados en el hombre indican que el salicilato se excreta por la orina, como ácido salicílico libre, ácido salicílico, glucuronidos de salicílico fenólico y ácido genticónico. Sin embargo la excreción como salicilato libre depende del valor de pH, en la orina básica puede alcanzar un 30%, mientras que en la ácida no llega a 2%.

Los preparados de salicilatos para su administración y dosis más habitual son el salicilato de sodio y la aspirina (ácido acetilsalicílico). El salicilato de sodio se vende en tabletas que contienen 325 ó 650 mg de droga y en una solución inyectable para uso parenteral. La aspirina se vende en tabletas de 65 a 975 mg, cápsulas y supositorios, también hay tabletas de liberación lenta.

Codeína.

Fue descubierta y aislada por Robiquet en 1832 [238,239], este alcaloide, es el constituyente más importante de las plantas, del grupo de los opiáceos. Este término se usó en un principio para las drogas derivadas del opio, morfina, codeína y muchos análogos semisintéticos de la morfina, actualmente designa en sentido genérico tanto las drogas naturales como sintéticas de acciones semejantes a la morfina.

Los alcaloides constituyen aproximadamente un 25 % en peso del opio y pueden dividirse en dos clases químicas definidas, fenantrenos y bencilisoquinolinas. La estructura de la codeína, que es metil morfina, Fig. 40, deriva de la estructura de la morfina propuesta originalmente por Gulland y Robinson [240] en 1925, donde se ha sustituido el -OH fenólico metílicamente.



Codeína: R= -OH; Morfina: R= -CH₃

Fig. 40 Estructura de opiáceos

La morfina y los opiáceos afines producen sus principales efectos sobre el sistema nervioso central [241-244] y el intestino. Dichos efectos son muy diversos e incluyen analgésico, somnolencia, alteraciones del estado de ánimo, depresión respiratoria, menos motilidad gastrointestinal, náuseas, vómitos y alteraciones de los sistemas endocrinos y nervioso autónomo.

Tres grupos de investigadores (Pert y Snyder; Simón Hiller y Edelman; Terenius), describieron de forma independiente sitios de fijación estereoespecíficos saturables para los opiáceos en el sistema nervioso del mamífero. En 1975, Hughes y Kosterlitz y col. describieron el aislamiento, en el encéfalo del cerdo, de dos pentapéptidos que exhibían acciones de tipo morfínico en el ileon del cobayo. El mismo año Goldstein y col. describieron la presencia de sustancias peptídicas con actividad opiácea en la glándula hipófisis, comprobándose en un periodo muy breve que existen tres familias de péptidos opiáceos y múltiples categorías de receptores para los opiáceos.

Interactúan con lo que parecen ser varios receptores relacionados y comparten algunas propiedades de ciertos péptidos naturales, como encefalinas, endorfinas y dinorfinas [241-244].

El desarrollo de la tolerancia y la dependencia física que trae el uso repetido, es un aspecto característico de todas las drogas opiáceas, y la posibilidad de que se produzca dependencia psicológica de los efectos de estas drogas es una de las principales limitaciones de su uso clínico.

Los opiáceos se absorben fácilmente del tracto gastrointestinal; también de la mucosa nasal y el pulmón, y por la inyección subcutánea o intramuscular. En la mayoría de ellos, el efecto de una dosis oral es menor que una parenteral, salvo en el caso de la codeína que ocurre al contrario que tiene aproximadamente dos tercios por vía oral que por parenteral, como analgésico y como depresor respiratorio.

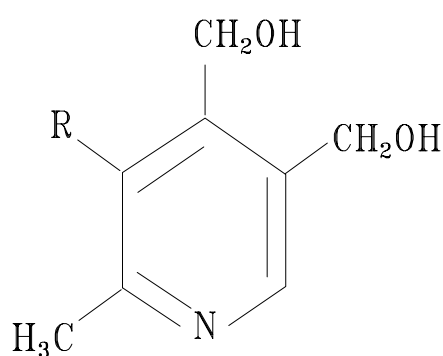
Los preparados farmacéuticos para la administración clínica de la codeína, se expenden como sus sales hidrosolubles, sulfato y fosfato de codeína, ambas en tabletas (15 a 60 mg). El fosfato, mucho más soluble en agua que el sulfato, se expende para inyección y es un ingrediente en muchas combinaciones analgésicas (líquidos, tabletas y cápsulas) y en diversas combinaciones antitusígenas (líquidos, cápsulas y tabletas).

Piridoxina.

En 1938 cinco laboratorios diferentes se referían al aislamiento de esta vitamina, a partir de la levadura y el salvado del arroz [245-250], a esta sustancia se le dio el nombre de piridoxina.

Como tal principio activo, pertenece al grupo de las vitaminas B, un grupo de sustancias de diversa composición química, que pueden definirse como sustancias orgánicas que deben figurar en pequeñas cantidades en la alimentación para posibilitar la síntesis en los tejidos de cofactores que son esenciales para diversas reacciones metabólicas. Cuando la vitamina existe en más de una forma química, (piridoxina, piridoxal, piridoxamina), o como precursor (caroteno para la vitamina A), estos análogos se denominan algunas veces vitámeros.

La estructura de la vitamina fue dilucidada en 1939 [251], a partir de pruebas químicas y espectroscópicas, Fig. 41, demostrándose que varios compuestos naturales afines, piridoxina, piridoxal y piridoxamina, poseían las mismas propiedades biológicas, por lo cual todos ellos deberían llamarse vitamina B₆, pero el Consejo de Farmacia y Química ha dado el nombre de piridoxina a la vitamina. En los tres casos, la estructura representada en la figura, responde a un núcleo de piridina sustituido. En la piridoxina, el sustituyente del carbono 4 del anillo es un grupo fenol, mientras que en los otros vitámeros se trata de un aldehído (piridoxal) o un grupo aminometilo (piridoxamina).



Piridoxal: R= -COH; Piridoxina: R= -OH; Piridoxamina: R= -NHCH₃

Fig. 41 Estructura del vitámero B₆

Las formas fisiológicamente activas de la vitamina B₆ son fosfato de piridoxal y fosfato de piridoxamina. Las tres formas se convierten en el organismo en fosfato de piridoxal por esterificación del alcohol situado en posición 5; el piridoxal es convertido en fosfato por la acción de la enzima piridoxalquinasa.

La piridoxina o vitamina B₆, es un nutriente esencial para las células de los mamíferos y debe encontrarse en la dieta [252]. La función fisiológica del fosfato de piridoxal es su participación como coenzima en gran variedad de transformaciones metabólicas de aminoácidos, tales como la descarboxilación, transaminación y racemización. Así por ejemplo, en el caso de la transaminación, el fosfato de piridoxal ligado a enzimas es aminado a fosfato de piridoxamina por el aminoácido donante y

este fosfato de piridoxamina es desaminado de nuevo a fosfato de piridoxal por el " -cetoácido aceptor. También interviene en etapas enzimáticas del metabolismo del triptófano, los aminoácidos que contienen azufre y los hidroxiaminoácidos.

La arterioesclerosis también se ha relacionado con una deficiencia alimentaria de piridoxina. En 1949 Rinehart y Greenberg [253,254] informaron que en monos deficientes en piridoxina se desarrollaban, lesiones muy parecidas a la arterioesclerosis, y en 1955 Schroeder [255], postuló que la dieta estadounidense, con elevado contenido en ácidos grasos saturados, puede ser inadecuada en su aportación de vitamina B₆.

Los síntomas de deficiencia [256] de piridoxina se han encontrado en todas las especies de mamíferos estudiadas, incluido el hombre, donde se han descrito lesiones cutáneas tipo seborrea en ojos, nariz y boca, acompañadas de glositis y estomatitis, producidas en pocas semanas de dietas pobres en el complejo B y con dosis diarias de un antagonista de la piridoxina (4-desoxipiridoxina). Las lesiones desaparecen rápidamente después de la administración de piridoxina pero no responden a otros miembros del complejo B. Además se ha encontrado que la incidencia de la carencia de vitamina B₆ bioquímicamente demostrable en alcohólicos es del 20% al 30%. Los aspectos más importante de dicha deficiencia se manifiestan en la piel, el sistema nervioso y la eritropoyesis. El requerimiento de piridoxina aumenta con la cantidad de proteína incluida en la alimentación.

Las principales fuentes de piridoxina son la carne, el hígado, el pan y los cereales integrales. Durante la cocción de los alimentos se producen pérdidas apreciables de piridoxina, que además es sensible a la luz ultravioleta y a la oxidación. La administración terapéutica más habitual es en forma de clorhidrato de piridoxina.

Piridoxina, piridoxal y piridoxamina se absorben fácilmente del tracto gastrointestinal. En el hombre, el principal producto de excreción de cualquiera de las tres formas de la vitamina es el ácido 4-piridóxico formado por la acción de una aldehidooxidasa hepática sobre el piridoxal libre.

IX. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A continuación, se presenta una relación de citas bibliográficas, la mayoría de los cuales corresponden al período de los últimos veinte años, relativos a la determinación de los tres principios activos objeto de esta Memoria, agrupados según las técnicas más relevantes descritas en la bibliografía.

Ácido salicílico.

Métodos electroquímicos.

Diferentes métodos de determinación de ácido salicílico se basan en el uso del enzima salicilato hidroxilasa (salicilato-1-monooxigenasa), que cataliza la hidroxilación irreversible en medio ácido del ácido salicílico a catecol con intervención del NADH, con desprendimiento de CO₂ y consumo de oxígeno. Basándose en esta reacción, la determinación de ácido salicílico puede hacerse siguiendo la disminución de NADH [257,258], la de oxígeno [259,260] o bien la formación de CO₂ [261] o la de catecol [262,263].

Y. Goto y col., [264] describen un método para la determinación de ácido salicílico en metabolitos de aspirina en suero humano, realizado por electroforesis capilar de zona (CZE) y detección con diodo array. La reproducibilidad de separación y cuantificación por análisis con CZE, del ácido salicílico extraído de suero humano es apropiado para las determinaciones diarias y efectuadas en distintos días. Existe una buena correlación entre los niveles de ácido salicílico encontrados en suero humano por CZE y por inmunoensayo por fluorescencia. No hay fenómeno de interferencias comprobado mediante el método de patrón interno. Este es un método simple y eficiente para la monitorización de ácido salicílico en pacientes.

M. Neumayr y col., [265] desarrollan un método enzimático rápido para determinación de ácido salicílico combinando un sistema de flujo con un reactor enzimático y un detector amperométrico del catecol formado a +0.45 v respecto del electrodo de referencia (Ag/AgCl/KCl). La respuesta del electrodo es proporcional a la concentración de ácido salicílico entre 5 y 150 : gAmL⁻¹, con límite de detección de 0.4 : gAmL⁻¹, desviaciones estándar relativas entre 0.5 y 2% y porcentajes de recuperación entre 93 y 98.

D. Evans y col., [266] investigan la oxidación del ácido salicílico en un electrodo de carbón vitrificado. La máxima señal electroquímica fue encontrada con un electrolito soporte de acetato buffer 0.06 molAL⁻¹ en metanol del 35% y a pH 5.0. El electrodo es usado como detector en la determinación de ácido salicílico en suero mediante cromatografía líquida. El método puede aplicarse a la determinación del analito a nivel de trazas en estudios clínicos.

Otros métodos eléctricos también pueden ser encontrados en bibliografía.[267-272]

Métodos espectrofotométricos.

B.W. Glombitza y P.C. Schmidt, [273] determinan simultáneamente ácido acetil salicílico y ácido salicílico en preparados farmacéuticos mediante dos métodos de análisis multicomponentes (regresión de componentes principales y por mínimos cuadrados parciales) mediante espectrofotometría UV, así como por espectroscopía de derivadas de 2º orden. El rango lineal de calibración es 0.0-103.2 : gAnL^{-1} para ASA y 0.07-44.5 : gAnL^{-1} para SA. La sensibilidad del método para el empleo de la 2ª derivada es 0.004% para ambos y 0.2% para el método de multicomponentes. La segunda derivada tiene la ventaja de determinar cantidades pequeñas en tabletas de preparaciones comerciales en comparación con los métodos de HPLC.

A. Ruiz Medina y col., [274] desarrollan un método con un sensor en flujo continuo, para determinar ácido salicílico en preparaciones farmacéuticas, basado en la fijación de este componente sobre un soporte sólido y la medida directa de su absorbancia intrínseca a 297 nm. El intercambiador iónico es un gel Sephadex QAE-A 25 (40-120:), introducido en una célula de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz. Se optimizaron las condiciones experimentales para las tres calibraciones 300. 600 y 1000 : L de volumen inyectado. El sensor se aplica a determinación ácido salicílico en fármacos previa hidrólisis del ácido acetil salicílico.

Yi-Bin Qu [275], desarrolla un método espectrofotométrico para determinación de ácido salicílico basado en una reacción con pentacloronitrosil-iridato ($[\text{Ir}(\text{NO})\text{Cl}_5^-]$), con el cual forma un complejo 1:1 con dos máximos de absorción (a 368 y 446 nm) ambos con absortividades molares de $1.1 \times 10^4 \text{ LAnol}^{-1} \text{ Acm}^{-1}$ en medio HCl 6M. En solución alcalina los máximos de absorción se presentan a 381 y 506 nm, con absortividades molares de 6.0×10^3 y $2.4 \times 10^4 \text{ LAnol}^{-1} \text{ Acm}^{-1}$ respectivamente. El sistema es lineal hasta concentraciones de 7 : gAnL^{-1} . No interfieren los ácidos benzoico y bórico. El autor estudia también la cinética y el mecanismo de la reacción.

S.Torrado y col. [276], comparan varios métodos de determinación de ácido salicílico en aspirina. Uno de los métodos estudia su determinación espectrofotométrica a 540 nm con el reactivo Trinder ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y HgCl_2 en medio HCl). Encontraron mayor linealidad en este método que en HPLC con detección UV y que en la determinación espectrofotométrica de derivadas (de segundo orden). La peor linealidad la encontraron por vía fluorimétrica.

Otros métodos espectrofotométricos además de los descritos pueden ser encontrados en bibliografías [277-293]. Hay métodos basados en la complejación con ión Fe(III) (277, 294), un método estándar también con formación de complejo con hierro [295], es empleado en diferentes tipos de matrices; en diazotación con p-notroanilina y ácido nitroso (277, 279, 296), el uso del reactivo Folin ciocalten [280], Complejación con ión Cu(II) en medio nitroso [296, 281] y conversión a un nitroderivado [297].

Métodos luminiscentes.

D.G. Konstantianos y col.[298] determinan simultáneamente ácido salicílico y acetil salicílico en suero humano y productos farmacéuticos mediante espectrofluorimetría sincrónica y derivada de segundo orden, basado en la fluorescencia nativa de los dos ácidos, en una solución de acético-cloroformo al 1%. Los rangos de concentración para su determinación son respectivamente 0.2-7.0 : $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.03-10 : $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ácido acetil salicílico y ácido salicílico. La recuperaciones son 102.6% para ácido acetil salicílico y 100.3% para ácido salicílico.

A. Villari y col. [299], mediante la espectrofluorimetría a ángulo cero en estado sólido, en la que los sistemas de excitación y detección están en línea, determinan ácido acetil salicílico y salicílico en productos farmacéuticos. Obteniendo valores para la desviación estándar relativa comprendidos entre 0.1-0.3 %, siendo su sensibilidad del orden de 10^{-8} g para ácido acetil salicílico.

J.A. Murillo Pulgarín y col. [300], determinan ácido salicílico en suero humano mediante fluorescencia sincrónica isopotencial y 1ª derivada del sincrónico. Trabajando a un pH de 6, ajustado con disolución de NaOH y NaH_2PO_4 , el método presenta unos valores de desviación estándar para una concentración de 0.100 : $\mu\text{g mL}^{-1}$, de 9.6×10^{-4} y 3.1×10^{-3} : $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada técnica respectivamente. El método es rápido y ofrece excelente reproducibilidad con sensibilidad comparable a otros métodos fluorimétricos, con la ventaja de poder aplicarse a matrices fluorescentes complejas sin separación previa.

J.A. Murillo Pulgarín y col. [301], proponen un método para la determinación simultánea de los siguientes ácidos p-aminobenzoico, gentísico y salicílico empleando la técnica de la 1ª derivada del espectro sincrónico con ángulo variable de 65.8° . El método en disolución acuosa a pH 7, empleando como disolución tampón fosfato tiene un rango de calibración comprendido entre 0.02-0.25 : $\mu\text{g mL}^{-1}$, para cada ácido. Las longitudes de onda de lecturas seleccionadas fueron 264.4/325.2 nm, 319.6/447.8 nm y 337.6/487.7 nm respectivamente para el ácido p-aminobenzoico, salicílico y gentísico. Del estudio de la reproducibilidad se obtuvieron resultados de desviación estándar correspondientes a una concentración de 0.100 : $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada componente del orden de 1.017×10^{-3} , 1.680×10^{-3} y 6.449×10^{-3} : $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente para ácido salicílico, ácido acetil salicílico y p-aminobenzoico. El método dio buenos resultados aplicado a muestras sintéticas.

D.G. Konstantianos y col. [302], determinan mediante la segunda derivada del espectro sincrónico naproxeno y ácido salicílico en suero humano. Basado en la fluorescencia de ambos analitos en disolución de cloroformo y ácido acético al 1%. El ácido salicílico se mide directamente en la mezcla binaria para un valor de $\lambda = 130$ nm y el naproxeno para un valor de $\lambda = 60$ nm. Las rectas están calibradas entre 0-14 mgA^{-1} para naproxeno y 0-13 mgA^{-1} , para AS. Los límites de detección son 0.003 y 0.01 mgA^{-1} , respectivamente para naproxeno y ácido salicílico y el valor medio de la recuperación para cada analito 102 % y 103% respectivamente.

J.A. Murillo Pulgarín y col. [303], proponen un método fluorimétrico para determinar ácido genticónico y salicílico, empleado la técnica de derivadas a partir del espectro sincrónico isopotencial. El pH de trabajo 6, es ajustado con disolución tampón de fosfato y la calibración lineal de ambos ácidos es 0.5-6.30 : gAmL^{-1} . Los resultados estadísticos de la comparación de pendientes a través de la *t* de Student, son satisfactorios así como la reproducibilidad y la sensibilidad.

P. Damiani, [304], determinan simultáneamente en orina, mediante espectrofluorimetría sincrónica y haciendo uso de la primera y segunda derivada ácido acetil salicílico, ácido salicílico y ácido genticónico.

L. Bruzzone, [305] describe un método fácil y simple para el análisis de ácido salicílico en productos farmacéuticos pulverizados, por fosforimetría a temperatura ambiente empleando yoduro potásico como átomo pesado para mejorar la determinación de ácido salicílico sin necesidad de separación previa. Los análisis han sido efectuados mediante la curva de calibración y por el procedimiento de adición de patrón interno. También se han estudiado las posibles interferencias de los principios activos presentes en las preparaciones farmacéuticas.

Schenk y col., [306] estudian los efectos de ácidos carboxílicos alifáticos en la fluorescencia de emisión de los ácidos acetil salicílico y salicílico. El análisis de la mezcla de estos componentes se realiza empleando como disolvente ácido acético/cloroformo 1%.

Shane y Miele [307], describen un método fluorimétrico rápido para la determinación de ácido salicílico en aspirina y otros fármacos en presencia de sustancias fluorescentes que no interfieren como citrato de feniltoloxamina, guayacolato de glicerilo y cafeína, interfiriendo fluoróforos como salicilamida. La precisión de los resultados obtenidos es satisfactoria. El procedimiento está basado en una simple disolución de la tableta triturada en una disolución amortiguadora a pH 4.0 y la lectura en el filtrado del espectro de emisión, registrado a una $\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm y $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm.

Streek y Schenk [308], han puesto a punto métodos para determinación de salicilamida, ácido acetil salicílico y salicílico en preparaciones farmacéuticas que contienen acetaminofenol, cafeína, fenacetina, salicilamida y ácido acetil salicílico como principales componentes. El ácido salicílico se determina para concentraciones de 10^{-7} M, pero después de la separación de salicilamida, acetaminofenol y cafeína.

Villari y col. [309], desarrollan un método fluorimétrico para la determinación de ácido salicílico en presencia de acetil salicílico (como producto de hidrólisis). El método se aplica a la muestra sólida pulverizada y después comprimida por lo que es un método no destructivo y bastante sensible, con coeficientes de variación entre 3 y 4%.

Damiani y col. [310], determinan ácido salicílico en aspirina en presencia de otros dos metabolitos de la aspirina (ácido salicílico y gentísico) por espectrofluorimetría sincrónica derivada aplicando la técnica zero-crossing. Con la primera derivada, la gráfica de calibración es lineal en el rango $0.02-2 \text{ mg}\mu\text{L}^{-1}$ con desviación estándar relativa entre 1-2% con la segunda derivada la desviación estándar relativa es 1-4%.

Zhu y col. [311], determinan ácido salicílico en presencia de ácido benzoico por fluorimetría sincrónica en medio H_2SO_4 1M en el rango 260-380 nm de λ_{exc} y con $\lambda=80$ nm. El límite de detección fue $25 : \text{g}\mu\text{mL}^{-1}$ y la reproducibilidad 1.2%.

Además de los citados, pueden encontrarse descritos en bibliografía otros métodos fluorimétricos [312- 316].

Finalmente, existen otros métodos basados en técnicas diferentes a la que aquí se han comentado, como pueden ser análisis térmicos [317-319], espectroscopía de reflectancia difusa [320,321] e inmunoensayo [322,323]. Así como un método estándar volumétrico empleado para determinar ácido salicílico en fármacos [324], por la U.S. Pharmacopeia.

Codeína

Métodos electroquímicos.

E. M. Elnema y M.A. Hamada [325], desarrollan cuatro sistemas con membranas de PVC en los electrodos para la determinación potenciométrica del catión codeínico. Estos electrodos se basan en el empleo de los complejos de asociación iónica, del catión codeínico con tetrafenilborato y con otros contraiones.

Las características de estos electrodos es dar una respuesta constante y estable de del potencial de Nernst para concentraciones de codeína comprendidas entre $(3.5-7.0) \times 10^{-5}$ M. Para valores de pH comprendidos entre 2.5 -7.0, los electrodos dan respuestas satisfactorias tanto para la determinación manual como por inyección en flujo de codeína en productos farmacéuticos. Las interferencias de excipientes y de un gran número de cationes inorgánicos y orgánicos son despreciables. En la determinación directa de $(1-30) \text{ g/mL}^{-1}$, los porcentajes de recuperación son del 109.06% y la medida de la desviación standar ± 0.8 %. Las comparaciones de estos resultados son comparables con los de la farmacopea inglesa.

Métodos espectrofotométricos.

M. Abdel-Hady Elsayed y col [326], describen un método preciso y simple para la determinación de acetaminofenol, salicilamida y fosfato de codeína en tabletas, donde la composición de los analitos está en la relación 25:30:1.

Los dos primeros se determinan directamente en disolución acuosa alcalina (hidróxido de sodio 0.01 M) a partir de las medidas de los espectros derivados a 262.5 nm para acetaminofenol y 329 nm para salicilamida; la codeína en estas condiciones muestra una señal despreciable que carece de interés cuantitativo. Para su determinación proceden a la formación de un par iónico con disolución de naranja de metilo a pH 3.5, empleando como disolución amortiguadora acético/acetato sódico, extrayendo a continuación con cloroformo y midiendo su absorbancia a 418 nm.

La calibración se realiza mediante mínimos cuadrados y para los siguientes intervalos de concentración 0.2-2.0 % m/m, 0.3-2.4 % m/m y 0.4-3.2 % m/m para acetaminofenol, salicilamida y fosfato de codeína respectivamente.

Los % de recuperación para los tres componentes oscilan entre 100.44 y 99.04% .

Métodos luminiscentes.

T.J.Christie y col. [327], han comprobado que algunos procedimientos analíticos que emplean reacciones de quimioluminiscencia, son extremadamente más sensibles que los espectrofotométricos y además más rápidos, simples y reproducibles, al acoplarle un sistema por inyección en flujo (FIA). Este trabajo determina codeína, en presencia de cantidades de morfina, combinando la quimioluminiscencia generada en la reacción con permanganato potásico (6×10^{-4} M), en presencia de ácido fosfórico 0.5 M y con un caudal de flujo de 1.24 mL min^{-1} , como condiciones óptimas del sistema.

La luminiscencia de la morfina, no impide la determinación de la codeína para cantidades menores al 0.13%. El límite de detección es de 8 pmoles y el coeficiente de desviación estándar relativa para la determinación de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ es 1.4% (n=10).

Greenway G.M. y col. [328], describen un método sensible, para determinar codeína, heroína y dextrometorfano empleando quimioluminiscencia electrogenerada a partir de la reacción de tris-(2,2'-bipiridina)-rutenio II con los grupos aminos terciarios, en la superficie de un electrodo. Puede ocurrir que la presencia de grupos inhibidores en la superficie del electrodo afecten a la luminiscencia del sistema, en este caso los grupos fenólicos. Esta determinación se realiza a temperatura ambiente y disolución acuosa tamponada empleando, acetato a pH 4.0 para codeína, fosfato pH 6.5 para dextrometorfano y acetato a pH 5.5 para heroína.

El rango dinámico lineal es 0.1-1.0 : mol L^{-1} y su desviación estándar relativa inferior al 5% para n=5. Los límites de detección calculados son 15 y 45 nmol L^{-1} para codeína y heroína y 44 nmol L^{-1} para dextrometorfano.

El método se ha aplicado para determinación cuantitativa de codeína en analgésicos, empleando adición de patrón y con recuperaciones de 103.8%. También puede ser aplicado en análisis clínicos forenses, pero en muestras biológicas como orina y plasma hay problemas de algunos interferentes

N. W. Barnett y col. [329], emplean un procedimiento de análisis por inyección en flujo (FIA), con detección de la quimioluminiscencia producida en un reactor heterogéneo en fase sólida de dióxido de plomo/sílice donde reaccionan la codeína con tris-(2,2'-bipiridilo)rutenio II en disolución acuosa a pH 5.8, empleando como disolución tampón acetato sódico y un caudal total de 2.0 mL min^{-1} . El método tiene una respuesta lineal para concentraciones entre 5.0×10^{-2} - 1.0×10^{-6} M, el límite de detección vale 5.0×10^{-9} M y la desviación estándar relativa 0.9% (n=5).

Para las muestras analizadas la codeína exhibe una gran sensibilidad y selectividad sobre otros alcaloides similares, especialmente la morfina. Cuando las muestras presentan matrices complejas se emplea el método de calibración interna. Se aplica para la determinación de codeína, obtenida en un proceso de extracción de *Papaverum somniferum* y los resultados obtenidos para dos regímenes distintos de trabajo son comparados con los de Cromatografía Líquida de pares-iónicos.

Piridoxina

Métodos electroquímicos.

A. Stergios y col, [330] desarrollan un procedimiento cinético-potenciométrico para la determinación de piridoxina en presencia de tiamina aplicado a preparaciones farmacéuticas.

La N-Bromosuccinimida (NBS), es probablemente el compuesto orgánico más importante para producir el oxidante fuerte Br^+ , encontrándose gran variedad de aplicaciones tanto en síntesis como en análisis químico. Existen un gran número de compuestos que se determinan usando NBS, que ofrece ciertas ventajas sobre los hipobromitos que generalmente hay que prepararlos "in situ", ya que pueden dar lugar fácilmente a bromato e iones bromuro.

En este trabajo se emplea el electrodo selectivo de bromuro, para estudios cinéticos de las reacciones de piridoxina y tiamina con NSB, en un amplio intervalo de pH. La NSB con iones Br^- , genera Br_2 en solución ácida, hidrolizada en medio alcalino forma bromato que se descompone produciendo de nuevo iones bromuro.

El método es lineal para el intervalo de concentraciones 5.0×10^{-7} - 1.0×10^{-4} M, para un rango de pH 3.0-11.0 y de temperatura 10-35 °C. Se aplica a cuatro fármacos que contiene ambas vitaminas, Neurobión (tabletas e inyectables), Vioneurin-6 forte (inyectables) y Triforte (inyectables), la diferencia entre los resultados obtenidos por este método y el de la US Farmacopea tienen un error relativo comprendido entre -9.4 y +6.1%.

Métodos espectrofotométricos.

M. Surmeian [331], describe un método para la determinación de clorhidrato de procaína y piridoxina en tabletas mediante la 1ª y 2ª derivada por espectrofotometría UV, empleando como disolventes agua y HCl 0.1 M respectivamente. La relación lineal ha sido obtenida a partir de la composición de la mezcla y la medida de la amplitud $dA/d\lambda$ a 308.33 nm para procaína y 265.81 nm para piridoxina.

El método resulta satisfactorio en cuanto a exactitud y precisión cuando se aplica a fármacos.

M.J Ayora Cañada y col., [332] proponen un sensor fotométrico de flujo par determinación de piridoxina en fase sólida, empleando como soporte resina Sephadex SPC-25 a pH 2.0 y empleando como portador NaCl, con una caudal de 1.15 mL min^{-1} . La absorción se mide a 290 nm. Para los dos volúmenes de muestra ensayados 600 : L y 1250 : L, el método es lineal para los intervalos 2-20 y 1-10 : $\mu\text{g mL}^{-1}$

respectivamente, los límites de detección correspondiente a cada uno son 0.08 y 0.02 : $\mu\text{g mL}^{-1}$ así como las desviaciones estándares relativas 0.65% y 0.84%. En la aplicación del método a un gran número de medicamentos en presencia de vitaminas se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios comprendidos entre 96-106 %.

Métodos luminiscentes.

A. A. Alwarthan y A. A. Aly [333], describen un método de quimioluminiscencia por inyección en flujo, para determinar clorhidrato de piridoxina. Se ha examinado, la linealidad, los límites de detección y reproducibilidad. Este método está basado en aumentar en el clorhidrato de piridoxina el efecto de quimioluminiscencia generado por la oxidación de luminol con peróxido de hidrógeno en disolución acuosa de hidróxido potásico y oxalato potásico.

La intensidad de quimioluminiscencia es lineal para el rango 10-250 : $\mu\text{g mL}^{-1}$, con valor para el límite de detección de 6 : $\mu\text{g mL}^{-1}$. La aplicabilidad del método ha sido demostrada para la determinación de clorhidrato de piridoxina en diferentes tabletas y en compuestos dietéticos.

A. Ruiz Medina y col., [334] proponen un método de determinación de piridoxina en presencia de otras vitaminas del grupo B, mediante un sensor de flujo con detección fluorimétrica en fase sólida con resina Sephadex SP-C25 como soporte sensor, sin ninguna reacción de derivación. Las longitudes de onda de excitación y emisión son 295 y 385 nm, respectivamente. El sensor responde linealmente para los siguientes rangos de concentraciones, 5-200, 10-400 y 50-1800 ng mL^{-1} respectivamente, con límites de detección 0.33, 0.67 y 5.70 ng mL^{-1} , para 2000, 1000 y 200 : L de volumen de muestra respectivamente. La desviación estándar relativa para diez determinaciones independientes es 0.75% para 0.2 y 1 mL de volumen de muestra y de 1.31% para 2 mL. El método ha sido aplicado a un gran número de preparaciones farmacéuticas con resultados satisfactorios.

J.E. Churchich [335], el fosfato de piridoxina es la forma de la coenzima de vitamina B₆, que tiene un máximo de fluorescencia a 378 nm, cuando se excita a 312 nm, en disolución acuosa neutra. El máximo de emisión es invariable a 378 nm, aún para pH bajos como 1, a pesar del cambio en el espectro de absorción debido a la protonación del zwitterion, se explica debido a la disociación del estado excitado del grupo hidróxilo fenólico.

J.E. Churchich [336,337], ha investigado también las propiedades fluorescentes del fosfato de piridoxamina y el ácido piridóxico (fosfato), el trabajo consiste en los estudios de transferencia de energía, el efecto de la temperatura y pH en el espectro así como los cambios espectrales al enlazarse con proteínas.

Y.V. Morozov y col.[338], tienen trabajos de asignación para las bandas de fluorescencia a través del estudio de varios orto y meta N derivados metilados y empleando métodos de química-cuántica.

J.W. Bridges y col.[146] y **J.F. Gregory** y col. [339], describen en sus trabajos como la mayor parte de los compuestos fluorescentes de la piridoxina, tienen su máximo de intensidad en un intervalo de pH próximo a la neutralidad entre 6 y 7 y cómo también la temperatura influye fuertemente para estos valores de pH.



I. METODOLOGÍA DE TRABAJO



I. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

En este capítulo, se recoge la metodología experimental, el tratamiento de datos aplicado a lo largo del desarrollo de esta Memoria y al mismo tiempo se indican todos los reactivos, disoluciones, instrumentación y programas informáticos utilizados en la realización del proceso experimental y tratamiento de datos obtenidos.

La metodología experimental es la Espectrofluorimetría en disolución. Con ella se pretende dar respuesta a ciertos problemas en las determinaciones abordadas en esta Memoria.

Las metodologías de tratamiento de las señal analítica han sido, según los casos:

- 1.- Calibración univariante.
- 2.- Calibración multivariante.

A continuación se ofrece una visión general de la metodología de trabajo utilizada.

I.1 Metodología de la espectrofluorimetría en disolución.

En espectrofluorimetría convencional y para conseguir una descripción completa de las características fluorescentes de un determinado compuesto, se requiere **un espectro tridimensional**, en el cual uno de los ejes es la escala de la longitud de onda de excitación; un segundo eje representa la longitud de onda de emisión y el tercero es el eje de intensidades. Tales espectros son conocidos como **espectros de luminiscencia total**.

Este espectro de luminiscencia total contiene n espectros individuales superpuestos. En nuestro caso, la obtención de los mismos ha sido posible gracias a la comunicación, vía puerto serie (RS-232 C) establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador tipo PC; a un programa de recogida y tratamiento de datos tipo (FLDM) y a un programa de representación tridimensional (GOLDEN SURFER). Mediante un programa BASIC escrito en lenguaje FLDM se registran una serie de espectros de emisión con una diferencia de longitudes de onda de excitación constante. Estos espectros son transformados en un fichero de formato .GRD compatible con el GOLDEN SURFER mediante un programa PASCAL.

Un segundo método para representar los espectros de luminiscencia total es mediante **curvas de nivel o topogramas**.

Esta posibilidad también está contemplada en las opciones de GOLDEN SURFER. Los dos ejes normales representan las longitudes de onda de excitación y de emisión mientras que las intensidades se expresan con una serie de curvas de nivel. Este sistema presenta ventajas importantes pues permite, entre otras cosas, determinar el máximo del sistema con gran precisión, calcular el intervalo de longitud de onda óptimo para la obtención de espectros sincrónicos y trazar la ruta más conveniente cuando se trabaja en fluorescencia sincrónica de ángulo variable o asincrónica.

1.1.1. Técnicas espectrofluorimétricas utilizadas.

A continuación se comentan las distintas técnicas fluorimétricas utilizadas en el presente trabajo.

*** Espectros de excitación y emisión. (Bidimensionales).**

El espectro de luminiscencia total, como se ha indicado anteriormente, nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y poder elegir las características espectrales óptimas, extrayendo mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de emisión y excitación más intensos del conjunto.

*** Espectros sincrónicos.**

La técnica de fluorescencia sincrónica consiste en realizar un barrido conjunto de los dos monocromadores del espectrofluorímetro, manteniendo una diferencia fija entre la longitud de onda de excitación y de emisión, obteniendo un espectro sincrónico que si el λ elegido corresponde a los máximos de los espectros convencionales de excitación y emisión, el espectro sincrónico puede simplificarse notablemente, sin perder sensibilidad dando con frecuencia un único pico relativamente estrecho.

Para la realización de los espectros sincrónicos hay que disponer del mapa de contorno o topograma de la mezcla y observar la zona de máxima fluorescencia para cada componente, seleccionando la diferencia constante entre la longitud de onda de excitación y emisión mediante una línea que forme 45° con la horizontal y que pase lo más cerca posible de los máximos de los espectros de los sistemas en estudio y la mezcla de ambos; evitando en lo posible, las zonas de solapamiento; así pues, la selección apropiada de la diferencia constante entre las longitudes de onda de emisión y excitación es crítica, debido a que esta diferencia puede modificar, en considerable extensión, la morfología del espectro.

* Espectros derivados.

En espectrofluorimetría de derivadas a una determinada longitud de onda la concentración de analito es función de la rapidez con que cambia la intensidad de fluorescencia con la longitud de onda, $dI_{RF}/d\lambda$, mientras que en fluorimetría convencional, la concentración del analito es directamente proporcional a IFR.

El proceso derivador, diferencia las bandas anchas de las estrechas en una extensión que aumenta al incrementarse el orden de la derivada. Esto es debido a que en bandas Gaussianas o Lorentzianas, la amplitud D_n , de la derivada de orden n , es inversamente proporcional a la anchura de banda original W , elevada a n :

$$D_n \propto (1/W)^n$$

Así, para dos bandas coincidentes de igual intensidad, la amplitud de la derivada de la banda más estrecha es mayor que la de la banda ancha, por un factor que se incrementa conforme aumenta el orden de la derivada.

Mediante la técnica de medida en el punto de corte *zero crossing* se eligen las longitudes de onda adecuadas para poder realizar medidas proporcionales a las concentraciones de los analitos y así poder establecer las correspondientes rectas de calibrado.

Esta técnica consiste en medir, para cada componente de un sistema binario el valor absoluto del espectro derivado total a un valor de longitud de onda correspondiente al punto de corte con el eje de abscisas del otro componente respectivamente.

Asumiendo que la derivada de un espectro mezcla es equivalente a la suma de las derivadas de los espectros individuales, cuando la magnitud de la derivada de uno de los analitos es cero, la contribución de dicho analito al espectro derivado de la mezcla es nula y consecuentemente, el otro analito puede medirse libre de la interferencia del primero. Del mismo modo ocurre para el segundo analito.

1.1.2. Medida de la intensidad de fluorescencia.

En cualquier método analítico instrumental, como es el caso que nos ocupa (espectrometría de fluorescencia), es imprescindible relacionar la **propiedad analítica, intensidad de fluorescencia, con la concentración** del analito a determinar, de manera que teniendo en cuenta lo descrito en la introducción de la presente Memoria, podemos establecer una relación cuantitativa entre

la intensidad de fluorescencia y la concentración a través de la ecuación:

$$I_f = \Phi_f (I_0 - I) \quad (1)$$

donde:

I_f : intensidad radiante de fluorescencia

I_0 : intensidad radiante incidente en la muestra

I : intensidad radiante transmitida por la muestra

A_f : rendimiento cuántico o eficiencia cuántica

El rendimiento cuántico de un proceso fluorescente es simplemente la razón entre el número de moléculas que producen fluorescencia y el número total de moléculas excitadas. Es evidente que el rendimiento cuántico fluorescente de un compuesto estará determinado por las velocidades relativas de los procesos mediante los cuales se desactiva el estado singlete excitado inferior y que se citan a continuación:

k_f : proceso de fluorescencia

k_i : cruzamiento entre sistemas

k_{ec} : conversión externa

k_{ic} : conversión interna

k_{pd} : predisociación

k_d : disociación

Estas relaciones se pueden expresar por la ecuación:

$$\Phi_f = \frac{\text{fotones emitidos como fluorescencia}}{\text{fotones emitidos}} = \frac{k_f}{k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d} \quad (2)$$

esta expresión, permite una interpretación cualitativa de los factores ambientales que influyen en la intensidad de la fluorescencia. Sin duda, aquellas variables que conducen a valores altos de k_f y bajos valores de las demás, aumentan la intensidad de fluorescencia. La magnitud de k_f , la constante de velocidad de predisociación k_{pd} y la constante de velocidad de disociación k_d , dependen principalmente de la estructura química; el resto de las constantes están fuertemente influidas por el ambiente y en menor grado por la estructura.

Aplicándole a la ecuación [1] la ley de Beer se obtiene:

$$I_f = \Phi_f I_0 (1 - e^{-\epsilon b c}) \quad (3)$$

y desarrollando la ecuación (3) en forma de serie de potencias, se llega a

$$I_f = \Phi_f I_0 \epsilon b c \left[1 - \frac{\epsilon b c}{2!} + \frac{(\epsilon b c)^2}{3!} - \dots + \frac{(\epsilon b c)^n}{(n+1)!} \right] \quad (4)$$

si $\epsilon b c$ es pequeño, solamente el primer término de la serie es significativo y la ecuación (4) se puede escribir como:

$$I_f = \Phi_f I_0 \epsilon b c \quad (5)$$

que tiene un error de solo 2.5% si $\epsilon b c$ es tan grande como 0.05. La ecuación (5) pues, establece una relación lineal entre la intensidad fluorescente y la concentración, siempre y cuando $\epsilon b c$ sea pequeña (esto es, cuando las concentraciones sean bajas). A concentraciones más elevadas la relación se hace no lineal, y a concentraciones todavía mayores, cuando toda la radiación es absorbida por la muestra y nada se transmite ($I = 0$), el límite es:

$$I_f = \Phi_f I_0 \quad (6)$$

y se vuelve independiente de la concentración.

Como en la medida de la intensidad de fluorescencia la fuente puede cambiar con el tiempo, las señales de fluorescencia no se miden como parámetros absolutos, sino que se expresan en términos de fluorescencia relativa. Todas las mediciones se hacen respecto a estándares de referencia de concentración conocida. Asimismo, todas las medidas de las lecturas deben corregirse por la presencia de una fluorescencia de fondo.

1.1.3. Condiciones instrumentales.

Los intervalos considerados para el registro de los espectros correspondientes en cualquiera de la técnicas fluorimétricas empleadas han sido entre 200 nm y 350 nm para espectros de excitación y desde 370 nm a 500 nm para espectros de emisión, realizando siempre en las mismas condiciones su correspondiente blanco.

La velocidad de barrido se elige a través de la opción que presenta el programa FL Data Manager del espectrofluorímetro LS-50 Perkin-Elmer de modo que no afecte a la señal de fluorescencia. El programa presenta velocidades de barrido comprendidas entre los límites de 10 y 1500 nm/minuto.

Los espectros así obtenidos, se someten a un proceso de suavizado, que tiene por objeto la minimización del ruido aleatorio que aparece al medir una señal mediante un instrumento y por consiguiente, aumentar la relación señal/ruido (S/N). El suavizado no se fundamenta en la identificación y eliminación del ruido, sino que éste se reduce aplicando algún tipo de promedio a la señal a intervalos regulares seleccionados de puntos (ventanas). Para el suavizado, hemos utilizado el programa FL Data Manager suministrado por Perkin-Elmer para controlar el espectrofluorímetro LS-50. Este programa aplica el método de filtrado de datos basado en el procedimiento de mínimos cuadrados simplificado de Savitzky-Golay [340]. En el proceso de filtrado se hace una convolución de la serie de datos con una función de filtrado consistente en una serie de coeficientes proporcionales. Cada punto de la serie de datos filtrados es una combinación lineal de un grupo de puntos adyacentes de la serie de datos sin filtrar, multiplicado cada uno por un coeficiente proporcional. Se pueden emplear factores comprendidos entre 5 y 149 puntos que ajustan cada punto a un polinomio cuadrático o cúbico a través de sucesivas ventanas de datos que se utilizan para determinar el punto central. A medida que aumentamos el factor de filtrado, el proceso de suavizado es más efectivo a costa de perder resolución.

Por último, también como condición instrumental habrá que seleccionar los valores óptimos para las correspondientes rendijas de excitación y emisión de ambos monocromadores del fluorímetro, que pueden variar respectivamente entre (2.5 nm - 15 nm) y (2.5 nm - 20 nm) con intervalos de 0.1 nm.

1.1.4. Procedimiento operatorio.

Para la aplicación de la metodología espectrofluorimétrica en disolución, la forma de operar será la siguiente:

* En matraces aforados de 100 ml, se introduce un volumen preciso requerido de disolución de los analitos, procedente de una disolución patrón (o de muestra a analizar).

* Se añade, a continuación el volumen de disolución tampón seleccionado para obtener la máxima señal.

* Finalmente, se enrasan con agua desionizada.

* La cubeta de medida se introduce en el compartimento del fluorímetro y se registra el espectro correspondiente en las condiciones instrumentales establecidas.

Para cada punto de la recta de calibración y cada disolución problema, se opera de la misma forma. Se prepara un blanco en cada caso.

I.2. Separación de constituyentes por cambio iónico.

La realización de esta separación se reservará para la resolución de muestras, donde la determinación de una especie, no sea factible debido a la presencia de otra que cause gran interferencia, de manera que con el empleo de esta técnica separativa, se pueda llevar a cabo la determinación con las técnicas fluorimétricas de trabajo.

I.2.1. Soportes sólidos ensayados.

Los soportes sólidos ensayados han sido cambiadores iónicos, tipo Sephadex y Dowex.

- **Resina Sephadex.** La empleada para el ensayo es del tipo QAE-A-25, en ciclo cloruro, con una capacidad ($3.0 \pm 0.4 \text{ meqAg}^{-1}$), es un cambiador aniónico fuerte. Esta es una sustancia natural o sintética, portadora de grupos iónicos fijos, capaz de intercambiar contraiones ligados a ella por cantidades equivalentes de otros iones en disolución.
Su estructura consiste en una matriz insoluble formada por cadenas dextrano entrecruzadas mediante epiclrorhidrina, que tiene unidos mediante enlace éter, ciertos grupos cargados, dietil-(2-hidroxi-propil) aminoetil, que están asociados a contraiones móviles (Cl⁻).
Su carácter hidrofílico radica en el gran número de grupos hidroxilo que posee en su estructura, razón por la cual se produce el hinchamiento de este tipo de geles en medio acuoso y en disolución de electrólitos.
Se encuentran disponibles en tres grados de porosidad diferentes que corresponden a las denominaciones 15, 25 y 50. Empleamos una porosidad intermedia (25).
- **Resina Dowex.** La empleada corresponde al tipo Dowex (1X8) 200-400, también en ciclo cloruro, con capacidad (3.5 meqAg^{-1}) y carácter fuertemente básico, con un entrecruzamiento del 8%.

Son materiales porosos y poseen grupos hidrófilos, por lo que son afectados por las características del medio de reacción (pH, constante dieléctrica, etc) y al ponerlos en suspensión en agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, se hinchan y se convierten en *geles*.

El grado de entrecruzamiento (relacionado directamente con el porcentaje de DVB) determina el tamaño de los microporos de la matriz, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contraiones en la resina. Esta última determina, a su vez, la velocidad del proceso de cambio iónico.

1.2.2. Procedimiento operatorio.

En todos los casos donde la metodología exija la separación previa por intercambio iónico, la forma de operar es la siguiente:

* En matraces aforados de 100 ml de volumen se introducen volúmenes precisos de analito a determinar, procedente de una disolución patrón o de muestra a analizar.

* Se añaden en estos matraces, el volumen seleccionado de disolución reguladora para mantener el pH óptimo de trabajo y se enrasa con agua desionizada.

* Por una minicolumna de resina Dowex (1x8) de 5 cm de altura y 5 mm de diámetro, previamente humedecida con agua desionizada se pasa la disolución patrón o muestra problema a separar (unos 15 o 18 ml). Se deja salir por la columna un volumen inicial de disolución de 10 ml y la medida se realiza sobre los 5 ml siguientes.

* La cubeta de medida de 1 cm de espesor, se introduce en el compartimento de cubetas y se registra el espectro según las condiciones instrumentales.

Se prepara una disolución del blanco que se trata análogamente.

II. METODOLOGÍA DEL TRATAMIENTO DE DATOS.

Dado que los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos, es necesario, para obtener la cantidad de analito presente, realizar la comparación de la medida física con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos proceso de calibración.

Es por ello que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y solo podremos obtener buenos los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

Etapas de calibración, es la primera y en ella se establecen las características del método con objeto de encontrar el modelo que relaciona la variable dependiente, que es la intensidad de fluorescencia, con la variable independiente, que es la concentración, $IRF = f(\text{concentración})$.

En los métodos experimentales, la función de calibración se establece ajustando dicho modelo matemático a un conjunto de datos obtenidos todos ellos en idénticas condiciones experimentales.

Etapas de predicción, es la segunda y consiste en obtener la variable independiente de una o más muestras problema, esto es, su concentración. El valor de la variable dependiente, medida en la muestra patrón, permite predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

Dos son los modelos funcionales matemáticos que se han empleado en la presente Memoria para establecer el calibrado analítico:

- 1.- Modelos de regresión univariante.
- 2.- Modelos de regresión multivariante.

Ambos son modelos lineales, lo que implica la existencia de una relación lineal entre la variable independiente, concentración y la variable dependiente, señal analítica.

La principal diferencia entre ellos radica en el número de variables utilizadas a la hora de caracterizar el comportamiento del sistema analítico en estudio.

II.1. Métodos univariantes.

Los modelos de regresión univariante, constituyen en el campo de la Química Analítica, los métodos más ampliamente usados para la realización de la calibración analítica.

En los modelos univariantes, sólo existe una variable independiente, **concentración**, que se relaciona con la respuesta, **señal instrumental**, mediante una relación lineal, tal como ya ha sido comentado anteriormente.

La relación funcional que se establece entre ambas variables, se ajusta a un modelo del tipo:

$$Y = a + bX$$

donde **Y** es la variable dependiente, **X** la variable independiente, **a** y **b** son los parámetros desconocidos a estimar a partir de datos experimentales, para obtener el modelo funcional concreto.

Las hipótesis básicas que garantizan la validez de los resultados del análisis son:

1.- Que la relación existente entre la concentración o variable independiente y la señal analítica o respuesta sea lineal.

2.- Que la variable independiente no sea aleatoria. Es decir, que la concentración esté medida sin error o que su error sea despreciable frente al de la respuesta. En la práctica este problema se minimiza mediante la utilización de sustancias patrón.

3.- Que los errores en la señal analítica sigan distribuciones normales, independientes y de valor medio cero. Esto implica, que para cada concentración de analito la dispersión de las medidas de la señal analítica debe ser la misma y resulte además, independiente de dicha concentración. Así, se puede establecer una única desviación estándar, σ , como representativa de la dispersión de la señal analítica para todo el intervalo lineal de concentraciones del analito. A esta situación se le denomina homocedasticidad.

II.1.1. Estimación de los parámetros del modelo.

La estimación de los parámetros **a** y **b** del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función de calibración lineal.

Para la estimación de los parámetros **a** y **b**, se parte de un conjunto de n pares de datos experimentales correspondientes a concentraciones y señales analíticas obtenidas y se les aplica el método de mínimos cuadrados.

Suponiendo que se cumple la hipótesis de homocedasticidad, el método de mínimos cuadrados proporciona las estimaciones de los parámetros **a** y **b**. Esto es de gran interés porque estos parámetros a su vez describen la calidad de un proceso analítico en términos de precisión y exactitud.

II.1.2. Validación del modelo lineal.

Una vez elegido el modelo de regresión más adecuado y determinado sus parámetros mediante los datos experimentales, se procede a su validación.

Para ello, los aspectos a considerar son:

1.- La comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas de partida, es decir la existencia de homocedasticidad. Se realiza y comprueba, según proponen Boqué y Rius [341].

2.- La comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales. Para esto se pueden elegir dos criterios, por una parte, la evaluación del fallo de ajuste de linealidad, y por otra, el estudio de significación tanto de la ordenada en el origen (a) como de la pendiente (b).

II.1.2.1. Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.

La evaluación del cumplimiento de homocedasticidad en los datos, se comprueba haciendo uso del análisis de residuos, que aunque no es un método riguroso totalmente, da información sobre su existencia en los datos experimentales.

Para ello, son habituales las representaciones gráficas de los residuos frente a las respuestas calculadas por el modelo o frente a la variable independiente, concentración.

De la observación de estas gráficas puede evaluarse el cumplimiento de la homocedasticidad de los datos si:

- es igual el número de residuos positivos y negativos encontrados.
- hay aleatoriedad en la distribución.
- se obtienen valores numéricos similares entre los residuales.

mediante estos gráficos pueden detectarse también la presencia de datos anómalos.

II.1.2.2. Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales.

Para llevarlo a cabo se han utilizado la evaluación del fallo de ajuste de los datos de homocedasticidad al modelo, así como el estudio de la significación de la pendiente y de la ordenada en el origen dado que el coeficiente r no se puede considerar como un test estadístico fiable [342].

A.- Evaluación del fallo de ajuste para datos homocedásticos.

El test utilizado para la determinación del fallo de ajuste se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales utilizadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de cada una de las parejas de datos.

Este test compara el valor del estadístico F , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste, MS_{FA} y el error puro, MS_{PE} , con los valores tabulados, para un determinado nivel de significación, con $k-2$ y $n-k$ grados de libertad, siendo k el número de patrones de calibración diferentes y n el número total de observaciones. El nivel de significación establecido, en la presente Memoria, es del 5%.

El estadístico calculado:

$$F_{cal} = MS_{FA} / MS_{PE}$$

se compara con el valor de F tabulado, de modo que el modelo es correcto si:

$$F_{cal} < F_{tab}$$

se concluye por tanto, que no hay diferencia significativa (se acepta la hipótesis nula); en caso contrario hay diferencia significativa y no se acepta dicha hipótesis.

B.- Significación de la pendiente y de la ordenada en el origen.

Para evaluar la significación de los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen se aplica el test de hipótesis nula. El estadístico que se emplea es la t de Student, utilizada a un nivel de confianza del 95 % para comprobar si la pendiente y la ordenada en el origen son o no significativamente diferentes de cero. Para realizar este estudio de significación de pendiente y ordenada la calibración del

método se puede llevar a cabo con o sin réplicas de la recta de calibrado, a continuación se citan ambos casos.

b₁) Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado (con réplicas).

Se realiza la comprobación de la igualdad de las funciones obtenidas para dos calibrados distintos con objeto de validar los procesos analíticos.

Para ello se selecciona el test de evaluación de la igualdad de dos pendientes que utiliza la **t** de Student. Es un test de hipótesis nula que considera:

- * Las dos pendientes son iguales $b_1 = b_2$ (H_0)
- * Las dos pendientes son distintas $b_1 \neq b_2$ (H_1)

donde el estadístico **t** a calcular es

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}} \quad (7)$$

Siendo $s_{b_1}^2$ y $s_{b_2}^2$, las respectivas varianzas de las pendientes de cada recta de calibrado.

El valor de **t** calculada se compara con el valor de **t** tabulado con un nivel de significación $\alpha = 0.05$, siendo el número de grados de libertad $n_1 + n_2 - 4$, donde n_1 , y n_2 son el número de patrones empleados en la construcción de las rectas que se comparan. De tal forma que, si se cumple:

$$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$$

se acepta la hipótesis nula, las dos pendientes son iguales, implicando la homogeneidad de pendientes para un nivel de significación del 5%. En caso contrario serán distintas.

b₂) Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado (sin réplicas).

Con objeto de comprobar la igualdad de pendientes entre las rectas de calibrado, se calcula el estadístico s_{sly} , desviación estándar de los residuos y a continuación se estima el valor de s_b , que permite determinar los límites de confianza para la pendiente a partir de la expresión $b \pm t s_b$, donde el valor de **t** de Student, se toma para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad[342].

II.1.3. Parámetros de calidad del modelo.

II.1.3.1. Límites de detección y cuantificación.

El límite de detección de un procedimiento analítico se puede definir como la menor concentración C_L o cantidad q que puede ser detectada en una disolución problema con una seguridad razonable [343].

El concepto de límite de detección, basado en un tratamiento estadístico del análisis del blanco o disolución de referencia, fue adoptado por la I.U.P.A.C. en 1975 y por el A.C.S. (*Subcommittee of Environmental Analytical Chemistry*) en 1980.

De acuerdo con ambos organismos, a este límite de detección expresado como C_L le corresponde una señal analítica X_L definida por:

$$X_L = X_B + K \cdot \sigma_B \quad (8)$$

siendo X_B el valor medio de la respuesta del blanco; σ_B es la desviación estándar de la señal del blanco y K es un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración C_L está relacionada con el valor de X_L por la expresión:

$$C_L = \frac{X_L - X_B}{m} \quad (9)$$

donde m es la sensibilidad analítica (pendiente de la recta de calibrado).

Si se sustituye la expresión (8) en la (9), obtenemos:

Este valor de C_L será un fiel reflejo del límite de detección cuando m se encuentre bien

$$C_L = \frac{K \cdot \sigma_B}{m} \quad (10)$$

definida y el valor de la ordenada en el origen de la curva de calibrado sea esencialmente cero.

El uso de $K=3$ en la ecuación (10) permite un nivel de confianza de 99.86%, y así se asegura que una señal analítica $X_L \sim X_B + 3\sigma_B$ sea debida a la presencia de analito en una disolución problema y no a fluctuaciones del blanco.

Finalmente, es interesante indicar el concepto de límite de cuantificación o concentración de analito que corresponde a una señal analítica, X_Q , definida por:

$$X_Q = X_B + K \cdot \sigma_B \quad (11)$$

recomendándose un valor de $K=10$.

La concentración C_Q que corresponde al límite de detección vendrá dada por:

$$C_Q = \frac{10 \cdot \sigma_B}{m} \quad (12)$$

En consecuencia, mediante la ecuación (10) se puede calcular los límites de detección y cuantificación empleando los valores recomendados de 3 y 10, respectivamente.

II.1.3.2. Precisión del método.

Para valorar la precisión de los métodos univariantes propuestos en la presente Memoria se ha utilizado el estudio de la reproducibilidad de la señal analítica. Así pues, la precisión vendrá estimada por el valor de la desviación standard relativa (D.E.R.) de la señal analítica, intensidad de fluorescencia.

Para el cálculo de esta D.E.R., se aplica el procedimiento analítico a 10 muestras patrón idénticas y de concentración correspondiente a un punto central de la función de calibrado. Se calcula la desviación standard de las intensidades de fluorescencia encontradas, σ_{n-1} , y el valor medio \bar{x} . La D.E.R. a de la media expresada en % será:

$$D.E.R. = [\sigma_{n-1} / \bar{x}] \cdot 100 \quad (13)$$

asimismo, también se calculan los siguientes parámetros estadísticos: el valor medio de IRF, la desviación standard de la media (S_m) y el error relativo sobre el valor medio (E_r), teniendo en cuenta que para el número de muestras empleadas ($n=10$) y el nivel de significación elegido $\alpha = 0.05$, el valor del estadístico t presenta un valor de 2.262.

II.1.3.3. Sensibilidad del método.

La sensibilidad de un método analítico, se puede definir de dos formas **sensibilidad de calibrado** (recomendada por la I.U.P.A.C. (1978), que da la relación entre la señal instrumental y la concentración y que depende de las condiciones utilizadas; y la **sensibilidad analítica** que indica la mínima variación de concentración que el método analítico es capaz de discernir. En esta Memoria para

los métodos propuesto se va a emplear la **sensibilidad de calibrado**.

II.2. Métodos multivariantes.

La introducción de métodos multivariantes en el campo de la Química Analítica, surge como consecuencia de la limitada información de los métodos univariantes y ante la incapacidad de la resolución de mezclas, cuando al valor de la señal analítica contribuye más de un analito. Estos métodos multivariantes [344], presentan mediante un tratamiento global los distintos datos en función de dos o más variables controladas, ofreciendo la ventaja [344,345] de determinar los constituyentes de una forma simultánea, obteniéndose una información cuantitativa y selectiva a partir de datos pocos selectivos, de tal forma que disminuyen los tiempos de análisis.

Se han propuesto distintos métodos de calibración multivariante, que se diferencian en los cálculos realizados en la etapa de calibración y en los requisitos del modelo. Los métodos de calibración multivariante más utilizados en la actualidad son:

- * **Análisis multicomponente clásico (CLS).**
- * **Regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS).**
- * **Regresión por componentes principales (PCR).**
- * **Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).**

En todos ellos se realizan una serie de medidas sobre un conjunto de patrones, para formar lo que se conoce como matriz de calibración. Los patrones empleados (en concentraciones y composición perfectamente conocidos) deben de cubrir el rango de concentraciones esperadas para las muestras que se vayan a analizar como problema y se medirán bajo las mismas condiciones. De cada patrón se registra el espectro de emisión y una vez establecida la matriz de calibración, ésta se empleará para la predicción de las concentraciones en muestras problema. En cualquier caso partimos de dos conjuntos de datos:

* El conjunto de respuestas instrumentales (intensidad de fluorescencia relativa) correspondientes a **p** canales (longitudes de onda) de los **N** patrones sobre los que se confecciona la matriz de calibración. Con este conjunto se forma la matriz **A (Nxp)**.

* El conjunto de datos formados por las concentraciones conocidas de los **R** analitos en la **N** disoluciones patrón, con este conjunto se obtiene la matriz **C(NxR)**.

La matriz de datos **A** se puede descomponer en el producto de otras dos matrices **A=(C x S)**, donde **C** es la matriz de concentración de los componentes individuales y **S** es la matriz de los espectros puros de los componentes de las muestras patrón.

En todos los métodos de calibración multivariante se busca la relación existente entre las dos matrices **C** y **S**, para poder utilizarla en la predicción de las concentraciones de analito en las disoluciones problema, de las que se han obtenido su respuesta analítica o espectro. Por lo tanto, en este tipo de calibración también se establecen las etapas de calibración y predicción.

II.2.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales.

El método de calibración multivariante seleccionado en la presente Memoria ha sido el de regresión por mínimos cuadrados parciales o PLS, dado que este método es el que presenta mayor robustez [346,347], entendiéndose como tal, el hecho de que los parámetros que definen o caracterizan al sistema no se ven fuertemente modificados por el número de muestras utilizadas en la etapa de calibración. Además evita a su vez, todos los problemas de conversiones matriciales que presentan CLS e ILS derivados del problema de colinealidad [348], esto es de información repetida.

Este método fue introducido por H. Wold [349] en 1975, teniendo una gran aceptación en el campo del análisis químico. Se ha comprobado [350,351] que los métodos multivariantes están limitados por problemas de interacciones entre los componentes y fuertes solapamientos espectrales, comparando los distintos métodos multivariantes entre sí, se llega a la conclusión de que los métodos basados en PLS son los más adecuados para resolver estos problemas.

El método PLS, se caracteriza por calcular los denominados factores o componentes principales a partir de las matrices **A** y **C**. Estos componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales del sistema en estudio, que son diferentes entre sí y tienen distinto porcentaje de varianza de manera que, con cada factor, se obtiene una varianza inferior a la obtenida con el anterior.

El problema fundamental en PLS es conocer el número de factores que deben incluirse en el modelo. Este número debe ser inferior al de variables originales, ya que se utiliza para modelar el sistema en estudio, excluyendo del modelo los factores que contienen información irrelevante, como puede ser la debida al ruido de fondo o a errores experimentales.

Si se elige un número pequeño de factores para modelar los datos, esto dará lugar a una predicción pobre del modelo, por otra parte, si calculamos más factores de los debidos estos se van agrupando, según el grado de importancia que presenta el modelo, y puede ocurrir que lleguen incluso a modelar el propio ruido de fondo, con lo cual el error de predicción comienza a aumentar rápidamente.

Es claro, por tanto, que la elección del número óptimo de factores es decisivo en este tipo de calibración.

II.2.1.1. Selección del número óptimo de factores.

El camino seguido para seleccionar el número óptimo de factores es calcular la suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados, valor que llamamos PRESS y lo obtendremos mediante la expresión:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (14)$$

donde:

n: es el número total de muestras empleadas en la etapa de calibración.

m: es el número total de analitos.

\hat{c}_i : es la concentración calculada para el compuesto *i* por el modelo.

c_i : es la concentración real.

Para obtener el valor de PRESS, el procedimiento es como sigue: dejando fuera una de las muestras empleadas en la calibración, las restantes se usan para llevar a cabo el proceso de descomposición espectral por un factor y se calcula la matriz de calibración por regresión. Esta matriz de calibración se emplea para calcular la concentración de la muestra que se ha dejado fuera. El proceso se repite para cada muestra patrón y de esta forma se va calculando el valor de PRESS que nos proporciona información sobre la idoneidad de la matriz de calibración para predecir la concentración de los analitos en función el número de factores considerados. Cuantos más factores sean tenidos en cuenta menor será el error en la predicción de los resultados.

Ahora bien, aunque para disminuir el error hay que aumentar el número de factores, este número no puede ser ilimitado ya que a partir de un valor en adelante el modelo incorpora factores de ruido que da lugar a un sobreajuste en donde se considera al ruido como un componente a ajustar. Para evitar el sobreajuste se debe tomar el número de factores que den lugar al PRESS mínimo, sin embargo aún en este valor se puede producir sobreajuste.

La solución para este problema fue sugerida por Haaland y Thomas [352] y consiste en comparar los valores de PRESS, obtenidos para cada factor, con el valor de PRESS mínimo encontrado. Para estimar la significación del PRESS mayor que el mínimo tenemos la F estadística que se calcula como la relación entre el valor más pequeño del PRESS (el mínimo) con todos los valores de PRESS. F es una función del número total de muestras usadas en la serie de calibración. Esto es algo arbitrario, por esta razón Haaland empíricamente ha determinado que el número verdadero de factores deberá ser el primer valor de PRESS donde la relación de probabilidad F es menor que 0.75, lo que nos dice el número óptimo de factores que debería ser usado para construir la matriz de calibración.

Dentro de los métodos PLS hay dos planteamientos distintos en cuanto a los algoritmos que hay que aplicar para calcular el valor del PRESS. Cada uno de estos dos algoritmos da lugar a una modalidad diferente de PLS a los que se denomina PLS-1 y PLS-2. El método PLS-1 asigna un factor para cada uno de los componentes de la muestra y por tanto calcula un valor de PRESS para cada uno de los componentes, mientras que PLS-2, el método calcula un solo valor para todos los componentes y calcula el PRESS una sola vez.

La interpretación de la información contenida en cada uno de los factores o componentes principales seleccionados en el modelo, es un campo actualmente en investigación y se realiza mediante análisis de componentes principales. Para ello se seleccionan aquellos factores que explican un gran porcentaje de la varianza sin saber realmente que información contienen, aunque esto no determina que esta varianza esté asociada a una información importante, incluso se podría deber al ruido de fondo. Recientemente se han propuesto métodos alternativos para la selección más apropiada de los componentes principales o factores como pueden ser los métodos basados en los algoritmos genéticos [353].

II.2.1.2 Calidad en el ajuste del modelo.

Entre los diferentes parámetros estadísticos posibles para evaluar el grado de ajuste entre los valores calculados y los predichos por el modelo, podemos citar:

* **Coefficiente de correlación o detección:** es un estimador del ajuste de los datos a la regresión lineal y viene dado por la expresión:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - \bar{c}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c}_i)^2} \quad (15)$$

donde:

- c_i : es la concentración teórica del analito en la muestra.
- \hat{c}_i : es la concentración predicha por el modelo.
- \bar{c}_i : es el valor medio de las concentraciones teóricas.
- n : es el número de muestras de patrón empleadas.

* **Desviación estándar media residual (DEMR):** este parámetro mide el error medio cometido en el análisis y viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{DEMR} = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2 \right]^{0.5} \quad (16)$$

donde c_i y \hat{c}_i tienen el mismo significado anterior.

* **Error relativo de predicción (ERP):** este parámetro mide la capacidad de predicción de cada método para cada componente y viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{ERP (\%)} = \frac{100}{c} \left[\frac{1}{n} (\hat{c}_i - c_i)^2 \right]^{0.5} \quad (17)$$

II.2.1.3 Detección de muestras desechables.

La detección y eliminación de muestras erróneas constituye una etapa importante en el análisis químico por multicalibración. Hay varias formas de hacerlo basadas todas ellas en métodos matemáticos complejos tales como análisis de cluster y análisis de residuos.

