



UNIVERSIDAD DE JAÉN

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

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS CONTRIBUCIONES AL
ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO
CONTINUO CON DETECCIÓN
ESPECTROSCÓPICA EN FASE SÓLIDA**

**PRESENTADA POR:
ANTONIO RUIZ MEDINA**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ
DRA. D^a MARÍA LUISA FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA**

JAÉN, 25 DE MARZO DE 1999

ISBN 84-8439-011-X



**NUEVAS CONTRIBUCIONES AL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO
CONTINUO CON DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA EN FASE SÓLIDA**

Ruiz Medina

Antonio

I.S.B.N 84-8439-011-X

Centro Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento Química Física y Analítica





Nombre y apellidos del autor

Apellidos **RUIZ MEDINA**

Nombre **ANTONIO**

Título de la Tesis Doctoral

**NUEVAS CONTRIBUCIONES AL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN
FLUJO CONTINUO CON DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA EN
FASE SÓLIDA**

Fecha de lectura

25 DE MARZO DE 1999

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

Centro **Facultad de Ciencias Experimentales**

Departamento **Química Física y Analítica**

Composición del Tribunal / Dirección de la tesis

Dirección de la Tesis **Dr. D. Antonio Molina Díaz y Dra. D^a M^a Luisa Fernández de Córdova**

Presidente/a del Tribunal **Dra. D^a Concepción Sánchez Pedreño**

Vocales

Dr. D. José Vilchez Quero

Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey

Dr. D. José Luis Gómez Ariza

Secretario/a **Dra. D^a Rosario Escobar Godoy**

Calificación obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Resumen

Con la presente Memoria se ha pretendido contribuir al desarrollo de nuevos sensores espectroscópicos en flujo continuo no segmentado, basados en la integración de la retención del analito mismo, sin previas reacciones de derivación, con la detección directa de una propiedad intrínseca del mismo: absorción o emisión molecular. En todos los casos se hace uso de un soporte sólido que permite la preconcentración y retención selectiva del/os analito/s de interés en la propia zona de detección.

Los sensores que se proponen van dirigidos a la determinación automática de especies de interés farmacológico, y su aplicación al control analítico de rutina en fármacos. Todos ellos se aplicarán a un elevado número de productos farmacéuticos.

Los sensores desarrollados se pueden agrupar en tres tipos, según el número de analitos que nos permiten determinar. Se ha abordado el estudio de seis sensores monoparámetro, para el análisis de: ácido ascórbico, minoxidil, ácido salicílico (y determinación indirecta de ácido acetil salicílico), amoxicilina, epinefrina, y piridoxina. En los cinco primeros, la determinación estará basada en la monitorización de sus absorbancias intrínsecas, en la zona UV, cuando las especies son retenidas sobre un cambiador aniónico ubicado en el interior de la célula de flujo (excepto el minoxidil, que hace uso de un cambiador catiónico); mientras que la piridoxina, retenida sobre un cambiador catiónico, se determinará en base a su fluorescencia nativa.

También se abordará el estudio de tres sensores biparámetro que permiten, respectivamente, la determinación secuencial de mezclas binarias de los analitos: salicilamida-paracetamol; ácido ascórbico-paracetamol; y ácido salicílico-salicilamida. Los dos primeros sensores utilizarán detección

fotométrica, mientras que el último usará detección fluorimétrica. En los tres casos se empleará como fase sólida un cambiador aniónico (Sephadex QAE A-25).

Por último, se desarrollará un multisensor que permite la determinación simultánea de cafeína, paracetamol y ácido acetil salicílico. En este caso se registrarán los espectros de absorción de la mezcla una vez que los componentes hayan sido retenidos sobre gel de sílice C18. Esta mezcla ternaria se resolverá por calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales.



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Química Física y Analítica

ISBN: 84-8439-011-X

**NUEVAS CONTRIBUCIONES AL ANÁLISIS
POR INYECCIÓN EN FLUJO CONTINUO
CON DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA
EN FASE SÓLIDA**

Tesis Doctoral presentada por:
Antonio Ruiz Medina
Jaén, 1999

**NUEVAS CONTRIBUCIONES AL ANÁLISIS POR
INYECCIÓN EN FLUJO CONTINUO CON DETECCIÓN
ESPECTROSCÓPICA EN FASE SÓLIDA**

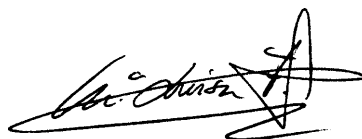
Visado en Jaén, Febrero de 1999

Los Directores:



Fr: Dr. Antonio Molina Díaz

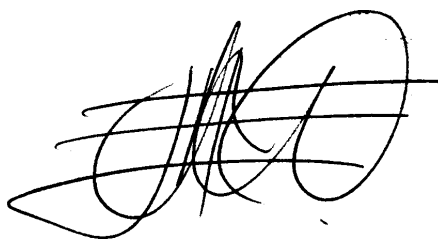
(Profesor Titular Unir. Jaén)



Fr: Dra. Mª L. Fernández de Córdoba

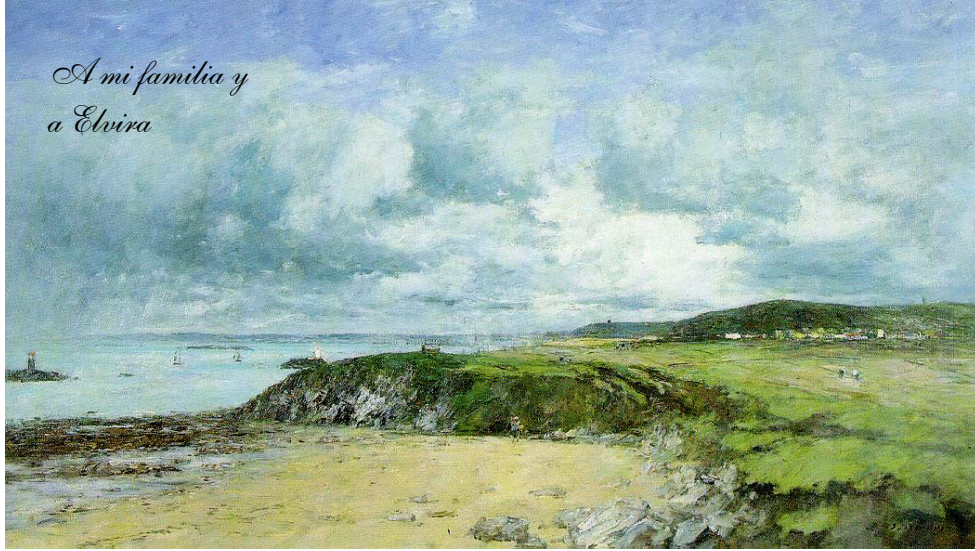
(Profesora Asociada Unir. Jaén)

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



Fr: Antonio Ruiz Medina

*A mi familia y
a Elvira*



*Lo que importa en la vida
no son los objetivos que nos marcamos,
sino los caminos que seguimos
para lograrlo.
(P. Bamm)*

En primer lugar quisiera mostrar mi agradecimiento a los Dres. D. Antonio Molina Díaz y D^a M^a Luisa Fernández de Córdoba, directores de esta Memoria. Con su ayuda incondicional han contribuido a mi formación como investigador, poniendo a mi disposición todos los medios materiales y humanos para llevar a buen término esta Tesis Doctoral, y sobre todo, por su apoyo sin reservas.

A D. Manuel Fernández Gómez, director del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén, y a D^a M^a Isabel Pascual Reguera, Prof. Titular de Química Analítica de dicha Universidad, por su constante buena disposición y su ayuda desinteresada en todo momento.

A Pilar Ortega y María José Ayora, por ayudarme en todos los problemas laborales del día a día que surgen en el laboratorio. Además de compañeras son amigas. No puedo olvidar tampoco a Juana Escudero y Natividad Ramos, por su confianza, amistad y muestras de apoyo en todo momento.

Al resto de compañeros del Departamento, por sus ánimos y esos otros buenos ratos, y a Alberto Moya, por darle a este trabajo un toque de color.

A la Junta de Andalucía por la concesión de una beca de investigación que ha permitido la realización de este trabajo, y a la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, donde se ha llevado a cabo.

Mi más sincero agradecimiento a mis padres y hermanas, a Elvira, así como a todos mis amigos, por creer en mí y ser mi punto de apoyo.

A todos, gracias.



ÍNDICE



OBJETO DEL TRABAJO	1
---------------------------------	---

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. Técnicas más empleadas en determinación de fármacos	7
2. Análisis por inyección en flujo (FIA)	8
3. Sistemas de detección en FIA	9
4. Características de los métodos FIA	10
5. Análisis de fármacos, utilizando FIA con detección fotométrica UV-Vis o fluorimétrica, en disolución	22
6. Espectroscopía en fase sólida. Metodología Batch	26
7. Sensores. Clasificación	27
8. Bibliografía	40

SENSORES ESPECTROFOTOMÉTRICOS EN FLUJO EN FASE SÓLIDA

CAPÍTULO II. SENSORES MONOPARÁMETRO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO, MINOXIDIL Y ÁCIDO SALICÍLICO

1. Introducción	49
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	56
3. Espectros de absorción en solución acuosa y fase sólida	57
4. Configuración FIA	61
5. Estudio de las variables experimentales	63
6. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos	74
7. Interferencias	79
8. Aplicaciones analíticas	83
9. Ácido acetil salicílico	100
10. Bibliografía	106

CAPÍTULO III. SENSORES MONOPARÁMETRO PARA AMOXICILINA Y EPINEFRINA

1. Introducción	111
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	116
3. Espectros de absorción en solución acuosa y fase sólida	117
4. Configuración FIA	119
5. Estudio de las variables experimentales	121
6. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos	130
7. Interferencias	133
8. Aplicaciones analíticas	135
9. Bibliografía	142

CAPÍTULO IV. SENSOR BIPARÁMETRO PARA SALICILAMIDA Y PARACETAMOL

1. Introducción	147
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	150
3. Espectros de absorción en solución acuosa y fase sólida	151
4. Configuración FIA	153
5. Estudio de las variables experimentales	156
6. Calibración del sensor. Parámetros analíticos	163
7. Interferencias	167
8. Aplicaciones analíticas	168
9. Bibliografía	174

CAPÍTULO V. SENSOR BIPARÁMETRO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO Y PARACETAMOL

1. Introducción	177
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	178
3. Espectros de absorción en solución acuosa y fase sólida	179
4. Configuración FIA	181
5. Estudio de las variables experimentales	182
6. Calibración del sensor. Parámetros analíticos	189

7. Interferencias	192
8. Aplicaciones analíticas	195
9. Bibliografía	202

CAPÍTULO VI. MULTISENSOR PARA CAFEÍNA, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y PARACETAMOL

1. Introducción	205
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	210
3. Espectros en disolución de cafeína, ácido acetil salicílico y paracetamol	211
4. Configuración FIA	212
5. Estudio de las variables experimentales	212
6. Funciones de calibración de los componentes individuales	220
7. Resolución de la mezcla mediante regresión por mínimos cuadrados	222
8. Determinación simultánea de cafeína, ácido acetil salicílico y paracetamol en mezclas sintéticas	232
9. Determinación simultánea de cafeína, ácido acetil salicílico y paracetamol en preparaciones farmacéuticas	234
10. Bibliografía	237

SENSORES ESPECTROFLUORIMÉTRICOS EN FLUJO EN FASE SÓLIDA

CAPÍTULO VII. SENSOR MONOPARÁMETRO PARA PIRIDOXINA

1. Introducción	243
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	246
3. Espectros de excitación y emisión en solución acuosa y fase sólida	247
4. Configuración FIA	252
5. Estudio de las variables experimentales	253
6. Calibración del sensor. Parámetros analíticos	262
7. Interferencias	264
8. Aplicaciones analíticas	266
9. Bibliografía	270

CAPÍTULO VIII. SENSOR BIPARÁMETRO PARA ÁCIDO SALICÍLICO Y SALICILAMIDA

1. Introducción	273
2. Disoluciones e instrumentación utilizadas	274
3. Espectros de excitación y emisión en solución acuosa y fase sólida	275
4. Configuración FIA	280
5. Estudio de las variables experimentales	282
6. Calibración del sensor. Parámetros analíticos	291
7. Interferencias	294
8. Aplicaciones analíticas	296
9. Bibliografía	301
CONCLUSIONES GENERALES	303
APÉNDICE	307
CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS QUE FORMAN PARTE DE ESTA TESIS DOCTORAL	337



OBJETO DEL TRABAJO



Con la presente Memoria se ha pretendido contribuir al desarrollo de nuevos sensores espectroscópicos en flujo continuo no segmentado, basados en la integración de la retención del analito mismo, sin previas reacciones de derivación, con la detección directa de una propiedad intrínseca del mismo: absorción o emisión molecular. En todos los casos se hace uso de un soporte sólido que permite la preconcentración y retención selectiva del/os analito/s de interés en la propia zona de detección.

Los sensores que se proponen van dirigidos a la determinación automática de especies de interés farmacológico, y su aplicación al control analítico de rutina en fármacos. Todos ellos se aplicarán a un elevado número de productos farmacéuticos.

Los sensores desarrollados se pueden agrupar en tres tipos, según el número de analitos que nos permiten determinar. Se ha abordado el estudio de seis sensores monoparámetro, para el análisis de: ácido ascórbico, minoxidil, ácido salicílico (y determinación indirecta de ácido acetil salicílico), amoxicilina, epinefrina, y piridoxina. En los cinco primeros, la determinación estará basada en la monitorización de sus absorbancias intrínsecas, en la zona UV, cuando las especies son retenidas sobre un cambiador aniónico ubicado en el interior de la célula de flujo (excepto el minoxidil, que hace uso de un cambiador catiónico); mientras que la piridoxina, retenida sobre un cambiador catiónico, se determinará en base a su fluorescencia nativa.

También se abordará el estudio de tres sensores biparámetro que permiten, respectivamente, la determinación secuencial de mezclas binarias de los analitos: salicilamida-paracetamol; ácido ascórbico-paracetamol; y ácido salicílico-salicilamida. Los dos primeros sensores utilizarán detección fotométrica, mientras que el último usará detección fluorimétrica. En los tres casos se empleará como fase sólida un cambiador aniónico (Sephadex QAE A-25).

Por último, se desarrollará un multisensor que permite la determinación simultánea de cafeína, paracetamol y ácido acetil salicílico. En este caso se registrarán los espectros de absorción de la mezcla una vez que los componentes hayan sido retenidos sobre gel de sílice C₁₈. Esta mezcla ternaria se resolverá por calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



I. TÉCNICAS MÁS EMPLEADAS EN DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS

La investigación de fármacos nuevos se ha convertido en un proceso cada vez más complicado y costoso. Por otra parte, los nuevos métodos analíticos se desarrollan para mejorar la exactitud y precisión de los ya existentes, para su automatización, para reducir el costo de reactivos y mano de obra, o para la determinación de una nueva variable analítica.

Existen muchos tipos diferentes de investigaciones cualitativas y cuantitativas de fármacos, cada una desarrollada teniendo en cuenta los intereses particulares del laboratorio, sus recursos y la experiencia de su personal. A continuación se comentan las más utilizadas en estos últimos años.

En general, las técnicas espectro fotométricas UV-Visible [1-3] y espectrofluorimétricas [4-6] son las más utilizadas en la determinación cuantitativa de fármacos. El análisis ultravioleta se emplea normalmente en pruebas para un fármaco específico o confirmación de compuestos detectados por otras técnicas. Sin embargo, posee relativamente escasa especificidad, a menos que el compuesto desconocido sea aislado por otras técnicas, como cromatografía en capa fina o extraído mediante métodos que reduzcan las interferencias espectrales de otros constituyentes presentes. Otro modo de aumentar la especificidad tanto del análisis UV-Visible como del fluorimétrico, podría conseguirse con el uso de un soporte sólido que permitiese la retención del analito de interés, incrementándose de este modo la selectividad y sensibilidad del método propuesto. Esta metodología es la que trataremos de desarrollar en esta Memoria.

Las técnicas de inmunoanálisis de multiplicación enzimática (EMIT) ofrecen equipos comerciales para drogas individuales o clases de drogas [4]. Igualmente, las técnicas de radioinmunoanálisis proveen al analista ensayos comercialmente disponibles para un número seleccionado de drogas individuales. La sensibilidad de estas pruebas es excelente, en ambos casos, permitiendo la detección de concentraciones muy bajas.

La cromatografía en capa fina es una excelente técnica de detección empleada tanto en grandes laboratorios como en los de capacidad más limitada. El método no requiere instrumental y es relativamente económico. Sus ventajas adicionales incluyen la flexibilidad de realizar análisis simultáneos de un mayor

número de drogas y muestras. La aplicabilidad fundamental de esta técnica es de carácter cualitativo, puesto que la sensibilidad de la mayoría de los métodos que la utilizan no es muy elevada. Desde el punto de vista del análisis clínico, la cromatografía de gases es la más poderosa herramienta analítica para la separación de mezclas de drogas en líquidos biológicos. Al igual que con la cromatografía en capa fina, la cromatografía de gases permite al analista investigar un gran número de componentes simultáneamente. Sin embargo, nos encontramos con un inconveniente, y es que antes de llevar a cabo la cromatografía de gases las muestras deben ser extraídas, y es menester que la droga sea volátil o bien se la derivatiza para hacerla volátil. Los compuestos se identifican por sus respectivos tiempos de retención en relación a un estándar interno. Cuando un cromatógrafo de gases se acopla a un espectrómetro de masas, la combinación provee los datos analíticos más objetivos de los métodos existentes para la elucidación estructural de un compuesto desconocido. Los gastos de equipamiento que requiere este acoplamiento son elevados.

Otros métodos también muy utilizados para la detección y determinación de fármacos, aunque el número total de publicaciones encontradas en bibliografía es mucho menor que los espectrofotométricos y espectrofluorimétricos, hacen uso de técnicas tales como HPLC [8-10], amperometría [11], espectroscopía IR [12] y métodos cinéticos [13].

II. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

El FIA (análisis por inyección en flujo) es una modalidad del análisis en flujo continuo (CFA). Se trata de un apartado de los Métodos Automáticos de Análisis, pero que presenta una diferencia importante en relación con el conjunto de los mismos, la cual consiste en su diseño para el análisis de muestras inyectadas manualmente. **Los rasgos esenciales del FIA son los siguientes:**

- El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA.

- La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.

- Se realiza un transporte del “trozo” inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).

- La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.

- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.

- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.

- El tiempo de operación debe de ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

Las condiciones ideales de un analizador de inyección en flujo según un artículo de Ruzicka de presentación del FIAstar [14] son las siguientes:

1.- La corriente portadora debe fluir libre de impulsos a través de un tubo estrecho de diámetro estrictamente uniforme, incluyendo las secciones de inyección y detector.

2.- El volumen de disolución de muestra debe inyectarse de forma reproducible, como un bolo, “plug”, en el flujo del portador sin crear perturbaciones en el mismo. El volumen de muestra inyectada debe ser ajustable a voluntad.

3.- La trayectoria del flujo debe ser fácilmente reprogramable para realizar una amplia variedad de ensayos y además los laterales de la corriente deben conectarse al flujo principal de forma fácil y reproducible.

4.- El flujo a través del detector debe dar una respuesta instantánea y

reproducibile del analito que contiene, con señal de máximo rendimiento.

Un sistema FIA elemental ha de estar formado por una serie de componentes esenciales: a) Un sistema propulsor de la corriente portadora a lo largo de las diferentes unidades elementales, que debe suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de impulsos y perfectamente reproducible; b) Un sistema de inyección dentro de la corriente portadora de volúmenes de muestra muy precisos, reproducibles y variables dentro de un amplio rango; c) Un sistema de transporte de la disolución que tiene como misiones fundamentales conectar entre sí los diferentes elementos y conseguir en el transcurso de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión o mezcla de la muestra con la corriente portadora; d) Un sistema de detección, que permita la medida continua de una propiedad de la muestra o de su producto de reacción proporcionando información cualitativa y cuantitativa sobre la misma.

III. SISTEMAS DE DETECCIÓN EN FIA

Para ser adecuado como sistema de medida en la técnica de inyección en flujo, un detector debe poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: pequeño volumen, bajo ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones y alta sensibilidad.

Cabe hacer una distinción general entre sistemas de detección FIA que miden directamente una propiedad de la especie disuelta en la muestra inyectada, que está limitada sólo a casos favorables en que se pueden aplicar métodos potenciométricos o absorción atómica, y aquellos en que debe existir una reacción adicional que origina un producto de reacción detectable. De esta manera el FIA puede aplicarse a especies activas o inactivas según su comportamiento en relación con el sistema de detección. De ahí que puedan considerarse las técnicas FIA clasificadas de acuerdo con:

1.- Análisis de muestras inyectadas que contienen especies no detectables por el detector empleado (análisis de muestras inactivas). Se pueden usar dos métodos en este caso: a) la disolución portadora contiene un componente detectable por el

detector que reacciona con el analito; la concentración de la especie detectable decrece a medida que progresa la reacción, b) el flujo de disolución contiene una especie inactiva que reacciona con la disolución muestra para dar un producto de reacción detectable.

2.- Análisis de flujos de muestra conteniendo un componente no detectable por el detector empleado (análisis de especies inactivas en el flujo). En este caso se inyecta una disolución de un reactivo apropiado. Existen dos posibilidades: a) si el detector es sensible al reactivo se “sigue” el consumo de reactivo; b) si el producto de la reacción es activo en el detector, se sigue su aparición. Obviamente los términos inactivo, no detectable, etc., dependen de la naturaleza del detector y de las condiciones experimentales.

La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, del volumen de muestra y de su concentración. En este último aspecto, si la muestra es concentrada, la inyección de muestra da resultados más satisfactorios que la inyección de reactivo, mientras que con muestras diluidas es preferible la situación inversa.

Los sistemas de detección más usados en FIA abarcan los mas variados tipos existentes dentro de los métodos analíticos: ópticos (espectroscópicos y no espectroscópicos) y electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, coulométricos, etc.).

III.1. DETECTORES ELECTROQUÍMICOS

Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos debido a su selectividad, sensibilidad y linealidad de respuesta en un amplio rango de concentración. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en volumen, los hace más atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. No obstante, mientras la manufacturación de células de pequeño volumen para la detección electroquímica no parece plantear problemas, el principal inconveniente lo constituye el material del electrodo. El envenenamiento de la superficie en el caso de electrodos sólidos debido a la adsorción, se manifiesta en una pérdida de estabilidad a causa de la pasivación y consecuente disminución de la señal.

Los detectores electroquímicos pueden clasificarse como *detectores de propiedades de la disolución* (como son los conductimétricos) y *detectores de las propiedades del soluto* (amperométricos, coulométricos y potenciométricos). Los detectores de propiedades electroquímicas de la disolución tienen la ventaja de no ser destructivos y ser más o menos universales. Su sensibilidad es moderada y su rango lineal dinámico es limitado. Los basados en propiedades electroquímicas de los solutos son en general muy sensibles y específicos. Su especificidad difiere frecuentemente de la de los detectores ópticos. Algunos de estos detectores son parcialmente destructivos. En principio estos detectores son reactores electroquímicos. En los electrodos tienen lugar oxidaciones o reducciones. Una importante característica de estos detectores es que la señal que suministra el detector viene determinada por la concentración o actividad del compuesto, medida en las proximidades de la superficie del electrodo de trabajo. Es por tanto muy importante que exista una relación inambigua entre la concentración promedio en la sección transversal de la célula de flujo del detector y la concentración en o muy cerca de la superficie del electrodo de trabajo. Este aspecto reactivo de los detectores de propiedades del soluto es la diferencia esencial con los detectores de propiedades ópticas del soluto, en los cuales se mide un parámetro físico.

Otra clasificación general que puede hacerse de los detectores electroquímicos en FIA se basa en la situación de la superficie activa o sensor responsable de la señal analítica. Así, existen tres tipos de detectores electroquímicos:

a) *Detector anular*. En el mismo, la parte sensible está en forma de un anillo más o menos ancho, que normalmente coincide con las dimensiones internas de los tubos de transporte (un ejemplo típico es el electrodo de vidrio).

b) *Detector de tipo varilla*. Se sitúa en la dirección de flujo; son de este tipo los electrodos metálicos (alambre de Ag, Pt, etc.).

c) *Detector de choque*. En este tipo, el flujo incide frontal o tangencialmente con la superficie activa. Esta puede ser plana (electrodo selectivo de iones) o esférica (electrodo de gotas de mercurio).

Otra clasificación general de los detectores electroquímicos en FIA se basa en la situación del electrodo de referencia. Existen tres tipos comunes:

1.- *Cuando se encuentra en la misma célula de flujo donde está situado el electrodo de trabajo.*

2.- *El electrodo de referencia está situado en un pozo o cavidad final donde se recoge el flujo de desecho del sistema.*

3.- Cuando está situado en lugares diferentes a los anteriores, tales como *bypass* del sistema de inyección, tubo de salida de la célula, etc.

III.1.1. Técnicas amperométricas

Con respecto al campo de aplicación y utilidad de los detectores amperométricos hay que distinguir entre los diseños que implican electrodos sólidos y los de gotas de mercurio (EGM). El EGM tiene la importante ventaja de una superficie continuamente renovada que asegura una sensibilidad y nivel de la línea base estables.

El campo de aplicación de estos detectores abarca la determinación a muy bajas concentraciones de compuestos fisiológicamente activos, como neurotransmisores y sus precursores, y metabolitos. Esta importante aplicación ha impulsado fuertemente la actividad científica y técnica en esta área, por lo que han sido propuestos en la literatura numerosos diseños de células. Sin embargo la geometría de la célula parece no tener una gran influencia en parámetros importantes como límite de detección y estabilidad del electrodo.

Haciendo uso de electrodos de carbón, Liu y col., determinaron paracetamol en orina [15], mientras que Neumayr y col. desarrollaron un método amperométrico para determinar ácido salicílico en preparados farmacéuticos [16] (obteniendo un rango lineal comprendido entre 5-150 ng ml⁻¹).

III.1.2. Técnicas potenciométricas

Un detector electroquímico en un sistema dinámico recibe el nombre de potenciométrico, cuando la diferencia de potencial entre dos electrodos en condiciones de corriente constante (generalmente cero) se mide en función de los componentes del flujo.

La detección potenciométrica presenta una serie de ventajas, como son: simplicidad del dispositivo experimental, selectividad, sensibilidad, rápida respuesta y química relativamente simple. Las desventajas que implica la técnica potenciométrica no son muchas, siendo las más importantes: interpretación difícil

de la medida si el ión a determinar está parcialmente complejoado, y ser sensibles a la actividad iónica sólo en la inmediata vecindad de la membrana.

Dentro de esta técnica se distinguen los distintos tipos de medidas que corresponden a: electrodos redox, electrodo de vidrio, electrodos selectivos de iones, transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFETS), y redisolución potenciométrica.

Las vitaminas B₁ y B₆ se han determinado con un electrodo selectivo tubular sin contener solución de referencia interna [17]. Las membranas se preparaban de vitamina-tetra (2-clorofenil) borato, disueltas en éter o-nitrofenil octil e inmovilizadas con ayuda de PVC. Las vitaminas se determinaban con una configuración FIA de doble canal en donde se insertaba el electrodo; los resultados obtenidos eran satisfactorios, consiguiendo con este electrodo un menor coste económico que las alternativas recomendadas por institutos oficiales.