* **Análisis de cluster:** la representación de las muestras de la matriz de calibración, en el caso en que todas sean similares en composición y valor, se agrupan alrededor de un valor medio denominado "cluster". La forma de evaluar si la muestra es desechable o no es midiendo la distancia estadística entre la muestra considerada sospechosa y el cluster, esta distancia se llama "Distancia de Mahalanobis"

* **Análisis de residuos:** después de ajustar el espectro siempre queda una información residual y el valor de este residuo es un indicador de la parte de información que no ha sido modelada. Si el residuo que se obtiene es excepcionalmente elevado, comparado con el resto de los residuos obtenidos para las distintas muestras, resultará sospechoso y debemos comprobar si hay que rechazarlo.

* **Cálculo del PRESS:** se realiza de acuerdo al proceso indicado en el apartado II.2.1.1 de este capítulo, a partir de él, el cálculo de la diferencia entre la concentración puesta y obtenida para cada muestra, mediante la matriz de calibración hará pensar si se trata de una muestra errónea y por tanto desechable a la hora de obtener la matriz de calibración.

III. VALIDACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO.

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, mediante su adecuación a uno determinados parámetros de calidad que pueden ser de tipo estadístico (exactitud y precisión) y de tipo económico (rapidez de análisis, costo, mantenimiento, etc..). Por lo general unos y otros son antagónicos por lo que en la práctica se llegará a una situación de compromiso entre ellos. Para evaluar estos parámetros de calidad se deben contrastar nuestros resultados con los ofrecidos por diversos procedimientos de mayor o menor validez: materiales de referencia, ejercicios interlaboratorios, métodos de referencia, aplicación de protocolos estadísticos de diverso tipo (adición de patrón en ausencia o presencia de efecto matriz) y preparaciones internas (sustancias de ensayo de concentración conocida).

En nuestro caso al no disponer de un material de referencia certificado, recurriremos bien a la determinación de la exactitud comparando los resultados obtenidos mediante un método de referencia o utilizando un protocolo alternativo de validación, como es el método de adición de patrón.

III.1. Comparación de la media de dos conjuntos de resultados.

En el caso de utilizar un método de referencia, tendremos que comparar los resultados obtenidos por nuestro método con los obtenidos por el método de referencia con lo cual la verificación de la exactitud se lleva a cabo comparando estadísticamente las medias aritméticas de estos dos conjuntos de datos.

El primer paso consiste en comparar las varianzas de los dos conjuntos de datos mediante el test de la **F** de Fisher:

$$F_{\text{cal}} = s_M^2 / s_m^2 \quad (18)$$

donde s_M^2 y s_m^2 son las varianzas de ambos conjuntos de datos colocando siempre en el numerador la varianza del mayor conjunto de datos y en el denominador el del menor. Dicho valor se compara con el valor de F_{tab} , para un nivel de significación, con n-1 grados de libertad correspondiente a cada método, referencia y a contrastar. Se nos pueden presentar dos casos:

* $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$: se concluye que hay una diferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos, en cuyo caso se comparan las medias de los dos conjuntos de datos aplicando el test de la t de Student.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|C_{\text{Ref}} - C_r|}{\sqrt{\left(\frac{S_{\text{Ref}}^2}{n_{\text{Ref}}}\right) + \left(\frac{S_r^2}{n_r}\right)}} \quad (19)$$

El valor de la t_{cal} se compara con el de t_{tab} con un grado de confianza de $\alpha = 0.05$ y unos grados de libertad aproximados que se calculan mediante el test de Welch:

$$g.l = \frac{(s_r^2/n_r + s_{\text{Ref}}^2/n_{\text{Ref}})^2}{\frac{(s_r^2/n_r)^2}{n_r - 1} + \frac{(s_{\text{Ref}}^2/n_{\text{Ref}})^2}{n_{\text{Ref}} - 1}} \quad (20)$$

donde r, es indicativo del método a contrastar y Ref del método de referencia.

* $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$: en este caso no hay una diferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos. El paso siguiente es el cálculo de la varianza promedio s_p^2 de las varianzas correspondientes a ambos conjuntos de datos:

$$s_p^2 = \frac{(n_{\text{Ref}} - 1) \cdot s_{\text{Ref}}^2 + (n_r - 1) \cdot s_r^2}{(n_{\text{Ref}} + n_r - 2)} \quad (21)$$

a continuación se calcula el valor de t_{cal} con la ecuación:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|C_{\text{Ref}} - C_r|}{\sqrt{s_p^2 (1/n_{\text{Ref}} + 1/n_r)}} \quad (22)$$

este valor se compara con un t_{tab} para un determinado grado de confianza $\alpha = 0.05$ y $(n_{\text{ref}} + n_r - 2)$ grados de libertad.

En ambas situaciones puede ocurrir que $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$, se acepta que no existen diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de datos, por lo tanto el método aplicado es exacto, o bien que $t_{\text{cal}} > t_{\text{tab}}$, ambas medias son significativamente distintas por lo que el método no es exacto.

III.2. Protocolos de validación para comprobar la exactitud por el método de adición de patrón.

El método de adición de patrón se emplea frecuentemente en Química Analítica para:

1.- La determinación de analitos en muestras en las que el efecto matriz lleva a resultados inexactos si se utiliza el calibrado con patrones.

2.- Detectar la presencia de analitos en una concentración inferior al límite de cuantificación del método pero superior a la sensibilidad analítica.

3.- Comprobar la exactitud de los resultados obtenidos cuando no se dispone de un método de referencia ya establecido.

Hay varias modalidades del método de adición de patrón:

- 1.- Variación continua de patrón a un volumen constante.
- 2.- Variación continua de patrón y muestra en un volumen total constante.
- 3.- Adición simple de un volumen variable de patrón y volumen total variable con variación continua de patrón.

La primera modalidad es la más seguida y consiste en adicionar en todos los matraces, volúmenes iguales de la disolución obtenida generalmente después de tratar la muestra y añadirle a todas menos a una cantidades crecientes y perfectamente conocidas del analito. Si representamos las señales así obtenidas frente a las concentraciones adicionadas y si no hay presencia de interferencias se obtiene una recta cuya extrapolación con la parte negativa del eje de las concentraciones corresponde a la concentración de analito en la muestra problema.

IV. MUESTRAS ANALIZADAS Y SU TRATAMIENTO.

A continuación, se exponen las muestras seleccionadas en esta Memoria, para realizar el análisis de los principios activos elegidos sobre las mismas convenientemente tratadas y demostrar la viabilidad de las metodologías de análisis propuestas.

IV.1. Muestras analizadas.

IV.1.1. Productos farmacéuticos.

Ácido salicílico, cafeína, codeína, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina y paracetamol son principios activos que se suelen encontrar en los medicamentos asociados o no, de manera que se ha determinado el contenido de los mismos en las preparaciones farmacéuticas siguientes:

1. **Analgilasa.** (comprimidos) (Lasa)
 - Paracetamol 500 mg
 - Cafeína 30 mg
 - Fosfato de codeína 10 mg
2. **Benadom.** (comprimidos) (Roche-Nicholas)
 - Clorhidrato de piridoxina 300 mg
3. **Codeisán.** (comprimidos) (Abelló)
 - Fosfato de codeína 1/2 H₂O 28.7 mg
4. **Conductasa.** (jarabe) (Bioresearch)
 - " -cetoglutarato de piridoxina 30.66 mg/ml
5. **Dolmen.** (comprimidos efervescentes) (Uriach-Biohorm)
 - Ácido acetil salicílico 500 mg
 - Fosfato de codeína 1/2 H₂O 10 mg
 - Acido ascórbico 250 mg
6. **Dolvirán.** (comprimidos) (Bayer)
 - Acido acetil salicílico 400 mg
 - Fosfato de codeína 1/2 H₂O 9.6 mg
 - Cafeína 50 mg

- 7. Fiorinal.** (cápsulas) (Sandoz-Pharma)
Paracetamol 300 mg
Acido acetil salicílico 200 mg
Cafeína anhidra 40 mg
Fosfato de codeína 14.69 mg
- 8. Nervobión.** (comprimidos) (Merck)
Nitrato de tiamina 100 mg
Clorhidrato de tiamina 100 mg
Cianocobalamina 1000fl
- 9. Neurovadur.** (cápsulas) (Belmac)
Clorhidrato de tiamina 250 mg
Clorhidrato de piridoxina 250 mg
Hidroxicobalamina acetato 2.5 mg
Ex. estearato y c.p.s.
- 10. Pazbronquial.** (jarabe) (Cinfa)
Fosfato de codeína 5 mg
Clorhidrato de efedrina 5 mg
Sulfoguayacolato potásico 100 mg
Benzoato sódico 83 mg
Citrato sódico 17 mg
Clorhidrato de piridoxina 3 mg
Mentol 1 mg
Tintura de Drosera 33 mg
Tintura de Lobelia 25 mg
Tintura de Grindelia 33 mg
Tintura de Orégano 10 mg
Ex.sacarosa 3.848 g
- 11. Perduretas de codeína.** (comprimidos) (Medea)
Fosfato de codeína 1/2H₂O 50 mg
Lactosa y otros
- 12. Rinomicine.** (comprimidos) (Fardi)
Paracetamol 150 mg
Maleato de clorfenamina 4 mg
Salicilamida 150 mg
Clorhidrato de fenilefrina 10 mg
Cafeína 30 mg
- 13. Serfoxide.** (comprimidos) (Morriith)
Fosfoserinato de piridoxina 300 mg

A partir de la composición podemos clasificarlos según sus fines terapéuticos, en complejos vitamínicos, Benadom, Conductasa, Nervobión, Neurovadur y Serfoxide; en analgésicos como Analgilasa y Rinomicine o con carácter analgésico y antitusígeno a la vez, Dolmen, Dolvirán, Fiorinal y solo antitusígeno Codeisán, Pazbronquial y Perduretas de codeína.

IV.1.2. Muestras sintéticas.

Las metodologías analíticas propuestas también han sido aplicadas en aplicación en muestras sintéticas que podemos distinguir entre: muestras sintéticas reales, fármacos semisintéticos y fármacos sintéticos, todos ellos han sido preparados con distintas relaciones en peso de cada uno de los componentes. La composición de los fármacos, sintetizados en el laboratorio se muestran en la Tabla I.1.

TABLA I.1 Fármacos sintéticos

Componente (mg)	Fármaco 1	Fármaco 2	Fármaco 3
Codeína	50	40	50
Cl.Piridoxina	10	5	5
Sacarina sódica	10	220	225
Sacarosa	220	285	280

IV.2. Tratamiento de las muestras.

Las muestras sólidas analizadas, fueron molidas finamente en mortero de vidrio y puestos en disolución en agua desionizada mediante distintas formas:

- * Sonicación durante un período de tiempo comprendido entre 15 y 30 minutos
- * Agitación magnética en medio ácido (H_2SO_4 0.1 N) durante varias horas.
- * Hidrólisis básica (NaOH 1N) en caliente con agitación magnética durante 45 minutos.

El excipiente insoluble se separó por filtración a través de un filtro Millipore de 0.45 : m, llevándose a un volumen final conocido. Aquellas muestras que se presentaban en forma de solución, no se les sometió a otro tratamiento, salvo en un caso que hubo que realizar un par de extracciones, la primera en fase orgánica (cloroformo) y la segunda en medio ácido (H_2SO_4 0.1 N) dado la complejidad de la muestra. Las disoluciones así preparadas, fueron diluidas adecuadamente para la aplicación del método analítico.

V. EXPERIMENTAL.

Se exponen a continuación todos los productos químicos, instrumentación y programas informáticos empleados para abordar el estudio de los componentes tal y como ha sido descrito en apartados anteriores.

V.1. Reactivos, disoluciones y soportes.

Reactivos.

- Acetonitrilo/Gradiente HPLC. Panreac.
- Ácido clorhídrico. Panreac, PA.
- Ácido ortofosfórico. Panreac, PA.
- Ácido salicílico. Fluka.
- Ácido sulfúrico. Panreac, PA.
- Codeína pura cristalizada. Abelló.
- Clorhidrato de piridoxina. FluKa.
- Cloruro sódico. Panreac, PA.
- Cloruro potásico. Panreac, PA.
- Fosfato dihidrógeno de potasio. Merck, PA.
- Fosfato dihidrógeno de sodio cristalizado. Panreac, PA.
- Hidróxido sódico. Merck, PA.
- Agua para HPLC. Resistividad 18.2 M Ω -cm
- Agua desionizada. Conductividad 0.2-2 : S cm^{-1}

Disoluciones.

- Disoluciones de ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina de concentración 1000 mg L^{-1} , preparadas disolviendo 100 mg de sustancia en 1000 mL de agua desionizada, manteniéndose estables durante una semana.
- Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de las anteriores por simple dilución con agua desionizada.
- Disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ pH=7, preparada a partir de 50 mL de KH_2PO_4 0.1 M (13.60 g en 1000 mL de agua desionizada) y 29.1 mL de NaOH 0.1 M (4 g en 1000 mL de agua desionizada) diluyendo con agua desionizada hasta 100 mL.
- Disolución de HCl 2 M.
- Disolución de NaOH 1 M.
- Disolución de H_2SO_4 0.1 N.
- Disolución de NaH_2PO_4 0.1 N.

Estabilidad de las disoluciones.

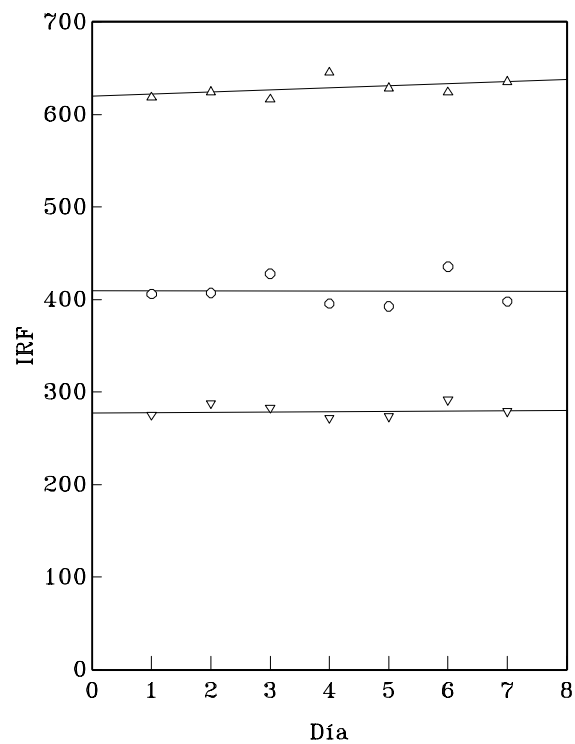
1. Estabilidad temporal de las disoluciones.

Para comprobar la estabilidad con el tiempo de las soluciones de trabajo de ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina, se prepararon sus disoluciones correspondientes en matraces de 100 mL, según el método operatorio, para que las concentraciones de cada analito fueran 1 mgA^{-1} de ácido salicílico, 5 mgA^{-1} de codeína y 2 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina en el volumen final. Se registraron los espectros de emisión periódicamente en las condiciones de trabajo (tabla III.3). Mientras tanto, las disoluciones se conservaron en frigorífico a 5°C .

La Tabla I.2 muestra los valores de las intensidades relativas con el tiempo y en la Figura I.1, se representa gráficamente. Concluyendo que las disoluciones una vez preparadas, permanecen inalterables al menos durante un período de siete días, conservadas a 5°C .

TABLA I.2 Estabilidad temporal de las disoluciones

Día	Ác. Salicílico IRF	Codeína IRF	Piridoxina IRF
1	620.0	274.1	406.0
2	626.0	286.2	407.1
3	618.0	281.4	428.0
4	647.0	270.5	395.6
5	630.2	272.1	392.8
6	625.6	290.1	435.6
7	637.0	277.7	398.0



△ Ácido Salicílico ▽ Codeína ○ Piridoxina

Fig.I.1 Estabilidad temporal de las disoluciones.

2. Estabilidad de las disoluciones mantenidas en el compartimento de medida.

Para realizar el estudio de la estabilidad de las disoluciones sometidas a la radiación continua del haz de luz de excitación durante un período de tiempo, se prepararon muestras de cada analito de la misma forma que en el apartado anterior. para que las concentraciones en el volumen final fueran 0.5 mgA^{-1} de ácido salicílico, 5 mgA^{-1} de codeína y 1 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina. Las medidas se realizaron de acuerdo con las condiciones de trabajo que se recogen en la Tabla I.3.

TABLA I.3 Condiciones espectrales

Parámetro	Ac. Salicílico	Codeína	Piridoxina
$\lambda_{\text{exc.}}$, nm	297	215	220
$\lambda_{\text{em.}}$, nm	405	350	395
Rendija (exc. - em.), nm	2.5-5	2.5-5	2.5-5
Tiempo, s	10800	10800	10800
Intervalo, s	300	300	300
Respuesta, s	5	5	5

Los tres componentes mantienen su señal de fluorescencia constante durante el período de tiempo que la muestra ha estado irradiada que ha sido de 180 minutos.

Soportes sólidos ensayados.

Los soportes sólidos empleados han sido geles de cambio iónico:

* Sephadex QAE-A-25

* Dowex (1x8) 200-400

V.2. Instrumentación y material de laboratorio.

Instrumentación.

- Agitador magnético con termostato Agimatic-E. Selecta, Ref. 243
- Agitador rotatorio de botellas. Agitaser.
- Balanza analítica Mettler AJ100.
- Baño de ultrasonidos Ultrasons (sin calefacción). Selecta
- Bomba de vacío de membrana MZ2C Vacumbrand.
- Cromatógrafo HPLC Hewlett-Packard, Mod. 1050, provisto de:
 - Bomba cuaternaria con gradiente.

- Columna Nucleosil C₁₈; 25 cm; 4.6 mm] interno; 5 : m (tamaño de partícula).
- Detector Diodo Array HEWLETT-PACKARD 1040 M.
- Desionizador de agua Sation 8000 P/30.
- Espectrómetro RMN Bruker avance DPX300, provisto de sonda inversa tipo QNP, N_{interno} 5 mm.
- Equipo de ósmosis inversa para la producción de agua ultrapura. Milli-Q plus Millipore.
- Espectrofotómetro UV-V GBC 911 A, controlado por microprocesador, de GBC Scientific Equipament PI y Ltd.
- Espectrofluorímetro PerKin-Elmer LS-50 provisto de:
 - Lámpara de descarga modulada de Xenón de 20 kW.
 - Monocromadores Monk-Gillieson con intervalo de longitud de onda de 200 nm a 800 nm en el orden cero para excitación y de 200 nm a 900 nm en el orden cero para emisión.
 - Patrón de calibración. Agua certificada, Perkin-Elmer.
 - Fotomultiplicador Gated.
 - Fluorescence Data Manager Software, versión 2.50.
- Medidor de punto de fusión con termómetro digital. Gallenkamp MFB 595.
- pH-metro digital Crison mod. microph 2000.
- Termostato P. Selecta. Frigiterm 6000 382.

Material de laboratorio.

- Cubetas de fluorescencia (tipo 3) de 1 cm de paso de luz, Starna LTD.
- Cubetas de cuarzo para UV-V de 1 cm de paso de luz, Starna
- Embudos filtrantes con placa de vidrio sinterizado.
- Filtros de membrana de disco MF-Millipore.
- Material volumétrico y de uso general.
- Matraces aforados de diferentes volúmenes, (Clase A).
- Minicolumna de vidrio de 10 cm de altura y 5 mm de diámetro exterior.
- Pipetas aforadas y graduadas de distintos volúmenes contrastados, (Clase A).

V.3. Ordenadores y programas informáticos.

Ordenadores

- Ordenador personal 386 MITAC con procesador automático
- Impresora EPSON EPL 2500
- Scanner Scanjet 5P Hewlett-Packard

Programas informáticos

- Corel Draw 5.0; Corel Photo-Paint 5.0
- Chems sketch (ACD).

- Fluorescence Data Manager (FLDM), v.2.50, (Pelkin-Elmer).

Este programa ha permitido la recogida y tratamiento de los datos suministrados por el espectrofluorímetro. La comunicación con este, se ha establecido mediante una interface R-232C, vía puerto serie, permitiendo el registro de cualquier tipo de espectro, sea de fluorescencia o de fosforescencia. Los espectros fueron almacenados en discos flexibles de 3½ pulgadas para su posterior tratamiento.


- GBC Scan Master V1.62
- Grams/386, v.2.02, (Galactic Industries Corporation 1993) y Grams/32, nivel 1, v.4.0 y PLS plus/IQ.

Mediante estos programas se ha realizado el estudio y tratamiento de los datos analíticos correspondientes a los métodos de calibración multivariante.

- Grapher, v.175, (Golden Software Inc. 1988).
- Harvard Graphics, v.3.0, (Software Publishing Corporation 1991).
- HP-7999-4A-Chemstation.
- Statgraphics, v.6.0, (STSC Inc., Statistical Graphics Corporation 1993).

Mediante este programa se ha realizado el estudio y tratamiento de los datos analíticos correspondientes a los métodos de calibración univariante.

- Scanner HP Scanjet 5P, v.3.0
- Surfer v.4.13, (Golden Software Inc. 1989).
- Wordperfect, v.6.1
- XWIN-NMR 1.2



II. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO PARA LA RESOLUCIÓN DEL SISTEMA ÁC. SALICÍLICO, CODEÍNA, CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA, TIAMINA Y PARACETAMOL



I. INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo nos proponemos como objetivo la puesta a punto de un método por cromatografía líquida con detección espectrofotométrica para la separación y determinación de ácido salicílico, cafeína, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, codeína y paracetamol.

Se ha realizado dicho estudio puesto que en la bibliografía consultada, que se cita a continuación, no se ha encontrado ningún procedimiento de estas características analíticas para tal mezcla.

Dicho método se utilizará posteriormente como método de referencia para la validación de los métodos espectrofluorimétricos estudiados en esta Memoria.

Antes de poner el método a punto, se ha realizado una revisión bibliográfica para comprobar la ausencia en la actualidad de un método que resuelva nuestro sistema en estudio mediante Cromatografía líquida de alta resolución.

Para determinar ácido acetil-salicílico o ácido salicílico, existen los métodos propuestos en los trabajos siguientes:

K. K. Verma y col. [354], proponen un método en fase inversa, para la determinación de ácido acetil salicílico, como ácido salicílico esto es, (una vez hidrolizado) y otros principios activos como acetaminofenol y cafeína con detección UV a 240 nm. La fase móvil es KH_2PO_4 (0.18 M) y metanol en una proporción 70:30 (v:v) a pH 3.60 ajustado con HCl concentrado y como fase estacionaria una columna Zorbax ODS. La calibración se hace con el valor de las áreas de los picos del cromatograma. Los valores de desviación estándar relativa del método se encuentran entre 1.1 y 2%. Aplicado a muestras sintéticas y a fármacos da resultados satisfactorios.

F. Kees D. Jehnich y H. Grobecker [355], describen un método para la determinación de ácido acetil salicílico ASA y su metabolito ácido salicílico SA en plasma humano, desproteinizado con acetonitrilo, el cual es extraído de la fase acuosa, junto con los dos analitos tras añadir NaCl. La determinación se lleva a cabo por HPLC en fase inversa empleando una columna Novapak C_{18} , y como eluyente 740 ml de agua, 900 : L de ácido ortofosfórico al 85% y 180 ml de acetonitrilo, con detección espectrofotométrica a 237 nm. Para la validación del método se han empleado cinco curvas de calibrado con seis concentraciones diferentes, comprendidas 0.2 y 20 y 0.5 y 50 : gAnL^{-1} respectivamente para ácido acetil salicílico y ácido salicílico, en el mismo orden los límites de detección son 75 y 100 pg y de cuantificación 100 ngAnL^{-1} para los dos. La precisión y exactitud tienen valores aceptables, (ASA:99±9 y SA :117±9

ngAmL⁻¹, n=5). Los valores de recuperación encontrados a partir de la recta de calibrado en el plasma son 106±8.4% para ácido acetil salicílico y 121.7±4.8% para ácido salicílico.

D. P. Venema y col. [356], desarrollan un método sensible y específico con detección fluorescente para determinar en alimentos, después de su hidrólisis, ácido acetil salicílico libre y ácido salicílico total (resultado de la hidrólisis más el propio del alimento). Las recuperaciones encontradas para el ácido acetil salicílico y ácido salicílico libres son 95-98% y 92-102 %, y para el ácido salicílico total varía entre 79-94%; los límites de detección referidos bien al alimento fresco o seco, valen en cada caso 0.02 y 0.2 mgAkg⁻¹ respectivamente. Para la separación cromatográfica se emplea una columna Lichrospher RP-18, como fase móvil, metanol: agua con ácido ortofosfórico 85% (40:60:0.2) con un flujo de 0.9 mLAm⁻¹ y para la detección fluorescente los valores de las longitudes de onda de excitación y emisión son respectivamente 300 y 400 nm.

R. Pirola, S. R. Bareggi y G. Debeneditis [357], describen un método para determinar ácido acetil salicílico y ácido salicílico en córnea humana y en plasma. Después de tratada cada muestra de forma conveniente, se procede a su inyección en el cromatógrafo, trabajando con una columna Lichrospher 100 RP-18, con un flujo de 1 mLAm⁻¹ y como fase móvil agua :disolución tampón de fosfato de pH 2.5:acetonitrilo (35:40:25). La respuesta es lineal para cantidades de ácido acetil salicílico de 0.1 a 100 : gAm⁻² y de 0.1 a 5 : gAm⁻² para ácido salicílico, para las muestras de córnea y de 0.1 a 2 y 1 a 50 : gAm⁻³ para ácido acetil salicílico y ácido salicílico respectivamente en plasma. En ambos casos se obtienen valores de recuperación superiores al 98%.

Entre otros métodos con diferentes técnicas cromatográficas contempladas en esta revisión bibliográfica, podemos citar los siguientes: en capa fina [358, 359], gas-líquido [360-364], líquida [365 y 366] y también un método considerado como oficial para determinación de ácido salicílico con cromatografía de columna [367].

A continuación, se citan las publicaciones más recientes, que resuelven mezclas conteniendo codeína y otros componentes simultáneamente como son:

I. N. Papadoyannis y B. Caddy [368], describen un procedimiento simple y rápido para determinar cafeína, codeína y morfina en fluidos biológicos. Los límites de detección son 0.4, 0.9 y 0.6 ng respectivamente, con un tiempo de análisis menor de 6 minutos. El sistema emplea una columna RP-8Sheri-5 en fase inversa y como eluyente metanol 0.25% (p/v) y acetato amónico:agua (70:30) con detección UV. La desviación estándar relativa es 0.5%, para cafeína, 1% para morfina y 1.2% para codeína. La recuperación para 50: L de muestras de sangre y orina es superior al 90%.

K. L. Crump, I. M. McIntyre y O. H. Drummer [369], proponen un método de separación e identificación de morfina y codeína en sangre y bilis, empleando una extracción líquido-líquido previamente, seguida de la cromatografía en fase inversa, combinando como detección la técnica UV y fluorescente. Como columna cromatográfica se emplea Nova-Pak, la fase móvil es acetonitrilo al 10% en disolución tampón fosfato de pH 6.6. El tiempo total de análisis es de 30 minutos, para la separación completa, con un flujo de 1.2 mL min^{-1} en régimen isocrático. El procedimiento es selectivo, sensible y exacto y aplicable tanto a análisis clínicos como forenses.

Los límites de detección en sangre son 0.10 y 0.06 mg A^{-1} para morfina y codeína respectivamente, y en bilis 0.20 mg A^{-1} para las dos. La desviación estándar relativa toma valores entre (6-2.6)% para morfina y (6-3.2)% para codeína en sangre para las distintas muestras, y en bilis (0.6-4.1)% para morfina y (0.8-5.4)% para codeína en las distintas cantidades ensayadas.

G. Santoni y col. [370], desarrollan un método para determinar aspirina, fosfato de codeína y propifenazona en productos farmacéuticos, analgésicos (tabletas); también es útil para ácido salicílico en bajas concentraciones. Se usan dos columnas C-8, trabajando en régimen isocrático, empleando como fase móvil metanol:agua (45:55) con 1.4% de ácido acético y 5mM de bromuro de tetrametilamonio, con un flujo de 1 mL min^{-1} y detección UV a 284 nm. La resolución de los picos es satisfactoria, así como la precisión y exactitud (RSD:1.7-1.2% aspirina, 0.7-1.3% codeína y 1.0-0.9% propifenazona). Los valores de recuperación varían entre, 99.6-102.2% para fosfato de codeína 100.2-98.6% para aspirina y 101.9-99.4% para propifenazona.

M. E. El-Koommos y K. M. Emara [371], presentan un método para determinar en productos comerciales, feniltoloxamina, salicilamida, cafeína, paracetamol, codeína y fenacetina. Es específico para la detección y determinación de cada componente en mezclas complejas. Como fase estacionaria emplea una columna C_{18} de 10: m y por eluyente metanol:acetonitrilo: agua:tetrahidrofurano (20:20:55:5 v/v) y detección espectrofotométrica a 254 nm. Los seis componentes se eluyen en siete minutos. El método ofrece buenos resultados para productos comerciales que contienen dos, tres, o cinco principios activos y el estudio de recuperación arroja resultados entre 98.9-100.4%.

S. H. Atwell, R. G. Bell y R. Vyas [372], proponen un método para la determinación simultánea de acetaminofenol, fosfato de codeína, benzoato sódico y metilparaben en suspensiones orales, con un sistema cromatográfico equipado con una columna fenilo de 5 : m (YMC, Morris Plains NJ), como fase móvil fosfato potásico, con 40 mM de ácido sulfúrico [9:1 (v/v)] 1mM, ajustado el pH a 3.9 con ácido fosfórico y acetonitrilo. El flujo es 2.0 mL min^{-1} , trabajando a 25°C e inyectando un volumen de muestra de 20 : L. Los valores del estudio de recuperación para cada componente son 99,5, 99,7, 99,5 y 99.7% para acetaminofenol, fosfato de codeína, benzoato sódico y metilparaben respectivamente y en el mismo orden las desviaciones estandar relativas 0.35, 0.68, 1.06 y 0.66%.

Los trabajos publicados para determinar vitaminas además de otros componentes presentes en muestras de distinta naturaleza como agua, alimentos (nutrición infantil), productos farmacéuticos, bebidas tónicas han sido más numerosos, a continuación se citan algunos de los más relevantes encontrados en la bibliografía:

P. C. H. Hollman y col. [373], describen un trabajo comparativo de los resultados obtenidos entre 18 laboratorios europeos, al determinar en alimentos las vitaminas B₁ y B₆, entre otras vitaminas hidrosolubles, mediante tres métodos: cromatografía líquida de alta resolución, fluorimétrico y microbiológico. Ambas vitaminas han sido analizadas en leche en polvo, carne de cerdo y semillas de judías verdes, el número de laboratorios participantes en cada tipo de muestra en el caso de la vitamina B₁, fue de 9 y 10, mientras que para la B₆ hubo un máximo de 13 para las muestras de leche y un mínimo de 11 para la carne de cerdo.

Los resultados del estudio de la reproducibilidad para la tiamina, por los tres métodos han sido buenos variando entre 11 a 18%, la variación para la piridoxina salvo en el caso de la leche ha sido grande (18 a 51%).

T. S. Agostini y H. T. Godoy [374], proponen un método para el control de los contenidos de cinco vitaminas del grupo B, nicotinamida, ácido nicotínico, riboflavina, tiamina y piridoxina, en quince alimentos distintos, tales como leche, macarrones, galletas, cereales...

Para la separación cromatográfica a temperatura ambiente de las vitaminas una vez extraídas de las muestras convenientemente, se emplea como fase móvil, acetonitrilo, en fase acuosa (con 5mM de ácido hexanosulfónico, 0.15% de trietilamina ajustado a un pH de 2.8 con H₂SO₄ al 10% y metanol), con un valor de flujo de 0.7 mL min⁻¹, con una elución en gradiente, al principio 2% de acetonitrilo y 98% de la fase acuosa, a continuación durante 3 minutos 3% acetonitrilo y 97% de fase acuosa, para seguir con un gradiente lineal con 2% acetonitrilo, 41% de fase acuosa, y 57% de metanol durante 20 minutos más. El sistema requiere de 20 minutos para equilibrarse de nuevo antes de la próxima inyección. La columna empleada para la separación es una C₁₈, 5 : m. Los picos se identifican con un detector de diodo en fila a 254 nm hasta los 9 minutos, a 278 nm desde 9 a 15 minutos y a 254 nm después de 15 minutos. La calibración se ha realizado a partir de los valores de las áreas de los picos. Casi todos los productos analizados muestran valores concordantes con los declarados o presenta una ligera variación.

M. Amin y J. Reusch [375], describen un método para determinación de vitaminas del grupo B, B₁, B₂, B₆ y B₁₂, solubles en agua, en productos farmacéuticos. Las características para la separación a temperatura ambiente han sido, una columna Vertex LiChrosob RP-18 como fase estacionaria, un flujo de 2 mL min⁻¹, y como eluyente metanol:agua (50:50). El volumen de inyección empleado fue 5-25 : L.

La calibración realizada con las áreas de los picos, es lineal para las siguientes rangos de concentración, 10-50 y 50-250 ng/mL para B₁ y 20-100 y 100-500 ng/mL para las demás. Los coeficientes de variación para las cuatro vitaminas oscilan entre 2.1y 4.2%. El método se ha aplicado a la determinación de las cuatro vitaminas en tres preparados farmacéuticos, necesitando para cada análisis un tiempo aproximado de 5 minutos, consiguiendo que sea rápido, exacto y sensible, con coeficientes de variación para las cuatro vitaminas <4%.

Y. Maeda y col., [376] desarrollan un método rápido y simple para la determinación simultánea de siete componentes: nicotinamida, tiamina, riboflavina, riboflavina fosfato sódico, piridoxina, cafeína y benzoato sódico en bebidas tónicas comerciales. Los siete componentes se separan en fase inversa con columna C₁₈, y con una fase móvil de acetonitrilo-fosfato dihidrógeno de potasio 0.01M - trietilamina (8:91.5:0.5 v/v/v), conteniendo octanosulfonato sódico 5mM y ajustado el pH a 2.8 con ácido fosfórico. Se detecta a 254 nm. El estudio de recuperación de los siete componentes presenta valores en el intervalo 97-104%, con coeficientes de variación de 0.9-4.2%.

G. W. Chase y col. [377, 378], presentan un trabajo para determinación simultánea de tiamina, riboflavina y piridoxina extraídas con ácido perclórico de fórmulas alimenticias infantiles pero modificado para ser aplicado también en alimentos dietéticos. En él la detección UV ha sido sustituida por fluorescente para B₁ y B₆, obteniendo resultados más sensibles y específicos, para ello la tiamina se convierte en tiocromo con hidróxido sódico y ferricianuro potásico. El método usa como fase móvil agua, acetonitrilo, sal sódica del ácido hexanosulfónico a un pH 3.6 ajustado con ácido fosfórico. La columna es NovaPak C₁₈. Los límites de detección valen 0.05 : gAnL⁻¹ para tiamina y riboflavina, 0.01: gAnL⁻¹ para piridoxina. La reproducibilidad del sistema se ha evaluado con diez determinaciones y los coeficientes de variación son de 5.9, 6.0 y 10.7% respectivamente para tiamina, riboflavina y piridoxina; en el mismo orden los resultados de los estudios de recuperación para cada vitamina son 111.0, 96.3 y 113%, que comparados con los métodos oficiales OAC son favorables.

L. Gámiz García y MD. de Castro [379], determinan Vitamina B₁, cafeína, ácido acetil salicílico e impurezas de ácido salicílico en preparaciones farmacéuticas. Una vez que se han optimizado las características del método cromatográfico, se ha validado mediante la calibración con adición de patrón y comprobado su reproducibilidad y selectividad, ha sido aplicado como control de calidad para los fármacos.

S. Albala Hurtado y col [380] proponen un método simple y rápido para determinar simultáneamente nicotinamida, tiamina, riboflavina, piridoxina, piridoxal, piridoxamina, cianocobalamina y ácido fólico en líquidos y leche infantil en polvo. Empleando una columna en fase reversa C₁₈. El análisis total de la muestra no necesita más de 55 minutos; la fase móvil que emplean es metanol/agua (15:85), ácido octanosulfónico 5mM, con 0.5% de trietilamina, ajustado el pH a 3.6 y con un flujo de 1.0mLAnin⁻¹. La

separación es satisfactoria para la mayor parte de las vitaminas y se detectan por absorción UV a diferentes longitudes de onda. La linealidad, precisión, recuperación y sensibilidad han sido satisfactorias en todos los casos. Los límites de detección varían desde 0.02 a 0.10 : $\mu\text{g mL}^{-1}$.

II. PRUEBAS PRELIMINARES. ASIGNACIÓN DE PICOS

Resumimos brevemente a continuación las características esenciales del método cromatográfico desarrollado para la separación de los analitos antes indicados.

A la vista de los componentes de la muestra y de sus diferentes polaridades y peso molecular, se elige como fase estacionaria una columna Nucleosil C₁₈ que es una fase apolar, lo que significa que se opera en fase inversa, utilizando detección ultravioleta con detector de diodos en fila.

Para conseguir una adecuada separación de los analitos con la mayor resolución posible y en el mínimo tiempo de análisis fue necesario, para encontrar los mejores resultados operar en isocrático durante 5 minutos con agua a pH 2 ajustado con ácido fosfórico; a continuación, 9 minutos con la mezcla acetonitrilo/agua 75:25 (v/v) a pH 2 ajustado también con ácido fosfórico.

En cuanto al estudio realizado sobre la influencia de la variación del flujo de la fase móvil sobre la eficacia de la columna, se comprobó un comportamiento típico de acuerdo a la ecuación de Van Deemter, deduciéndose que la máxima eficacia se obtiene para un valor de flujo de 1 mL min^{-1} .

Las condiciones cromatográficas óptimas para la resolución del sistema son las que se indican a continuación.

* Temperatura: 35°C

* Volumen de inyección: 10 μ l

* Flujo de la fase móvil: 1 mL min^{-1}

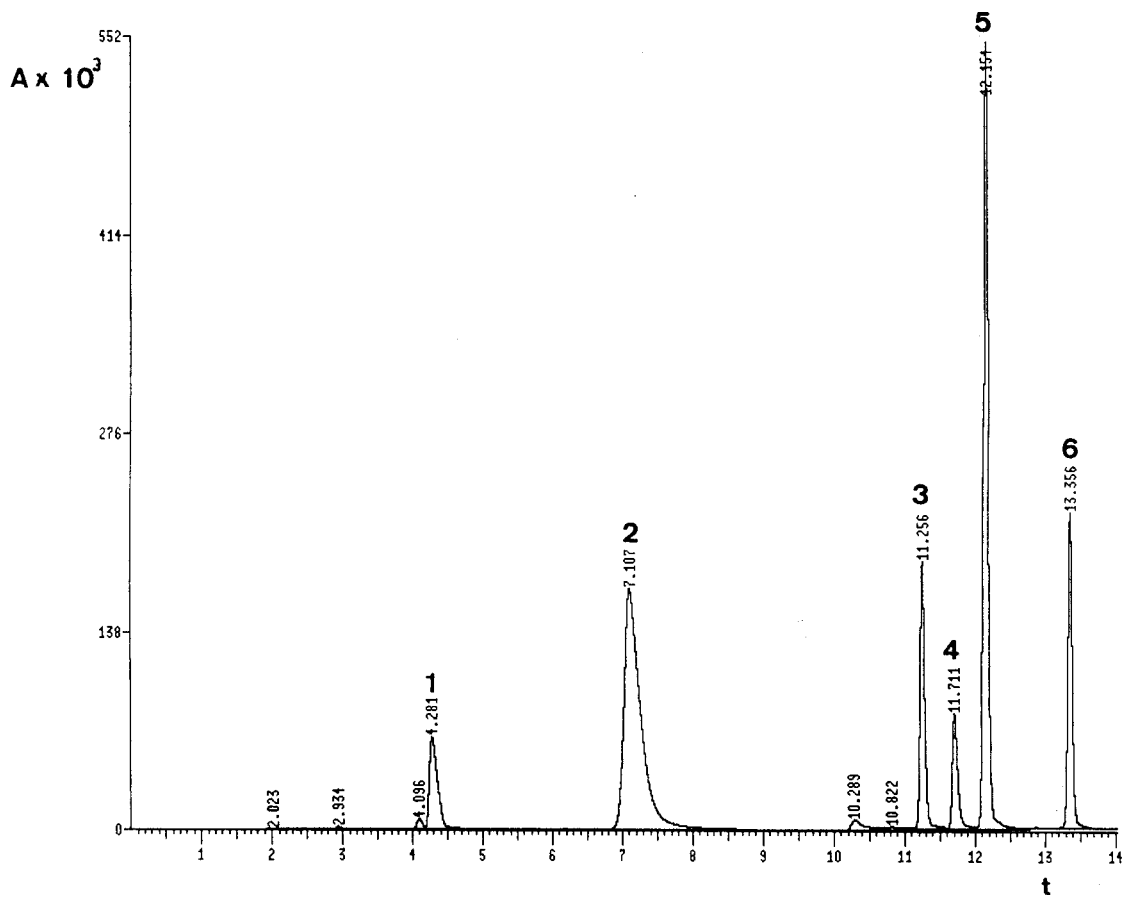
* Fase móvil:

- Primer eluyente: Agua pH=2, tiempo 5 min.

- Segundo eluyente: Acetonitrilo/Agua 75/25 pH 2, tiempo 9 min.

En la Figura II.1, se muestra un cromatograma típico obtenido en las anteriores condiciones, cuyos tiempos de retención para cada componente se recogen en la Tabla II.1.

A la vista de los resultados de la Tabla II.1, se observa como las vitaminas clorhidrato de piridoxina y tiamina son eluidos en primer lugar dadas sus características iónicas, mientras que el resto de los componentes son retenidos con más fuerza en la columna y requieren un disolvente más apolar para ser eluidos



F

ig. II.1 Asignación de picos. 1. Clorhidrato de tiamina. 2. Clorhidrato de piridoxina.

3. Paracetamol. 4. Codeína. 5. Cafeína. 6. Ac. Salicílico.

* 200 mgA^{-1} de concentración para todos los componentes.

* $\lambda_{\text{emi}} = 285 \text{ nm}$

TABLA II.1 Asignación de picos

Componente	Tiempo de retención (minutos)
Clorhidrato de tiamina	4.281
Clorhidrato de piridoxina	7.107
Paracetamol	11.256
Codeína	11.711
Cafeína	12.151
Ácido salicílico	13.356

III. SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA

Al objeto de mejorar la determinación y dado que el equipo utilizado posee un detector de diodos en fila que permite registrar el espectro completo de las sustancias que pasan a través de él, se seleccionan las longitudes de onda que permiten una mayor sensibilidad y selectividad para el método.

A partir de los espectros individuales de cada componente Figuras II.2 y II.3, la longitud de onda de los máximos de absorción para cada uno se recoge en la Tabla II.2, a la vista de la misma, se decide tomar 285 nm para la determinación conjunta de todos los analitos, salvo para la codeína, que se elige 240 nm para compensar el efecto de su menor concentración respecto a los demás componentes.

TABLA II.2 Selección de longitudes de onda

Analito	Ácido salicílico	Cafeína	Codeína	Cl. de piridoxina	Cl. de tiamina	Paracetamol
λ_{m} nm	305	275	240, 285	290	260	250

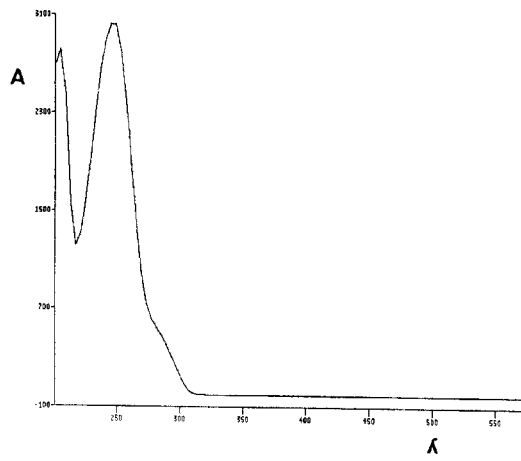
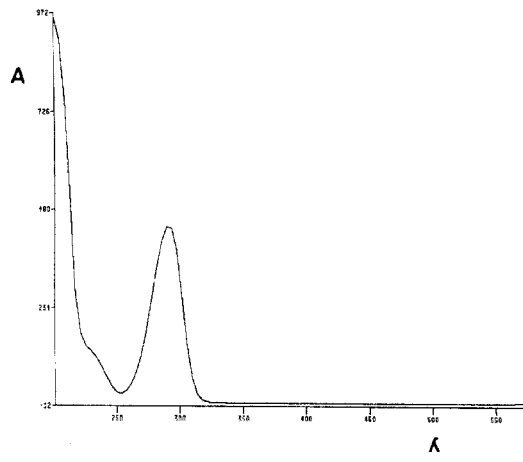
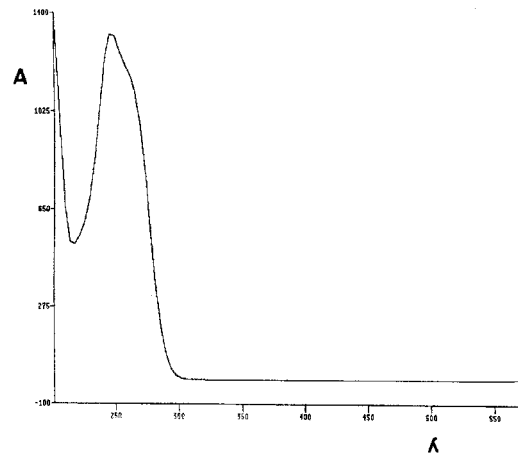


Fig. II. 2

Espectros de UV. 1. Clorhidrato de tiamina. 2. Clorhidrato de piridoxina.
3. Paracetamol.

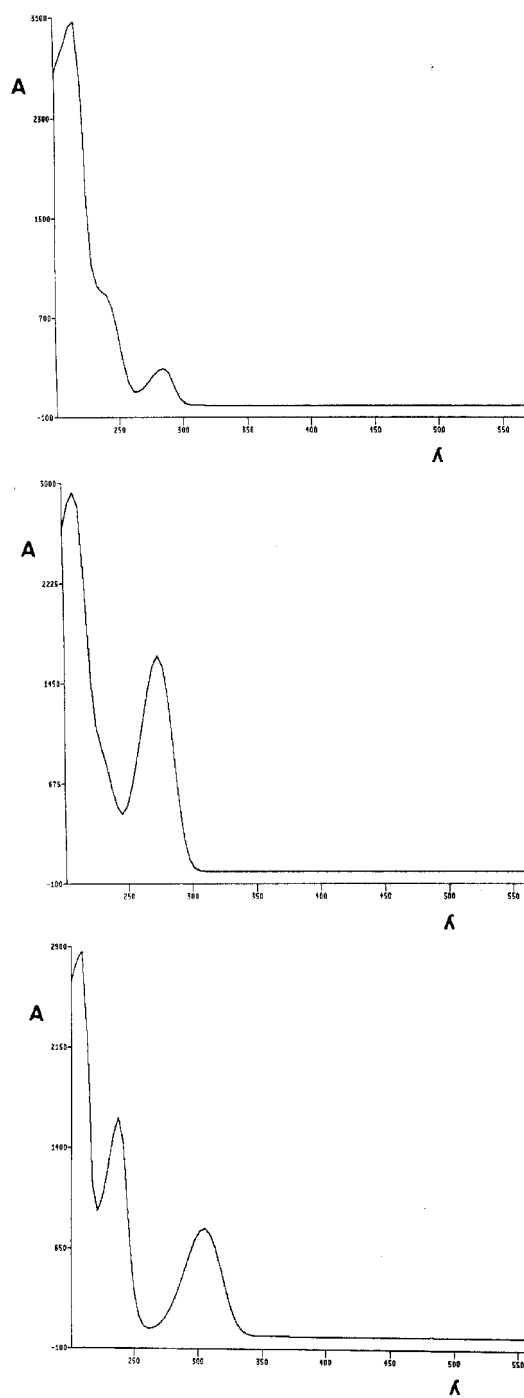


Fig. II. 3 Espectros de UV. 4. Codeína. 5. Cafena. 6. Ác. Salicílico

IV. EFICACIA DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PROPUESTA

Una vez que en los apartados anteriores hemos establecido las condiciones cromatográficas del método y seleccionado los valores de las longitudes de onda de lectura, es necesario caracterizar la eficacia de la separación cromatográfica mediante el empleo de los siguientes parámetros: factor de capacidad, parámetro de resolución y factor de asimetría.

IV.1 Factor de capacidad

En una determinación cromatográfica la posición del pico queda especificada por la retención del analito en la columna (fase estacionaria) y su posterior elución (fase móvil), para caracterizar con más propiedad a cada pico en el sistema cromatográfico, calculamos el denominado "**factor de capacidad**", que se define como:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

siendo:

t_0 : tiempo muerto

t_R : tiempo de retención

Siempre que $1 < K' < 5$, se acepta que la columna retiene y separa con eficacia. Los valores experimentales se recogen en la Tabla II.3, observándose para todos los analitos un valor correcto del factor de capacidad, menos en el caso de la tiamina, que es retenida con menos fuerza en la columna.

TABLA II. 3 Factor de capacidad k'

Analito	t_R (min)	k'
Clorhidrato de tiamina	4.167	0.480
Clorhidrato de piridoxina	6.880	1.438
Paracetamol	11.227	2.978
Codeína	11.668	3.315
Cafeína	12.138	3.301
Ácido salicílico	13.362	3.375

IV. 2 Parámetro de resolución

La eficiencia con que una mezcla de componentes es separada en cromatografía de elución, se materializa en la situación relativa de los respectivos picos de elución y el ancho de banda, en definitiva en el grado de solapamiento entre ellos. La resolución obtenida para la fase móvil estudiada se calculó a través del "**parámetro de resolución R_s** ", suponiendo que se den las condiciones de cromatografía de elución lineal. La expresión es la siguiente:

$$R_s = \frac{2 \cdot \Delta Z}{W_A + W_B} \quad (2)$$

donde:

) Z: distancia entre dos picos consecutivos

W: anchura de pico

Criterio: $R_s < 1$ Existe solapamiento

$R_s > 1$ No existe solapamiento

En la Tabla II.4, se muestran los resultados obtenidos.

TABLA II. 4 Parámetro de resolución R_s

Analito	$W_{0.5h}$:	W) Z	R_s
Clorhidrato de tiamina	0.122	0.052	0.208	2.173	7.93
Clorhidrato de piridoxina	0.200	0.085	0.340	4.347	19.01
Paracetamol	0.068	0.029	0.116	0.441	3.50
Codeína	0.080	0.034	0.136	0.470	3.70
Cafeína	0.069	0.029	0.116	1.224	10.74
Ácido salicílico	0.066	0.028	0.112		

De los valores de los parámetros de resolución, se deduce que no existe ningún tipo de solapamiento entre dos picos adyacentes en el cromatograma por lo que la resolución es aceptable.

IV.3 Factor de asimetría

Como en la práctica, los picos cromatográficos de elución no son estrictamente Gaussianos, existe una "**asimetría de pico**" que explica la desviación del comportamiento ideal. Para caracterizar su desviación se utiliza el factor de asimetría. Para ello, se trazan dos líneas, una perpendicular a la línea de base desde el máximo, y otra paralela a la base, trazada a una altura que corresponda al 10% de la altura máxima alcanzada. De esta manera se consiguen dos anchos parciales de banda $a_{0.1}$ y $b_{0.1}$. El factor de asimetría se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$T = \frac{b_{0.1}}{a_{0.1}} \quad (3)$$

Criterio:

Si $T = 1$ pico gaussiano.

Si $T > 3$ pico con desviación en la cola o en el frente.

En la Tabla II.5 se muestran los valores del factor de asimetría para cada componente.

TABLA II.5 Factor de asimetría T

Analito	h	$a_{0.1}$	$b_{0.1}$	T
Clorhidrato de tiamina	2.9	0.25	0.80	3.2
Clorhidrato de piridoxina	4.5	0.30	1.50	5
Paracetamol	6.0	0.20	0.25	1.25
Codeína	4.8	0.20	0.38	1.9
Cafeína	15.3	0.10	0.30	3
Ácido salicílico	6.7	0.10	0.29	2.64

A la vista de los resultados y en cuanto al criterio de asimetría, se puede afirmar que todos los picos son simétricos, salvo el de la piridoxina que presenta una ligera desviación de cola tal como se observa en el cromatograma de la Figura II.1.

V. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Teniendo en cuenta los valores de las condiciones óptimas de los factores de separación anteriormente puestos a punto, se propone como procedimiento operatorio el siguiente: se inyecta en el cromatógrafo un volumen de 10 : L, de la disolución de la mezcla de los seis componentes, ácido salicílico, cafeína, clorhidratos de piridoxina y tiamina, codeína y paracetamol cuyas concentraciones deben estar comprendidas dentro del rango dinámico lineal (apartado VI.1), y se procede a la separación y registro del cromatograma en las condiciones de trabajo, 35°C y flujo de 1 mL/min⁻¹. Los componentes se eluyen de la fase estacionaria, columna Nucleosil C₁₈, empleando como fase móvil primero agua a pH 2 (ajustada con ácido fosfórico) durante 5 minutos y a continuación una mezcla acetonitrilo/agua 75/25 (v/v) durante 9 minutos, al mismo valor de pH y ajustado también con ácido fosfórico, una vez eluidos todos los componentes se procede a lavar la columna por un tiempo de 4 minutos con agua a pH 2.

Para la determinación de todos los componentes del sistema el valor de la longitud de onda de medida de las áreas de los picos de absorbancia es 285 nm, salvo para la codeína que es 240nm.

VI. CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS

A continuación, vamos a proceder a la calibración conjunta de todos los componentes de la mezcla, así como estudiar la reproducibilidad y cálculo de los límites de detección.

VI.1 Funciones de calibrado

Para cualquier determinación analítica, basada en una separación cromatográfica, la medida de la señal analítica puede hacerse en áreas o alturas de picos, en nuestro caso elegimos áreas, por su mayor reproducibilidad.

El calibrado para cada analito en la disolución conjunta de los seis componentes, se va a realizar para rangos de concentraciones que permitan en cada caso, la medida del área de la señal instrumental. Estas concentraciones varían entre 50 y 1000 $\text{mg}\cdot\text{A}^{-1}$ para clorhidrato de tiamina y codeína y para los demás entre 50 y 500 $\text{mg}\cdot\text{A}^{-1}$. Para cada punto de la recta de calibrado se tomará el volumen correspondiente de la disolución de la mezcla y se le aplicará el procedimiento operatorio descrito en el apartado V.

Se realizaron tres réplicas para cada concentración, los resultados obtenidos en el análisis de los cromatogramas, en las condiciones del método, se recogen en las Tablas II.6 a II.9, y sus rectas de calibrado, una por componente, en las Figuras II.5 a II.10, comprobándose en todos los casos la linealidad del método, según los criterios de validación establecidos en el capítulo I de esta Memoria y recogidos en la Tabla II.10.

Asimismo en la Figura II.4, se observan dos cromatogramas correspondientes a muestras de la calibración conjunta.

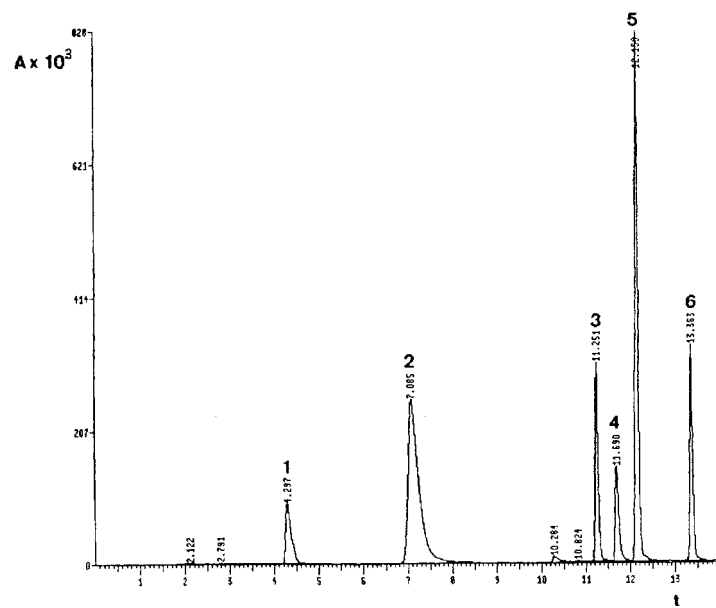
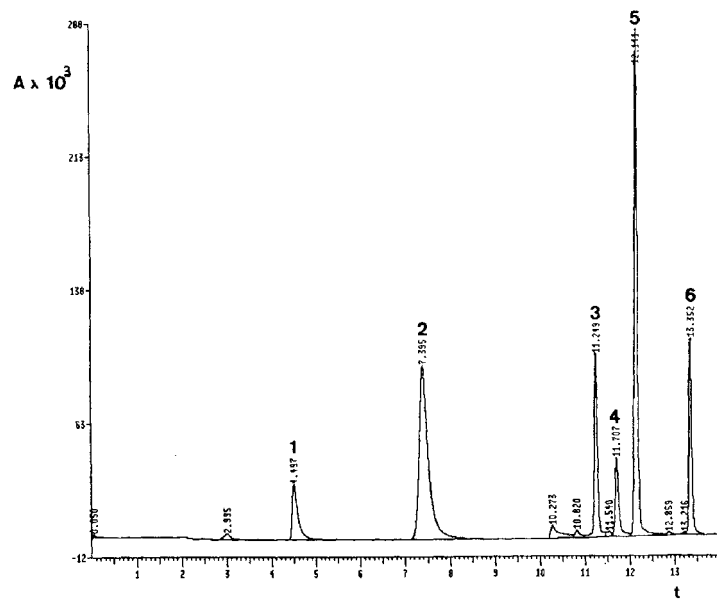


Fig. II.4 Cromatograma de calibración. 1. Clorhidrato de tiamina. 2. Clorhidrato de piridoxina. 3. Paracetamol. 4. Codeína. 5. Cafeína. 6. Ac. Salicílico.

a) C: 100 mgA^{-1}

b) C: 400 mgA^{-1} ; 800 mgA^{-1} (CO)

* $\lambda_{\text{emi}} = 285 \text{ nm}$

TABLA II.6 Funciones de calibración (I) para ácido salicílico y cafeína

[Patrón] (mgÅ ⁻¹)	Ácido salicílico			Cafeína		
	Area ₁	Area ₂	Area ₃	Area ₁	Area ₂	Area ₃
50	241	247	241	613	613	600
100	487	488	486	1226	1299	1235
200	973	962	970	2491	2496	2491
300	1409	1468	1421	3592	3751	3564
400	1951	1920	1970	4745	4941	4822
500	2433	2415	2430	5916	5910	5910

TABLA II.7 Funciones de calibración (II) para clorhidrato de piridoxina y paracetamol

[Patrón] (mgÅ ⁻¹)	Clorhidrato de piridoxina			Paracetamol		
	Area ₁	Area ₂	Area ₃	Area ₁	Area ₂	Area ₃
50	672	675	676	210	211	213
100	1394	1384	1386	484	471	476
200	2831	2742	2780	924	871	888
300	4260	4230	4250	1368	1292	1314
400	5640	5602	5561	1788	1771	1766
500	7031	7084	7094	2182	2200	2225

Tabla II. 8 Funciones de calibración (III) para clorhidrato de tiamina y codeína

[Patrón] (mgÅ ⁻¹)	Clorhidrato de tiamina			Codeína		
	Area ₁	Area ₂	Area ₃	Area ₁	Area ₂	Area ₃
50	124	120	124	366	368	366
100	266	278	260	726	711	698
200	535	535	535	1339	1313	1320
400	1033	1028	1072	2573	2561	2565
800	2125	2146	2105	5170	4942	5097
1000	2665	2654	2661	6281	6101	6157

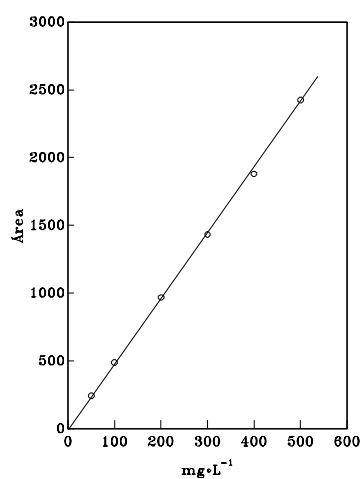


Fig.II.5 Recta de calibrado para ácido salicílico

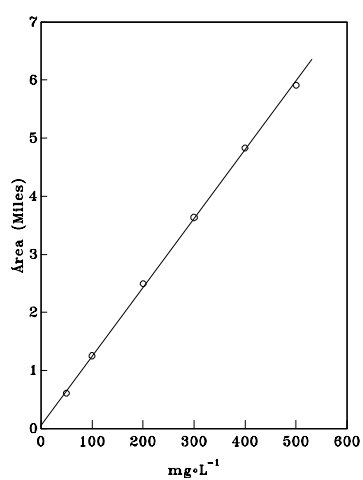


Fig.II.6 Recta de calibrado para cafeína

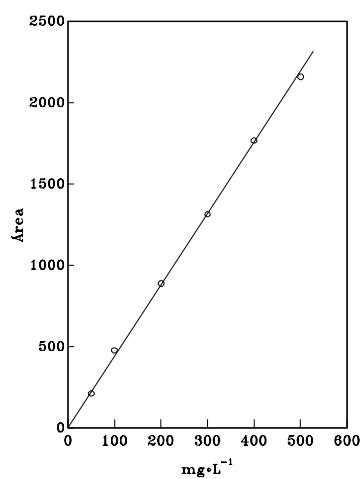


Fig.II.7 Recta de calibrado para paracetamol

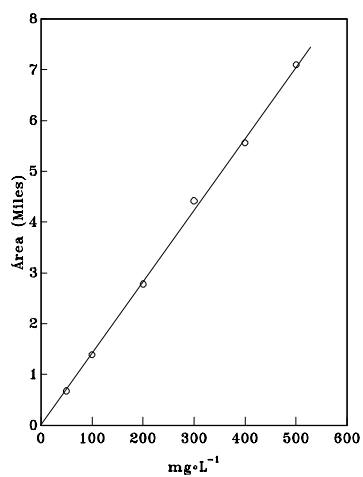


Fig.II.8 Recta de calibrado para clorhidrato de piridoxina

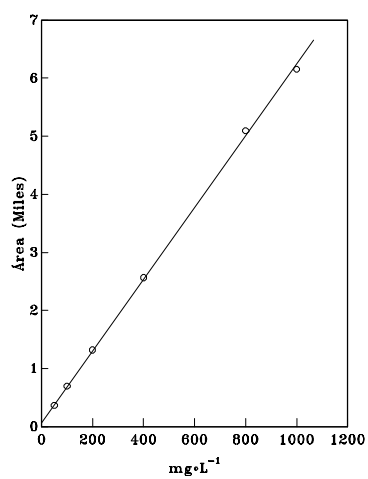


Fig.II.9 Recta de calibrado para codeína

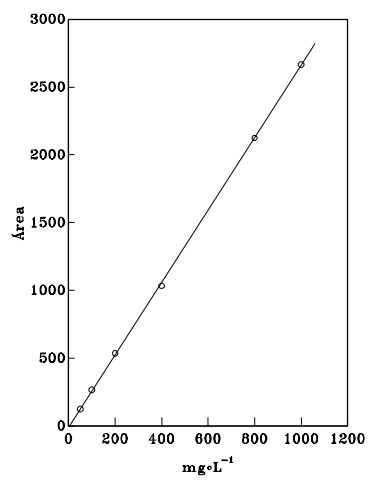


Fig.II.10 Recta de calibrado para clorhidrato de tiamina

TABLA II.9 Parámetros de calibración.

Componente	Coefficiente de correlación (r)	Ecuación de la recta
Ácido salicílico	0.9998	$y = -1.04 + 4.85 C$
Cafeína	0.9994	$y = 59.08 + 11.84 C$
Clorhidrato de piridoxina	0.9999	$y = -40.13 + 14.20 C$
Clorhidrato de tiamina	0.9999	$y = -8.37 + 2.66 C$
Codeína	0.9996	$y = 89.48 + 6.15 C$
Paracetamol	0.9995	$y = 4.41 + 5.29 C$

TABLA II.10 Parámetros estadísticos

Parámetro	AS	CF	CO	PCT	PI	TI
n	12	12	12	12	12	12
m	3	3	3	3	3	3
a	-1.04	59.08	89.48	5.29	-40.13	-8.37
s _a	9.08	25.54	19.34	9.08	11.77	4.38
b	4.85	11.84	6.15	4.41	14.20	2.67
s _b	0.02	0.10	0.04	0.03	0.04	0.01
DSR(b)%	0.42	0.84	0.65	0.68	0.28	0.37
Lack of fit	33.02	2.72	12.71	9.31	10.22	20.46
F	1.27	6.40	1.59	2.37	2.23	1.68
R ²	99.96	99.89	99.93	99.90	99.98	99.48

AS: ácido salicílico; **CF:** cafeína; **CO:** codeína; **PCT:** paracetamol.

PI: clorhidrato de piridoxina y **TI:** clorhidrato de tiamina.

VI.2 Estudio de reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad del método cromatográfico se analizó la variabilidad de la respuesta, empleando los valores de áreas del cromatograma y aplicando el método a dos disoluciones patrón de distintas concentraciones dentro del rango 50 y 500 o 50 y 1000 mgA⁻¹ de calibración y realizando un número de inyecciones sucesivas de distintas disoluciones de medida, aplicándoles por último el procedimiento operatorio.

Los resultados de todas estas determinaciones cromatográficas se recogen en las Tablas II.11 y II.12. En general se observan valores del coeficiente de variación muy aceptables.

TABLA II.11 Reproducibilidad (I)

Muestra	AS	CF	CO	PCT	PI	TI
1	494.6	1204	219.7	458.0	1384	257.2
2	470.4	1313	210.8	497.2	1365	269.3
3	471.9	1167	211.3	458.8	1338	244.6
4	485.8	1265	218.4	481.2	1378	262.9
5	476.4	1369	209.7	484.6	1372	259.1
6	471.4	1358	219.6	480.7	1344	248.2
7	470.4	1362	217.3	452.6	1352	253.7
8	482.2	1188	218.8	485.5	1360	261.5
9	481	1259	208.5	491.5	1361	273.4
10	477.6	1251	218.2	467.5	1377	251.6
Parámetros estadísticos						
O	478.1	1274	215.4	477.8	1363	258.2
s_{n-1}	7.89	74.50	4.55	15.42	15.15	9.07
C.V.%	1.65	5.84	2.12	3.24	1.11	3.51

AS: ácido salicílico; **CF:** cafeína; **CO:** codeína; **PCT:** paracetamol.

PI: clorhidrato de piridoxina y **TI:** clorhidrato de tiamina.

$m_{\text{inyectada}}$: 1000 ng para todos los componentes.

TABLA II.12 Reproducibilidad (II)

Muestra	AS	CF	CO	PCT	PI	TI
1	1821	4572	4485	1547	5465	1958
2	1830	4281	4661	1724	5535	2045
3	1810	4557	4645	1591	5479	2056
4	1858	4546	4667	1616	5523	1960
5	1843	4544	4647	1640	5540	2038
6	1884	4713	4744	1791	5596	2064
7	1838	4501	4736	1698	5562	2011
8	1870	4472	4730	1680	5602	2002
9	1892	4705	4803	1645	5708	2111
10	1856	4687	4622	1690	5541	2014
Parámetros estadísticos						
O	1848	4556	4674	1663	5555	2026
s_{n-1}	27.11	129.4	87.53	70.05	69.24	47.22
C.V.%	1.47	2.84	1.87	4.21	1.25	2.33

AS: ácido salicílico; **CF:** cafeína; **CO:** codeína; **PCT:** paracetamol.