III.1.3. Técnicas coulométricas

La coulometría por inyección en flujo (FIC) está basada en la medida de la integral del pico corriente-tiempo (i-t), obtenido en la inyección de un pequeño volumen de disolución que contiene especies electroactivas en un flujo de electrolito-soporte que pasa a través de un detector que opera en condiciones de transporte de masa limitado. El FIC es más efectivo cuando el electrodo tiene una gran superficie y pequeño volumen interno, de manera que opera con una eficiencia de prácticamente el 100% y se llama entonces “electrodo coulométrico”.

El aporte de reactivo en esta técnica puede realizarse: a) Por generación electrolítica externa, lo que tiene un amplio campo de aplicación, especialmente cuando el reactivo se inyecta en la disolución; b) Por un proceso de electrolisis continuo.

En la determinación de dipirona en fármacos [18], la muestra se inyecta en una solución acuosa de HCl 0.1M. El analito se oxida sobre un electrodo de Pt poroso teniendo como electrodo de referencia uno de calomelanos saturado, a un potencial de 0.75 V. Asimismo, también se ha determinado coulométricamente algunas fenotiazinas (clorpromazina, prometazina, dietazina y trifluoperazina) en

preparaciones farmacéuticas [19].

III.1.4. Técnicas conductimétricas

La asociación de esta técnica con el FIA ha dado lugar a un nuevo método de inyección en flujo, donde las muestras se eluyen a través de una célula de conductividad miniaturizada. Una columna de cambio iónico reduce la contribución a la conductividad del ácido o la base por neutralización a H₂O. La conductividad diferencial es, por tanto, proporcional al contenido de ácido o base no considerando la sal.

En bibliografía, no se han encontrado aplicaciones de esta técnica en FIA para principios activos con carácter farmacológico.

III.2. DETECTORES ÓPTICOS

Son, con mucha diferencia, los métodos de detección más utilizados en FIA, debido al gran número de especies que pueden “seguirse” por técnicas de este tipo, bien por sus propiedades intrínsecas, bien porque el producto de su reacción con una sustancia adecuada sea apto para este tipo de medidas. Dentro de los métodos ópticos es la fotometría la técnica que ha sido más utilizada. La utilización del láser como fuente de excitación ha impulsado de forma notable la técnica fluorimétrica, que ofrece un atractivo campo de aplicación en Química Clínica. Las técnicas atómicas están asimismo experimentando un notable desarrollo [20] al que contribuye de manera cada vez más notoria el desarrollo de los métodos de emisión por ICP [21].

III.2.1. Fotometría

Es actualmente el sistema de detección más importante en FIA debido a la gran cantidad de reacciones selectivas coloreadas utilizables para todo tipo de compuestos y elementos que existen. A pesar de la enorme aplicación que ha tenido la fotometría en FIA, las células no han tenido un desarrollo paralelo, habida cuenta que las células de flujo existentes en el mercado se utilizan con buenos resultados

para este fin. Los dos tipos más comunes de estas células son: a) Tipo en U fabricado en cuarzo o vidrio óptico especial, dependiendo de la zona del espectro donde se mida, y con caras negras, existiendo dos rendijas por célula situadas en caras opuestas (el flujo entra y sale por la parte superior); b) Tipo en Z, donde el flujo entra por la cara inferior, saliendo por la superior. Es un modelo bastante menos utilizado, ya que es más difícil de adaptar a los espectrofotómetros usuales.

Muchas de las aplicaciones a fármacos, con este tipo de detección, se comentan ampliamente más adelante (*Capítulos II-VI*).

III.2.2. Fluorimetría

A la vista de las ventajas de esta técnica determinativa, su selectividad, bajo límite de detección, capacidad para la miniaturización y costo relativamente bajo, su utilización ha sido bastante amplia. Un inconveniente de la misma es que el efecto fluorescente lo manifiestan un número muy limitado de compuestos. Sin embargo, el uso de reacciones químicas sencillas puede ampliar el campo de aplicación del método de forma considerable. La aplicación del láser como fuente de excitación ha hecho posible la determinación de concentraciones a muy bajos niveles y muy pequeños volúmenes. La puesta a punto de esta fuente de excitación aplicada al FIA se debe a Baumann [22].

Las células fluorimétricas de flujo, al igual que las fotométricas, existen en el mercado con un diseño común, apto para su uso en FIA y responden a las características y materiales ya descritos para fotometría. La diferencia fundamental con aquellas se desprende de las características intrínsecas de la técnica: existen tres rendijas en tres caras de la célula, mientras que la cuarta es opaca. El diseño más utilizado es en U.

Al igual que se comentó en el apartado anterior, muchas de las aplicaciones a fármacos con este tipo de detección se ven con mayor detalle más adelante (*Capítulos VII y VIII*).

III.2.3. Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia exhibida por una sustancia es proporcional a la velocidad de la reacción que producen los estados electrónicamente excitados, además de a la concentración del producto. Como consecuencia, el diseño de una célula de quimioluminiscencia para FIA difiere de los diseños basados en los métodos de medida de concentración, ya que nos interesa observar la reacción en el momento de la mezcla o en un tiempo muy corto después de ésta, porque la intensidad es usualmente mayor al comienzo de la reacción (antes de que el consumo de especies sea significativo). Para incrementar la intensidad observada, es deseable medir un volumen mayor que los extremadamente pequeños volúmenes usados generalmente en detectores de medida de concentración.

Las aplicaciones a la determinación de fármacos es elevada. Deftereos y col. [23] han determinado adrenalina en preparados farmacéuticos utilizando permanganato potásico en medio sulfúrico como reactivo, y obteniendo una RSD de 1.2%. Por otra parte, utilizando luminol y agua oxigenada como reactivo, es posible la determinación quimioluminiscente de riboflavina [24] y vitamina B₁₂ [25] en complejos vitamínicos.

III.2.4. Infrarrojo

Los mayores inconvenientes se centran en la falta de transparencia de los disolventes así como en las dificultades del montaje y limpieza de las celdas. En este sentido, el empleo de mezclas de disolventes y el acoplamiento de la espectroscopía IR con las técnicas de inyección en flujo han hecho que el análisis cuantitativo de líquidos por IR, aún siendo minoritario, haya ido ocupando un lugar cada día más importante en la literatura científica. La sensibilidad no es muy elevada. Con la espectrometría IR mediante la transformada de Fourier (FTIR), en el tiempo requerido para medir un elemento de resolución mediante un espectrofotómetro dispersivo, es posible medir el espectro completo.

Morgan y col. [26] determinaron sulfocianato de octilo en medicamentos, disolviendo las muestras en agua y realizando medidas de reflectancia total atenuada. Los autores utilizaron un espectrofotómetro FTIR equipado con un detector piroeléctrico de sulfato de triglicina y una celda de flujo con un cristal de

ZnSe. Asimismo, también han sido determinados fármacos tales como ibuprofeno [27], dimenhidrinato [28], paracetamol [124], y la mezcla de cafeína y ácido acetil salicílico [125].

III.2.5. Refractometría

El principio en que está basada la refractometría como sistema de detección en FIA es la formación de un gradiente de índice de refracción entre la disolución de la muestra y una corriente de disolución estándar, la magnitud del cual es una medida del índice de refracción original de la muestra. La alta sensibilidad del sistema es debido a la forma de este gradiente. Si una disolución de alto contenido salino (alto índice de refracción) se inyecta en una corriente de agua destilada que pasa por el transductor, cuando la muestra circula a través de él lo hace de tal forma que las líneas de igual concentración salina (isolineas) tienen forma parabólica, característica de las condiciones de flujo laminar del sistema. Cada isolinea tendrá un índice de refracción distinto al de la adyacente. El sistema puede considerarse como una lente líquida cuyo foco o luz divergente es de una magnitud que depende de las dimensiones de la parábola, y de su situación con respecto a la luz incidente, de la dirección y de la magnitud del gradiente de índice de refracción. Su aplicación al campo farmacéutico es muy escasa.

III.2.6. Técnicas espectroscópicas atómicas

En las técnicas atómicas con o sin llama se utiliza generalmente para la determinación de un elemento por aspiración continua, un volumen de 0.5 a 2 ml de disolución de muestra. Para el análisis de muestras de menor volumen el uso de FIA en conjunción con estas técnicas resuelve el problema. Una característica diferencial del uso de un instrumento de absorción atómica, fotómetro de llama o unidad ICP con otros detectores usados en FIA es el hecho de no precisar célula de flujo. El esquema de un sistema de este tipo no puede ser más simple: el portador continuamente bombeado, se aspira hasta el nebulizador. La inserción de la muestra en el mismo da lugar a su aparición en el nebulizador, atomización o ionización sin ser necesaria la correspondiente célula de flujo más o menos característica de cada sistema de detección.

Característica común de las técnicas atómicas-FIA es el uso de dispersión baja, factor adicional para una mayor sensibilidad. Actualmente la utilización del ICP como sistema de detección está en creciente desarrollo, habida cuenta de la gran sensibilidad, frecuencia de muestreo, y versatilidad que proporciona esta unidad de emisión.

Martínez Calatayud y col. [29] y Montero y col. [30] han determinado de forma indirecta clorhexidina y lidocaína, respectivamente, utilizando como agentes precipitantes Cu(II) para el primero y Co(II) para el segundo, y determinando la cantidad de ión metálico no precipitado. Para cada uno de ellos se obtienen valores de RSD del orden de 3.6 y 0.5%, respectivamente.

IV. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS FIA

IV.1. Sensibilidad

En general los métodos FIA son algo menos sensibles que las técnicas manuales por dos razones: a) cuando se hace uso de reacciones derivatizadoras, al ser el tiempo de reacción corto, se consiguen rendimientos parciales de reacción; b) al existir una dispersión física o dilución de la muestra en el portador, no se alcanza la máxima señal posible (bolo sin diluir). Debido a las numerosas posibilidades que ofrece esta técnica son diversas las modificaciones que pueden hacerse en los montajes FIA para paliar esta característica negativa:

- Para conseguir una mezcla más eficiente entre el bolo de muestra y el reactivo, se utiliza un punto de confluencia entre un canal de disolvente puro, que recibe al bolo de muestra, y el canal de reactivo.

- El empleo de sistemas continuos de separación incorporados al FIA puede mejorar indirectamente la sensibilidad de la determinación.

- La interrupción del flujo cuando el bolo reaccionante se encuentra en el reactor, permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.

- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración

del analito a partir del bolo de muestra. Esto será lo que haremos en el desarrollo de esta Memoria.

IV.2. Selectividad

La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera semiautomática o automática por FIA conlleva, en general, una reducción más o menos notable tanto del número de especies interferentes, como del nivel de perturbación. Este hecho se ha constatado en numerosas determinaciones FIA al establecer la comparación con el método manual. El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida (tiempo de residencia en FIA). Además, esta característica se ve aún más incrementada en nuestros métodos por el uso de un soporte sólido que nos permita la fijación sólo del analito en estudio.

IV.3. Precisión

A pesar de que en la metodología FIA concurren aspectos cinéticos, físicos y químicos, que a priori pueden hacer suponer que los resultados no han de caracterizarse por su buena precisión, de hecho se alcanzan niveles de reproducibilidad notables y perfectamente comparables con los conseguidos con las metodologías manuales. A pesar de que son varias las causas que pueden originar fluctuaciones en la señal FIA (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, falta de sincronización entre el detector y registrador, etc.), es sin duda la constancia en el caudal el factor más crítico. Es importante elegir un tipo de bomba que origine caudales constantes.

IV.4. Rapidez

La rapidez de la metodología FIA tiene su mayor incidencia en la frecuencia o velocidad de muestreo, siendo incomparablemente superior respecto a las técnicas manuales. Esta mayor velocidad de muestreo en FIA puede atribuirse a la existencia de fuerzas de difusión radiales, de gran significación con relación a las de difusión axial y de convección, que ejercen un efecto de lavado evitando la contaminación

mutua entre las muestras al limitar el ancho de banda.

Es indudable que factores como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo. Deben de elegirse en cada caso las condiciones adecuadas a las necesidades.

IV.5. Sencillez

La técnica FIA se caracteriza por su gran simplicidad debido a:

- Montajes no sofisticados compuestos por tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones, etc., de fácil ensamblaje, en contraste con las nuevas metodologías analíticas surgidas en los últimos años, que se basan en instrumentos complicados difíciles de adquirir, poner a punto y mantener.

- Fácil manejo. No sólo es tarea sencilla el uso de un montaje FIA para análisis rutinarios, sino que es muy fácil también manipular su diseño para conseguir los resultados deseados. Así, es fácil sustituir algún componente, alargar un reactor, modificar la temperatura, etc., para adaptar el mismo montaje a la determinación de un analito en diferentes matrices.

IV.6. Economía y versatilidad

Al ser el FIA una técnica sencilla y simple, se caracteriza por su bajo coste, en claro contraste con otras metodologías automáticas, tanto continuas segmentadas, como discontinuas. Además, el carácter modular de un sistema FIA permite su adaptación a las diferentes necesidades que hoy en día tiene la sociedad y cuya resolución compete a la Química Analítica. La sustitución de cualquiera de sus componentes y la incorporación de otros es tarea sencilla si se tiene en cuenta la ausencia de altas presiones que complicarían estas operaciones. La optimización de un nuevo montaje preparado en pocos minutos es fácil de llevar a cabo.

V. ANÁLISIS DE FÁRMACOS, UTILIZANDO FIA CON DETECCIÓN FOTOMÉTRICA UV-VISIBLE O FLUORIMÉTRICA, EN DISOLUCIÓN

La espectroscopía de absorción molecular es sin duda la técnica de detección utilizada más frecuentemente, debido a la amplia disponibilidad y economía de la instrumentación requerida. El gran número de aplicaciones publicadas que están relacionadas con esta técnica, es el resultado lógico de su elevada flexibilidad para poder adaptarse a una variedad amplia de problemas analíticos. La bibliografía abunda con referencias a determinaciones espectro fotométricas de fármacos utilizando metodología FIA. Sin embargo, pocas de estas aplicaciones acaban midiendo la absorbancia directa del fármaco en disolución (*Tabla I-1*) y menos aún en la región ultravioleta, debido a la baja selectividad que ofrece la técnica. Para obviar esto, lo que normalmente se hace es someter al analito a reacciones derivadoras tales como oxidaciones, utilizando para ello un fuerte agente oxidante (*Tabla I-2.1*), o provocar la formación de quelatos coloreados utilizando para ello iones metálicos (*Tabla I-2.2*).

Tabla I-1. *Aplicación de FIA con detección fotométrica a fármacos. Medida de su absorbancia nativa*

Analito	λ (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Frecuencia de muestreo (h^{-1})	Ref.
Proflavina	450	0.3-12.5	1.2	40	31
9-aminoacridina	400	0.4-24.9	0.16	27	32
Fosfestrol	239	5-30	0.2	140	33
Azintamida	258	5-50	-	150	34
Clotiazepan	390	31-502 μM	-	-	35
Clorocresol	400	0.05-0.15%	1.1	-	36
Morfina	420	30-700	0.4	240	37
Sulfonamidas	545	2-20	0.5	72	38

Tabla I-2.1. Aplicación de FIA con detección fotométrica a fármacos.
Derivación por oxidación

Oxidante	Analito	λ (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Muestreo (h^{-1})	Ref.
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Perfenazina	525	50-250	0.3	300	39
	Trimeprazina	510	-	0.8	-	40
Ce(IV)	Prometazina	514	10-51	1.2	122	41
	Trimeprazina	510	500-1000	0.8	200	42
	Ácido ascórbico	410	0.06-0.17M	0.9	36	43
	Procainamida	480	100-600	0.5	250	44
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Paracetamol	630	0.25-30	0.4	26	45
	Isoprenalina	-	-	-	180	46
	Doxiciclina	520	20-250	0.5	70	47
	Terbutalina	550	-	0.5	-	48
V(V)	Isoniazida	420	-	1.5	360	49
	Clorpromazina	526	160-1000	0.3	129	50
	Prometazina	515	160-2100	0.5	150	50
	Trimeprazina	525	400-1200	0.4	129	50
KIO_4	Emetina	400	25-250	0.6	39	51
	Ácido ascórbico	350	0.1-40	1.5	-	52
	Resorcinol	540	0-6	0.3	300	53
Cloramina T	Ácido ascórbico	650	4-140	-	90	54
	Ácido ascórbico	650	20-140	2.5	90	55
	Ácido ascórbico	650	15-150	0.9	90	56
Fe(III)	Flufenazina	-	10-150	>1	120	57
	Ácido ascórbico	510	50-500	0.5	60	58

Tabla I-2.2. Aplicación de FIA con detección fotométrica a fármacos.
Formación de quelatos coloreados

Catión	Analito	λ (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Muestreo (h^{-1})	Ref.
Fe(II, III)	Paracetamol	590	0.5-6	-	-	59
	Ácido Salicílico	520	100-600	0.4	30	60
	Salicilamida	540	80-800	-	-	61
	Oxitetraciclina	435	-	1.7	17	62
	Norfloxacina	430	50-450	0.6	140	63
	Ciprofloxacina	447	50-500	0.9	250	64
	Tetraciclina	423	20-200	0.9	170	65
	Ampicilina	505	0.25-3	1.1	50	66
	Metildopa	533	-	-	450	67
	Bromazepam	585	-	0.7	-	68
Ni(II)	N-acetilcisteína	415	$(0.2-3)\times 10^{-3}$ M	0.4	100	69
Co(II)	N-penicilamina	360	$(0.1-2)\times 10^{-3}$ M	0.5	150	70

Por otro lado, las características que más sobresalen de la fluorimetría son, sin duda, su elevada selectividad así como los bajos límites de detección obtenidos. Estas características han hecho aumentar el empleo de esta técnica en el análisis farmacéutico. De hecho, la fluorimetría es una de las técnicas más usadas para la detección de cantidades muy pequeñas de drogas en materia biológica, donde se encuentran frecuentemente a niveles de concentración de pocos nanogramos o picogramos. Si a esto añadimos la economía y simplicidad de la técnica, se justifica el interés y desarrollo que ha tenido esta técnica en los últimos años. El problema más grande con el que nos encontramos, es el bajo número de sustancias que presentan fluorescencia, incluidos los fármacos (Tabla I-3). Por ello, en la mayoría de los casos, es necesario activar la fluorescencia de los fármacos mediante derivaciones químicas (Tabla I-4).

Tabla I-3. Aplicación de FIA con detección fluorimétrica a fármacos.
Medida de su fluorescencia nativa

Analito	λ (nm)		Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Muestreo (h^{-1})	Ref.
	Exc	Em				
9-aminoacridina	400	432	0.06-2900	0.3	163	71
Ergotamina	325	415	0.3-1	1.8	-	72
Escopoletina	350	418	0.1-65	0.9	120	73
Umbeliferona	325	418	1-20	-	-	74
Sulfanilamida	260	345	0.1-1	-	-	75
Quinina	365	415	0.05-0.3	1.3	120	76

Tabla I-4. Aplicación de FIA con detección fluorimétrica a fármacos.
Reacciones de derivación

Reactivo	Analito	λ (nm)		Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Muestreo (h^{-1})	Ref.
		Exc	Em				
Hg(II)	Ácido ascórbico	366	435	0.1-10	2.0	30	77
	Captopril	-	-	1-5	1.3	145	78
	Difenhidramina	-	-	0.2-2	0.7	80	79
	Tiopronina	365	445	10-80 mM	1.2	-	80
	Tiamina	370	465	-	0.2	22	81
Ce(IV)	Prometazina	259	359	0.5-31	0.6	130	82
	Dipirona	260	360	0.5-4	0.9	-	83
Cu(II)	Histidina	308	435	-	0.5	60	84
H ₂ O ₂	L-cisteína	250	430	(5-50) $\times 10^{-6}$ M	1.0	37	85
Tl(III)	L-cistina	-	-	(2-20) $\times 10^{-6}$ M	1.4	-	85
CN ⁻	Piridoxal	355	435	-	1.0	30	86

VI. ESPECTROSCOPIA EN FASE SÓLIDA. METODOLOGÍA BATCH

La Espectrofotometría en Fase Sólida surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los “*resin spot test*”. A pesar de los numerosos trabajos sobre “resin spot test” publicados desde que en 1954 Fujimoto [87] propusiera la referida técnica de microanálisis cualitativo, en ninguno de ellos se hizo un intento de cuantificación del analito y tuvieron que pasar más de dos décadas hasta que en 1976 Kazuhisa Yoshimura [88] diera a conocer los primeros métodos de determinación cuantitativa basados en la medida directa de la absorbancia de la especie coloreada sorbida en fase resina, que él llamó *Colorimetría de Cambio iónico* y que más ampliamente debemos denominar *Espectrofotometría en Fase Sólida*.

La espectrofotometría en fase sólida es una metodología relativamente nueva que ha sido aplicada a una gran variedad de analitos orgánicos [89-91] e inorgánicos [92-94]. Los métodos basados en esta técnica ofrecen una alta sensibilidad y selectividad [93-96] utilizando una instrumentación barata y no sofisticada, mostrando además una alta aplicabilidad en el análisis de muestras reales. El analito, al que generalmente se le ha sometido a un proceso de derivación, es previamente fijado por equilibración en un soporte sólido adecuado (generalmente una resina de intercambio iónico), que posteriormente se introducirá en el interior de una cubeta (1-mm de paso óptico) donde se producirá la detección directa del mismo retenido en el soporte. Una gran ventaja de la SPS respecto de la Espectrofotometría convencional radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece la primera con el aumento del volumen de muestra a analizar, pudiendo cuantificarse niveles de concentración inferiores a 0.1 ng ml⁻¹. Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos traza por espectrofotometría sin que sea obligado el empleo de una preconcentración previa del analito, tal y como se requiere en la espectrofotometría convencional.

En los últimos años se ha producido una extensión de dicha metodología a la espectrofluorimetría, surgiendo así la *Espectrofluorimetría en Fase Sólida*. Uno de sus más inmediatos antecesores ha sido el grupo de investigación del PAI “*Espectrometría en Fase Sólida*” del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada [121-123]. Ambas técnicas, espectrofotometría y espectrofluorimetría en fase sólida, podrían englobarse en el término general “*Espectroscopía o Espectrometría en Fase Sólida*” (SPS).

La integración de la metodología SPS con el análisis por inyección en flujo (FIA) combina las ventajas de ésta última (rapidez, automatización y menor participación humana, etc.) con aquéllas ofrecidas por SPS. Algunas de estas combinaciones SPS-FIA (sensores en flujo continuo) se han desarrollado en los últimos años tanto para especies orgánicas [97, 98] como inorgánicas [99-102]. Cuando sólo existían pocos antecedentes del acoplamiento FIA con SPS, en nuestro grupo de investigación de Química Analítica se empezó a trabajar en el desarrollo de este tipo de sistemas, dando origen a los sensores que aparecen en esta Memoria.

VII. SENSORES. CLASIFICACIÓN

Un sensor químico (o bioquímico) ideal es un dispositivo analítico (miniaturizado) que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de una (o más) especie(s) (analitos) de una muestra [103]. Consta de una microzona sensora, donde tiene lugar una reacción química (o bioquímica) y/o un proceso de separación, que está conectada con (o integrada en) un transductor óptico, eléctrico, térmico, de masas o acústico. Muchas veces, el término sensor es usado impropiaemente y es frecuente encontrar trabajos y libros en donde dicho término se aplica a dispositivos que no trabajan realmente según los criterios contemplados en la definición dada.

La amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales; no obstante, establecer sus propiedades genéricas, indispensables unas, deseables otras, resulta mucho más fácil. Algunas de ellas coinciden con características esenciales de la metodología FIA, como son exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras, se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad, reutilizabilidad en procesos irreversibles o regenerables. Otras características básicas son aquellas relacionadas con el tiempo: respuesta lo más próxima posible a tiempo real, rapidez en los procesos reversibles y en los de regeneración y estabilidad (duración y tiempo de vida operacional). Finalmente, otras características destacables son: simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo costo, posibilidad de utilización con muestras complejas o sistemas en evolución y, por último, necesidad de no interpretación por parte del operador.

VII.1. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES

Dado el gran número y variedad de sensores existentes, la clasificación debe hacerse atendiendo a un amplio conjunto de criterios diferentes. Así, tenemos:

1. Sensores químicos o bioquímicos, según sea el parámetro que miden.
2. Sensores reversibles, irreversibles o desechables y reusables o regenerables, según su naturaleza.
3. Planos, de sonda o de flujo, según su forma externa.
4. Conectados o integrados, según la relación de la zona sensora con el transductor.
5. Discontinuos o continuos, según el modo de medida.
6. Ópticos, eléctricos, térmicos, de masa, acústicos, según la naturaleza del transductor.
7. Monoparámetro o multiparámetro según respondan a un sólo analito o a varios simultáneamente.
8. Simultáneos o secuenciales según respondan a la vez o sucesivamente a varios analitos.

En la presente Memoria, nuestro interés está centrado en los sensores ópticos de flujo continuo (acoplamiento de FIA con detectores ópticos), es decir, sensores donde la microzona activa se sitúa en el interior de una célula de flujo ubicada en el seno de un detector espectroscópico no destructivo. Antes de entrar directamente en el estudio de las características y modalidades de este tipo de sensores, veremos las características genéricas de los sensores químicos (o bioquímicos) de flujo.

VII.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SENSORES QUÍMICOS (O BIOQUÍMICOS) EN FLUJO

En los sistemas analíticos de flujo continuo, la detección en la célula de flujo, las reacciones químicas (o bioquímicas) y los procesos de separación que implican transferencia de materia entre dos fases tienen lugar en módulos diferentes, que están separados en el espacio, es decir, se llevan a cabo de forma secuencial. Existen cuatro formas genéricas de integrar estos pasos:

1. Integrar la(s) separación(es) continua(s) con la(s) reacción(es) analítica(s).
2. Integrar la(s) reacción(es) químicas(s) (o bioquímicas) con la detección.

3. Integrar la(s) separación(es) continua(s) con la detección.
4. Integrar la(s) separación(es) continua(s) con la(s) reacción(es) química(s) (o bioquímicas) y la detección.

Los dispositivos que integran estos pasos en una célula de flujo según las modalidades 2, 3 y 4 se pueden considerar sensores, pues poseen los principales requisitos exigibles a éstos.

Hay tres tipos básicos de sensores químicos (o bioquímicos) de flujo según la posición de la microzona sensora en la que tiene(n) lugar la(s) reacción(es) química(s) (o bioquímicas) y/o la(s) separación(es) y su relación con el detector: dos de ellos son sensores que usan sondas conectadas al instrumento, de tal forma que la zona sensora se encuentra incorporada al final de la sonda o colocada en la célula de flujo, llevándose a cabo por consiguiente el contacto con la muestra por inmersión de la sonda en la misma. El tercer tipo es un instrumento convencional, en el que la microzona sensora se ubica en una célula de flujo especial, introduciéndose en este caso la muestra por aspiración o inyección en la célula de flujo.

En los sensores en flujo activos la célula de flujo incluye una microzona reactiva. La interacción fisicoquímica entre dicha microzona y los constituyentes del flujo (líquido o gas) puede llevarse a cabo en forma de una simple reacción química (o bioquímica), un proceso de separación, o bien, una combinación de ambos. En general, estos procesos están basados en la retención de uno de los ingredientes de una reacción (química o bioquímica), bien sea el analito, el reactivo, el catalizador o el producto de reacción sobre un soporte adecuado [104]. Dicha inmovilización deberá ser permanente en el caso de reactivo o catalizador, si se va usar en gran número de determinaciones, pues si el reactivo se consume en el proceso, el sensor en flujo sólo se podrá usar un número muy limitado de veces. Tal es el caso del primer sensor fotométrico descrito en bibliografía [111]. El reactivo inmovilizado debe ser regenerado si no actúa de modo reversible; esta regeneración se efectúa, generalmente, por eliminación o elución del analito. Por su parte, un catalizador es autorregenerable, por lo que no requiere ninguna acción externa para lograr que el sensor actúe reversiblemente. Cuando lo que se inmoviliza es el analito o el producto de la reacción, dicha retención ha de ser transitoria: el sensor tiene que ser regenerado después de cada determinación, lo que obliga a eliminar la especie retenida en la microzona, es decir, el sensor opera en dos pasos, retención y elución, integrados con la detección.