PI: clorhidrato de piridoxina y **TI:** clorhidrato de tiamina.

* $m_{inyectada}$: 8000 ng; resto de componentes $m_{inyectada}$: 4000 ng.

VI.3 Límites de detección

El calibrado correspondiente a un método cromatográfico se caracteriza por la dificultad del cálculo de la señal analítica correspondiente al blanco, por lo cual es difícil realizar predicciones por la zona baja de la recta de calibrado sobre valores extrapolados que no se controlan experimentalmente. Para evitar este hecho general se introduce en la experiencia de calibrado puntos correspondientes a concentraciones de analito tan bajas como posible sea cuantificar.

Por otro lado la ausencia de un criterio claro para la determinación de la señal correspondiente al blanco, imposibilita el cálculo del límite de detección de la forma recomendada por la I.U.P.A.C. para métodos espectroquímicos de análisis, por ello hay que recurrir a otros procedimientos: cálculo de la relación señal/ruido, estudio de la mínima cantidad detectable, estimación a partir de los datos de la recta de calibrado, (según Miller y Miller [382], Cuadros y col. [381]), ordenada en el origen y otros. En este trabajo se ha optado por calcularlo a partir de los datos de la recta de calibrado.

1. Según Miller y Miller. La definición que estos autores hacen del límite de detección viene dada por la concentración que se obtendría a partir de la señal dada por la expresión:

$$LD = (a + 3S_{y/x}) \quad (4)$$

donde

- a: ordenada en el origen obtenida en la ecuación de calibrado
- $S_{y/x}$: Desviación estándar de regresión de la ecuación de calibrado, o desviación estándar de regresión de la señal instrumental sobre la concentración.

Esta expresión surge del hecho, de que cada punto obtenido en la recta de calibración, tiene variaciones sobre la dirección del eje de ordenadas distribuidas normal-mente, con una desviación estándar estimada por $S_{y/x}$. de aquí que sea apropiado utilizar dicha desviación para estimar el límite de detección, en lugar de la desviación estándar del blanco, a su vez el valor de la ordenada en el origen **a**, daría lugar a una estimación del blanco más exacta.

2. Otros autores [384] proponen para aquellas técnicas donde no es posible hacer correcciones del blanco, como ocurre en cromatografía, una estimación estadística aproximadamente del límite de detección dada por la expresión:

$$LD = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}} \quad (5)$$

donde n, representa el número de pares de datos obtenidos en la recta de calibrado y b la pendiente.

En la Tabla II.13 se recogen los resultados del cálculo del límite de detección por ambos métodos expresados en mgA^{-1} . Se aprecia que siguiendo el criterio 2 los límites de detección son siempre más bajos, siendo del orden de la tercera parte de los primeros.

TABLA II.13 Límites de detección

Analito	$S_{y/x}$	a(ordenada)	b(pendiente)	Criterio 1	Criterio 2
Ácido Salicílico	21.48	-1.04	4.85	27	5.1
Cafeína	50.20	59.08	11.84	13	4.9
Codeína	56.00	89.48	6.15	27	10.5
Cl. de Piridoxina	93.30	-40.13	14.19	19	7.6
Cl. de Tiamina	17.80	-8.37	2.66	20	7.7
Paracetamol	25.31	5.29	4.41	17	6.6

VII. APLICACIONES ANALÍTICAS

Se han determinado los contenidos de los distintos **principios activos**, en las siguientes preparaciones farmacéuticas: **Analgilasa, Benadom, Codeisán, Conductasa, Dolmen, Dolvirán, Fiorinal, Nervobión, Neurovadur, Pazbronquial, Perduretas de codeína, Rinomicine, Serfoxide.**

En todos los preparados farmacéuticos el tratamiento de las muestras corresponde con lo indicado en el apartado IV.2 del capítulo I. Los resultados obtenidos para los medicamentos analizados, así como el estudio de recuperación llevado a cabo para chequear la exactitud del método, se recogen en las Tablas II.14 a II.19 y en las Figuras II.11 a II.14 se muestran a modo de ejemplo cromatogramas de distintos fármacos.

TABLA II.14 Aplicaciones (I)

Principio activo	Ac. acetil salicílico			Cafeína			Fosfato de codeína			Paracetamol		
	C	m±:	C.V.	C	m±:	C.V.	C	m±:	C.V.	C	m±:	C.V.
Analgilasa	-	-	-	300	27±2	0.93	100	10.2±1.2	0.12	500	458±1	0.11
Dolmen	500	486±3	0.56	-	-	-	100	10.5±0.2	1.71	-	-	-
Dolvirán	400	387±3	0.70	500	465±1	0.25	96	9.4±0.2	3.09	-	-	-
Fiorinal	200	197±3	1.44	400	31.1±0.4	0.98	146.9	14.6±0.2	1.27	300	274±4	1.38
Rinomicine	-	-	-	300	27.7±0.7	2.44	-	-	-	120	138±1	0.91

C: concentración en mgA^{-1} de la disolución inyectada, según lo indicado por el fabricante

m: masa en mg, encontrados en el fármaco

Los resultados son media de tres determinaciones independientes

TABLA II.15 Aplicaciones (II)

Principio activo	Fosfato de codeína			Piridoxina (derivados)			Tiamina (NO ₃ ⁻ o HCl)		
	Fármaco	C	m±:	C.V.	C	m±:	C.V.	C	m±:
Benadom	-	-	-	300	277±3	1.10	-	-	-
Codeisán	287	26.1±0.5	1.82	-	-	-	-	-	-
Conductasa	306.6	29.9±0.4	1.34	-	-	-	-	-	-
Nervobióm	-	-	-	200	203±2	0.82	200	219±1	0.10
Neurovadur	-	-	-	250	237±6	2.68	250	241±3	1.17
Pazbronquial	200	200±1	0.57	120	113±14	0.89	-	-	-
Perduretas de codeína	500	46.1±0.4	0.81	-	-	-	-	-	-
Serfoxide	-	-	-	300	280±3	1.06	-	-	-

C: concentración en mgA⁻¹ de la disolución inyectada, según lo indicado por el fabricante

m: masa en mg, encontrados en el fármaco

Los resultados son media de tres determinaciones

TABLA II.16 Diferencias expresadas en % entre las cantidades obtenidas por el método propuesto y las indicadas por el laboratorio fabricante.

Fármaco	Principio activo					
	Ácido acetil salicílico	Cafeína	Piridoxina (derivados)	Tiamina (derivados)	Fosfato de Codeína	Paracetamol
Analgilasa	-	- 10.00	-	-	- 2.00	- 8.46
Benadom	-	-	- 7.66	-	-	-
Codeisán	-	-	-	-	- 9.25	-
Conductasa	-	-	-	-	- 2.47	-
Dolmen	- 2.80	-	-	-	+ 5.00	-
Dolvirán	- 3.25	- 7.00	-	-	- 2.08	-
Fiorinal	- 1.50	- 6.52	-	-	- 0.61	- 8.66
Nervobióm	-	-	+ 1.50	+ 9.50	-	-
Neurovadur	-	-	- 5.20	- 3.60	-	-
Pazbronquial	-	-	- 5.83	-	0	-
Perduretas de codeína	-	-	-	-	- 7.84	-
Rinomicine	-	- 7.66	-	-	-	+15.00
Serfoxide	-	-	- 6.67	-	-	-

Los contenidos de los respectivos principios activos obtenidos, se encuentran dentro de los márgenes de tolerancia aceptados por la farmacopea española

TABLA II.17 Aplicaciones (III). Estudio de recuperación

Principio activo	Cafeína			Fosfato de codeína			Paracetamol		
Fármaco	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V.%	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V.%	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V.%
Analgilasa	50	49.3±1.4	2.79	100	101±4	4.34	50	50.3±1.0	2.06
	100	105±3	2.45	500	489±4	0.89	200	196±3	1.67
	350	337±1	6.00	800	773±2	2.74	400	401±5	1.40
Rinomicine	150	146±2	1.17	-	-	-	400	382±3	0.66
	200	194±2	2.5	-	-	-	800	772±2	0.52
	300	285±3	0.89	-	-	-	1200	1140±2	0.20

Los resultados son media de tres determinaciones

TABLA II.18 Aplicaciones (IV). Estudio de recuperación

Principio activo	Fosfato de codeína			Piridoxina (HCl)			Tiamina (derivados)		
Fármaco	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V. %	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V. %	C _{añadida} (mgA ⁻¹)	C _{recup.±} (mgA ⁻¹)	C.V. %
Nervobión	-	-	-	60	59.7±0.1	0.4	60	57±4	5.66
	-	-	-	200	209±2	1.71	200	212±1	0.4
	-	-	-	400	398±5	1.48	800	839±5	.99
Nuerovadur	-	-	-	60	61±1	2.20	60	61±5	4.66
	-	-	-	200	203±2	0.86	200	205±3	4.26
	-	-	-	400	397±4	1.19	800	772±5	0.84
Pazbronqui al	100	95±1	1.25	100	93±1	0.73	-	-	-
	200	184±2	1.07	200	202±1	0.12	-	-	-
	300	298±1	0.38	300	313±3	0.51	-	-	-

Los resultados son media de tres determinaciones

TABLA II.19 Estudio de recuperación. % de Recuperación

Fármaco	Principio activo				
	Cafeína	Piridoxina (derivados)	Tiamina (derivados)	Fosfato de Codeína	Paracetamol
Analgilasa	99 %	-	-	101 %	100 %
	105 %	-	-	98 %	98 %
	96 %	-	-	97 %	100 %
	0	100 %		99 %	99 %
Nervobión	-	99 %	95 %	-	-
	-	104 %	105 %	-	-
	-	100 %	105 %	-	-
	0	101 %	102 %		
Neurovadur	-	102 %	102 %	-	-
	-	102 %	103 %	-	-
	-	99 %	97 %	-	-
	0	101 %	101 %		
Pazbronquial	-	93 %	-	95 %	-
	-	101 %	-	96 %	-
	-	104 %	-	97 %	-
	0	99 %		96 %	
Rinomicine	98 %	-	-	-	95 %
	97 %	-	-	-	96 %
	95 %	-	-	-	95 %
	0	97 %	-	-	95 %

En cuanto al estudio de recuperación, llevado a cabo en cada caso a tres niveles de concentración en cinco de los fármacos, los resultados medios globales para cada analito en cada fármaco están muy próximos al 100%, lo que pone de manifiesto la exactitud del método y por tanto su posible utilización tanto para el control analítico como para método de referencia. En los siguientes capítulos será usado para este último fin.

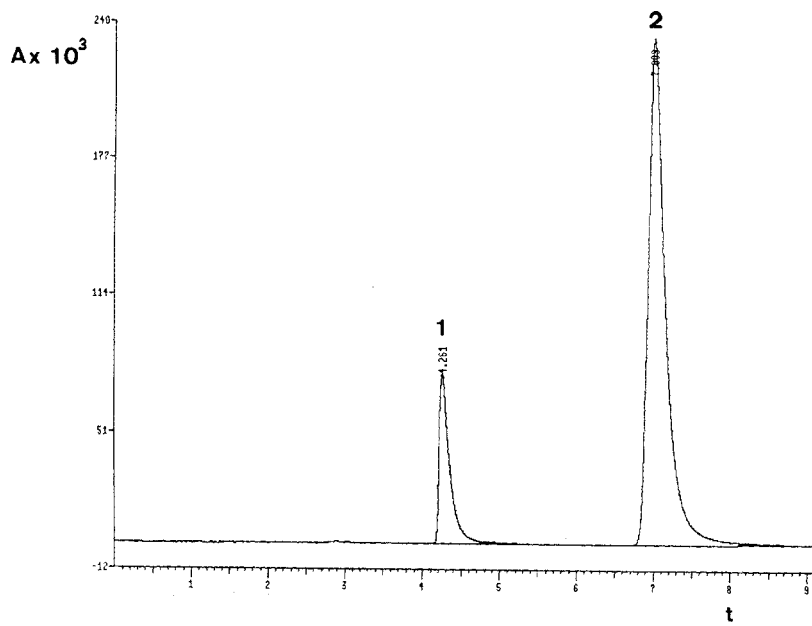


Fig.II.11 Nervobión. 1. Nitrato de tiamina. 2. Clorhidrato de piridoxina.

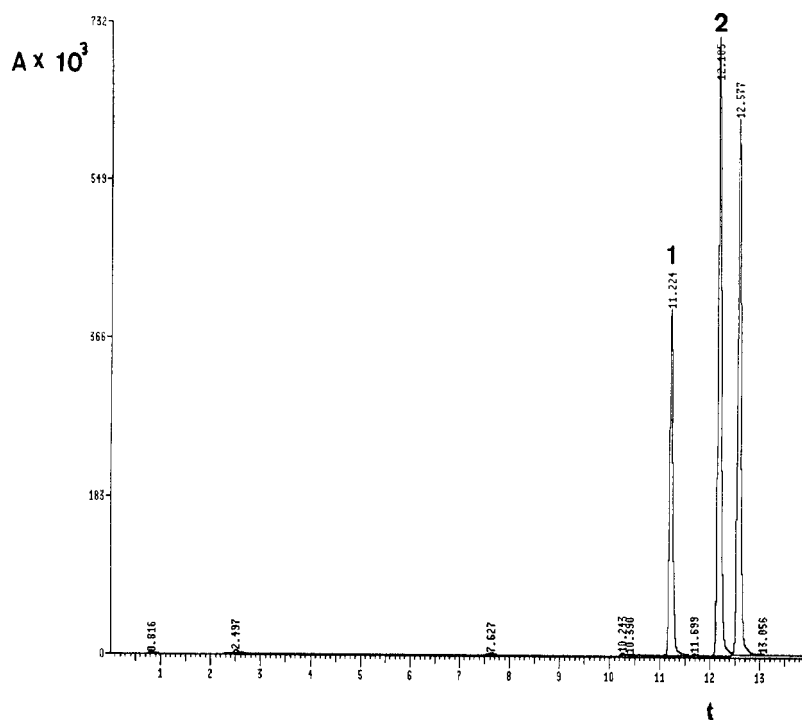


Fig.II.12 Rinomicine.1. Paracetamol. 2. Cafeína.

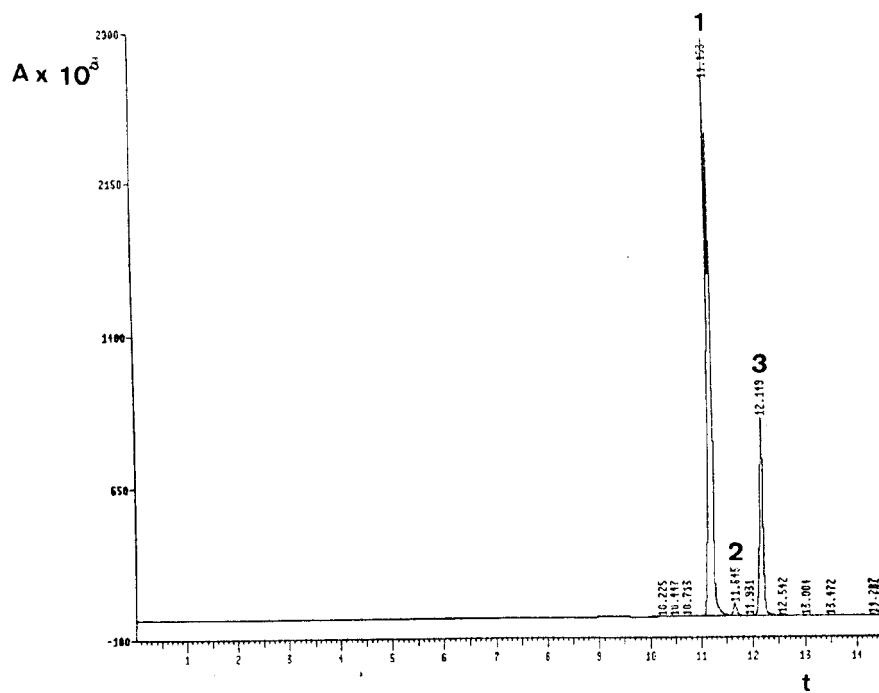


Fig. II.13 Analgisa. 1. Paracetamol. 2. Fosfato de codeína. 3. Cafeína.

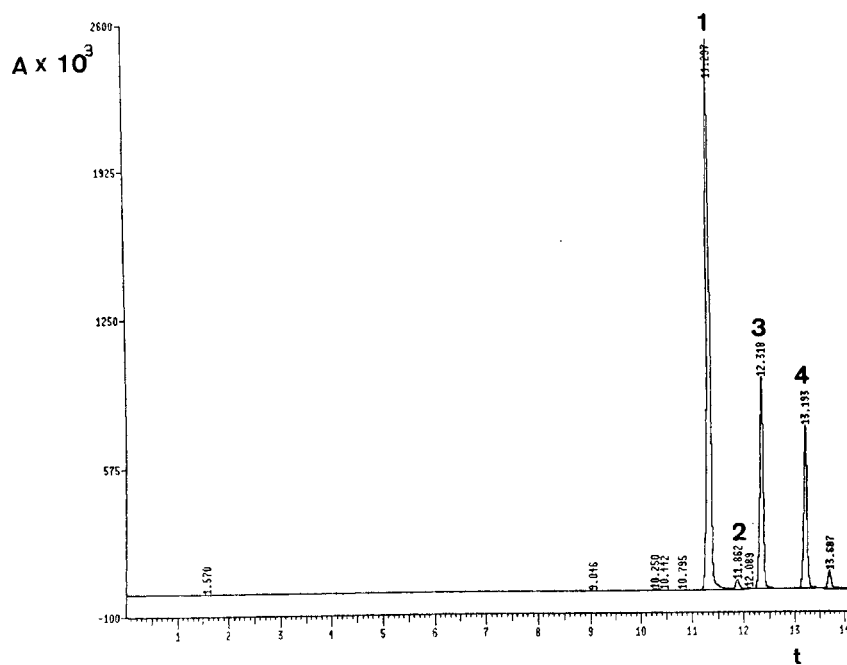


Fig. II.14 Fiorinal. 1. Paracetamol. 2. Fosfato de codeína. 3. Cafeína. 4. Ácido salicílico.



**III. ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE
CODEÍNA, ÁCIDO SALICÍLICO Y
CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA**



I. CARACTERÍSTICAS FLUORESCENTES.

En el presente capítulo, vamos a estudiar el comportamiento fluorescente de los analitos en estudio haciendo uso de la espectrofluorimetría convencional, al mismo tiempo que conoceremos como afectan determinadas variables a la intensidad relativa de fluorescencia.

I.1 Espectros de luminiscencia total.

Para la obtención de los espectros tridimensionales de cada componente, se prepararon disoluciones de acuerdo al procedimiento operatorio. A continuación se procedió al registro de los espectros y al establecimiento de mapas de contorno de fluorescencia bajo las condiciones que se recogen en la Tabla III.1.

TABLA III.1 Condiciones espectrales

Parámetro	Ac. Salicílico	Codeína	Piridoxina
Intervalo de emisión, nm	330-500	290-520	290-520
Intervalo de excitación, nm	200-300	200-270	200-270
$\lambda_{exc.}$, nm	4	2	2
Rendija de excitación, nm	3	3	3
Rendija de emisión, nm	5	5	5
Número de barridos	25	35	35

Asimismo, también se registró el espectro del blanco para ser restado en cada caso y obtener el espectro de luminiscencia total neto de cada especie y, al mismo tiempo, conseguir la eliminación de la línea Rayleigh. El resultado se muestra en las Figuras III.1 y III.2.

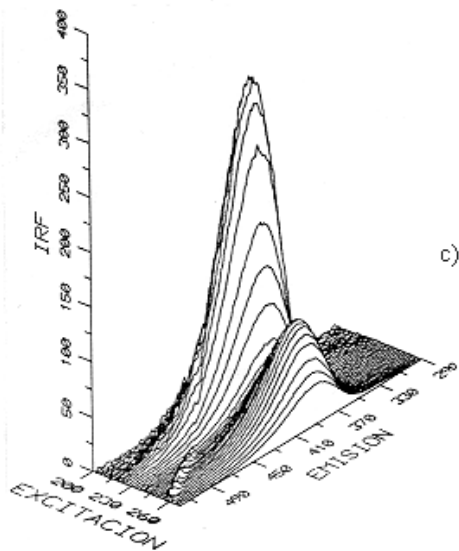
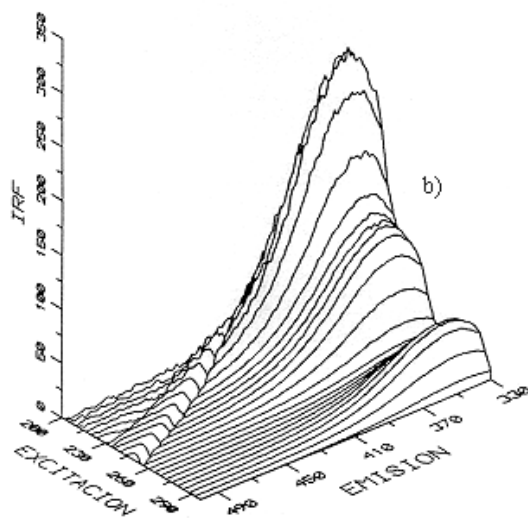
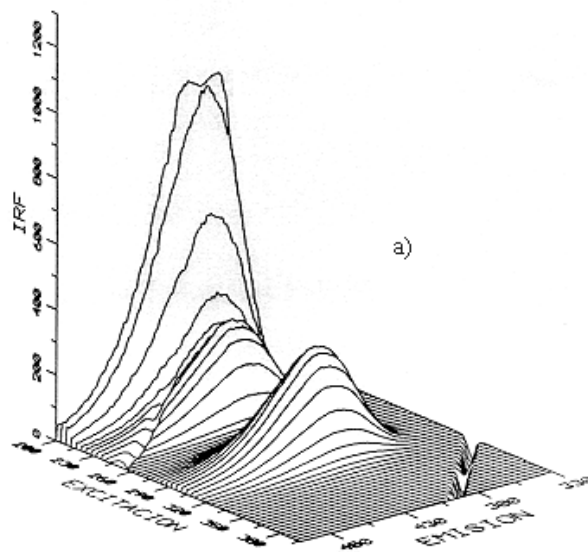


Fig. III. 1 Espectros tridimensionales. a) ácido salicílico. b) codeína. c) piridoxina

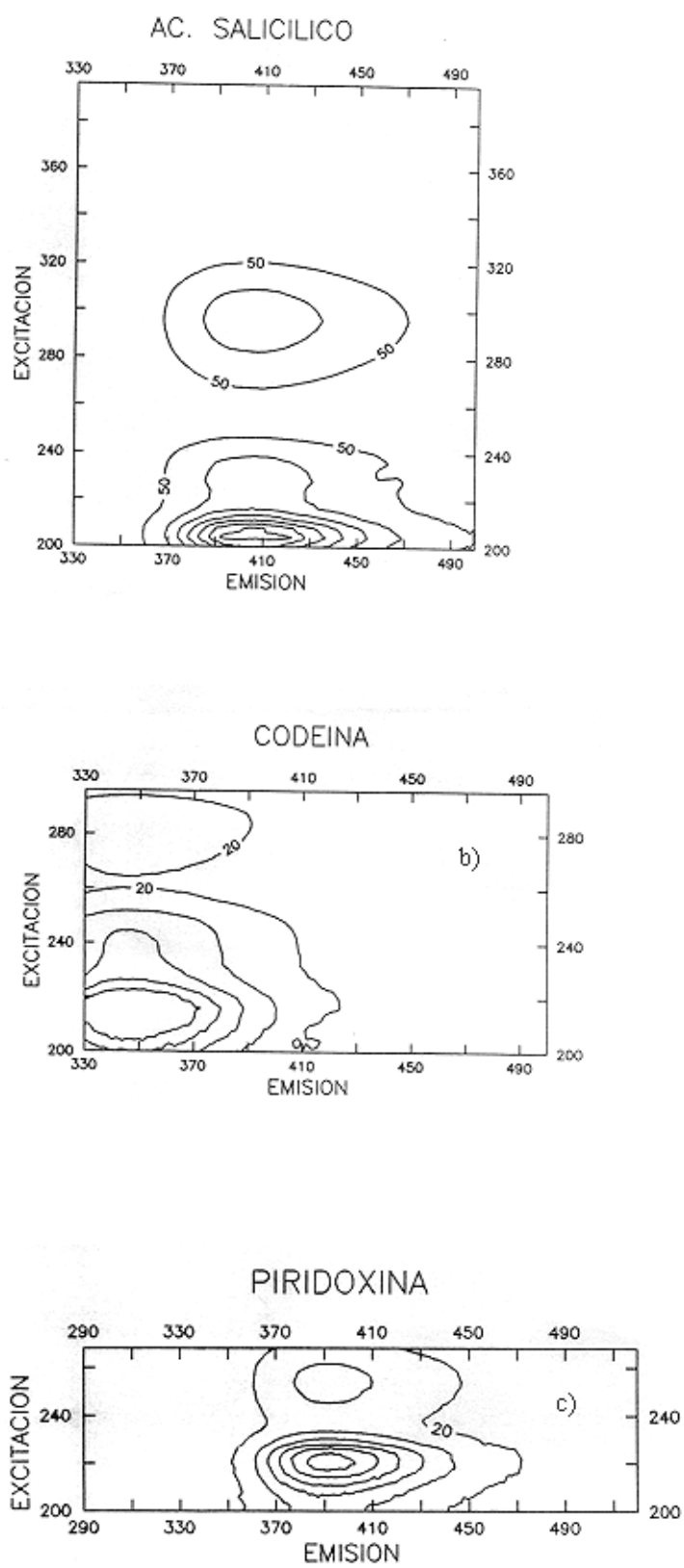


Fig. III. 2 Mapas de contorno. Intervalo de contorno: a) 150 b) 40 c) 50

I.2 Espectros bidimensionales.

Se obtuvieron los espectros bidimensionales más representativos de cada analito a partir de los espectros de luminiscencia total en las condiciones óptimas, y que se representan en las Figuras III.3 a III.5, de ellos se seleccionaron las longitudes de onda de trabajo, tanto de excitación como de emisión.

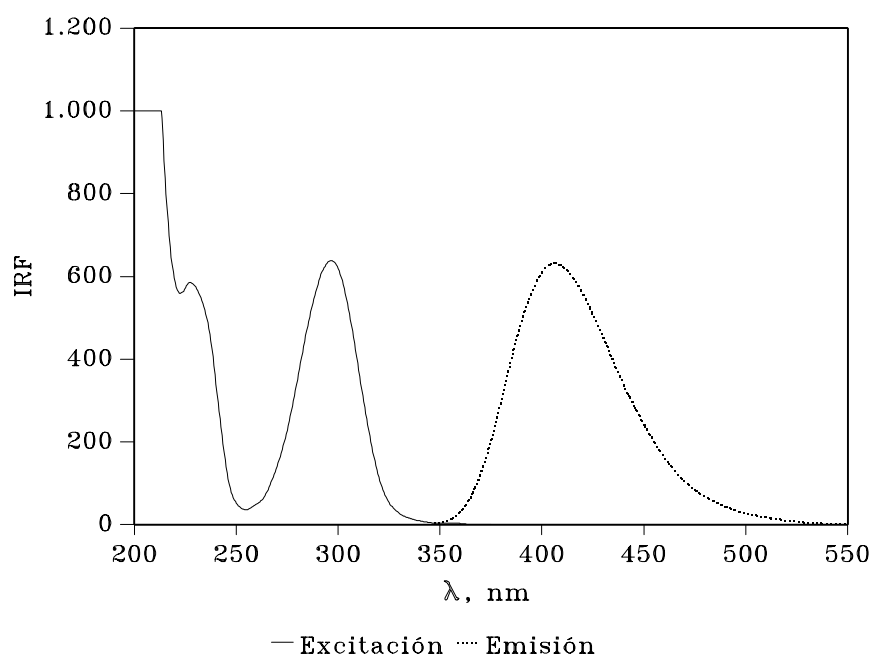


Fig. III.3 Espectros de emisión y excitación del ácido salicílico.
Concentración: 1 mgA^{-1}

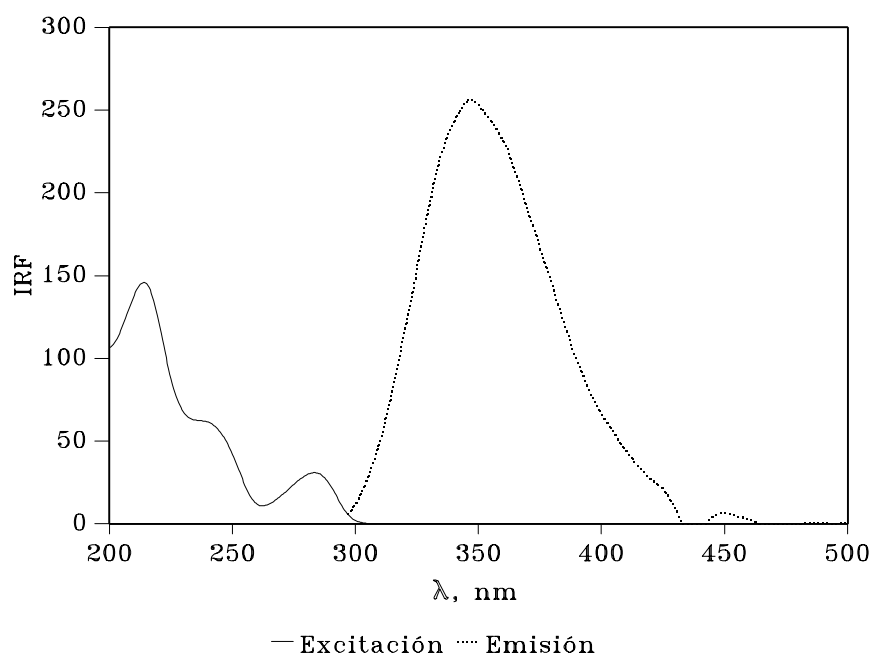


Fig. III.4 Espectros de emisión y excitación de codeína. Concentración: 5 mgA^{-1}

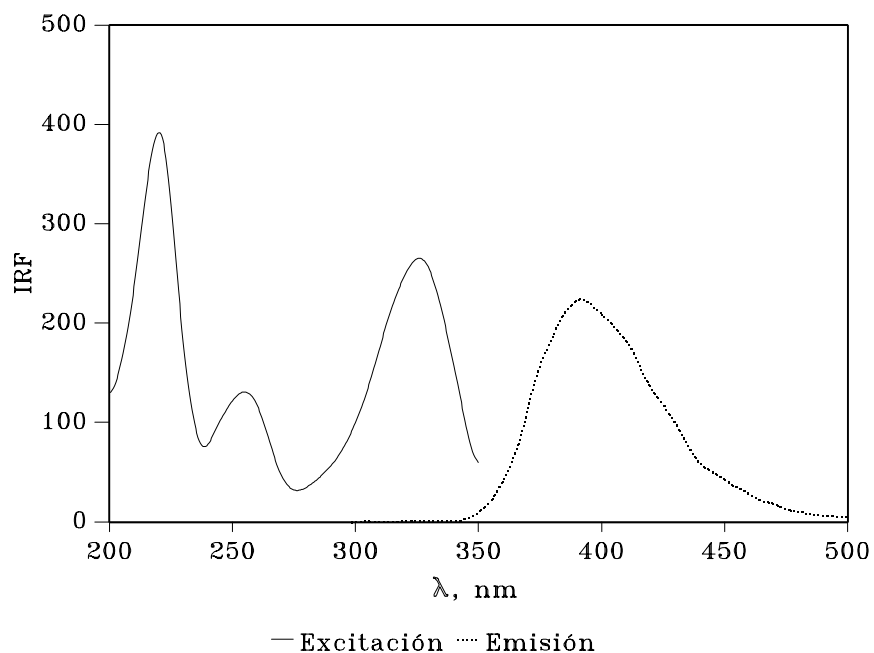


Fig. III.5 Espectros de emisión y excitación de piridoxina. Concentración: 1 mgA^{-1}

I.3 Elección de las longitudes de onda.

En la Tabla III.2, se recogen las distintas longitudes de onda de excitación y emisión de los máximos de los espectros correspondientes a: 1 mgA^{-1} de ácido salicílico, 5 mgA^{-1} de codeína y 1 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina, así como la relación entre la intensidad relativa de fluorescencia y la concentración de analito.

TABLA III.2 Características espectrales

Componente	$\lambda_{\text{exc.}}$ nm	$\lambda_{\text{em.}}$ nm	IRF / conc.
Ac. Salicílico	230, 297	405	634
Codeína	215 , 240, 283	350	52.09
Piridoxina	220 , 255, 325	395	209.5

De la observación de la tabla anterior y de las figuras, se puede deducir la proximidad existente entre las dos longitudes de onda de excitación máximas para codeína y piridoxina, 215 y 220 nm, respectivamente; mientras que la correspondiente al ácido salicílico presenta su máximo más alejado, para el valor de 297 nm de la longitud de onda.

En cuanto a la posición del máximo de la intensidad relativa de fluorescencia para la longitud de onda de emisión, las señales del ácido salicílico a 405 nm y de la piridoxina a 395 nm, se encuentran muy próximas entre sí; sin embargo, la codeína queda localizado a 350 nm. Las longitudes de onda de trabajo se han señalado en negrita en la Tabla III.2.

También cabe destacar la gran diferencia en el rendimiento relativo de fluorescencia del ácido salicílico respecto a los otros dos componentes, siendo esta diferencia mucho más acusada en el caso de la codeína. Hay que señalar que en experiencias posteriores la diferencia en el rendimiento de fluorescencia de los analitos, va a ser uno de los principales problemas para poner a punto métodos fluorimétricos que permitan la resolución de los sistemas ácido salicílico-codeína y clorhidrato de piridoxina-codeína a los niveles relativos de concentración a los que habitualmente se encuentran en los fármacos.

I.4 Condiciones instrumentales.

Con objeto de comprobar cómo afectan los parámetros instrumentales, rendijas de excitación y emisión, velocidad de barrido y factor de suavizado en la espectrofluorimetría convencional

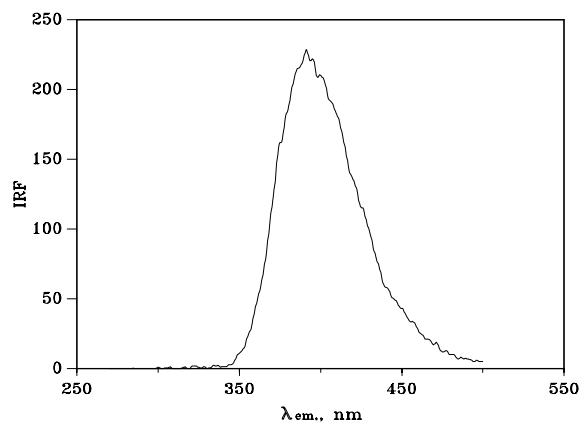
para los analitos en estudio, se registraron los espectros de emisión de acuerdo a lo establecido en el apartado I.1.3, concluyendo de los resultados obtenidos lo siguiente:

Que se debe elegir como rendija óptima de emisión el valor de 5 nm, pues para valores superiores la señal se satura con rapidez y no permite trabajar en un intervalo amplio de concentración para ambos, aunque la codeína en cambio, admite abrir la rendija de emisión hasta un valor de 8 nm, para su determinación.

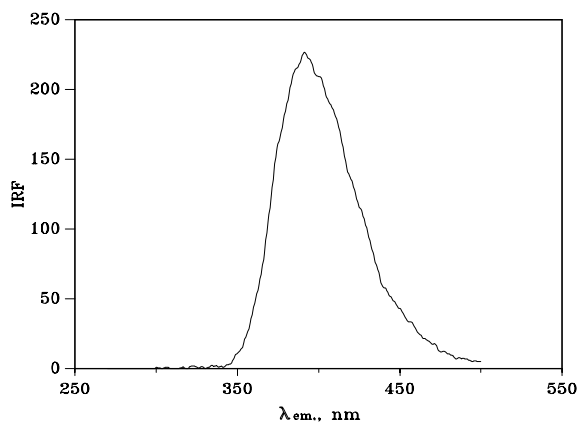
Como rendija óptima de excitación para los distintos analitos, se seleccionó 2,5 nm, que es la que al mismo tiempo origina la máxima señal de fluorescencia, posee menor ancho de banda y por tanto menor dispersión de la radiación luminiscente emitida.

Para el factor de suavizado, será necesario variar el orden de filtrado en función del componente a determinar, de modo que la elección óptima será 4/19 para ácido salicílico y clorhidrato de piridoxina, y 5/25 para codeína, tal como se deduce de los espectros que se muestran en las Figuras III.6 a III.8. Comprobándose que el filtrado no afecta a la intensidad de fluorescencia pero sí al ruido de los espectros.

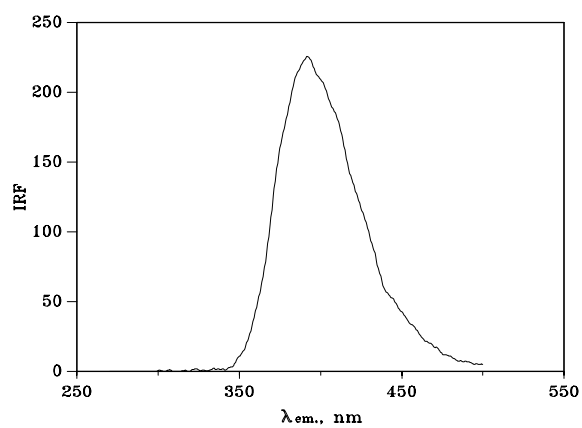
Y dado que los distintos valores de velocidad de barrido, no producen variación en los espectros de emisión de cada componente se utilizará 240 nm/minuto, valor que el programa usa por defecto.



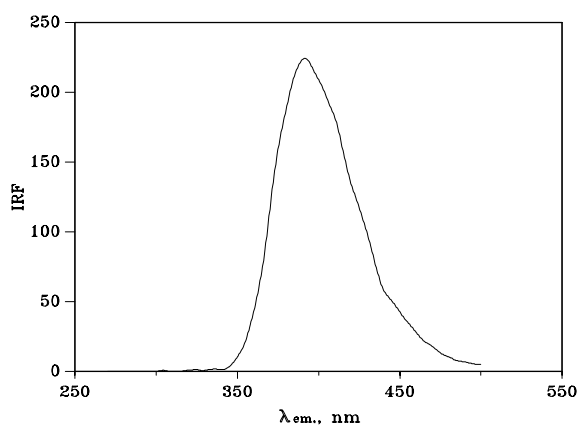
(a)



(b)

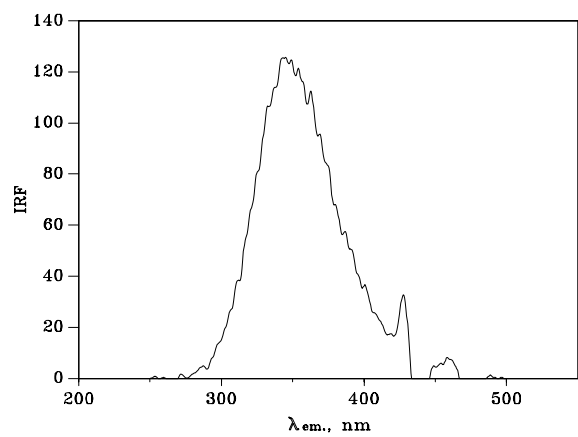


(c)

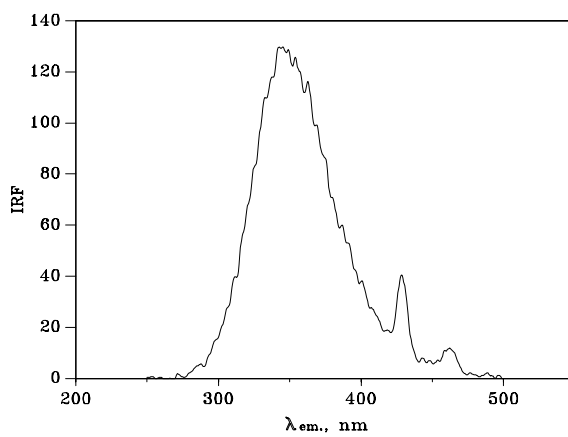


(d)

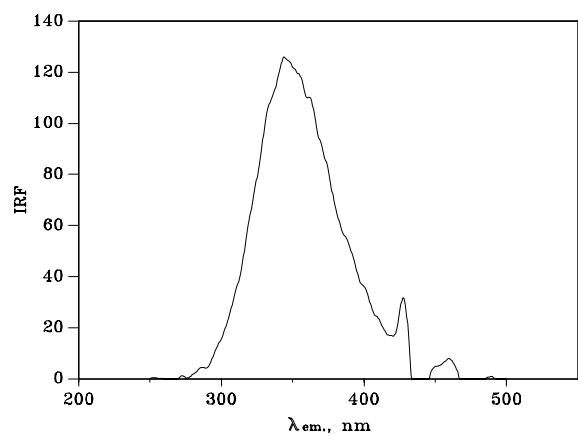
Fig. III.6 Efecto del factor de filtrado. Piridoxina. a) 5 puntos; b) 9 puntos; c) 13 puntos; d) 19 puntos



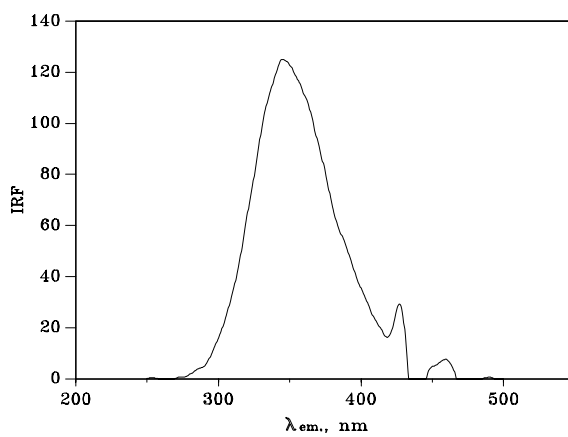
(a)



(b)

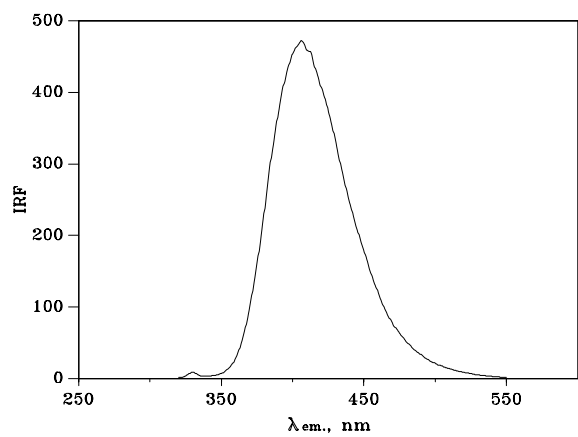


(c)

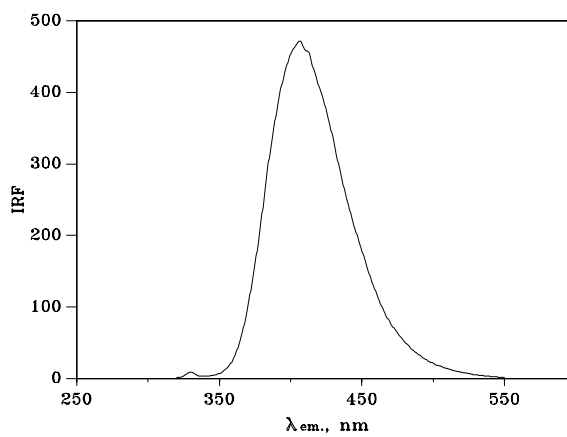


(d)

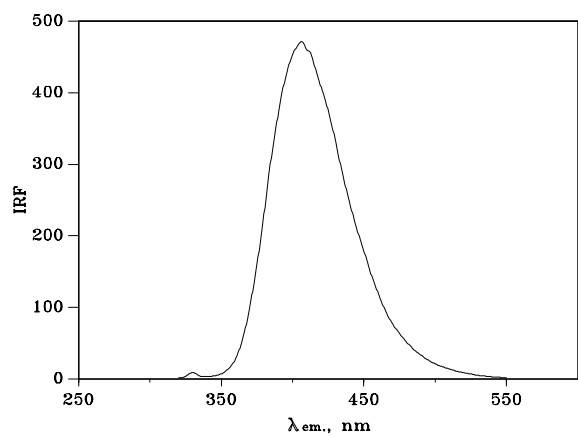
Fig. III.7 Efecto del factor de filtrado. Codeína. a) 5 puntos; b) 9 puntos; c) 13 puntos; d) 25 puntos



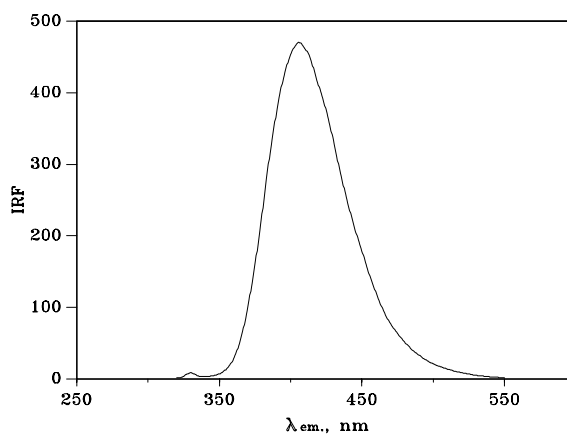
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. III.8 Efecto del factor de filtrado. Ác. salicílico. a) 5 puntos; b) 9 puntos; c) 13 puntos; d) 19 puntos

II. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MEDIDA DE LA SEÑAL ANALÍTICA.

En este apartado, vamos a estudiar la influencia de distintas variables sobre la señal analítica de fluorescencia en disolución, se estudian los siguientes factores.

- Influencia del pH.
- Influencia del volumen de disolución reguladora.
- Influencia de la fuerza iónica.
- Influencia de la temperatura.

II.1 Influencia del pH.

Con objeto de establecer la influencia que ejerce la acidez del medio sobre la señal de fluorescencia, se prepararon para cada componente en matraces de 100 mL, un volumen de disolución patrón de 100 mgA^{-1} de cada analito para que las concentraciones fueran en el volumen final de 1 mgA^{-1} de ácido salicílico, 5 mgA^{-1} de codeína y 2 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina, ajustándose convenientemente el pH entre los valores 2 y 12 para cada punto, con disoluciones de HCl y NaOH, de concentraciones conocidas.

A continuación se registraron los espectros de emisión y excitación en las condiciones operatorias de la Tabla III.3.

TABLA III.3 Condiciones de trabajo

Componente	Ac. Salicílico	Codeína	Piridoxina
$\lambda_{\text{exc.}}$, nm	297	215	220
$\lambda_{\text{em.}}$, nm	405	350	395
Intervalo de emisión, nm	330-500	250-500	375-450
Rendijas (exc. - em.), nm	2.5-5	2.5-5	2.5-5

En la Figura III.9 y en la Tabla III.4, se recogen los valores de fluorescencia medidos para cada valor de pH y analito.

TABLA III.4 Influencia del pH.

Ácido Salicílico	
pH	IRF
2.36	93.6
3.12	340.7
4.33	555.9
5.20	570.3
6.36	646.0
7.76	634.0
10.17	637.3
11.30	585.0

Codeína	
pH	IRF
2.29	250.5
3.96	250.5
5.50	223.0
6.65	260.5
7.11	264.0
7.91	241.4
9.92	232.4
11.76	223.4

Piridoxina	
pH	IRF
2.21	88.6
4.10	159.0
5.66	353.0
6.16	406.0
7.25	419.0
8.55	380.0
10.17	181.0
11.96	136.0

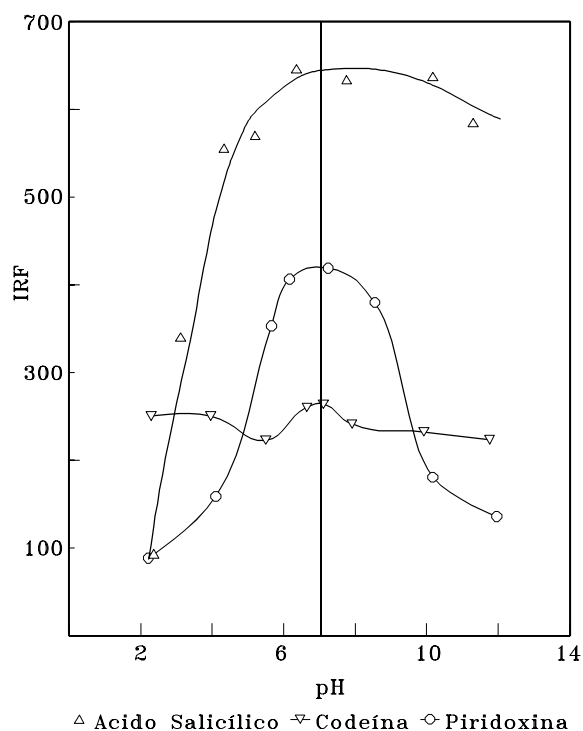


Fig. III.9 Influencia del pH.

En la figura III.9, se observa la variación en la señal con la acidez para cada analito. Se decide utilizar como valor de trabajo un pH de 7,0 para el cual el ácido salicílico que presenta el máximo de intensidad de fluorescencia se encuentra en forma iónica en disolución en base a sus dos valores de pK_a 2.97 y 13.40 respectivamente. El clorhidrato de piridoxina [339], en medio neutro, y dado que los pK_a son 5 y 8.96 se encontraría desprotonado pero sin carga, observándose su mayor intensidad de fluorescencia. Sin embargo la codeína (pK_a 8.2), apenas tiene variación con la acidez del medio y en disolución a pH 7 se encuentra en forma molecular, siendo la menos afectada de los tres analitos por el valor del pH.

De la observación de los espectros de excitación y emisión de cada analito podemos concluir que:

Los valores de las longitudes de onda de los máximos de los espectros de excitación, tanto del ácido salicílico como de la codeína, permanecen invariables en el intervalo de pH estudiado, mientras que en el caso de los correspondientes de la piridoxina presenta un desplazamiento batocrómico para valores ácidos y básicos de pH.

De la misma manera, los espectros de emisión presentan un comportamiento similar; ácido salicílico y codeína, mantienen invariables las posiciones de su longitud de onda de máxima fluorescencia, repitiendo la piridoxina el mismo desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de su máximo de emisión para valores de pH inferiores y superiores a 7.

II.2 Influencia de la concentración de disolución reguladora.

Una vez elegido el pH óptimo de trabajo, pH=7.0, se utiliza como disolución reguladora adecuada, el sistema $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ($C_0=0.1 \text{ M}$), dado que no existe diferencia alguna en el espectro y señal de fluorescencia en comparación con los obtenidos cuando se emplea HCl o NaOH para fijar el pH.

Para el estudio de la influencia del volumen de disolución reguladora, se prepararon en matraces aforados de 100 mL, disoluciones que contenían 1 mgA^{-1} de ácido salicílico, 2 mgA^{-1} de codeína y 1 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina, respectivamente y volúmenes crecientes de disolución reguladora de concentración $C_0=0.1 \text{ M}$, registrándose los espectros de emisión en las condiciones indicadas en la Tabla 3.3, apartado II.1 del presente capítulo.

Los resultados de fluorescencia se recogen en las Tabla III.5 y su representación gráfica en la Figura III.10.

TABLA III.5 Influencia del volumen de disolución reguladora

V (mL)	C_t	A.Salicílico IRF	pH	Codeína IRF	pH	Cl. Piridoxina IRF	pH
5	5.0×10^{-3}	514.3	6.22	132.5	7.10	235.0	6.49
10	1.0×10^{-2}	525.5	7.15	120.8	6.93	232.9	6.86
15	1.5×10^{-2}	521.5	7.11	117.5	6.99	237.6	6.88
20	2.0×10^{-2}	513.3	7.15	122.3	7.10	238.8	6.93
25	2.5×10^{-2}	523.3	7.09	95.9	7.08	237.5	6.88

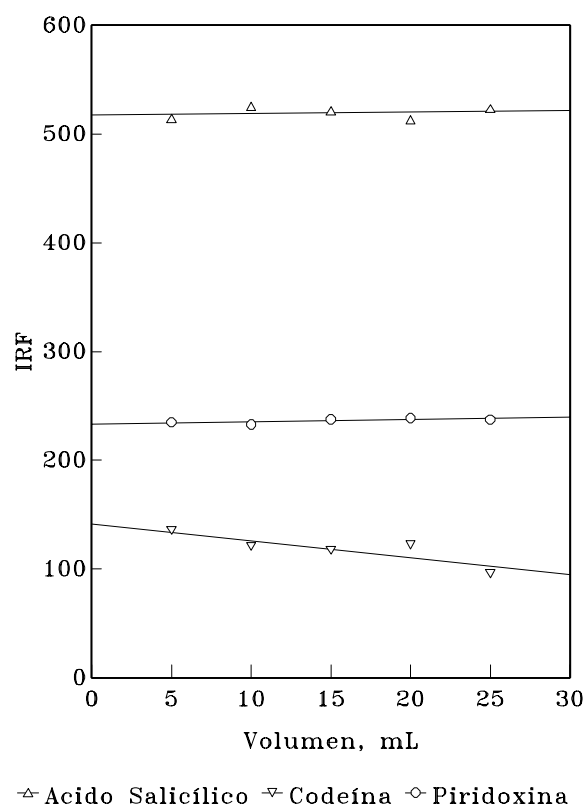


Fig.III.10 Influencia del volumen de disolución reguladora.

El análisis de los resultados indica que el volumen de disolución reguladora no presenta una influencia notable sobre los valores de intensidad de fluorescencia, salvo para codeína, habiendo elegido un volumen de 10 mL, es decir, una concentración ($C_T = 0.01$ M) para experimentos posteriores, el cual asegura el pH óptimo seleccionado para el sistema.

II.3 Influencia de la fuerza iónica.

Para estudiar la influencia que ejerce la fuerza iónica sobre el medio, se selecciona el NaCl como electrolito fuerte.

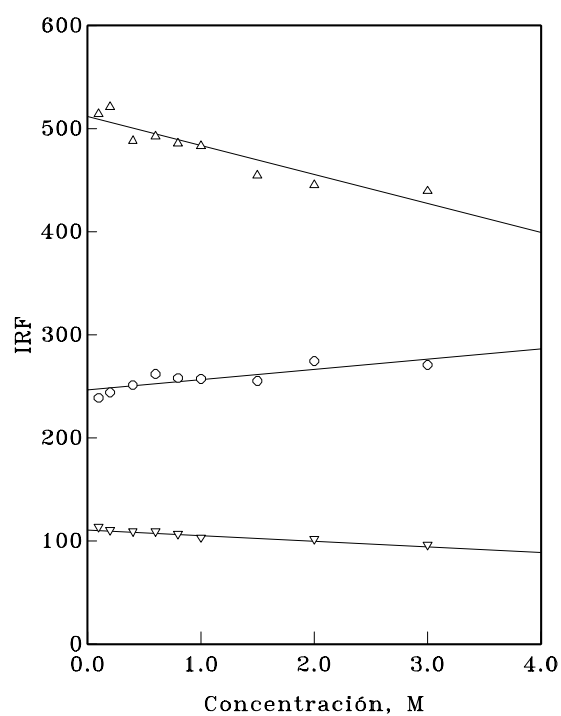
Al efecto, se prepararon en matraces de 100 mL, disoluciones que contenían, volumen de disolución patrón de 100 mgA^{-1} de manera que las concentraciones en el volumen final fueron 1 mgA^{-1} de ácido salicílico, 2 mgA^{-1} de codeína y 1 mgA^{-1} de piridoxina, 10 mL de disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ de $C_0=0,1 \text{ M}$ y volúmenes crecientes de NaCl 5 M.

Los espectros de emisión se registraron en las condiciones de la Tabla III.3, apartado II.1 de esta memoria.

En la Tabla III.6 se recoge la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada analito para los distintos valores de fuerza iónica de todos los iones presentes en disolución y en la Figura III.11, se muestra la gráfica correspondiente; de donde se deduce que el NaCl influye con un efecto negativo en la intensidad de fluorescencia del ácido salicílico que se justifica dado que de los tres es el analito que tiene mayor carácter ácido y está más afectado por un aumento de concentración del electrolito fuerte, disminuyendo pues el valor de la primera constante de acidez, mientras que codeína y piridoxina, apenas sufren alteración.

TABLA III.6 Influencia de la concentración de NaCl

[NaCl]	V (mL)	: (M)	A. Salicílico IRF	Codeína IRF	Cl.Piridoxina IRF
0.1	2	0.075	515.5	112.7	239.1
0.2	4	0.125	522.6	109.6	244.4
0.4	8	0.225	489.4	108.6	251.5
0.6	12	0.325	494.2	108.6	262.2
0.8	16	0.425	487.0	106.0	258.3
1.0	20	0.525	484.7	102.4	257.6
1.5	30	0.775	456.2	101.8	255.6
2.0	40	1.025	446.8	100.9	274.9
3.0	60	1.525	440.9	95.9	270.9



△ Acido Salicílico ▽ Codeína ○ Piridoxina

Fig.III.11 Influencia de la concentración de NaCl

II.4 Influencia de la temperatura.

En el estudio de la influencia de la temperatura se prepararon disoluciones de los tres analitos, de concentraciones 0.5; 2.0 y 5.0 mgA⁻¹ de ácido salicílico, clorhidrato de piridoxina y codeína respectivamente, registrándose los espectros de emisión en las condiciones operatorias que se recogen en la Tabla III.3 apartado II.1.

Las Tablas III.7 y III.8, muestran la variación en la intensidad de fluorescencia con el aumento y descenso respectivamente de temperatura realizados con la ayuda de un termostato y se representan gráficamente en las Figuras III.12 y III.13.

De la observación de dichas figuras se concluye como era de esperar que la temperatura afecta a la IRF de los tres componentes y que tampoco se observan en los valores de fluorescencia ciclos de histéresis al recuperar la temperatura sus valores. El más afectado por los cambios de temperatura es la piridoxina [146], obligándonos a fijar una temperatura de trabajo de 20.0 ± 0.5°C, próxima a la temperatura ambiente y fácil de conseguir con la ayuda de un termostato.

TABLA III.7 Influencia del aumento de temperatura.

T,°C	A. Salicílico IRF	Codeína IRF	Cl. Piridoxina IRF
0	342.4	179.4	603.0
5	337.4	169.9	543.5
10	323.4	166.8	518.4
15	325.1	163.6	491.4
20	312.1	161.2	455.8
25	293.4	149.9	384.4
30	275.3	142.8	328.7
35	260.2	129.0	280.1
40	248.3	122.5	248.9
45	231.0	108.3	210.5
50	218.0	111.3	168.2
55	203.0	105.6	148.5
60	190.4	98.3	127.2
65	178.5	110.2	91.1
70	168.6	90.7	85.8

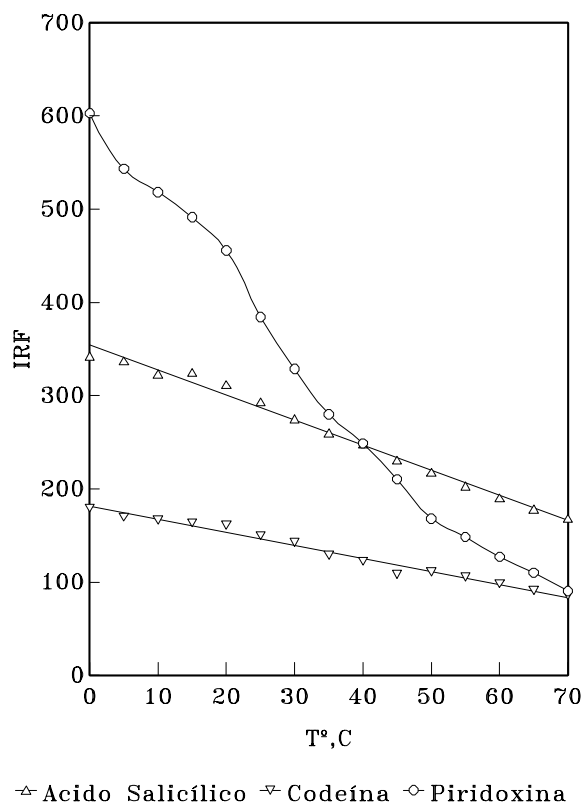
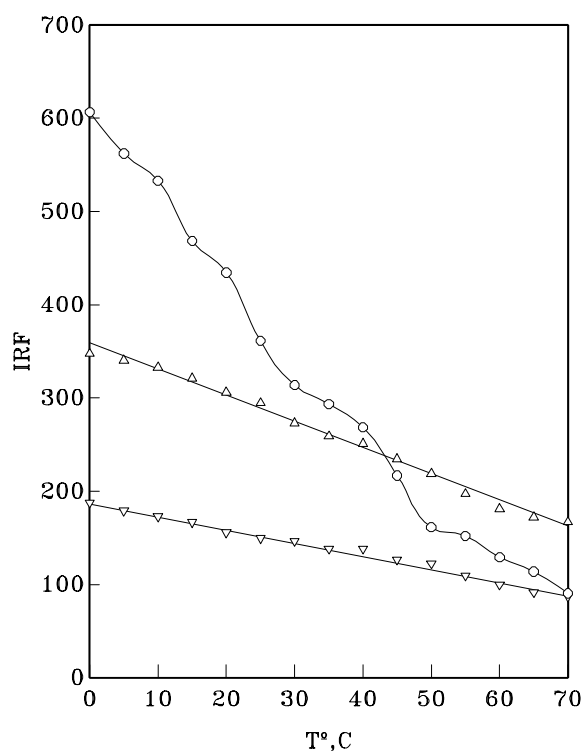


Fig. III.12 Influencia del aumento de temperatura

TABLA III.8 Influencia del descenso de temperatura.

T,°C	A. Salicílico IRF	Codeína IRF	Cl. Piridoxina IRF
0	168.5	90.7	85.8
5	173.7	113,8	90.3
10	182.5	129.2	98.3
15	198.6	152.1	108.0
20	220.1	161.5	121.2
25	236.0	216.8	125.3
30	252.4	268.5	137.0
35	260.4	293.5	137.0
40	274.5	313.9	145.1
45	296.1	361.4	148.3
50	307.5	434.6	154.4
55	322.5	468.5	165.5
60	334.4	533.1	171.7
65	342.0	562.4	177.6
70	349.0	606.7	186.4



△ Acido Salicílico ▽ Codeína ○ Piridoxina

Fig.III.13 Influencia del descenso de temperatura

III. RESUMEN DE OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

En la Tabla III.9 se resumen los valores óptimos de las variables encontrados en las experiencias anteriores y que a partir de ahora, serán utilizadas para la determinación de Codeína, Ácido Salicílico y Clorhidrato de Piridoxina, en todas las experiencias a realizar.

TABLA III.9 Resumen de la optimización de variables.

Variable	Codeína	Ac. Salicílico	Cl. Piridoxina
pH	7	7	7
Disolución reguladora	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{-2}$ 0.1 M, 10 mL	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{-2}$ 0.1 M, 10 mL	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{-2}$ 0.1 M, 10 mL
Fuerza iónica	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-2}	2.5×10^{-2}
Temperatura	20.0 ± 0.5 °C	20.0 ± 0.5 °C	20.0 ± 0.5 °C



**IV. MÉTODOS PROPUESTOS PARA
DETERMINAR ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA
MEDIANTE TÉCNICAS FLUORIMÉTRICAS**



I. CARACTERÍSTICAS FLUORIMÉTRICAS DEL SISTEMA ÁCIDO SALICÍLICO- CODEÍNA.

En el estudio de determinación de varios componentes, mediante técnicas fluorimétricas, siempre es preciso conocer en primer lugar y de una manera total, el comportamiento fluorescente tanto de cada componente, como de sus mezclas; siendo necesario para ello, la obtención del espectro de luminiscencia total de los componentes y de la mezcla; y a partir de él, abordar la determinación por la técnica de fluorimetría que obtenga mejor resolución.

Espectros de luminiscencia total.

Los espectros de luminiscencia total, correspondientes a cada componente del sistema, fueron obtenidos en el capítulo anterior. Ahora se ha realizado el espectro de la mezcla ácido salicílico y codeína, a partir de una disolución de concentraciones 0.5 y 8 mgA⁻¹ respectivamente, en las condiciones experimentales de la Tabla III.3 (Capítulo III) y en las mismas condiciones, se obtuvo el espectro del blanco. Los espectros netos de los componentes aislados se muestran en las Figuras III.1 a III.3 (capítulo II), y el correspondiente a la mezcla en la Figura IV.1.

Mapas de contorno.

A partir de los experimentos anteriores se obtienen las curvas de nivel o topogramas, Figuras IV.2, del sistema en estudio, confirmando que no existe desplazamiento de las longitudes de onda de excitación y de emisión máximos para cada componente de la mezcla, siendo para codeína $\lambda_{exc.} = 215 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 350 \text{ nm}$ y para el ácido salicílico $\lambda_{exc.} = 297 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 405 \text{ nm}$.