En algunos casos, la inmovilización sobre la microzona activa puede ser a la vez permanente y transitoria: ello ocurre cuando se retienen dos reactivos o un catalizador más el producto de la reacción [105].

Por otra parte, también se usa con frecuencia una doble inmovilización cuando el reactivo previamente inmovilizado retiene al analito y origina una alteración detectable (color, fluorescencia, etc) de la microzona sensora. En este caso ocurren simultáneamente la reacción, la separación y la detección [106, 107].

Las reacciones (químicas o bioquímicas) pueden tener lugar en el soporte sólido (cuando el analito o el reactivo es la especie inmovilizada), en la solución del interior de la célula (cuando es el catalizador el que se inmoviliza en el soporte sólido [108]) o en una zona previa, es decir, en un reactor del sistema de flujo [109, 110].

En esta Memoria, nos centraremos en sensores en flujo en los que la microzona sensora está constituida por un soporte sólido que se ubica en la zona de detección de un detector espectroscópico no destructivo fotométrico o fluorimétrico, utilizando para ello una célula de flujo adecuada y una configuración de flujo no segmentada, pues una de las características más sobresalientes de los sensores en flujo es su compatibilidad con este tipo de configuraciones, por lo que éstos sensores gozan de las ventajas de aquélla: automatización, flexibilidad, facilidad de acondicionamiento de la muestra, bajo consumo de reactivos y muestra, escasa intervención humana, etc. De entre dichos sensores, los que se presentan en esta Memoria corresponden a los que integran la separación (retención) y detección, estando basados según los casos, en la medida de su absorbancia o fluorescencia nativas.

Junto a las ventajas ya comentadas, este tipo de sistemas integrados de retención-detección presentan algunos inconvenientes, entre los que cabe destacar principalmente: (a) la dificultad de encontrar sistemas de detección compatibles con el soporte sólido utilizado como microzona sensora; (b) la necesidad de colocar el instrumento cerca del sistema objeto de estudio, lo que contrasta con los sensores tipo sonda que permiten la detección a larga distancia; (c) la escasez de sistemas (bio)químicos que reúnan las condiciones requeridas, principalmente de reversibilidad o regenerabilidad, para su integración en este tipo de sensores.

Los esfuerzos encaminados al desarrollo de sensores (bio)químicos en los últimos años han sido cuantiosos. Ahora se plantea la necesidad de acometer la aplicación sistemática de los mismos a la resolución de problemas analíticos reales, mediante la validación de métodos de análisis que hagan uso de este tipo de sensores, posibilitando su empleo en laboratorios de rutina. Como hemos dicho antes, nosotros nos vamos a centrar en los sensores que integran la retención y detección, por ser éstos los que se van a desarrollar en la Memoria presentada.

VII.3. SENSORES EN FLUJO QUE INTEGRAN RETENCIÓN Y DETECCIÓN

Los sistemas integrados de separación-detección incluyen tres tipos de interfases: gas-líquido (difusión gaseosa), líquido-líquido (diálisis, extracción) y sólido-líquido (adsorción, cambio iónico, etc). En los dos primeros casos, la construcción de sensores basados en dichos fenómenos es difícil, ya que el detector debe responder a la transferencia de gas o iones (moléculas) a través de la membrana, lo que requiere sistemas demasiado complejos para que puedan ser considerados como sensores; hay que excluir, además, los sistemas que implican detección atómica (generación de hidruros o formación de vapor de mercurio), ya que no cumplen los requisitos necesarios para el desarrollo de sensores. Es en la interacción sólido-líquido, donde el diseño de sensores que integran retención-detección encuentra mayores posibilidades de expansión, ya que no sólo es posible retener el analito y monitorizar alguna propiedad intrínseca del mismo, sino que se puede también retener el producto de una reacción que haya tenido lugar previamente.

Los sensores de este tipo más frecuentemente empleados se basan en el uso de un material sorbente como una resina de cambio iónico, o sílice con fases enlazadas, empaquetado en la célula de flujo de un detector espectroscópico (no destructivo) y en el que se retiene el analito o su producto de reacción. Son sensores irreversibles, reutilizables en los que a lo sumo tienen lugar dos pasos (retención y elución) de forma secuencial pero simultáneamente con la detección en cada determinación.

En el caso de sensores fotométricos en flujo, son pocos los basados en la retención y medida de la absorbancia intrínseca del analito. El primero fue desarrollado por *Yoshimura* [111] para la determinación de cobre, utilizando una

configuración monocanal con dos válvulas de inyección en serie, una para la muestra y otra para el eluyente (ácido nítrico concentrado). La microzona activa la constituye una resina AG50W-X12 ubicada en una célula de flujo comercial. Este mismo autor describió también el primer sensor fluorimétrico de esta naturaleza [112], basado en la fluorescencia nativa de algunos elementos lantánidos y empleando como microzona sensora una resina catiónica (Sephadex CM C-25) empaquetada en un tubo de sílice fundida.

Son pocos los sensores ópticos de flujo que han sido aplicados a moléculas orgánicas de interés farmacológico (*Tabla I-5*). Los sensores más recientemente desarrollados para determinación de principios activos a partir de su fijación en un soporte sólido y posterior detección en la microzona activa, son de vitaminas, concretamente, tiamina [113] y riboflavina [114]. Dada la escasez de sensores de este tipo, y puesto que presentan características tan importantes como sencillez, economía, sensibilidad, reproducibilidad, selectividad, así como fácil manejo, en el desarrollo de esta Memoria se han estudiado sensores ópticos de flujo aplicados a principios activos farmacológicos, en donde se produce directamente la fijación del analito sobre el soporte sólido cuando el bolo de muestra alcanza la zona sensora sin necesidad de realizar ninguna reacción derivadora previa de éste para su posterior detección fotométrica o fluorimétrica.

Los sensores en los que la especie retenida es el producto de una reacción previa a la retención son mucho más frecuentes para cationes metálicos; sin embargo, son muy escasos los sensores que determinan aniones o compuestos de naturaleza orgánica [97, 105, 111]. En lo que respecta a moléculas con aplicación farmacológica (*Tabla I-5*), se ha determinado piridoxal mediante la monitorización de su reacción con Berilio [115]; o sulfanilamida, sulfatiazina, sulfaquinoxalina y sulfatiazol utilizando como reactivo una disolución de ácido clorhídrico, nitrito sódico, ácido sulfámico y (1-naftil) etilendiamina [116].

Tabla I-5. Sensores espectroscópicos en flujo basados en la integración de la retención y detección

Analito	Detecc.	Soporte	λ (nm)	Rango lineal	RSD (%)	Muest. (h ⁻¹)	Ref.
Riboflavina	Fluorim.	Sílice C ₁₈	515 ($\lambda_{exc}=466$)	2.2-91.8 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.1	20	113
Tiamina	Fotom.	Sephadex CM C-25	247	0.8-13 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1.8	14	114
Piridoxal	Fluorim.	Sílice C ₁₈	450 ($\lambda_{exc}=360$)	0.2-16 μM	0.8	6	115
Sulfanilamida	Fotom.	Sílice C ₁₈	540	10-100 $\mu\text{g l}^{-1}$	2.3	12	116
Sulfatiazina				20-120 $\mu\text{g l}^{-1}$	2.0		
Sulfaquinoxalina				25-1000 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.1		
Sulfatiazol				25-1200 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.5		
Paracetamol	Fotom.	Sephadex QAE A-25	264	0.75-12 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.24	40	120
Piridoxina	Fotom.	Sephadex SP C-25	290	1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.84	32	120

VII.4. MULTISENORES

Los sensores que permiten la detección simultánea de más de un analito son técnicamente más complejos que los sensores monoparámetro, principalmente debido a la necesidad de que el detector sea capaz de proporcionar información multidimensional, en un periodo de tiempo compatible con las características del sensor, sin embargo, sus indiscutibles ventajas justifican su trato diferenciado en esta Memoria respecto a los que responden a una sola especie. Nos centraremos, además, en aquellos sensores capaces de resolver mezclas complejas de analitos sin necesidad de llevar a cabo una separación previa, obviando aquellos sistemas sensores colocados, por ejemplo, a la salida de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución [117].

Una multideterminación consiste en la determinación de dos o más analitos

sobre una muestra, pudiendo ser: (a) Secuencial. Determinación de n analitos a partir de n inyecciones de muestra; (b) Simultánea. Determinación de varios analitos a partir de una simple inyección.

En esta Memoria se desarrolla una multideterminación simultánea, puesto que se determinan varios analitos con una única inyección; para ello, se hace uso de un diodo array. Las características de estos acoplamientos ya han sido descritas [118, 119]. M. J. Ayora y col. [120] han propuesto un sensor para la determinación de paracetamol-dimenhidrinato-cafeína mediante la retención transitoria de los analitos sobre gel de sílice C_{18} , y posterior tratamiento de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales. Hasta la fecha éste es el único sensor de estas características. Nosotros desarrollaremos un sensor de características semejantes para determinación simultánea de tres principios activos que se encuentran asociados en algunos fármacos: paracetamol, ácido acetil salicílico y cafeína.

Asimismo, en la presente Memoria, se realizarán multideterminaciones secuenciales para la resolución de las mezclas formadas por ácido ascórbico-paracetamol, salicilamida-paracetamol y salicilamida-ácido salicílico, con detección fotométrica UV para las dos primeras y fluorimétrica para la última. Hemos de señalar que en la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún sensor en flujo secuencial para resolución de mezclas (de principios activos).

VII.5. TIPO DE SOPORTE SÓLIDO

La elección del soporte sólido entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse, constituye una parte esencial del diseño del sensor, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la integración de reacción y/o retención y la detección espectroscópica. Consideraremos, únicamente, los cuatro tipos de materiales más usados:

- a) cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno
- b) cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano
- c) resinas adsorbentes sin grupos funcionales
- d) sílice con fases enlazadas

En cualquier caso, el soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos para su empleo en estos sistemas de flujo no segmentado, como son:

1) Su tamaño de partícula debe ser lo suficientemente grande como para permitir que el líquido circule libremente, teniendo en cuenta que una de las mayores ventajas de la técnica FIA es la de trabajar a bajas presiones.

2) Con el fin de garantizar la reproducibilidad de la respuesta del sensor, el soporte debe ser mecánicamente resistente al flujo continuo: no debe producirse la ruptura de las partículas o la aparición de huecos, que provocarían variaciones en la superficie de contacto sólido-disolución. Debe ser además, resistente al efecto de “barrido”, provocado por el flujo continuo de portador, para que no se produzca una pérdida gradual de la actividad del soporte.

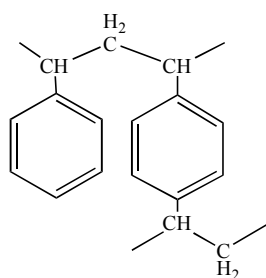
3) Ha de ser químicamente inerte frente a los componentes de las disoluciones utilizadas como portador, eluyente y otros reactivos, ya que en caso contrario la vida media del sensor se vería gravemente afectada.

4) Debe ser de un material compatible con la técnica integrada de detección, así, en sensores espectrofotométricos, el soporte debe ser suficientemente transparente como para permitir la medida de la absorbancia; y en sensores espectrofluorimétricos la emisión de fondo debe ser lo más baja posible.

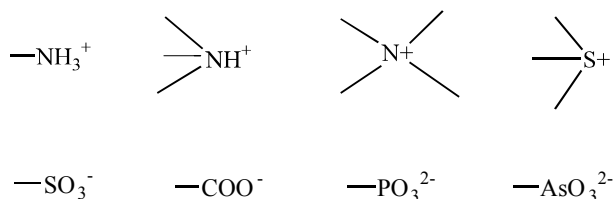
5) El proceso de retención/elución debe ser suficientemente rápido.

VII.5.1. Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno

Son los polímeros de cambio iónico más extendidos en la actualidad. Están constituidos por una matriz tridimensional hidrófoba, formada por cadenas de poliestireno unidas por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex), que puede esquematizarse:



Unidos al anillo aromático, se hallan los grupos cambiadores, que pueden ser de ácido fuerte o de ácido débil para los cambiadores catiónicos (tipo Dowex 50) y de base fuerte o débil para los cambiadores aniónicos (tipo Dowex 1):



Al ponerse en contacto con agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, convirtiéndose en “geles”; ya que se trata de materiales porosos con numerosos grupos hidrófilos, las características del medio de reacción (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, etc) influyen decisivamente en el grado de hinchamiento. El grado de reticulación de la matriz, relacionado directamente con el porcentaje de divinilbenceno, tiene asimismo una influencia decisiva en las características del cambiador, ya que determina el tamaño de los microporos, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contraiones, determinando la velocidad del proceso de cambio iónico. Para el empleo de estos cambiadores en técnicas absorciométricas en fase sólida, hay que tener en cuenta, además, que al aumentar el porcentaje de entrecruzamiento disminuye notablemente la transparencia del soporte.

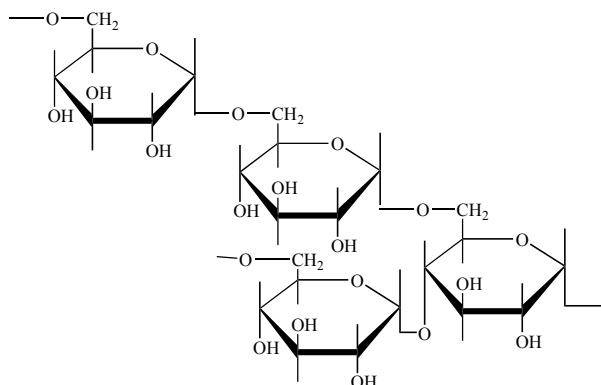
Desde el punto de vista de su empleo en el desarrollo de sensores, hay que destacar que son muy útiles para la retención/elución de complejos inorgánicos o en el caso de cambiadores catiónicos para la retención irreversible de reactivos orgánicos que formen complejos con cationes. Los cambiadores aniónicos son

menos útiles para la retención irreversible de reactivos, pues si al pH óptimo de la reacción éstos están cargados negativamente el anclaje sobre el cambiador se produce a través de los grupos quelantes, inactivándolos.

La utilización de estos soportes en sistemas que emplean reactivos aromáticos que forman complejos muy estables con cationes o aniones inorgánicos, plantea también numerosos inconvenientes, pues la elución del complejo resulta enormemente difícil.

VII.5.2. Cambiadores iónicos derivados de polímeros del dextrano

Están formados por polisacáridos obtenidos por entrecruzamiento de dextrano con epíclorhidrina, son por tanto, cambiadores de naturaleza polar, debido a los numerosos grupos hidroxilo existentes en los anillos de la estructura. El esqueleto de polisacárido puede ser representado esquemáticamente:



La introducción de grupos funcionales iónicos da lugar a cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP), ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE y QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE y ECTEOLA).

Estos soportes pueden ser utilizados para la retención de complejos con ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, ya que la naturaleza no aromática del cambiador, hace que la retención se produzca mediante interacciones casi

exclusivamente electrostáticas, o en cualquier caso, débiles, facilitándose mucho la elución con respecto a los cambiadores mencionados en el apartado anterior. También son muy útiles para la determinación de especies orgánicas por medida de su absorbancia intrínseca en la zona UV, lo que resulta imposible con cambiadores de naturaleza aromática debido a la intensa absorción que presentan.

VII.5.3. Polímeros adsorbentes sin grupos funcionales

Al igual que las resinas tipo Dowex, están formadas por cadenas de poliestireno entrecruzadas por moléculas de divinilbenceno, pero carecen de grupos cambiadores de iones. Dado que no poseen grupos iónicos hidrofílicos, se afectan por las características del medio de reacción en mucha menor medida que las resinas cambiadoras de iones. Estos soportes permiten retener numerosos reactivos aromáticos, manteniendo intacta su capacidad formadora de complejos, dado que la retención se efectúa por adsorción sobre el esqueleto aromático del soporte, quedando libres los grupos iónicos activos de los reactivos.

También existen adsorbentes con esqueleto tipo Sephadex sin grupos funcionales cambiadores de iones.

VII.5.4. Sílice con fases enlazadas

Se trata de soportes constituidos por esferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena suele ser de 2, 8 o 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos, por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio. Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos aromáticos o no (ya sean reactivos formadores de complejos o analitos de naturaleza orgánica), ya que retienen débilmente a estos compuestos, en medio acuoso o hidroorgánico y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos.

VII.6. ELUCIÓN DE LA ESPECIE RETENIDA PARA REGENERAR EL SENSOR

Para que el sensor sea reutilizable es necesario que una vez desarrollada la señal, la microzona activa se regenere y quede dispuesta para un nuevo análisis. El procedimiento más simple de regeneración de un sensor se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente, desplazando al analito (o producto de reacción) de los sitios activos del soporte. Esto es lo que ocurre en la mayoría de los sensores desarrollados en esta Memoria.

Si no se produce la circunstancia mencionada anteriormente, hay que utilizar otra disolución que actúe como eluyente de la especie retenida. En los sensores aquí presentados se ha procedido a utilizar como eluyente la misma disolución portadora (mismo valor de pH) pero con una mayor concentración de sales, para aumentar de este modo la fuerza iónica de la disolución provocando así la desorción del analito sobre el soporte sólido. El objeto de utilizar un portador y un eluyente con el mismo valor de pH, siempre que sea posible, no es otro que tratar de evitar el someter al soporte a cambios bruscos de pH, con el consecuente cambio en la compactación por parte de éste.

Los agentes utilizados en la regeneración de sensores varían en función de la naturaleza de las especies retenidas y del tipo de interacción entre dichas especies y el soporte sólido. Podrían utilizarse, entre otros: agentes oxidantes o reductores, tensioactivos, agentes complejantes, disolventes orgánicos e incluso simplemente cambios de pH o de fuerza iónica del medio. En nuestro trabajo, se va a utilizar este último caso.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. A. El Ragehy, M. Abdelkawy, A. El Bayoumy, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 2127.
- [2] A. K. Sanyal, D. Laha, *J. AOAC Int.*, 77 (1994).
- [3] J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, M. L. Morena Pardo, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349 (1994) 756.
- [4] Y. S. Endoh, Y. Takahashi, S. Hamamoto, Y. Ishihara, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 35 (1994) 292.
- [5] A. Villari, N. Micali, M. Fresta, G. Puglisi, *Analyst*, 119 (1994) 1561.
- [6] J. A. Murillo, A. A. Molina, *Analyst*, 119 (1994) 1915.
- [7] A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, I. Durán Meras, M. Dolores Moreno, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 1893.
- [8] G. Tharakan, A. Prakash, S. Tyagi, A. Bhatnagar, *Indian Drugs*, 31 (1994) 382.
- [9] T. B. Vree, A. J. A. M. Van der Ven, C. P. W. G. M. Verwey-van Wissen, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 19 (1994) 327.
- [10] I. Caraballo, M. Fernández Arévalo, M. A. Holgado, M. T. Vela, A. M. Rabasco, *J. Pharm. Sci.*, 83 (1994) 1147.
- [11] H. I. Gokal, K. Nisli, *Egypt. J. Anal. Chem.*, 3 (1994) 135.
- [12] P. Umapathi, P. Parimoo, S. K. Thomas, *Indian Drugs*, 31 (1994) 489.
- [13] B. Gala, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349 (1994) 824.
- [14] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, J. Wiley, New York, 1981.
- [15] A. Liu, E. K. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 280 (1993) 223.
- [16] M. Neumayr, O. Friedich, G. Sontag, F. Pittner, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 469.
- [17] J. L. F. C. Lima, M. C. B. M. S. Montenegro, A. M. R. Silva, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 1041.
- [18] A. Dakashev, L. Ilcheva, P. Dzambazova, *Izv. Khim.*, 24 (1991) 118.
- [19] Z. Feher, I. Kolbe, E. Pungor, *Anal. Chem.*, 332 (1988) 345.
- [20] J. F. Tyson, *Anal. Proc.*, 20 (1983) 488.
- [21] S. Greenfield, *FIA weds ICP-A marriage of convenience*, Rep. Ind. Research and Dev., 1981.
- [22] W. Baumann, *Z. Anal. Chem.*, 310 (1982) 239.
- [23] N. T. Deftereos, A. C. Calorkerinos, C. E. Efstathion, *Analyst*, 118 (1993) 627.

-
- [24] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, A. Sanz, V. Tomás, *Analyst*, 119 (1994) 1825.
- [25] Y. K. Zhou, H. Li, Y. Liu, G. Y. Liang, *Anal. Chim. Acta*, 243 (1991) 127.
- [26] D. K. Morgan, N. D. Danielson, J. E. Katon, *Anal. Lett.*, 18 (1985) 1979.
- [27] S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia, *Talanta*, 40 (1993) 89.
- [28] Z. Bouhsain, B. A. Hasan, S. Garrigues y M. de la Guardia, *Quim. Anal.*, 14 (1995) 96.
- [29] J. Martínez Calatayud, J. V. García Mateo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 1441.
- [30] R. Montero, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 3 (1988) 725.
- [31] J. Martínez Calatayud, A. Sánchez Sampedro, P. Villar Civera, C. Gómez Benito, *Pharmazie*, 44 (1989) 795.
- [32] J. Martínez Calatayud, A. Sánchez Sampedro, P. Villar Civera, C. Gómez Benito, *Anal. Lett.*, 23 (1990) 2315.
- [33] E. M. Abdel-Moety, S. Z. El-Kateeb, *Acta Pharm. Fenn.*, 98 (1989) 247.
- [34] E. M. Abdel-Moety, A. A. Mustafa, A. K. S. Ahmad, A. E. El-Gendy, *Sci. Pharm.*, 55 (1987) 259.
- [35] R. M. Alonso, P. M. Jiménez, A. Carvajal, J. García, F. Vicente, *Talanta*, 36 (1989) 761.
- [36] M. S. Bloomfield, K. A. Preble, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 275.
- [37] W. Z. Liu, H. Chen, C. D. Wang, *Fenxi-Huaxue*, 21 (1993) 822.
- [38] M. A. Koupparis, P. I. Anagnostopoulou, *Anal. Chim. Acta*, 204 (1988) 271.
- [39] S. M. Sultan, A. M. Abdennabi, *Microchem. J.*, 48 (1993) 343.
- [40] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, *Anal. Sci.*, 8 (1992) 841.
- [41] J. Martínez Calatayud, A. Sánchez Sampedro, S. Navasquillo Sarrión, C. Gómez Benito, *Microchem. J.*, 45 (1992) 745.
- [42] S. M. Sultan, *Microchem. J.*, 44 (1991) 304.
- [43] S. M. Sultan, *Talanta*, 40 (1993) 593.
- [44] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, *Talanta*, 40 (1993) 623.
- [45] J. Martínez Calatayud, M. C. Pacual Martí, S. Sagrado Vives, *Anal. Lett.*, 19 (1986) 2023.
- [46] B. Betteridge, T. J. Sly, A. P. Wade, J. E. W. Tillman, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1292.
- [47] R. Karlicek, P. Solich, *Anal. Chim. Acta*, 285 (1994) 9.
- [48] M. Strandberg, S. Thelander, *Anal. Chim. Acta*, 145 (1983) 219.
- [49] V. V. S. Eswara, H. A. Mottola, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 776.
- [50] S. M. Sultan, *Analyst*, 116 (1991) 177.

- [51] J. Martínez Calatayud, S. Sagrado Vives, *Pharmazie*, 44 (1989) 614.
- [52] J. Hernández-Méndez, A. Alonso-Mateos, M. J. Almendral-Parra, C. García de María, *Anal. Chim. Acta*, 184 (1986) 243.
- [53] Z. Bouhsain, B. A. Haran, K. D. Khalaf, M. de la Guardia, *J. Flow Injection Anal.*, 11 (1994) 169.
- [54] S. M. Sultan, A. M. Abdennabi, F.E.O. Suliman, *Talanta*, 41 (1994) 125.
- [55] F. Lázaro, A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 111 (1986) 167.
- [56] F. Lázaro, A. Rios, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 111 (1986) 163.
- [57] M. A. Koupparis, A. Barcuchova, *Analyst*, 111 (1986) 313.
- [58] J. M. Álamo, A. Maquieira, R. Puchades, S. Sagrado, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347 (1993) 293.
- [59] M. A. Koupparis, K. E. Evagorou, T. P. Hadjiioannou, *Anal. Chim. Acta*, 224 (1989) 339.
- [60] J. M. López Fernández, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Autom. Chem.*, 12 (1990) 263.
- [61] M. A. Koupparis, P. I. Anagnostopoulou, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 6 (1988) 35.
- [62] A. A. Alwarthan, S. A. Al-Tamrah, S. M. Sultan, *Analyst*, 116 (1991) 183.
- [63] S. M. Sultan, F. E. O. Suliman, *Analyst*, 118 (1993) 573.
- [64] F. E. O. Suliman, S. M. Sultan, *Analyst*, 117 (1992) 1523.
- [65] F. E. O. Suliman, S. M. Sultan, S. O. Duffuaa, I. Abu-Abdoun, *Analyst*, 117 (1992) 1179.
- [66] R. Karlicek, P. Solich, *Cesk. Farm.*, 2 (1990) 77.
- [67] F. P. Bigley, R. L. Grob, G. S. Brenner, *Anal. Chim. Acta*, 181 (1986) 241.
- [68] S. M. Sultan, *Analyst*, 117 (1992) 773.
- [69] P. Viñas, J. A. Sánchez Prieto, M. Hernández Córdoba, *Quim. Anal.*, 9 (1990) 205.
- [70] P. Viñas, J. A. Sánchez Prieto, M. Hernández Córdoba, *Microchem. J.*, 41 (1990) 2.
- [71] J. Martínez Calatayud, A. Sánchez Sampedro, P. Villar Civera, C. Gómez Benito, *Anal. Lett.*, 23 (1990) 2315.
- [72] M. Polasek, P. Solich, R. Karlicek, *Ceskoslov. Farm.*, 38 (1989) 1.
- [73] P. Solich, M. Polasek, R. Karlicek, *Pharmazie*, 50 (1995) 545.
- [74] P. Solich, M. Polasek, R. Karlicek, *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 293.
- [75] M. C. Mahedero, J. J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 193.

- [76] M. Polasek, R. Karlicek, P. Solich, *Ceskolov. Farm.*, 36 (1987) 201.
- [77] H. K. Chung, J. D. Ingle, *Talanta*, 38 (1991) 355.
- [78] R. Segarra Guerrero, S. Sagrado Vives, J. Martínez Calatayud, *Microchem. J.*, 43 (1991) 176.
- [79] J. Martínez Calatayud, F. J. Blasco Martínez, S. Sagrado Vives, *Mikrochim. Acta*, 106 (1992) 319.
- [80] T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, G. Lambertos, *Microchem. J.*, 44 (1991) 72.
- [81] T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, I. Ibarra, *Talanta*, 40 (1992) 907.
- [82] M. T. García Sancho, J. Martínez Calatayud, *Pharmazie*, 47 (1992) 557.
- [83] T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Carpena, *Microchem. J.*, 47 (1996) 296.
- [84] B. E. Miller, N. D. Danielson, *Anal. Chim. Acta*, 192 (1987) 293.
- [85] H. Mori, K. Natsume, *Anal. Sci.*, 3 (1987) 581.
- [86] P. Linares, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2101.
- [87] M. Fujimoto, *Bull. Chem. Soc.*, 27 (1954) 48.
- [88] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, 23 (1976) 499.
- [89] L. F. Capitán-Vallvey, N. Navas Iglesias, I. de Orbe-Payá, R. Avidad-Castañeda, *Talanta*, 43 (1996) 1457.
- [90] F. Capitán, L. F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández, I. De Orbe, R. Avidad, *Anal. Chim. Acta*, 331 (1996) 141.
- [91] P. Ortega-Barrales, M. L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 271.
- [92] K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, 32 (1985) 345.
- [93] M. L. Fernández-de Córdova, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 44.
- [94] P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, M. I. Pascual-Reguera, L. F. Capitán-Vallvey, *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 115.
- [95] M. L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, M. I. Pascual-Reguera, L. F. Capitán-Vallvey, *Talanta*, 42 (1995) 1057.
- [96] M. L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz, M. I. Pascual-Reguera, L. F. Capitán-Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 1668.
- [97] P. Richter, M. D. Luque, M. Valcárcel, *Anal. Lett.*, 25 (1992) 2279.
- [98] K. Yoshimura, S. Nawata, G. Kura, *Analyst*, 115 (1990) 843.
- [99] K. Yoshimura, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2922.

- [100] K. Yoshimura, *Analyst*, 113 (1988) 471.
- [101] K. Yoshimura, U. Hase, *Analyst*, 116 (1991) 835.
- [102] L. F. Capitán-Vallvey, M. C. Valencia, G. Mirón, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 365.
- [103] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, *Analyst*, 118 (1993) 593.
- [104] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro, *Analyst*, 115 (1990) 699.
- [105] J. M. Fernández Romero, M. D. Luque de Castro, *Anal. Chem.*, 118 (1993) 3048.
- [106] R. M. Liu, D. J. Liu, A. L. Sun, *Talanta*, 40 (1993) 381.
- [107] M. Agudo, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 281 (1993) 100.
- [108] R. Q. Thompson, R. Crouch, *Anal. Chim. Acta*, 144 (1982) 155.
- [109] K. Yoshimura, S. Nawata, G. Kura, *Analyst*, 115 (1990) 843.
- [110] D. Chen, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta*, 37 (1990) 1049.
- [111] B. Fernández Band, P. Linares, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1672.
- [112] K. Yoshimura, S. Matsuoka, T. Tabuchi, H. Waki, *Analyst*, 117 (1992) 189.
- [113] P. Ortega Barrales, M. L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 376 (1998) 227.
- [114] Z. L. Gong, Z. J. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 339 (1997) 161.
- [115] D. Chen, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Microchem. J.*, 44 (1991) 215.
- [116] M. T. Tena, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 119 (1994) 1625.
- [117] M. T. Tena, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. Sci.*, 30 (1992) 269.
- [118] R. S. Vithanage, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 326.
- [119] F. Lázaro, A. Ríos, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 179 (1986) 279.
- [120] M. J. Ayora, *Tesis Doctoral*, Universidad de Jaén 1998.
- [121] J. L. V. Quero, J. Rohand, A. N. Montón, R. A. Castañeda, L. F. Capitán Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354 (1996) 470.
- [122] L. F. Capitán Vallvey, E. J. Alonso, R. Avidad, M. del Olmo, J. L. Vilchez, *Anal. Sci.*, 9 (1993) 117.
- [123] J. L. Vilchez, M. del Olmo, R. Avidad, L. F. Capitán Vallvey, *Analyst*, 119 (1994) 1211.
- [124] Z. Bousain, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analyst*, 121 (1996) 635.
- [125] S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia, *Talanta*, 40 (1993) 1799.



SENSORES
ESPECTROFOTOMÉTRICOS
EN FLUJO EN FASE SÓLIDA



CAPÍTULO II

SENSORES MONOPARÁMETRO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO, MINOXIDIL Y ÁCIDO SALICÍLICO

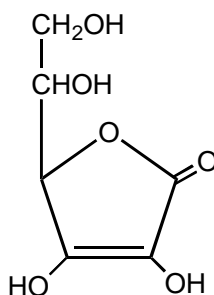


1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ácido Ascórbico

El escorbuto, enfermedad causada por carencia de vitamina C, se conoce desde los tiempos de las Cruzadas, especialmente en los países del norte de Europa que subsistían con dietas sin frutas ni verduras frescas durante largos periodos del año [1]. La frecuencia del escorbuto se redujo con la introducción en Europa, en el siglo XVII, de la patata, fuente adicional de vitamina C. En 1928, Szent-Györgyi aisló a partir de repollos y de glándulas suprarrenales un agente reductor en forma pura; en 1932, Waugh y King identificaron este compuesto como el factor antiescorbútico activo del jugo de limón. La estructura química de esta sustancia se estableció poco después en varios laboratorios, y se le dio el nombre químico trivial “ácido ascórbico” para designar su función preventiva del escorbuto. El término vitamina C debe considerarse una descripción genérica de todos los compuestos que muestran cualitativamente la actividad biológica del ácido ascórbico; este último nombre debe restringirse a dicha sustancia específica.

El ácido ascórbico es un compuesto de seis carbonos que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas. Se oxida reversiblemente en el organismo a ácido deshidroascórbico. Este último compuesto posee plena actividad vitamínica C. La fórmula estructural del ácido ascórbico es la siguiente:



En el sentido estricto de la palabra, puede decirse que la vitamina C posee pocas acciones farmacológicas. La administración del compuesto en cantidades mucho mayores que los requerimientos fisiológicos causa pocos efectos

demostrables, excepto en el individuo escorbútico, cuyos síntomas se alivian rápidamente. Los síntomas secundarios que acompañan a la enfermedad carencial pueden ser variados e incluir anemia, infecciones, trastornos metabólicos u otros síntomas. En consecuencia, se ha acumulado abundante literatura sobre el efecto de la vitamina C sobre casi todas las funciones del organismo.

El ácido ascórbico actúa en muchas reacciones bioquímicas, casi todas ellas con oxidación, así como en la síntesis de sustancias intercelulares, entre ellas el colágeno, proteoglucanos y otros componentes orgánicos de la matriz dental y ósea y del endotelio capilar [2].

El ácido ascórbico se absorbe fácilmente del intestino, y la absorción del ascorbato dietético es casi completa (80 a 90%) [3]. El ácido ascórbico está presente en el plasma y tiene distribución ubicua en las células del organismo. Estudios con ácido L-ascórbico marcado isotópicamente han demostrado que la vitamina se oxida a CO₂ en ratas y cobayas, pero en el hombre puede detectarse una conversión mucho menor.

La determinación de ácido ascórbico, en diferentes matrices, se ha llevado a cabo con diversas técnicas analíticas, siendo las más empleadas las espectro fotométricas (*Tabla II-1*) y HPLC [4-8]. La determinación espectrofotométrica de ácido ascórbico por medida directa de su absorbancia en la región UV es muy difícil de realizar, ya que normalmente se encuentra asociado a otras sustancias que también absorben en esta región. El problema de las interferencias se ha conseguido eliminar haciendo uso de reactivos que reaccionan específicamente con el ácido ascórbico, originando productos coloreados. La mayoría de estos métodos están basados en la capacidad reductora del ácido ascórbico [9-12], sin embargo, estos métodos están sujetos a los posibles interferentes que también posean dicha capacidad reductora, y que aparecen acompañando al ácido en matrices de diferente índole.

La fijación del analito sobre un soporte sólido adecuado permite un incremento en la sensibilidad del método, debido a la preconcentración de dicho analito, así como un incremento en la selectividad causado por la exclusión del resto de analitos no retenidos sobre dicho soporte en las condiciones de trabajo. Hay descritas muchas aplicaciones de la espectrofotometría en fase sólida (SPS)

para la determinación de diferentes especies, basadas en la formación de productos derivados coloreados [13-15]; sin embargo, las aplicaciones a la determinación de especies por medida directa de su absorción intrínseca UV es escasa [16-18]. Los métodos (sensores) espectrofotométricos desarrollados en esta tesis doctoral, son una combinación de la SPS y el análisis por inyección en flujo (FIA), combinando, por tanto, las características de ambas metodologías: la sensibilidad, selectividad (características de la SPS) y rapidez, automatización, simplicidad, menor consumo de reactivos y muestra, y menor participación humana (características del FIA). El sensor de ácido ascórbico ha sido aplicado a la determinación de este analito en muestras de diferente naturaleza, como preparaciones farmacéuticas, caramelos y orina.

En la *Tabla II-1* se muestran algunos parámetros analíticos, así como el reactivo utilizado en la reacción derivadora, de métodos espectrofotométricos descritos para determinación de ácido ascórbico.

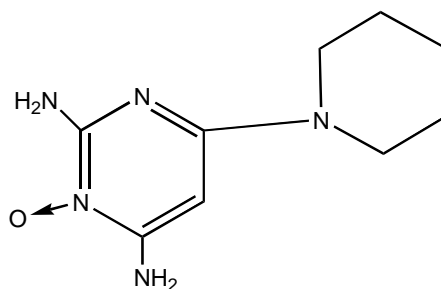
Tabla II-1. Comparación de las sensibilidades y rangos dinámicos lineales de distintos métodos espectrofotométricos para la determinación de ácido ascórbico

Reactivo	ϵ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Referencias
2,6-dicloroindofenol	-	1-20	[19]
Ácido p-aminobenzóico	-	20-67	[20]
Sal Fast Red AL	4.07×10^3	5-25	[21]
Yodato-fluoresceína	8.81×10^3	< 4.0	[22]
Fe(III)-bipiridil	1.73×10^4	-	[23]
Fe(III)-1,10-fenantrolina	2.20×10^4	-	[10]
Fe(III)-TPTZ [†]	4.43×10^4	-	[24]
Fe(III)-ferrozina	5.58×10^4	0.2-10	[11, 12]

[†]TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina; [‡]Absortividad molar aparente

1.2. Minoxidil

El minoxidil es un potente vasodilatador. Actúa directamente sobre las células del músculo liso vascular, y su mecanismo de acción probablemente sea similar al de la hidralazina. A continuación se muestra la estructura química del minoxidil (2,6-diamino-4-piperidinopirimidino-1-óxido):



El minoxidil produce dilatación arteriolar, disminución de la resistencia periférica y reducción de las presiones sistólica y diastólica. Este efecto se acompaña de aumento reflejo de la frecuencia e índices cardíacos. También aumenta la concentración plasmática de norepinefrina, renina y aldosterona, especialmente durante su administración aguda. Hoy día también se utiliza el minoxidil para tratar a pacientes con problemas de alopecia.

Este analito es rápidamente absorbido, y es metabolizado predominantemente por el hígado, especialmente por conjugación con ácido glucurónico. Aunque tanto el minoxidil como sus metabolitos son excretados principalmente por los riñones, sólo el 12% de la droga es excretado sin cambios en orina. Aunque la eficacia hipotensora del minoxidil es impresionante, las reacciones adversas llevan a la suspensión de la droga en hasta el 70% de los pacientes.

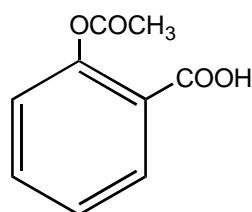
Los métodos propuestos para la determinación de minoxidil incluyen: cromatografía de gases [25], HPLC [26], radioinmunoensayos [27], polarografía de pulso diferencial [28], extracción de par-iónico [29], y electroanálisis [30]. En la farmacopea estadounidense, se utiliza como técnica de determinación la cromatografía líquida [31].

La mayoría de los métodos espectrofotométricos para la determinación de

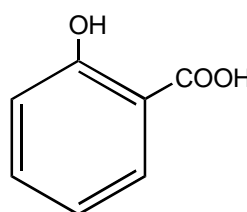
minoxidil usan derivación [32-36] y todos ellos son menos sensibles que el método propuesto en esta Memoria, el cual ha sido aplicado a numerosos preparados farmacéuticos.

1.3 Salicilatos

Los salicilatos forman dos grandes clases que son los *ésteres del ácido salicílico*, obtenidos por sustitución en el grupo carboxilo, y los *ésteres salicilato de ácidos orgánicos*, en los que el grupo carboxilo del ácido salicílico se conserva y la sustitución se hace en el grupo OH. Por ejemplo, la aspirina es un éster del ácido acético. Los salicilatos actúan normalmente en virtud de su contenido en ácido salicílico.



Ácido Acetil Salicílico



Ácido Salicílico

El ácido salicílico (ácido ortohidroxibenzoico) es tan irritante que sólo puede usarse externamente, y por ello varios derivados de este ácido se han sintetizado para el uso sistémico. A pesar de la introducción de muchos fármacos nuevos, la aspirina (ácido acetil salicílico) sigue siendo probablemente el agente analgésico-antipirético y antiinflamatorio más empleado, y es la norma de comparación y evaluación de los demás. Enormes cantidades del fármaco se consumen en los Estados Unidos; algunas estimaciones hablan de 10 a 20 mil toneladas por año. El hombre confía en ella como analgésico doméstico común y sin embargo, por la misma fácil accesibilidad de la droga, a menudo se subestima su utilidad. Del mismo modo, el farmacólogo y el clínico elogian la eficacia e inocuidad de la aspirina como analgésico y antirreumático, pero creen necesario hacer constantes advertencias acerca de su papel como causa común de envenenamiento letal por drogas en niños pequeños, y su potencial de toxicidad seria si se usa indebidamente.

La literatura antigua sobre los salicilatos ha sido resumida por Hanzlik (1927). Cohen (1976) y Miller y col. (1978) son reseñas más recientes sobre parte de la farmacología clínica. Los tipos de dolor susceptibles de alivio por los salicilatos son los de poca intensidad, de origen circunscripto o difuso, en particular cefaleas, mialgias, artralgias y otros dolores que surgen de estructuras tegumentarias y no viscerales. Los salicilatos se utilizan más que ninguna otra clase de drogas para aliviar el dolor. El uso crónico no produce tolerancia ni adicción, y la toxicidad es menor que la de los analgésicos más potentes.

Los salicilatos disminuyen la temperatura corporal elevada. El efecto antipirético es generalmente rápido y efectivo. Aunque la dosis moderada de salicilatos disminuye la temperatura corporal elevada, también aumenta el consumo de oxígeno y el índice metabólico. En dosis tóxicas, estos compuestos tienen un efecto pirético que produce sudoración. Esto aumenta la deshidratación que se produce en la intoxicación por salicilatos.

Los salicilatos se utilizan mucho en medicina y fuera de ella se los emplea en forma indiscriminada. Más de 10.000 casos de intoxicación seria por salicilato se ven en los Estados Unidos anualmente. Algunos de ellos son fatales y muchos se producen en niños. Considerando su abuso y su fácil accesibilidad, la gran frecuencia de reacciones tóxicas al salicilato no es sorprendente, y la droga no debe considerarse como un inofensivo medicamento doméstico.

La ingestión de salicilato puede provocar dificultades epigástricas, náuseas y vómitos. El salicilato puede causar también ulceración gástrica y hasta hemorragia en los animales de experimentación y en el hombre. Aquellos salicilatos ingeridos por vía oral se absorben rápidamente, 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, el salicilato se distribuye en casi todos los tejidos del organismo y en casi todos los líquidos transcelulares, principalmente por procesos pasivos dependientes del pH.

La biotransformación del salicilato tiene lugar en muchos tejidos, pero particularmente en el retículo endoplasmático y mitocondrias hepáticos. Los tres productos metabólicos principales son el ácido salicilúrico, el éter o glucurónido

fenólico, y el éster o acil glucurónido. La excreción se lleva a cabo principalmente por el riñón. Los estudios en el hombre indican que el salicilato se excreta por la orina como ácido salicílico libre (10%), ácido salicílico (75%), glucurónidos de salicílico fenólico (10%) y acílico (5%), y ácido gentísico (< 1%). Sin embargo, la excreción de salicilato libre es sumamente variable y depende de la dosis y del pH urinario.

El gran número de métodos publicados para la determinación de ácido salicílico o ácido acetil salicílico en fluidos biológicos y fármacos, haciendo uso de una gran variedad de técnicas analíticas, no es sólo indicativo del gran interés que presenta la determinación de estos compuestos, sino también de los problemas que se encuentran para encontrar un método que presente buena sensibilidad, selectividad y simplicidad en su determinación.

En bibliografía se han encontrado diferentes métodos para la determinación de ácido salicílico: espectrofotométricos [37, 38], espectrofluorimétricos [39-41], electrodos de membrana líquida [42-44], e inmunoensayos [45]. La determinación de ácido acetil salicílico se realiza normalmente mediante una previa hidrólisis de éste a ácido salicílico, para posteriormente determinar este último. La razón de ello se debe a la fácil tendencia a la hidrólisis del ácido acetil salicílico tanto en disolución como en fase sólida.

La determinación espectrofotométrica en fase sólida acoplada al análisis por inyección en flujo, nos ofrece una serie de ventajas si comparamos con las técnicas utilizadas hasta el momento [46, 47]. Una de las más importantes es la posibilidad de determinar concentraciones de analito mucho más bajas que aquellas que nos permiten métodos automáticos que han sido descritos hasta el momento [48, 49].

Se propone a continuación un sensor que permite la determinación directa de ácido salicílico en preparados farmacéuticos; así como la determinación indirecta de ácido acetil salicílico, para lo cual es necesario introducir en dicho sensor un paso que nos permita la previa hidrólisis de éste a ácido salicílico.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón con una concentración de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de: ácido L(+)-ascórbico (PANREAC R.A.), minoxidil (SIGMA) y ácido salicílico (FLUKA). La disolución de ácido salicílico y de minoxidil se preparan en etanol/agua al 5% (v/v), debido a su baja solubilidad en agua. A partir de las disoluciones patrón se prepararon disoluciones de menor concentración, mediante la adecuada dilución con agua bidestilada. La disolución patrón inicial de ácido ascórbico hay que prepararla a diario, mientras que para el minoxidil y ácido salicílico la estabilidad es al menos de un mes (en frigorífico a 5°C).
- b) Disolución de portador HAc/NaAc (0.04 M), pH=5.6, preparada por disolución de 0.320 g de NaAc (PANREAC R.A.) en agua bidestilada, añadiendo HAc glacial (PANREAC R.A.) hasta ajuste del pH y enrasando finalmente a 100 ml.
- c) Resina de cambio iónico Sephadex QAE A-25 (ALDRICH), en ciclo Cl^- , utilizada sin tratamiento previo.
- d) Resina de cambio iónico Sephadex SP C-25 (ALDRICH), en ciclo H^+ , utilizada sin tratamiento previo.
- e) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- f) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , $\text{H}_2\text{K}_2\text{PO}_4$, NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.05M (PANREAC R.A.).
- g) Disoluciones amortiguadoras: ácido cítrico/citrato sódico, HAc/NaAc, ácido succínico/succinato Na, ácido maléico/maleato Na y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$.

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofotómetro UV-V Lambda 2 de Perkin Elmer controlado por ordenador personal compatible 386, programa PECCS 4.2.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.

- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- f) Cubetas de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz, HELLMA 138-QS.
- g) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.
- h) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.

3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Se registraron los espectros de absorción de los tres analitos en estudio, tanto en disolución acuosa como en fase resina, al pH elegido como óptimo para el desarrollo del sensor. El espectro en disolución acuosa se registró utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz, mientras que el espectro en fase sólida se registró en una cubeta de flujo (de cuarzo, ya que trabajamos en la región UV) de 1 mm de paso de luz Hellma 138-QS. Esta célula, que se esquematiza en la *Figura II-1*, presenta un depósito de 50 μl de volumen interno. Esta cubeta será la que utilizaremos en todos los sensores espectrofotométricos desarrollados en esta tesis doctoral.

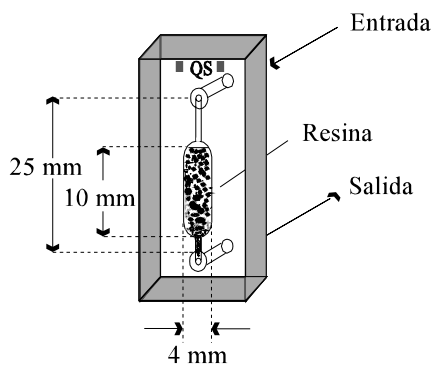


Figura II-1. *Célula de flujo Hellma 138-QS*

3.1. Ácido ascórbico

Se realizaron los espectros de absorción del ácido ascórbico en disolución acuosa y en fase resina a pH=5.6.

El espectro en disolución se obtuvo a partir de una solución de concentración $5 \mu\text{g ml}^{-1}$, en donde el pH se ha ajustado por adición de HCl 0.1M. El espectro se realizó frente a un blanco que no contenía analito, y presenta un máximo a 262 nm.

El espectro en fase resina se obtuvo utilizando la configuración FIA mostrada en la *Fig. II-5*. Como portador se utilizó una disolución amortiguadora HAc/NaAc 0.04M a pH=5.6, en la que se inyectaron $600 \mu\text{l}$ de ácido ascórbico con una concentración de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y deteniendo el flujo cuando se alcanzó la máxima señal. Como microzona activa se utilizó resina Sephadex QAE A-25. El espectro se realizó frente a un blanco correspondiente al portador circulando a través de la resina. El máximo de absorción aparece a 267 nm, observándose por tanto un ligero efecto batocrómico con respecto al espectro en disolución. Ambos espectros aparecen representados en la *Figura II-2*.

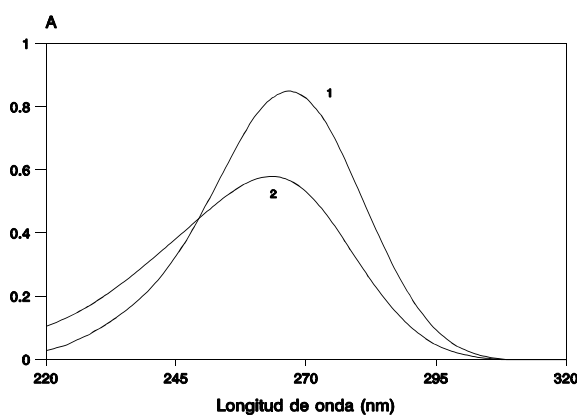


Figura II-2. *Espectros de ácido ascórbico*
[ácido ascórbico]= $5 \mu\text{g ml}^{-1}$
1) Espectro en resina ($V_i=600 \mu\text{l}$)
2) Espectro en disolución

3.2. Minoxidil

En este caso los espectros se registraron a pH=2. El espectro en disolución se obtuvo a partir de una solución de $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ en minoxidil, en donde el pH se ajustó adicionando HCl 0.1M. El espectro mostrado (Fig. II-3) es el neto, al que se le restó un blanco que no contenía analito, presentando un máximo a 282 nm.

Para el espectro en fase resina, en la configuración FIA (Fig. II-5) y utilizando resina Sephadex SP C-25, se inyectaron en la corriente portadora (NaCl 0.05M a pH=2) $600 \mu\text{l}$ de una disolución de $8 \mu\text{g ml}^{-1}$. El espectro neto, obtenido a flujo detenido como en el caso anterior, muestra el máximo de absorción a 289 nm. Una vez más se produce un ligero efecto batocrómico al pasar de una disolución a una fase resina (Figura II-3).

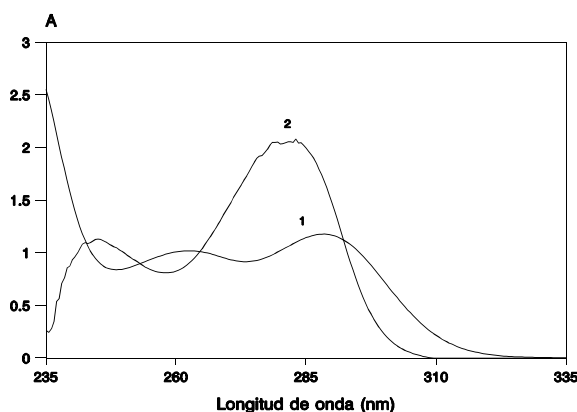


Figura II-3. Espectros de minoxidil
[minoxidil]_{res} = $8 \mu\text{g ml}^{-1}$; [minoxidil]_{dis} = $25 \mu\text{g ml}^{-1}$
1) Espectro en resina ($V_i=600 \mu\text{l}$)
2) Espectro en disolución

3.3. Ácido salicílico

Los espectros recogidos se realizaron a pH=10. Para el espectro en disolución se utilizó una solución con una concentración de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ en ácido salicílico, ajustándose el pH por adición de NaOH 0.1M. El máximo de absorción, previa

sustracción del blanco correspondiente, aparece a 297 nm.

Para el espectro en fase resina, en una disolución 0.08M de NaCl a pH=10, se inyectan 600 μl de disolución con una concentración de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico. La fijación se produce sobre resina aniónica Sephadex QAE A-25, obteniéndose el máximo de absorción a la misma longitud de onda que en disolución, es decir, a 297 nm. Los espectros netos en disolución y en fase sólida se representan en la *Figura II-4*.

Trabajaremos en cada caso con la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción.

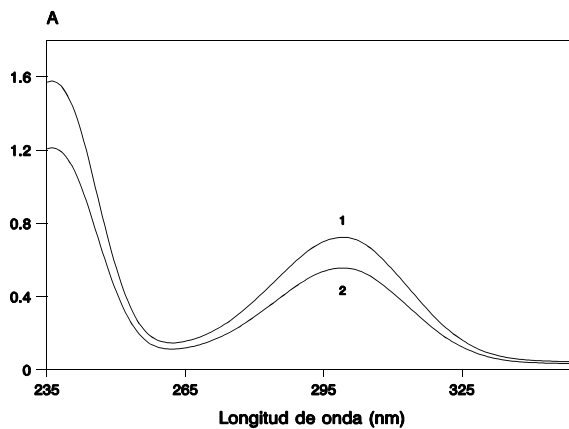


Figura II-4. *Espectros de ácido salicílico*
[ácido salicílico]=20 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1) Espectro en resina ($V_i=600 \mu\text{l}$)
2) Espectro en disolución

Teniendo en cuenta que al realizar los espectros pasamos de utilizar una cubeta de 1 cm de paso de luz en disolución a 1 mm de paso de luz en resina, se produce en los tres casos estudiados un incremento de sensibilidad del orden de 12 a 20 veces cuando se usa el sistema sensor con respecto a la espectrofotometría convencional en disolución.

4. CONFIGURACIÓN FIA

En todos los casos se empleó una sencilla configuración FIA de un solo canal, que se muestra en la *Figura II-5*. El analito se inyecta en una corriente de portador que lo pone en contacto con la microzona activa del sensor. Cuando el final del bolo de muestra alcanza la zona de detección y la señal analítica su valor máximo, el portador, a su vez, actúa de eluyente de forma rápida y efectiva regenerando la zona sensora, lo que hace reutilizable el sensor, que queda así dispuesto para la siguiente muestra.

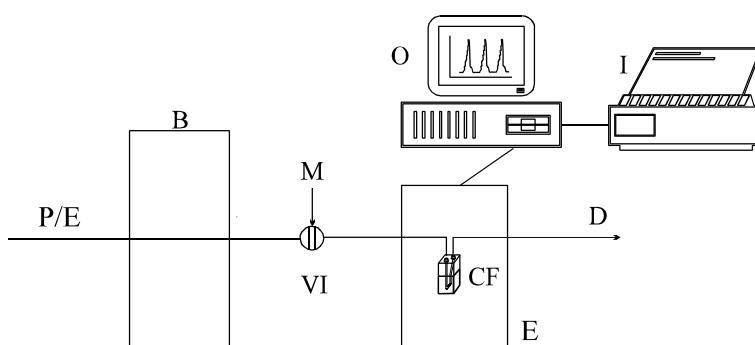


Figura II-5. Configuración FIA

P/E: portador/eluyente; B: bomba; M: muestra; E: espectrofotómetro;
VI: válvula de inyección; CF: célula de flujo; D: desecho; O:
ordenador; I: impresora

Ejemplos de fiagramas obtenidos con cada sensor correspondientes a cada uno de los analitos en estudio, se muestran en las *Figuras II-6.1*, *II-6.2* y *II-6.3*. Para el ácido ascórbico, el fiagrama corresponde a un estudio de calibración. En cambio, para el minoxidil y el ácido salicílico, los fiagramas corresponden al respectivo estudio de la reproducibilidad de cada uno de los analitos en el sensor espectrofotométrico de flujo (para sus condiciones óptimas).