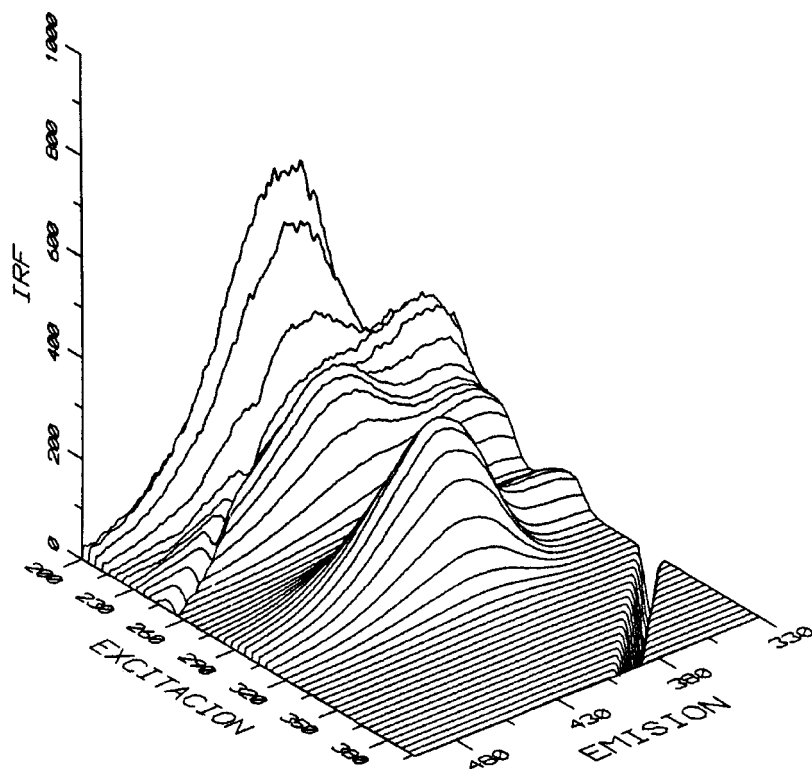


Fig.IV.1 Espectro tridimensional de la mezcla (ácido salicílico y codeína)

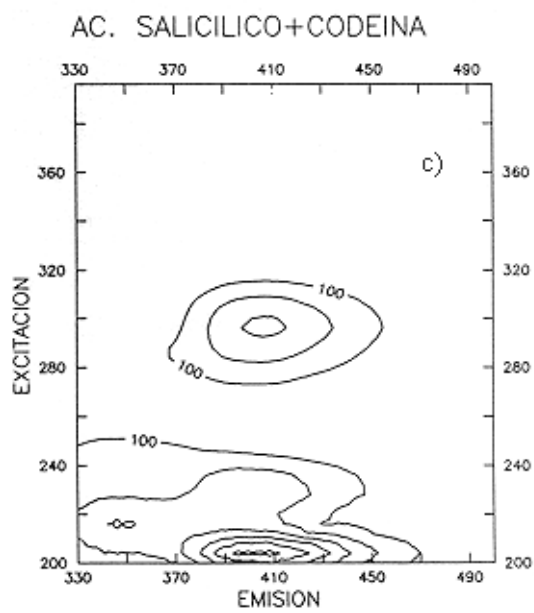
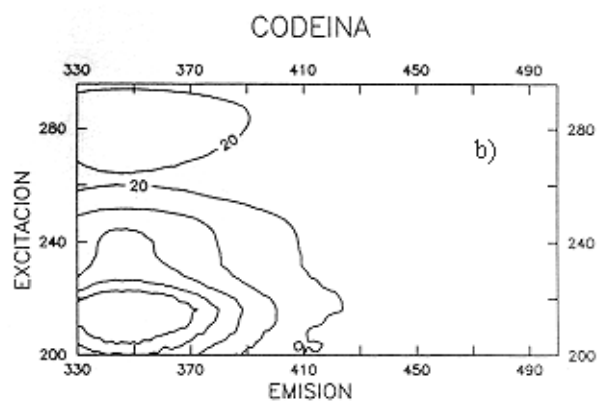
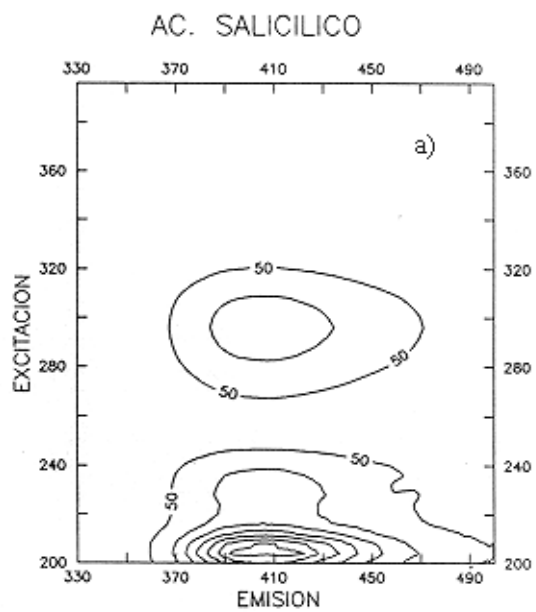


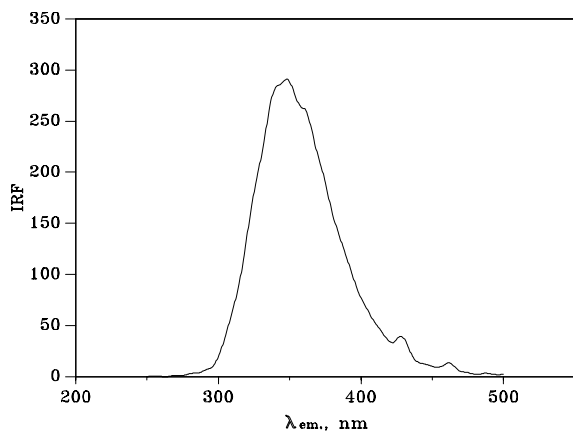
Fig. IV. 2 Mapas de contorno. Intervalo de contorno: a) 150, b) 40, c) 100

I.1. Espectrofluorimetría convencional y derivada.

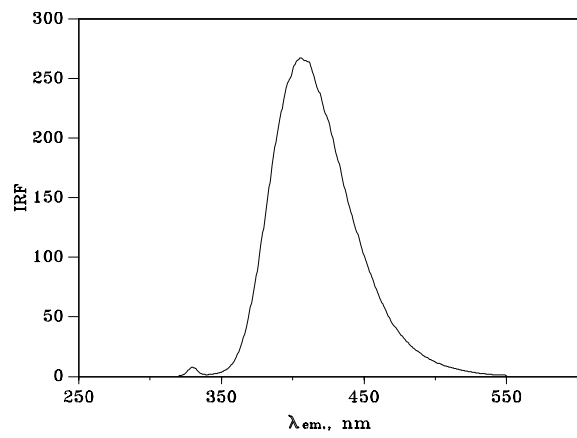
a) Espectros de emisión

A partir de los valores de longitudes de onda de excitación seleccionadas para cada componente en el capítulo III, se registraron los espectros de emisión de la mezcla en ambas condiciones: $\lambda_{exc.} = 215$ nm (codeína) y $\lambda_{exc.} = 297$ nm (ácido salicílico), según el procedimiento operatorio. De la observación de las mismas pareció razonable que las condiciones elegidas para los espectros bidimensionales de la mezcla, fueran las óptimas de la codeína, ya que en el espectro de las condiciones del ácido salicílico, no había señal para identificar la codeína, además este componente del sistema posee una fluorescencia nativa muy inferior a la del ácido salicílico y también porque la proporción relativa de codeína respecto a ácido salicílico en los fármacos donde se aplicarán dichos métodos, es al mismo tiempo muy baja.

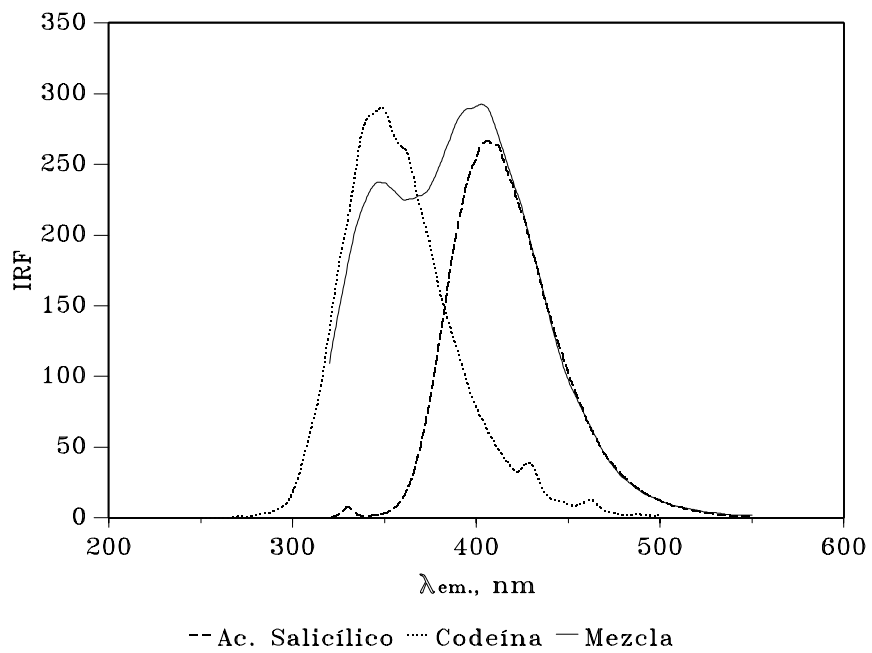
Para concluir, en la Figura IV.3 se muestran los espectros de emisión $\lambda_{exc.} = 215$ nm citados anteriormente de codeína, ácido salicílico y la mezcla de ambos. De su observación, se deduce que la resolución del sistema no es viable, en principio, por fluorimetría convencional, dado el solapamiento espectral, pues aunque el ácido salicílico no emite para la longitud de onda de máxima emisión de la codeína a 350 nm, a la inversa no ocurre igual, pues a 405 nm, longitud de onda de máxima emisión del ácido salicílico, la codeína presenta fluorescencia y conllevaría a errores en la determinación del ácido salicílico, errores que aumentarían de forma proporcional a la concentración de codeína presente.



(a)



(b)



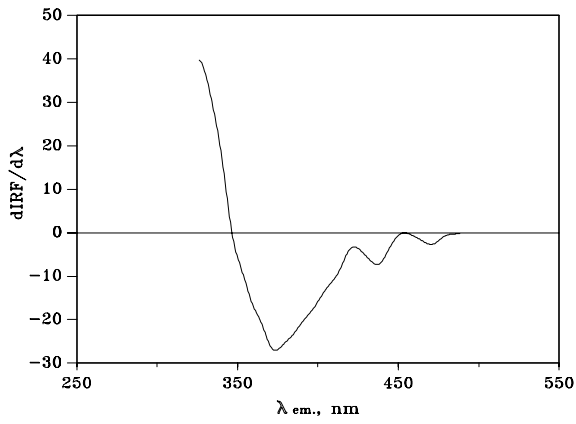
(c)

Fig. IV.3 Emisión. a) codeína; b) ácido salicílico; c) codeína, ac. salicílico y su mezcla.

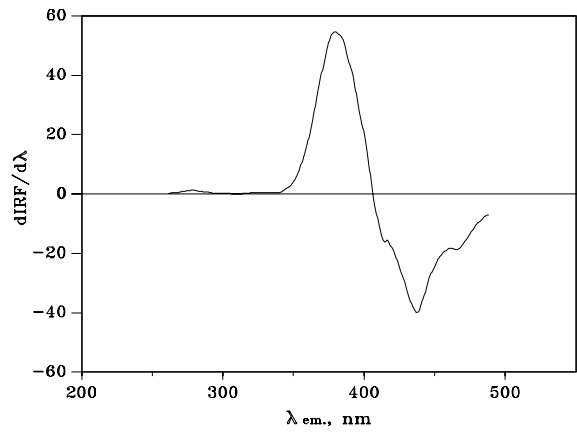
b) Espectros de emisión derivados.

Para continuar el estudio dirigido a la resolución de la mezcla codeína y ácido salicílico, que en principio no se podría resolver mediante la técnica fluorimétrica anterior, espectrofluorimetría de emisión, vamos a abordar, la resolución mediante la técnica de derivadas del espectro de emisión, que ofrece mayor capacidad de resolución.

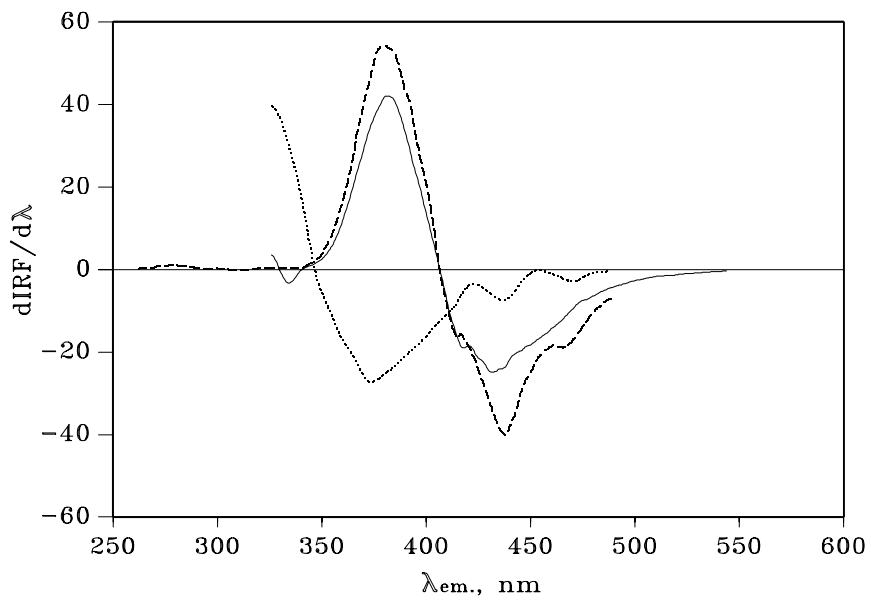
Se procedió a realizar la primera derivada de los espectros de emisión, para λ_{exc} de 215 nm de los componentes individuales y la mezcla, Figura IV.4, pero la resolución por este método tampoco era posible, pues solo se conseguía medir un componente y también afectado de cierto error. En las sucesivas derivadas de segundo y tercer orden, no se ofrecía ninguna posibilidad de solución al sistema.



(a)



(b)



-- Ac. Salicílico ···· Codeína — Mezcla

(c)

Fig. IV.4 Emisión derivado. a) codeína; b) ácido salicílico; c) codeína, ác. salicílico y su mezcla

I.2. Espectrofluorimetría sincrónica y sincrónica derivada.

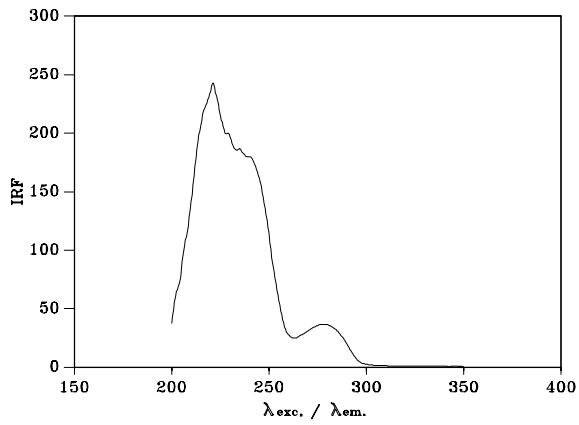
a) Espectros sincrónicos

Para la aplicación de esta técnica fluorimétrica, en la determinación de ácido salicílico y codeína, es necesario el empleo de las gráficas de curvas de nivel (topogramas) obtenidos de los espectros de fluorescencia total, para seleccionar la diferencia de longitudes de onda de excitación y emisión más adecuada, realizando a continuación la optimización de la misma.

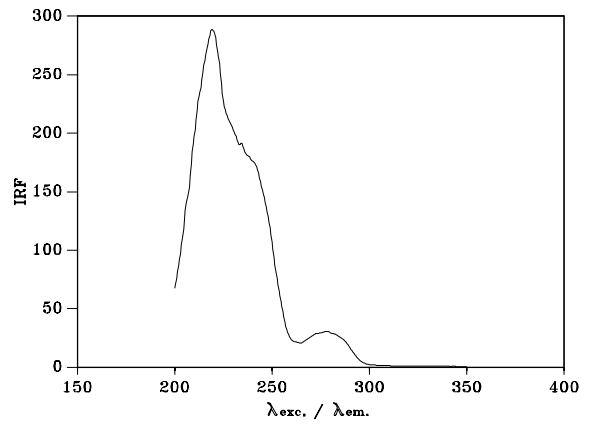
Se prepararon tres disoluciones que contenían respectivamente, 0.5 mgA^{-1} y 8 mgA^{-1} de ácido salicílico y codeína y la mezcla de ambos.

Los espectros para las distintas λ se registraron empleando el procedimiento operatorio y se muestran en las Figuras IV.5 a IV.8. En el eje de abscisas se han recogido solamente los valores de λ_{exc} , los correspondientes valores a λ_{emi} , se obtienen sumando a aquellos el correspondiente valor de λ , indicado al pie de las figuras. La posición del máximo se mantiene constante para el ácido salicílico e igual a 293 nm; para la codeína se observa un ligero desplazamiento de la posición de su máximo el cual muestra los valores mayores de señal para $\lambda = 125 \text{ nm}$ y $\lambda = 130 \text{ nm}$, a una longitud de onda de 215 nm. Escogemos una diferencia de longitudes de onda de $\lambda = 125 \text{ nm}$ para posteriores experiencias y leeremos las señales a 215 nm y 293 nm respectivamente para codeína y ácido salicílico.

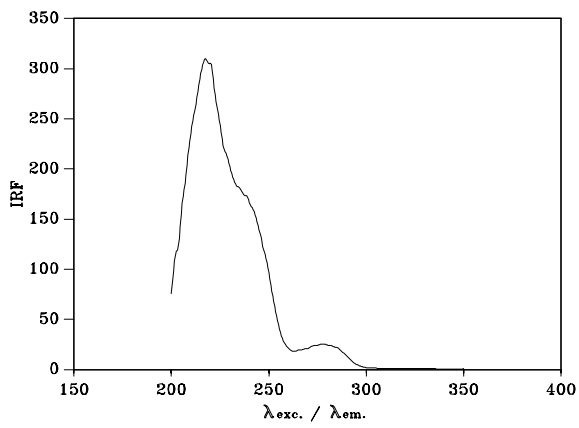
Los valores de la señal de los máximos para las distintas diferencias de longitudes de onda ensayadas, se recogen en la Tabla IV.1



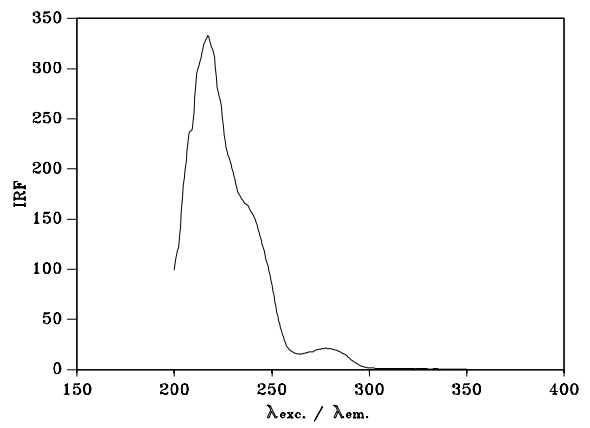
(a)



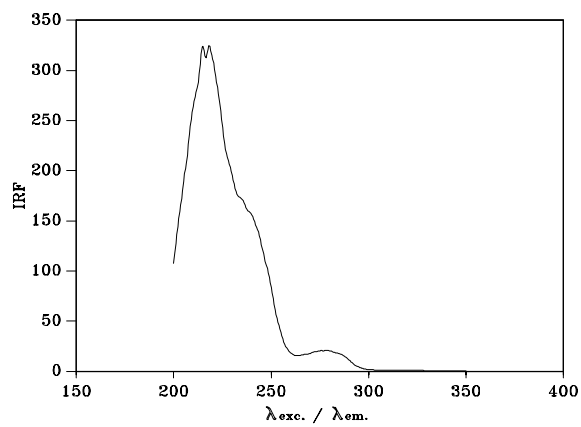
(b)



(c)

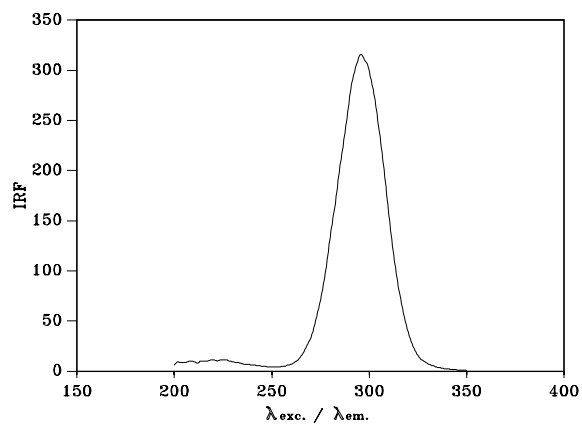


(d)

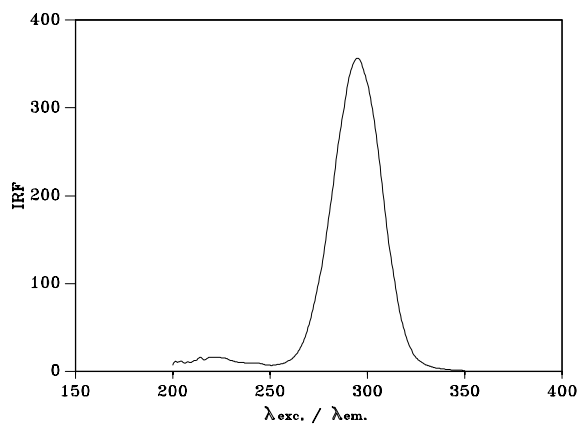


(e)

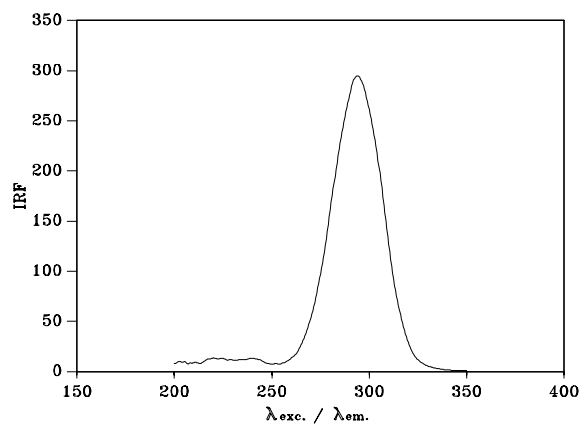
Fig.IV.5 Optimización de) 8 de los espectros sincrónicos de codeína.
a) 110; b) 115; c) 120; d) 125; e) 130.



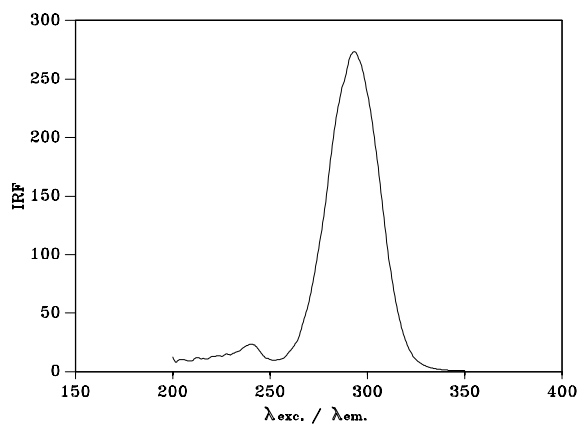
(a)



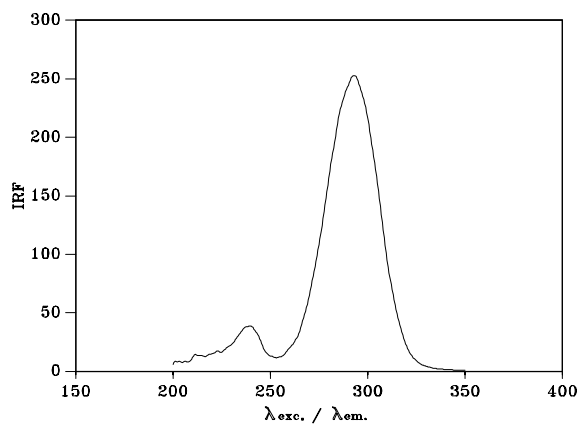
(b)



(c)

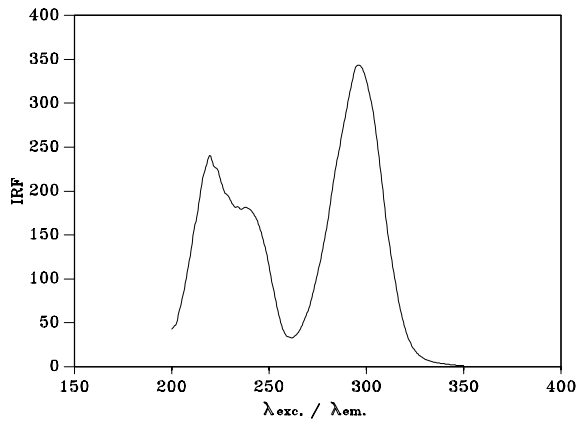


(d)

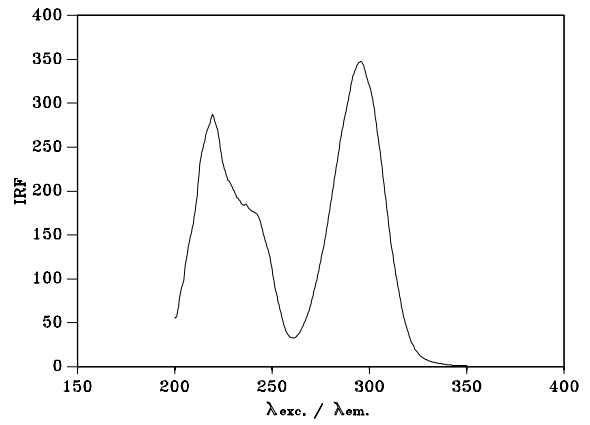


(e)

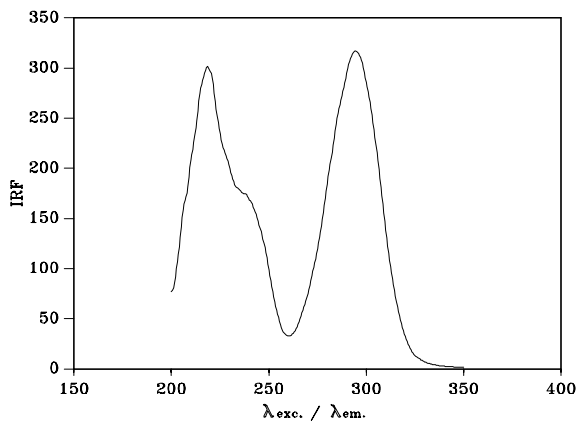
Fig.IV.6 Optimización de λ_{exc} de los espectros sincrónicos de ácido salicílico.
a) 110; b) 115; c) 120; d) 125; e) 130.



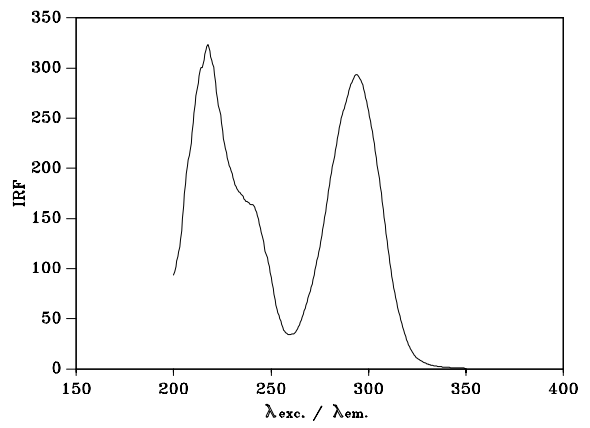
(a)



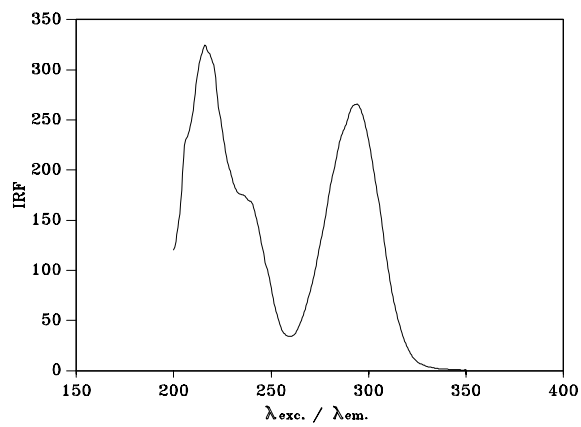
(b)



(c)

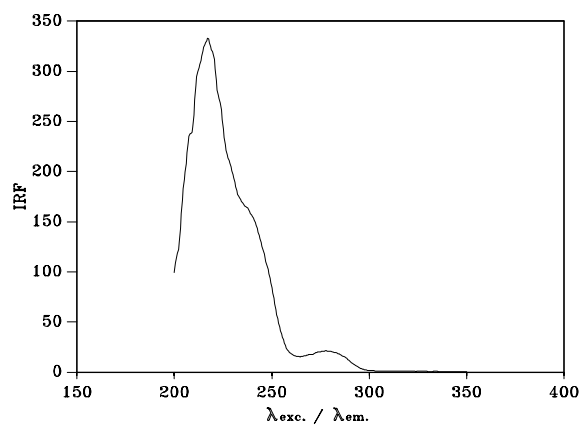


(d)

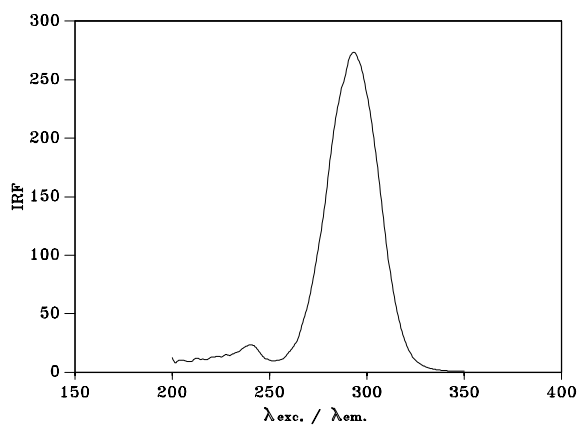


(e)

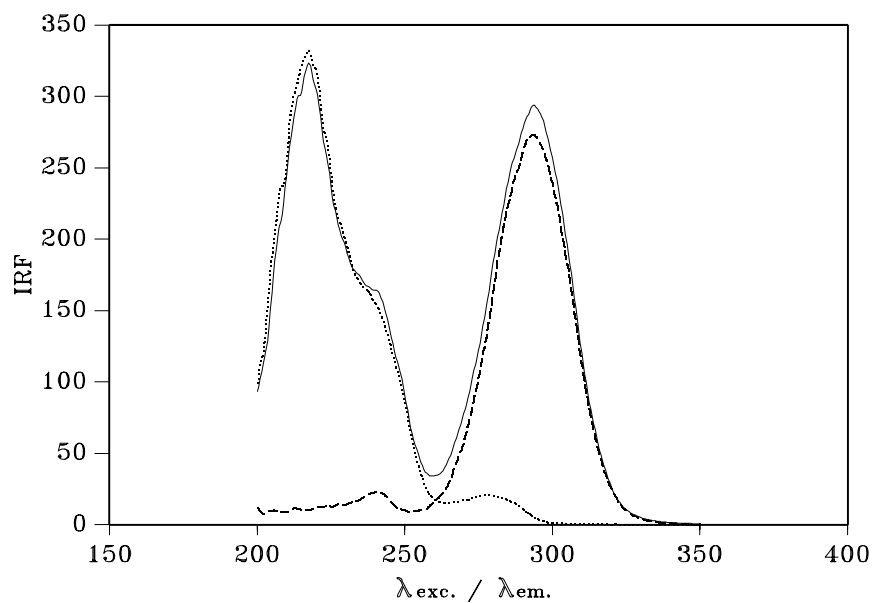
Fig.IV.7 Optimización de δ de los espectros sincrónicos de la mezcla cafeína y ácido salicílico.
a) 110; b) 115; c) 120; d) 125; e) 130.



(a)



(b)



-- Ac. Salicílico ···· Codeína — Mezcla

(c)

Fig. IV.8 Sincrónico. a) codeína; b) ácido salicílico; c) codeína, ác. salicílico y su mezcla.

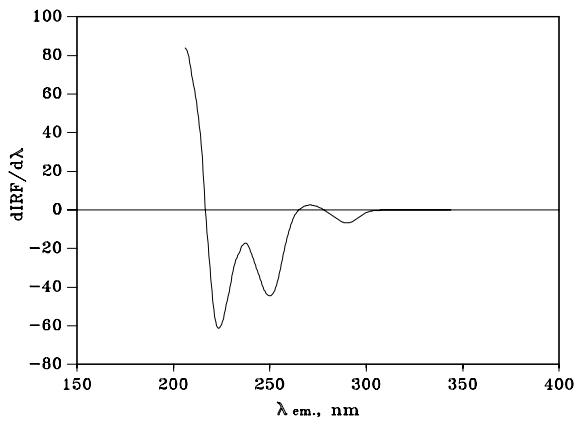
TABLA IV.1 Selección de δ

Sincrónico δ	Mezcla	
	Codeína IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 215 \text{ nm}/340 \text{ nm}$	Ac. Salicílico IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 293 \text{ nm}/418 \text{ nm}$
110	205.5	327.3
115	257.0	339.8
120	281.1	314.8
125	325.5	292.7
130	320.5	266.4

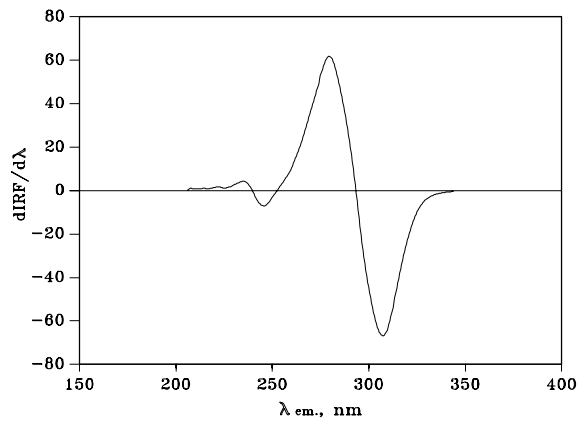
De la comparación de las figuras para los diferentes δ nm, se observa que el solapamiento espectral ha disminuido considerablemente con respecto a los espectros bidimensionales de la Figura IV.3, pero la resolución aún no es completa. También se aprecia que la aditividad de las señales no es total en toda la región estudiada y se produce solapamiento en algunas zonas de la misma. No hay realmente un efecto apreciable de esta variable sobre el grado de solapamiento y elegimos 125 nm de δ para posteriores experiencias, Fig.IV.8.

b) Espectros sincrónicos derivados.

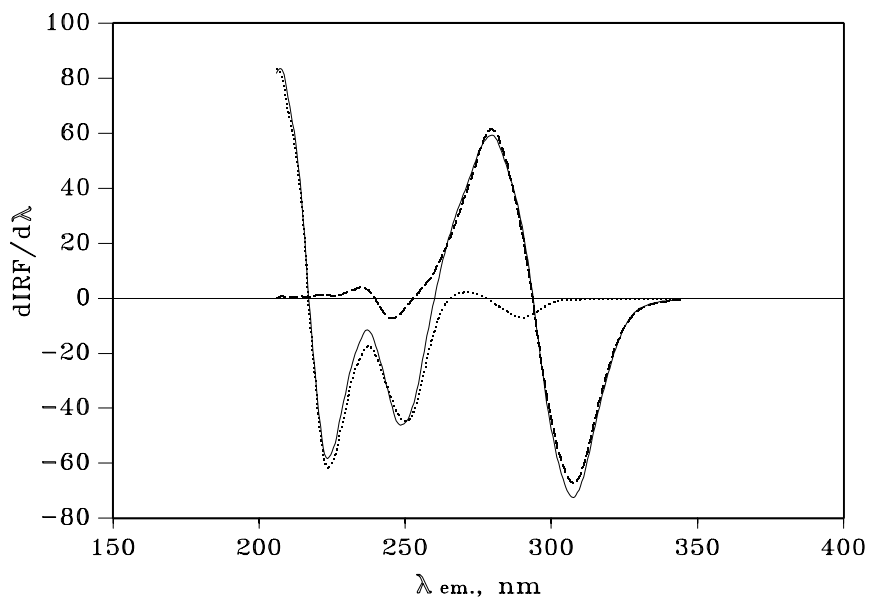
Con el fin de completar el estudio del comportamiento de la mezcla codeína y ácido salicílico, para las distintas técnicas de fluorimetría, vamos a intentar, por último, la resolución mediante la técnica de derivadas del espectro sincrónico. La Figura IV.9, muestran los espectros derivados de primer orden del sincrónico, respectivamente, para cada componente aislado y su mezcla. Se elige el de primer orden ya que las derivadas segunda y tercera no mejoran la resolución. No obstante, en la primera derivada, se sigue observando en algunas zonas ausencia de aditividad de las señales, por lo que la resolución del sistema podrá ir aún afectada de un cierto error que no será remediado con esta técnica.



(a)



(b)



-- Ac. Salicílico ···· Codeína — Mezcla

(c)

Fig.IV.9 Sincrónico derivado. a) codeína;b) ácido salicílico; c)codeína, ácido salicílico y su mezcla.

I.3. Selección de las longitudes de onda para cada técnica fluorimétrica.

Para finalizar el estudio de las distintas técnicas fluorimétricas que podían ofrecer una solución en la determinación conjunta de ácido salicílico y codeína, se seleccionan las longitudes de onda más favorables para cada una y se recogen a continuación en la Tabla IV.2.

TABLA IV.2 Selección de longitudes de onda

Técnica Fluorimétrica	Codeína	Ac. Salicílico
Emisión	$\lambda_{em.} = 350 \text{ nm}$	$\lambda_{em.} = 405 \text{ nm}$
Sincrónica	$\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 215 \text{ nm}/340 \text{ nm}$	$\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 293 \text{ nm}/418 \text{ nm}$
Sincrónica derivada	$\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 250 \text{ nm}/375 \text{ nm}$	$\lambda_{exc.}/\lambda_{em.} = 265 \text{ nm}/390 \text{ nm}$

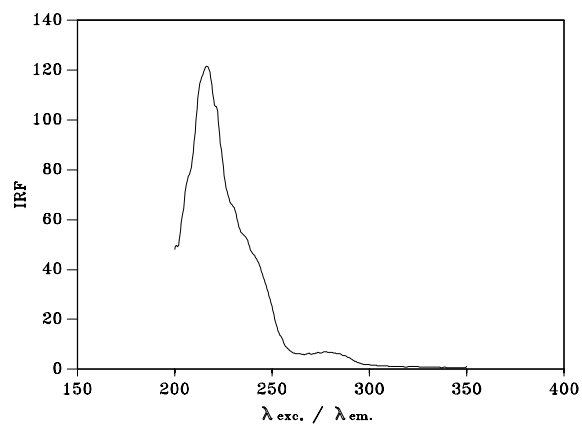
Podemos concluir, que entre las diferentes técnicas fluorimétricas ensayadas, no hay ninguna que sea capaz totalmente de medir ambos analitos al mismo tiempo y de forma exenta de error, con lo cual vimos oportuno hacer en secciones siguientes de este capítulo, una vez optimizados ciertos parámetros instrumentales, un estudio paralelo de los resultados obtenidos cuando se intenta aplicar cada una de estas tres técnicas fluorimétricas a la resolución de esta mezcla; haciendo la observación que en el caso de los espectros derivados sincrónicos de primer orden para codeína, dado que los $dIRF/d\lambda$ de fluorescencia son negativas, se representarán gráficamente sus valores absolutos.

I.4. Optimización de las condiciones instrumentales.

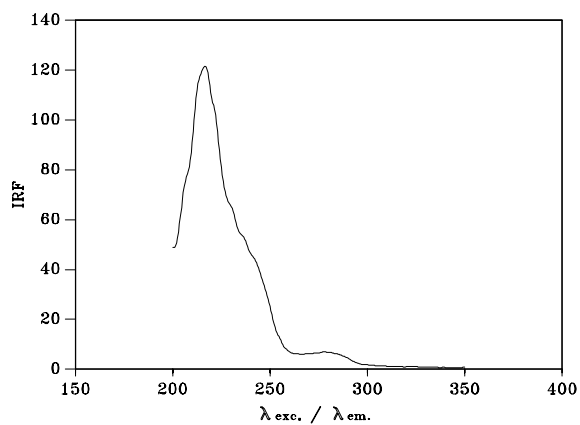
En el estudio anterior (capítulo III) del comportamiento fluorescente individual de la codeína y ácido salicílico de la presente Memoria, sólo se obtuvieron los resultados para la espectrofluorimetría convencional y dado que en esta hemos aplicado además otras dos técnicas fluorimétricas, para la determinación de los componentes del sistema, consideraremos para éstas, cómo influye sobre la señal de fluorescencia la variación de los parámetros instrumentales: rendijas de excitación y emisión, velocidad de barrido y orden de suavizado.

De las experiencias realizadas según el método de trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

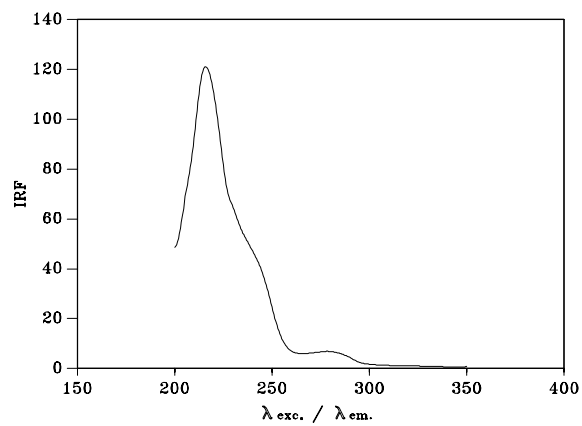
- * Emplear rendijas de excitación y emisión con valores de 2.5 y 5 nm respectivamente.
- * En cuanto a la velocidad de barrido, su variación no influye sobre los valores de intensidad de fluorescencia relativa, se trabajará a 240 nm/min.
- * Por último, el orden de suavizado óptimo para la técnica sincrónica será 25 y 13 para codeína y ácido salicílico respectivamente. En el caso de la 1ª derivada del sincrónico, corresponderán a 25 para cada componente, quedando así la señal exenta de ruido. Siendo para la mezcla, 25 para los espectros sincrónicos y 37 para los derivados del sincrónico. Los espectros para los distintos órdenes de filtrado se muestran en las figuras IV.10 a IV.15.



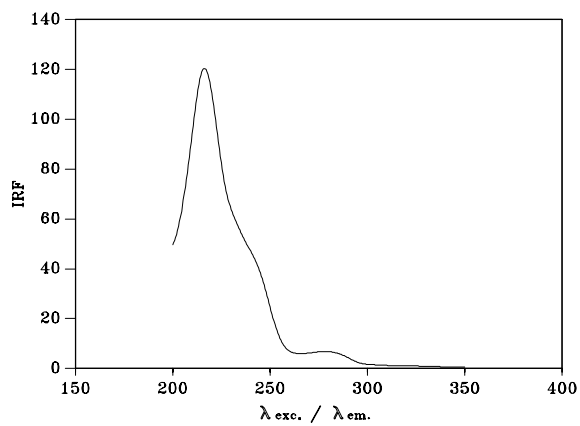
(a)



(b)

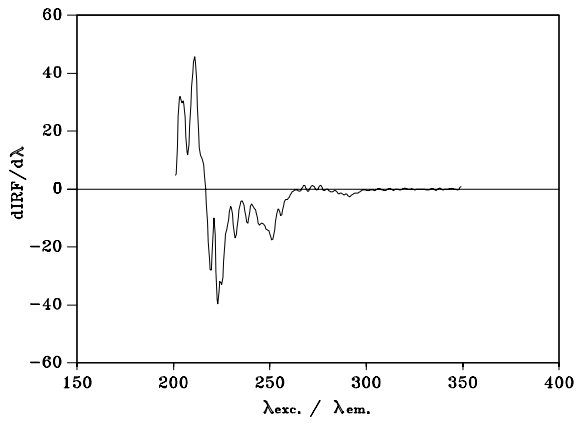


(c)

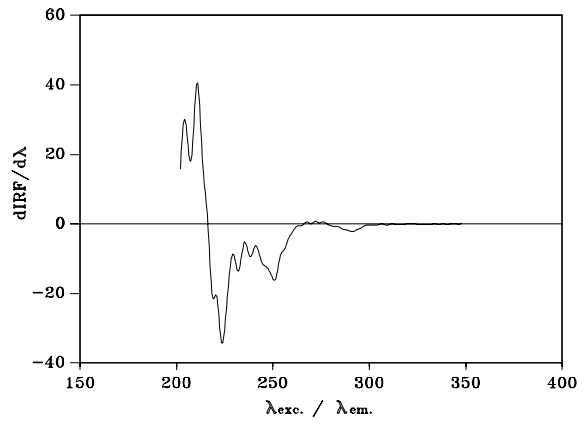


(d)

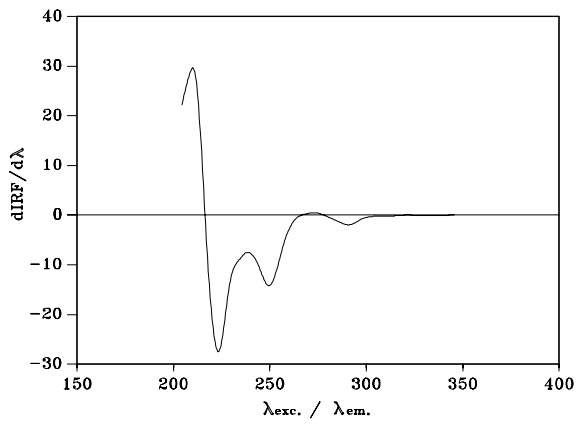
Fig.IV.10 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos para codeína.
Factor: a) 5; b) 9; c) 19; d) 25.



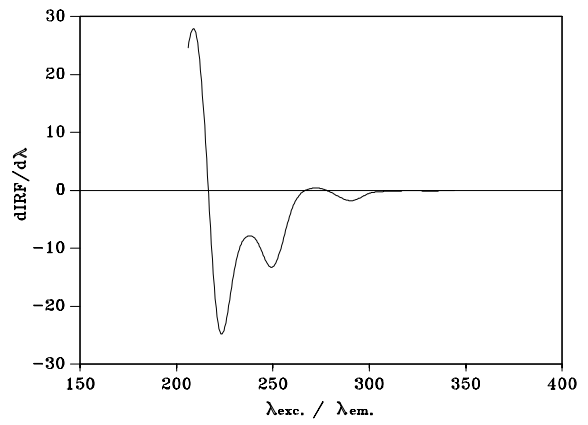
(a)



(b)

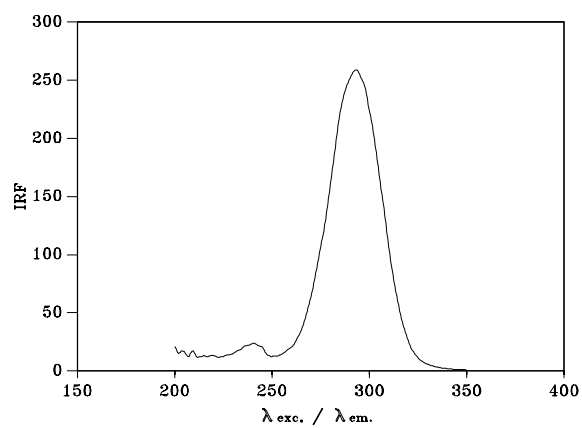


(c)

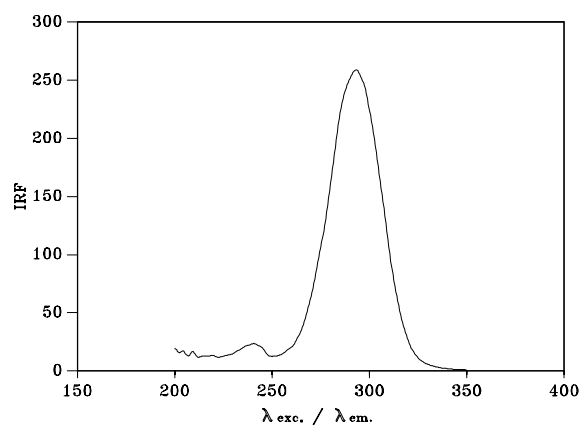


(d)

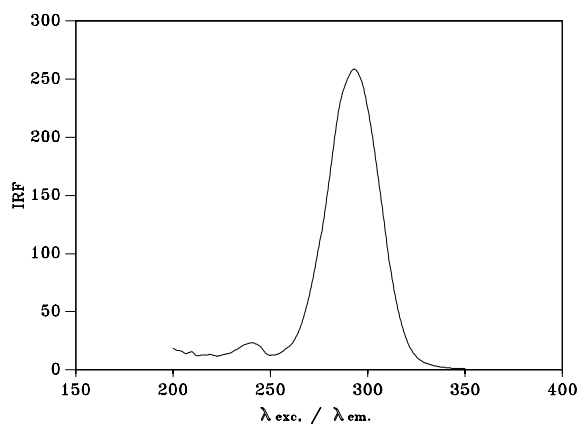
Fig.IV.11 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos derivados para codeína.
Factor: a) 5; b) 9; c) 19; d) 25.



(a)

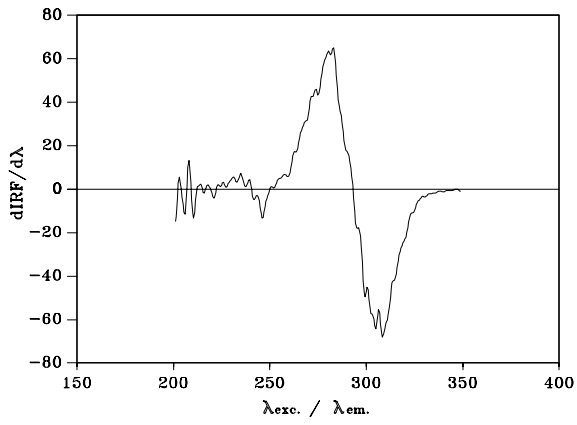


(b)

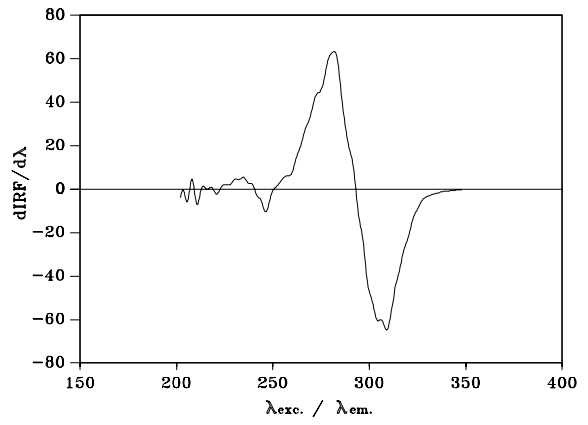


(c)

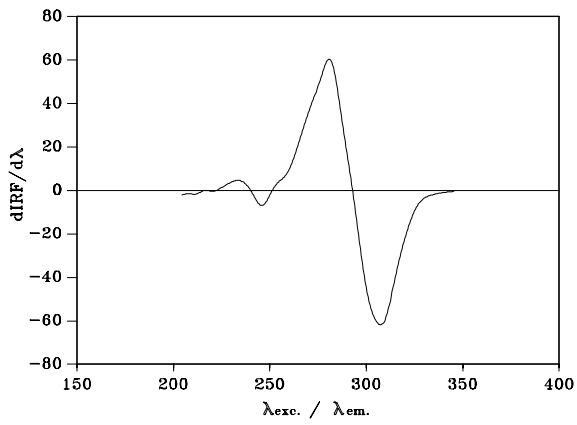
Fig.IV.12 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos para ácido salicílico.
Factor: a) 5; b) 9; c) 13.



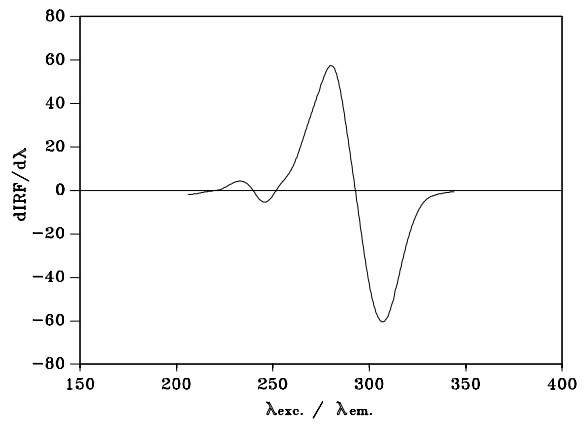
(a)



(b)

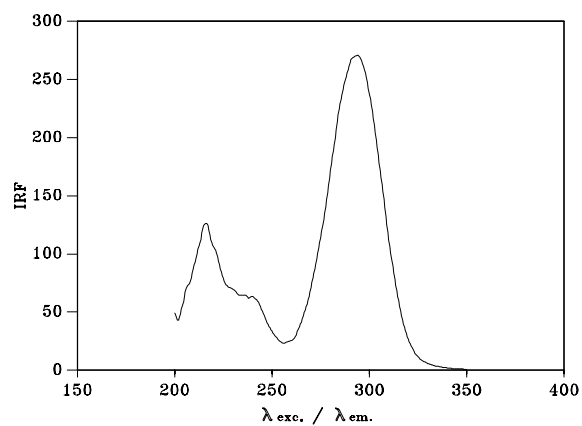


(c)

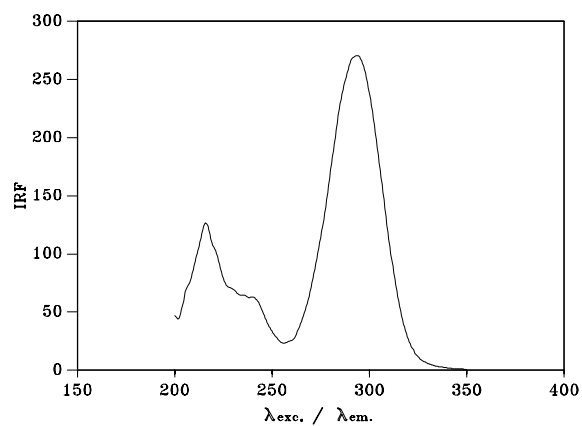


(d)

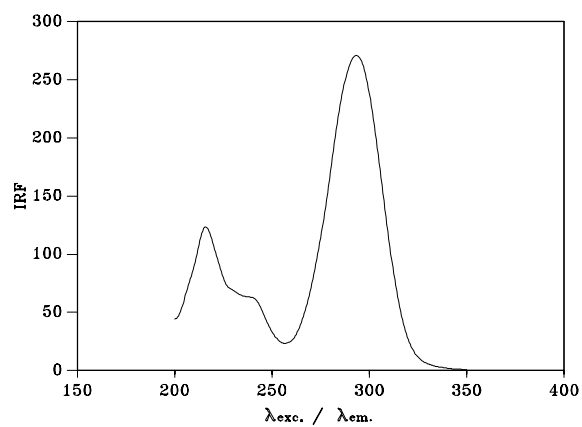
Fig.IV.13 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos derivados para ácido salicílico.
Factor: a) 5; b) 9; c) 19; d) 25.



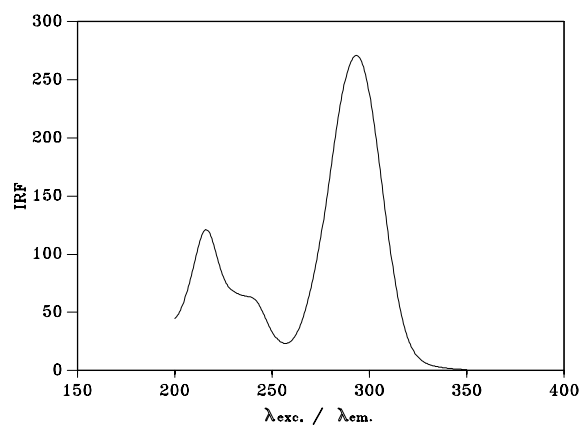
(a)



(b)

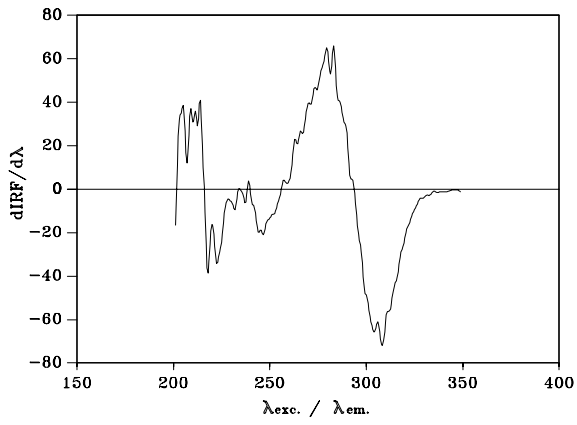


(c)

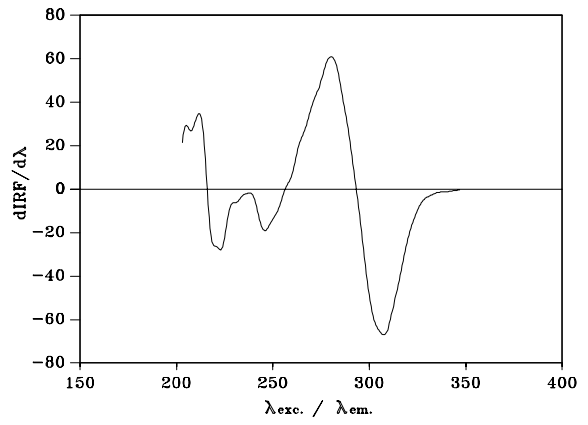


(d)

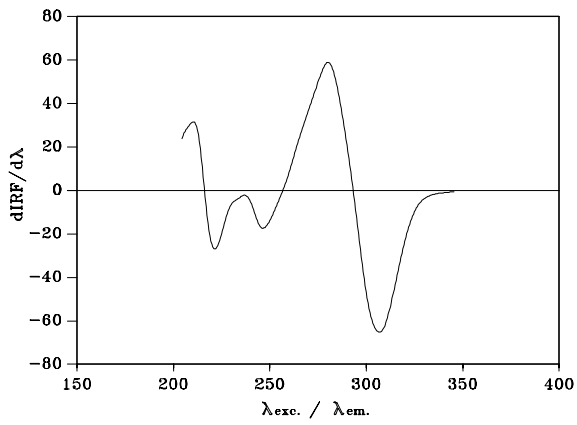
Fig.IV.14 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos para la mezcla ác. salicílico y codeína.
Factor: a) 5; b) 9; c) 19; d) 25.



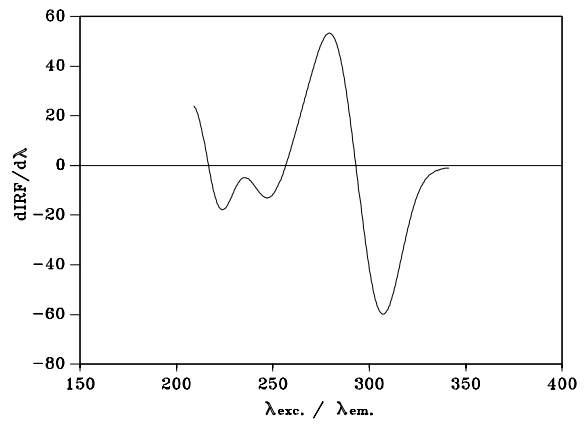
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig.IV.15 Factor de filtrado. Espectros sincrónicos derivados para la mezcla ácido salicílico y codeína. Factor: a) 5; b) 13; c) 19; d) 37.

II. MÉTODOS PROPUESTOS PARA DETERMINAR ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA POR ESPECTROFLUORIMETRÍA.

Una vez que han sido optimizadas todas las variables que pueden afectar a la intensidad de fluorescencia (pH, volumen de disolución reguladora, fuerza iónica y temperatura), estudiadas las características espectrales de los sistemas univariantes y su mezcla binaria, se va a proceder a la realización de un estudio paralelo de las tres técnicas, con objeto de establecer el calibrado y el cálculo de los parámetros analíticos de calidad.

II.1. Calibración.

Se han establecido las tres rectas de calibrado para cada técnica en estudio con el fin de comprobar la independencia entre las señales analíticas correspondientes a disoluciones que contenían cantidades crecientes de cada analito en ausencia y presencia de concentraciones del segundo componente implicado en la muestra y viceversa.

II.1.1 Funciones de calibrado para codeína.

La recta de calibrado para la codeína en las tres técnicas de fluorimetría se realizó, según el procedimiento operatorio preparando disoluciones en matraces aforados de 100 mL, con volúmenes crecientes de disolución patrón de codeína de 10 mgA^{-1} .

Se registraron los espectros con las rendijas de excitación y emisión respectivamente de 2.5 y 5 nm a la temperatura de $(20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. A continuación sobre los tres tipos de espectros una vez restada la señal del blanco y suavizados aplicándole el factor de filtrado optimizado previamente, se miden las intensidades de fluorescencia. En la Tabla IV.3 se recogen los datos de la rectas de regresión ajustada por mínimos cuadrados y sus representaciones se muestran en las Figuras IV.16 y IV.17.

TABLA IV.3 Recta de calibrado de Codeína.

Codeína mgA ⁻¹	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1° Der.
	IRF $\delta_{em.} = 350 \text{ nm}$	IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 215 \text{ nm}/340 \text{ nm}$	dIRF/d δ $\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 250 \text{ nm}/375 \text{ nm}$
0.10	3.58	3.81	0.46
0.20	16.73	15.62	-0.94
0.50	36.23	34.40	-2.08
1.00	75.60	66.45	-6.25
2.00	134.93	117.40	-12.76
3.00	190.99	169.60	-19.92

Método	Recta de regresión	Coefficiente de correlación
Emisión	$y = 3.96 + 63.87 C$	0.997
Sincrónico	$y = 4.42 + 56.00 C$	0.998
Sincrónico 1° der.	$y = -0.94 + 6.92 C$	0.999

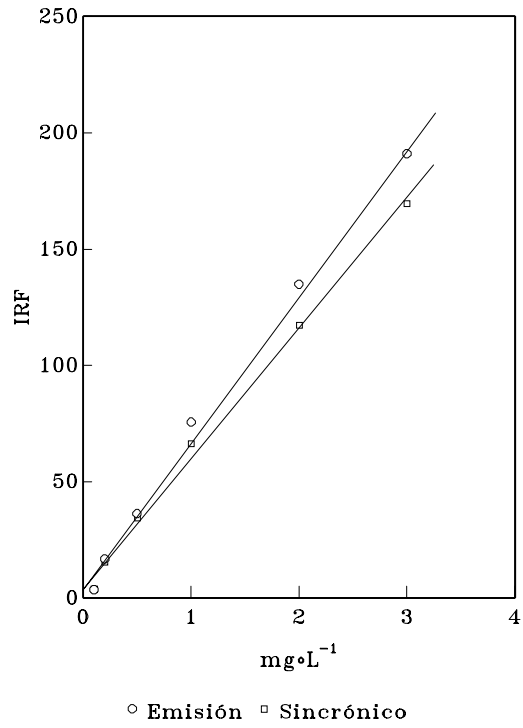


Fig. IV.16 Rectas de calibrado de codeína. Emisión y sincrónico.

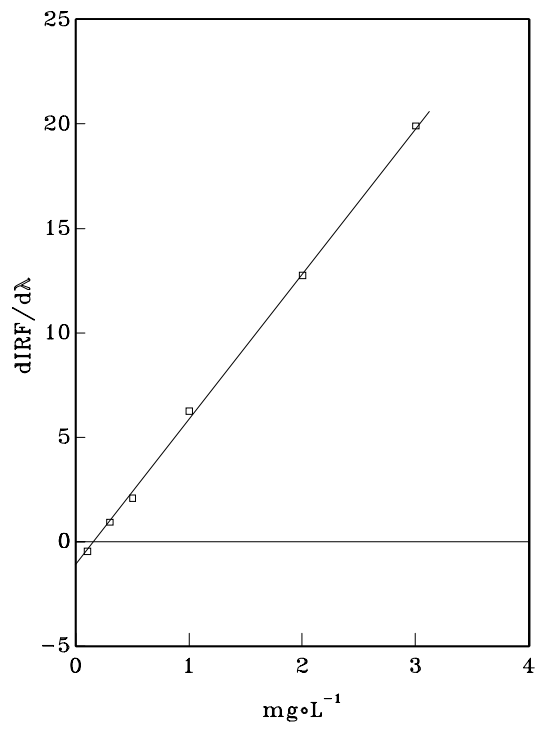


Fig. IV.17 Recta de calibrado de codeína. Sincrónico 1ª derivada.

Al objeto de comprobar si existe independencia entre las señales analíticas de los analitos, se han establecido rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de codeína, pero en presencia de concentraciones diferentes de ácido salicílico. Los espectros se han realizado de la misma forma que en el apartado anterior pero suavizados en las condiciones previamente optimizadas.

En las Tablas IV.4 a IV.6, se muestran los valores correspondientes a las señales de fluorescencia y parámetros analíticos de calibración.

TABLA IV.4 Calibración de codeína en presencia de diferentes cantidades de ácido salicílico. Emisión

Codeína mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.75 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.50 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.25 mgA⁻¹
0.5	45.11	41.38	43.26
1	67.68	67.70	67.17
2	116.6	113.8	111.6
3	149.9	151.8	154.2

Rectas de regresión			
Ac. salicílico mgA⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	63.87	3.96	0.997
0.75	42.52	25.73	0.996
0.50	44.08	22.04	0.998
0.25	44.26	22.13	0.999

TABLA IV.5 Calibración de codeína en presencia de diferentes cantidades de ácido salicílico. Sincrónico.

Codeína mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.75 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.50 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.25 mgA⁻¹
0.5	37.30	37.56	38.31
1	57.47	59.89	59.23
2	99.90	105.8	101.2
3	131.2	143.0	138.0

Rectas de regresión			
Ac. salicílico mgA⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	56.00	4.42	0.998
0.75	37.96	19.77	0.998
0.50	42.47	17.55	0.999
0.25	40.02	19.15	0.999

TABLA IV.6 Calibración de codeína en presencia de diferentes cantidades de ácido salicílico. Sincrónico 1ª derivada.

Codeína mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.75 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.50 mgA⁻¹	Ácido salicílico 0.25 mgA⁻¹
0.5	-2.78	-3.20	-2.71
1	-4.48	-4.00	-4.33
2	-7.68	-8.34	-8.16
3	-11.50	-12.66	-11.91

Rectas de regresión			
Ac. salicílico mgA⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	6.92	-0.94	0.999
0.75	3.46	0.98	0.999
0.50	3.91	0.67	0.993
0.25	3.71	0.75	0.999

Comparación de pendientes.

Con objeto de comprobar la igualdad de pendientes entre las rectas de calibrado en ausencia y presencia de ácido salicílico, se calcula el estadístico $s_{s/y}$, desviación estándar de los residuos de y , a continuación se estima el valor s_b , que permite determinar los límites de confianza para la pendiente a partir de la expresión $b \pm t s_b$, donde el valor de t de Student, se obtiene para un nivel de confianza del 95% y $n-2$ grados de libertad. Los resultados se recogen en la Tabla IV.7.

TABLA IV.7 Intervalos de confianza (P=0.05). Pendientes

Técnica fluorimétrica	Intervalo de confianza
Emisión	64 ± 6
Sincrónico	56 ± 5
Sincrónico 1ª derivada	7.0 ± 0.5

Del estudio realizado se desprende que los valores de las pendientes obtenidos, no quedan incluidos dentro del intervalo de confianza (P=0.05), correspondiente a la establecida en ausencia de ácido salicílico y puesto que esto ocurre no solo en espectrofluorimetría de emisión y sincrónico sino también en derivada, podemos concluir que no puede determinarse codeína en presencia de ácido salicílico por ninguna de las tres técnicas, al menos en las relaciones de concentración ensayadas.

II.1.2 Funciones de calibrado para ácido salicílico.

La recta de calibrado para ácido salicílico en las tres técnicas de fluorimetría se realizó, según el procedimiento operatorio, introduciendo en matraces aforados de 100 mL, volúmenes crecientes de disolución patrón de ácido salicílico de 10 mgA^{-1} .

Se registraron los espectros con las rendijas de excitación y emisión respectivamente de 2.5 y 5 nm a la temperatura de $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación sobre los tres tipos de espectros una vez restada la señal del blanco y suavizados según las condiciones establecidas, se miden las intensidades de fluorescencia. Los datos de la rectas de regresión ajustadas por mínimos cuadrados se recogen en la Tabla IV.8 y sus representaciones gráficas se muestran en las Figuras IV.18 y IV.19.

TABLA IV.8 Recta de calibrado de ácido salicílico.