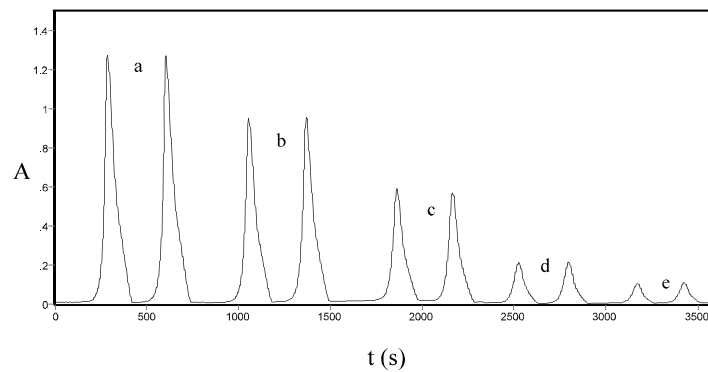


Figura II-6.1. *Fiagrama para ácido ascórbico*
[Ac. ascórbico] ($\mu\text{g ml}^{-1}$): a) 6; b) 5; c) 3; d) 1; e) 0.5
 $V_{\text{inyección}}$: 1000 μl ; Caudal: 1 ml min^{-1} ; $\lambda=267$ nm

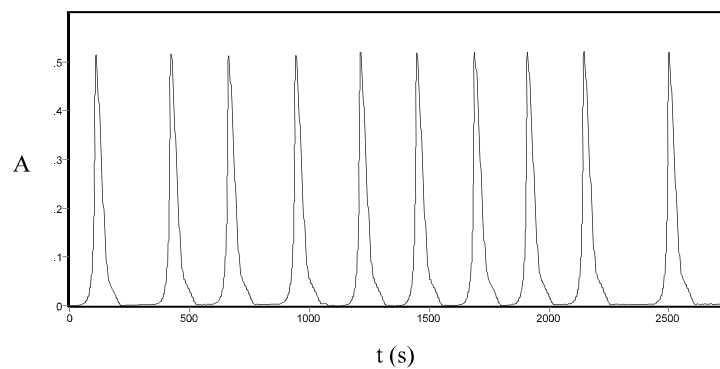


Figura II-6.2. *Fiagrama para minoxidil*
[Minoxidil]=3.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}$: 600 μl ; Caudal: 1.60 ml min^{-1}
 $\lambda=289$ nm

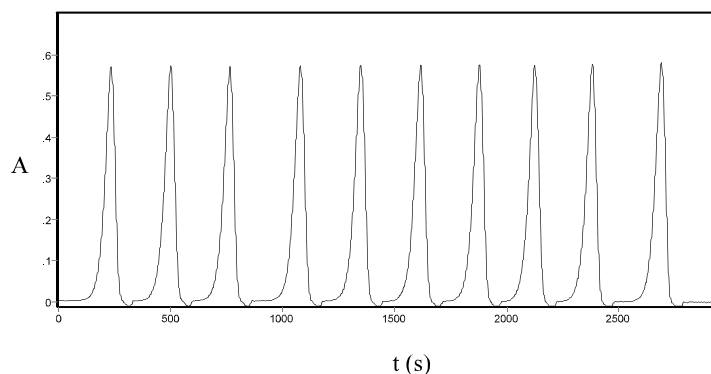


Figura II-6.3. *Fiagrama para ácido salicílico*
[Ac. salicílico]=15 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}$: 600 μl ; Caudal: 1.20 ml min^{-1}
 $\lambda=297 \text{ nm}$

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Podemos considerar tres grupos de variables: químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección. Estas últimas son las primeras que estudiamos.

5.1. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

En este punto va a ser estudiado: naturaleza del soporte sólido y nivel de la resina en la célula de medida.

5.1.1. Naturaleza del soporte sólido

Se optó en todos los casos por un soporte tipo Sephadex, ya que la naturaleza aromática de los cambiadores iónicos tipo Dowex los hace tan poco transparentes en la región UV que resultan incompatibles con este tipo de detección. Se probaron para cada analito resinas aniónicas y catiónicas fuertes y débiles: SP C-25, CM C-25, QAE A-25 y DAE A-25.

Dada la estructura química del ácido ascórbico (ácido carboxílico) y la del ácido salicílico (conteniendo un grupo OH fenólico y un grupo carboxílico COOH), cabe esperar a pH básico la fijación de los mismos sobre un cambiador aniónico; y además, dados los valores del pK_a del ácido ascórbico (4.2 y 11.6) su fijación parcial a pH ácido. Por otro lado, la presencia en la estructura del minoxidil de grupos $-NH_2$ amino y de nitrógenos piridínicos, hacía previsible a pH ácido la fijación sobre un cambiador catiónico.

El cambiador iónico que proporcionó mejores resultados para cada analito, es decir, una señal mayor y una elución mucho más rápida, fue:

- La resina aniónica de base fuerte Sephadex QAE A-25 para la fijación del ácido ascórbico y el ácido salicílico.

- La resina catiónica de ácido fuerte Sephadex SP C-25 para la fijación del minoxidil.

5.1.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

El estudio de esta variable se realizó a través de medidas de la señal analítica que proporciona el sistema a la respectiva longitud de onda óptima, empleando diferentes niveles de la resina (h_r) en la célula de medida. Para los tres analitos la forma de las curvas de absorción frente a la altura de resina (mm) son idénticas. Es por esto, que sólo se representa la curva del estudio de la altura de resina óptima en la célula de flujo correspondiente al ácido ascórbico (*Figura II-7.1*). Como portador/eluyente se utilizó una disolución de HAc/NaAc 0.04M de pH=5.6, el volumen de muestra inyectado fue de 600 μ l, y el caudal de 1 ml min^{-1} .

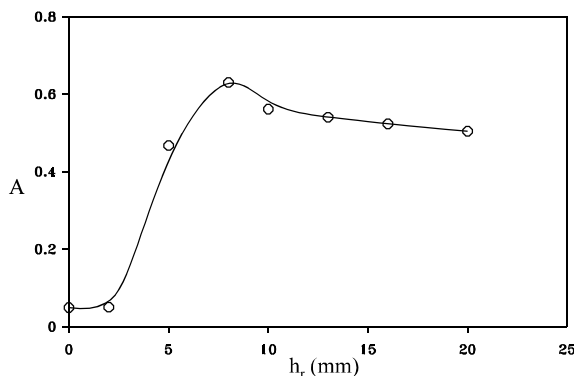


Figura II-7.1. Influencia del nivel de resina en la célula
[ácido ascórbico]=5 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Se observa que la absorbancia va aumentando hasta un valor máximo, que se produce cuando la cantidad de resina es suficiente para que todo el haz de luz pase a su través (8 mm); para cantidades mayores de resina la absorbancia disminuye debido a la dilución del analito en la resina, de modo que parte del mismo se fija en una zona de la resina que no coincide con la zona irradiada (Figura II-7.2), sino que se encuentra situada por encima de ésta (ensanchamiento de banda). Este resultado es similar al encontrado en el estudio de otros sistemas en nuestro laboratorio [53, 54]. Se elige la altura correspondiente al bulbo casi completo (10 mm) por comodidad y reproducibilidad a la hora de llenar la cubeta.

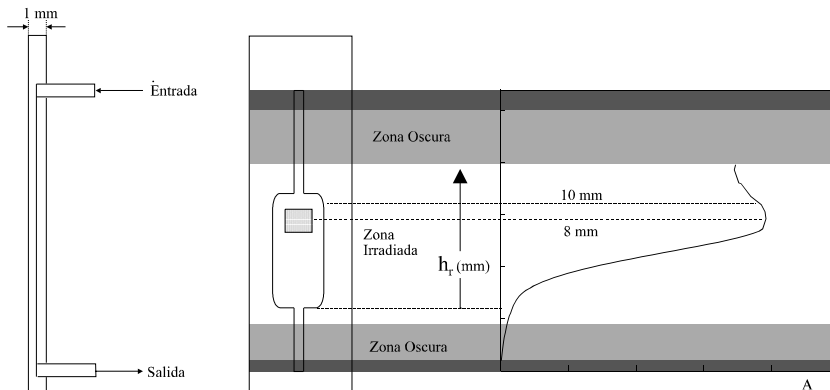


Figura II-7.2. Esquema de la célula de flujo en relación con la influencia del nivel de resina

5.2. VARIABLES QUÍMICAS

Se consideran variables químicas: el estudio de la naturaleza y concentración óptima de portador/eluyente, así como la influencia del pH del mismo y el de la muestra.

Durante el estudio de las variables químicas se mantienen fijas las variables FIA:

✎ **Ácido ascórbico** ⇨ Caudal: 1.0 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 µl

✎ **Minoxidil** ⇨ Caudal: 1.6 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 µl

✎ **Ácido salicílico** ⇨ Caudal: 1.2 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 µl

5.2.1. pH del portador/eluyente y de la muestra

Para estudiar el pH óptimo de fijación/elución en estos sistemas, se prepararon distintas disoluciones con una concentración constante de sales (NaCl 0.05M) pero diferentes valores de pH (mediante adición de la cantidad necesaria de HCl o NaOH 0.1M). Al inyectar el analito, se registró la señal a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para unas concentraciones de 5, 2 y 20 µg ml⁻¹ de ácido ascórbico, minoxidil y ácido salicílico, respectivamente. Los resultados obtenidos aparecen representados en las Fig. II-8.1, II-8.2 y II-8.3.

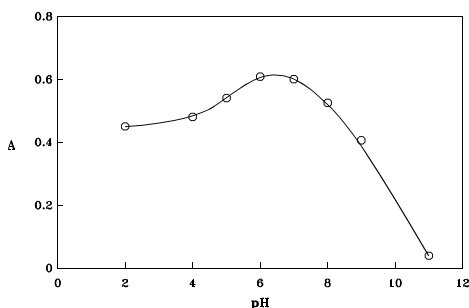


Figura II-8.1. Influencia del pH del portador para el ácido ascórbico

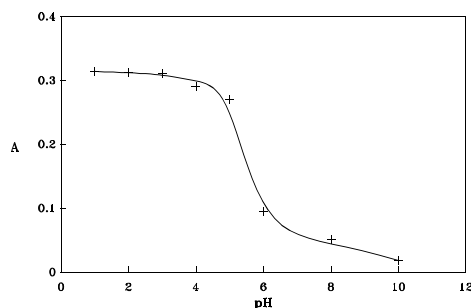


Figura II-8.2. Influencia del pH del portador para el minoxidil

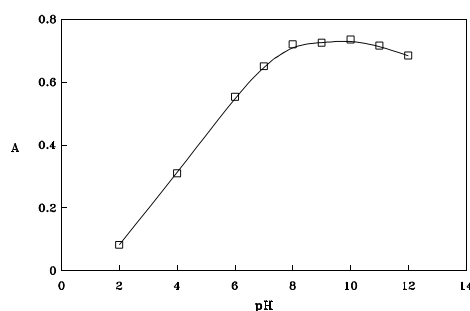


Figura II-8.3. *Influencia del pH del portador para el ácido salicílico*

Para el ácido ascórbico la señal máxima se obtiene para un valor de $\text{pH}=5.6$. El pK_1 del ácido ascórbico tiene un valor de 4.1, por lo que a partir de este valor predomina la forma desprotonada y éste permite la consecuente fijación sobre el cambiador aniónico. Elegimos el valor de $\text{pH}=5.6$ como óptimo para próximas experiencias.

Para el minoxidil, a partir de $\text{pH}=5$ la fijación sobre la resina catiónica disminuye en gran medida. Este comportamiento se debe, a que la fijación tiene lugar como consecuencia de la protonación de los N piridínicos y/o de los grupos amino. A la vista de los resultados, se eligió 2 como pH óptimo de trabajo, siendo éste el empleado en las experiencias sucesivas.

En el caso del ácido salicílico se comprueba cómo a partir de $\text{pH}=8$ la fijación del analito sobre la resina es máxima. Esto es lógico, puesto que a pH ya ácido se produce la desprotonación del grupo carboxílico y después la del grupo fenólico, favoreciéndose de este modo la fijación del analito sobre la resina aniónica Sephadex QAE A-25. Se escoge 10 como pH óptimo de trabajo en las sucesivas experiencias.

Asimismo también se estudió la influencia del pH de la muestra para valores de concentración idénticos a los estudiados anteriormente en este mismo apartado, mediante modificación del pH con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1M. Se comprobó que para valores de pH comprendidos entre 3-10, 1-8 y 3-11 para ácido ascórbico, minoxidil y ácido salicílico, respectivamente, no se producían diferencias significativas en los valores de absorbancia. Dado que es de

esperar que el pH de las muestras objeto de análisis esté comprendido en este rango, no será necesario un control estricto de esta variable.

5.2.2. Naturaleza y concentración del portador/eluyente

Una vez elegido el pH óptimo de trabajo, se estudió la influencia de la naturaleza de la disolución utilizada como portador/eluyente, así como su concentración. Se observó que trabajando a valores de pH muy ácidos o básicos (minoxidil y ácido salicílico), las mejores características tanto como portador así como de eluyente las presentaban disoluciones de electrolitos ajustadas al valor de pH correspondiente con HCl o NaOH respectivamente. En cambio, trabajando para valores de pH intermedios (como es el caso del ácido ascórbico) se conseguían mejores resultados con el uso de disoluciones amortiguadoras.

Para la determinación de ácido ascórbico fueron probadas las siguientes disoluciones amortiguadoras (pH=5.6, $c_T=0.1M$): ácido cítrico/citrato sódico, HAc/NaAc, ácido succínico/succinato Na, ácido maléico/maleato Na y KH_2PO_4/K_2HPO_4 . De todas ellas, la que dio mejores resultados fue la disolución tampón HAc/NaAc. Para estudiar la influencia de la concentración de portador/eluyente, se prepararon disoluciones de HAc/NaAc a pH=5.6, de concentraciones comprendidas entre 0.02 y 0.12M, para una concentración de ácido ascórbico de $5 \mu g ml^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura II-9.1*.

Para el minoxidil y el ácido salicílico se emplearon disoluciones portadoras de diferentes electrolitos de concentración 0.05M ajustadas al pH de trabajo (en el caso del minoxidil, una concentración 0.05M en el catión). Los electrolitos utilizados en estas disoluciones portadoras fueron los siguientes: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , HK_2PO_4 , $Na_2B_4O_7$ y $NaNO_3$. De todos ellos el NaCl proporcionó los mejores resultados en ambos casos. Para estudiar la influencia de su concentración en la respuesta del sensor, en el caso del minoxidil, se prepararon disoluciones de NaCl a pH=2 de concentraciones comprendidas entre 0.02-0.1M para una concentración de minoxidil de $2 \mu g ml^{-1}$. Para el ácido salicílico, las concentraciones de NaCl a pH=10 estaban comprendidas entre 0.02-0.15M, para la determinación de una concentración de $20 \mu g ml^{-1}$ de dicho ácido. Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras II-9.2 y II-9.3*.

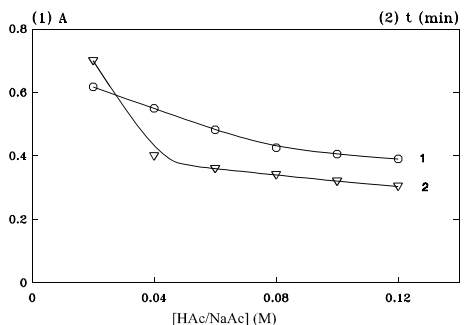


Figura II-9.1. Efecto de la concentración del portador/eluyente para ácido ascórbico

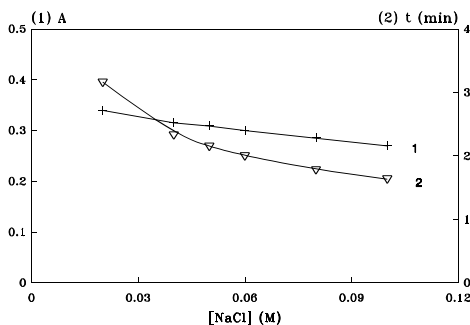


Figura II-9.2. Efecto de la concentración del portador/eluyente para minoxidil

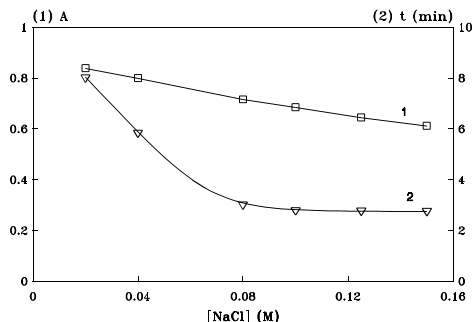


Figura II-9.3. Efecto de la concentración del portador/eluyente para ácido salicílico

En todos los casos, al incrementarse la fuerza iónica de la disolución utilizada como portador/eluyente, disminuye la señal analítica, debido a la mayor competencia de los iones del portador por los sitios activos de la resina; pero también disminuye el tiempo de desarrollo de la señal analítica, permitiendo así mayor frecuencia de muestreo. Es necesario, por tanto, adoptar una solución de compromiso que proporcione no sólo una buena respuesta del sensor, sino también una velocidad de muestreo aceptable. Así se estimó en 0.04M la concentración óptima de HAc/NaAc para la determinación de ácido ascórbico; mientras que la concentración escogida de NaCl a pH=2 para minoxidil y a pH=10 para ácido salicílico fue, de 0.05 y 0.08M respectivamente.

5.3. VARIABLES FIA

Una vez seleccionadas las variables químicas, se llevó a cabo el estudio de la influencia de las variables del sistema de inyección en flujo, que son: caudal y volumen de inyección de muestra. En todos los casos se utilizaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.

5.3.1. Caudal

El estudio de esta variable se realiza manteniendo constante el diámetro interno de los tubos de la bomba y modificando la velocidad de giro. Las variables químicas se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados.

En los tres sistemas se inyectaron 600 μl de volumen de muestra, siendo las concentraciones de 5, 2 y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para ácido ascórbico, minoxidil y ácido salicílico, respectivamente. Los resultados se muestran en las Figuras II-10.1, II-10.2 y II-10.3.

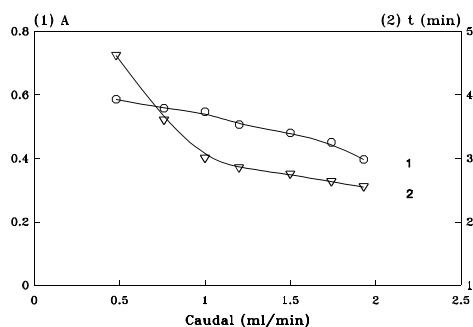


Figura II-10.1. Influencia del caudal para ácido ascórbico

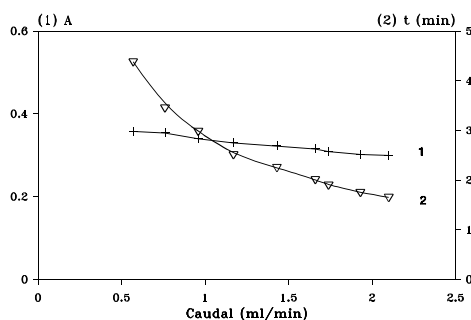


Figura II-10.2. Influencia del caudal para minoxidil

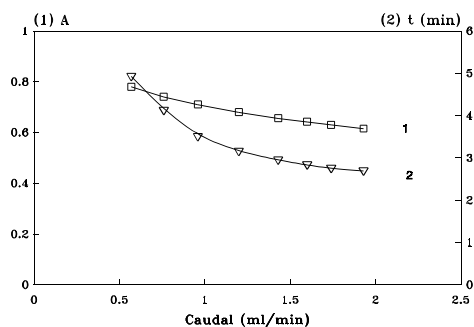


Figura II-10.3. Influencia del caudal para *ác. salicílico*

Para todos los sistemas se observa que al aumentar la velocidad de la bomba (es decir, el caudal) disminuye la absorbancia del pico, debido a una menor fijación del analito en la resina (lo que a su vez indica que la cinética del proceso de fijación no es muy rápida), pero a su vez lógicamente también disminuye el tiempo de elución (o anchura de pico, que es lo que aparece representado en la escala (2) en las Figuras II-10.1, II-10.2 y II-10.3), produciendo por tanto un aumento en la frecuencia de muestreo. Ante este hecho se adopta una solución de compromiso, que se estimó en una velocidad de flujo de 1, 1.6 y 1.2 ml min⁻¹ para ácido ascórbico, minoxidil y ácido salicílico, respectivamente.

5.3.2. Volumen de inyección

Una vez fijados todos los parámetros anteriores, sólo nos resta obtener el volumen de muestra a inyectar. Para dicho estudio se insertan en el sistema bucles de muestra de volúmenes variables, permaneciendo constante la concentración de analito que se inyecta. Las Figuras II-11.1, II-11.2 y II-11.3 muestran el efecto de esta variable sobre la señal analítica, para unas concentraciones de 5, 2 y 10 µg ml⁻¹ de ácido ascórbico, minoxidil y ácido salicílico, respectivamente.

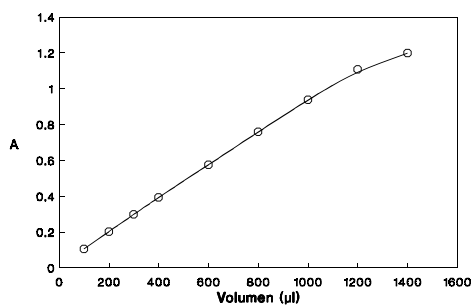


Figura II-11.1. Volumen de muestra para *ác. ascórbico*

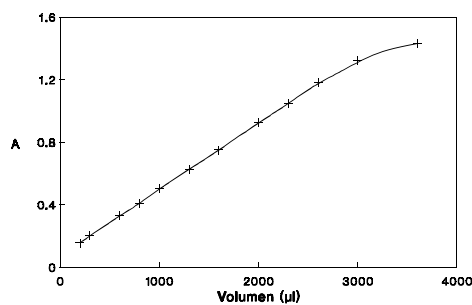


Figura II.11.2. Volumen de muestra para *minoxidil*

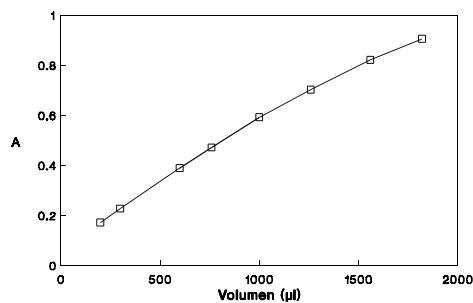


Figura II-11.3. Volumen de muestra para *ác. salicílico*

Según los resultados obtenidos se observa que, al aumentar el volumen de muestra, la absorbancia aumenta debido a la fijación de una mayor cantidad del analito sobre la misma masa de resina (microzona activa). Esto ofrece la ventaja de poder trabajar con amplios márgenes de concentración de analito variando simplemente el volumen de inyección, previa calibración del sensor para el volumen adecuado de muestra. Obviamente, para volúmenes altos de inyección, la frecuencia de muestreo disminuye apreciablemente.

Para el ácido ascórbico y ácido salicílico se encuentra una linealidad entre la señal analítica y el volumen hasta un valor de éste de 1000 μl ; para el minoxidil esta linealidad se mantiene hasta un volumen de 3000 μl . Para los tres analitos, la señal ya no sigue aumentando linealmente al aumentar el volumen, posiblemente debido, por una parte, a que el pH de la zona central del bolo de muestra no es el óptimo para la fijación del analito, y por otra, a la desorción de

parte del analito fijado por un proceso de autoelución, dando lugar a un progresivo ensanchamiento de los picos.

Para conseguir por una parte buena frecuencia de muestreo, y por otra, buena sensibilidad y amplios márgenes de calibración, se han escogido para cada sistema tres volúmenes de inyección con los que se ha calibrado cada sensor. Para el ácido ascórbico y el ácido salicílico se han calibrado volúmenes de 300, 600 y 1000 μl ; mientras que para el minoxidil, se calibraron volúmenes de 600, 1000 y 2000 μl .

5.4. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se relacionan las condiciones óptimas, incluidas las variables químicas y FIA, de cada uno de los sensores en estudio.

	<i>Ácido Ascórbico</i>	<i>Minoxidil</i>	<i>Ácido Salicílico</i>
λ (nm)	267	289	297
Soporte sólido	Seph. QAE A-25	Seph. SP C-25	Seph. QAE A-25
Nivel de soporte (mm)	10	10	10
Portador/eluyente	HAc/NaAc 0.04M (pH=5.6)	NaCl 0.05M (pH=2)	NaCl 0.08M (pH=10)
pH de la muestra	3-10	1-8	3-11
Caudal (ml min^{-1})	1.0	1.6	1.2
Volumen de muestra (μl)	300, 600 y 1000	600, 1000 y 2000	300, 600 y 1000

6. CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES. PARÁMETROS ANALÍTICOS

6.1. Calibración de los sensores

Para comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, se inyectaron para un mismo volumen de muestra distintas concentraciones de analito. Dado que se han calibrado tres volúmenes de muestra para cada sensor, en las Figuras II-12.1, II-12.2 y II-12.3 aparece la representación gráfica de tres rectas de calibrado para cada uno de ellos. Las variables químicas y FIA de cada uno de los sensores se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, mientras que los rangos lineales para cada una de las rectas aparecen en las Tablas II-2.1, II-2.2 y II-2.3.