Ácido	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1° der.
Salicílico	IRF	IRF	dIRF/dδ
mgA⁻¹	$\delta_{em.} = 405 \text{ nm}$	$\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 293 \text{ nm}/418 \text{ nm}$	$\delta_{exc.}/\delta_{em.} = 265 \text{ nm}/390 \text{ nm}$
0.10	59.11	50.26	4.56
0.25	147.0	125.7	10.30
0.50	268.1	230.4	18.34
0.75	450.5	387.4	32.12
1.00	588.4	510.6	42.46
1.50	872.5	773.0	67.55

Método	Recta de regresión	Coefficiente de correlación
Convencional	$y = -8.07 + 598.6 C$	0.999
Sincrónico	$y = -8.84 + 519.6 C$	0.999
1ª Deriv. Sincrónico	$y = -1.66 + 45.2 C$	0.997

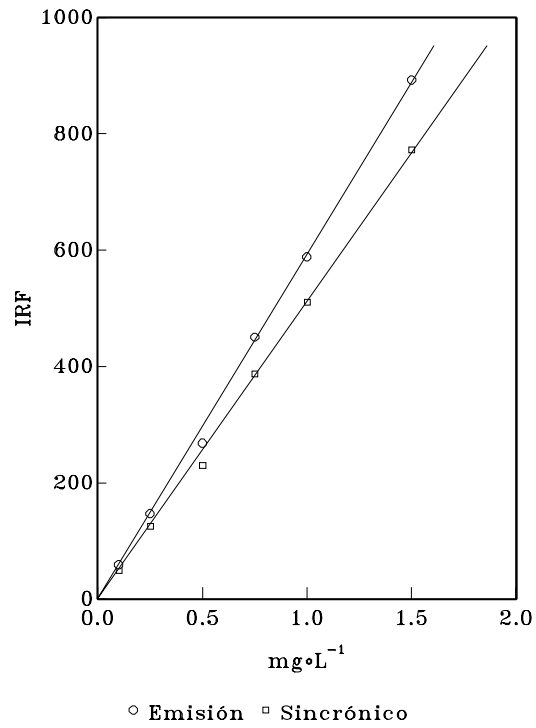


Fig.IV.18 Rectas de calibrado de ácido salicílico. Emisión y sincrónico.

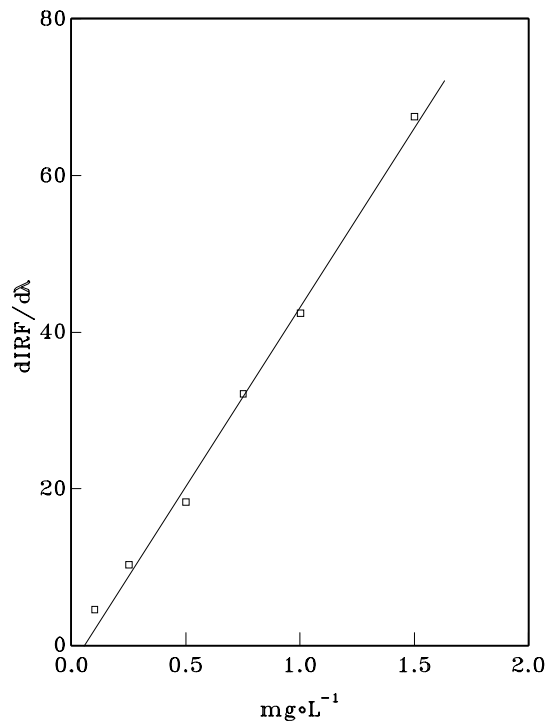


Fig.IV.19 Recta de calibrado de ácido salicílico. Sincrónico 1ª derivada.

De la misma forma, con el fin de comprobar si existe independencia entre las señales analíticas de los analitos, se han establecido rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de ácido salicílico, pero en presencia de concentraciones diferentes de codeína. Los espectros se han realizado de la misma forma que en el apartado anterior pero usando el factor de suavizado optimizado previamente y 25 puntos para los métodos de emisión y sincrónico y 37 puntos para el derivado de primer orden del sincrónico.

En las Tablas IV.9 a IV.11, se muestran los valores de fluorescencia, pendientes y ordenadas en el origen de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados así como, los correspondientes valores del coeficiente de correlación.

TABLA IV.9 Calibración de ácido salicílico en presencia de diferentes cantidades de codeína. Emisión.

Ácido Salicílico mgA^{-1}	Codeína 20 mgA^{-1}	Codeína 10 mgA^{-1}	Codeína 5 mgA^{-1}	Codeína 1 mgA^{-1}
0.3	168	167.3	167.3	154.4
0.5	279	271.5	273.4	273.2
0.7	393	384.1	388.0	397.4
1.0	557	573.2	563.0	581.3

Rectas de regresión			
Codeína mgA^{-1}	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	598.6	-8.07	0.999
20	557.3	1.41	0.999
10	581.4	14.63	0.999
5	568.3	-6.98	0.997
1	611.4	-30.72	0.999

TABLA IV.10 Calibración de ácido salicílico en presencia de diferentes cantidades de codeína. Sincrónico.

Ácido Salicílico mgA ⁻¹	Codeína 20 mgA ⁻¹	Codeína 10 mgA ⁻¹	Codeína 5 mgA ⁻¹	Codeína 1 mgA ⁻¹
0.3	143	143.2	144.2	134.1
0.5	232	230.1	236.1	236.2
0.7	325	324.5	335.2	340.2
1.0	474	485.0	498.0	505.1

Rectas de regresión

Codeína mgA ⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	520.0	-8.84	0.999
20	473.0	-2.41	0.999
10	489.1	-10.46	0.999
5	508.3	-13.51	0.999
1	530.2	-27.62	0.999

TABLA IV.11 Calibración de ácido salicílico en presencia de diferentes cantidades de codeína. Sincrónico 1ª derivada.

Ácido Salicílico mgA ⁻¹	Codeína 20 mgA ⁻¹	Codeína 10 mgA ⁻¹	Codeína 5 mgA ⁻¹	Codeína 1 mgA ⁻¹
0.3	9.67	8.70	10.70	10.33
0.5	19.88	18.68	17.48	18.68
0.7	31.03	30.16	29.25	31.03
1.0	40.41	39.34	40.40	40.41

Parámetros Analíticos

Codeína mgA ⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
-	45.20	-1.66	0.997
20	44.31	-2.44	0.991
10	44.31	-347	0.991
5	43.67	-285	0.995
1	44.07	-2.41	0.991

Comparación de pendientes.

Para establecer la igualdad entre las pendientes de las rectas de calibrado de ácido salicílico en ausencia y presencia de codeína, se llevará a cabo con el mismo criterio del apartado II.1.1. Los resultados se recogen en la Tabla IV.12.

TABLA IV.12 Intervalos de confianza (P=0.05). Pendientes

Técnica fluorimétrica	Intervalo de confianza
Emisión	598 ± 32
Sincrónico	519 ± 28
Sincrónico 1ª derivada	45 ± 4

Podemos comprobar que a vista de los resultados de las Tablas IV.9 a IV. 11, que en la determinación de hasta 1 mgA⁻¹ de ácido salicílico, se toleran hasta un máximo de 10 mgA⁻¹ de codeína en el método de emisión y hasta 20 mgA⁻¹ en sincrónico y su primera derivada, lo cual supone relaciones de CO/AS toleradas de hasta 40 (emisión) y 80 (sincrónico y su 1ª derivada) en la determinación de ácido salicílico en presencia de codeína.

Concentraciones de codeína superiores a mgA⁻¹ fueron también ensayadas pero no eran toleradas en ninguno de los tres métodos propuestos.

II.2 Parámetros de calidad.

II.2.1. Límites de detección y cuantificación.

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizaron siguiendo las normas de la I.U.P.A.C. para ambos analitos, en las tres técnicas fluorimétricas en estudio, que a continuación se exponen:

* **Codeína.** Para la determinación del límite de detección y cuantificación de codeína, se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco, para lo cual se prepararon 9 matraces de 100 mL; disponiéndose en cada uno de ellos, un volumen de 10 mL de disolución reguladora HPO₄⁻² / H₂PO₄⁻ (0,1 M) y agua bidestilada hasta completar el volumen final.

A continuación se registraron los espectros en las condiciones óptimas para la codeína para las distintas técnicas fluorimétricas, los resultados obtenidos se recogen en la Tabla IV.13.

TABLA IV.13 Límites de detección y cuantificación. Codeína

Muestra	Bidimensional IRF $\delta_{em.} = 350 \text{ nm}$	Sincrónico IRF $\delta_{exc.} / \delta_{em.}$ 215 nm/340 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d δ $\delta_{exc.} / \delta_{em.}$ 250 nm/375 nm
1	-0.20	0.80	-0.56
2	0.11	1.10	-0.50
3	-0.60	1.03	-0.58
4	0.75	0.70	-0.46
5	-0.70	0.80	-0.46
6	-0.84	1.10	-0.73
7	0.60	0.80	-0.66
8	0.23	0.80	-0.62
9	0.66	0.83	-0.68

Parámetros Estadísticos			
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
O	0.001	0.88	0.58
σ_{n-1}	0.614	0.150	0.104
m	63.87	56.00	6.92
C_L	0.029 mgA ⁻¹	0.008 mgA ⁻¹	0.045 mgA ⁻¹
C_0	0.096 mgA ⁻¹	0.026 mgA ⁻¹	0.151 mgA ⁻¹

* **Ácido salicílico.** Se calcularon ambos límites para el ácido salicílico, preparando 9 matraces de 100 mL que contenían 10 mL de disolución reguladora $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ (0,1 M) y agua bidestilada hasta el enrase.

Los espectros de emisión, sincrónico y el derivado de primer orden del sincrónico se registraron en las condiciones operatorias óptimas del ácido salicílico y los resultados se recogen en la Tabla IV.14.

TABLA IV.14 Límites de detección y cuantificación. Ácido salicílico

Muestra	Bidimensional IRF $\delta_{em}=405\text{ nm}$	Sincrónico IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 293 nm/418 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d δ $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 265 nm/390 nm
1	0.48	0.00	0.06
2	0.24	0.00	-0.04
3	0.04	-0.52	0.04
4	0.24	0.00	0.01
5	0.09	0.00	0.03
6	0.16	-0.47	0.03
7	0.10	-0.51	0.05
8	0.16	-0.52	0.01
9	0.08	-0.52	-0.02

Parámetros Estadísticos

	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1ª der.
m	598.6	519.6	45.2
O	0.1766	0.282	0.033
σ_{n-1}	0.1332	0.268	0.016
C_L	0.0006 mgA ⁻¹	0.002 mgA ⁻¹	0.001 mgA ⁻¹
C_Q	0.002 mgA ⁻¹	0.005 mgA ⁻¹	0.003 mgA ⁻¹

II.2.2 Estudio de reproducibilidad.

La precisión para los métodos fluorimétricos propuestos en la determinación de codeína y ácido salicílico, se evaluaron mediante los criterios establecidos en el capítulo I de la presente Memoria. Seguidamente se exponen los resultados obtenidos para cada componente.

*** Reproducibilidad del método para determinar codeína.**

El estudio de la reproducibilidad para la determinación de codeína se realizó según lo establecido en el procedimiento operatorio, preparando 10 disoluciones con una concentración de 2 mgA⁻¹ de codeína patrón.

En la Tabla IV.15, se muestran los datos de intensidad de fluorescencia correspondientes a las distintas técnicas fluorimétricas y los valores de los parámetros analíticos de los que se deduce que los tres métodos propuestos para la determinación de codeína son reproducibles para las condiciones de trabajo seleccionadas.

TABLA IV.15 Reproducibilidad del método. Determinación de 2 mgA^{-1} de codeína.

Muestra	Bidimensional IRF $\delta_{em.}=350 \text{ nm}$	Sincrónico IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 215 nm/340 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d δ $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 250 nm/375 nm
1	134.9	117.3	-13.1
2	142.5	124.8	-12.9
3	136.6	116.6	-12.4
4	142.8	119.9	-12.4
5	145.3	123.1	-13.7
6	139.6	114.3	-13.3
7	132.6	113.8	-12.9
8	136.8	124.4	-12.6
9	144.6	121.2	-12.1
10	137.4	118.9	-12.4

Parámetros Estadísticos			
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
n	10	10	10
O	139.3	119.4	12.8
s_m	1.36	1.25	0.15
s_{n-1}	4.32	3.95	0.47
C.V.%	3.1	3.3	3.7
$\bar{x} \pm t_s$	139 \pm 3	119 \pm 3	12.8 \pm 0.3

* Reproducibilidad del método para determinar ácido salicílico.

De forma similar y atendiendo a los mismos criterios anteriores, se procedió a estudiar la reproducibilidad en la determinación de ácido salicílico, preparando 10 disoluciones con una concentración de 1 mgA^{-1} de ácido salicílico.

Los espectros de emisión, sincrónico y derivado de primer orden de éste se registraron en las condiciones operatorias del ácido salicílico y los resultados de fluorescencia junto con los valores de los parámetros estadísticos se recogen en la Tabla IV.16, confirmándose, a partir de ellos, una buena reproducibilidad de los tres métodos propuestos.

TABLA IV.16 Reproducibilidad del método. Determinación de 1 mgA^{-1} de ácido salicílico.

Muestra	Bidimensional IRF $\mathcal{E}_{em.}=405 \text{ nm}$	Sincrónico IRF $\mathcal{E}_{exc.}/\mathcal{E}_{em.}$ 293 nm/418 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d \mathcal{E} $\mathcal{E}_{exc.}/\mathcal{E}_{em.}$ 265 nm/390 nm
1	591.3	514.5	41.9
2	583.2	515.3	44.0
3	582.3	498.3	40.1
4	596.9	507.1	44.4
5	564.1	494.7	43.6
6	581.2	506.6	41.6
7	584.4	509.1	44.6
8	582.2	510.8	43.7
9	555.2	484.5	42.4
10	594.5	520.1	43.8

Parámetros Estadísticos

	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
n	10	10	10
O	581	506	43.3
σ_m	3.98	3.40	0.36
σ_{n-1}	12.57	10.73	1.08
C.V.%	2.2	2.1	2.5
$\bar{x} \pm \sigma_m \cdot t_s$	581 \pm 9	506 \pm 7	43.3 \pm 0.8

II.3 Resumen de los parámetros analíticos.

En las Tablas IV.17 y IV.18 se recogen de forma resumida los parámetros analíticos obtenidos, mediante las distintas técnicas aplicadas a la determinación de codeína y ácido salicílico.

TABLA IV.17 Resumen de los parámetros analíticos. Codeína

Parámetro analítico	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
Ordenada en origen	3.96	4.42	-1.17
Pendiente (LAng ⁻¹)	63.87	56.00	7.02
Coefficiente de correlación (r)	0.997	0.998	0.999
Rango dinámico lineal (R.D.L. mgA ⁻¹)	0.1-3.0	0.1-3.0	0.2-3.0
Límite de detección (mgA ⁻¹)	0.029	0.008	0.082
Límite de cuantificación (mgA ⁻¹)	0.096	0.026	0.280
Desviación estándar relativa (R.S.D.%)	3.1	3.3	3.7

TABLA IV.18 Resumen de los parámetros analíticos. Ácido salicílico.

Parámetro analítico	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
Ordenada en origen	-8.07	-8.84	-1.66
Pendiente (LAng ⁻¹)	598.6	519.6	45.20
Coefficiente de correlación (r)	0.999	0.999	0.997
Rango dinámico lineal (R.D.L. mgA ⁻¹)	0.1-1.5	0.1-1.5	0.1-1.5
Límite de detección (mgA ⁻¹)	6A10 ⁻⁴	1.5A10 ⁻³	1A10 ⁻³
Límite de cuantificación (mgA ⁻¹)	2.2A10 ⁻³	5.1A10 ⁻³	3A10 ⁻³
Desviación estándar relativa (R.S.D.%)	3.3	3.6	2.5

III. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS. TOLERANCIAS.

Se denominan interferencias a las perturbaciones químicas que pueden alterar la detección cualitativa y/o determinación cuantitativa en una muestra. El interferente es el agente químico que origina la interferencia, produciendo un error sistemático en el resultado del análisis del analito en la muestra, dentro del rango de aplicación del método.

El parámetro de calidad de un método analítico que nos informa de dichas interferencias es la *selectividad*, que en la práctica analítica se representa a través de la cuantificación de la interferencia producida por una especie química concreta en la determinación del analito en un procedimiento dado, de modo que puede establecerse un nivel máximo de éste que no produce interferencia.

La estrategia a seguir para decidir si una sustancia produce o no, interferencia en la determinación de un analito determinado, será medir la señal analítica correspondiente a la concentración de analito en presencia de una concentración concreta del posible interferente. Los interferentes que se seleccionaron fueron aquéllos que suelen existir en la composición de los fármacos acompañando a la codeína, ácido salicílico o a ambos. Estos interferentes son: ácido ascórbico, cafeína, efedrina, paracetamol, salicilamida y teofilina.

Para estimar el nivel de tolerancia de los interferentes, se procede de la siguiente forma: se realizan las medidas de fluorescencia de las disoluciones de cada analito en presencia de cada interferente, así como del blanco en las mismas condiciones para restarlo al sistema y obtener el neto correspondiente, de modo que con la ayuda de la recta de calibrado, se determina en cada caso el error relativo, aceptando como límite de tolerancia para el interferente, la concentración de este que origine un error relativo en la medida del $\pm 5\%$, no considerando como tales, de acuerdo a este criterio, aquellas concentraciones de interferente que presenten un error relativo igual o menor al citado límite. Los resultados se recogen en las Tablas IV.21 y IV.22.

*** Interferencias en la determinación de ácido salicílico.**

Para realizar la medida de fluorescencia se dispusieron una serie de matraces, con una concentración de patrón de ácido salicílico de 1 mgA^{-1} y volúmenes variables de las disoluciones de los distintos interferentes; los espectros se registraron, en cada caso, de acuerdo a las condiciones de trabajo y se midieron las señales de fluorescencia a las longitudes de onda seleccionadas para cada caso, así como su correspondiente blanco. La concentración máxima de interferente ensayada fue 100 mgA^{-1} .

Los valores resultantes de las medidas de fluorescencia y de los errores relativos, se recogen en la Tabla IV.19.

TABLA IV.19 Efecto producido por la presencia de ácido ascórbico.

Ácido Ascórbico mgA^{-1}	Bidimensional al IRF $\lambda_{em}=405\text{nm}$	Error %	Sincrónico IRF $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=293\text{nm}/418\text{nm}$	Error %	1ª deriv. Sincrónico dIRF/d λ $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=265\text{nm}/390\text{nm}$	Error %
Testigo	584.3		487.6		45.2	
45	354.1	- 39.40	251.4	-48.44	3.3	-92.72
15	463.4	- 20.70	331.3	-32.05	4.1	-91.07
10	547.8	-6.25	443.6	-9.02	17.7	-60.90
5	552.1	-5.51	463.7	-5.04	23.3	-48.60
2	569.3	-2.57	477.7	-2.03	33.6	-25.85
1	574.0	-1.76	497.1	-1.95	40.1	-11.62
0.5	580.20	-0.70	497.7	-1.95	41.8	-7.80

TABLA IV.19 (cont.) Efecto producido por la presencia de cafeína.

Cafeína mgA ⁻¹	Bidimension	Error %	Sincrónico	Error %	Sincrónico 1º der.	Error %
	al		IRF		dIRF/d8	
	IRF		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=293nm/418nm$		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=265nm/390nm$	
	$\lambda_{em}=405nm$					
Testigo	584.3		487.6		45.2	
45	413.4	- 29.25	255.7	-47.56	2.1	-95.43
25	502.8	- 14.00	336.2	-31.05	6.4	-85.88
15	519.3	- 11.12	353.7	-26.70	7.0	-84.50
10	546.3	-6.50	437.0	-10.37	18.4	-59.43
5	577.3	-1.20	470.0	-3.60	29.0	-36.26
3	581.3	-0.51	483.4	-0.86	32.3	-28.71
1	580.8	-0.60	501.7	+2.90	41.0	-9.50
0.5	582.3	-0.34	510.7	+4.74	43.2	-4.72

Efecto producido por la presencia de efedrina.

Efedrina mgA ⁻¹	Bidimensional	Error %	Sincrónico	Error %	Sincrónico 1º der.	Error %
	IRF		IRF		dIRF/d8	
	IRF		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=293nm/418nm$		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=265nm/390nm$	
	$\lambda_{em}=405nm$					
Testigo	584.3		487.6		45.2	
100	672.6	+15.16	583.7	+19.71	50.0	+10.19
90	642.8	+10.01	560.6	+14.97	47.6	+5.07
60	621.1	+6.30	543.4	+11.44	44.1	-0.28

Efecto producido por la presencia de paracetamol.

Paracetamol mgA ⁻¹	Bidimensional	Error %	Sincrónico	Error %	Sincrónico 1º der.	Error %
	IRF		IRF		dIRF/d8	
	IRF		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=293nm/418nm$		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=265nm/390nm$	
	$\lambda_{em}=405nm$					
Testigo	584.3		487.6		45.2	
25	524.8	- 10.20	400.5	17.80	27.4	-39.40
15	545.9	-6.60	526.8	8.13	34.1	-24.56
5	581.2	-1.02	476.3	2.22	45.1	-0.22

TABLA IV.19 (cont.) Efecto producido por la presencia de salicilamida.

Salicilamida mgÅ ⁻¹	Bidimensional	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	IFR	%	IFR	%	dIFR/d8	%
	$\delta_{em}=405nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=293nm/418nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=265nm/390nm$	
Testigo	584.3		487.6		45.2	
45	430.8	-26.27	450.0	-7.71	49.1	+8.20
20	518.7	-11.22	520.5	-6.74	50.8	+12.00
15	505.8	-13.43	507.3	-14.40	52.0	+14.70
5	562.6	-3.71	518.8	+6.40	47.2	+4.00
2	561.4	-3.91	499.0	+2.34	42.6	-6.13
1	582.4	-0.32	511.3	+4.86	44.4	-2.20
0.5	592.2	-1.35	515.5	+5.72	45.1	-0.64

Efecto producido por la presencia de teofilina.

Teofilina mgÅ ⁻¹	Bidimensional	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	IFR	%	IFR	%	dIRF/d8	%
	$\delta_{em}=405nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=293nm/418nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=265nm/390nm$	
Testigo	584.3		487.6		45.2	
45	490.0	-16.13	299.0	-38.70	0.8	-98.30
25	460.1	-21.25	342.2	-29.82	5.5	-87.80
15	571.3	-2.22	404.0	-17.14	5.1	-89.00
10	599.4	+2.60	468.7	-3.88	16.9	-62.77
3	570.0	-2.45	481.3	-1.35	29.1	-35.82
0.50	582.3	-0.34	500.0	+2.54	40.8	-9.92

*** Interferencias en la determinación de codeína.**

Para la medida de la intensidad relativa de fluorescencia, se prepararon una serie de matraces de 100 mL para cada interferente, con una concentración de 2 mgA^{-1} para codeína y concentraciones decrecientes de interferente, registrándose los espectros en las condiciones operatorias seleccionadas para cada técnica de fluorescencia y leyendo la intensidad relativa a las longitudes de onda óptimas de trabajo.

Los resultados obtenidos de intensidad y porcentaje de error relativo se recogen en la Tabla IV.20.

TABLA IV.20 Efecto producido por la presencia de ácido ascórbico.

Ácido Ascórbico mgA^{-1}	Bidimensional IRF $\lambda_{em}=350\text{nm}$	Error %	Sincrónico IRF $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=215\text{nm}/340\text{nm}$	Error %	Sincrónico 1º der. dIRF/d λ $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=250\text{nm}/375\text{nm}$	Error %
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
40	112.4	-16.70	94.8	-19.18	-3.3	-74.27
10	132.1	-2.10	111.2	-5.28	-9.5	-25.52
5	135.2	+0.18	110.8	-5.66	-12.6	-1.45

Efecto producido por la presencia de cafeína.

Cafeína mgA^{-1}	Bidimension al IRF $\lambda_{em}=350\text{nm}$	Error %	Sincrónico IRF $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=215\text{nm}/340\text{nm}$	Error %	Sincrónico 1º der. dIRF/d λ $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=250\text{nm}/375\text{nm}$	Error %
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
10	49.5	-63.11	41.4	-64.71	-11.4	-10.89
5	85.0	-36.98	69.4	-40.89	-12.6	-1.17
1	126.7	-6.14	108.2	-7.82	-13.1	+2.74
0.5	131.3	-3.64	116.3	-0.92	-13.2	+3.68

TABLA IV.20 (cont.) Efecto producido por la presencia de efedrina.

Efedrina mgA ⁻¹	Bidimensional	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	IRF	%	IRF	%	dIRF/d8	%
	$\delta_{em}=350nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=215\text{ nm}/340nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=250nm/375nm$	
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
10	98.5	- 26.98	86.6	-26.24	-13.2	+3.29
5	104.9	- 22.26	83.0	-29.33	-11.8	-7.52
0.5	137.0	+1.52	118.0	+0.42	-13.5	+5.66

Efecto producido por la presencia de paracetamol.

Paracetamol mgA ⁻¹	Bidimensional	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	IRF	%	IRF	%	dIRF/d8	%
	$\delta_{em}=350nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=215nm/340nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=250nm/375nm$	
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
5	109.8	-18.17	95.8	-18.65	-7.2	-43.43
1	129.1	-3.82	119.1	-1.12	-12.05	-5.50

TABLA IV.20 (cont.) Efecto producido por la presencia de salicilamida.

Salicilamida mgA ⁻¹	Bidimensional	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	IRF	%	IRF	%	dIRF/d δ	%
	$\delta_{em}=350nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=215nm/340nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=250nm/375nm$	
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
5	93.9	-30.45	74.3	- 36.72	-10.4	-21.32
1	115.5	-14.38	94.0	- 19.94	-11.9	-6.74
0.5	129.1	-4.35	103.8	- 11.63	-12.3	-3.46

Efecto producido por la presencia de teofilina.

Teofilina mgA ⁻¹	Bidimension	Error	Sincrónico	Error	Sincrónico 1° der.	Error
	al	%	IRF	%	dIRF/d δ	%
	IRF		$\delta_{ex}/\delta_{em}=215nm/340nm$		$\delta_{ex}/\delta_{em}=250nm/375nm$	
Testigo	135.0		117.4		-12.8	
10	57.2	- 57.58	54.6	-53.49	-11.1	-12.77
5	89.8	- 33.47	75.9	-35.35	-12.3	-3.84
1	122.2	-9.46	100.8	-14.17	-12.8	+0.21

TABLA IV.21 Tolerancia (mgA^{-1}) para la determinación de ácido salicílico

Tolerancia (mgA^{-1} interferente/ mgA^{-1} ácido salicílico)			
Sustancia	Bidimensional	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
Ácido Ascórbico	<5	5	<0.5
Cafeína	5	5	0.5
Efedrina	<60	<60	<90
Paracetamol	5	5	5
Salicilamida	5	2	1
Teofilina	15	10	<0.5

TABLA IV.22 Tolerancia para la determinación de codeína

Tolerancia (mgA^{-1} interferente/ mgA^{-1} codeína)			
Sustancia	Bidimensional	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
Ácido Ascórbico	5	<5	2.5
Cafeína	0.25	0.25	2.5
Efedrina	0.25	0.25	<0.25
Paracetamol	0.5	0.5	<0.5
Salicilamida	0.25	<0.25	0.25
Teofilina	<0.5	<0.5	2.5

Hay que señalar a vista de los resultados de las Tablas IV.21 a IV.22 que para los métodos propuestos, el ácido salicílico presenta mayor tolerancia que la codeína para todos los interferentes ensayados.

IV. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN ÁCIDO SALICÍLICO-CODEÍNA

El sistema ácido salicílico-codeína, estudiado en este capítulo ha mostrado tener un comportamiento no aditivo tal como puede observarse en los espectros mostrados en los apartados II.1 y II.2 y en las Figuras IV.20 .

Ello origina ciertos problemas en la resolución de la mezcla que obligan por ejemplo a elegir longitudes de onda de trabajo en los espectros sincrónicos derivados que aparentemente no son las más adecuadas al efecto para el procedimiento "zero crossing". Esto es debido a que la posición de las δ a la cual se puede aplicar el procedimiento "zero crossing" no se mantiene fija sino que fluctúa ligeramente en función de la proporción relativa en la que se encuentran los analitos en la mezcla, como consecuencia del comportamiento no aditivo comentando antes, lo que conlleva a errores en la determinación.

Las longitudes de onda seleccionadas muestran mayor estabilidad, aunque suponen una pérdida en la sensibilidad. Aún así los errores en la determinación de codeína en presencia de ácido salicílico son altos. Los errores altos usando la espectrofluorimetría de emisión convencional y la sincrónica en cierto modo son previsibles ya que los correspondientes espectros no están totalmente resueltos. En cambio, con espectrofluorimetría sincrónica derivada con la que la mezcla debe quedar resuelta, no puede determinarse codeína si ésta no se encuentra, al menos, en la relación 6:1 respecto del ácido salicílico. Así la determinación de codeína en presencia de ácido salicílico en relaciones CO/AS que van de 0.25 a 6, arrojan los errores indicados en la Tabla IV.23.

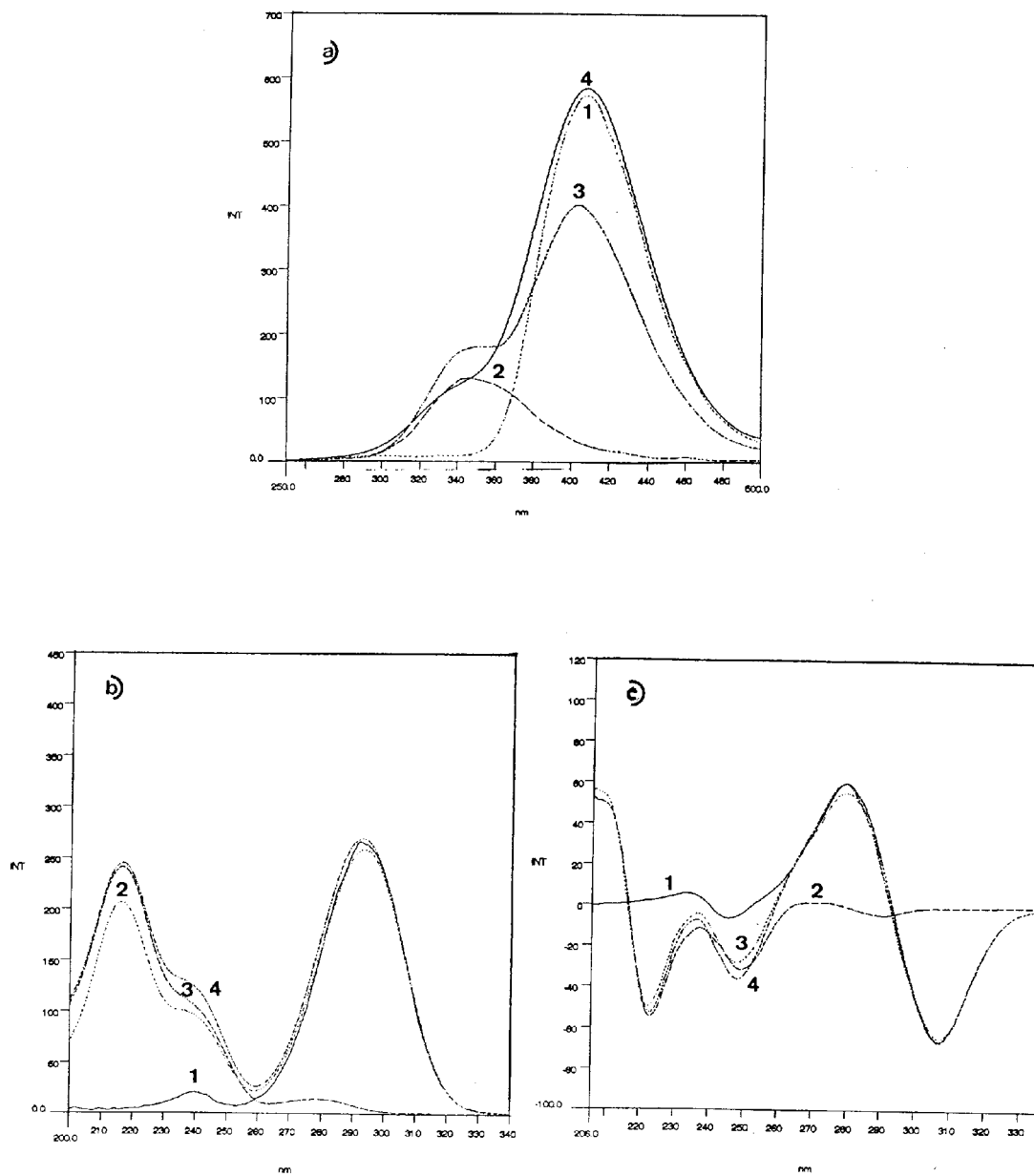


Fig. IV.20 Espectros: a) Convencional: [AS] : 1 mgA^{-1} , [CO] : 5 mgA^{-1}
 b) Sincrónico: [AS] : 0.5 mgA^{-1} , [CO] : 5 mgA^{-1}
 c) Sincrónico 1ª deriv. : [AS] : 0.5 mgA^{-1} , [CO] : 5 mgA^{-1}
 1) Ácido salicílico, 2) Codeína, 3) Mezcla, 4) Suma aritmética

TABLA IV.23 % Errores en la determinación de codeína

Relación CO/AS	Técnica Fluorimétrica		
	Convencional % Error	Sincrónica % Error	Sinc. 1ª der. % Error
0.25	-92.0	-94.4	+209
0.5	-12.42	-19.87	+111
1	-13.64	-22.36	+42.4
1.5	-33.2	-34.3	+24.03
2	-12.8	-19.0	+12.4
3	-17.2	-23.4	+55.8
4	-15.20	-16.6	+17.8
6	-6.78	-5.61	+3.22

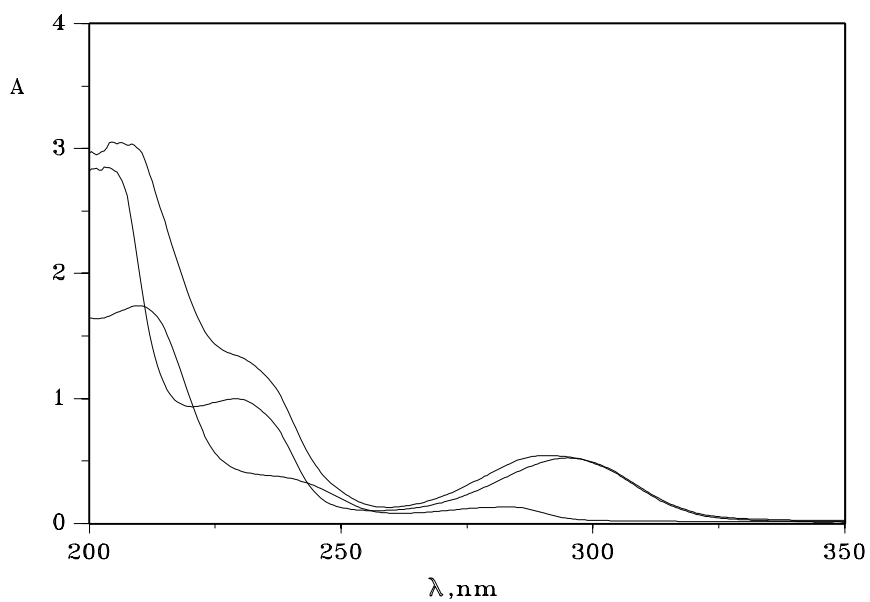


Fig.IV. 21 Espectros de UV. 1) Ácido salicílico; 2) Codeína; 3) Mezcla
Concentración: 20 mgA⁻¹

La interacción también parece ponerse de relieve en los espectros de UV (Figura IV.21) donde se observa asimismo la falta de aditividad del sistema.

Este problema parece apuntar hacia la existencia de una interacción entre los dos componentes del sistema tal como comentamos en el apartado II.1.2, la cual sería responsable de este comportamiento.

Una aproximación al estudio de la naturaleza o tipo de esta interacción lo hemos abordado mediante la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , la cual podría indicarnos si la presencia de uno de los componentes es capaz de originar alguna modificación en el espectro del otro como consecuencia de desplazamientos químicos de algún (os) ^1H inducidos por dicha interacción.

Se realizaron los espectros de ^1H de RMN de alta resolución del ácido salicílico, de la codeína y la mezcla de ambos en agua deuterada, empleando tetrametilsilano como patrón interno (Figuras IV.22 a IV.25) y el espectro de correlación $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a corta distancia (Figura IV.26) en el cual cada C da señales de correlación con los ^1H enlazados a él, lo cual contribuye a confirmar que la asignación de las señales en los espectros de ^1H es coherente en ambos casos con las posiciones de los H indicadas en las Figuras IV.22 y IV.23 y con los datos hallados en bibliografía [383].

En el espectro de la mezcla se observan variaciones en los desplazamientos químicos positivas muy significativas para los H de las posiciones " y \$ respecto del N (7, 9 y 20; 6, 10 y 18), respectivamente y en menor extensión para el de la posición 5 (Tabla IV.24). En todos los casos, el sentido y magnitud del desplazamiento sería coherente con la protonación del N codeínico, por acción del H del grupo -COOH del ácido salicílico, que induciría en todos los casos un "desapantallamiento" de estos H con intensidad decreciente conforme más alejados quedan del N. Esto queda patente a su vez cuando se comparan los espectros de correlación $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de la codeína con los de la mezcla codeína-ácido salicílico, (espectros COSY- Figuras IV.27 y IV.28).

En cambio, los H 3 al 6 del ácido salicílico no sufren ningún desplazamiento significativo debido a la posición relativamente alejada que ocupan respecto del grupo carboxílico.

Todo esto vendría a decirnos que la sospechada interacción entre estos dos constituyentes es una interacción química de tipo ácido-base.

TABLA VI. 24 Desplazamientos químicos (ppm).

H) † mezcla			
	* _{AS}	† _{CO}	AS	CO
2	-	5.01	-	+0.08
3	7.91	4.35	-0.02	+0.04
4	7.02	5.44	-0.03	+0.02
5	7.55	5.66	-0.02	+0.12
6	7.02	2.70	-0.03	+0.50
7	-	3.57	-	+0.67
9a	-	2.50	-	+0.63
9b	-	2.72	-	+0.65
10a	-	1.90	-	+0.20
10b	-	2.14	-	+0.25
15	-	6.74	-	+0.06
16	-	6.80	-	+0.06
18a	-	2.50	-	+0.18
18b	-	3.17	-	+0.50
20	-	2.47	-	+0.53
22	-	3.86	-	+0.01

* CO: codeína; AS: ácido salicílico

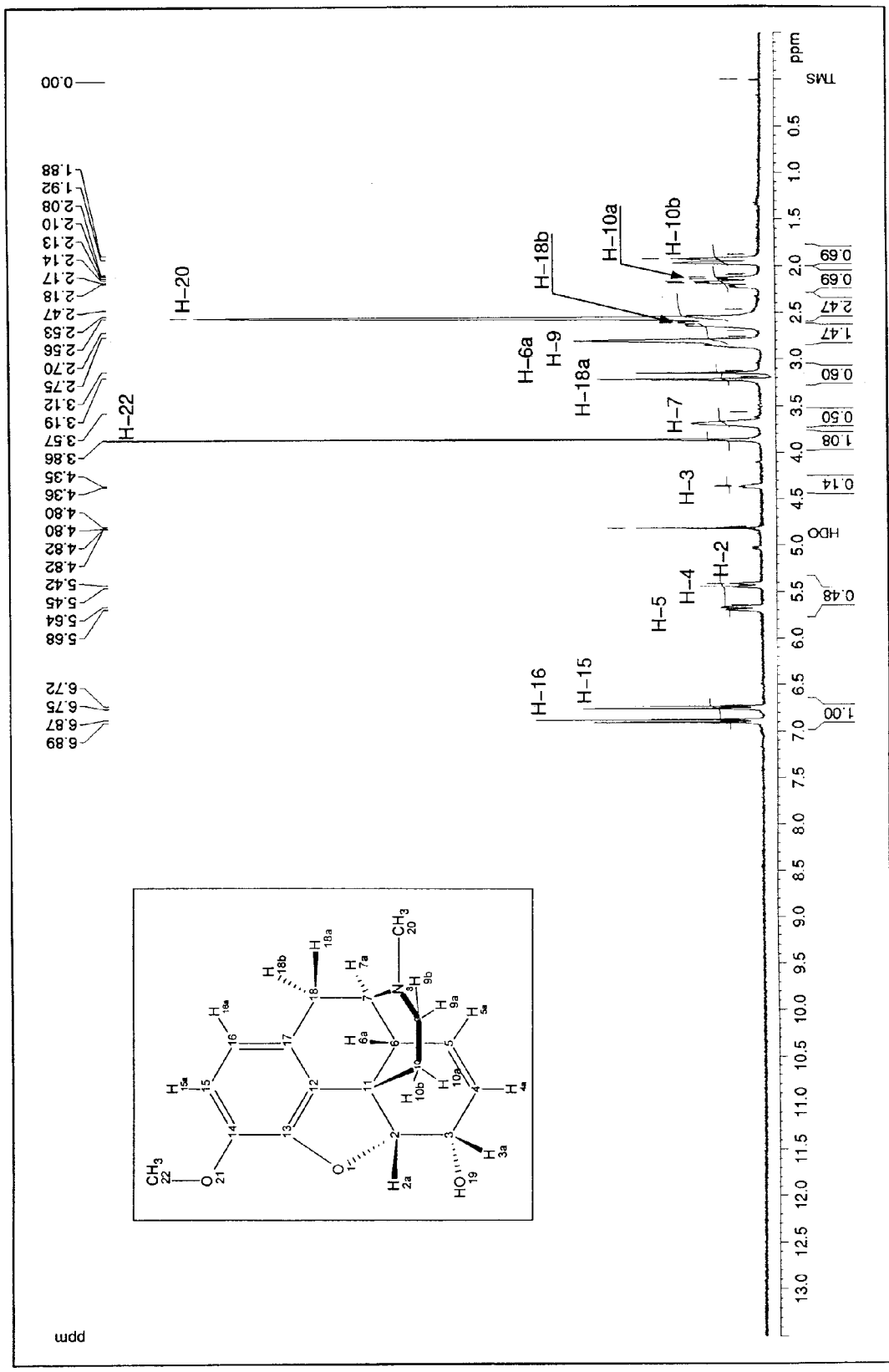


Fig. IV.23 1H-RMN de Codeína en D2O
Experimento con supresión de disolvente

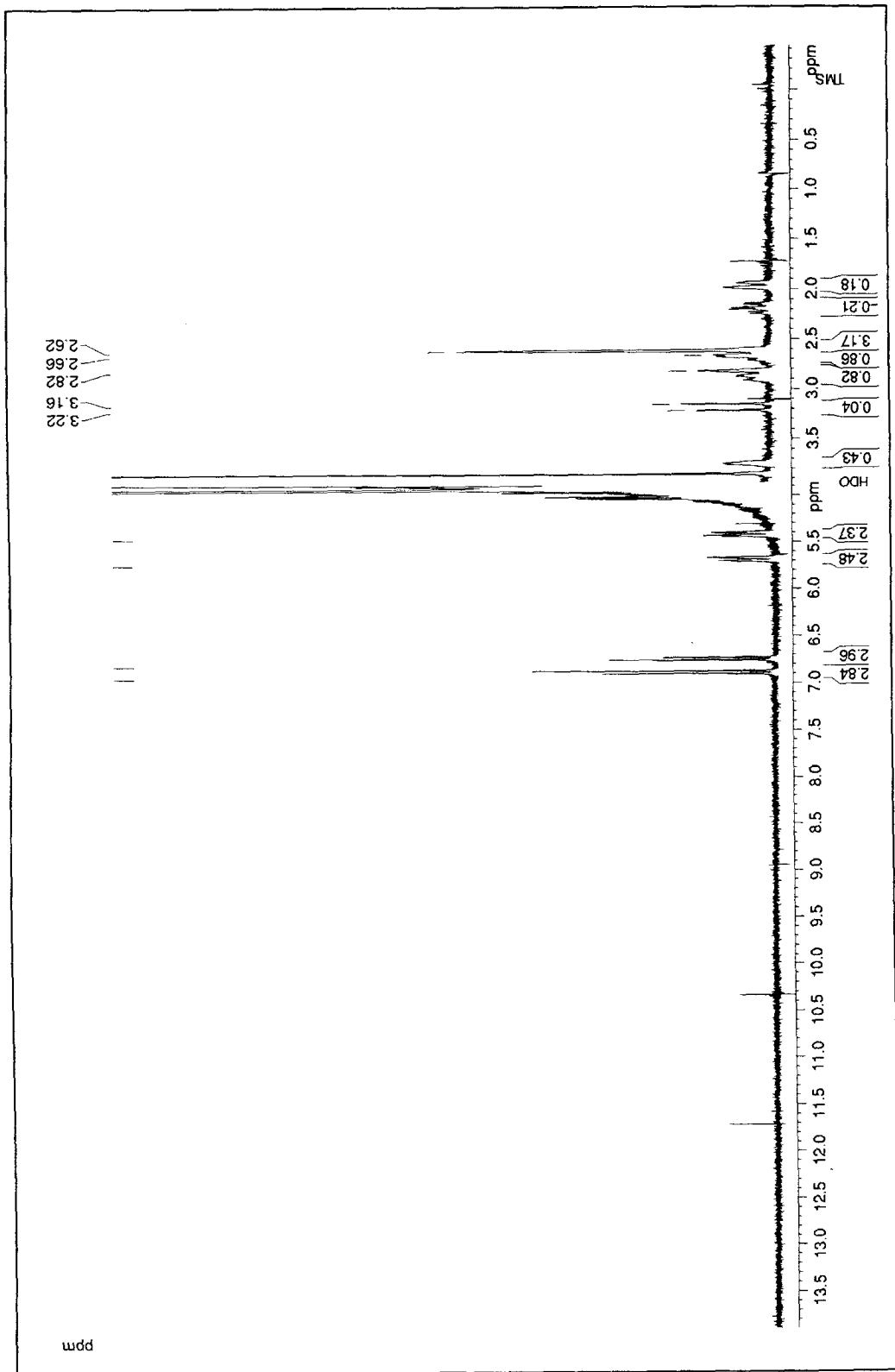


Fig. IV.24 1H-RMN de Codeína en D₂O

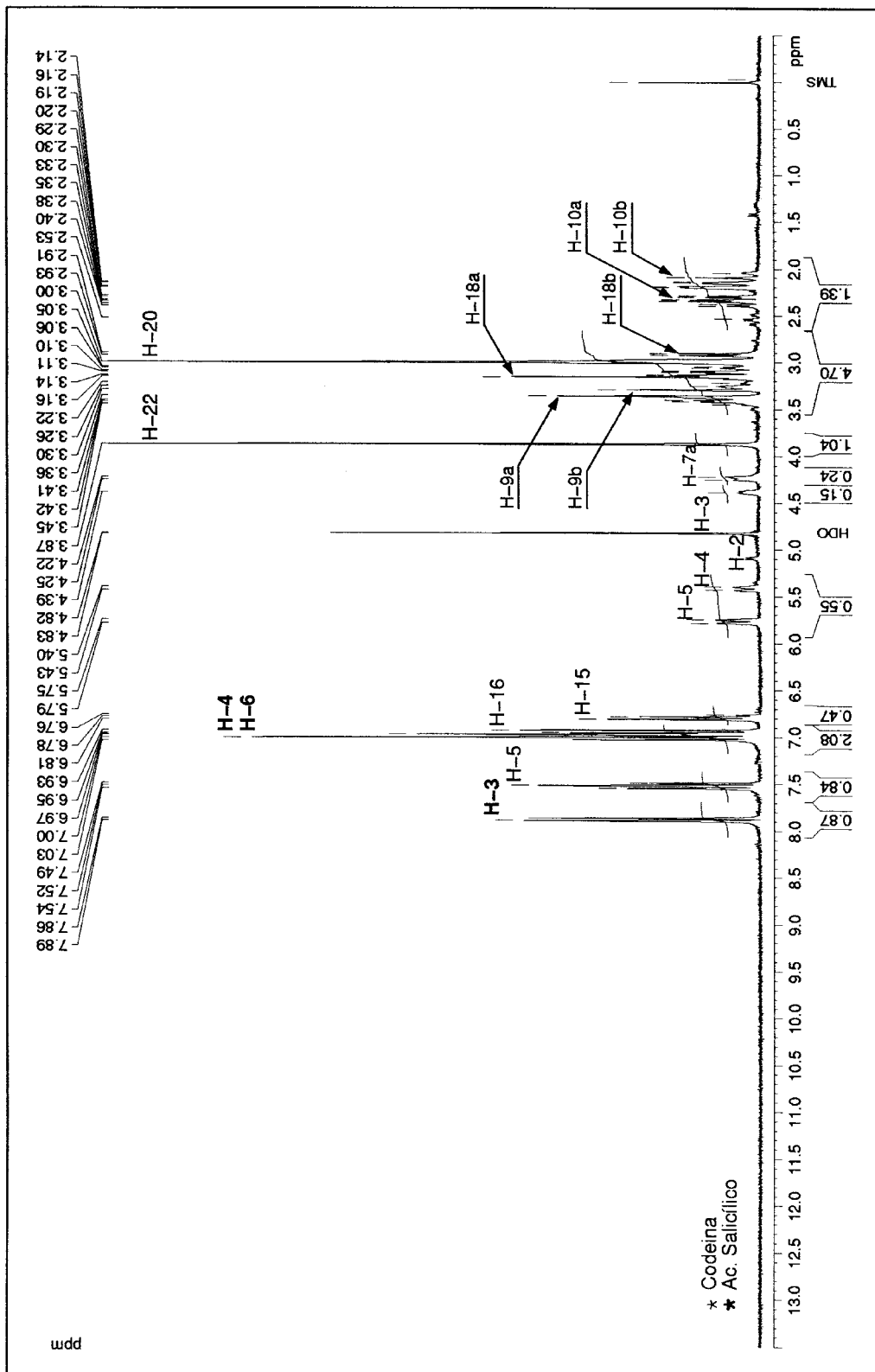


Fig. IV.25 1H-RMN de Acido Salicílico y Codeína en D2O
Experimento con supresión de disolvente

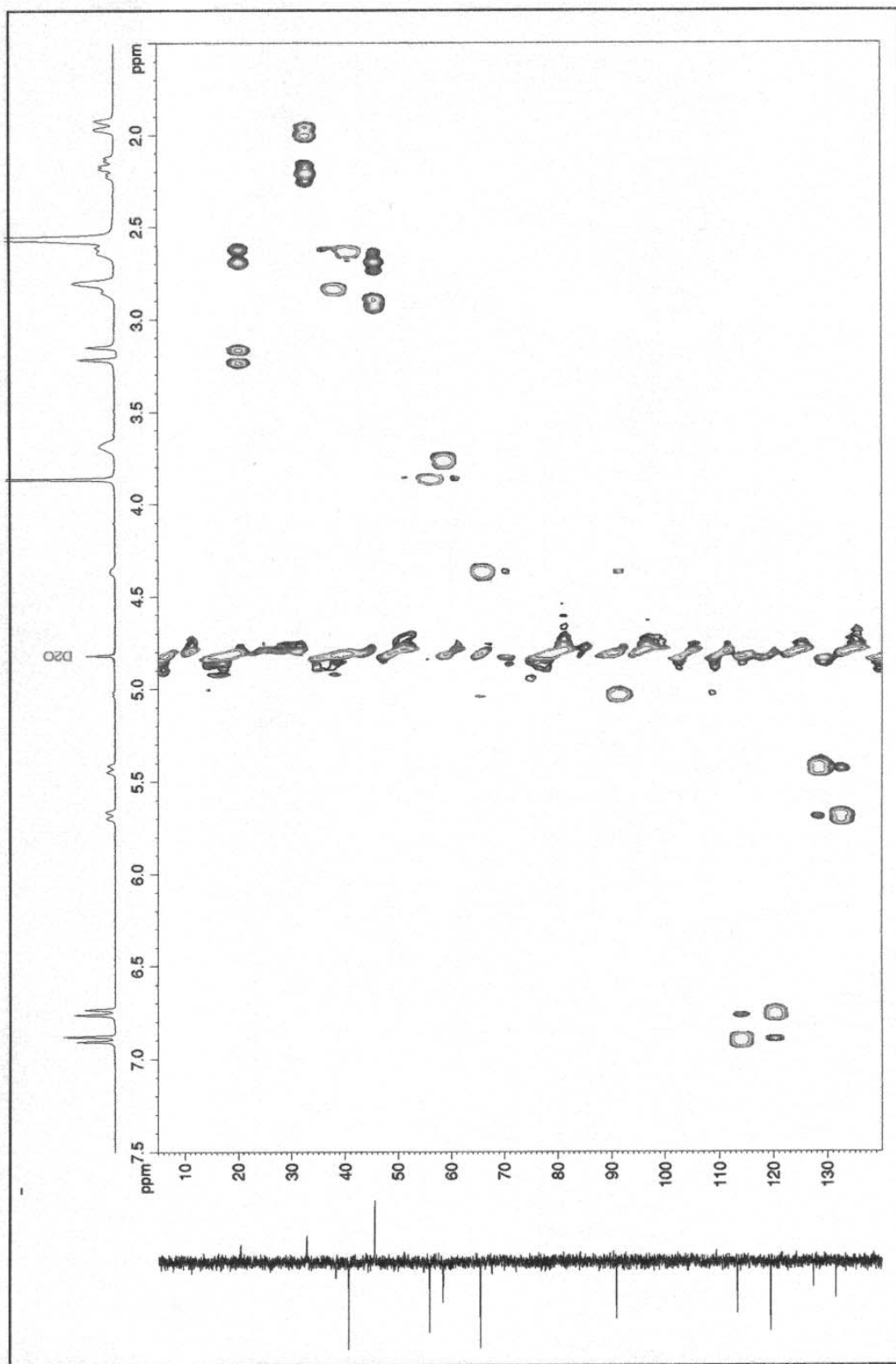


Fig. IV.26 Correlación ¹H-¹³C HMQC de Codeína en D₂O

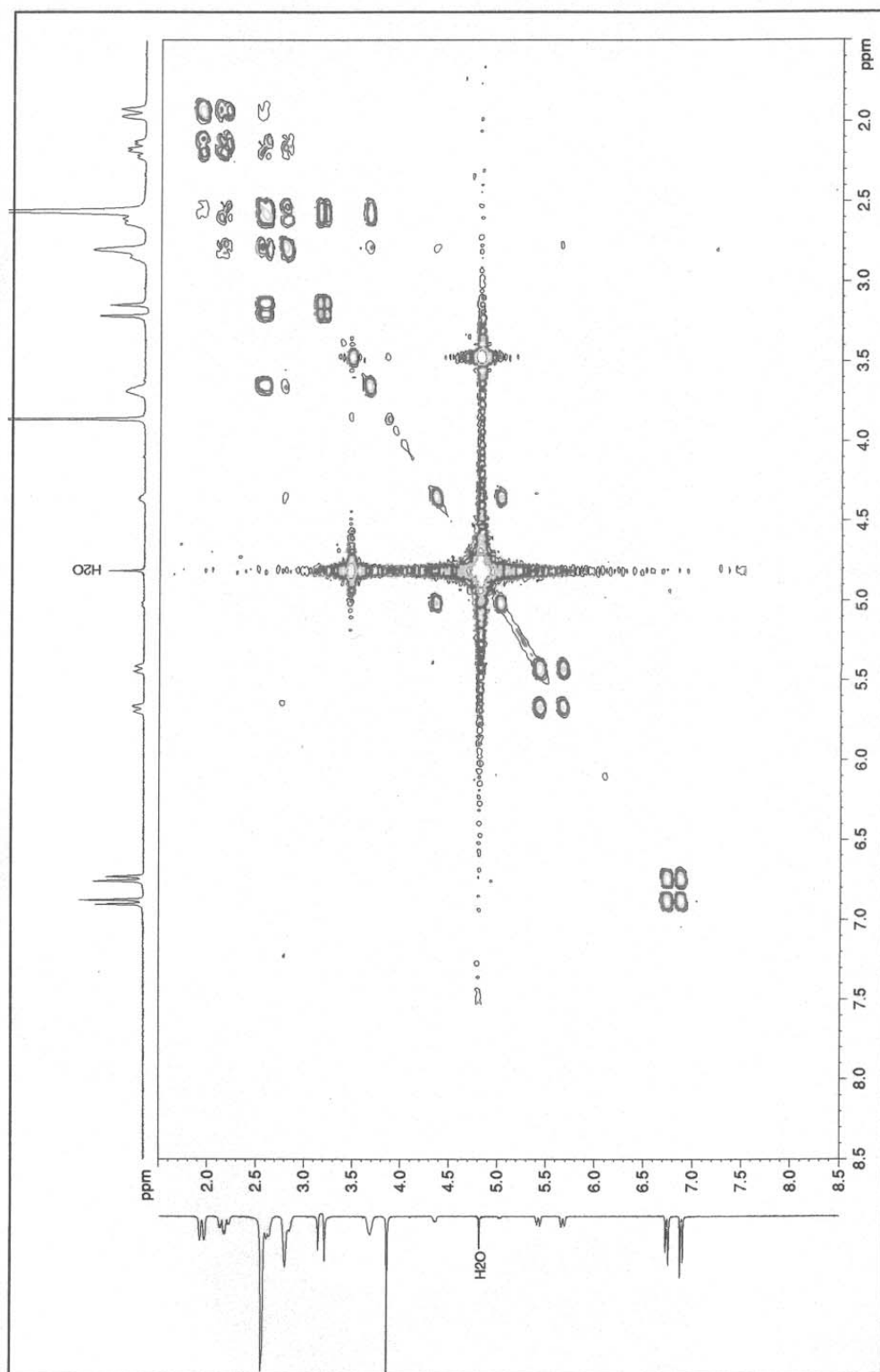


Fig. IV.27 COSY-DQF-1H-1H de Codeína en D₂O

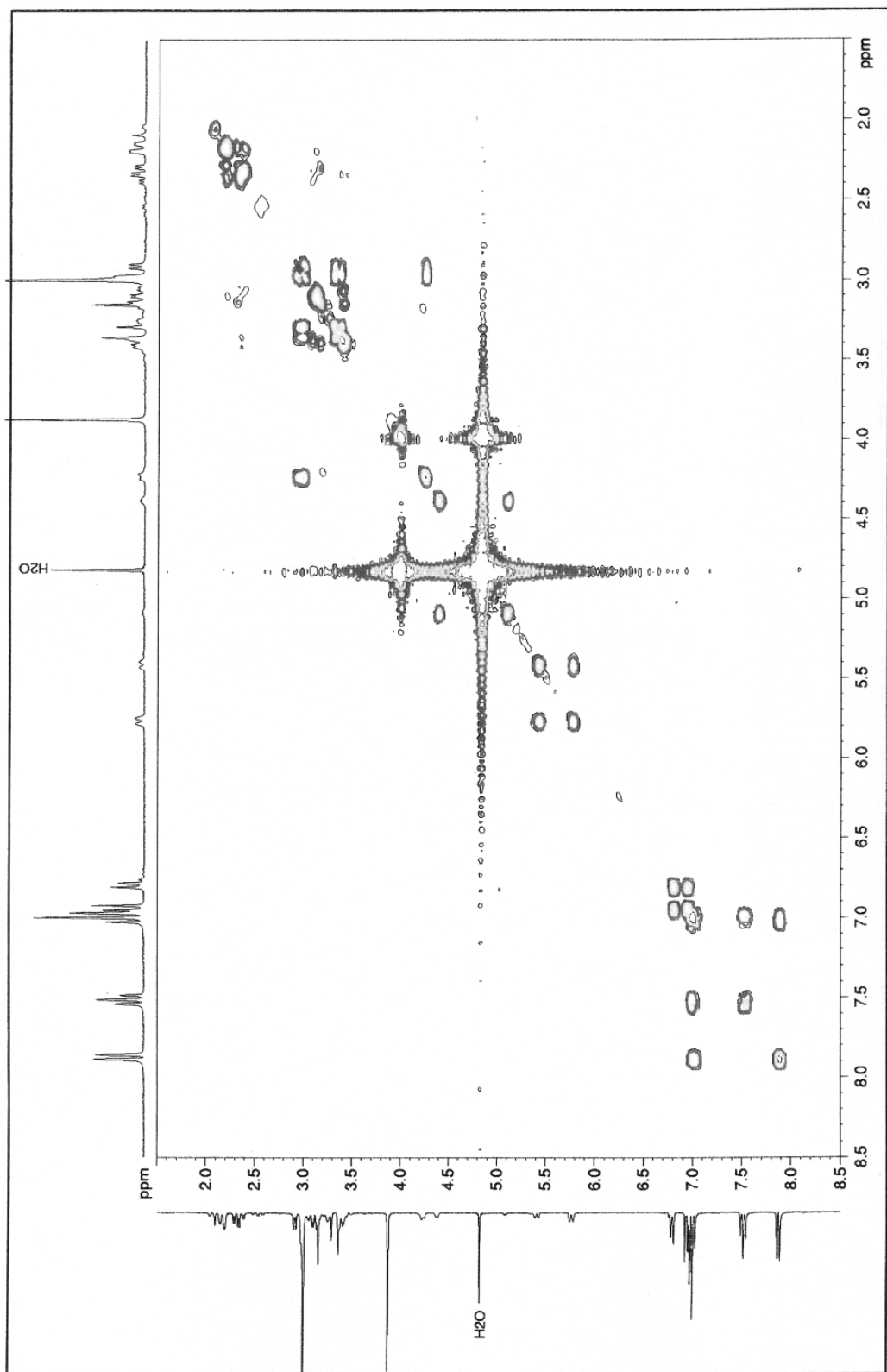


Fig. IV.28 COSY-DQF-1H-1H de Acido Salicilico y Codeina en D2O



**V. APLICACIONES ANALÍTICAS.
SISTEMA ÁCIDO SALICÍLICO Y CODEÍNA**



I. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo IV se ha realizado el estudio de características espectrales, parámetros instrumentales y analíticos, calibraciones de métodos, así como de límites de detección e interferencias y tolerancias para la resolución del sistema ácido salicílico y codeína. Dicho estudio se complementa con las aplicaciones a muestras reales y sintéticas que se lleva a cabo en este capítulo.

Los resultados obtenidos en la determinación simultánea de ambos analitos en muestras reales (fármacos), por cualquiera de las tres técnicas fluorimétricas no son totalmente satisfactorias. Ello es debido a que los fármacos disponibles en el mercado presentan una relación ácido salicílico/codeína muy elevada, por encima de la tolerada en los métodos estudiados en el capítulo anterior. El ácido salicílico en estas condiciones puede determinarse en presencia de codeína que no interfiere, pero la determinación de ésta requiere su separación, que hemos efectuado por intercambio iónico.

A continuación, en la Tabla V.1 se recoge como ejemplo los valores medios de tres determinaciones, para cada componente en algunos fármacos Dolmen y Dolvirán antes de su separación, comprobando que la determinación de codeína en presencia de concentraciones altas de ácido salicílico es inviable por ninguna de las tres técnicas fluorimétricas en estudio, en vista de los errores tan elevados que presenta, confirmando pues la necesidad de una técnica separativa en las muestras reales a aplicar previa a la realización de la medida.

TABLA V.1 Determinación en fármacos de ácido salicílico y codeína (sin separación).

Fármaco	Ácido Salicílico (mg)			Codeína (mg)		
	Emisión	Sincrónico	1ª der. Sincrón.	Emisión	Sincrónico	1ª der. Sincrón.
Dolmen*	491	482	484	5	30	330
Dolvirán**	388	390	398	5	30	400

* 500 mg de ácido acetil salicílico y 10 mg de fosfato de codeína $\frac{1}{2}$ H₂O

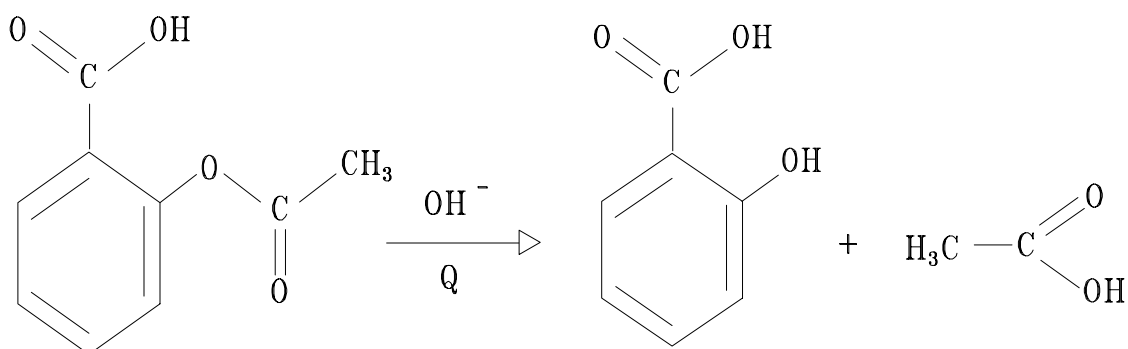
** 400 mg de ácido acetil salicílico y 9.6 mg de fosfato de codeína $\frac{1}{2}$ H₂O

II. APLICACIONES ANALÍTICAS.

II.1 Determinación de ácido salicílico.

II.1.1 Preparación de la muestra.

En los fármacos disponibles en el mercado que contienen los analitos en estudio, el ácido salicílico se encuentra acetilado en forma de ácido acetil salicílico, con lo cual teníamos que someter la muestra, una vez triturada en mortero de vidrio a un proceso de hidrólisis, según se describió en el apartado IV.2 (capítulo I), para conseguir la conversión completa a ácido salicílico, según la reacción:



Se hacen tres determinaciones por separado de cada muestra y los resultados se refieren a mg de ácido acetil salicílico.

II.1.2 Aplicación de los métodos fluorimétricos.

Para comprobar la aplicabilidad de los métodos propuestos, mediante las distintas técnicas fluorimétricas, estas se han aplicado a aquellos productos farmacéuticos que contenían codeína y ácido salicílico (como acetil-salicílico), cuyas composiciones se detallan en el capítulo I, siendo los que se indican a continuación: Dolmen, Dolvirán y Fiorinal.

En primer lugar hay que recordar que la presencia de codeína no va a interferir en ningún caso en la intensidad de fluorescencia del ácido salicílico, debido a que su concentración es muy baja en comparación con la de éste así como del resto de las sustancias presentes en las muestras, la cafeína es la única fluorescente, pues el ácido ascórbico y el paracetamol, no muestran fluorescencia nativa. Como consecuencia del estudio de interferencias y tolerancias para la determinación de ácido salicílico

(Capítulo IV), podemos concluir, que las sustancias presentes en los tres fármacos se encuentran dentro de los límites de tolerancia permitidos.

Los resultados analíticos correspondientes a las tres réplicas para cada muestra, aplicándoles el procedimiento operatorio, se recogen en las Tablas V.2 a V.4.

TABLA V.2 Dolmen.

EMISIÓN			
Determinación	IRF $\epsilon_{em} = 405 \text{ nm}$	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A. Salic./comprimido
1	443.5	0.98	492.2
2	444.0	0.98	492.5
3	439.5	0.97	487.6
Valor medio			490.7

SINCRÓNICO			
Determinación	IRF $\epsilon_{exc.}/\epsilon_{em.}$ 293 nm/418nm	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A. Salic./comprimido
1	375.1	0.96	482.0
2	372.7	0.96	479.0
3	377.2	0.97	484.5
Valor medio			482.0

SINCRÓNICO 1ª DERIVADA			
Determinación	dIRF/dϵ $\epsilon_{exc.}/\epsilon_{em.}$ 265 nm/390 nm	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A.Salic./comprimido
1	32.01	0.97	483.0
2	32.64	0.98	487.0
3	31.82	0.97	483.1
Valor medio			484.2

TABLA V.3 Dolvirán.

EMISIÓN			
Determinación	IRF $\epsilon_{em} = 405 \text{ nm}$	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA⁻¹)	mg Ac.A. Salic./comprimido
1	443.0	0.98	392.0
2	431.0	0.96	384.0
3	437.0	0.97	388.0
Valor medio			388.0

SINCRÓNICO			
Determinación	IRF $\epsilon_{exc.}/\epsilon_{em}$ 293 nm/418 nm	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA⁻¹)	mg Ac.A. Salic./comprimido
1	388.0	0.99	396.0
2	375.3	0.96	384.0
3	379.0	0.97	388.0
Valor medio			389.4

SINCRÓNICO 1ª DERIVADA			
Determinación	dIRF/dϵ $\epsilon_{exc.}/\epsilon_{em}$ 265 nm/390 nm	[Ac.A.Salic.]_{dis.} (mgA⁻¹)	mg Ac.A.Salic./comprimido
1	32.66	0.99	396.0
2	32.92	0.99	396.0
3	33.50	1.01	404.0
Valor medio			398.0

TABLA V.4 Fiorinal.