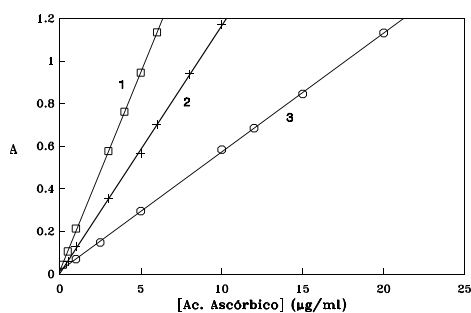


Figura II-12.1. Rectas de calibrado para ácido ascórbico
1) 1000 µl 2) 600 µl 3) 300 µl

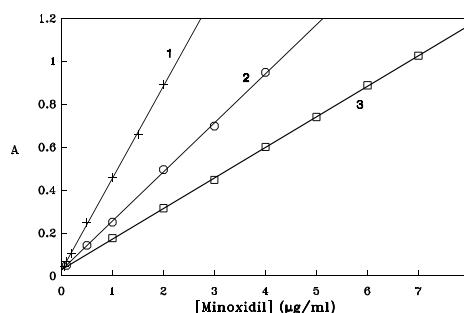


Figura II-12.2. Rectas de calibrado para minoxidil
1) 2000 µl 2) 1000 µl 3) 600 µl

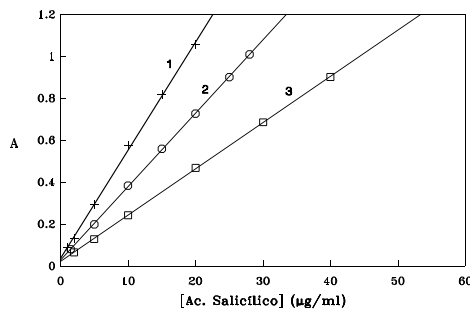


Figura II-12.3. Rectas de calibrado para ácido salicílico
1) 1000 µl 2) 600 µl 3) 300 µl

Mediante ajuste por mínimos cuadrados, se obtienen las siguientes ecuaciones de las rectas para los diferentes volúmenes de inyección:

✓Ácido ascórbico

✎ Volumen: 300 µl	$A = 0.013 + 0.056 c$	$r=0.9998$
✎ Volumen: 600 µl	$A = 0.002 + 0.116 c$	$r=0.9997$
✎ Volumen: 1000 µl	$A = 0.014 + 0.186 c$	$r=0.9999$

✓Minoxidil

✎ Volumen: 600 µl	$A = 0.028 + 0.143 c$	$r=0.9998$
✎ Volumen: 1000 µl	$A = 0.026 + 0.229 c$	$r=0.9995$
✎ Volumen: 2000 µl	$A = 0.024 + 0.430 c$	$r=0.9997$

✓Ácido salicílico

✎ Volumen: 300 µl	$A = 0.021 + 0.022 c$	$r=0.9999$
✎ Volumen: 600 µl	$A = 0.029 + 0.035 c$	$r=0.9998$
✎ Volumen: 1000 µl	$A = 0.037 + 0.051 c$	$r=0.9998$

donde :

A: absorbancia

c: concentración de analito ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

r: coeficiente de correlación

6.2. Parámetros analíticos

Con objeto de evaluar la *reproducibilidad* de cada uno de los sensores, se inyectaron diez disoluciones que contenían igual concentración de analito, registrándose la respuesta del sensor a la longitud de onda óptima. Los resultados obtenidos, se muestran en las *Tablas II-3.1, II-3.2, II-4.1, II-4.2, II-5.1 y II-5.2* del *Apéndice*.

Para la *determinación del límite de detección y cuantificación*, se inyectó repetidas veces agua destilada en lugar de la disolución de muestra, midiéndose la absorbancia de diez inyecciones sucesivas. Los resultados se muestran en las *Tablas II-3.3, II-4.3 y II-5.3* del *Apéndice*.

Mediante un estudio estadístico de los resultados, se obtienen los valores de la desviación estándar relativa y límites de detección y cuantificación.

El límite de detección para una magnitud, es el valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero. En nuestro caso la magnitud medida es la absorbancia neta del analito, A . Denominaremos A_L al límite de detección, de esta magnitud, el cual corresponde a la incertidumbre sobre el valor de A cuando ésta tiende a cero. Según el caso, A_L es igual bien al límite de sensibilidad del aparato de medida, bien a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos, o bien, a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando A es igual a A_L , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido A cumple:

$$0 \leq A \leq A_b + 3\sigma$$

donde:

A_b : absorbancia media obtenida para el blanco

σ : desviación estándar para el blanco

Se admite como límite de detección el valor [50]:

$$A_L = A_b + 3\sigma$$

El límite de detección en términos de concentración, c_L , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (A_L - A_b) / m = 3\sigma / m$$

siendo m la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal medida (en nuestro caso la absorbancia neta, A) crece por encima del límite de detección, crece la concentración aparente del analito. Como criterio mínimo, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

Se admite la siguiente definición [51]:

$$A_Q = A_b + 10\sigma$$

donde:

A_Q : absorbancia correspondiente al límite de cuantificación.

A_b : absorbancia obtenida para el blanco.

σ : desviación estándar para el blanco.

El límite de cuantificación en términos de concentración, c_Q , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$c_Q = (A_Q - A_b)/m = 10\sigma/m$$

donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Los parámetros analíticos de cada uno de los sensores, para cada volumen de muestra inyectado, se muestran en las *Tablas II-2.1, II-2.2 y II-2.3*.

Tabla II-2.1. *Parámetros analíticos para ácido ascórbico*

Parámetro	Volumen de inyección de muestra (μl)		
	300	600	1000
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	0.013	0.002	0.014
<i>Pendiente ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$)</i>	0.056	0.116	0.187
<i>Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	1.0-20.0	0.5-10.0	0.2-6.0
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9998	0.9997	0.9999
<i>Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.04	0.03	0.02
<i>Límite de cuantificación ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.13	0.10	0.06
<i>RSD % (n=10)</i>	0.87	1.08	0.90
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	28	24	21

Tabla II-2.2. *Parámetros analíticos para minoxidil*

Parámetro	Volumen de inyección de muestra (μl)		
	600	1000	2000
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	0.028	0.026	0.024
<i>Pendiente ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$)</i>	0.143	0.229	0.430
<i>Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.2-7.0	0.1-4.0	0.05-2.0
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9998	0.9995	0.9997
<i>Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.06	0.03	0.01
<i>Límite de cuantificación ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.20	0.11	0.02
<i>RSD % (n=10)</i>	0.52	1.06	2.63
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	26	22	16

Tabla II-2.3. *Parámetros analíticos para ácido salicílico*

Parámetro	Volumen de inyección de muestra (μl)		
	300	600	1000
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	0.021	0.029	0.037
<i>Pendiente ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1}$)</i>	0.022	0.035	0.051
<i>Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	2.0-40.0	1.5-28.0	1.0-20.0
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9999	0.9998	0.9998
<i>Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.13	0.08	0.06
<i>Límite de cuantificación ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.45	0.27	0.21
<i>RSD % (n=10)</i>	0.38	0.47	0.52
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	25	22	18

Cada sensor tiene una vida media operacional superior a 250 inyecciones de muestra. Asimismo, la frecuencia de muestreo para todos sensores es relativamente alta si tenemos en cuenta que estamos trabajando en fase sólida.

7. INTERFERENCIAS

Una vez realizadas las experiencias necesarias para establecer el método de determinación automática de ácido ascórbico, minoxidil, y ácido salicílico, basado en la integración de la retención y la detección UV, pasamos a determinar la interferencia producida en cada uno de ellos por la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas. Se han seleccionado, como posibles interferentes, aquellas especies que más frecuentemente acompañan al analito en estudio, en las preparaciones farmacéuticas (o en muestras reales tales como la orina). En el caso del minoxidil no se ha realizado dicho estudio por una causa justificada, y es que dicho analito, en las preparaciones farmacéuticas, no aparece acompañado por otras especies que pudiesen interferir en su determinación.

Siguiendo con el método propuesto para un volumen de inyección de 600 μl (tanto para el ácido ascórbico como para el ácido salicílico), operamos con disoluciones que para cada especie extraña contienen 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico o 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico. A dichas disoluciones se añaden cantidades variables de la especie cuyo efecto se quiere ensayar. La concentración máxima de especie interferente ensayada fue de 1000 mg l^{-1} .

Se aceptó como límite de tolerancia para la especie extraña, la concentración de ésta que originaba un error relativo en la medida mayor del 5%. No se consideran por tanto interferentes, aquellas concentraciones de especie extraña que producen un error relativo igual o menor al mencionado límite. Los límites de tolerancia del analito para las diferentes especies ensayadas aparecen en las *Tablas II-6.1 y II-6.2*.

Tabla II-6.1. *Tolerancia del sensor de ácido ascórbico a especies interferentes*
(determinación de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico)

Especie extraña	Tolerancia ($\mu\text{g ml}^{-1}$) [interferente] / [analito]
Glucosa, sacarosa	>200 ^a
Mg(II), Ca(II), Na(I), K(I), Cl ⁻	>100 ^a
Ácido glutámico	30
Vitamina B ₁ , Vitamina B ₆ , Vitamina B ₁₂	>20 ^a
Cafeína, Paracetamol	20
Codeína	15
Ácido cítrico	6
Ácido úrico	2
Sacarina	1.5
Urea	1

^a Máxima relación interferente/analito ensayada

Tabla II-6.2. *Tolerancia del sensor de ácido salicílico a especies interferentes*
(determinación de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico)

Especie extraña	Tolerancia ($\mu\text{g ml}^{-1}$) [interferente] / [analito]
Glucosa, Sacarosa, Ácido bórico, Codeína, Cafeína, Nicotinamida	>100 ^a
Ácido láctico	50
Alcanfor	10
Betametasona	5
Paracetamol, Ácido ascórbico, Sacarina	1
Benzocaína	0.5

^a Máxima relación interferente/analito ensayada

Para el ácido ascórbico, en general, la tolerancia es muy buena a todas las especies ensayadas excepto para la sacarina y la urea, que interfieren en concentraciones del orden de las del propio analito. Lo mismo ocurre para el ácido salicílico, en cuyo caso, los interferentes más serios son el paracetamol, ácido ascórbico, sacarina y benzocaína, debido a su competencia con el analito en la fijación sobre la resina. Sin embargo, tanto en la determinación de ácido ascórbico así como en la de ácido salicílico, las cantidades presentes de estas

especies más fuertemente interferentes en las preparaciones farmacéuticas más comunes son inferiores a su tolerancia y permiten la determinación del analito haciendo uso del sensor, pues están por debajo del nivel de tolerancia establecido.

En general, la selectividad mostrada por los sensores espectrofotométricos UV en fase sólida, es mucho más alta que la ofrecida por la espectrofotometría UV convencional en disolución. Esto es una gran ventaja de estos sensores, pues se convierten así en métodos simples y rápidos a la vez que económicos y muy sensibles y selectivos a pesar de su naturaleza UV. Como ejemplo de esto, hemos comprobado que en la determinación de ácido ascórbico por espectrofotometría convencional UV en disolución, la tolerancia a paracetamol, codeína y sacarina, es 0.1, 1 y 0.05, respectivamente, tolerancias mucho más bajas que las obtenidas con el sensor en flujo en fase sólida (*Tabla II-6.1*), debido al amplio solapamiento espectral de estas especies con el analito en la espectrofotometría convencional. El empleo del soporte sólido aísla el analito del resto de las especies interferentes que quedan en la disolución, aumentando así drásticamente la tolerancia a las mismas. Así pues, esta alta selectividad se debe a la naturaleza química del cambiador iónico, ya que el soporte necesita que las especies interferentes se encuentren cargadas negativamente (por tratarse de un cambiador aniónico) para que así puedan fijarse sobre él.

En las *Figuras II-13 y II-14* se comprueba la excelente selectividad del método propuesto para la determinación de ácido ascórbico. En la *Figura II-13* se muestran los espectros UV individuales en disolución acuosa, correspondientes a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico, codeína, sacarina y paracetamol, respectivamente, así como una mezcla de ellos a la misma concentración anterior. De la observación de los espectros (realizados en una cubeta de 1-cm de paso de luz) se deduce que sería imposible determinar, en disolución, el ácido ascórbico en presencia del resto de especies. En la *Figura II-14* aparecen registrados los espectros en fase sólida correspondientes a la inyección en el sensor propuesto de dos disoluciones, una de las cuales contiene sólo ácido ascórbico (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y la otra contiene la misma concentración de ácido ascórbico junto con 50, 5 y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de codeína, sacarina y paracetamol, respectivamente. Estos espectros se registraron parando el flujo, en el sensor propuesto, una vez se haya alcanzado la máxima señal de absorbancia en cada una de las inyecciones. Se comprueba, cómo dichas especies extrañas no interfieren en la determinación del ácido ascórbico, puesto que los espectros

obtenidos en ambos casos son coincidentes. De esta forma se demuestra la ventaja, en cuanto a selectividad, de trabajar con un sensor UV en fase sólida respecto a disolución. Resultados similares se han encontrado trabajando con otros sensores UV en nuestro Departamento [53] y también con espectrofotometría UV en fase sólida en modo batch [18].

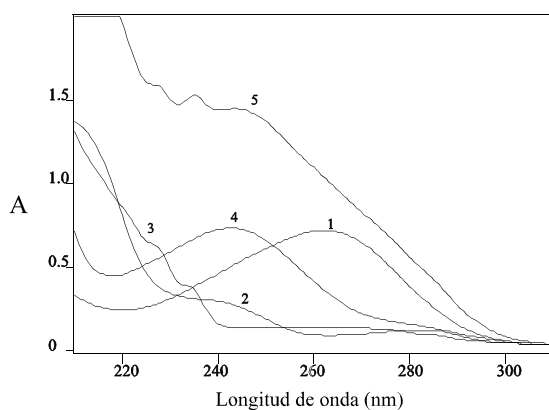


Figura II-13. *Espectros en solución acuosa (1-cm de paso óptico)*

- (1) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico; (2) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de codeína; (3) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de sacarina
(4) $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol; (5) mezcla de todos los compuestos 1,2,3 y 4

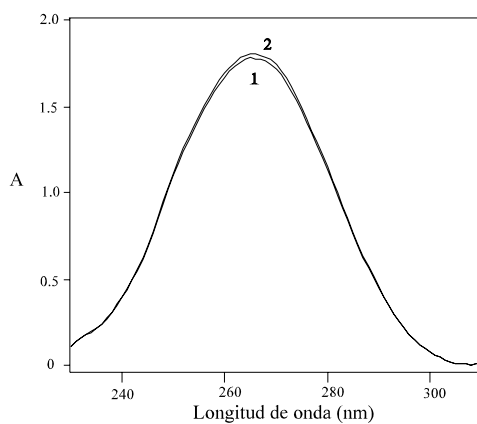


Figura II-14. *Espectros obtenidos en el sensor FIA (1-mm de paso óptico)*

- (1) $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico; (2) Mezcla de: $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de codeína, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de sacarina, y $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol


8. APLICACIONES ANALÍTICAS

8.1. ÁCIDO ASCÓRBICO

El método anteriormente establecido se ha aplicado a la determinación del contenido en ácido ascórbico en los siguientes tipos de muestras:

 *medicamentos*

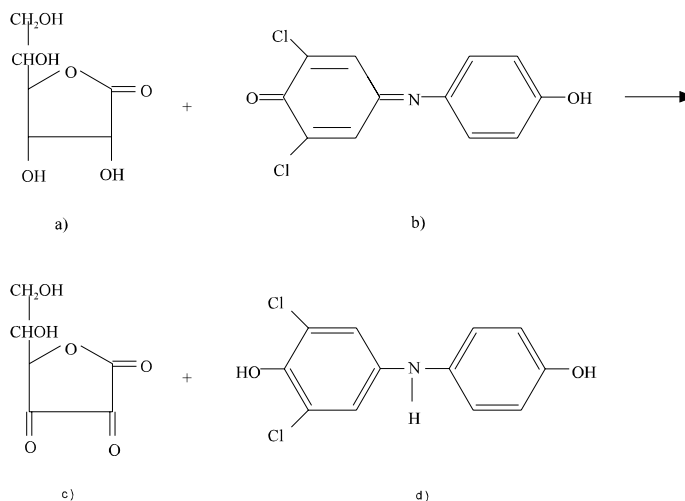
 *caramelos*

 *orina*

En cada caso los resultados se compararon con los obtenidos con un método de referencia. Como tal elegimos el método oficial de la AOAC [52], realizando una comparación estadística entre éste y el método propuesto.

8.1.1. Fundamento del método oficial de la AOAC

El método consiste en una volumetría redox basada en la reducción del 2,6-dicloroindofenol por el ácido ascórbico, siendo el indicador el mismo indofenol (*Reacción 1*). En el punto final, con un pequeño exceso de indofenol, se aprecia un viraje de incoloro a rosa en medio ácido. El ácido es valorado en presencia de $\text{HPO}_3 - \text{CH}_3\text{COOH}$ para mantener la propia acidez de la reacción y evitar la autoxidación del ácido ascórbico a pH altos.



Reacción 1 . (a) Ac. *L*-ascórbico, (b) 2,6-diclorofenolindofenol (forma oxidada),
 © Ac. *Deshidroascórbico* y (d) 2,6-diclorofenolindofenol (forma reducida)

8.1.2. Comparación estadística entre el método propuesto y el de referencia

Una vez determinado el contenido en ácido ascórbico, tanto por el método propuesto como por el método de referencia, se pasó a realizar un estudio estadístico comparativo de la precisión y exactitud de ambos métodos. En cada caso se realizan tres determinaciones.

Para el cálculo de la precisión se aplicó el criterio "F" de la razón de las varianzas para un nivel de significación del 5%, cuya expresión es la siguiente:

$$F_{\text{exp}} = \sigma_1^2 / \sigma_2^2$$

El valor crítico de $F_{0.05} = 39.000$ ($g.l_1 = g.l_2 = 2$).

Para la comparación de los valores medios obtenidos por ambos métodos, se calculó la desviación estándar del sistema, σ , y la t_{exp} a partir de las siguientes expresiones:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \sigma_1^2 + (n_2 - 1) \sigma_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}} \quad t_{\text{exp.}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

El valor de $t_{\text{teór}}$ para un nivel de confianza del 95% y 4 grados de libertad es igual a 2.776.

En los casos en que $t_{\text{exp}} < t_{\text{teór}}$ no habrá diferencia significativa entre los valores de las medias obtenidas por ambos métodos, por lo que podremos afirmar en tal caso que ambos métodos arrojan el mismo resultado para una probabilidad del 95%.

8.1.3. Preparación de las muestras

Las muestras sólidas analizadas fueron finamente molidas en mortero de ágata, homogeneizadas, disueltas en agua bidestilada con ayuda de un baño ultrasonidos (5 minutos), y filtradas a través de filtro Millipore de 0.45 μm , llevando a un volumen final apropiado adecuado con agua bidestilada, según el contenido en ácido ascórbico. En el caso de la orina, se realizó una dilución apropiada con agua bidestilada y se filtró.

En aquellos casos en los que se comprobó que no existía efecto matriz, como es el caso de todas las preparaciones farmacéuticas en estudio así como en los caramelos, se obtuvo la concentración de ácido ascórbico por el método de calibración directa para un volumen de 600 μl . Para la orina, dada la existencia de un pequeño efecto matriz, se aplicó el método de adición de patrón usando igualmente un volumen de inyección de 600 μl .

8.1.4. Determinación de ácido ascórbico

8.1.4.1. En preparaciones farmacéuticas

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Redoxón" (Lab. Roche Nicholas), comprimidos efervescentes
 - Ácido ascórbico: 1000 mg
 - Sacarina sódica: 20 mg
 - Sacarosa: 1305 mg

2. "Citrovit" (Lab. Abello Farmacia), sobres
 - Ácido ascórbico: 1000 mg
 - Sacarosa: 7090 mg
 - Glucosa líquida (R.S): 599 mg
 - Azúcar invertido: 178 mg
 - Otros excipientes: 10 g

3. "Cebión 500" (Lab. Merck), sobres
 - Ácido ascórbico: 500 mg
 - Sacarosa: 420 mg
 - Excipiente aromatizado (incluyendo 7 mg de sacarina sódica)

4. "Algidol" (Lab. Berenguer Infale), sobres
 - Ácido ascórbico: 500 mg
 - Paracetamol: 650 mg
 - Codeína fosfato: 10 mg
 - Excipiente (contiene 2.5 mg de sacarina sódica y 3.714 mg de sacarosa)

Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado por el método propuesto, y su comparación estadística con los del método de referencia, se muestran en las *Tablas II-7.1, II-7.2, II-7.3 y II-7.4*. De ellas se deduce que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el método propuesto y el de referencia.

Tabla II-7.1. Determinación de ácido ascórbico en "Redoxón"
 Disolución: comprim. en 500 ml; Dilución: 0.5 ml llevados a 200 ml

<i>Determinación</i>	<i>A</i>	<i>[Ac. ascórbico]</i> <i>($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>mg Ac. ascórbico/</i> <i>comprimido</i>
1	0.598	4.968	993.6
2	0.568	4.865	973.0
3	0.582	4.985	997.1
<i>Parámetros estadísticos</i>		<i>Método propuesto</i>	<i>Método referencia</i>
Media, \bar{x}		987.9	993.3
Desviación estándar, σ		12.99	4.40
σ^2		168.99	16.30
Desviación de la media, σ_m		7.50	2.33
C.V.(%)		1.31	0.44
E_r (%)		3.26	1.01
Contenido medio		988 \pm 32	993 \pm 10
σ del sistema		9.625	
t_{exp} y significación		0.688	N.S. ($t_{\text{teor}}=2.776$)
F_{exp}		10.367	N.S. ($F_{\text{teor}}=39.00$)

Tabla II-7.2. *Determinación de ácido ascórbico en "Citrovit"*
 Disolución: comprim. en 500 ml; Dilución: 0.5 ml llevados a 200 ml

<i>Determinación</i>	<i>A</i>	<i>[Ac. ascórbico]</i> <i>($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>mg Ac. ascórbico/</i> <i>comprimido</i>
1	0.585	5.011	1002.2
2	0.587	5.028	1005.6
3	0.580	4.968	993.6
<i>Parámetros estadísticos</i>	<i>Método propuesto</i>	<i>Método referencia</i>	
Media, \bar{x}	1000.4	1009.0	
Desviación estándar, σ	6.18	3.46	
σ^2	38.25	12.00	
Desviación de la media, σ_m	3.57	2.00	
C.V.(%)	0.61	0.34	
E_r (%)	1.53	0.85	
Contenido medio	1000 ± 15	1009 ± 9	
σ del sistema		5.012	
t_{exp} y significación	2.086	N.S. ($t_{\text{teor}}=2.776$)	
F_{exp}	3.187	N.S. ($F_{\text{teor}}=39.00$)	

Tabla II-7.3. Determinación de ácido ascórbico en "Cebión 500"

Disolución: comprim. en 500 ml; Dilución: 1 ml llevado a 200 ml

<i>Determinación</i>	<i>A</i>	<i>[Ac. ascórbico]</i> <i>($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>mg Ac. ascórbico/</i> <i>comprimido</i>
1	0.580	4.968	496.8
2	0.583	4.884	499.4
3	0.591	5.062	506.2
<i>Parámetros estadísticos</i>	<i>Método propuesto</i>		<i>Método referencia</i>
Media, \bar{x}	500.8		495.0
Desviación estándar, σ	4.85		1.73
σ^2	23.56		3.00
Desviación de la media, σ_m	2.80		1.00
C.V.(%)	0.97		0.35
E_r (%)	2.40		0.87
Contenido medio	501 \pm 12		495 \pm 4
σ del sistema	3.644		
t_{exp} y significación	1.950 N.S. ($t_{\text{teor}}=2.776$)		
F_{exp}	7.851 N.S. ($F_{\text{teor}}=39.00$)		

Tabla II-7.4. *Determinación de ácido ascórbico en "Algídol"*
 Disolución: comprim. en 500 ml; Dilución: 1 ml llevados a 200 ml

<i>Determinación</i>	<i>A</i>	<i>[Ac. ascórbico]</i> <i>($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>mg Ac. ascórbico/</i> <i>comprimido</i>
1	0.578	4.951	495.1
2	0.583	4.994	499.4
3	0.585	5.011	501.1
<i>Parámetros estadísticos</i>	<i>Método propuesto</i>		<i>Método referencia</i>
Media, \bar{x}	498.5		498.0
Desviación estándar, σ	3.09		3.46
σ^2	9.59		12.00
Desviación de la media, σ_m	1.78		3.40
C.V.(%)	0.62		0.35
E_r (%)	1.53		1.73
Contenido medio	499 \pm 18		498 \pm 9
σ del sistema	3.284		
t_{exp} y significación	0.186 N.S. ($t_{\text{teor}}=2.776$)		
F_{exp}	1.251 N.S. ($F_{\text{teor}}=39.00$)		

8.1.4.2. *En caramelos*

Se ha determinado el contenido de ácido ascórbico en caramelos PRAIMS (Limón Plus C), cuya composición es la siguiente: Isomalt (95g/100g), Ácido ascórbico (1250mg/100g), Ácido cítrico, Aroma de limón, Mentol, Edulcorante Acesulfam-K (0.045g/100g) y β -caroteno. A partir de estos datos, cada caramelo contendría unos 25 mg de ácido ascórbico. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla II.8.*

Tabla II-8. *Determinación de ácido ascórbico en caramelos "Praits"*
Disolución: 1 caramelo en 250 ml; Dilución: 0.5 ml llevados a 10 ml

<i>Determinación</i>	<i>A</i>	<i>[Ac. ascórbico]</i> <i>($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	<i>mg Ac. ascórbico/</i> <i>comprimido</i>
1	0.575	4.925	24.6
2	0.578	4.951	24.7
3	0.582	5.985	24.9
<i>Parámetros estadísticos</i>		<i>Método propuesto</i>	<i>Método referencia</i>
Media, \bar{x}		24.7	25.0
Desviación estándar, σ		0.15	0.42
σ^2		0.02	0.17
Desviación de la media, σ_m		0.09	0.24
C.V.(%)		0.63	1.67
E_r (%)		1.54	4.12
Contenido medio		24.7 ± 0.4	25 ± 1
σ del sistema		0.316	
t_{exp} y significación		1.163 N.S. ($t_{\text{teor}}=2.776$)	
F_{exp}		7.333 N.S. ($F_{\text{teor}}=39.00$)	

8.1.4.3. *En orina*

Para el estudio de la determinación de ácido ascórbico en esta muestra se procedió a recoger la orina de un sujeto dos horas después de haberse tomado un sobre del fármaco "Citrovit" (conteniendo 1000 mg de Ac. ascórbico) disuelto en 50 ml de agua. Una vez recogida dicha muestra se filtró, y se hizo la dilución adecuada. Los resultados de la determinación aparecen en la *Tabla II-9*.

Tabla II-9. *Determinación de ácido ascórbico en orina. Método de adición de patrón*
Dilución: 1 ml llevado a 500 ml; $V_{\text{inyección}}$: 600 μl .

$\mu\text{g ml}^{-1}$ Ác. asc. añadidos	A	Función	$\mu\text{g ml}^{-1}$ encontrados	$\mu\text{g ml}^{-1}$ en orina
1ª Determinación				
0	0.230			
1	0.330	A = 0.227 + 0.107c r = 0.9996	2.12	1060
2	0.446			
3	0.540			
5	0.765			
2ª Determinación				
0	0.229			
1	0.331	A = 0.226 + 0.106c r = 0.9997	2.14	1069
2	0.442			
3	0.537			
5	0.760			
3ª Determinación				
0	0.233			
1	0.327	A = 0.227 + 0.107c r = 0.9995	2.11	1055
2	0.447			
3	0.542			
5	0.768			

En la *Figura II-15* se representa sólo una de las determinaciones anteriores (la primera), en donde ha sido aplicado el método de adición de patrón, ya que las rectas obtenidas para las otras dos determinaciones son prácticamente iguales.

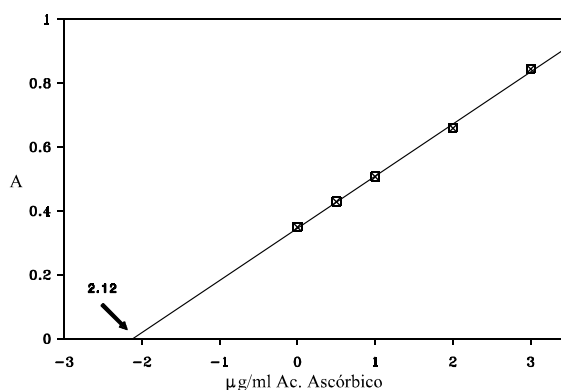


Figura II-15. Determinación de ácido ascórbico en orina
Adición de patrón. 1ª Determinación

Asimismo, y al igual que en los casos anteriores, se procedió a hacer una comparación estadística entre los resultados obtenidos por el método propuesto y aquellos obtenidos por el método de referencia (Tabla II-10).

Tabla II-10. Comparación estadística

Parámetros estadísticos	Método propuesto	Método referencia
\bar{x}	1061	1050
Desviación estándar σ	7.09	4.32
σ^2	50.26	15.66
Desviación de la media σ_m	4.09	2.49
C.V.(%)	0.67	0.41
Er(%)	1.66	1.02
Contenido medio	1061 ± 18	1050 ± 11
σ del sistema	5.870	
t_{exp} y significación	2.290 N.S. ($t_{teor}=2.776$)	
F_{exp}	2.693 N.S. ($F_{teor}=39.00$)	

Del valor de la relación de pendientes entre el método de adición de patrón y el propuesto se deduce la existencia de un efecto matriz negativo que viene dado por la siguiente expresión:

$$\text{relación (m/m}_{\text{método}}) = 0.107 / 0.116 = 0.922$$

Asimismo, se realizó un estudio de recuperación de diferentes cantidades de ácido ascórbico sobre la misma muestra de orina (*Tabla II-11*).

Tabla II-11. *Estudio de recuperación en orina*

añadido ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	encontrado $\pm \sigma$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	% Recuperado
-	2.12 ± 0.03	-
1	3.07 ± 0.04	98.4
2	4.11 ± 0.02	99.8
3	5.06 ± 0.03	98.8

Los resultados del estudio de recuperación muestran, asimismo, porcentajes entre el 98 y el 100%, lo que pone de manifiesto la utilidad del sensor propuesto para el control analítico de rutina en estos tipos de muestras. En ninguna de las muestras analizadas se encontró diferencia significativa entre el método de referencia y el propuesto.

8.2. MINOXIDIL

Mediante el método propuesto se ha determinado la cantidad de minoxidil en diferentes preparaciones farmacéuticas.

8.2.1. Preparación de las muestras

Se procedió de diferente forma en función de que se tratase de comprimidos ó soluciones.

Para los comprimidos, se pesaron y molieron cuatro de ellos en un mortero de ágata, y se disolvió una cantidad de muestra equivalente a 10 mg de minoxidil en 5 ml de etanol 96% v/v (para facilitar la disolución), con ayuda de un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. La solución se filtró a través de filtro Millipore de 0.45 μm de tamaño de poro, y se realizaron las diluciones adecuadas con agua

bidestilada (usando etanol de 96% v/v para que el contenido final en etanol fuese del 5%).

Respecto a las soluciones farmacéuticas, todas ellas de concentración 2% p/v, se disolvieron en agua bidestilada sin tratamiento previo y se realizaron las diluciones adecuadas (usando etanol de 96% v/v para que el contenido final en etanol fuese del 5%).

En todos los casos se comprobó que no existía efecto matriz, de modo que se obtuvo la concentración de minoxidil por el método de calibración directa para un volumen de 1000 μ l.

8.2.2. Determinación de minoxidil

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Loniten" (Lab. Upjohn), comprimidos
 - Minoxidil: 10 mg
 - Lactosa y otros excipientes c.s.

2. "Lacovin" (Lab. Galderma), solución
 - Minoxidil: 20 mg/ml
 - Excipientes c.s.

3. "Pilovital" (Lab. Lesvi), solución
 - Minoxidil: 20 mg/ml
 - Excipientes c.s.

4. "Regaine" (Lab. Upjohn Farmoquímica), solución
 - Minoxidil: 20 mg/ml
 - Excipientes c.s.

5. "Riteban" (Lab. Centrum), solución
 - Minoxidil: 20 mg/ml
 - Excipientes c.s.

Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado, media de tres determinaciones independientes, se muestran en la siguiente *Tabla II-12*.

Tabla II-12. *Determinación de minoxidil en preparaciones farmacéuticas*

Fármaco	Composición (mg)/unidad	Encontrado (mg)/unidad	Recuperación $\pm \sigma_r$ (%) ^c
Loniten	^a 10.0	9.8	98 \pm 1
Lacovin	^b 20.0	20.6	103 \pm 1
Pilovital	^b 20.0	20.5	103 \pm 1
Regaine	^b 20.0	20.3	101.7 \pm 0.8
Riteban	^b 20.0	19.8	99.0 \pm 0.9

^a por comprimido; ^b por ml; ^c media de tres determinaciones

Se observa que no hay diferencia apreciable entre los resultados obtenidos por el método propuesto y los indicados por el fabricante, ya que en todos los casos la recuperación se encuentra comprendida entre el 98 y el 103%. Además, para chequear la exactitud del método propuesto, se determinó la cantidad de minoxidil añadido a los fármacos previamente analizados (*Tabla II-13*), es decir, se llevó a cabo un estudio de recuperación de distintas cantidades sobre los anteriores fármacos obteniéndose igualmente resultados satisfactorios.

Tabla II-13. *Estudio de recuperación de minoxidil en preparaciones farmacéuticas*

Muestra	Añadido	% Recuperación $\pm \sigma_r$ (%) ^a
Loniten	1 ^b	98.2 \pm 0.9
	2 ^b	99.5 \pm 0.9
Lacovin	1 ^c	101 \pm 1
	2 ^c	99.8 \pm 0.8
Pilovital	1 ^c	102 \pm 1
	2 ^c	100 \pm 1
Regaine	1 ^c	101.2 \pm 0.9
	2 ^c	99 \pm 1
Riteban	1 ^c	99.4 \pm 0.9
	2 ^c	99.5 \pm 0.9

^a Media de tres determinaciones; ^b mg/comprimido; ^c mg/ml

8.3. ÁCIDO SALICÍLICO

El método propuesto se aplicó a la determinación de ácido salicílico en diferentes preparaciones farmacéuticas.

8.3.1. Preparación de las muestras

Cada uno de los fármacos se disolvió previamente en 5 ml de etanol 96% v/v y posteriormente en agua bidestilada con ayuda de un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. La solución se filtró a través de filtro Millipore de 0.45 μ m, y se realizaron las diluciones adecuadas con agua bidestilada (usando etanol de 96% v/v para que el contenido final en etanol fuese del 5%).

En el caso del fármaco “Diprosalic”, dado que se trata de un ungüento (solución) en medio no acuoso, se procedió de otra forma operatoria. Se disolvió la muestra en 20 ml de CCl₄, y a continuación, se hizo una extracción líquido-líquido

con agua bidestilada utilizando volúmenes de 25 ml (tres extracciones), llevando finalmente el extracto a un volumen de 100 ml. A partir de esta disolución se realizaron las diluciones adecuadas para obtener una concentración apropiada del analito.

En todos los casos se comprobó que no existía efecto matriz, excepto para uno de los fármacos "Isdín Antiverrugas" (al que se aplicó el método de adición de patrón), de modo que para todos los demás se obtuvo la concentración de ácido salicílico por el método de calibración directa para un volumen de 600 μ l.

8.3.2. Determinación de ácido salicílico

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Callix-D" (Lab. Pérez Giménez), solución
 - Ácido salicílico: 15 g
 - Ácido láctico: 10 g
 - Benzocaína: 3.33g
 - Colodión elástico c.s.p. 100 g

2. "Isdín Antiverrugas" (Lab. Isdín), solución
 - Ácido salicílico: 16.7 g
 - Ácido láctico: 16.7 g
 - Colodión elástico c.s.p. 100 ml

3. "Acnosán" (Lab. Bescansa), solución
 - Ácido salicílico: 1.20 g
 - Alcanfor: 12.8 g
 - Ácido undecilénico: 8.75 g
 - Ácido bórico: 6.45 g
 - Resorcina: 1.94 g
 - Sulfato de Zn: 0.13 g
 - Sulfato de Cu: 0.13 g
 - Vehículo: agua, esencia de menta, edulcorantes (E-150, E-102)

4. "Diprosalic" (Lab. Plough), solución
- Ácido salicílico: 30 mg
 - Betametasona, dipropionato: 0.5 mg
 - Excipientes: Aceite mineral y vaselina

Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado (media de tres determinaciones) se resumen en la *Tabla II-14*. Tal y se como muestra, los valores obtenidos con el método propuesto concuerdan con los indicados por el fabricante.

Tabla II-14 . *Determinación de ácido salicílico en preparaciones farmacéuticas*

Fármaco	Composición (mg)/unidad	Encontrado (mg)/unidad	Recuperación $\pm \sigma_r$ (%)
Callix-D	^a 150.0	146.8	98.0 \pm 2.1
Diprosalic	^a 30.0	30.0	100.1 \pm 0.6
Acnosán	^b 1200.0	1207.6	100.6 \pm 1.4
^c Isdín	^a 167.0	170.1	102.3 \pm 3.2

^a por gramo; ^b por litro; ^c método de adición de patrón

Para chequear la exactitud del método propuesto se llevó a cabo un estudio de recuperación de distintas cantidades de minoxidil adicionadas sobre los anteriores fármacos (*Tabla II-15*), obteniéndose resultados satisfactorios.

Tabla II-15. Estudio de recuperación de ácido salicílico en preparaciones farmacéuticas

Muestra	Añadido	% Recuperación $\pm \sigma_r$ (%) ^a
Callix-D	100 ^b	99.2 \pm 0.8
	200 ^b	98.5 \pm 0.9
Diprosalic	100 ^b	100.1 \pm 0.7
	200 ^b	99 \pm 1
Acnosán	100 ^c	101.1 \pm 0.6
	200 ^c	100.3 \pm 0.5
^a Isdín	100 ^b	99 \pm 1
	200 ^b	99.2 \pm 0.9

^a método de adición de patrón; ^b mg/gramo; ^c mg/l

9. ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO

Dado que el ácido salicílico (AS) es el producto de hidrólisis alcalina del ácido acetil salicílico (AAS), nos planteamos la posibilidad de poder aplicar el método propuesto para el AS en aquellas preparaciones farmacéuticas donde el AAS se encuentra como principio activo, que es la situación más frecuente. Dicha aplicación es posible, con una ligera modificación de la configuración FIA utilizada para la determinación del AS (*Fig. II-5*). Esta configuración viene esquematizada en la *Fig. II-16*, y como puede apreciarse, se trata de una configuración en donde el AAS es previamente hidrolizado a AS para posteriormente poder ser determinado como tal.

La muestra se hace confluír con una disolución de NaOH para favorecer la hidrólisis, pasando dicha muestra a través de un reactor de teflón situado en el interior de un baño termostático en el que se completa la hidrólisis. Después de esto, la muestra se inserta dentro del mismo portador utilizado en la determinación de ácido salicílico.

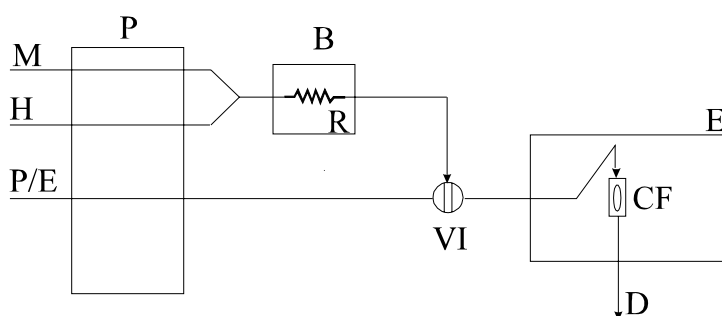


Figura II-16. Configuración FIA

P/E: portador/eluyente; M: muestra; H: solución básica (NaOH); P: bomba; B: baño termostático; R: reactor; VI: válvula de inyección; CF: célula de flujo; D: desecho; E: espectrofotómetro

Viendo el procedimiento a seguir, habrá que optimizar variables tales como: concentración de NaOH, longitud del reactor y temperatura del baño termostático. Se decidió realizar el estudio para un único volumen de muestra a inyectar que va a ser 300 μl . Los resultados obtenidos son los siguientes:

Concentración de NaOH. Haciendo circular una disolución conteniendo 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AAS, a través del reactor de una longitud de 5 metros y calentado a una t° de 70 $^{\circ}\text{C}$, se prueban concentraciones de NaOH de valores 0.2, 0.5, 1, 2, 3 y 5 mol l^{-1} . La señal fue máxima constante para una concentración igual o superior a 2 mol l^{-1} , por lo que probablemente, a menores concentraciones, la hidrólisis no se realizó completamente. Se escogió como óptima una concentración de NaOH 2 mol l^{-1} .

T° del baño. Se hace confluír una disolución de 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AAS con una disolución de NaOH 2 mol l^{-1} , a través de un reactor de 5 metros de longitud, y se prueban diferentes temperaturas del baño termostático comprendidas entre 40 y 100 $^{\circ}\text{C}$. Se observa una señal máxima para valores de T° igual o superiores a 60 $^{\circ}\text{C}$. Elegimos dicho valor como óptimo para el desarrollo del sensor en flujo.

Longitud del reactor. Análogamente a las experiencias anteriores, se hace pasar una disolución de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$, previa confluencia con $\text{NaOH } 2 \text{ mol l}^{-1}$, a través de un reactor inmerso en un baño termostatzado a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y cuyas longitudes, van a variarse de 1 a 7 metros. Se observa que la hidrólisis del AAS a AS es completa para una longitud del reactor de 3.5 metros, lo que hace que se escoja dicha longitud como óptima.

Asimismo, al igual que para el resto de analitos, se hizo un estudio de interferencias para una concentración de AAS correspondiente a $60 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los niveles de tolerancia resultantes son análogos a los obtenidos para AS (ver *Tabla II-6.2*), lo cual era de esperar, ya que como se ha indicado anteriormente, lo que se hace es una determinación indirecta de AAS como AS, mediante hidrólisis previa del primero.

9.1. Preparación de disoluciones patrón y muestras

Se preparó una disolución patrón inicial de AAS, suministrado por FLUKA, de concentración $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Esta disolución se mantuvo a una t^a de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A esta t^a , la descomposición de AAS a AS es inferior al 2% en un mes. Las disoluciones estándar de trabajo se preparaban a diario por dilución adecuada con agua bidestilada.

Cinco tabletas de los preparados farmacéuticos analizados fueron finamente molidos en mortero de ágata y homogeneizados. Una fracción equivalente a 10 mg de AAS fue pesada y disuelta en agua bidestilada con ayuda de un baño ultrasonidos (10 minutos), y filtrados a través de filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$, llevando a un volumen final adecuado con agua bidestilada (usando etanol de 96% v/v para que el contenido final en etanol fuese del 5%). En ningún caso se comprobó que existiese efecto matriz, de modo que se obtuvo la concentración de AAS por el método de calibración directa para un volumen de $300 \mu\text{l}$.

9.2. Calibración y características del método propuesto

Bajo las condiciones óptimas de trabajo, se inyectaron en el montaje FIA propuesto, disoluciones patrón de AAS de concentraciones comprendidas entre 5 y

120 $\mu\text{g ml}^{-1}$, obteniéndose una recta de calibrado lineal que responde a la siguiente ecuación (Fig. II-17):

$$A = 0.023 + 8.01 \times 10^{-3} [\text{AAS}] \quad r = 0.9998$$

donde [AAS] va expresado en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

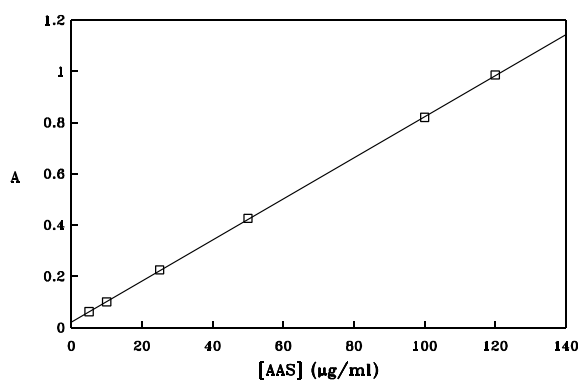


Figura II-17. Recta de calibrado para ácido acetil salicílico
 $V_i=300 \mu\text{l}$

La desviación estándar correspondiente a la determinación de 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AAS ($n=10$) fue 0.41%, y el límite de detección de 0.32 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Como se puede comprobar la reproducibilidad es muy alta, y más teniendo en cuenta que las medidas están hechas en fase sólida. La frecuencia de muestreo se sigue manteniendo en 25 h^{-1} , tal y como ocurría para el mismo volumen de muestra en la determinación de AS.

9.3. Determinación de ácido acetil salicílico

La composición de los preparados farmacéuticos en estudio es la siguiente:

1. "Dolvirán" (Lab. Bayer), comprimidos
 - Ácido acetil salicílico: 400 mg
 - Codeína, fosfato: 9.6 mg

- Cafeína: 50 mg
- 2. "Aspirina" (Lab. Bayer), comprimidos
 - Ácido acetil salicílico: 500 mg
- 3. "Veganín" (Lab. Parke-Davis), comprimidos
 - Ácido acetil salicílico: 250 mg
 - Codeína, fosfato: 10 mg
 - Paracetamol: 250 mg
- 4. "Dolmen" (Lab. Uriach), comprimidos
 - Ácido acetil salicílico: 500 mg
 - Codeína, fosfato: 10 mg
 - Ácido ascórbico: 250 mg
 - Sacarina sódica: 15 mg

Tabla II-16. Determinación de ácido acetil salicílico en preparados farmacéuticos

Fármaco	^a Añadido (mg)/unidad	Encontrado $\pm \sigma_r$ (%)	% Recuperación
Dolvirán	-	399 \pm 1	-
	100	499 \pm 2	100
	200	602 \pm 2	101
Aspirina	-	496 \pm 3	-
	100	597 \pm 4	101
	200	697 \pm 3	101
Veganín	-	250 \pm 2	-
	100	350 \pm 2	100
	200	451 \pm 4	101
Dolmen	-	489 \pm 5	-
	100	592 \pm 5	103
	200	694 \pm 4	102

^a por comprimido

Los resultados obtenidos para cada preparación farmacéutica así como los del estudio de recuperación de diferentes cantidades de ácido acetil salicílico sobre cada fármaco se muestran en la tabla anterior (*Tabla II-16*). Estos resultados son en ambos casos estupendos, lo que pone de manifiesto la utilidad del sensor propuesto.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. I. Sharman, *Vitamin C: Recent aspects of its physiological and technological importance*, eds. G. G. Birch and K. J. Parker, Applied Science Publishers, Ltd., London, 1974, pp. 1-14.
- [2] W. H. Sebrell, R. S. Harris (eds.), *The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods, Vol. I*, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- [3] A. Kallner, D. Hartman y D. Horning, *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.*, 47 (1977) 383.
- [4] M. Tausz, I. Kranner, D. Grill, *Phytochem. Anal.*, 7 (1996) 69.
- [5] J. Lykkesfeldt, S. Loft, H.E. Poulsen, *Anal. Biochem.*, 229 (1995) 329.
- [6] H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. B., Biomed. Appl.*, 655 (1994) 195.
- [7] H. J. Nelis, A. P. De Leenheer, G. Merchie, P. Lavens, P. Sorgeloos, *J. Chromatogr. Sci.*, 35 (1997) 337.
- [8] J. J. Mangas-Alonso, J. Moreno, B. Suarez, A. Picinelli, D. Blanco-Gomis, *Chromatographia*, 47 (1998) 197.
- [9] The United States Pharmacopeia, XXII Revision, The National Formulary XVII Edition, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1990, p. 109.
- [10] S. M. Sultan, A. M. Abdennabi and F. E. O. Suliman, *Talanta*, 41 (1994) 125.
- [11] B. Jaselskis and S. J. J. Nelapaty, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 379.
- [12] E. L. McGown, M. G. Rusnak, C. M. Lewis and J. A. Tillotson, *Anal. Biochem.*, 119 (1982) 55.
- [13] M. L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, M. I. Pascual Reguera and L. F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 42 (1995) 1057.
- [14] S. Boudra, J. M. Bosque Sendra, M. C. Valencia, *Talanta*, 42 (1995) 1525.
- [15] P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, M. I. Pascual Reguera and L. F. Capitán Vallvey, *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 115.
- [16] H. Waki and J. Korkisch, *Talanta*, 30 (1983) 95.
- [17] L. F. Capitán Vallvey, I. De Orbe, M. C. Valencia and J. J. Berzas Nevado, *Mikrochim. Acta*, 111 (1993) 223.
- [18] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova and A. Molina Díaz, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 271.
- [19] P. J. Garry, G. M. Owen, D. W. Lashley and P. C. Ford, *Clin. Biochem.*, 7 (1974) 131.
- [20] M. H. Hashmi, Maqbool Ahmad Shahid, M. Akhtar and N. A. Chughtai,

- Mikrochim. Acta*, 1973 (1973) 901.
- [21] E. Y. Backheet, K. M. Emara, H. F. Askal and G. A. Saleh, *Analyst*, 116 (1991) 861.
- [22] N. Balasubramanian, S. Usha and K. Srividya, *Indian Drugs*, 32 (1995) 78.
- [23] R. Aragonés-Apodaca, *Inform. Quím. Anal. Pura Apl. Ind.*, 21 (1967) 230.
- [24] B. R. Day, D. R. Williams, C. A. Marsh, *Clin. Biochem.*, 12 (1979) 22.
- [25] T. Koniewska, E. Kublin, E. Wedawowicz, *Acta Pol. Pharm.*, 43 (1986) 588.
- [26] G. Carrum, D. R. Abernethy, M. Sadhaukhan, C. Wright, *J. Chromatogr.*, 381 (1986) 127.
- [27] M. E. Rajer, H. Ko, T. J. Wilberston, J. M. McCall, K. T. Jonston, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 1266.
- [28] L. Amankwa, L. G. Chatter, S. Pons, *Analyst*, 108 (1983) 1221.
- [29] C. S. P. Sastry, D. M. Krishna, A. Sailaja, *Indian Drugs*, 29 (1992) 275.
- [30] J. Arcos, B. García, A. Munguia, J. López Palacios, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 357.
- [31] The United States Pharmacopoeia, IIIth revision, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, (1985) 1867.
- [32] Ahmet Araman, *Acta Pharm. Turc.*, 28 (1986) 9.
- [33] C. S. P. Sastry, A. Sailaja, T. Thirupathi Rao, M. V. Suryanarayana, *Microchem. J.*, 44 (1991) 268.
- [34] M. El-Sayed Mahrous, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 2017.
- [35] C. S. P. Sastry, A. Sailaja, T. T. Rao, D.M. Krishna, *Indian Drugs*, 29 (1992) 473.
- [36] M. B. Devani, S. S. Pandya, S. A. Shah, *Indian Drugs*, 28 (1991) 197.
- [37] P. Trinder, *Biochem. J.*, 57 (1954) 301.
- [38] U. Saha, K. Baksi, *Analyst*, 110 (1985) 739.
- [39] A. M. Pena de la, F. Salinas, I. D. Merás, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2493.
- [40] G. Graham, M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, 61 (1972) 1219.
- [41] M. Kleinerman, *Anal. Lett.*, 10 (1977) 205.
- [42] K. K. Choi, K. W. Fung, *Anal. Chim. Acta*, 138 (1982) 385.
- [43] H. James, G. Carmack, H. Freiser, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 856.
- [44] S. M. Hassan, M. A. Hamada, *Analyst*, 113 (1988) 1709.
- [45] L. Hendeles, C. Edwards, *J. Clin. Pharm. Ther.*, 13 (1988) 131.
- [46] M. Neumayr, O. Friedrich, G. Sontag, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 469.
- [47] F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker, *J. of Chromat. B*, 677 (1996) 172.
- [48] J. M. López Fernández, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. of Autom. Chem.*, 12 (1990) 263.

- [49] B. Glombitza, P. Schmidt, *J. of Pharm. Sciences*, 83 (1994) 751.
- [50] Analytical Chemistry division, *Spectrochimica Acta Part B*, 242 (1978).
- [51] ACS Commite on enviromental improvement, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2242.
- [52] Z. Wang, Y. Chen, *Fenxi Huaxue*, 19 (1991) 357.
- [53] P. Ortega Barrales, M. L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 376 (1998) 227.
- [54] M. J. Ayora Cañada, M. I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 375 (1998) 71.

CAPÍTULO III

SENSORES MONOPARÁMETRO PARA AMOXICILINA Y EPINEFRINA

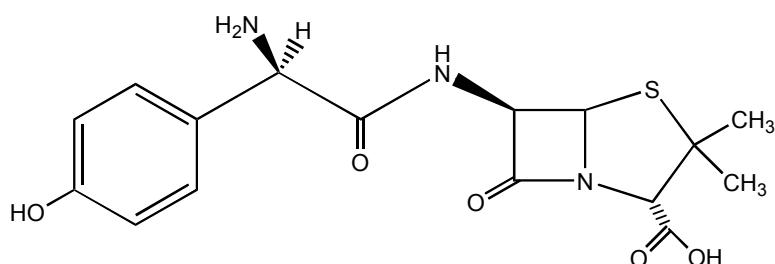


1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se van a tratar otros dos sensores monoparámetro: sensor de amoxicilina y de epinefrina. La razón de no englobarlos en el capítulo anterior (*Capítulo II*) junto con los otros sensores monoparámetro no es otra que el empleo en ambos sensores de una Configuración FIA distinta a la utilizada anteriormente, ya que en estos dos sensores el portador no actúa a su vez de eluyente sobre el analito fijado previamente en la resina, sino que es necesaria una elución posterior haciendo uso de una disolución eluyente.

1.1. Amoxicilina

La ampicilina, la amoxicilina y la hetacilina forman un grupo de penicilinas denominado aminopenicilinas, cuya actividad antimicrobiana se extiende hasta incluir microorganismos gramnegativos como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. Todas estas drogas se destruyen con la betalactamasa (de bacterias grampositivas y gramnegativas) y por ello son ineficaces para casi todas las infecciones estafilocócicas. En general, son algo menos activas que la penicilina G contra cocos grampositivos sensibles a este último agente. La estructura de la amoxicilina es la siguiente:



Esta droga, una penicilina semisintética susceptible a la penicilinasas, es análoga química y farmacológicamente a la ampicilina. La droga es estable en medio ácido y se destina al uso oral. El espectro antimicrobiano de la amoxicilina es esencialmente idéntico al de la ampicilina, con la importante excepción de que la amoxicilina parece ser menos efectiva que la ampicilina para la shigellosis [1].

La amoxicilina se absorbe del tracto gastrointestinal en forma más rápida y completa que la ampicilina, y ésta es la principal diferencia entre ellas. Aunque la vida media de la amoxicilina es semejante a la de la ampicilina, concentraciones efectivas de amoxicilina administrada por vía oral son detectables en el plasma el doble del tiempo que la ampicilina, debido también a la absorción más completa. Aproximadamente el 20% de la amoxicilina está ligado a las proteínas del plasma, valor similar al de la ampicilina. Un 50% de la dosis del antibiótico se excreta en forma activa por la orina.

Las indicaciones terapéuticas para la amoxicilina así como para el resto de penicilinas pertenecientes al grupo de las aminopenicilinas son las siguientes: infecciones gonocócicas, infecciones respiratorias superiores y del tracto urinario, meningitis, infecciones por *Salmonella*, así como aquellas infecciones causadas por bacterias gramnegativas adquiridas en la comunidad general.

En bibliografía existe una amplia variedad de métodos espectrofotométricos para la determinación de amoxicilina, los cuales requieren de un paso previo de derivación [2-8]. Asimismo, se han desarrollado métodos por espectrofotometría de derivadas en la región UV [9-12] para la determinación de este analito sólo, o en combinación con otras penicilinas o cefalosporinas. Con la espectrofotometría derivada se trata de resolver el problema del solapamiento espectral de bandas que se produce entre el analito y las distintas especies acompañantes. Algunos parámetros analíticos de cada uno de estos métodos se recogen en la *Tabla III-1*.