EMISIÓN			
Determinación	IRF $\delta_{em} = 405 \text{ nm}$	[Ac.A. Salic.] _{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A. Salic./cápsula
1	428.8	0.95	190.0
2	438.4	0.98	196.0
3	431.1	0.95	190.0
Valor medio			192.0
SINCRÓNICO			
Determinación	IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em}$ 293 nm/ 418nm	[Ac.A. Salic.] _{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A. Salic./cápsula
1	372.4	0.95	190.0
2	386.4	0.99	198.0
3	371.5	0.95	190.0
Valor medio			192.6
SINCRÓNICO 1ª DERIVADA			
Determinación	dIRF/d δ $\delta_{exc.}/\delta_{em}$ 265 nm/390 nm	[Ac.A. Salic.] _{dis.} (mgA^{-1})	mg Ac.A. Salic./cápsula
1	32.06	0.97	194.0
2	34.24	1.03	206.0
3	34.25	1.03	206.0
Valor medio			202.0

II.1.3 Parámetros estadísticos.

Finalmente, se va a validar los métodos por comparación del resultado con un método de referencia puesto a punto en el capítulo II de la presente memoria, que utiliza como técnica separativa Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

A partir de los resultados experimentales, aplicamos el procedimiento estadístico para la evaluación y comparación de la exactitud y precisión de los métodos propuestos.

La exactitud se ha comparado mediante el estadístico calculado $t_{e,exp}$ (t de Student) y la precisión a través del contraste de varianzas, *test* de Snedecor (distribución F de Fisher). En ambos criterios, siempre que el estadístico calculado t o F sean menor que el tabulado para el número de grados de libertad correspondiente al nivel de significación seleccionado, 5%, se acepta que el método comparado es igual de exacto y preciso que el de referencia.

A continuación, los resultados de los test aparecen en las Tablas V.5 a V.7, concluyendo que los métodos fluorimétricos son exactos y precisos y por lo tanto aplicables a la determinación de ácido salicílico en productos farmacéuticos que incluyen en su composición codeína.

TABLA V.5 Dolmen

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	490.7	482.0	484.2	486.0
s_{n-1}	2.656	2.754	2.309	2.722
s^2	7.05	7.58	5.333	7.41
s_m	1.533	1.590	1.333	1.572
C.V. %	1.43	0.57	0.48	0.56
E_r	+0.84	-0.95	-0.34	-
$O \pm s_m \times t$	491±7	482±7	484±6	486±7
s_{sistema}	2.689	2.738	5.084	-
t_{exp}	1.868 N.S.	2.058 N.S.	0.328 N.S.	-
F_{exp}	1.051 N.S.	1.023 N.S.	1.389 N.S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

TABLA V.6 Dolvirán

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	388.0	389.3	398.7	387.0
s_{n-1}	4.00	6.11	4.619	2.722
s^2	16.00	37.33	21.33	7.410
s_m	2.309	3.528	2.666	1.572
C.V. %	1.03	1.57	1.16	0.70
E_r	+0.26	+0.60	+5.10	-
$O \pm s_m \times t$	388±10	390±15	398.7±11.4	387±7
s_{sistema}	3.421	4.730	7.582	-
t_{exp}	0.358 N.S.	0.596 N.S.	1.543 N.S.	-
F_{exp}	2.159 N.S.	5.038 N.S.	2.879 N.S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

TABLA V.7 Fiorinal.

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	192.0	192.7	202.0	196.7
S_{n-1}	3.464	4.618	6.920	2.840
s^2	12.00	21.33	48.00	8.07
s_m	1.999	2.666	3.999	1.640
C.V. %	1.80	2.40	3.43	1.44
E_r	-2.39	-2.03	+2.70	-
$O \pm s_m \times t$	192±9	193±11	202±17	197±7
s_{sistema}	3.168	3.834	5.295	-
t_{exp}	1.818 N.S.	0.326 N.S.	1.000 N.S.	-
F_{exp}	1.487 N.S.	2.644 N.S.	5.940 N.S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

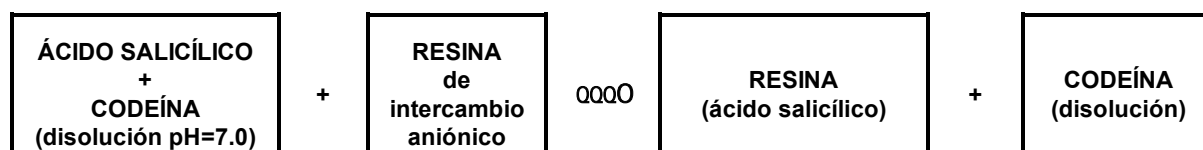
$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

II.2 Determinación de Codeína.

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo y comprobado en los valores recogidos en la Tabla V.1, para la codeína en los tres métodos fluorimétricos propuestos, existe la imposibilidad de llevar a cabo la determinación simultánea de los componentes del sistema en estudio en los fármacos anteriores debido a la elevada relación ácido salicílico codeína que presentan, muy por encima de la que permiten resolver los métodos que hemos puesto a punto en nuestro trabajo. Por ello optamos por una separación previa de la codeína y ácido salicílico. Este problema ha sido encontrado también por otros autores que han tenido que acudir por ello al empleo de una separación previa de la codeína [326]. En base a la naturaleza de ambos analitos y características del método seleccionamos, una técnica separativa por intercambio iónico, siendo necesario previamente un estudio de optimización de factores, que influyen en el proceso de separación.

II.2.1 Estudio experimental de la separación de este analito del ácido salicílico.

Se consideró como más idóneo un proceso de separación por cambio iónico, de acuerdo al siguiente esquema



de manera que el ácido salicílico quede fijado en la resina mientras que la codeína permanece en disolución.

II.2.1.1 Elección del cambiador iónico para la separación.

Para iniciar este estudio, es necesario conocer el comportamiento ácido de ambos componentes en disolución y sus estructuras representadas en las Figuras V.1 y V.2.

A partir del valor óptimo de pH de trabajo, pH = 7.0, cabe pensar que el ácido salicílico se encuentra en forma aniónica y puede ser retenido en una resina de carácter aniónico por intercambio iónico o alternativamente por adsorción.

El siguiente paso era escoger la resina adecuada, para ello se ensayaron dos tipos: Sephadex QAE-A25 y Dowex 1x8 (200-400). Primeramente se ensayó la separación por equilibración discontinuo (método batch).

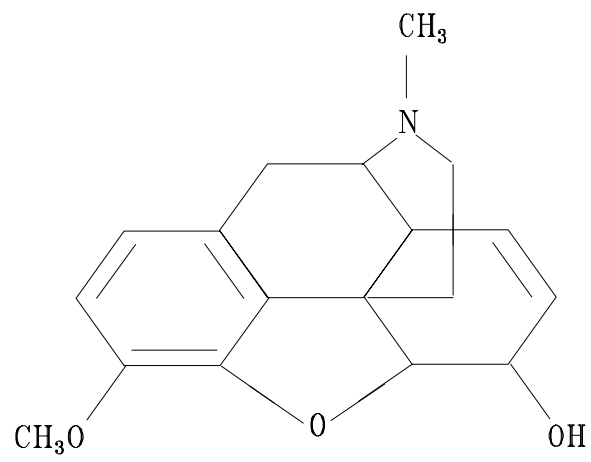


Fig. V.1 Estructura de la codeína.

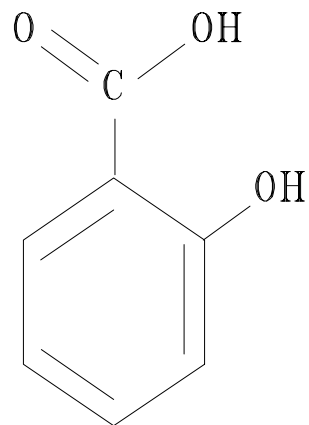


Fig. V.2 Estructura del ácido salicílico.

Los ensayos se realizaron para distintas mezclas del sistema, con una concentración fija de codeína y crecientes de ácido salicílico, empleando tiempos de equilibración comprendidos entre cinco y cuarenta y cinco minutos, y cantidades de resina variables. Una vez equilibrado el sistema, se filtraba a través de un embudo de filtro con placa de vidrio sinterizado del nº 3 y al filtrado se le registraban los espectros en las condiciones óptimas de cada técnica fluorimétrica, calculando para cada ensayo el porcentaje de fijación de ácido salicílico en la resina.

De esta forma, la resina Sephadex QAE-A25 fue rechazada al comprobar que ambos analitos se fijaban simultáneamente y el ácido salicílico lo hacía de una forma parcial, lo que dio lugar a realizar la misma experiencia con la resina tipo Dowex 1x8 (200-400), en la que se fija mejor el ácido salicílico. A pesar de todos estos intentos, no se consiguió obtener una fijación completa del ácido salicílico, debido a que éste posee un coeficiente de distribución bajo. Se intentó entonces la separación en columna usando la última resina citada.

El proceso de separación se llevó a cabo en una minicolumna de dimensiones: 10 cm de altura y 5 mm de diámetro externo, cargada hasta una altura aproximada de 5 cm y empaquetada uniformemente, de esta manera se permite que el paso de la disolución de la mezcla (fase móvil), sea más lento a través de la resina y por tanto, más eficaz la fijación del ácido salicílico en la resina y conseguir aislar el analito a determinar.

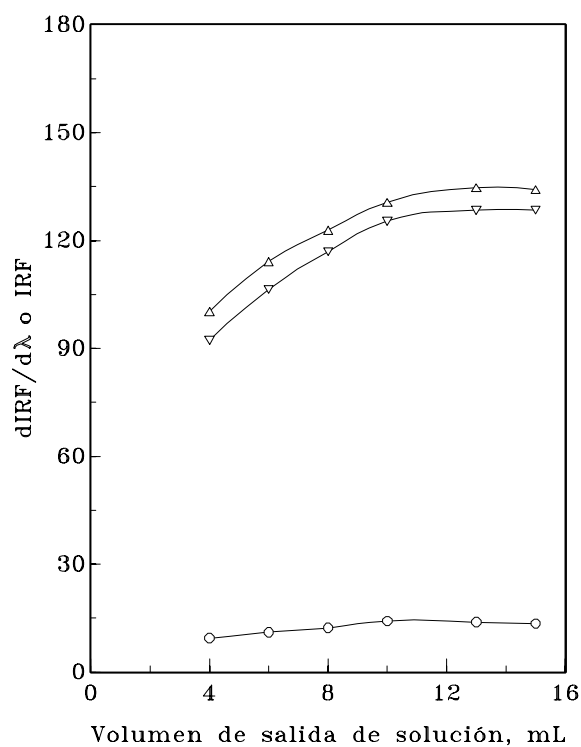
II.2.1.2 Optimización del volumen inicial de cabeza desechable.

Como resultado de los valores de intensidad de fluorescencia relativa y observación de los espectros registrados a distintas fracciones sucesivas recogidas de la minicolumna, una vez pasada la disolución de la mezcla de ambos componentes, fue necesario optimizar un volumen de cabeza de la minicolumna que había que rechazar hasta obtener una señal constante del analito a determinar (codeína).

Para tal fin, se preparó una batería de minicolumnas cargadas de acuerdo a lo descrito en el apartado anterior y humedecidas con 2 mL de agua desionizada. Las disoluciones de la mezcla contenían: 2 mL de disolución de codeína de $100 \text{ mg}\text{A}^{-1}$ y 1 mL de disolución de ácido salicílico de $100 \text{ mg}\text{A}^{-1}$, 2 mL de disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ y agua bidestilada hasta un volumen final de 100 mL. Los resultados se recogen en la Tabla V.8 y su representación gráfica se muestra en la Figura V.3. A la vista de los mismos optamos por desechar los primeros diez mL de solución, a partir de los cuales las señal se estabiliza, recogiendo los cinco siguientes para realizar la medida.

TABLA V.8 Optimación del volumen inicial desechable.

Volumen mL	Emisión IRF $\delta_{em.} = 350 \text{ nm}$	Sincrónico		Sincrónico 1° der.
		IRF		$dIRF/d\delta$
		$\delta_{exc.}/\delta_{em.}$		$\delta_{exc.}/\delta_{em.}$
		215 nm/340 nm	250 nm/375 nm	
4	100.3	92.52		-9.43
6	114.2	106.4		-11.12
8	122.9	116.8		-12.31
10	130.6	125.4		-14.24
13	134.6	128.4		-13.90
15	134.2	128.5		-13.50



△ Emisión ▽ Sincrónico ○ Sincrónico 1ª deriv.

Fig. V.3 Optimación del volumen inicial desechable.

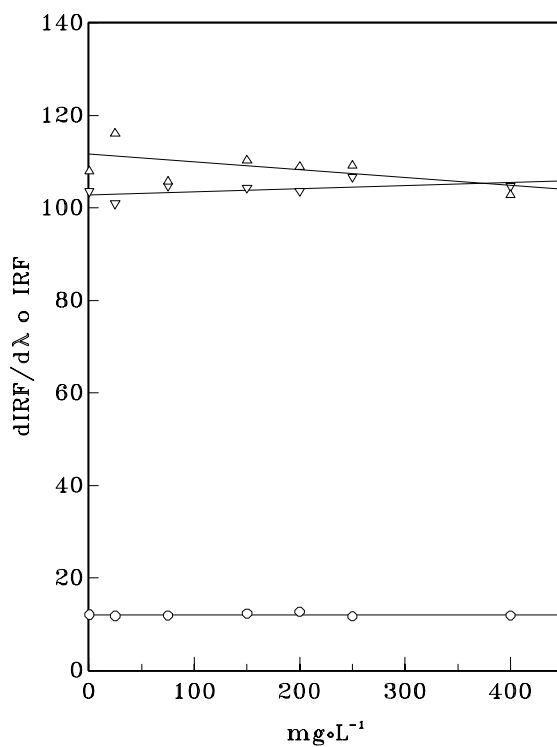
II.2.1.3 Estudio de fijación del ácido salicílico en la resina de cambio iónico.

Para completar las experiencias sobre la separación de ambos componentes del sistema, se estudió si la cantidad de resina contenida en la minicolumna era suficiente para retener todo el ácido salicílico, que acompañe a la codeína en la disolución problema, para ello se prepararon una serie de minicolumnas en las condiciones óptimas establecidas en apartados anteriores, se prepararon disoluciones que para una misma concentración de codeína 2 mgA^{-1} y $\text{pH} = 7.0$ (ajustado con el tampón), la cantidad de ácido salicílico variaba desde 0.5 a 400 mgA^{-1} y que era suficiente dada la relación de ambos analitos en los fármacos.

A las soluciones obtenidas de cada minicolumna (una vez desechados los volúmenes iniciales indicados anteriormente) se les registraron los espectros y los valores de las señales de fluorescencia para ácido salicílico y codeína encontradas están recogidos en la Tabla V.9 y su representación gráfica en la Figura V.4, indicando que la resina es capaz de retener al menos, el ácido salicílico de disoluciones de hasta 400 mgA^{-1} pudiendo conseguirse una separación completa del analito a determinar. La cantidad media de codeína expresada en porcentaje recogida a la salida de la columna es del 84%. En cambio el ácido salicílico es retenido cuantitativamente en la columna, pues la solución recogida a la salida de la misma solo contiene el 0.07%, es decir, la cantidad retenida de este analito es el 99.93% por lo que podemos afirmar que conseguimos una separación completa de la codeína.

TABLA V.9 Estudio de separación de los componentes en la columna

Relación AS/CO	Ac.Salicílico mgA ⁻¹	Emisión IRF		Sincrónico IRF		Sincrónico 1º der. dIRF/d8	
		CO	AS	CO	AS	CO	AS
0.25	0.5	108.2	58.2	103.3	12.7	-12.1	-3.55
12.5	25	116.4	63.7	100.7	11.9	-11.8	-2.40
37.5	75	106.0	56.8	104.5	12.2	-11.9	-2.81
75	150	110.6	56.1	104.1	11.1	-12.3	-4.60
100	200	109.2	52.0	103.4	10.0	-12.7	-4.60
125	250	109.5	54.8	106.4	12.1	-11.7	-3.92
200	400	103.1	58.5	104.4	14.8	-11.9	-2.75



△ Emisión ▽ Sincrónico ○ Sincrónico 1ª deriv.

Fig. V.4 Estudio de separación de los componentes en la columna

II.2.2 Calibración y parámetros analíticos.

Dado que la determinación de codeína nos ha llevado a tener que realizar un proceso de separación previo, por las razones ya descritas y observando además en ensayos realizados con anterioridad que el valor de la señal de intensidad de fluorescencia de la codeína, una vez separada del ácido salicílico en la minicolumna, era menor en comparación con la señal de fluorescencia a la misma concentración de la disolución patrón, hemos de realizar la calibración para codeína, en las condiciones del propio proceso de separación, a través de la minicolumna.

II.2.2.1 Función de calibrado.

Para llevar a cabo la calibración, se preparó una serie de seis minicolumnas de acuerdo a lo establecido en el apartado I.1.2, y en matraces de 100 mL se añadieron volúmenes crecientes de disolución patrón de codeína 100 mgA^{-1} , 2 mL de disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, volumen de disolución patrón de ácido salicílico para una concentración constante de 250 mgA^{-1} y agua desionizada hasta enrasar. Los espectros para las tres técnicas fluorimétricas se registraron en idénticas condiciones que en disolución, con su correspondiente blanco. Los resultados netos de las señales y los parámetros analíticos se muestra en la Tabla V.10 y en las Figuras V.5 y V.6 sus representaciones gráficas para los métodos propuestos.

TABLA V.10 Rectas de calibrado

Codeína, mgA^{-1}	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
0.10	3.15	3.66	0.44
0.20	14.7	15.0	-0.90
0.50	31.9	33.0	-2.00
1.00	66.5	63.8	-6.00
2.00	118.1	112.2	-12.31
3.00	168.1	162.9	-19.12

Resumen de los parámetros analíticos			
Método	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
fluorimétrico			
a	3.47	4.23	-0.60
m	56.13	53.66	6.52
r	0.998	0.998	0.999

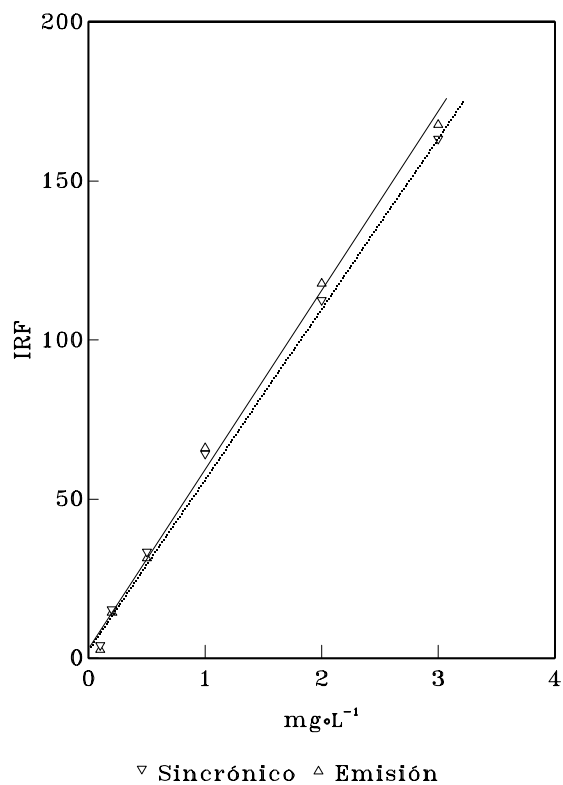


Fig. V.5 Recta de calibrado para codeína $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (resina). Emisión-Sincrónico.

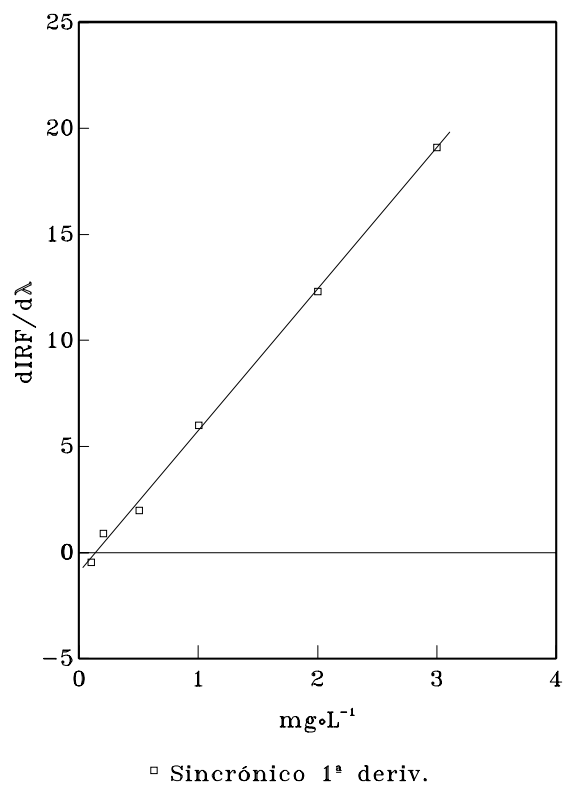


Fig. V.6 Rectas de calibrado para codeína ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Sincrónico 1ª derivada

II.2.2.2 Límites de detección y cuantificación.

Para establecer ambos límites, se ha seguido el criterio recomendado por la I.U.P.A.C., que ha sido expuesto en el capítulo I de la presente Memoria. Para el cálculo de ambos límites se prepararon nueve minicolumnas, según se ha expuesto con anterioridad, y el mismo número de blancos conteniendo 250 mgA^{-1} de Ácido salicílico, sometiéndolos al mismo procedimiento operatorio de separación. Los resultados para las distintas técnicas fluorimétricas se expresan en la Tabla V.11.

TABLA V.11 Límites de detección y cuantificación. Codeína (resina)

Muestra	Bidimensional IRF $\varrho_{em.} = 350 \text{ nm}$	Sincrónico IRF $\varrho_{exc.}/\varrho_{em.}$ 215 nm/340 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d ϑ $\varrho_{exc.}/\varrho_{em.}$ 250 nm/375 nm
1	-0.17	0.77	-0.09
2	0.10	0.88	-0.09
3	-0.53	0.88	0.00
4	0.66	0.68	-0.05
5	-0.61	0.77	-0.05
6	-0.74	0.84	-0.07
7	0.53	0.77	-0.01
8	0.20	0.77	-0.02
9	0.58	0.79	-0.08
Parámetros Estadísticos			
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
O	0.002	0.080	0.051
m	56.13	53.66	6.52
s_{n-1}	0.540	0.068	0.034
C_L	0.029 mgA^{-1}	0.003 mgA^{-1}	0.016 mgA^{-1}
C_Q	0.096 mgA^{-1}	0.012 mgA^{-1}	0.053 mgA^{-1}

II.2.2.3 Reproducibilidad del método.

Igualmente, para el estudio de la reproducibilidad del método se procede según lo establecido en los apartados anteriores. Preparando de nuevo una batería de ocho minicolumnas y ocho disoluciones que contenían 2 mgA^{-1} de codeína y 200 mgA^{-1} de ácido salicílico. Los valores de intensidad de fluorescencia para los espectros registrados mediante las técnicas de emisión, sincrónico y primera derivada del sincrónico, en las condiciones adecuadas y restando el correspondiente blanco, se recogen

en la Tabla V.12.

TABLA V.12 Reproducibilidad del método. Codeína (Resina)

Muestra	Emisión IRF $\delta_{em.} = 350 \text{ nm}$	Sincrónico IRF $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 215 nm/340 nm	Sincrónico 1º der. dIRF/d δ $\delta_{exc.}/\delta_{em.}$ 250 nm/375 nm
1	126.0	111.0	-12.35
2	121.5	121.9	-12.08
3	110.4	110.3	-13.29
4	115.4	116.1	-12.67
5	107.1	114.2	-12.80
6	123.0	111.8	-12.32
7	117.5	112.5	-12.59
8	123.8	111.0	-12.26

Parámetros Estadísticos			
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
n	8	8	8
O	118.1	112.8	12.55
σ_m	2.38	1.55	0.14
σ_{n-1}	6.73	4.39	0.38
C.V.%	5.7	3.9	3.1
$\bar{x} \pm \sigma_m \cdot t_s$	118±5	113±4	12.6±0.3

II.2.2.4. Resumen de los parámetros analíticos

En la Tabla V.13 se recogen los valores de todos los parámetros analíticos para las tres técnicas de análisis propuestas.

Tabla V.13 Resumen de los parámetros analíticos

Parámetro analítico	Emisión	Sincrónico	1ª der. Sincrónico
Ordenada en origen	3.47	4.23	-0.60
Pendiente ($L \cdot \text{Ang}^{-1}$)	56.13	53.66	6.52
Coefficiente de correlación (r)	0.998	0.998	0.999
Rango dinámico lineal (R.D.L. $\text{mg} \cdot \text{Å}^{-1}$)	0.1 - 3	0.1 - 3	0.1 - 3
Límite de detección ($\text{mg} \cdot \text{Å}^{-1}$)	0.028	0.003	0.016
Límite de cuantificación ($\text{mg} \cdot \text{Å}^{-1}$)	0.096	0.012	0.053
Desviación estándar relativa (R.S.D.%)	5.7	6.9	3.1

Los resultados obtenidos en los parámetros analíticos para el método con separación previa de la codeína en columna, en comparación con los métodos en disolución conduce a valores del mismo orden de los límites de detección y cuantificación para las técnicas convencional y sincrónica y menores para la derivada sincrónica, se observan valores más bajos para la pendiente en las tres técnicas posiblemente debido a la retención parcial del analito en la resina, así como valores más altos del coeficiente de variación causado quizás por la manipulación requerida en el proceso de separación.

II.2.3. Estudio de interferencias. Tolerancia.

Para completar el estudio de la determinación de codeína mediante su separación del ácido salicílico, en la minicolumna con resina de intercambio iónico y dado que la existencia de otras sustancias presentes pueden competir por su fijación en la resina con el ácido salicílico influyendo en los resultados, se va a proceder a estudiar la tolerancia a las distintas especies presentes en la disolución. De acuerdo al procedimiento operatorio se prepararon minicolumnas con resina suficiente para todas los interferentes estudiados y disoluciones que contenían, 2 mgA^{-1} de codeína y 250 mgA^{-1} de ácido salicílico y volúmenes variables de cada disolución patrón de interferente. A continuación, a la disolución de salida de cada minicolumna, tal como se ha descrito, se les registran los espectros en las condiciones de cada técnica, al igual que sus correspondientes blancos. Los resultados tanto del estudio de interferencias como de tolerancias se recogen en las Tablas V.14 y V.15.

TABLA V.14 Efecto producido por la presencia de interferentes en la determinación de 2 mgA⁻¹ de codeína, en presencia de 250 mgA⁻¹ de ácido salicílico.

Interferentes mgA ⁻¹	Bidimensional IRF	Error %	Sincrónico IFR	Error %	Sincrónico 1º der. dIRF/d8	Error %
Testigo	118.1		112.6		-12.3	
Ácido Ascórbico						
30	125.1	+5.92	109.9	-2.03	-11.7	-5.29
10	120.9	+2.33	116.7	+4.02	-12.1	-1.36
Salicilamida						
20	124.6	+5.45	114.9	+5.05	-11.6	-5.84
15	115.4	-2.30	107.8	-3.90	-12.3	-0.09
5	121.2	+2.64	109.9	-2.02	-12.5	+1.09
Cafeína						
10	49.1	-58.42	56.5	-54.84	-11.5	-6.80
5	52.0	-55.98	59.8	-46.70	-12.6	+2.37
Teofilina						
5	93.7	-20.65	90.9	-18.96	-11.2	-8.66
1	116.7	-1.20	106.9	-4.70	-11.3	-8.18
Efedrina						
20	101.9	-13.73	98.7	-12.06	-13.3	+7.98
15	95.4	-19.26	93.8	-16.35	-11.9	-3.40
Paracetamol						
50	107.9	-8.64	110.7	-1.41	-9.8	-20.00
40	112.4	-4.83	111.6	-0.44	-9.1	-26.28
5	113.9	-3.60	112.4	-0.11	-12.1	-1.12

TABLA V.15 Tolerancia para la determinación de codeína.(separación AS en columna)

Tolerancia (mgA ⁻¹ interferente / mgA ⁻¹ codeína)			
Sustancia	Bidimensional	Sincrónico	Sincrónico 1º der.
Teofilina	0.5	0.5	<0.5
Ácido Ascórbico	<15	<15	<15
Salicilamida	<10	<10	<10
Cafeína	<2.5	<2.5	2.5
Efedrina	<7.5	<7.5	7.5
Paracetamol	20	20	2.5

De la comparación de los resultados entre las tablas de tolerancias para la determinación de codeína en los métodos propuestos en disolución, capítulo IV apartado IV, de la presente Memoria y los obtenidos en este capítulo en estudio, se puede observar una mayor tolerancia para todos los interferentes en este método de la separación del analito a determinar, codeína, del ácido salicílico en la columna, este hecho puede ser explicado por la propia fijación de las especies estudiadas como interferentes en la resina, bien por adsorción o por intercambio iónico.

II.2.4 Aplicación analíticas.

Para comprobar la utilidad y exactitud del método propuesto en este capítulo, en las tres técnicas fluorimétricas para la determinación de codeína, se ha aplicado a las mismas muestras reales que las citadas en el apartado II.1 del presente capítulo. Se recurre a la metodología de la adición de patrón, para eliminar la existencia de un acusado efecto matriz, que se puede observar en la Tabla V.16, a través de la relación de pendientes.

TABLA V.16 Relación de pendientes. Efecto matriz

Método	Dolmen	Dolvirán	Fiorinal
Fluorimétrico	m_{AP}/m_M	m_{AP}/m_M	m_{AP}/m_M
Emisión	0.70	0.35	0.44
Sincrónico	0.59	0.40	0.43
Sincrónico 1º der.	0.79	0.46	0.49

II.2.4.1 Funciones de calibrado con adición de patrón.

Para la obtención de las funciones de calibrado se prepararon tres series de disoluciones así como las correspondientes minicolumnas con las resinas de intercambio iónico, para cada fármaco, en matraces de 100 mL se introduce el volumen necesario de cada muestra para que la concentración de codeína sea 1 mgA^{-1} , y volúmenes crecientes de disolución patrón de codeína de 50 mgA^{-1} . A continuación se procede según el método operatorio descrito.

Los resultados para cada muestra y técnica fluorimétrica se exponen en las Tablas V.17 a V.19, en las que se recogen los valores de intensidad de fluorescencia de los espectros registrados en las condiciones de trabajo, restados de su correspondiente blanco, para las concentraciones de codeína utilizadas en la obtención de las funciones de adición de patrón, así como los parámetros de las mismas obtenidos mediante el método de regresión lineal.

TABLA V.17 Dolmen. Método de adición de patrón.

Emisión $\lambda_{em.}=350$ nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	27.43	24.91	25.84
0.5	50.61	46.48	48.60
1	72.31	67.04	70.10
2	107.81	102.49	105.00
a	29.60	26.45	27.96
m	39.93	38.61	39.34
r	0.998	0.998	0.998
Sincrónico $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=215$ nm/340 nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	23.10	21.70	23.93
0.5	36.52	40.00	41.34
1	53.50	54.32	55.85
2	84.20	86.98	89.47
a	22.33	22.50	24.57
m	30.84	32.30	32.37
r	0.999	0.999	0.999
Sincrónico 1º der. $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=250$ nm/375 nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación dIRF/dλ	2ª Determinación dIRF/dλ	3ª Determinación dIRF/dλ
-	4.07	3.91	3.92
0.5	6.35	6.26	6.81
1	9.82	9.42	8.91
2	14.40	13.80	14.61
a	4.06	3.97	4.19
m	5.25	5.00	5.36
r	0.997	0.997	0.995

TABLA V.18 Dolvirán. Método de adición de patrón.

Emisión $\lambda_{em.}=350$ nm			
Codeína añadida (mgA⁻¹)	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	12.26	12.84	13.63
0.5	21.99	23.00	23.89
1	31.32	33.14	33.06
2	50.65	51.46	52.02
a	12.27	13.24	13.76
m	19.16	19.80	19.56
r	0.999	0.999	0.999
Sincrónico $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=215$ nm/340 nm			
Codeína añadida (mgA⁻¹)	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	14.64	14.89	15.24
0.5	26.17	25.62	24.39
1	35.72	36.52	36.12
2	58.54	57.17	57.92
a	14.70	15.05	14.54
m	21.81	21.14	21.50
r	0.998	0.999	0.999
Sincrónico 1º der. $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=250$ nm/375 nm			
Codeína añadida (mgA⁻¹)	1ª Determinación dIRF/dλ	2ª Determinación dIRF/dλ	3ª Determinación dIRF/dλ
-	2.51	2.70	2.43
0.5	4.04	4.40	4.86
1	5.82	6.01	5.89
2	8.39	8.90	9.21
a	2.61	2.44	3.16
m	2.95	3.01	2.99
r	0.997	0.999	0.993

TABLA V.19 Fiorinal. Método de adición de patrón.

Emisión $\lambda_{em.}=350$ nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	16.76	17.66	16.92
0.5	31.24	29.55	31.86
1	45.11	43.96	42.53
2	64.72	67.75	66.73
a	18.63	17.66	18.06
m	23.80	25.23	24.52
r	0.995	0.999	0.998
Sincrónico $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=215$ nm/340 nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación IRF	2ª Determinación IRF	3ª Determinación IRF
-	15.42	16.22	15.82
0.5	29.03	25.95	28.49
1	41.23	40.72	41.73
2	61.79	61.98	61.73
a	16.81	15.86	16.89
m	22.83	23.27	22.92
r	0.997	0.998	0.997
Sincrónico 1º der. $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}=250$ nm/375 nm			
Codeína añadida (mgA^{-1})	1ª Determinación dIRF/dλ	2ª Determinación dIRF/dλ	3ª Determinación dIRF/dλ
-	3.17	3.05	3.24
0.5	4.94	4.92	5.31
1	6.81	6.77	6.36
2	9.70	9.51	9.63
a	3.30	3.25	3.41
m	3.26	3.21	3.11
r	0.998	0.996	0.996

En la Tabla V.20 se recogen los valores medios de concentración y los contenidos de codeína obtenido para cada fármaco y técnica fluorimétrica.

TABLA V.20 Aplicaciones analíticas

Fármaco	Emisión		Sincrónico		1ª deriv. Sincrónico	
	mgÅ ⁻¹ (encont.)	mg (fármaco)	mgÅ ⁻¹ (encont.)	mg (fármaco)	mgÅ ⁻¹ (encont.)	mg (fármaco)
Dolmen	0.96	9.70	0.98	9.83	1.06	10.63
Dolvirán	0.90	9.23	0.91	9.27	1.10	11.90
Fiorinal	0.98	14.05	0.93	13.62	1.36	19.63

II.2.4.2 Parámetros estadísticos.

Para finalizar el apartado correspondiente a la determinación de codeína, se procedió a validar la exactitud y precisión del método propuesto con los mismos *test* de significación elegidos en el apartado II.1.3 de este capítulo, comparándolo también con el mismo método de referencia, tablas V.21 a V.23.

Los resultados, en general son satisfactorios, aunque en algún caso la técnica derivada de primer orden del sincrónico arroja significación para alguno o los dos test aplicados.

TABLA V.21 Dolmen

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	9.70	9.83	10.63	10.50
s_{n-1}	0.400	0.416	0.153	0.180
s^2	0.160	0.173	0.026	0.033
s_m	0.230	0.240	0.088	0.104
C.V. %	4.12	4.23	1.44	1.71
E_r	-7.62%	-6.38%	+1.24%	-
$O \pm s_m \times t$	9.70±0.99	9.83±1.03	10.63±0.40	10.50±0.45
s_{sistema}	0.305	0.316	0.158	-
t_{exp}	2.370 N.S.	1.783 N.S.	2.636 N.S.	-
F_{exp}	6.154 N.S.	6.654 N.S.	1.130 N.S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

TABLA V.22 Dolvirán

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	9.23	9.27	11.9	9.36
s_{n-1}	0.462	0.115	0.458	0.289
s^2	0.213	0.013	0.210	0.084
s_m	0.266	0.067	0.264	0.167
C.V. %	5.00	1.25	3.85	3.09
E_r	-1.39%	-0.96%	+27.14	-
$O \pm s_m \times t$	9.23±1.14	9.27±0.29	11.9±1.14	9.36±0.72
s_{sistema}	0.400	0.670	0.397	-
t_{exp}	0.551 N.S.	0.670 N.S.	7.683 S.	-
F_{exp}	2.203 N.S.	8.077 N.S.	2.000 N.S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

TABLA V.23 Fiorinal

Parámetros Estadísticos	Método Fluorimétrico			Método de Referencia
	Emisión	Sincrónico	Sincrónico 1º der.	
O	14.05	13.62	19.63	14.64
$\langle n-1$	0.791	0.541	0.929	0.187
\vdots^2	0.626	0.293	0.864	0.035
\vdots_m	0.456	0.312	0.537	0.108
C.V. %	5.63	3.97	4.73	1.27
E_r	-4.03	-6.96	+34.08	-
$O \pm \vdots_m \times t$	14.05±1.96	13.62±1.34	19.63±2.31	14.64±0.46
\vdots sistema	0.578	0.410	0.673	-
t_{exp}	0.041 N.S.	1.315 S.	10.138 S.	-
F_{exp}	14.90 N.S.	6.976 N.S.	20.57 S.	-

$$t_{teor.} = 2.776$$

$$F_{teor.} = 19.00$$



**VI. ESTUDIO Y RESOLUCIÓN DEL SISTEMA
CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA Y CODEÍNA**



I. CARACTERÍSTICAS FLUORIMÉTRICAS DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA Y CODEÍNA.

En el estudio de determinación de varios componentes, mediante técnicas fluorimétricas, siempre es preciso conocer en primer lugar y de una manera total, el comportamiento fluorescente tanto de cada componente, como de sus mezclas; siendo necesario para ello, la obtención del espectro de luminiscencia total de los componentes y de la mezcla; y a partir de él, abordar la determinación por la técnica de fluorescencia que aporte mejor resolución.

Espectros de luminiscencia total.

Los espectros de luminiscencia total, correspondientes a cada componente del sistema, fueron obtenidos en el capítulo III apartado (I.1). Aquí, se ha realizado el espectro del sistema codeína y clorhidrato de piridoxina, en las condiciones experimentales de la Tabla III.1.

Para la obtención del espectro de luminiscencia total del sistema se preparó según el procedimiento operatorio una disolución de concentraciones 5 y 1 mgA^{-1} de codeína y clorhidrato de piridoxina respectivamente. En las mismas condiciones se obtuvo el espectro del blanco. Los espectros netos de los componentes aislados se muestran en las Figuras III.1 (capítulo III), y el correspondiente a la mezcla en la Figura VI.1.

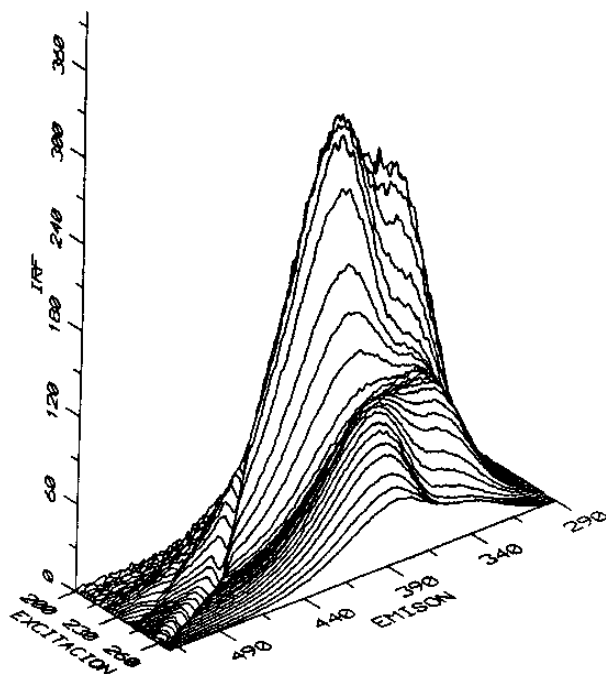


Fig.VI.1 Espectro tridimensional para la mezcla codeína clorhidrato de piridoxina

Mapas de contorno.

A partir de los experimentos anteriores se obtienen las curvas de nivel o topograma, Figuras VI.2, del sistema en estudio, confirmando que no existe desplazamiento de las longitudes de onda de excitación y de emisión para cada componente de la mezcla, siendo para codeína $\lambda_{exc.} = 215 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 350 \text{ nm}$ y para el clorhidrato de piridoxina $\lambda_{exc.} = 220 \text{ nm}$, $\lambda_{em.} = 395 \text{ nm}$.

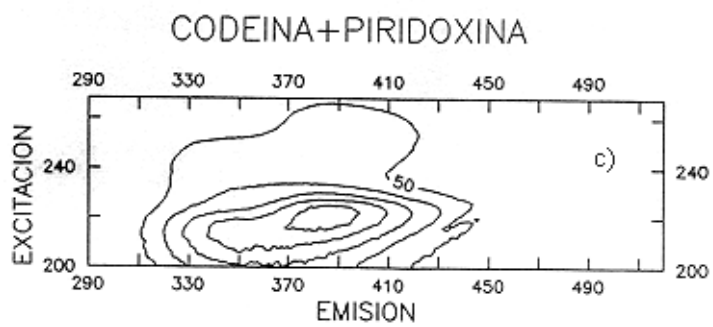
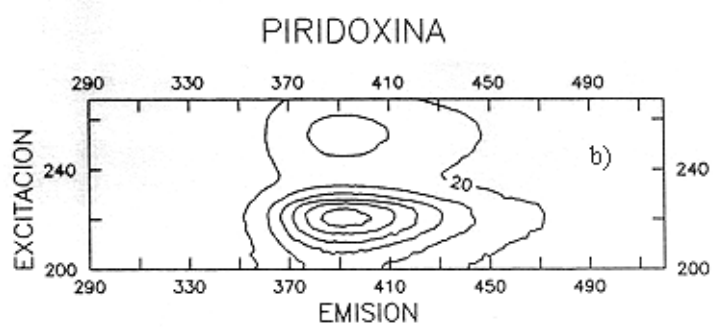
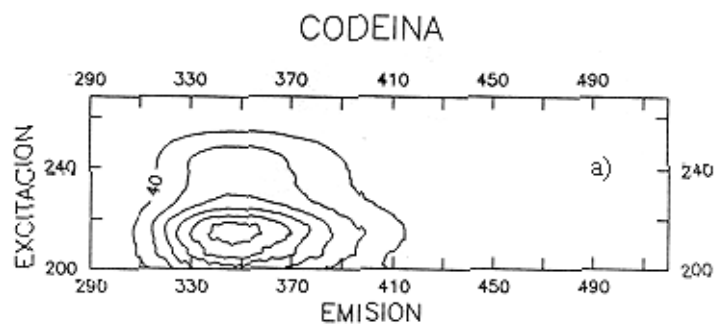


Fig. VI. 2 Mapas de contorno. Intervalo de contorno: a) 40, b) 50, c) 50

I.1. Espectrofluorimetría convencional.

A la vista de los mapas de contorno o topogramas, de la mezcla y sus componentes, se eligen los valores de longitudes de onda de excitación de 215, 240 y 255 nm para la resolución de la mezcla por fluorimetría convencional, se procedió a realizar el espectro de emisión a cada longitud de onda de excitación según el procedimiento operatorio, Para ello se prepararon en tres matraces de 100 ml, disoluciones de cada analito y su mezcla, con concentraciones: a) 5 mgA^{-1} para codeína; b) 2 mgA^{-1} para clorhidrato de piridoxina; c) mezcla en las mismas concentraciones. Los espectros correspondientes, se muestran en las Figuras VI.3 a VI.5.

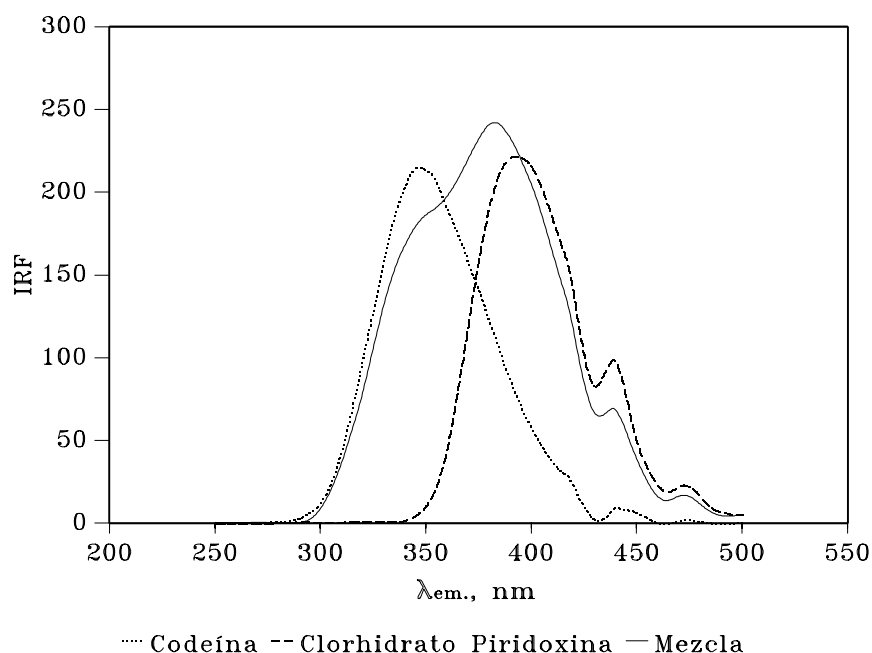
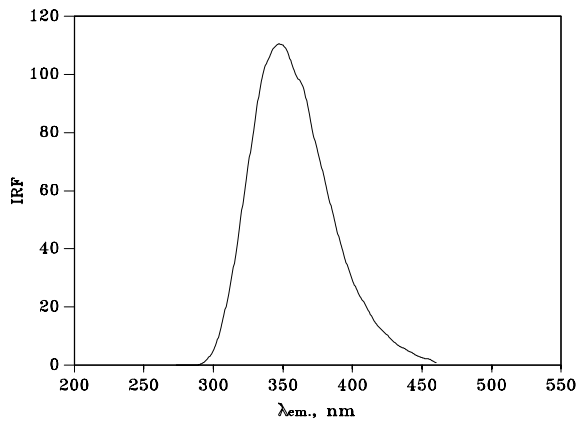
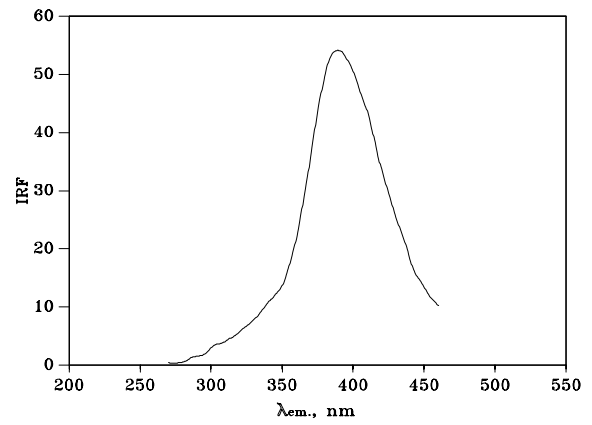


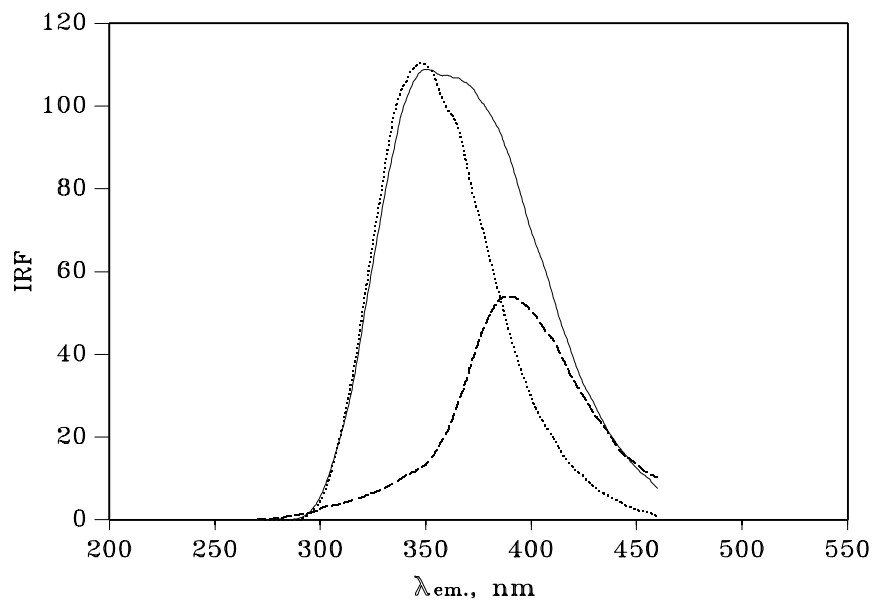
Fig. VI.3 Espectros de emisión. Codeína, clorhidrato de piridoxina y su mezcla, $\lambda_{exc.}$ 215 nm.



(a)



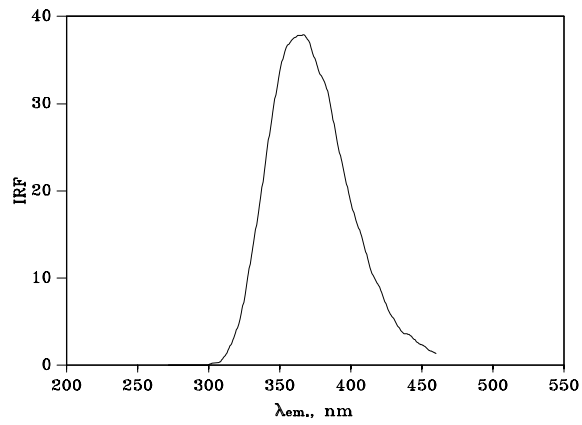
(b)



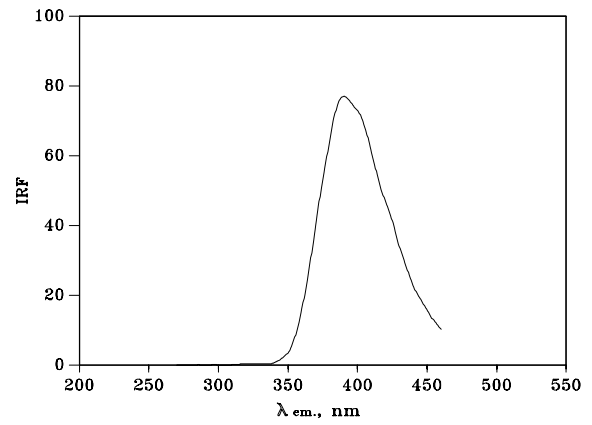
..... Codeína -- Clorhidrato Piridoxina — Mezcla

(c)

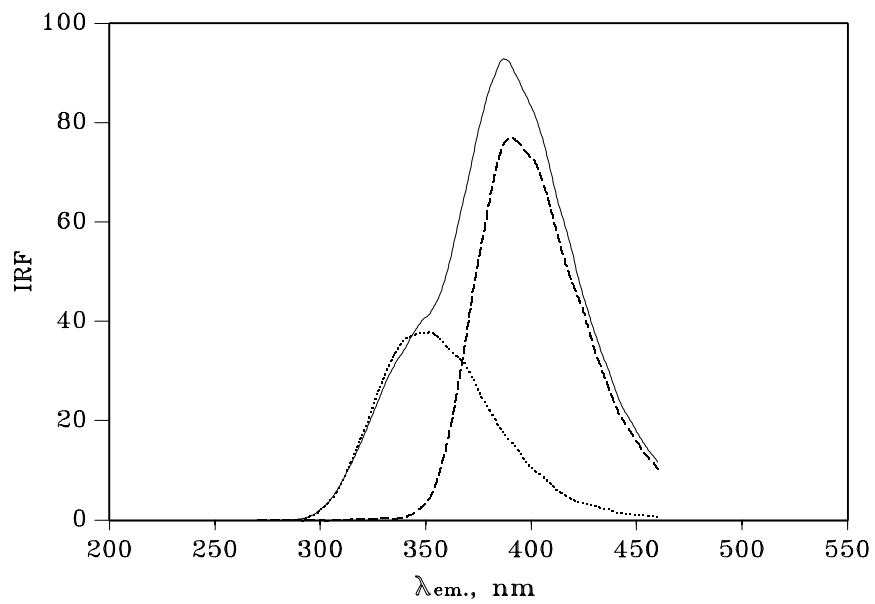
Fig. VI.4 Espectros de emisión. a) codeína; b) clorhidrato de piridoxina. c) codeína, clorhidrato de piridoxina y su mezcla. $\lambda_{exc.}$ 240 nm.



(a)



(b)



..... Codeína -- Clorhidrato Piridoxina — Mezcla

(c)

Fig.VI.5 Espectros de emisión. a) codeína; b) clorhidrato de piridoxina
c) codeína, clorhidrato de piridoxina y su mezcla, $\lambda_{exc.}$ 255 nm.

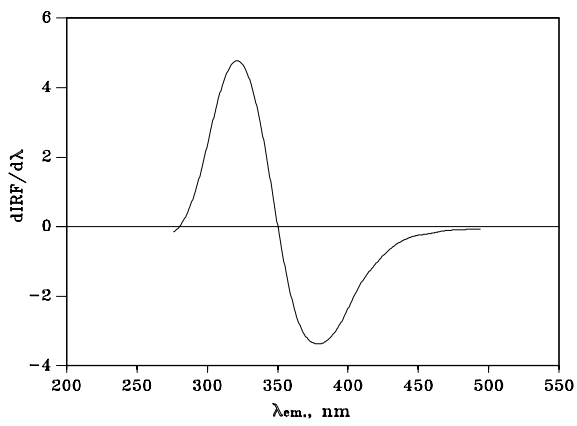
De la observación de las mismas se puede concluir que el amplio solapamiento espectral impida la resolución de la mezcla.

I.2. Espectrofluorimetría de derivadas.

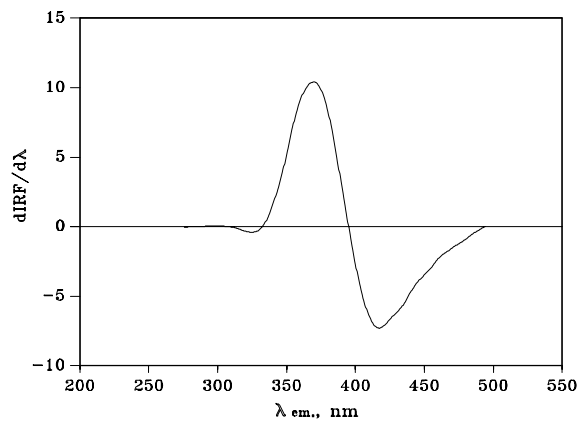
Para continuar el estudio dirigido a la resolución de la mezcla codeína y clorhidrato de piridoxina, que en principio no queda totalmente resuelta mediante la técnica fluorimétrica de emisión, vamos a intentar la resolución, mediante la técnica de derivadas a partir de los distintos espectros de emisión.

Se procedió a realizar la primera derivada de los distintos espectros de emisión (apartado II.1), para los componentes individuales así como a la mezcla, Figura VI.6, donde en el eje de abscisas se representa $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$.

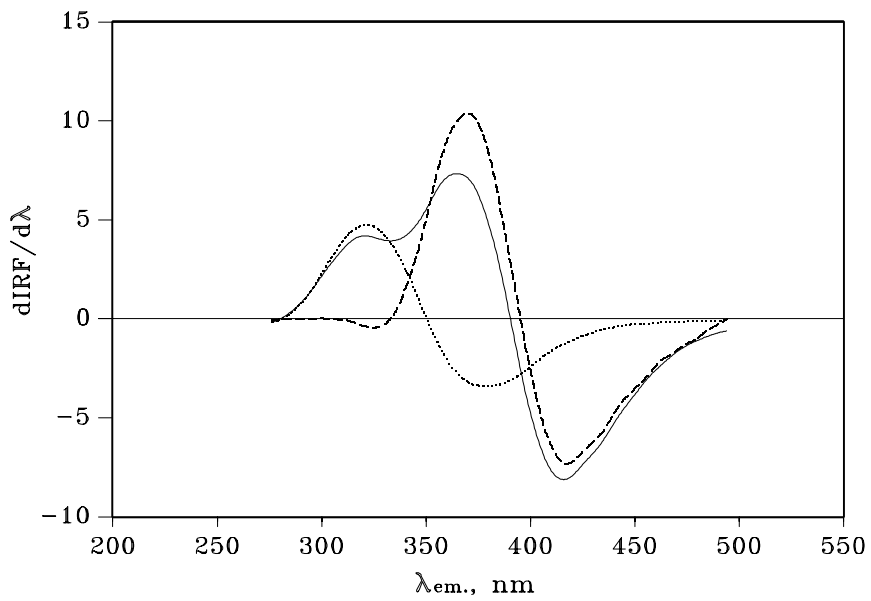
A vista de los espectros, optamos por elegir para la resolución del sistema los espectros derivados de emisión, excitados a la longitud de onda de 255 nm, por presentar más posibilidad de aplicar la técnica de "**zero crossing**" y permitir la determinación conjunta de ambos analitos. Las longitudes de onda seleccionadas, para la resolución del sistema son: 309 nm para codeína y 450 para clorhidrato de piridoxina.



(a)



(b)



..... Codeína -- Clorhidrato Piridoxina — Mezcla

(c)

Fig. VI.6 Espectros de emisión derivados. a) codeína; b) clorhidrato de piridoxina c) codeína, clorhidrato de piridoxina y su mezcla.

I.3. Optimización de los factores que influyen en la medida de la señal analítica.

En este apartado se va a plantear de nuevo, en base a la nueva técnica elegida para la resolución del sistema clorhidrato de piridoxina y codeína, la influencia que sobre el espectro de derivadas presentan algunas variables experimentales o parámetros de carácter instrumental que se citan a continuación:

*** Parámetros instrumentales.**

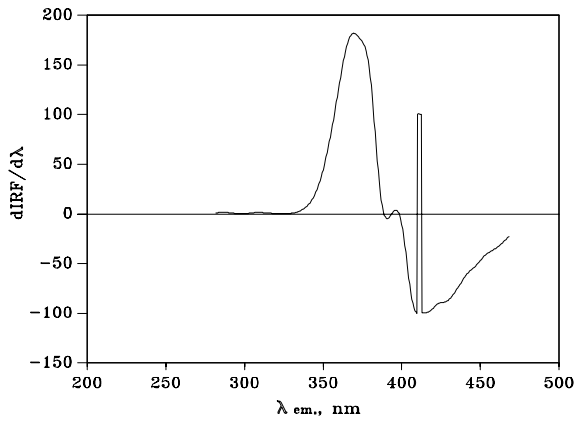
En primer lugar se procede a estudiar como influyen las condiciones instrumentales, rendijas de excitación y emisión, velocidad de barrido y orden de suavizado en la señal analítica derivada de primer orden, del espectro de emisión $dI_{FR}/d\lambda$ para la resolución del sistema clorhidrato de piridoxina - codeína.

De las experiencias realizadas se concluye para cada parámetro lo siguiente:

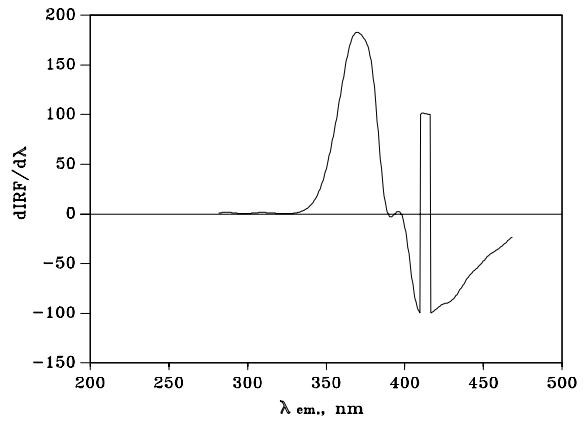
* Las rendijas seleccionadas como óptimas corresponden a los valores de 2.5 y 10 nm respectivamente para excitación y emisión.

* La velocidad de barrido, no presenta ninguna variación significativa en el valor de $dI_{FR}/d\lambda$.

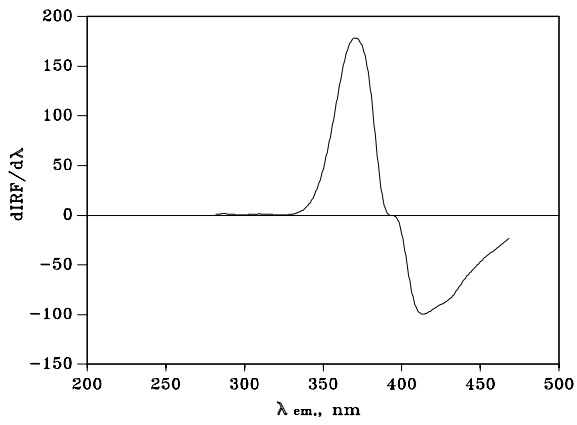
* Por último, en el estudio del orden de suavizado se eligen los valores de 49 puntos para los componentes aislados y la mezcla, los espectros se muestran en las figuras VI.7 a VI.9.



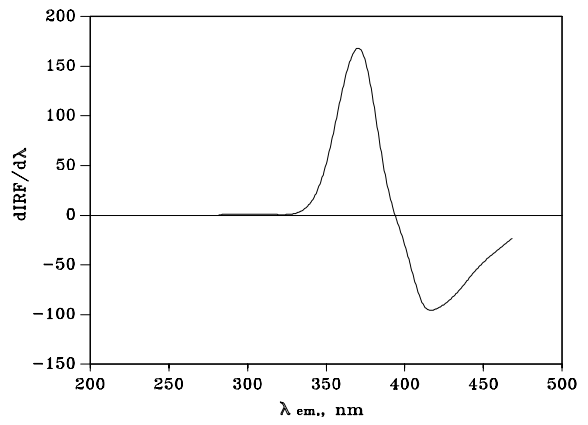
(a)



(b)

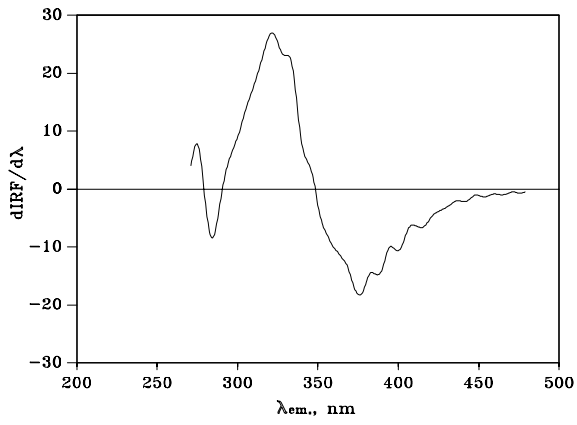


(c)

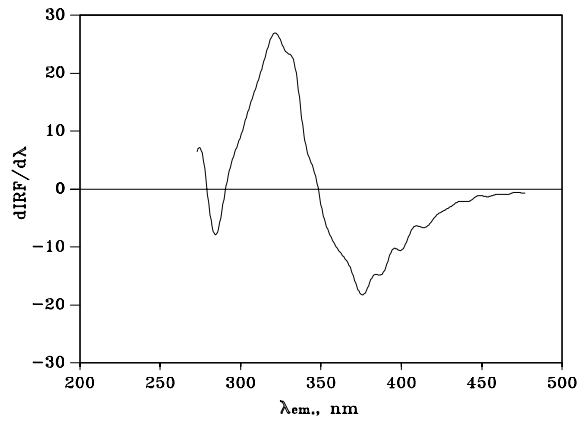


(d)

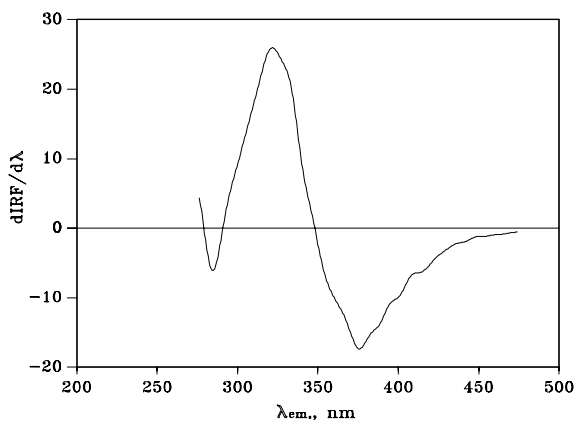
Fig. VI.7 Factor de filtrado. Espectros de emisión derivados para 3 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina. Factor: a) 5; b) 13; c) 25; d) 49.



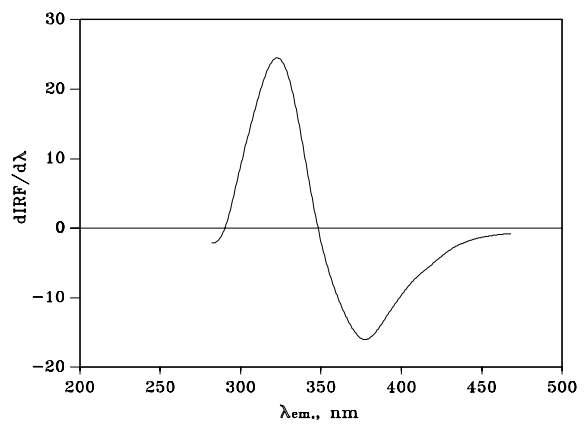
(a)



(b)

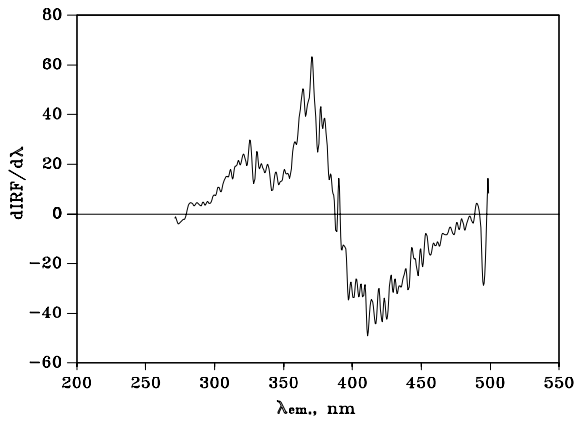


(c)

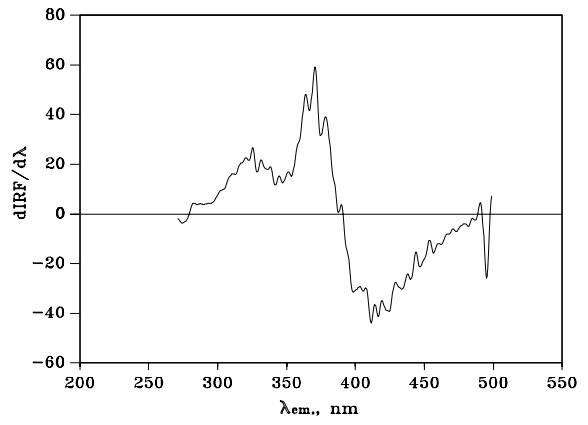


(d)

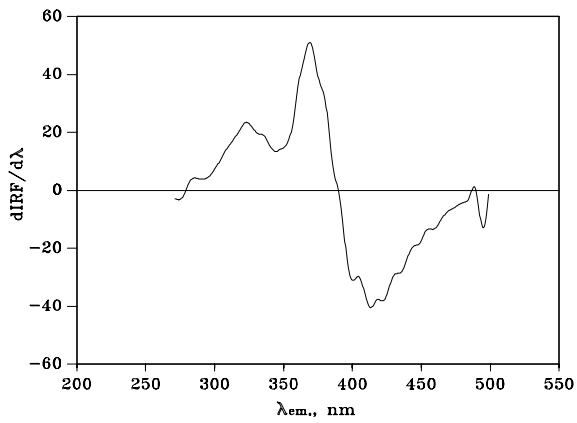
Fig. VI.8 Factor de filtrado. Espectros de emisión derivados para 5 mgA^{-1} de codeína.
Factor: a) 5; b) 13; c) 25; d) 49.



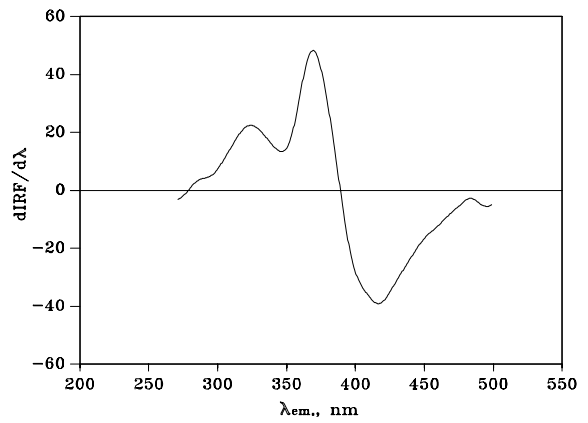
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. VI.9 Factor de filtrado. Espectros de emisión derivados para la mezcla codeína y clorhidrato de piridoxina. Factor: a) 5; b) 13; c) 25; d) 49.

*** Variable experimental. Influencia del pH.**

Los resultados obtenidos del estudio de la influencia del pH para cada componente aislado codeína y clorhidrato de piridoxina (espectros de orden cero) se recogen en el capítulo III, apartado III.1 de esta memoria. Sin embargo, debido a la nueva técnica seleccionada para la resolución del sistema, realizaremos el estudio de la influencia de la acidez del medio sobre la señal de cada analito.

Para tal fin se prepararon para cada componente disoluciones de patrón de cada analito cuyas concentraciones fueran de 5 mgA^{-1} para codeína y 2 mgA^{-1} para clorhidrato de piridoxina, ajustándose convenientemente el pH entre los valores de 2 y 12 para cada punto con disoluciones de NaOH y HCl, de concentración conocida. Se registraron los espectros de emisión en las condiciones operatorias; en la Figura VI.10 se muestra gráficamente los resultados y en la Tabla VI.1, se recogen los valores de intensidad de fluorescencia.

TABLA VI.1 Influencia del pH.

Codeína	
pH	IRF
1.75	173.55
3.96	173.61
6.65	180.54
7.16	173.68
9.92	161.12
12.21	160.80
Clorhidrato de Piridoxina	
pH	IRF
2.81	113.36
4.10	289.43
5.66	657.13
7.16	794.43
8.55	709.69
10.17	331.35
11.62	247.86

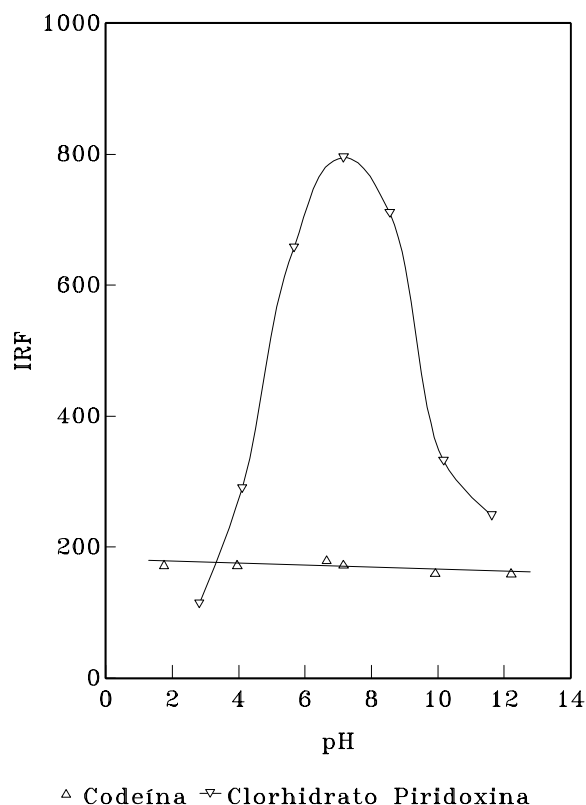


Fig. VI.10 Influencia del pH

Del estudio de la gráfica donde se observa la variación en la señal con la acidez para cada analito, se decide volver a tomar como óptimo de trabajo, un pH de 7.0, para el cual la codeína apenas tiene variación en la señal y el clorhidrato de piridoxina presenta el máximo de intensidad de fluorescencia [339]. Para este valor de pH y teniendo en cuenta los valores de pK_a para los dos analitos del sistema, 5 y 8.96 para el clorhidrato de piridoxina y 8.2 para la codeína, las especies fluorescentes en disolución corresponderán a la forma neutra en el caso del clorhidrato de piridoxina y molecular para la codeína.

II. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA Y CODEÍNA POR ESPECTROFLUORIMETRÍA.

Una vez que han sido optimizadas (Capítulo III), todas las variables que pueden afectar a la intensidad de fluorescencia, estudiadas las características espectrales de los sistemas univariantes y su mezcla binaria, así como seleccionados los parámetros instrumentales para la resolución del sistema en estudio, mediante la técnica de derivada de emisión pasamos a proponer un método analítico. Para ello vamos a establecer el calibrado y el cálculo de los parámetros analíticos de calidad del método fluorimétrico.

II.1. Calibración.

Se ha establecido la recta de calibrado para la técnica en estudio de cada analito y además, con el fin de comprobar la independencia entre las señales analíticas correspondientes se han preparado disoluciones que contenían cantidades crecientes de cada analito, en ausencia y presencia de concentraciones del segundo componente implicado en la muestra y viceversa.

II.1.1. Funciones de calibrado para codeína.

La recta de calibrado para la codeína se realizó según el procedimiento operatorio, preparando disoluciones con volúmenes crecientes de disolución patrón de codeína de 100 mgA^{-1} .

Se registraron los espectros con las rendijas de excitación y emisión respectivamente de 2.5 y 10 nm a la temperatura de $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación sobre el espectro derivado de primer orden de emisión, una vez restada la señal del blanco y aplicándole el factor de filtrado óptimo de 49 puntos, se miden los valores de $dIRF/d\delta$ indicados en las Tabla VI.2. Los datos de la recta de regresión ajustada por mínimos cuadrados se representan en la Figura VI.11.

TABLA VI.2 Función de calibrado para codeína.

Codeína mgA ⁻¹	Emisión 1ºDer. dIRF/dλ
1	3.22
2	6.96
5	15.24
7	24.50
10	33.04
12	36.97
15	46.43
17	51.00

Calibración de codeína		
Método	Recta de regresión	Coefficiente de correlación
1ª Deriv. Emisión	$y = 1.22 + 3.00 C$	0.997

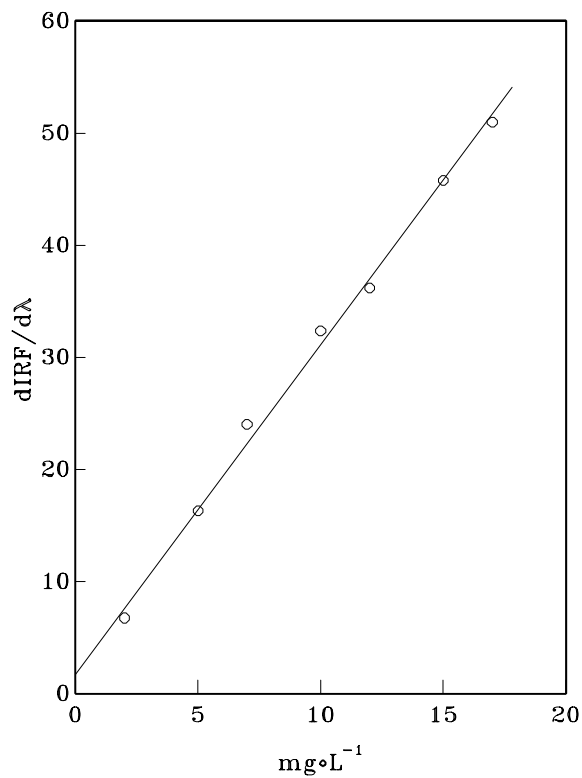


Fig. VI.11 Recta de calibrado para codeína. Emisión 1º der.

Para comprobar la independencia entre las señales analíticas de los analitos, se han establecido rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de codeína, pero en presencia de concentraciones diferentes de clorhidrato de piridoxina. Los espectros se han realizado de la misma forma que en el apartado anterior.

En la Tabla VI.3, se muestran los valores de pendientes y ordenadas en el origen de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados.

Tabla VI.3 Calibración de codeína en presencia de clorhidrato de piridoxina.

Codeína mgA ⁻¹	Clorhidrato de piridoxina			
	0.20 mgA ⁻¹	0.40 mgA ⁻¹	1.00 mgA ⁻¹	1.5 mgA ⁻¹
2	6.80	6.80	6.80	5.90
5	15.95	15.95	15.95	14.48
10	29.96	30.67	30.24	27.10
15	43.18	43.15	42.84	36.30

Rectas de regresión			
Cl. piridoxina mgA ⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
0.2	2.83	1.45	0.999
0.4	2.80	1.71	0.999
1.0	2.77	1.78	0.999
1.5	2.34	2.21	0.996

Del valor del intervalo en las pendientes, en la tabla VI.4 se concluye que para determinar codeína en presencia de clorhidrato de piridoxina se tolera hasta 1 mgA⁻¹, el valor de 1.5 mgA⁻¹ sobrepasaría el intervalo de confianza permitido para la pendiente.

Tabla VI.4 Intervalos de confianza (P=0.05). Pendientes

Técnica fluorimétrica	Intervalo de confianza
Emisión 1ª derivada	3.0 ± 0.2

II.1.2. Funciones de calibrado para clorhidrato de piridoxina.

La recta de calibrado para clorhidrato de piridoxina en la técnica de fluorimetría se realizó introduciendo en matraces aforados de 100 ml, volúmenes crecientes de disolución patrón de clorhidrato de piridoxina de 10 mgA^{-1} .

Se registraron los espectros con las rendijas de excitación y emisión respectivamente de 2.5 y 10 nm a la temperatura $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación sobre el espectro derivado de primer orden de emisión, una vez restada la señal del blanco y aplicándole el factor de filtrado óptimo de 49 puntos, se miden los valores de $dIRF/d\lambda$ indicados en la Tabla VI.5. Los datos de la recta de regresión ajustada por mínimos cuadrados, están representados en la Figura VI.12.

TABLA VI.5. Función de calibrado para Clorhidrato de Piridoxina.

Clorhidrato de Piridoxina $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Emisión 1º Der. $\text{dIRF}/\text{d}\lambda$
0.2	-3.73
0.3	-3.98
0.4	-6.50
0.8	-11.99
1.0	-16.20
1.5	-22.30
2.0	-29.52
2.5	-37.77

Calibración de clorhidrato de piridoxina		
Método	Recta de regresión	Coefficiente de correlación
Emisión 1ª deriv.	$y = 0.36 + 14.83 C$	0.999

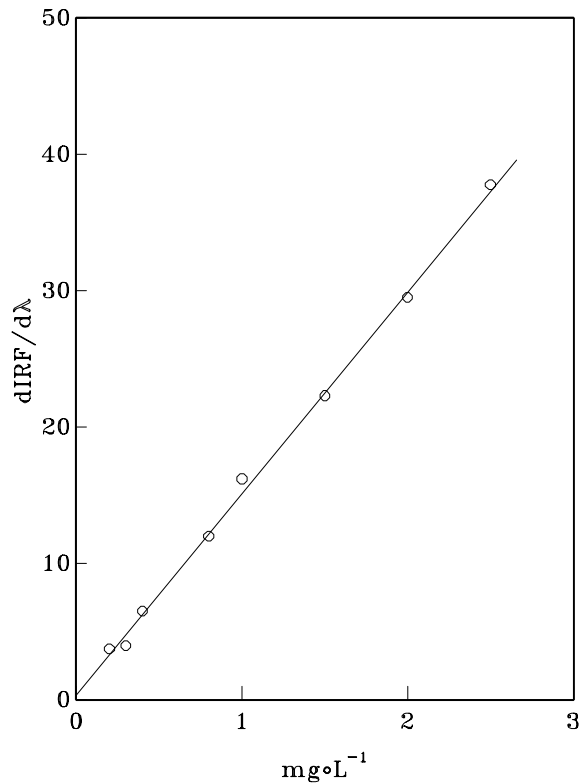


Fig.VI.12 Recta de calibrado para clorhidrato de piridoxina
Emisión 1ª derivada

Para comprobar la independencia entre las señales analíticas de los analitos, se han establecido rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de clorhidrato de piridoxina, pero en presencia de concentraciones diferentes de codeína. Los espectros se han realizado de la misma forma que en el apartado anterior.

En las Tabla VI.6, se muestran los valores de pendientes y ordenadas en el origen de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados.

TABLA VI.6 Calibración de clorhidrato de piridoxina en presencia de codeína.

Clorhidrato de piridoxina mgA ⁻¹	Codeína				
	1 mgA ⁻¹	2 mgA ⁻¹	5 mgA ⁻¹	7 mgA ⁻¹	10 mgA ⁻¹
0.2	-3.47	-3.52	-4.10	-4.93	-3.73
0.4	-6.33	-6.33	-6.54	-6.69	-7.60
1	-16.11	-16.11	-15.93	-16.53	-16.94
1.5	-23.12	-23.12	-21.92	-21.72	-21.89
2	-29.98	-30.75	-30.75	-30.75	-29.98

Rectas de regresión			
Codeína mgA ⁻¹	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación
1	14.85	0.65	0.999
2	15.16	0.50	0.999
5	14.64	0.91	0.998
7	14.25	1.59	0.997
10	13.78	2.16	0.998

A continuación fue calculado el intervalo de confianza para las pendientes y a la vista de los resultados de la Tabla VI.6, podemos admitir con seguridad que hasta un valor de 5 mgA⁻¹ de codeína se tolera para la determinación de clorhidrato de piridoxina, e incluso la presencia de 7 mgA⁻¹ de codeína se podría considerar aceptable.

Tabla VI.7 Intervalos de confianza (P=0.05). Pendientes

Técnica fluorimétrica	Intervalo de confianza
Emisión 1 ^a derivada	14.83 ± 0.70

II.2. Parámetros de calidad.

II.2.1. Límites de detección y cuantificación.

De acuerdo a los criterios establecidos en el capítulo I, de la presente memoria, se han calculado los límites de detección y cuantificación de los componentes del sistema.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación de clorhidrato de piridoxina y codeína, se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco, para lo cual se prepararon 9 matraces según el procedimiento operatorio y a continuación se registraron los espectros en las condiciones óptimas de cada componente, para la técnica fluorimétrica de trabajo, los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VI.8.

TABLA VI.8 Límites de detección y cuantificación. Clorhidrato de piridoxina y codeína.

Muestra	Codeína	Cl. Piridoxina
	dIRF/d8 $\lambda_{em}=309\text{ nm}$	dIRF/d8 $\lambda_{em}=450\text{ nm}$
1	0.33	-0.05
2	0.63	0.24
3	0.51	0.06
4	0.63	0.17
5	-0.04	0.06
6	-0.05	0.23
7	-0.07	0.12
8	-0.07	0.12
9	-0.05	0.20

Parámetros estadísticos	Codeína	Cl.Piridoxina
\bar{x}	0.930	0.127
s_{n-1}	3.01	0.094
m	0.106	14.95
C_L	0.106 mgA ⁻¹	0.019 mgA ⁻¹
C_Q	0.352 mgA ⁻¹	0.063 mgA ⁻¹

II.2.2 Estudio de reproducibilidad.

Para valorar la precisión de los métodos univariantes y resolución del sistema binario propuesto, se ha utilizado el mismo criterio descrito en el capítulo I.

El estudio de la reproducibilidad para la determinación de clorhidrato de piridoxina y codeína se realizó según lo establecido, preparando 10 disoluciones de patrón de 1 y 10 mgA⁻¹ de concentración respectivamente. En la Tabla VI.9, se muestran los datos de los valores de los parámetros analíticos de los que se deduce que el método propuesto para la determinación de ambos es reproducible para las condiciones de trabajo seleccionadas.

De la misma forma, se realizó la presente experiencia con el fin de completar el estudio estadístico de la reproducibilidad en la determinación de codeína y clorhidrato de piridoxina en la mezcla, preparando 10 disoluciones, con valores de concentración de 1 y 5 mgA⁻¹ de clorhidrato de piridoxina y codeína respectivamente. Los espectros se registraron para el método de fluorimetría en las condiciones óptimas y los datos estadísticos que observamos como consecuencia de las medidas de intensidad de fluorescencia obtenidos, Tabla VI.10, revelan una reproducibilidad aceptable en el método elegido.

TABLA VI.9 Reproducibilidad del método. Determinación de 10 mgA^{-1} de codeína, 1 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina.

Muestra	Codeína	Piridoxina
	Emisión 1ª der.	Emisión 1ª der.
	dIRF/d8 $\lambda_{em} = 309 \text{ nm}$	dIRF/d8 $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$
1	30.88	-15.18
2	29.54	-15.18
3	31.64	-15.54
4	29.94	-15.65
5	30.88	-15.78
6	30.55	-14.50
7	28.92	-14.70
8	31.38	-15.86
9	29.56	-15.89
10	31.03	-15.28
Parámetros Estadísticos	Emisión 1ª der.	Emisión 1ª der.
n	10	10
\bar{x}	30.43	-15.36
s_{n-1}	0.895	0.480
s_m	0.283	0.152
C.V.%	3.0	3.1
$x \pm t_{m, s}$	30.4 ± 0.6	15.4 ± 0.3

TABLA VI.10 Reproducibilidad del método. Determinación simultánea de 5 mgA^{-1} de codeína, 1 mgA^{-1} de clorhidrato de piridoxina.

Muestra	Codeína	Piridoxina
	Emisión 1ª der.	Emisión 1ª der.
	dIRF/d8 $\lambda_{em} = 309 \text{ nm}$	dIRF/d8 $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$
1	14.16	-15.95
2	14.28	-15.83
3	14.18	-15.93
4	14.10	-16.24
5	14.22	-15.74
6	14.30	-15.58
7	14.32	-15.82
8	14.31	-15.68
9	14.24	-15.78
10	14.82	-16.29
Parámetros Estadísticos	Emisión 1ª der.	Emisión 1ª der.
n	10	10
\bar{x}	14.29	-15.88
s_{n-1}	0.198	0.229
s_m	0.063	0.072
C.V.%	1.4	1.4
$x \pm t_{m, t_s}$	14.29 ± 0.14	15.88 ± 0.16

II.3. Resumen de los parámetros analíticos.

A continuación, en la Tabla VI.11 se muestran los valores de parámetros analíticos estudiados para la determinación simultánea de clorhidrato de piridoxina y codeína mediante espectrofluorimetría de emisión derivada.

TABLA VI.11 Resumen de los parámetros analíticos

Parámetro analítico	Codeína	Cl. Piridoxina
Ordenada en origen	1.22	0.36
Pendiente ($L\text{Ang}^{-1}$)	3.00	14.83
Coefficiente de correlación (r)	0.997	0.999
Rango dinámico lineal ($R.D.L.mg\text{A}^{-1}$)	1 - 17	0.2 - 2.5
Límite de detección ($mg\text{A}^{-1}$)	0.106	0.019
Límite de cuantificación ($mg\text{A}^{-1}$)	0.352	0.063
Desviación estándar (R.S.D.%)	3.0	3.1

III. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS Y TOLERANCIAS.

Para completar el estudio de la determinación de codeína y clorhidrato de piridoxina, se procedió a estudiar la tolerancia a las distintas especies presentes en la disolución, de acuerdo a los criterios establecidos en el capítulo III, apartado IV.

* Interferencias para determinar codeína.

Para tal fin, se prepararon disoluciones para todas los interferentes estudiados, conteniendo cada matraz, 5 mgA^{-1} de codeína y el volumen correspondiente de cada disolución patrón de interferente.

A continuación, cada disolución, tal como se ha descrito, se somete al procedimiento operatorio y los espectros se registran en las condiciones de la técnica fluorimétrica, al igual que sus correspondientes blancos. Los resultados tanto del estudio de interferencias se recogen en las Tablas VI.12.

* Interferencias para determinar clorhidrato de piridoxina.

De la misma manera que en el apartado anterior se prepararon disoluciones de clorhidrato de piridoxina para que en el volumen final la concentración fuera de 1 mgA^{-1} , con presencia de los distintos interferentes, registrándose los espectros en las condiciones de la técnica fluorimétrica elegida y realizando el blanco de la misma forma, los resultados netos se recogen en la Tabla VI.13.

* Interferencias para la determinación de la mezcla de codeína y clorhidrato de piridoxina.

Para concluir el estudio de interferencias se prepararon disoluciones de la mezcla de ambos analitos con concentraciones de 5 mg.L^{-1} para codeína y 1 mg.L^{-1} para clorhidrato de piridoxina, en presencia de los mismos interferentes y registrándose los espectros derivados de emisión de primer orden de acuerdo a las condiciones seleccionadas para dicha técnica fluorimétrica. Los resultados netos de los mismos se representan en la Tabla VI.14.

TABLA VI.12 Efecto producido por la presencia de interferentes en la determinación de 5 mgA⁻¹ de codeína.

Interferentes mgA⁻¹	Emisión 1^a der. dIRF/d8	Error %
Testigo	15.10	
Ácido Ascórbico		
5	7.88	-47.81
1	13.08	-13.38
0.5	14.15	-6.29
Salicilamida		
5	12.98	-14.03
1	15.11	+0.06
Teofilina		
10	9.86	-34.70
5	11.58	-23.31
1	14.17	-6.16
0.5	13.90	-8.55
Efedrina		
10	11.00	-27.15
5	13.05	-13.57
1	13.85	-8.28
0.5	14.66	-2.91
Cafeína		
10	8.15	-46.02
5	9.39	-37.81
1	12.35	-18.21
0.5	13.93	-7.75
Paracetamol		
50	2.16	-86.67
5	11.20	-26.16
1	14.31	-5.55
Tiamina		
5	13.14	-12.98
1	15.26	-12.32

TABLA VI.13 Efecto producido por la presencia de interferentes en la determinación de 1 mgA⁻¹ de clorhidrato de piridoxina.

Interferentes mgA⁻¹	Emisión 1ª der. dIRF/d8	Error %
Testigo	15.76	
Acido Ascórbico		
10	-5.05	-67.96
5	-8.52	-45.94
1	-13.93	-11.68
0.5	-15.22	-3.43
Salicilamida		
5	-38.63	+145.11
1	-15.82	+0.38
Teofilina		
10	-9.35	-40.67
5	-11.43	-23.31
1	-14.32	-9.14
0.5	-14.06	-10.79
Efedrina		
35	-13.88	-11.93
25	-14.30	-13.57
10	-15.53	-1.46
5	-15.37	-2.47
Cafeína		
10	-3.98	-74.74
5	-4.72	-70.05
1	-15.62	-0.89
0.5	-15.37	-2.47
Paracetamol		
50	-1.68	-89.25
5	-11.20	-61.23
1	-14.90	-4.80
Tiamina		
5	13.36	-15.23
1	16.06	+1.91

TABLA VI.14 Efecto producido por la presencia de interferentes para la mezcla de 5 mgA⁻¹ de codeína y 1 mgA⁻¹ de clorhidrato de piridoxina.

Interferentes mgA ⁻¹	Codeína		Cl. Piridoxina	
	Emisión 1ª der. dIRF/d8	Error %	Emisión 1ª der. dIRF/d8	Error %
Testigo	14.46		16.55	
Acido Ascórbico				
5	6.71	-53.71	-9.28	-43.91
1	11.93	-17.68	-14.94	-9.71
0.5	12.71	-12.32	-16.16	-2.34
Salicilamida				
5	11.12	-23.31	-41.33	+149.74
1	12.64	-12.78	-22.68	+37.05
0.5	13.37	-7.55	-20.07	+21.25
Teofilina				
5	10.75	-25.83	-13.96	-15.61
1	12.88	-11.12	-16.96	+2.47
0.5	13.16	-9.20	-17.38	+5.01
Efedrina				
5	11.62	-19.86	-17.50	+5.77
1	13.54	-6.62	-17.54	+5.96
0.5	13.63	-5.96	-17.18	+3.81
Cafeína				
5	8.83	-39.07	-5.91	-64.34
1	12.60	-13.12	-16.51	-0.25
0.5	13.52	-6.75	-17.88	+8.05
Paracetamol				
5	7.92	-45.23	-8.83	-46.65
1	13.50	-6.63	-16.21	-2.05
0.5	13.74	-4.98	-15.80	-4.53
Tiamina				
5	11.49	-20.54	-15.71	-5.08
1	13.90	-3.85	-17.25	+4.23

Tolerancia para determinar codeína y clorhidrato de piridoxina.

A continuación en la Tabla VI.15, se recogen los resultados de las tolerancias permitidas para los componentes del sistema de una forma aislada y en la mezcla.

TABLA VI.15 Tolerancia para la determinación de codeína y clorhidrato de piridoxina.

Sustancia	Tolerancia mgA^{-1} (interferente) / mgA^{-1} (analito)			
			Mezcla	
	Codeína	Cl. Piridoxina	Codeína	Cl. Piridoxina
Teofilina	<0.5	<0.5	<0.5	#1
Acido Ascórbico	<0.5	0.5	<0.5	0.5
Salicilamida	1	1	<0.5	#0.5
Cafeína	<0.5	1	<0.5	1
Efedrina	#0.5	10	<0.5	0.5
Tiamina	<1	1	1	5
Paracetamol	<1	1	<0.5	1

De los resultados de la tabla de tolerancias para la determinación de codeína y clorhidrato de piridoxina para el método propuesto en disolución, se puede observar una tolerancia relativamente baja para todos los interferentes ensayados.

IV. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA - CODEÍNA.

El sistema clorhidrato de piridoxina - codeína estudiado en este capítulo ha mostrado tener también un comportamiento no aditivo tal como puede observarse en los espectros mostrados en los apartados II.1 y II.2 y en la Figura VI.13. Ello origina también problemas en la resolución de la mezcla, derivadas de la variabilidad en la posición de las λ a las que se puede aplicar el procedimiento "zero crossing", posición que varía en función de la proporción relativa en la que se encuentran los analitos en la mezcla. En este sistema los errores afectan más seriamente a la determinación de codeína, como se desprende de la observación de las tablas de calibración de cada analito en presencia de cantidades variables del otro (Tablas VI.3, VI.4, VI.6 y VI.7).

Aunque las λ seleccionadas muestran mayor estabilidad, no son las más idóneas, pues conllevan menor sensibilidad.

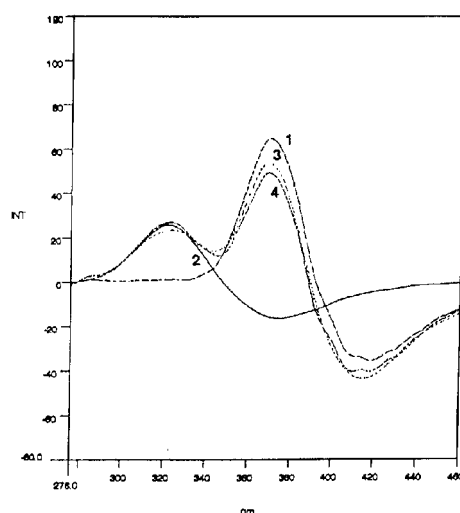


Fig.VI. 13 Espectros de emisión derivado: [CO]:5 mgA⁻¹, [PI]: 1 mgA⁻¹
1) Clorhidrato de piridoxina, 2) Codeína, 3) Mezcla, 4) Suma aritmética

Este problema parece apuntar de nuevo hacia la existencia de una interacción entre los dos componentes, lo cual sería responsable del comportamiento observado. Dicha interacción queda asimismo patente en los espectros de UV Figura VI.14.

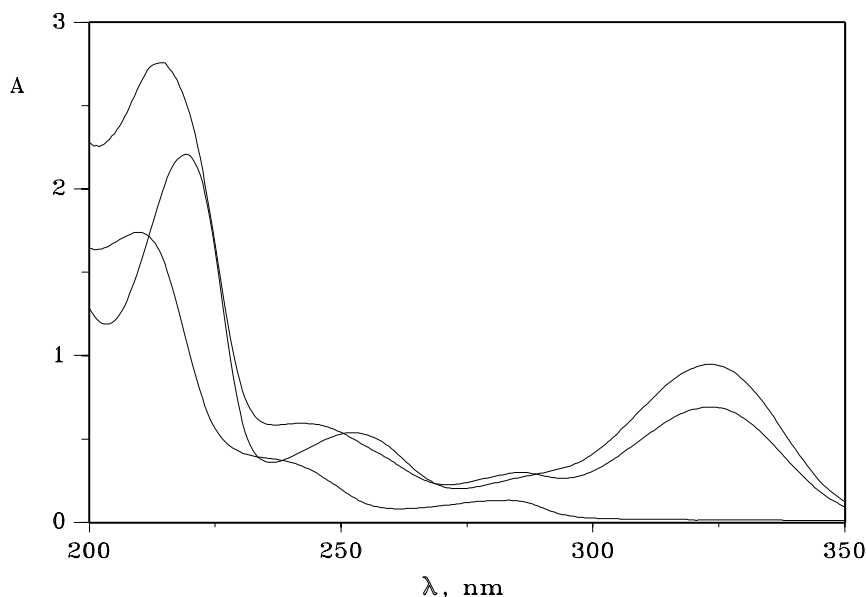


Fig.VI. 14 Espectros de UV. 1) Clorhidrato de piridoxina; 2) Codeína; 3) Mezcla
Concentración: 20 mgA^{-1}

Una aproximación al estudio de la naturaleza o tipo de esta interacción lo hemos abordado de la misma manera que en capítulo IV, mediante la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , la cual podría indicarnos si la presencia de uno de los componentes es capaz de originar alguna modificación en el espectro del otro como consecuencia de desplazamientos químicos de algún(os) ^1H inducidos por dicha interacción.

Se realizaron los espectros de ^1H de RMN de alta resolución de la codeína, del clorhidrato de piridoxina, y de la mezcla de ambos en agua deuterada, empleando tetrametilsilano como patrón interno (Fig.IV.23 y Fig.VI.15 y VI.16) y el espectro de correlación $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a corta distancia (Figura IV.26) en el cual cada C da señales de correlación con los ^1H enlazados a él, lo cual contribuye a confirmar que la asignación de las señales en los espectros de ^1H es coherente en ambos casos con las posiciones de los H indicadas en las Figuras IV.23 y VI.15 y con los datos hallados en bibliografía [383].

En este sistema se observan variaciones en los desplazamientos químicos positivas muy significativas indicadas en las Tabla VI.16 para los H de las posiciones " y \$ respecto del N (7, 9 y 20; 6, 10 y 18), respectivamente y en menor extensión el de la posición 5. En todos los casos, el sentido y magnitud del desplazamiento sería coherente, de nuevo, con la protonación del N codeínico, por acción del H que originalmente protona el nitrógeno de la piridoxina en su forma primitiva de clorhidrato, que induciría en todos los casos un "desapantallamiento" de estos H con intensidad decreciente conforme más alejados quedan del N. Esto queda patente a su vez cuando se comparan los espectros de correlación $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de la codeína con los de la mezcla codeína-clorhidrato de piridoxina, (espectros COSY, Figuras IV.27 y VI.17).

La variación en los desplazamientos químicos de la piridoxina en cambio, indican un efecto de apantallamiento de los H 2 y 12, que es coherente con la pérdida del H unido al N aromático.

Todo esto vendría a decirnos que la sospechada interacción entre estos dos constituyentes es también una interacción química de tipo ácido-base.

TABLA VI.16 Desplazamientos químicos (ppm).

H) † mezcla			
	† PI	† CO	PI	CO
2	8.08	5.01	-0.39	+0.09
3	-	4.35	-	+0.05
4	-	5.44	-	+0.02
5	-	5.66	-	+0.12
6	-	2.70	-	+0.55
7	-	3.57	-	+0.67
9a	-	2.50	-	+0.63
9b	-	2.72	-	+0.63
10a	-	1.90	-	+0.21
10b	-	2.14	-	+0.25
12	2.62	-	-0.14	-
15	-	6.74	-	+0.07
16	-	6.80	-	+0.08
18a	-	2.50	-	+0.45
18b	-	3.17	-	+0.13
20	-	2.47	-	+0.56
22	-	3.86	-	+0.02

* CO:codeína; PI:piridoxina

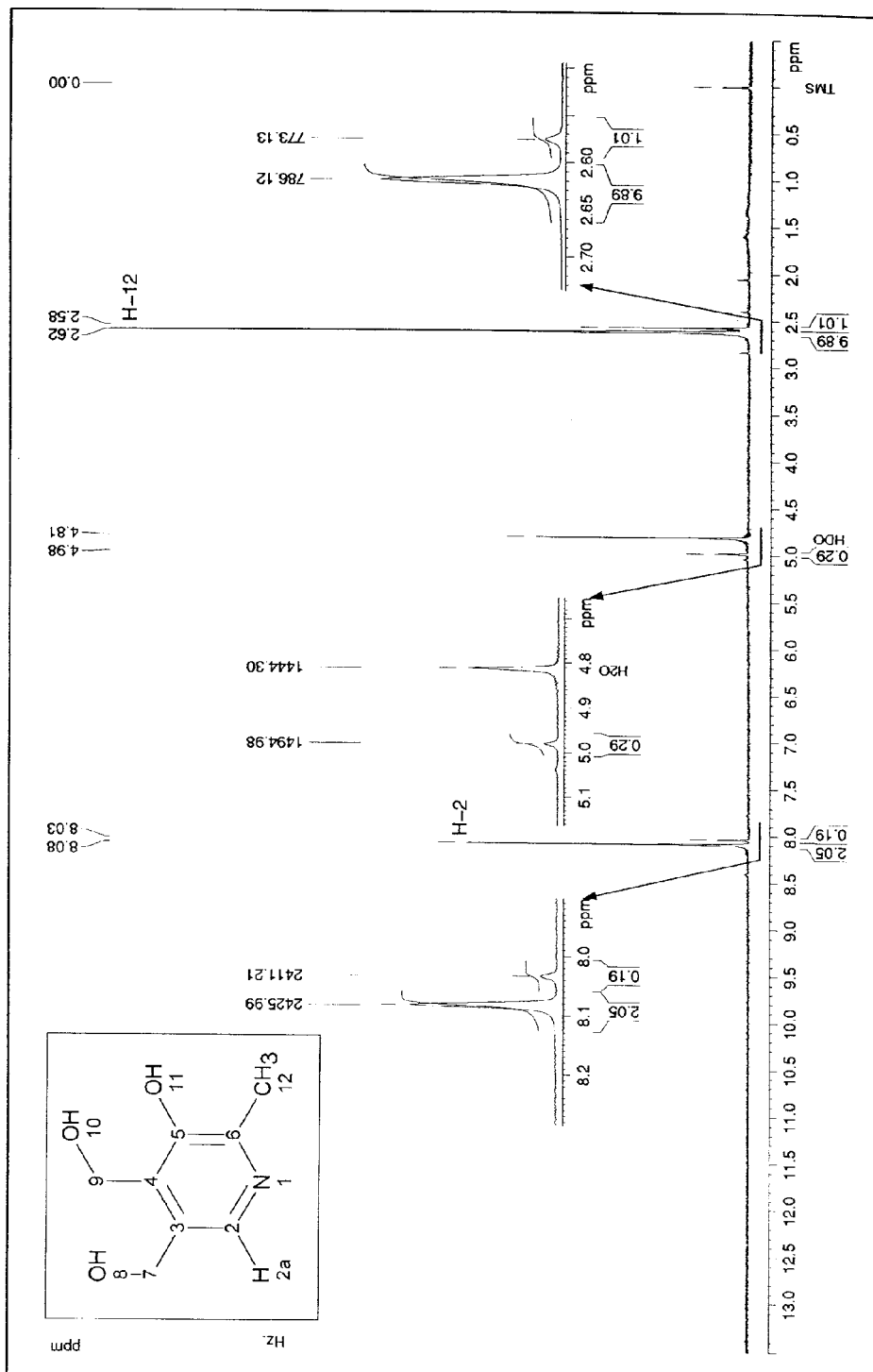


Fig. VI.15 ¹H-RMN de Piridoxina en D₂O
Experimento con supresión de disolvente

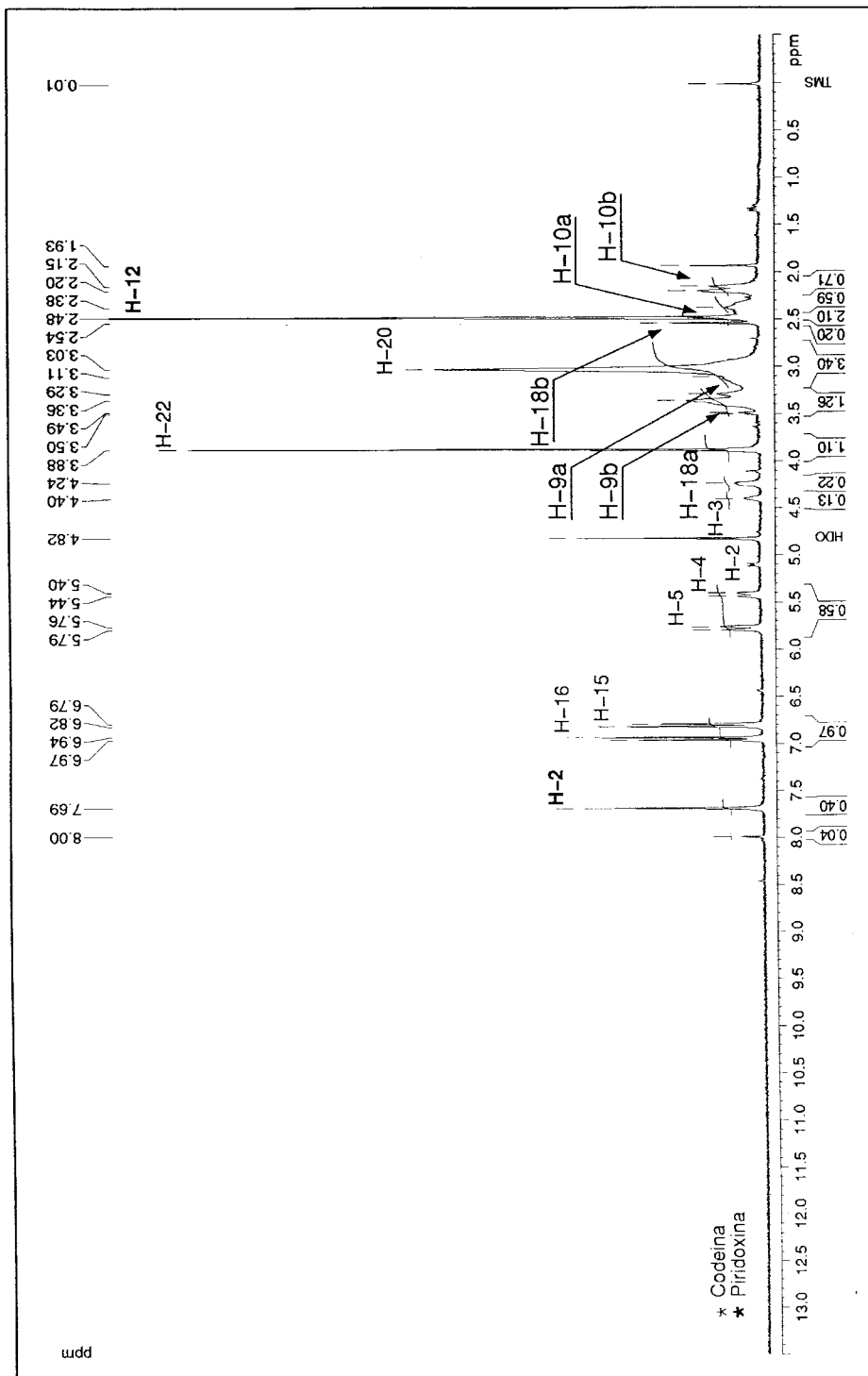


Fig. VI.16 1H-RMN de Codeina y Piridoxina en D2O
 Experimento con supresión de disolvente

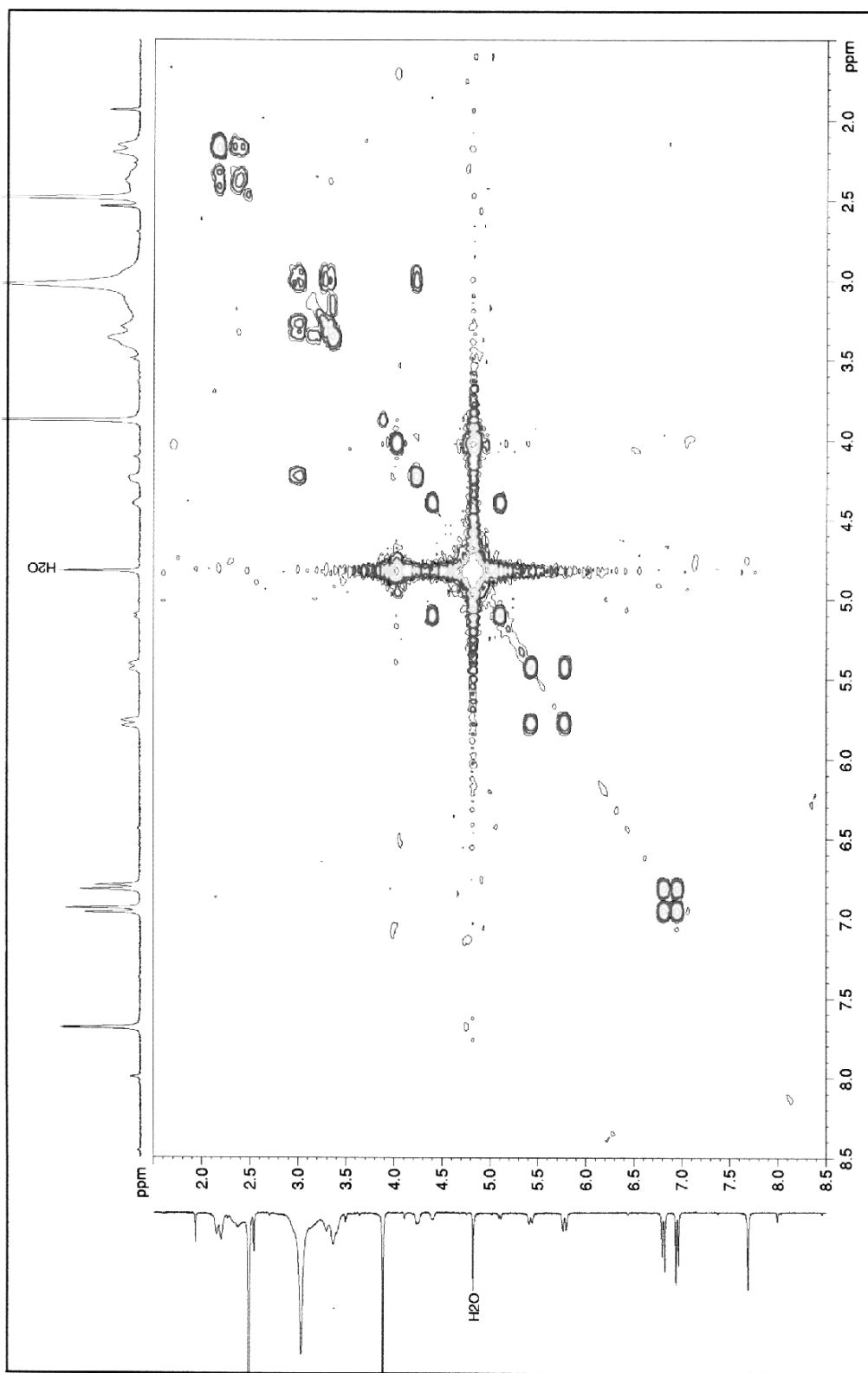


Fig. VI.17 COSY-DQF-1H-1H de Piridoxina y Codeína en D2O

V. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Con objeto de comprobar la validez del método propuesto para la resolución del sistema clorhidrato de piridoxina y codeína, se va a aplicar a los siguientes tipos de muestras:

- * Productos farmacéuticos reales
- * Productos farmacéuticos semisintéticos
- * Productos farmacéuticos sintéticos
- * Muestras sintéticas

V.1. Productos farmacéuticos.

Para las aplicaciones del método, se seleccionaron los siguientes productos farmacéuticos, Benadom, Conductasa, Serfoxide, Codeisán, Perduretas de codeína y Pazbronquial.

Las disoluciones de los medicamentos obtenidas una vez tratados, según el apartado IV.2 (capítulo I), fueron diluidas de forma adecuada y para la determinación de la concentración de cada analito se empleó, bien la función de calibrado directamente o el método de adición de patrón. Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado, son en todos los casos media de tres determinaciones.

* Función de calibrado

A la disolución de cada fármaco preparada convenientemente, se le aplicó el procedimiento operatorio, para el registro de los espectros, los valores de la derivada de la intensidad de fluorescencia fueron interpolados en la recta de calibrado, determinándose así las concentraciones de cada analito. Los resultados se recogen en las siguiente Tabla VI.17.

TABLA VI.17 Aplicaciones analíticas

Benadom			
Determinación	dIRF/d8	[Cl.Piridoxina] mgA⁻¹	mg/comprimido
1	15.22	0.94	283
2	14.60	0.90	272
3	15.00	0.93	280
Valor medio			278
Conductasa			
Determinación	dIRF/8	[^{''} .Piridoxina] mgA⁻¹	mg/mL(jarabe)
1	10.37	0.96	28.84
2	10.16	0.94	29.75
3	10.48	0.97	29.32
Valor medio			29.27
Serfoxide			
Determinación	dIRF/8	[Fosfoserinato-Piridoxina] mgA⁻¹	mg/comprimido
1	8.82	0.92	285.0
2	8.79	1.04	284.5
3	8.77	0.91	283.5
Valor medio			284.0
Codeisán			
Determinación	dIRF/d8	[Fosfato-codeína] mgA⁻¹	mg/comprimido
1	11.84	5.58	27.90
2	11.54	5.43	27.88
3	11.42	5.37	26.70
Valor medio			27.46
Perduretas de codeína			
Determinación	dIRF/d8	[Fosfato-codeína] mgA⁻¹	mg/comprimido
1	10.55	4.91	49.23
2	10.50	4.89	48.96
3	10.10	4.68	46.92
Valor medio			48.37

* Fármaco Pazbronquial. Método de adición de patrón.

En el caso del último fármaco Pazbronquial, se comprobó la existencia de un efecto matriz negativo Tabla VI.20, explicable por la compleja composición que presenta, por lo que se procedió a su análisis mediante el método de adición de patrón. Previamente la codeína se separó por extracción según el apartado IV.2 (capítulo I), no siendo posible igualmente separar el clorhidrato de piridoxina, luego se determina un solo analito, codeína. Por ello se recurrió, para su determinación al empleo de la técnica fluorimétrica de emisión convencional, cuya función de calibrado se muestra en la Tabla VI.18 y su gráfica en la Figura VI.18

TABLA VI.18 Recta de calibrado. Emisión

Codeína mgA⁻¹	I.R.F. $\lambda_{\text{emi}} = 350 \text{ nm}$
1	33.92
2	75.58
5	161.7
7	247.4
10	341.6
15	473.3
17	524.4
Parámetros analíticos	
a, ordenada en el origen	15.39
b, pendiente	30.70
r, coeficiente de correlación	0.998

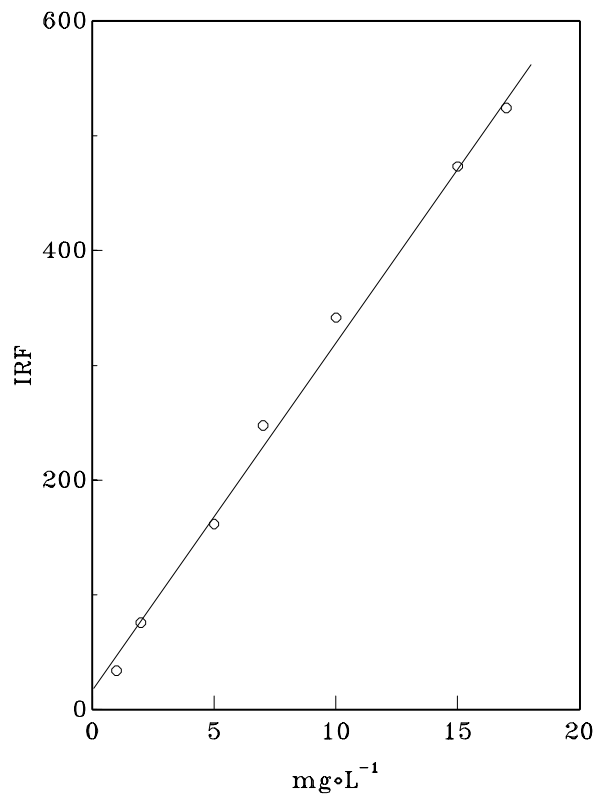


Fig.VI.18 Recta de calibrado de codeína.
Emisión

A continuación, a partir de la disolución resultante del proceso de extracción, se prepararon por triplicado disoluciones con concentraciones añadidas de disolución patrón de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de codeína, se les registraron los espectros de emisión en las condiciones operatorias y los resultados se muestran en la Tabla VI.19.

TABLA VI.19 Pazbronquial

Codeína (añadida) mgA^{-1}	1ª Determinación $\text{IRF}_{8_{\text{nm}}}=350\text{nm}$	2ª Determinación $\text{IRF}_{8_{\text{nm}}}=350\text{nm}$	3ª Determinación $\text{IRF}_{8_{\text{nm}}}=350\text{nm}$
-	41.34	43.24	46.32
3	127.0	131.1	115.8
8	244.0	251.3	231.4
10	288.4	292.0	278.0
a	46.56	49.31	46.36
b	24.48	24.79	23.15
r	0.998	0.998	0.999

A la vista de los valores de la relación de pendientes (Tabla VI.20) de cada determinación queda comprobado el efecto matriz negativo.

TABLA VI.20 Relación de pendientes

Relación	1ª Determinación	2ª Determinación	3ª Determinación
m/m_M	0.80	0.81	0.75

Por último, en la Tabla VI.21, se muestran las cantidades de fosfato de codeína obtenidas para cada determinación.

TABLA VI.21 Determinaciones analíticas

Determinación	Primera	Segunda	Tercera
mgA^{-1} encontrado	2.51	2.63	2.64
mg/mL jarabe	1.004	1.052	1.056

Parámetros estadísticos.

Finalmente, se va a validar los métodos por comparación del resultado con un método de referencia puesto a punto en el capítulo II de la presente memoria, que utiliza como técnica separativa Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

A partir de los resultados experimentales, aplicamos el procedimiento estadístico para la evaluación y comparación de la exactitud y precisión de los métodos propuestos.

La exactitud se ha comparado mediante el estadístico calculado t_{exp} (t de Student) y la precisión a través del contraste de varianzas, *test* de Snedecor (distribución F de Fisher). En ambos criterios, siempre que el estadístico calculado t o F sean menor que el tabulado para el número de grados de libertad correspondiente al nivel de significación seleccionado, 5%, se acepta que el método comparado es igual de exacto y preciso que el de referencia. Los resultados se muestran en la Tabla VI.22.

TABLA VI.22 Parámetros estadísticos

Benadom		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión 1ª der.	HPLC
O	278.3	276.3
s_{n-1}	5.70	2.92
s^2	32.33	8.53
s_m	3.283	1.686
C.V. %	2.04	1.06
E_r	+0.72	-
$O_{\pm m \times t}$	278±14	276±7
s_{sistema}	4.52	-
t_{exp}	0.54 N.S.	-
F_{exp}	3.79 N.S.	-
Conductasa		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión 1ª der.	HPLC
O	29.29	28.69
s_{n-1}	0.46	1.42
s^2	0.21	2.02
s_m	0.263	0.820
C.V. %	1.55	4.96
E_r	+2.10	-
$O_{\pm m \times t}$	29±1	29±4
s_{sistema}	1.056	-
t_{exp}	0.696 N.S.	-
F_{exp}	9.62 N.S.	-

TABLA VI.22 (cont.)

Serfoxide		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión 1ª der.	HPLC
O	284.0	280.0
: _{n-1}	0.80	2.96
: ²	0.63	8.81
: _m	0.457	1.71
C.V. %	0.28	1.06
E _r	+1.43	-
O±: _m x t	284±2	280±7
: sistema	2.173	-
t _{exp}	1.084 N.S.	-
F _{exp}	13.98 N.S.	-
Codeisán		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión 1ª der.	HPLC
O	27.47	27.10
: _{n-1}	0.67	1.40
: ²	0.44	1.93
: _m	0.384	0.802
C.V. %	2.42	5.12
E _r	+1.36	-
O±: _m x t	27±2	27±3
: sistema	1.089	-
t _{exp}	0.416 N.S.	-
F _{exp}	4.39 N.S.	-

TABLA VI.22 (cont.)

Perduretas de codeína		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión 1ª der.	HPLC
O	48.37	46.10
s_{n-1}	1.26	0.37
s^2	1.60	0.14
s_m	0.729	0.216
C.V. %	2.61	0.81
E_r	+4.99	-
$O \pm s_m \times t$	48±3	46.1±0.9
s_{sistema}	0.933	-
t_{exp}	1.987 N.S.	-
F_{exp}	11.43 N.S.	-
Pazbronquial		
Parámetros estadísticos	Método Fluorimétrico	Método de referencia
	Emisión	HPLC
O	1.036	1.001
s_{n-1}	0.028	5.6×10^{-3}
s^2	7.8×10^{-4}	3.1×10^{-5}
s_m	0.016	3.2×10^{-3}
C.V. %	2.74	0.57
E_r	+3.50	-
$O \pm s_m \times t$	1.04±0.07	1.00±0.01
s_{sistema}	0.020	-
t_{exp}	2.144 N.S.	-
F_{exp}	26.09 S.	-

$$t_{\text{teor.}} = 2.776$$

$$F_{\text{teor.}} = 19.00$$

V.2 Productos farmacéuticos semisintéticos.

La Tabla VI.23, muestra los resultados de los fármacos semisintéticos, cada dato es media de tres repeticiones, donde en cada caso se ha añadido el principio activo ausente en la composición del mismo, llevándose a cabo la determinación simultánea por el procedimiento desarrollado de la derivada de primer orden del espectro de emisión.

TABLA VI.23 Aplicaciones analíticas

Benadon							
Clorhidrato de piridoxina				Codeína			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	E %	CV %	$C_{\text{añadid.}}$ mgA^{-1}	$C_{\text{recup.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
0.4	0.38	-5.80	0.76	4.0	3.99	102±2	1.72
1.0	0.94	-6.00	0.86	5.0	4.97	99±1	0.33
Conductasa							
" -cetoglutarato de piridoxina				Codeína			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	E %	CV %	$C_{\text{añadid.}}$ mgA^{-1}	$C_{\text{recup.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
0.78	0.76	-3.93	0.76	4.0	4.27	106±2	2.19
1.96	1.84	-6.46	1.13	5.0	4.87	99±2	1.78
Serfoxide							
Fosfofoserinato de piridoxina				Codeína			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	E %	CV %	$C_{\text{añadid.}}$ mgA^{-1}	$C_{\text{recup.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
0.38	0.37	-2.63	4.16	4.0	4.01	100±1	1.25
0.96	0.90	-6.25	1.70	5.0	4.81	96±1	0.83
Codeisán							
Fosfato de codeína				Cl. Piridoxina			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	E %	CV %	$C_{\text{añadid.}}$ mgA^{-1}	$C_{\text{recup.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
4.60	4.34	-5.67	0.49	0.5	0.52	104±1	1.24
5.74	5.50	-4.29	2.42	1.0	1.02	102±1	1.03
Perduretas de codeína							
Fosfato de codeína				Cl. Piridoxina			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	E %	CV %	$C_{\text{añadid.}}$ mgA^{-1}	$C_{\text{recup.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
4.00	3.77	-5.80	1.11	0.3	0.29	94±4	4.19
6.00	5.57	-7.33	0.18	1.0	0.97	96±4	0.43

V.3 Fármacos sintéticos

A continuación, dado la carencia de fármacos cuya composición presenten la combinación de ambos principios activos a determinar, hemos realizado en el laboratorio la síntesis de comprimidos para distintas relaciones de codeína y clorhidrato de piridoxina de acuerdo a las cantidades que se recogen en la Tabla I.1 del capítulo I

Las muestras tratadas según el apartado IV.2 (capítulo I), se sometieron al procedimiento operatorio y registro de sus espectros, los resultados obtenidos media de tres determinaciones se muestran en la Tabla VI.24

TABLA VI.24 Aplicaciones a fármacos sintéticos

Codeína				Cl. Piridoxina			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %	C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	%R±:	CV %
5	4.82	96±2	2.44	1	1.07	107±2	1.11
4	3.91	98±2	1.50	0.5	0.54	108±3	1.31
5	4.70	94±2	1.45	0.5	0.53	105±1	1.46

Para los tres fármacos sintetizados se obtienen porcentajes de recuperación satisfactorios.

V.4 Muestras sintéticas.


De la misma manera que en el apartado anterior, se va a comprobar la utilidad del método propuesto para la determinación de ambos analitos en distintas mezclas sintéticas en disolución.

Se prepararon una serie de disoluciones siguiendo el procedimiento operatorio, con concentraciones diferentes de cada analito, por último se midieron los valores de $dIRF/d\lambda$ para cada componente en la mezcla y las concentraciones recuperadas se obtuvieron mediante interpolación en la correspondiente recta de calibrado. En la Tabla VI.25 se muestra, los resultados del estudio de recuperación, siendo todos media de tres réplicas.


TABLA VI.25 Aplicaciones a muestras sintéticas

Codeína				Cl. Piridoxina			
C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	$\%R\pm$:	CV %	C_{puesto} mgA^{-1}	$C_{\text{encont.}}$ mgA^{-1}	$\%R\pm$:	CV %
5	4.75	95±3	5.53	2	1.95	98±5	5.51
5	5.13	103±2	1.75	1	0.99	99±1	1.20
2	2.03	101±4	4.00	0.2	0.21	102±3	2.83
7	6.70	95±2	2.01	0.4	0.44	108±1	0.55

Los resultados obtenidos para todas las muestras sintéticas analizadas, presentan porcentajes de recuperación que pueden considerarse, en general satisfactorios.



VII. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA POR CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES



El objetivo de este capítulo es probar la aplicabilidad de los métodos de calibración multivariante para la determinación espectrofluorimétrica de estos tres analitos. Para ello se aborda la resolución de las mezclas ternarias y binarias así como muestras unitarias de ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina en diferentes tipos de matrices.

En la actualidad y de acuerdo con la revisión bibliográfica, que a continuación se cita, para este sistema no se ha propuesto ningún método que permita su resolución mediante la combinación por mínimos cuadrados parciales (PLS) a través de las formas algorítmicas PLS-1, y la espectrofluorimetría en disolución, con lo cual es de interés el llevar a cabo este propósito. Se pretende con ello proponer un método alternativo a la resolución de las mezclas abordadas en los capítulos anteriores que supere las limitaciones encontradas en las resoluciones de las mezclas binarias que allí estudiamos.

A continuación exponemos brevemente los trabajos encontrados en la bibliografía consultada en los que se resuelven mediante calibración multivariante, mezclas de varios analitos, en los que participa al menos, uno de los tres que son objeto de nuestro estudio

A. Muñoz de la Peña y col [384], determinan simultáneamente ácido salicílico y diflunisal mediante la técnica sincrónica combinada con la calibración multivariante (PLS). A partir del espectro de luminiscencia total se selecciona 128 nm como valor óptimo para la diferencia entre la longitud de onda de excitación y emisión. El método se basa en la fluorescencia nativa de los compuestos en cloroformo 1% (V/V), ácido acético. Para concentraciones comprendidas entre (60- 240) : $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito, se encuentran recuperaciones entre (96-103)% para ácido salicílico y de (97-105)% para diflunisal.

R. D. Bautista Jiménez y col [385], resuelven la mezcla de ácido salicílico, codeína y efedrina, así como la de codeína y efedrina en muestras sintéticas y de orina, mediante la multicalibración (PLS), en presencia de sustancias extrañas también fluorescentes. El método se ha validado estadísticamente con buenos resultados para todos los casos, encontrándose límites de detección de valores 0.33, 0.04 y 0.11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para efedrina, codeína y ácido salicílico respectivamente.

A. Muñoz de la Peña y col [386], proponen un método para el sistema ácido genticónico, salicílico y salicilúrico, empleando métodos de multicalibración PLS y PCR, para las técnicas fluorimétricas de excitación-emisión y sincrónica. Los parámetros estadísticos RMSD y R^2 , no son significativamente diferentes para ningún método. Se prefiere, excitación-emisión para ácido salicílico y salicilúrico por el menor solapamiento, mientras que en el caso del ácido genticónico es indistinto emplear, el espectro de excitación-emisión o sincrónico.

R. D. Bautista y col [387], presentan dos formas de calibración multivariante MULTI3 y PLS-2, para la resolución de las mezclas ternarias, ácido salicílico-cafeína-codeína y acetaminofenol-cafeína-codeína. Los resultados obtenidos por Multi3, eran inaceptables en la mayoría de los casos, mientras que por PLS-2, disminuían considerablemente los errores, lo que demuestra que es posible el empleo de PLS-2, para resolver mezclas complejas de analitos en proporciones muy distintas, aún cuando haya amplio solapamiento de señales. El método propuesto ha sido aplicado a tabletas farmacéuticas.

W. Wei, L. Nie y S. Yao [388], establecen un análisis por calibración multivariantes, empleando sensores de cuarzo piezoeléctrico para determinar aspirina y ácido salicílico. Se basa en la relación lineal entre la conductividad de una disolución acuosa y el sensor en función de la concentración. La utilidad de la técnica ha sido evaluada con el análisis de mezclas desconocidas, empleando la matriz óptima de calibración. Los errores relativos eran 0.81% para aspirina y 1.63% para ácido salicílico.

R. D. Bautista y col.[389], determinan simultáneamente diazepam y piridoxina, en muestras sintéticas y productos farmacéuticos empleando, regresión lineal múltiple y regresión por mínimos parciales, combinadas con la técnica de "zero crossing", del espectro de absorción UV. La exactitud y precisión de los métodos ha sido determinada y validada, mediante el análisis de muestras sintéticas que contenían mezclas de ambos analitos en distintas proporciones. Se ha aplicado a la determinación de diazepam y piridoxina en preparados farmacéuticos, con buenos resultados en todos los casos.

R. D. Bautista y col [390], han empleado dos modalidades de calibración multivariante PLS-1 y PLS-2 para el análisis de mezclas ternarias y cuaternarias de acetaminofenol, ácido acetil-salicílico, codeína y cafeína. La metodología permite la determinación cuantitativa teniendo en cuenta el solapamiento espectral de las bandas. A los resultados experimentales se les ha aplicado un análisis estadístico exhaustivo demostrando la validez del método propuesto. La determinación en productos farmacéuticos han sido satisfactorios en todos los casos.

I. ESPECTROS EN DISOLUCIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA

En primer lugar vamos a obtener las condiciones adecuadas para la obtención de los espectros en disolución de los componentes del sistema, para su determinación simultánea mediante regresión por mínimos cuadrados parciales. Para ello se estudió como influía en el solapamiento de los espectros de emisión, la variación de la longitud de onda de excitación, para tal fin se prepararon disoluciones de concentraciones 0.25, 2 y 0.45 mgA⁻¹ respectivamente de ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina, se registraron los espectros de emisión entre 300 y 500 nm para los siguientes valores de longitudes de onda de excitación: 215, 220, 225, 230, 240, 250, 260 y 293 nm. En todos los casos se observa un solapamiento mayor entre los espectros del ácido salicílico y clorhidrato de piridoxina, solapamiento que para la codeína aumenta para los valores más bajos de longitudes de onda de excitación ensayadas, no obstante se elige 220 nm para el cual la codeína componente de menor rendimiento fluorescente del sistema, se encuentra favorecida, mientras que el ácido salicílico y clorhidrato de piridoxina mantienen una señal de fluorescencia suficiente que permite abordar la resolución de la mezcla mediante el método de calibración multivariante.

De igual forma, se realizaron experiencias para ver la influencia de la velocidad de barrido y los valores de la rendijas de excitación y emisión así como el factor de filtrado sobre los espectros de emisión de los componentes, comprobándose que la velocidad de barrido no altera la señal de fluorescencia y que los valores óptimos de rendijas eran 5 y 5 nm para ambas, que permitían ampliar el rango de calibración para los componentes más fluorescentes del sistema, ácido salicílico y clorhidrato de piridoxina.

Resumiendo, los espectros de emisión para la aplicación de la calibración multivariante al sistema formado por: ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina se registrarán en las siguientes condiciones:

- * **Longitud de onda de excitación:** 220 nm
- * **Velocidad de barrido:** 240 nm/min
- * **Rendijas de excitación y emisión:** 5 y 5 nm
- * **Factor de filtrado:** 49 puntos

Los espectros en estas condiciones se pueden observar en la Figura VII.1

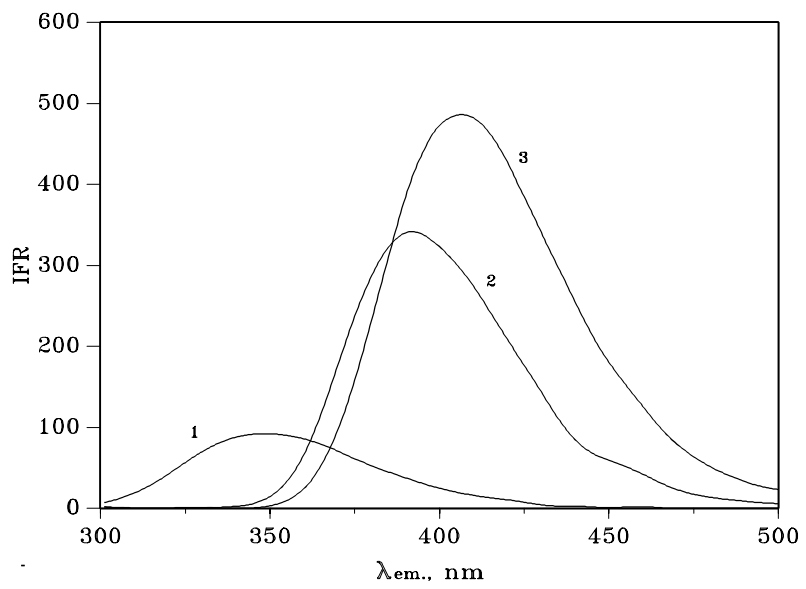


Fig. VII.1 Espectros de emisión: codeína (1), clorhidrato de piridoxina (2) y ácido salicílico (3)

II. FUNCIONES DE CALIBRACIÓN DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES

Antes de abordar la resolución de la mezcla, es necesario establecer para cada analito en las condiciones óptimas espectrales seleccionadas en el apartado anterior, la función de calibrado para cada uno de ellos por separado.

Para ello, se prepararon disoluciones de distintas concentraciones para cada analito y se registraron los espectros en las condiciones seleccionadas en el apartado anterior, los valores de los parámetros analíticos así como las ecuaciones de las rectas de regresión ajustadas por mínimos cuadrados se recogen en la Tabla VII.1 y su representación gráfica se muestra en las Figuras VII.2 a VII.4.

TABLA VII.1 Funciones de calibrado

Ácido salicílico mgA⁻¹	IRF
0.10	58.56
0.25	139.6
0.50	288.9
1.00	504.5
2.00	950.5
Parámetros analíticos	
Ordenada en origen	30.76
Pendiente	464.5
Coefficiente de correlación	0.999
Ecuación de la recta	Y = 30.76 + 464.5 C
Codeína mgA⁻¹	IRF
0.25	12.87
0.50	25.61
1.00	57.43
2.00	103.2
3.00	137.8
Parámetros analíticos	
Ordenada en origen	5.48
Pendiente	45.86
Coefficiente de correlación	0.994
Ecuación de la recta	Y = 5.48 + 45.86 C
Clorhidrato de piridoxina mgA⁻¹	IRF
0.10	40.54
0.25	91.89
0.50	173.0
1.00	316.2
2.00	559.5
Parámetros analíticos	
Ordenada en origen	27.48
Pendiente	271.1
Coefficiente de regresión	0.998
Ecuación de la recta	Y = 27.48 + 271.1 C

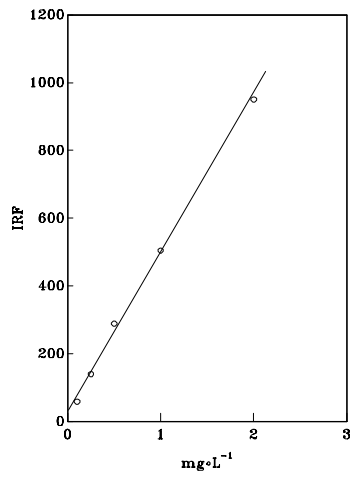


Fig.VII.2 Recta de calibrado para ácido salicílico

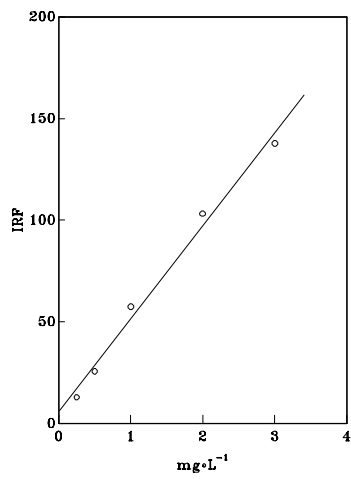


Fig.VII.3 Recta de calibrado para codeína

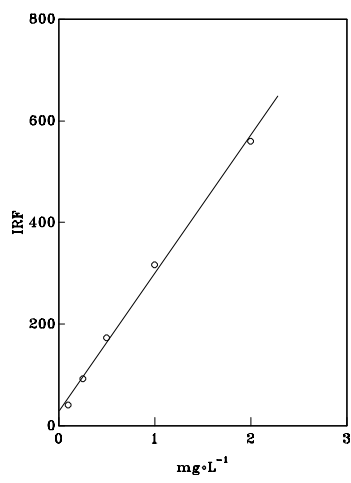


Fig.VII.4 Recta de calibrado para clorhidrato de piridoxina

III. MATRIZ DE CALIBRACIÓN

El primer paso para la aplicación del método de calibración multivariante PLS es la obtención de la matriz de calibración, conjunto de patrones que son mezclas de los compuestos puros que constituyen el problema, de concentraciones seleccionadas de forma aleatoria y comprendidas dentro de los intervalos de linealidad establecidos para cada uno de los componentes.

Se preparan un conjunto de 24 disoluciones para definir la matriz de calibración, recogidas en la tabla VII.2 que son mezclas binarias y ternarias en distintas proporciones, para los intervalos siguientes de concentración, $[0.10 - 2] \text{ mgA}^{-1}$ para ácido salicílico, $[0.25 - 3] \text{ mgA}^{-1}$ para codeína y $[0.10 - 2] \text{ mgA}^{-1}$ para clorhidrato de piridoxina. Este número de muestras es lo suficientemente amplio para que al aplicar los criterios de rechazo y eliminar las posibles muestras erróneas, para que podamos disponer de un número adecuado de ellas que permita obtener la matriz de calibración óptima al aplicar los métodos de calibración multivariante. A cada una de estas muestras se le aplica el procedimiento operatorio establecido en capítulo I, registrándose los espectros de emisión en las condiciones establecidas en el apartado I de este capítulo.

1.- El primer conjunto de datos está formado por los espectros que no se someten a ningún tratamiento previo, son los que se obtienen directamente al introducir las muestras en el fluorímetro y registrar los espectros con un intervalo de longitud de onda de

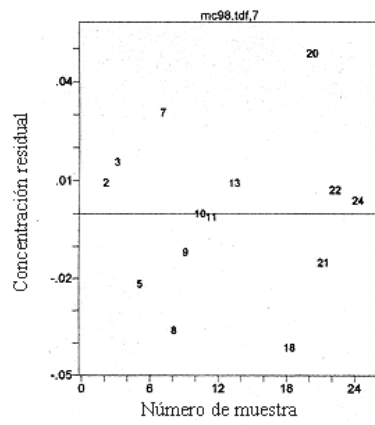
2.- El segundo conjunto de datos está formado por los espectros anteriores después de ser sometidos a una operación de suavizado del ruido instrumental, adecuada para cada componente y optimizada en el apartado I del presente capítulo.

Para efectuar los cálculos en todos los casos se selecciona la zona de 250 a 500 nm del espectro, rango que contiene puntos y donde se encuentra la mayor información espectral de los analitos.

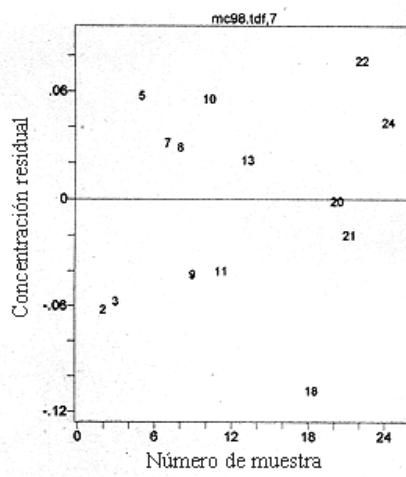
TABLA VII.2 Composición de la matriz de calibración

Muestra	Ácido salicílico mgA ⁻¹	Codeína mgA ⁻¹	Clorhidrato de piridoxina mgA ⁻¹
1	-	3.00	0.10
2	-	1.00	1.00
3	-	0.25	1.00
4	0.10	2.00	-
5	0.25	0.25	-
6	1.00	2.00	-
7	1.00	-	1.00
8	0.50	-	1.00
9	0.25	-	1.00
10	0.10	0.50	1.00
11	0.10	2.00	0.25
12	0.10	3.00	1.00
13	0.10	1.00	0.25
14	0.25	0.25	2.00
15	0.25	3.00	0.10
16	0.50	0.25	0.25
17	1.00	0.50	0.25
18	1.00	0.50	0.50
19	1.00	0.25	0.50
20	1.00	0.25	0.25
21	0.50	2.00	0.50
22	0.50	1.00	1.00
23	2.00	1.00	0.10
24	0.50	2.00	1.00

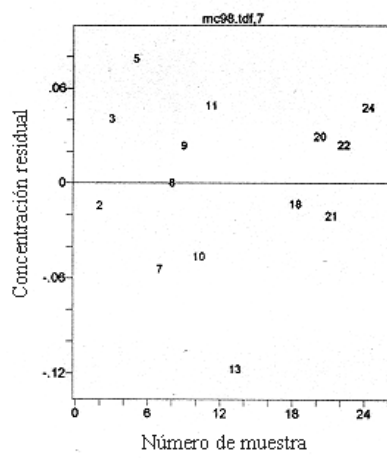
La detección de muestras erróneas se realizó tal como está descrito en el capítulo I de la presente Memoria, de manera que se seleccionan 14 muestras para la obtención de la matriz de calibración que se utilizará posteriormente en la etapa de predicción (las muestras 1, 4, 6, 12, 14, 15, 16, 17, 19 y 23 fueron rechazadas). En la Figura VII.5, se muestran los gráficos de los residuales de concentración para cada componente, en las diferentes muestras de la matriz de calibración.



(a)



(b)



(c)

Fig. VII.5. a) ácido salicílico. b) codeína. c) clorhidrato de piridoxina.

A continuación, como se aprecia en la Tabla VII.3, el número máximo de factores a tener en cuenta para optimizar la matriz de calibración, aplicando el criterio de Haaland y Thomas (mitad de muestras patrón más uno) es de ocho, por lo tanto, teniendo en cuenta que vamos a emplear el algoritmo PLS-1 que utiliza un valor de PRESS para cada componente y que dichos valores son los que corresponden al primer valor de probabilidad que se encuentra por debajo de 0.75, nos encontramos que el número óptimo de factores para cada componente es de tres.

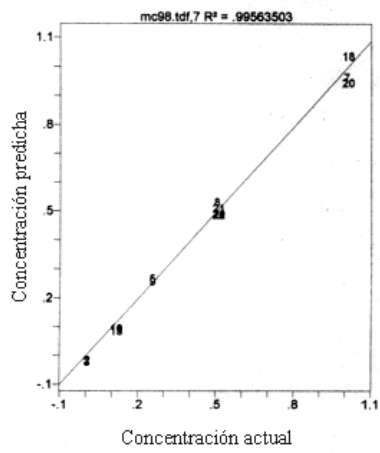
TABLA VII.3 Selección del número de factores

Número factores	Ácido salicílico		Codeína		Cl. de Piridoxina	
	PRESS	P	PRESS	P	PRESS	P
1	0.57308	0.9999	8.00737	0.9999	1.91018	0.9999
2	0.07385	0.9995	1.56206	0.9999	0.24338	0.9992
3	0.00775	0.5000	0.03436	0.5000	0.03893	0.6784
4	0.01392	0.0000	0.05326	0.0000	0.03061	0.5216
5	0.01080	0.0000	0.10821	0.0000	0.03769	0.6585
6	0.00945	0.0000	0.17156	0.0000	0.03746	0.6546
7	0.00948	0.0000	0.16278	0.0000	0.03029	0.5144
8	0.00849	0.0000	0.16064	0.0000	0.02983	0.5043

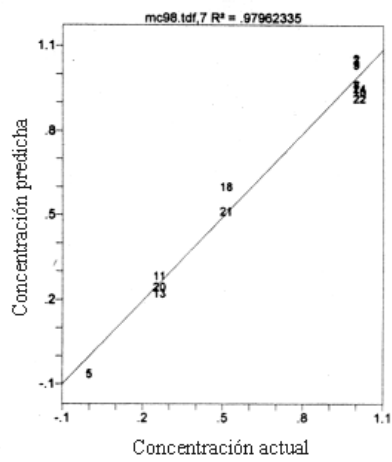
Por último, en la Tabla VII.4, se recogen los parámetros estadísticos relacionados con la calidad de ajuste del modelo para cada analito, de la forma ya comentada en el capítulo I, y sus correspondientes representaciones gráficas se muestran en la Figura VII.6.

TABLA VII.4 Parámetros estadísticos

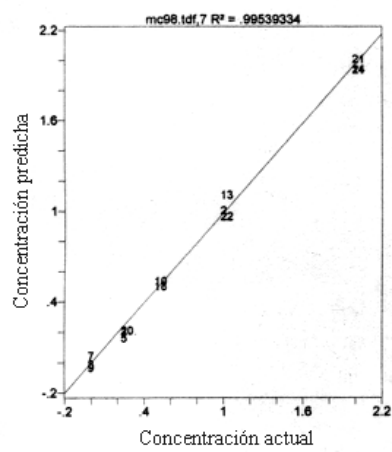
Componente	R ²	RMSD	REP
Ácido salicílico	0.9956	0.0234	3.04
Codeína	0.9796	0.0527	4.62
Clorhidrato de piridoxina	0.9953	0.0495	2.77



(a)



(b)



(c)

Fig. VII.6. a) ácido salicílico. b) codeína. c) clorhidrato de piridoxina.

IV. ETAPA DE PREDICCIÓN

La matriz de calibración anteriormente seleccionada se emplea a continuación, para determinar los tres componentes en mezclas sintéticas. El objetivo de esta experiencia es determinar la capacidad de la matriz de calibración para resolver no sólo mezclas ternarias y binarias sino también sistemas que contengan uno solo de los analitos de forma que posteriormente, podamos aplicar el método a productos farmacéuticos con garantías de éxito.

Para ello, se preparan mezclas ternarias y binarias así como disoluciones que contienen solo uno de los analitos y se les aplica el proceso operatorio establecido introduciendo los espectros obtenidos en la matriz de calibración. En la Tabla VII.5 se recogen los resultados obtenidos, donde se establece el tanto por ciento de recuperación para cada una de las muestras. El valor encontrado en todos los casos es media de tres determinaciones.

En estas muestras sintéticas los porcentajes de recuperación se encuentran comprendidos entre 84 y 120 % para ácido salicílico, 84.3 y 113.6% para codeína y entre 80 y 120 % para clorhidrato de piridoxina.

TABLA VII.5 Composición de mezclas sintéticas

Muestra	Ácido salicílico			Codeína			Cl. Piridoxina		
	C _{puesta}	C _{encont.}	%R±:	C _{puesta}	C _{encont.}	%R±:	C _{puesta}	C _{encont.}	%R±:
1	-	0.00	-	0.30	0.25	84.3±0.7	-	-0.07	-
2	-	-0.01	-	1.00	1.08	108±1	-	0.00	-
3	-	0.00	-	2.00	2.12	106±1	-	-0.05	-
4	-	-0.03	-	-	0.17	-	0.30	0.29	97.3±0.8
5	-	-0.02	-	-	-0.09	-	1.00	0.80	80±1
6	-	-0.01	-	-	-0.04	-	2.00	1.60	81±2
7	0.30	0.33	110.2±0.1	-	-0.01	-	-	-0.02	-
8	0.50	0.43	85.5±0.5	-	-0.10	-	-	-0.02	-
9	1.00	1.08	108±1	-	-0.10	-	-	0.03	-
10	-	0.03	-	2.00	2.15	107±2	0.75	0.82	109±2
11	-	0.02	-	0.60	0.61	101.2±0.8	1.50	1.37	91±1
12	0.20	0.21	105±1	0.60	0.60	100±2	-	0.00	-
13	0.15	0.15	100±3	-	-0.1	-	0.60	0.59	98±1
14	0.15	0.18	120±2	0.60	0.68	113.6±0.2	0.60	0.57	95±1
15	0.20	0.21	105±3	3.50	3.25	93±1	0.75	0.77	103±2
16	0.20	0.21	105±2	3.50	3.27	94±2	0,60	0.61	101±1
17	0.20	0.18	92±2	0.60	0.54	90.4±0.8	0.30	0.25	83.7±1.7
18	0.75	0.63	84±2	3.50	2.95	84.5±0.6	0.30	0.32	106.2±1.5
19	0.30	0.28	93±1	2.50	2.20	88±1	1.50	1.27	85±1
20	0.15	0.14	98±1	1.50	1.61	107±1	0.15	0.18	120±2
21	0.15	0.14	98±2	3.50	3.28	94.2±0.6	0.30	0.36	120±1
22	0.30	0.28	95±1	0.60	0.51	85.3±0.2	0.15	0.13	85.3±1.4

V. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO, CODEÍNA Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA EN FÁRMACOS.

Se ha llevado a cabo la determinación de los tres analitos mediante el método multivariante propuesto en los siguientes productos farmacéuticos, Benadom, Codeisán, Dolmen, Dolvirán y Perduretas de codeína citada su composición en el capítulo I, habiéndose hecho además un estudio de recuperación por adición de alguno(s) de los constituyentes no contenidos en los fármacos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VII.6 a VII.10.

TABLA VII.6 Benadom

Ácido salicílico			Codeína			Cl.Piridoxina		
C _{añadido}	C _{encont.}	%R±:	C _{añadido}	C _{encont.}	%R±:	C _{puesta}	C _{encont.}	%R±:
-	-	-	-	-	-	1.00	1.10	110±1
0.50	0.54	108±2	-	-	-	1.00	1.16	116±2
0.50	0.51	102±1	2.00	1.99	99.5±1	0.50	0.58	116±1
0.50	0.52	106±1	2.00	2.03	102±1	1.00	1.08	108±2

TABLA VII.7 Codeisán

Ácido salicílico			Codeína			Cl.Piridoxina		
C _{añadido}	C _{encont.}	%R±:	C _{puesta}	C _{encont.}	%R±:	C _{añadido}	C _{encont.}	%R±:
-	-	-	2.29	2.26	98.7±0.6	-	-	-
1	1.10	108±4	2.29	2.36	103±3	-	-	-
-	-	-	2.29	2.20	95.9±0.2	1.00	0.80	80±1
0.50	0.54	116.3±0.2	2.29	2.25	98.5±1.2	0.50	0.45	90±3
0.50	0.54	108±3	2.29	0.17	90.8±2.4	1.00	0.80	80±3

TABLA VII.8 Dolmen

Ácido salicílico			Codeína			Cl.Piridoxina		
C_{puesta}	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:
0.50	0.56	113.5±4.1	-	-	-	-	-	-
0.50	0.52	105±1	2.00	1.92	96.1±0.2	-	-	-
0.30	0.33	113±1	1.00	1.01	101±4	-	-	-
0.50	0.51	101±2	2.00	2.31	115.3±0.4	0.50	0.59	118±1
0.50	0.58	117±1	2.00	2.09	104.5±0.2	1.00	1.09	109.3±0.7

TABLA VII.9 Dolvirán

Ácido salicílico			Codeína			Cl.Piridoxina		
C_{puesta}	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:
0.50	0.58	117±2	-	-	-	-	-	-
0.50	0.54	109±1	1.00	1.15	115±2	-	-	-
0.50	0.53	106±1	2.00	2.22	111±1	0.50	0.59	118±1
0.50	0.58	117±2	2.00	1.99	99.0.7	1.00	1.01	101±1

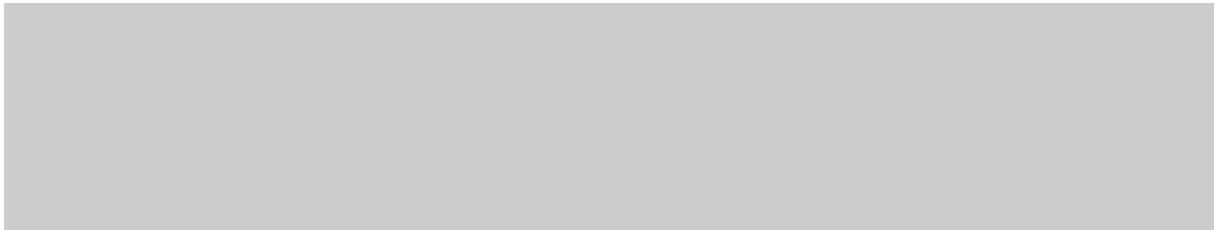
TABLA VII.10 Perduretas de codeína

Ácido salicílico			Codeína			Cl.Piridoxina		
$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	C_{puesta}	$C_{\text{encont.}}$	%R±:	$C_{\text{añadido}}$	$C_{\text{encont.}}$	%R±:
-	-	-	2.00	1.89	95.2±0.7	-	-	-
1.00	1.10	110±3	2.00	1.99	99±1	-	-	-
-	-	-	2.00	1.92	96±1	1.00	0.90	90.4±0.7
0.50	0.58	118±1	2.00	1.96	98.3±0.5	0.50	0.50	100.7±0.4
0.50	0.56	112±2	2.00	1.88	94±20	1.00	0.94	94±2
0.50	0.53	106±1	2.00	2.12	106.4±0.6	1.00	1.02	102.3±0.8

Como conclusión, podemos decir que los resultados obtenidos son en general satisfactorios. La cantidad media global recuperada respecto de las cantidades de los tres analitos presentes en los fármacos es 108.3% y la relativa a las cantidades adicionadas del 104.7 %.



CONCLUSIONES



1. Se ha desarrollado un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ácido salicílico, cafeína, clorhidrato de piridoxina, tiamina, codeína y paracetamol. El método tras ser validado, ha sido empleado como método de referencia para contrastar los resultados obtenidos en la aplicación de los métodos fluorimétricos propuestos en la presente Memoria a la determinación de ácido salicílico, clorhidrato de piridoxina y codeína.
2. Se ha llevado a cabo el estudio espectrofluorimétrico individual de los analitos, ácido salicílico, clorhidrato de piridoxina y codeína, habiéndose optimizado las condiciones instrumentales y los valores de las variables que influyen en la medida de la señal analítica: pH, concentración de disolución reguladora, fuerza iónica y temperatura de trabajo.
3. Se han desarrollado tres métodos espectrofluorimétricos para la resolución del sistema ácido salicílico y codeína por espectrofluorimetría (de emisión) convencional, sincrónica y sincrónica derivada. Los resultados encontrados indican que a los niveles de concentración ensayados, la señal de la codeína es dependiente de la del ácido salicílico, por lo que la resolución de la mezcla no puede llevarse a cabo de un modo satisfactorio, siendo preciso la separación previa de aquella para su determinación en presencia de ácido salicílico. En cambio en la determinación de ácido salicílico se tolera la presencia de codeína en relaciones de hasta 40 (método convencional) y 80 (métodos sincrónico y su 1ª derivada) veces respecto del ácido salicílico.
4. Se ha determinado ácido acetil salicílico y codeína en fármacos conteniendo estos dos principios activos, previa conversión completa del primero en ácido salicílico por hidrólisis alcalina. Dada la habitual alta relación ácido acetil salicílico/codeína en los fármacos, la determinación del primero puede llevarse a cabo en presencia de la codeína contenida en dichos fármacos, con resultados totalmente satisfactorios. En cuanto a la determinación de codeína exige su previa separación, que se llevó a cabo mediante la retención del ácido salicílico en una resina de intercambio aniónico. Ello obliga a establecer una nueva calibración en estas condiciones. Los resultados encontrados por este procedimiento son satisfactorios.
5. Se ha detectado la existencia de interacción entre los dos constituyentes del sistema ácido salicílico - codeína a la que puede atribuirse la falta de aditividad en las señales del sistema. Mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear esta interacción ha podido explicarse, en primera aproximación, por una interacción química ácido-base entre el grupo carboxílico del ácido salicílico y el N codeínico.

6. Se ha desarrollado un método para la resolución de la mezcla clorhidrato de piridoxina-codeína mediante la técnica de espectrofluorimetría (de emisión) de derivadas (1º orden) y se ha establecido la tolerancia de cada uno de los analitos en la determinación del otro.
7. El método anterior se ha aplicado a la determinación de estos compuestos en mezclas sintéticas y en fármacos con resultados satisfactorios. Asimismo se ha aplicado a fármacos semisintéticos y sintéticos con diferentes relaciones de concentración entre sus analitos, con buenos resultados.
8. También en este sistema se detecta la existencia de interacción entre sus constituyentes, que origina igualmente, una falta de aditividad en las señales analíticas y que parece afectar más intensamente a la determinación de codeína. La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear indica de nuevo interacción química ácido-base entre el H originario del clorhidrato de piridoxina y el N de la codeína.
9. Se ha desarrollado un método fluorimétrico para la resolución de la mezcla ternaria constituida por ácido salicílico, codeína y clorhidrato de piridoxina basado en regresión por mínimos cuadrados parciales (calibración multivariante) a partir de los espectros de emisión. El método muestra buenos coeficientes de regresión para los tres componentes y errores relativos de predicción (REP) inferiores al 5%.
10. El método anterior se ha validado mediante aplicación a muestras sintéticas constituidas por mezclas binarias y ternarias de los analitos, así como a muestras constituidas por uno solo de ellos. Los resultados en general, son muy aceptables.
11. Asimismo dicho método se ha aplicado a la determinación de estos analitos (previa hidrólisis alcalina en su caso para el ácido acetil salicílico) en diferentes fármacos, habiéndose hecho además un estudio de recuperación por adición de alguno(s) de los constituyentes no contenidos en los fármacos. Los resultados son satisfactorios.



BIBLIOGRAFÍA



1. **J.J. Aarón y J.D. Winefordner**, *Talanta*, **22**, 707(1975)
2. **R.J. Hurtubise**, in S.J. Schulman (ED.), *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and applications*, Part 2, J. Wiley, New York, Chap.1, (1984)
3. **T. Vo-Dinh**, *Room Temperature Phosforimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, (1984)
4. **R.J. Hurtubise**, *Anal. Chem.*, **61**, 889A, (1989)
5. **R.J. Hurtubise**, *Phosforimetry: Theory, Instrumentation and Applications*, VCH, New York, (1990)
6. **D. Rendell**, *Fluorescence y Phosphorescence*. John Wiley and SONS, 1987. London
7. **A. Fernandez Gutiérrez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz**, *Anal. Chim. Acta.*, **361**, 217(1998)
8. **E.M. Schulman y C. Walling**, *Science* **178**, 53(1972)
9. **D.J. Brown**, *J. Chem. Soc.* 1, 1974(1958)
10. **S.G. Schulman**, *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications*, Part 1, J. Wiley, New York 1985
11. **J. Lu y Z. Zhang**, *Analyst*, **10**, 120(1995)
12. **T. Kitade, K. Kitamura y Y. Wada**, *Anal. Chim. Acta*, **367**, 33(1998)
13. **A.D. Campiglia, A. Bethod y J.D. Winwfordner**, *Anal. Chim. Acta.*, **231**,289(1990)
14. **L.F. Capitán-Vallvey, M. Kalil Deheidel y R. Avidad**, *Ana. Lett.* (en prensa)
15. **L.F. Capitán-Vallvey, K.A. Mahmoud y R. Avidad**, *J.Anal. Chem.*, **362**,307(1998)
16. **L.F. Capitán-Vallvey, F.Ojeda, M.del Olmo, R.Avidad, A. Navalón y T.Vo-Dinh**, *Applied Spectroscopy*, **52**, 1,(1998)
17. **A. Einstein**, *Ann. Phys.*, **17**, 132(1905)
18. **J. Frank**, *Trans.Faraday Soc.*, **21**, 536(1926); **Condon**, *E.U., Phys. Res.*, 28, 1182 (1926); 32, 858(1928)
19. **A. Jablonski**, *Z. Phys.*, **94**, 38(1935)
20. **R.S. Becker**, *Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence*, Wiley Interscience, New York, 1969
21. **N. Mataga y T. Kubota**, *Molecular Interaction and Electric Spectra*, M. Dekker, New York 1970
22. **I.B. Berlman**, *Energy Transfer Paramters of Aromatic Compound*, Academic Press, New York 1973
23. **M. Zander**, *Fluorimetrie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg,New York 1981

24. **G. Schwedt**, Fluorimetrische Analyse, Methoden and Anwendungen, Verlage Chemie, Weinheim, Deerfiel Beach, Florida, Basel, 1981
25. **G.W. Robinson y R.P. Forsch**, J. Chem. Phys., **37**, 1962(1962); **38**, 1187(1963)
26. **M. Couterman**, J. Chem. Phys., **36**, 2846(1962)
27. **G.N. Lewis y M. Kasha**, J. Am. Chem. Soc., **66**, 2100(1944)
28. **G.G. Stokes**, Phil. Trans. R. Soc. London, **142**, 463(1852)
29. **M. Kasha**, Disc. Faraday Soc., **9**, 14(1950)
30. **B.L. Van Duuren**, Chem. Rev., **63**, 325(1963)
31. **E.J. Bowen**, J. Phys. Chem., **63**, 4(1959)
32. **W.R. Ware y B.A. Baldwin**, J. Chem. Phys., **43**, 1194(1965)
33. **S.G. Schulman**, Rev. Anal. Chem., **1**, 85(1971)
34. **C.A. Parker y W.T. Rees**, Analyst, **87**, 83(1962)
35. **W. Förster**, Naturwissenschaften., **23**, 220(1946)
36. **W. West**, in Chemical Applications of Spectroscopy (Techniques in Organic Chemistry, Vol. **9**, Wiley Interscience, New York, 1956
37. **D.M. Hercules**, Fluorescence and phosphorescence Analist-Principles and Applications, Wiley Interscience, New York, 1973
38. **E.L. Wehry y L.B. Rogers**, in ref., 21, pp. 81-99
39. **G. G. Guilbault**, Practical Fluorescence- Theory, Method and Thechniques, M. Dekker, New York, 1973
40. **H. Gotô**, J. Chem. Soc. Jpn. (Nippon Kagaku Zashi), **56**, 199(1938); Sci. Rept. Tohoku Univ., 1 Ser. **28**, 458(1940)
41. **M. Kasha**, Radiation Res. Supl., **2**, 243 (1960)
42. **A. Weller, W. Uraban**, Angew. Chem., **66**, 336 (1954)
43. **D.M. Hercules y B. Rogers**, Spectrochim. Acta, **15**, 393(1959)
44. **Z. Yoshida y R. Oda**, Mem. Faculty Eng. Kyoto Univ., **13**, 108(1951)
45. **J.R. Bensen y P.E. Hare**, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**, 619(1975)
46. **K. Samejima, W. Dairman y S. Udenfriend**, Anal. Biochem., **42**, 22(1972); Science, **178**, 871(1972)
47. **S. Stein, P. Böhlen y J. Stone**, Arch. Biochem.,Biophys., **155**, 203(1973)
48. **S. DeBernardo, M. Weigele y W. Toome**, Arch. Biochem. biophys., **163**, 390(1974)

49. **N. Ichinose, K. Nakamura y C. Shimizu**, *J. Chromatogr.*, **295**, 463(1984)
50. **N. Ichinose, K. Nakamura y C. Shimizu**, *Jpn. Soc. Anal. Chem. (Bunseki Kagaku)*, **33**, E271(1984)
51. **N. Nimura y T. Kinoshita**, *Anal. Lett.*, **13**, 191(1980); *Shimazu Science and Instruments News*, **24**, 9(1983)
52. **J.A.F. Silva y L. D'Arconte**, *J. Forensic Sci.*, **14**, 184(1969)
53. **D.W. Cornish, D. M. Crossman**, *Anal. Chem.*, **45**, 221R(1973)
54. **S. Fleury**, *Chim. Anal.*, **48**, 266(1966) French
55. **S.J. Mullé**, *J. Chromatog.*, **25**, 255(1971)
56. **D.J. Blackmore, A.S. Curry y T.S. Hayes**, *Clin. Chem.*, **17**, 896(1971)
57. **P. Froehlich**, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **12**, 83(1976)
58. **J.W.** *Methodol. Dev. Biochem.*, **5**, 25(1976)
59. **D.A. Terhaar y T.J. Porro**, "Fluorescence Spectrophotometry (for drug analysis)", JJ. Thoma, P.B. Nabdo y I. Sunshine (eds), *Guidel. Anal. Toxicol. Programs*, **2**, CRC 1977, P. 153 in *Chem. Abstr.*, **89**, 122786u(1978)
60. **S.G. Schulman y D.V. Navik**, *Drug fate Metab.* **2**, 195 (1978); in *Chem. Abstr.* **88**, 163523d (1978)
61. **E.L. Wehry**, *Anal. Chem.*, **52**, 75R(1980)
62. **S.G. Schulman y R.J. Sturgeon**, *Drugs Pharm. Sci.* **11**, 229(1981)
63. **J.B.F. Lloyd**, *Chem. Br.* **11**, 442(1975)
64. **E.P. Gibson**, *J. Forensic Sci.* **22**, 680(1977)
65. **S. Udenfriend y P. Zaltzman**, *Anal. Biochem.*, **3**, 49(1962)
66. **F.W.J. Teale y G. Weber**, *Biochem. J.*, **65**, 476(1957)
67. **D.G. Kaiser, W.F. Liggett y A.A. Forist**, *J. Pharm. Sci.*, **65** (1967)
68. **F. W. J. Teale y G. Weber**, *Biochem. J.*, **65**, 476(1957)
69. **P. M. Froehlich y M. Yeats**, *Anal. Chim. Acta*, **87**, 185(1976)
70. **W. Altekar**, *Biopolymers*, **16**, 341(1977)
71. **E. Hohaus**, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **310**, 70(1982)
72. **T. K. Hwang**, *Anal. Chim. Acta* **99**, 305(1978)
73. **R. Wintersteiger**, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **312**, 455(1982)
74. **A. DeLeenheer, J.E. Sinsheimer, y J.H. Brurckhalter**, *J. Pharm., Sci.*, **62**, 1370(1973)

75. **H. Nakamura**, *Anal. Chem.* **54**, 2482(1982)
76. **R.W. Frei**, *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Commun.*, **2**, 11(1979)
77. **U.A.T. Brinkman**, *Anal. Chem.-. Symp. Ser.*, **3**, 247(1980)
78. **S. Undefriend**, *Science*, **178**, 871(1972)
79. **M. Weigele**, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5927(1972)
80. **P.M. Froehlich y T.D. Cunningham**, *Anal. Chim. Acta*, **84**, 427(1976)
81. **J. Kusnir**, *Chem. Listy*, **71**, 1046(1977)
82. **J.V. Castell, M. Cervera y R. Marco**, *Anal Biochem.*, **99**, 379(1979)
83. **B.A. Tomkins, V.H. Ostrum y C. H. Ho**, *ANal. Lett.*, **13**, 589(1980)
84. **H.khalaf y M. Timpler**, *Hoppe-Seyler's Z. Phisiol. Chem.*, **358**, 505(1977)
85. **N. Seiler y M. Wiechmann**, *Z. Anal. Chem.*, **220**, 109(1966)
86. **B. Leonard y N.N. Osborne**, *Res Methods Nuerochem.*, **3**, 443(1975)
87. **P.L. Felgner y J.E. Wilson**, *Anal. Biochem.*, **80**, 601(1977)
88. **B. A. Davis**, *J. Chromatogr.*, **151**, 252(1978)
89. **N. Seiler, T. Schmidt-Glenewinkel y H. H. Schneider**, *J. Chromatogr.*, **84**, 95(1973)
90. **P.B. Ghosh y M.W. Whitehouse**, *Biochem. J.*, **108**, 155(1968)
91. **K. Samejima**, *Anal. Biochem.* **42**, 222(1971)
92. **N. Lusteenberger, H.W. Lange y K. Hempel**, *Angew. Chem.* **84**, 255(1972)
93. **G. Taslky y C. Gramsch**, *Z, Anal. Chem.*, **282**, 451(1976)
94. **S. Kirschenbaum y M.D. Glantz**, *Mikrochim. Acta*, **1**, 289(1976)
95. **J.T. Stewart y D.M. Lotti**, *Anbal. Chim. Acta*, **41**, 178(1968)
96. **M. Roth**, *Abnal. Chem.* **43**, 880(1971)
97. **M. Toth y A. Hampai**, *J. Chromatogr.*, **83**, 353(1973)
98. **S.S. Simons, Jr., D.F. Jhonson**, *Anal. Biochem.*, **82**, 250(1977)
99. **R. Hakanson, A.L. Roennberg y K. Sjoelund**, *Anal. Biochem.*, **59**, 98(1974)
100. **E. Méndez y J.G. Gavilanes**, *Anal. Biochem.*, **72**, 473(1976)
101. **G.J. Schmidt**, *Chromatogr., Newsl.*, **5**, 33(1977)
102. **J.A.F. DeSilva y N. Strojny**, *Anal. Chem.*, **47**, 714(1975)

103. **J.E. Sinsheimer**, J. Pharm. Sci., **57**, 1938(1968)
104. **L. Brand y J. R. Gohlke**, Ann. Rev. Biochem., **41**, 843(1972)
105. **V. R. Villanueva**, J. Chromatogr., **139**, 381(1977)
106. **G. Milano y col.**, Clin. Chem. Biochem., **18**, 157(1980)
107. **G. Schwedt**, Z, Anal. Chem., **287**, 152(1977)
108. **A. E. Ciarlone**, Microchem. J., **21**, 349(1976)
109. **A. E. Ciarlone**, Microchem. J., **23**, 9(1978)
110. **J. F. Lawrence y R. W. Frei.**, Anal. Chem., **44**, 2046(1972)
111. **R. J. Sturgeon y S. G. Schulman**, Anal., Chim., Acta, **75**, 225(1975)
112. **H. J. Klimisch y L. Stadler**, J., Chromatogr., **90**, 141(1974)
113. **H. J. Klimisch y L. Stadler**, J., Chromatogr., **90**, 223(1974)
114. **M. Maeda y T. Kinoshita y A. Tsuji**, Anal. Biochem., **38**, 121(1970)
115. **M. Maeda y A. Tsuji**, Anal. Biochem., **52**, 555(1973)
116. **J. L. Vilchez, G. Sánchez Palencia, R. Avidad, L.F. capitán-Vallvey y A. Navalón**, Mikrochim. Acta **110**, 61-69(1993)
117. **C. Gómez Bendito, J. Martínez Calatayud y T. García Sancho**, Analytica Chimica Acta, **279** (2), 293-298(1993)
118. **J.L. Vilchez, G. Sánchez Palencia, R. Avidad y A. Navalón**, J. Pharm. & Biom. Anal. **12**, No. 313-317(1994)
119. **J. Martínez Calatayud y C. Gómez Benito**, Anal. Chim. Acta, **245**, 101-107 (1991)
120. **F. García Sánchez, A.L. Ramos Rubio y C. Cruces Blanco**, Talanta, Vol. **37**, No 6, 579-584(1990)
121. **G.G. Guiltbault**, Practical Fluorescence-Theory, Methods and Techniques, M. Dekker, New York
122. **R.A. Chalmers y G.A. Wadds**, Analyst, **95**, 234(1970)
123. **M. Montagu-Bourin**, Planta Med., **38**, 50(1980)
124. **T. Gürkan**, Microchim. Acta, **1**, 173(1976)
125. **D. Naik**, Anal. Chim. Acta, **74**, 29(1975)
126. **S.M. Hassan**, J. Pharm. Belg., **38**, 305(1983)
127. **J. Hetherington**, J. Photochem., **20**, 367(1982)
128. **C.W. McLeod y T. S. West**, Analyst, **107** (1270), 1(1982)

129. **A.D. Thomas**, *Talanta*, **22**, 865(1974)
130. **N.V.R. Rao y S. N. Tandon**, *Anal. Lett.*, **311**, 477(1978)
131. **A. Szabo y E. M. Haracsony**, *J. Chromatogr.*, **193**, 500(1980)
132. **W.A. Wagins y W. H. Jennings**, *Discussions Faraday Soc.*, **27**, 180(1959)
133. **J.J. Aaron y J. D. Winefordner**, *Talanta*, **19**, 21(1972)
134. **S. Udenfriend**, *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1962
135. **D.E. Duggan**, *Biochem. Biophys.*, **68**, 7(1957)
136. **J. Kahan**, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **18**, 679(1966)
137. **B.D. Drujan**, *Anal. Biochem.*, **23**, 44(1968)
138. **J. Marks**, *The Vitamins in Health and Disease*, J. and A. Churchill Ltd., London, 1968, pp. 85
139. **J. Koziol**, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 41(1966)
140. **C. Ang y F.A. Mosely**, *J. Agr. Food chem.*, **28**, 483(1980)
141. **O.A. Bessey**, *J. Biol. Chem.*, **180**, 755(1949)
142. **G. Weber**, *Biochem. J.*, **47**, 114(1950)
143. **M.A. Ryan e J.D. Ingle, Jr.**, *Talanta*, **28**, 225(1981)
144. **J.M. Calatayud, C. Gómez Benito y D. Gaspar Martínez**, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 0(1990)
145. **D.B. Coursin y V.C. Brown**, *Proc. Soc. Expm. Biol. Med.*, **98**, 315(1958)
146. **J.W. Bridges, D. Davies y R.T. Willians**, *Biochem.*, **98**, 451(1966)
147. **R.F. Chen**, *Science*, **150**, 1593(1965)
148. **S. Udenfriend**, *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Vol. II, Academic Press, New York, 1969
149. **D.E. Duggan**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 116(1959)
150. **W.E. Ohnesorge y L. B. Rodgers**, *Anal. Chem.*, **28**, 1017(1956)
151. **K. Yagi**, *Vitamins (Kyoto)*, **9**, 391(1955)
152. **H.B. Burch**, *J. Biol. Chem.*, **198**, 477(1952)
153. **K.L. Muiruri**, *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 837(1974)
154. **O. Pelletier y R. Madere**, *Clin. Chem.*, **18**, 937(1972)
155. **B. Karlberg y S. Thelander**, *Anal. Chim. Acta*, **114**, 129(1980)

156. **J. V. Scudi**, *Science*, **103**, 567(1946)
157. **T. E. Friedemann y E. I. Frazier**, *Science*, **102**, 97(1945)
158. **J. W. Huff**, *Biol. Chem.*, **167**, 151(1947)
159. **H.B. Burch**, *J. Biol. Chem.*, **212**, 897(1955)
160. **M. J. Deustsch y C. E. Weeks**, *J. Assoc. Pffic. Agr. Chemists*, **48**, 1248 (1965)
161. **S. W. Jones**, *Am. Chem. Soc. (Abs. 138 th Meeting) New York Sept.*, 1960, p.60 c(1960)
162. **P. S. Chen**, *Anal. Biochem.*, **8**, 34(1964)
163. **O. Warburg, y W. Christian**, *Biochem. Z.*, **266**, 377(1933)
164. **K. Yagi**, *Bull. Soc. Chim., Fr.*, 1543(1957)
165. **W. Allfrey**, *J. Biol. Chem.*, **178**, 465(1949)
166. **J. Bramhall y A.Z. Britten**, *Clin. Chim. Acta* **68**, 203(1967)
167. **S. Kober**, *Biochem. Z.*, **239**, 209(1931)
168. **G. Z. Ittrich**, *Z. Physiol. Chem.* **312**, 1(1958)
169. **G. Z. Ittrich**, *Acta Endocrinol.*, **35**, 34(1960)
170. **L. Lee y R. Haehnel**, *Clin. Chem.*, **17**, 1194(1971)
171. **K.H. Outch**, *Clin. Chim. Acta*, **40**, 377(1972)
172. **R.W. Albers y O.H. Lowry**, *Anal. Chem.*, **27**, 1829(1955)
173. **D.B. McDougal, Jr. y H.S. Farmer**, *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 485(1957)
174. **G.J. Koval**, *J. Lipid Res.*, **2**, 419(1961)
175. **E.B. Solow y L. W. Freeman**, *Clin. Chem.*, **16**, 472(1970)
176. **J.C. Fruchart**, *Anal. Biol. Clin.*, **33**, 453(1975)
177. **K.W. Kohn**, *Anal. Chem.*, **33**, 862(1961)
178. **T.V. Alykora**, *Antibiotic (Moscow)* **17**, 353(1972) Russ; in *Chem. Abstr.* 77, 28708a(1972)
179. **D. Hall**, *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 4209(1976)
180. **R.G. Kally y K.D. Hogt**, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **7**, 152(1969)
181. **W.J. Jusko**, *J. Pharm. Sci.* **60**, 728(1971)
182. **K. Miyazaki, O. Ogino y T. Arita**, *Chem. Pharm. Bull(tokio)*, **22**, 1919(1974)
183. **R.H. Barbaiya, P. Turner y E. Shaw**, *Clin. Chim. Acta.* **77**, 373(1977)

184. **R.E. Jensen y R.T. Pflam**, *J. Pharm. Sci.* **53**, 835(1964)
185. **R. Onishi, K. Kawamura, K. Inone y T. Kobayashi**, *Yakugaku Zashi* **92**, 1101(1972) (Japón); in *Chem. Abstr.* 77, 156358y(1972)
186. **P. Pringshein**, *Fluorescencen and fosorescence*, Interscience, New York, 1949
187. **E. Nichols y H. Homes**, *Fluorescence of the Uranyl Salts*, Carnegie Institute, Washington, D.C. 1919
188. **E. Rabinowitch y R.L. Belford**, *Spectroscopy and Photochemistry of Uranyl Compounds*, Pergamon Press, Oxford, 1964
189. **F. Capitán, G. Sánchez Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán-Vallvey y J.L. Vilchez**, *Anal. Chem. Acta*, **259**, 345-353(1992)
190. **G. Urbain**, *Ann. Chim. Phys. (París)*, **18**, 222-289(1909)
191. **G. Urbain**, *Chem. Rev.* **1**, 143(1925)
192. **B.G. Wybourne**, *Spectroscopic Properties of Rare Earths*, Wiley-Interscience, New York, 1965
193. **H.M. Crosswhite y H.W. Moos**, *Optical Properties of Ions in Crystals*, Wiley-Interscience, New York, 1967
194. **G.H. Dieke**, *Spectra and Energie Levels of Rare earth Ions in Crystals*, Wiley-Interscience, New York, 1968
195. **G.E. Peterson**, *Trans. Met. Chem.*, **3**, 202(1966)
196. **F.S. Richardson**, *Chem. REv.*, **82**, 541(1982)
197. **C.A. Morrison y R.P. Leavit, K.A. Gschneider y Eyring**, Eds., *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Vol. 5, North-Holland, Amsterdam, 1982, Chap. 46
198. **A.K. Levine, y F.C. Palilla**, *Appl. Phys. Lett.*, **5**, 118(1964)
199. **L.H. Brixner y E. Abramson**, *Electrochem. Soc.*, **112**, 70(1965)
200. **K.A. Wickersheim y R.A. Lefever**, *J. Electrochem. Soc.*, **115**, 976(1968)
201. **A.E. Hardy**, *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED15**, 868(1968)
202. **W.W. Anderson, S. Razi y D.J. Walsh**, *J. Chem. Phys.*, **43** 1153(1965)
203. **W.W. Anderson**, *J. Chem. Phys.*, **44**, 3283(1966)
204. **H. Kasano, Megumi y H. Yamamoto**, *J. Electrochem. Soc.* **131**, 1953 (1984)
205. **T.E. Peters y J.A. Baglio**, *J. Electrochem. Soc.* **119**, 230(1972)
206. **J.E. Ralph**, *J. Phys. Chem. Solids*, **31**, 507(1970)
207. **D.J. Robbins, B. Cockayne, J.L. Glasper**, *J. Electrochem. Soc.*, **126**, 1556(1979)
208. **M.L. Keith y R. Roy**, *Am. Mineral.*, **39**, 1(1954)

209. **G. Blasse y A. Bril**, Philips Tech. Rev., **31**, 304, 314, 324(1970)
210. **K.H. Butler**, Fluorescent Lamp Phosphors, Pennsylvania State University Press, University Park, p., 1980
211. **W.L. Wanmaker, A. Bril, J.W. ter Vrugt y J. Broos**, Philips Res. Rep. **21.**, 270(1966)
212. **G. Blasse y A. Bril**, Philips Res. Rep. **22**, 481(1967)
213. **W.L. Wanmaker y J.W. Vrugt**, J. Electrochem. Soc., **112**, 1147(1965)
214. **H.J. Borchadt**, J. Chem. Phys., **42**, 3743(1965)
215. **G. Blasse**, J. Chem. Phys., **45**, 2356(1966)
216. **V. Abbruscato**, J. Electrochem. Soc., **118**, 930(1971)
217. **G. Blasse, W.L. Wanmaker, J.W. Vrugt y A. Bril**, Philips Res. Rep., **23**, 189 (1968)
218. **W.L. Wanmaker, y J.W. Vrugt**, Philips Res. Rep. **22**, 355(1967)
219. **W.L. Wanmaker y J.W. Vrugt**, Philips Res. Rep. **23**, 362(1968)
220. **M.V. Hoffman**, J. Electrochem. Soc., **115**, 590(1968)
221. **G. Blasse y A.J. Bril**, Chem. Phys., **45**, 2350(1966)
222. **J. Huang, L. Lories y P.J. Porcher**, Solid State Chem., **43**, 87 (1982)
223. **G. Blasse y S. Kemmler-Sack**, Ber Bunsenges. Phys. Chem., **87**, 352 (1983)
224. **M. Litter**, Farmacología Experimental y Clínica. 4a. Ed. El Ateneo, Buenos Aires
225. **T.A. Sollmann**, Manual of Pharmacology. 8th Ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1957
226. **R.T. Morrison y R.N. Boyd**, Química Orgánica. 3a. Ed. Trad. Cast. Fondo Educativo Interamericano S. A., Bogotá, 1976
227. **V.E. Tyler, L.R. Brady y J. Roblers**, J. E. Farmacognosia, 7a. Ed. trad. Cast. El Ateneo, Buenos Aires 1979
228. **T.C. Daniels y E.C. Jorgensen**, Physicochemical properties in relation to biological action. In Wilson C. O. Gisvold O. y Doerge R. F., Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 7th Ed. J. B. Lippicott Co., Philadelphia, 1977,4
229. **A.J. Clarck**, Applied Pharmacology, 7th Ed J & A. Churchill Ltd London 1942
230. **B.B. Brodie**, Physico-Chemical factors in drug absorption. In Binns, T. B. Absorption and Distribution of Drugs. E & S. Livingtone Ltd., London, 1964, 16
231. **A. Korolkovas** Essentials of Molecular Pharmacology. Wiley-Interscience, New York, 1970
232. **A. Goodman Gilman, T.W. Rall, F. Murad y L.S. Goodman**, "Las bases Farmacológicas de la Terapéutica", Ed. Médica Panamericana
233. **K.D. Rainsford**, Aust. J. Pharm., **56**, 374(1975)

234. **K.D. Rainsford, K. Brune y M.W. Whitehouse**, Agents and actions, (suppl.) **1**, 1-17(1976)
235. **M.J.H. Smith y P.K. Smith**, Eds. Salicylates. New York, Intersciences Publishers, 1966
236. **D.M. Woodbury y E. Fingl**, en "Las Bases Farmacológicas y Terapéuticas", L.S. Goodman y A. Gilman Eds. 5th ed. New York, Macmillan Co., 327(1975)
237. **K.D. Rainsford**, Aust. J. Pharm., **56**, 375(1975)
238. **E. Robiquet**, Ann. Chim. Phys., **51**, 225(1832)
239. **E. Robiquet**, Liebigs Ann. Chem., **5**, 82(1833)
240. **E. Grimaux**, C. R. Acad. Sci. (Paris), **92**, 1140(1881) y **93**, 67(1881)
241. **T.T. Chau-Pham**, Drug Metab. Rev., **7**, 255(1978)
242. **S.H. Snyder**, Sci. Am., **236**, 44(1977)
243. **S.H. Snyder**, Chem. Eng. News., **55**, 26(1977)
244. **E.J. Simon y J.M. Hiller**, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., **18**, 371(1978)
245. **J.C. Keresztesy y J.R. Stevens**, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **38**, 64(1938)
246. **S.Lepkovsky**, Science, **87**, 169(1938)
247. **R. Kuhn y G. Wendt**, Chem. Ber., **71**, 780(1938)
248. **P. Gyorgy**, J. Am. Chem. Soc., **60**, 938(1938)
249. **A. Ichiba y K. Michi**, Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res. (Tokio), **34**, 623(1938)
250. **A. Ichiba y K. Michi**, Chem. Abstr., **32**, 7534^g(1938)
251. **E.T. Stiller, J.C. Keresztesy y J.R. Stevens**, J. A. Chem. Soc., **61**, 12378(1939)
252. **D.B. McCormick y E.E. Snell**, J. Biol. Chem., **236**, 2085(1961)
253. **J.F. Rinehart y L.D. Greenberg**, Am. J. Path., **25**, 481(1949)
254. **J.F. Rinehart y L.D. Greenberg**, Arch. Path., **51**, 12(1951)
255. **H.A. Schroeder**, J. Chrom. Dis., **2**, **28**(1955)
256. **W.O. Foye**, Principios de Química Farmacéutica, Vol. I y II, Ed. Reverté 1984
257. **K.S. You y J.A. Bittikofer**, Clin. Chem., **30** 1549(1984)
258. **R.W. Longenecker, J.E. Trafton y R.B. Edwards**, Clin. Chem., **30**, 1369(1984)
259. **K.S. You**, Clin. Chim. Acta, **149**, 281(1985)
260. **M.A.N. Rahni, G.G. Guilbaut y G.N. Oliveira**, Anal. Chim. Acta, **181**, 219(1986)
261. **T. Fonong y G.A. Rechnitz**, Anal. Chim. Acta, **158**, 357(1984)

262. **S.A.P. Chubb, R.S. Capbell, J.R. Ramsay, P.M. Hammond, T. Atkinson y C.P. Price**, Clin. Chim. Acta, **155**, 209(1986)
263. **J.E. Frew, S.W. Bayliff, P.N.B. Gibbs y M.J. Green**, Anal. Chim. Acta, **224**, 39(1989)
264. **Y. Goto, K. Makino, Y. Kataoka, M. Shuto y R. Oishi**, J. of Chromatography B. **706**, 2,(1998)
265. **M. Neumayr, O. Friedrich y G. Sontag**, Anal. Chim. Acta, **273**, 469-475(1993)
266. **D. Evans, J.P. Hart y G. Rees**, Analyst, **116**, 8(1991)
267. **K.K. Choi y K.W. Fung**, Anal. Chim. Acta, **138**(1982)
268. **N.A. Chaniotakis, S.B. Park y M.E. Meyerhoff**, Anal. Chem., **61**, 566(1989)
269. **H. James, G. Carmack y H. Freiser**, Anal. Chem., **44**, 856(1972)
270. **S.M. Hassan y M.A. Hamada**, Analyst, **113**, 1709(1988)
271. **D. Midgley**, Anal. Chim. Acta, **182**, 91(1986)
272. **Q. Chang y M.E. Meyerhoff**, Anal. Chim. Acta, **186**, 81(1986)
273. **B.W. Glombitza y P.C. Schmidt**, J. of Pharm. Sci., **83**, 5, 751-757(1994)
274. **A. Ruíz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz**, P329, 6th SAS, Valencia(1998)
275. **Yi-Bin Qu**, Talanta, **38**,9, 1061-1066(1991)
276. **S. Torrado y R. Cardoniga**, J. Pharm. Technol. Anal., **12**, 3, 383-387(1994)
277. **P. Trinder**, Biochem. J., **57**, 301-303(1954)
278. **U. Sha y K. Naski**, Analyst, **110**, 739(1985)
279. **V. Cotty, F. Zurzola, T. Beezley y A. Rodgers**, J. Pharm. Sci., **54**, 868-870(1965)
280. **T.E. Weichselbaum y I. Shapiro**, Am. J. Clin. Path, **15**, (Tech. suppl.9) 42-44(1945)
281. **S.M.K. Mallick y A. Rehmann**, A. Ann. Biochem. Exp.Med., **5**, 97-100(1945)
282. **W.E. Jhul y R.D. Kirchhoefer**, J. Pharm. Sci., **69**, 544-548(1980)
283. **H. Kubin y H. Gänshirt**, Pharm. Ind., **38**, 224-227(1976)
284. **J. Levine y J.D. Weber**, J. Pharm. Sci., **57**, 631-633(1968)
285. **W.B. Chapman y A.J. Harrison**, J. Assoc. Public Anal., **1**, 64-67(1963)
286. **L.T.H.Fernández y F.H. Klappmeier**, J. Chem. Educ., **55**, 266(1978)
287. **L.J. Edwards**, Trans faraday Soc., **46**, 723-735(1950)
288. **H. Sattler**, Phram. Ztg., **111**, 1395-1405(1966)
289. **R.B. Tinker y A.J. McBay**, Am. Pharm. Assoc. Sci., **43**, 315-317(1954)

290. **M.A. Sotolongo**, Rev. Cubana Farm., **21**, 5-18(1987)
291. **N.A. Shane y J. Routh**, Anal. Chem., **39**, 414(1967)
292. **A.W. Clayton y R.E. Thiers**, J. Pharm. Sci. **55**, 404-407(1966)
293. **R.C. Reed y W.W. Davis**, J. Pharm. Sci. **54**, 1533-1534(1965)
294. **E. Cid, A. Dresse y Fr. Jaminet**, Pharm. Acta. Helv., **46**, 377-382(1971)
295. **B.B. Brodie, S. Undefriend y A.F. Colurn**, Pharm. Exptl. Therap., **80**, 114(1944)
296. **D.G. Moss**, Clin. Pathol., **5**, 208-211(1952)
297. **M. Volterra y M.D. Jacobs**, J. Lab. Clin. Med., **32**, 1282-1284(1947)
298. **D.G. Konstantianos P.C. Ioannou y C.E. Efstathiou.**, Analyst **116**, 373-378(1991)
299. **G. Puglisi, A. Villari, N. Micali y M. Fresta**, Analyst **119**, 1561-1565(1994)
300. **J.A. Murillo Pulgarín y A. Alañón Molina**, Microchem. J. **52**, 341-349(1995)
301. **J.A. Murillo Pulgarín y A. Alañón Molina**, Anal. Chem. Acta **319**, 361-368(1996)
302. **D.G. Konstantianos y P.C. Ioannou.**, Analyst, **121**, 909-912(1996)
303. **J.A. Murillo Pulgarín y A. Alañón Molina**, Analyst, **119**, 1915-1919(1994)
304. **P. Damiani, M.E. Ribone, G. Ibañez y A.C. Olivieri**, Analyst, **120**, 2, 443-445(1995)
305. **L. Bruzzone**, Microchem. J., **58**, 1, 52-57(1998)
306. **G.H. Schenk, F.H. Boyer, C.I. Miles y D.R. Wirz**, Anal. Chem. **44**, 1593(1972)
307. **N. Shane y D. Miele**, J. Pharm. Sci. **59**, 397(1970)
308. **K.W. Street, Jr., y G.H. Schenk**, J. Pharm. Sci. **70**, 641(1981)
309. **A. Villari, N. Micali, M.Fresta y G. Puglisi**, J. Phram. Sci., **81**, 895(1992)
310. **P.Damiani, M.E. Ribone G. Ibañez y A.C. Olivieri**, Analyst, **120**, 443-445(1995)
311. **Y.X. Zhu, S.X. Li, X.Y. Zhang, Y. Zhang, Y.X. Xu y X.Z. Huang**, Fenxi Kexue Xuebao, **11**, 29-32(1995)
312. **A.M. de la Peña, F. Salinas y I.D. Merás**, Anal. Chem., **60**, 2493(1988)
313. **G. Graham y M. Rowland**, J. Pharm. Sci., **61**, 1229(1972)
314. **M. Kleinerman**, Anal. Lett., **10**, 205(1977)
315. **C.I. Miles y G.H Schenk**, Anal. Chem., **42**, 656-659(1970)
316. **T. Shibazaki, T. Nishimura, M Hara y T. Iijima**, Chem. Phram.Bull., 26, 1737-1745(1978)

317. **D.J. Ager, K.S. Alexander, A.S. Batti, J.S. Blackburn, D. Dollimore, T.S. Koogan, K.A. Mooseman, G.M. Muhvic, B. Sims y V. Webb**, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 97-101(1986)
318. **M.C. Ricari, S.J.M. Monge, P.J.A. de Ciriza y F. Marcotegui**, *Rev. Asoc. Esp. Farm. Hosp.*, **6**, 57-62(1982)
319. **F. Marcotegui y J.M. Sánchez Monge**, *Rev. Asoc. Esp. Farm. Hosp.*, **5**, 5-10(1981)
320. **D.C. Monkhouse y J.L. Lach**, *can J. Pharm. Sci.*, **7**, 29-46(1972)
321. **W.B. Meier**, Dissertation; Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, 1977
322. **C.L. Keegan, F. Ungemach, J. Simpson y M. Aden**, *Clin. Chem.*, **31**, 942(1985)
323. **L. Hendeles y C. Edwards**, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **13**, 131(1988)
324. **F.J. Welcher**, *Standard Methods of Chemical Analysis*, Vol.(II), Part A, Krieger.
325. **E.M. Elnenma y M.A. Hamada**, *Mikrochim.*, **126**, 1-2 147-151(1996)
326. **M. Abdel-Hady Elsayed, S.F. Belal, M. Abdel-Fattah y E. Hassan Abdine**, *Analyst*, **104**, 620-625(1979)
327. **T. J. Christie, R. H. Hanway, D. A. Paulls y A. Townshend**, *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, **32**, 91-93(1995)
328. **G.M. Greenway, A.W. Knight y P. Knight**, *Analyst* **120**, 2549-2552(1995)
329. **N.W. Barnett, T.A. Boswer, R.D. Gerardi y B. Smith**, *Anal. Chim. Acta*, **318**, 309-317(1996)
330. **A.Stergios, M. Meropi y C.E. Efstathiou**, *Talanta*, **40**,8, 1213-1220(1993)
331. **M. Surmeian**, *Revue Romain de Chimie*, **39**, 5, 497-501(1994)
332. **M.J. Ayora Cañada**. Tesis Doctoral, Univ. de Jaén 1998
333. **A.A. Alwarthan y A.A. Aly-FA**, *Talanta*, **45**,6, 1131-1138(1998)
334. **A. Ruíz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz**, *Fresenius, J. Anal. Chem.* (en prensa)
335. **J.E. Churchich**, *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 280(1965)
336. **J.E. Churchich**, in *Modern Fluorescence Spectroscopy*, vol.2E.L., Whery(ed.), Plenum Press, New York, 1967, p.217
337. **J.E. Churchich**, *J. Biol. Chem.* **247**, 6953(1972) and ref. therein on former work.
338. **Y.V. Morozov y L.P. Cherkashina**, *Mol. Photochem.*, **8**, 45(1977)
339. **J.F. Gregory y J.R. Kirk**, *J. Food Sci.*, **42**, 1073(1977)
340. **A. Savitzky y M. Golay**, *Anal. Chem.*, **36**, 1627(1964)
341. **R. Boqué y F.X. Rius**, *Avances en Quimiometría práctica*, Capítulo 4, Universidad de Santiago de Compostela, Servicio Public e Intercambio Científico (1994)

342. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119(1994)
343. IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectrochim. Acta B*, **33**, 242(1978)
344. **D.M. Haaland y R.G. Easerling**, *Applied Spectroscopy*, **36**, 665(1982)
345. **P.H. Garthwhite**, *J. of the American Statistical Association*, **89**, 122(1994)
346. **S. Wold, A. Ruhe, H. Wold y W. Dunn**, *J. Sci. Stat. Comput.*, **5**, 735(1984)
347. **M. Otto y W. Wegscheider**, *Anal. Chem.* **57**, 63(1985)
348. **P. Geladi y B.R. Kowalski**, *Anal. Chim. Acta.*, **185**, 1(1986)
349. **H. Wold**, *Research Paper in Statistics*, David F., Ed. Wiley, New York, London (1966)
350. **M. Otto y W. Wolford**, *Anal. Chem.* **57**, 63(1985)
351. **R.D. Bautista, F. Jiménez, A.I. Jiménez y J.J. Arias**, *Talanta*, **40**, 1687(1993)
352. **D.M. Haaland y D.V. Thomas**, *Anal. Chem.*, **60**, 1193(1988)
353. **R. Leardi, E. Onnoe y D. Noord**, *Anal. Chem.*, **60**, 1193(1988)
354. **K.K. Verma, D. Gupta, A. Janin y S.K. Sanghi**, *J. of Pharm. Sci.*, **76**, No.7(1987)
355. **F. Kees, D. Jehnich y H. Grobecker**, *J. Of Chromatogr. B*, **677**, 172-177(1996)
356. **D.P. Venema, P.C.H. Hollman, K. Jousen y M.B. Katan**, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1762-1767(1996)
357. **R. Pirola, S.R. Bareggi y G. Debeneditis**, *J. of Chromatography*, **Vol. 705**,2, 309-315(1998)
358. **A.J. Cummings, M.L. King**, *Nature*, **209**, 620-623(1966)
359. **J.C. Morrison, J.M. Orr**, *Pharm. Sci.*, **55**, 936-941(1966)
360. **L.J. Walter. D.F. Biggs y R.T. Coutts**, *J. Pharm. Sci.*, **63**,1754-1758(1974)
361. **J.G. Nikelly**, *Anal. Chem.*, **36**, 2248-2250(1964)
362. **E.B. Dechene. L.H. Booth y J.J. Windheuser**, *J. Pharm.,. Sci.*, **21**, 678-680(1969)
363. **S. Patel, J.H. Perrin y J.J. Windheuser**, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1794-17976(1972)
364. **R.N. Galante, J.C. Egovalle, A.J. Visalli y D.M. Patel**, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 167-169(1981)
365. **R.L. Stevenson y C.A. Burtis**, *J. Chromatogr.*, **61**, 253-261(1971)
366. **R.G. Baum y F.F. Cantwell**, *J. Pharm. Sci.* **67**, 1066-1069(1978)
367. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Ed. Kenneth Helrich, 15th, USA 1990, *JAOAC* 50, 666(1967)
368. **I.N. Papadoyannis y B. Caddy**, *Microchem. J.* **36**, 182-191(1987)
369. **K.L. Crump, I. M. McIntyre y O.H. Drummer**, *J. of Analytical Toxicology*, **18**, 208-212(1994)

370. **G. Santoni, L. Fabbri, P. Gratter, G. Renzi y S. Pinzauti**, International J. of Pharm., **80** 263-266(1992)
371. **M.E. El-Koommos y K. M. Emara**, Talanta, **36**, 678-679(1989)
372. **S.H. Atwell, R. G. Bell y R. Vyas**, Pharmacopeial Forum, **Vol. 18**, No.4, 3735-3745(1992)
373. **P.C.H. Hollman y J.S. Slangen**, Analyst. **118**, 481-488(1993)
374. **T.S. Agostini y H.T. Godoy**, HRC J. of High resolution Chromatography, **20**, 245-248(1997)
375. **M. Amin y J. Reusch**, J. of Chromatography, **390**, 448-453(1987)
376. **Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, Z.H. Naka y T. Masui**, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **Vol.72**, No. 2, 244-247(1989)
377. **C.W. Chase, W.O. Landem, A.G.M. Soliman y R.R. Eitenmiller**, J. of AOAC International, **76**, 1276-1280(1993)
378. **G.W. Chase, W.O. Landen, R.R. Eitenmiller y A.G.M. Soliman**, J. of AOAC Interantiuonal, **75**, No.3, 561-565(1992)
379. **L. Gámiz García y M.D. de Castro**, J. of Liquid Chromatography & Related Technologic, **Vol.20**, 13, 2123-2133(1997)
380. **S. Albala Hurtado, M. T. Veciana Nogues, M. Izquierdo Pulido y A. Marine ont**, J. of Cromatography, **Vol.778**, 1-2, 247-257(1997)
381. **L. Cuadros, A. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba**, Anal. Lett., **26**, 1243(1993)
382. **J.C. Miller y J.N. Miller**, "Estadística para Química Analítica", 2ª Ed. Addison-Wesly Iberoamericana, S. A. Wilmigtonn, Delaware, 1993
383. **Pretsch, Clerc, Seibl y Simon**, Tables of Spectral Data for Structure Determiation of Organic Compounds, W. Fresenius, J.F.K. Huber, E. Pungor, G.A. Rechnitz, W. Simoin y Th.S. West (eds),2th Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1989.
384. **A. Muñoz de la Peña, M.D. Moreno, I. Durán-Merás y F. Salinas**, Talanta, **43**, 1349-1349(1996)
385. **R.D. Bautista Jiménez, A.J. Alizanda, F.J. MOreno y J.J. León**, Cli. Chim. Acta, **249** 21-36(1996)
386. **A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, M.D. Moreno, F. Salinas y M. Martínez Galera**, Fresenius, J. Anal. Chem. **351**, 571-576(1995)
387. **R.D. Bautista, A.I. Jiménez, F. Jiménez y J.J. Arias**, Fresenius J. Anal. Chem. **357**, 449-456(1997)
388. **W. Wei, L. Nie y S. Yao**, Anal. Chim. Acta, **263**, 77-83(1992)
389. **R.D. Bautista, A.I. Jiménez, F. Jiménez y J.J. Arias**, J. of Pharm. and Biom. Analysis, **15**, 183-192(1996)
390. **R.D. Bautista, A.I. Jiménez, F. Jiménez y J.J. Arias**, Anal. Lett., **29(15)**, 2645-2665(1996)