Tabla III-1. Métodos espectrofotométricos para la determinación de amoxicilina

Método	λ (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Referencia
Espectrofotometría (primera derivada)	234	20-50	<1	[9]
Espectrofotometría (segunda derivada)	280.7	3.32 [†] -55.36	2.6	[10]
Espectrofotometría (segunda derivada)	276	59.4-390.6	-	[11]
Espectrofotometría (cuarta derivada)	308.5	20-140	-	[12]
Acetilacetona-formaldeido	400	10-100	-	[2]
4-nitrofenol	445	1-18	0.51	[3]
2,4-dinitrofenol	438	1-20	0.63	
Ácido 3,5-dinitrobenzóico	336	1-24	0.37	
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	429	1-22	0.89	
Ácido pícrico	477	0.5-16	1.7	[4]
Ácido picrámico	480	0.5-16	1.7	
Ácido ascórbico (en 2% DMF)	410	6-30	<2	[5]
<i>N</i> -bromosuccinimida	395	1-20	1.80-1.99	[6]
<i>N</i> -clorosuccinimida	395	1-20	1.38-1.40	
PdCl_2^{\ddagger}	400	7.3-219.1	0.22	[7]
DDQ ^a	460	10-60	-	[8]
TCNQ ^b	842	4-16		

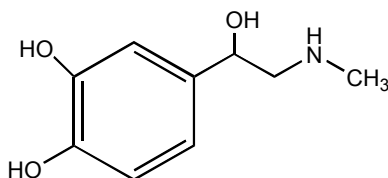
[†] Límite de detección; [‡] procedimiento FIA;

^a 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona; ^b 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano;

El sensor propuesto permite la determinación espectrofotométrica UV de amoxicilina en presencia de otras penicilinas (incluso a niveles más altos que los encontrados en preparados farmacéuticos), lo cual no es posible utilizando métodos convencionales de absorción en la región UV; así, por ejemplo, el método oficial de la farmacopea británica (método espectrofotométrico UV) [13], no permite la determinación de amoxicilina cuando va acompañada de dicloxacilina o cloxacilina.

1.2. Epinefrina

Los principales productos de secreción de la médula adrenal son las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina). Estas hormonas son conocidas como adrenalina y noradrenalina, respectivamente. La producción de estas hormonas no está limitada a la médula adrenal sino también tiene lugar en las neuronas del sistema nervioso simpático y del sistema nervioso central, así como también a nivel de grupos de células cromafines diseminados en distintas áreas del organismo, incluyendo el retroperitoneo, mediastino y cuello. La norepinefrina representa el principal producto sintetizado en el sistema nervioso central y la epinefrina es la principal catecolamina producida por las glándulas adrenales. La estructura de la epinefrina es la siguiente:



Si se sustituye el grupo metilo $-CH_3$ por un hidrógeno, nos encontramos ante la estructura de la norepinefrina.

Las catecolaminas son responsables de las respuestas fisiológicas registradas en situaciones de miedo o violencia física. Los efectos diversos de las catecolaminas son mediados por dos grupos principales de receptores de membrana en las células de los distintos órganos efectores. Los receptores que fijan principalmente la norepinefrina son los conocidos como receptores alfa, mientras que los receptores beta fijan la epinefrina. En general, los receptores beta median la vasodilatación y la broncodilatación. Tanto la epinefrina como la norepinefrina, aumentan la frecuencia respiratoria y, en cierto grado, la profundidad de la respiración. Aunque ambas hormonas producen una broncodilatación, la epinefrina es significativamente más potente que la norepinefrina en este aspecto. Además, ambas catecolaminas desempeñan funciones metabólicas muy importantes.

La epinefrina es un potente estimulador de los receptores adrenergéticos, alfa

y beta, y por ello sus efectos sobre los órganos efectores son complejos. Tienen particular preponderancia las acciones sobre el corazón y el músculo liso vascular y otros. La epinefrina es una de las drogas vasopresoras más potentes que se conocen. En rápida administración intravenosa produce un efecto característico sobre la presión sanguínea, que sube pronto hasta un máximo proporcional a la dosis. El aumento de la presión sistólica es más grande que el de la diastólica, de modo que hay un aumento de la presión de pulso. La presión media cae entonces por debajo de la normal antes de volver al nivel de control. El mecanismo del aumento de la presión sanguínea debido a la epinefrina es triple: estimulación directa del miocardio que aumenta la fuerza de la contracción ventricular, mayor frecuencia cardíaca, y la vasoconstricción en muchos lechos vasculares, especialmente en los vasos de resistencia precapilares de la piel, mucosas y riñón, junto con marcada constricción de las venas.

La epinefrina no alcanza concentraciones farmacológicamente activas en el organismo después de su administración oral. La absorción de los tejidos subcutáneos se hace lentamente por la vasoconstricción local; el calor y el masaje apresuran la velocidad. La absorción es más rápida después de la inyección intramuscular que subcutánea. Aunque sólo pequeñas cantidades aparecen en la orina de personas normales, la orina de pacientes con feocromocitoma contiene grandes cantidades de epinefrina, norepinefrina y sus metabolitos.

La epinefrina puede causar reacciones indeseables como miedo, ansiedad, tensión, inquietud, dolor de cabeza pulsátil, temblor, debilidad, mareos, palidez, dificultades respiratorias y palpitaciones. Los efectos ceden rápidamente con el reposo y la tranquilidad. Accidentes más serios consisten en hemorragia cerebral y arritmias cardíacas.

En las farmacopeas el método oficial recomendado para la determinación de epinefrina consiste en una titulación no acuosa con ácido perclórico en medio acético, usando cristal de violeta como indicador [14]. Se han propuesto también métodos cromatográficos: HPLC con detección electroquímica [15-17], y Cromatografía de gases [18, 19], requiriendo esta última de procesos previos de derivación del analito ya que la epinefrina es un compuesto polar y no volátil.

En la bibliografía consultada se comprueba la existencia de métodos espectrofotométricos para la determinación de epinefrina, incluyendo reacciones

derivadoras con reactivos orgánicos (*p*-benzoquinona [20], cloranil [21]) e inorgánicos (yodo [22], metavanadato amónico [23] y metaperyodato [24]). Algunos de estos métodos han sido adaptados a FIA [25, 26]. Aquí proponemos un método sencillo y rápido, a la vez que selectivo.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón en agua bidestilada con una concentración de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de: amoxicilina (SIGMA), y epinefrina (SIGMA). A partir de éstas se prepararon disoluciones de menor concentración mediante la adecuada dilución con agua bidestilada. Las disoluciones patrón iniciales de ambos analitos son estables durante al menos un mes, a una t^{a} de 4° C. En el caso de la epinefrina es necesario, además, medio ácido y ausencia de luz (para evitar su oxidación a adrenocromo).
- b) Resina de cambio iónico Sephadex QAE A-25 (ALDRICH), en ciclo Cl^{-} utilizada sin tratamiento previo.
- c) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- d) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , HK_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 μm .

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofotómetro UV-V Lambda 2 de Perkin Elmer controlado por ordenador personal compatible 386, programa PECCS 4.2.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Cubetas de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz, HELIMA 138-QS.
- f) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.

- g) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.

3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Se registraron los espectros de absorción de los dos analitos en estudio, tanto en disolución acuosa como en fase resina. Para registrar los espectros en fase sólida se usó la misma cubeta que sirvió de base para el desarrollo del sensor, es decir una cubeta Hellma 138-QS (ver diagrama en el *Capítulo II, Figura II-1*), que posee 1-mm de paso óptico; en cambio, para los espectros en disolución se utilizó una cubeta con 1-cm de paso de luz.

3.1. Amoxicilina

El espectro en disolución se obtiene a partir de una solución de amoxicilina con una concentración de $12 \mu\text{g ml}^{-1}$, y a un valor de $\text{pH}=12.5$ ajustado con NaOH 0.1M. El espectro, que se realizó frente a un blanco que no contenía analito, presenta un máximo a 244 nm. Al realizar espectros a valores de pH inferiores a 10 hay un desplazamiento del máximo de absorción a 228 nm.

El espectro en fase resina se obtuvo utilizando la configuración FIA mostrada en la *Fig. III-3*. Como portador se utilizó una disolución de NaCl 0.1M a $\text{pH}=12.5$ obtenido con NaOH, en la que se inyectaron 600 μl de amoxicilina con una concentración de $12 \mu\text{g ml}^{-1}$. Como microzona activa se utilizó resina Sephadex QAE A-25. El espectro se realizó frente a un blanco correspondiente al portador circulando a través de la resina. El máximo de absorción aparece en 248 nm, observándose por tanto un ligero efecto batocrómico con respecto al espectro en disolución (*Figura III-1*), lo cual es frecuente en espectrofotometría en fase sólida.

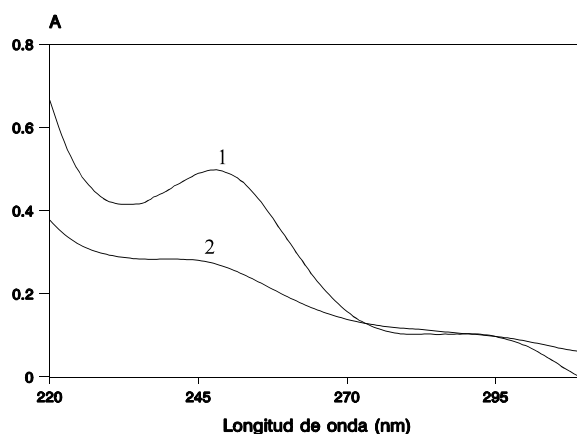


Figura III-1. *Espectros de amoxicilina*
[amoxicilina]= 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1) Espectro en resina ($V_i=600 \mu\text{l}$)
2) Espectro en disolución

3.2. *Epinefrina*

Al igual que en el caso anterior, los espectros se registraron a pH básico, concretamente a pH=12. El espectro en disolución se obtuvo a partir de una disolución con una concentración de 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en epinefrina, en donde el pH se ajustó por adición de NaOH 0.1M. El espectro mostrado es el neto, al que se le restó un blanco que no contenía analito, presentando un máximo a 287 nm.

Para obtener el espectro en fase resina, en la configuración FIA (*Fig. III-3*) y utilizando resina Sephadex QAE A-25, se inyectaron 600 μl con una concentración de epinefrina de 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en el portador NaCl 0.05M a pH=12. El espectro obtenido muestra el máximo de absorción, una vez restado el blanco correspondiente, a 287 nm, con lo cual el máximo coincide tanto en disolución acuosa como en fase resina (*Figura III-2*). Se observa también un hombro hacia 245 nm en los dos espectros.

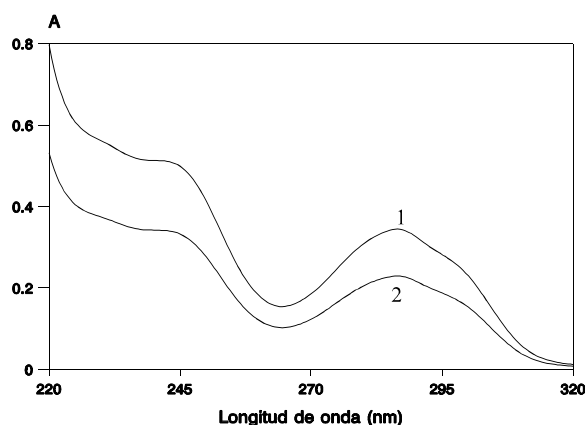


Figura III-2. Espectros de epinefrina
[epinefrina]= 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1) Espectro en resina ($V_i=600 \mu\text{l}$)
2) Espectro en disolución

Las longitudes de onda de trabajo para estos dos sensores son, pues, 248 y 287 nm respectivamente, para amoxicilina y epinefrina.

Teniendo en cuenta la diferencia de paso óptico de las cubetas usadas, se produce para ambos analitos un incremento de sensibilidad del orden de 15 veces al usar el sistema sensor, con respecto a la espectrofotometría convencional.

4. CONFIGURACIÓN FIA

Se empleó la configuración FIA mostrada en la *Fig. III-3*. El analito se inyecta en una corriente de portador (P) que lo pone en contacto con la microzona activa del sensor. Una vez fijado el analito en ella y alcanzado el máximo de la señal, giramos la válvula de selección (VS) para que el eluyente pase a través de la cubeta de forma rápida y eficaz, desorba el analito y haga reutilizable el sensor. Los tubos usados son de teflón de 0.8 mm de diámetro interno y de longitud la mínima para transportar la muestra al detector.

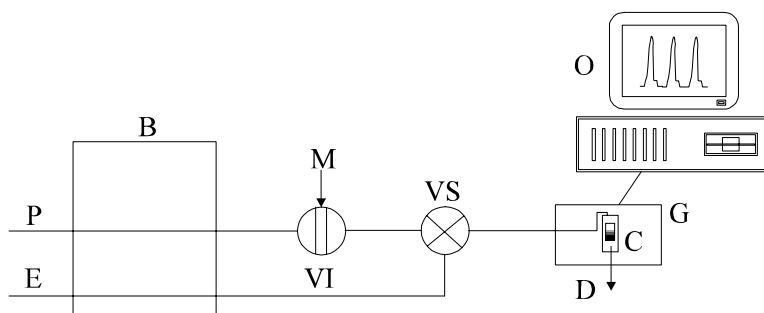


Figura III-3. Configuración FIA
 P: portador; E: eluyente; B: bomba; M: muestra; VI: válvula de inyección; VS: válvula de selección; C: célula de flujo; D: desecho; G: espectrofotómetro; O: ordenador

Ejemplos de diagramas correspondientes a cada uno de los analitos en estudio se muestran en las Figuras III-4.1 y III-4.2. En ambos casos, el diagrama corresponde al estudio de la reproducibilidad de cada uno de los analitos en el sensor espectrofotométrico de flujo (para sus condiciones operatorias óptimas).

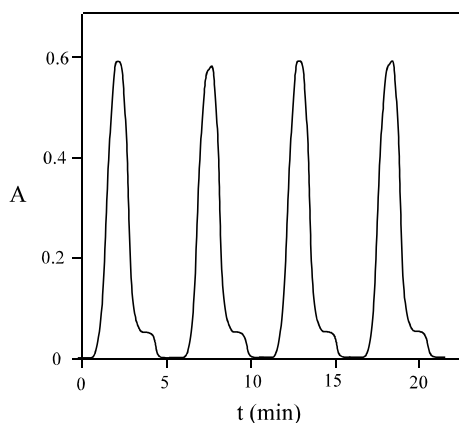


Figura III-4.1. Diagrama para amoxicilina
 [amoxicilina]= $15 \mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}: 600 \mu\text{l}$;
 Caudal: 0.82 ml min^{-1}

Tal y como se muestra en el fiagrama para la amoxicilina, los picos presentan un pequeño hombro al final de su desarrollo, correspondiente a la elución de las últimas porciones de analito de la zona de detección.

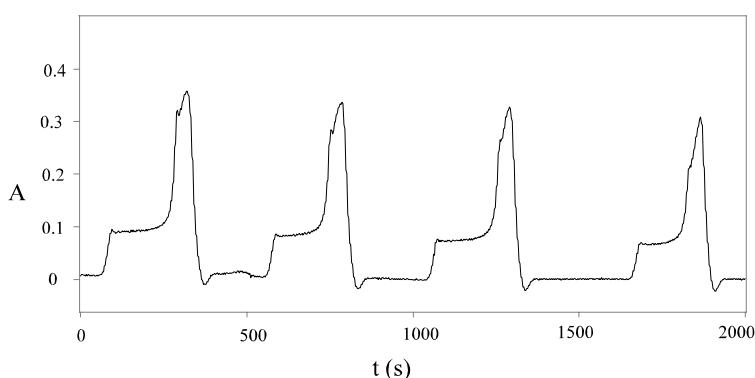


Figura II-4.2. *Fiagrama para epinefrina*
[epinefrina]= 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}$: 600 μl ; Caudal: 1.2 ml min^{-1}

La epinefrina, tal y como muestran sus picos en el fiagrama, en un principio, es fuertemente retenida en la parte superior de la cubeta una vez se ha puesto en contacto con la resina de intercambio aniónico. Sin embargo, seguidamente, el portador actúa en cierto modo de eluyente, desplazando al analito hasta la zona de detección y produciéndose entonces una rápida subida de la señal analítica.

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Tal y como se mencionó en el capítulo anterior, podemos considerar también aquí tres grupos de variables: químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección.

5.1. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.1.1. Naturaleza del soporte sólido

Se optó por los cambiadores tipo Sephadex por las mismas razones indicadas en el *Capítulo II*. Se probaron para cada analito resinas aniónicas y catiónicas fuertes y débiles: QAE A-25, DAE A-25, SP C-25, y CM C-25.

La presencia en la estructura de la amoxicilina de un grupo -OH fenólico así como de un grupo carboxílico -COOH, hacía previsible a pH básico, la fijación sobre un cambiador aniónico. Por otro lado, la presencia en la estructura de la amoxicilina de grupos cetónicos =O así como de grupos amino y de un nitrógeno heterocíclico, hacía previsible a pH ácido su fijación sobre un cambiador catiónico.

La epinefrina tiene una estructura mucho más sencilla. Presenta un grupo amino (posible fijación sobre un cambiador catiónico) así como un grupo alcohólico y dos grupos fenólicos (posible fijación sobre un cambiador aniónico).

En ambos casos, el cambiador iónico que proporciona mejores resultados, tanto en la respuesta del sensor como en el tiempo necesario para el retorno de la señal a la línea base, es la resina aniónica de base fuerte Sephadex QAE A-25.

5.1.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

En todo sistema heterogéneo, una disminución en el volumen o masa de una de las fases trae como consecuencia el aumento de la concentración de soluto en dicha fase; por ello, la cantidad de soporte sólido (y por tanto el nivel alcanzado en la resina) es una variable clave en la respuesta del sensor. Se realiza esta experiencia para determinar la influencia que en el valor de la absorbancia del analito ejerce el nivel de resina utilizado, y poder establecer el mínimo nivel que produce una absorbancia máxima. Conforme el nivel de resina utilizado aumenta por encima de este valor, la señal analítica decrece debido a la fijación de una cantidad constante de analito en la fase sólida sobre cantidades crecientes de resina ya que la fijación de analito se produce en gran parte fuera de la parte irradiada del detector. Dado que para los dos analitos la forma de las curvas de absorción frente a la altura de resina (mm) son análogas, sólo se representa la curva del estudio de la

altura de resina óptima en la célula de flujo correspondiente a la amoxicilina (Figura III-5), en donde como portador se utilizó una disolución de NaCl 0.1M a pH=12.5 y como eluyente una disolución de NaCl 0.5M a pH=12.5, para un volumen de muestra de 600 μ l.

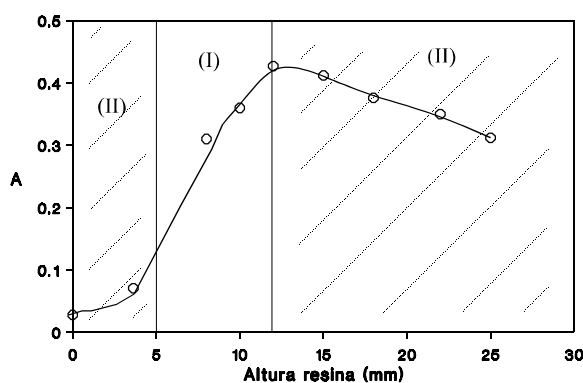


Figura III-5. Influencia del nivel de resina en la célula [amoxicilina]= 10 μ g ml⁻¹
(I) Zona irradiada (II) Zona oscura

Se observa que la absorbancia va aumentando hasta un determinado nivel de soporte sólido, suficiente para que todo el haz de luz pase a través de la resina; para cantidades mayores de resina, la absorbancia disminuye debido a la dilución del analito en la resina y a la fijación parcial del mismo fuera de la zona irradiada del detector, tal como hemos comentado anteriormente. Se elige la altura correspondiente a 12 mm, que equivale al bulbo totalmente completo, por ser ésta la que proporciona una mayor respuesta de la señal analítica.

5.2. VARIABLES QUÍMICAS

Durante el estudio de las variables químicas se mantienen fijas las variables FIA:

✎ **Amoxicilina** ⇔ Caudal: 0.82 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 μ l

✎ **Epinefrina** ⇔ Caudal: 1.20 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 μ l

5.2.1. pH del portador y de la muestra

Dado que utilizando como portador únicamente agua bidestilada ajustada a un determinado valor de pH, la fijación del analito en la parte superior de la célula de flujo (a ciertos valores) era tan alta que no permitía el paso de éste a través de la zona de detección, y por consiguiente no había desarrollo de la señal analítica. Para el estudio de la influencia del pH del portador sobre la retención del analito en la resina de cambio iónico, se procedió a preparar distintas disoluciones con una concentración constante de sales (NaCl 0.05M) pero diferentes valores de pH (mediante adición de la cantidad necesaria de HCl o NaOH 0.1M). Al inyectar el analito, se registró la señal a la longitud de onda correspondiente para unas concentraciones de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ tanto para amoxicilina como para epinefrina. Los resultados obtenidos aparecen representados en las Figuras III-6.1 y III-6.2.

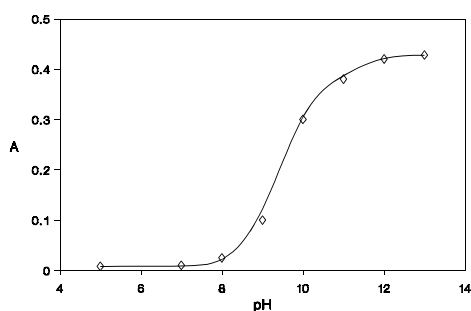


Figura III-6.1. Efecto del pH del portador para amoxicilina ($V_i=600 \mu\text{l}$)

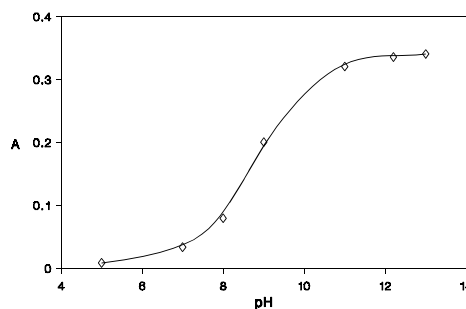


Figura III-6.2. Efecto del pH del portador para epinefrina ($V_i=600 \mu\text{l}$)

En ambos casos se comprueba cómo a partir de $\text{pH}=8$ aumenta notablemente la fijación del analito sobre la resina. Esto se explica si tenemos en cuenta que a pH básico se produce la desprotonación de los grupos fenólicos (además del carboxílico en el caso de la amoxicilina), favoreciéndose de este modo la fijación del analito sobre la resina aniónica Sephadex QAE A-25 al quedar cargado con triple carga negativa. La forma sigmoide de las curvas parece sugerir que, efectivamente, la fijación responde a un proceso de disociación que conduce a una especie aniónica. Se escoge 12.5 y 12 como valores de pH óptimos para trabajar en las sucesivas experiencias con la amoxicilina y la epinefrina, respectivamente.

También se estudió la influencia del pH de la muestra para valores correspondientes al mismo intervalo estudiado anteriormente en este mismo apartado, mediante modificación del pH con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1M. El objetivo de esta experiencia es comprobar si el pH al que es inyectada la muestra, tiene o no, una influencia significativa sobre la señal analítica, en cuyo caso será necesario tamponarla previamente. Se comprobó que para valores de pH comprendidos entre 3-13 y 2-13 para amoxicilina y epinefrina, respectivamente, no se producían diferencias significativas en los valores de absorbancia, por lo cual no es necesario un control estricto de esta variable.

5.2.2. Naturaleza y concentración del portador y del eluyente

Una vez elegido el pH óptimo de trabajo, se estudió el efecto que, tanto sobre la señal analítica como sobre la rapidez de la elución, tenía la naturaleza de la disolución utilizada como portador, así como su concentración. Se ha comprobado que a valores de pH próximos al extremo de la escala, se obtienen mejores resultados cuando se utilizan como portador disoluciones de electrolitos de una determinada concentración ajustadas al valor de pH correspondiente, por adición de HCl o NaOH. Para la amoxicilina y la epinefrina se emplearon como portadoras disoluciones de diferentes sales de concentración 0.1M, ajustadas al pH de trabajo. Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na₂CO₃, HK₂PO₄, NaNO₃ y Na₂B₄O₇. De todos ellos el NaCl proporcionó los mejores resultados en la determinación de ambos analitos.

Para estudiar la influencia de la concentración del portador, en el caso de la amoxicilina, se prepararon disoluciones de NaCl a pH=12.5 de concentraciones comprendidas entre 0.05-1.5M para una concentración de amoxicilina de 10 µg ml⁻¹. Para la epinefrina, las concentraciones de las disoluciones de NaCl a pH=12 estaban comprendidas entre 0.025-1.0M, para la determinación de una concentración de 10 µg ml⁻¹ de dicho analito. Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras III-7.1 y III-7.2*.

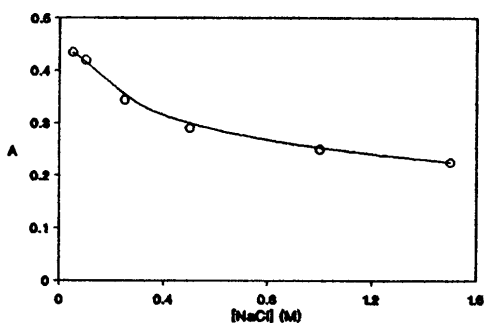


Figura III-7.1. Efecto de la concentración del portador para amoxicilina

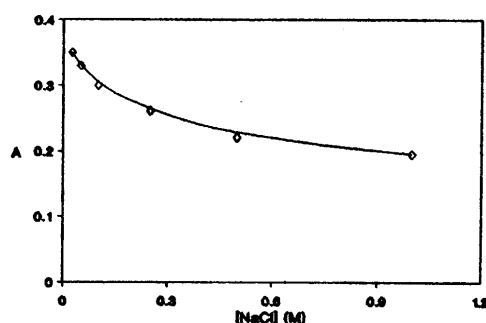


Figura III-7.2. Efecto de la concentración del portador para epinefrina

Puede observarse que en ambos casos el incremento de la concentración de portador, hace disminuir la señal analítica (así como los tiempos de desarrollo de la señal), debido a la mayor competencia de los iones del portador por los sitios activos de la resina. Es necesario, por tanto, adoptar una solución de compromiso que proporcione no sólo una buena respuesta del sensor, sino también una frecuencia de muestreo aceptable. Así se estimó en 0.1M la concentración más adecuada de NaCl para la determinación de amoxicilina, mientras que la concentración escogida para epinefrina fue de 0.05M.

Para estos analitos, la elución desde la microzona activa no es llevada a cabo por el propio portador, como ocurría con los analitos del capítulo anterior, ya que parte del analito queda fuertemente retenido sobre la resina. Se ensayaron pues distintas formas de conseguir la desorción total del analito empleando en todos los casos una válvula de selección para conducir el eluyente a la zona sensora: empleo de disoluciones amortiguadoras, disolventes orgánicos, disoluciones de electrolitos, etc. De todas ellas, se observó que los mejores resultados se obtenían utilizando una disolución con el mismo electrolito que era empleado en la disolución portadora (NaCl), lógicamente a una concentración superior, para poder arrastrar al analito fijado en el soporte sólido. Para evitar los hinchamientos de la resina dentro de la célula de flujo, debidos a los cambios bruscos de pH, se utilizó una disolución eluyente con el mismo valor de pH que la disolución portadora.

Para estudiar la influencia de la concentración del eluyente, en el caso de la amoxicilina y de la epinefrina, se prepararon disoluciones de NaCl a pH=12.5 y pH=12, respectivamente, de concentraciones comprendidas entre 0.1-2M para una

una concentración de analito de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se estimó en 0.5M la concentración óptima de NaCl para la elución completa de amoxicilina, mientras que la concentración escogida para epinefrina fue de 0.7M.

En el caso de la epinefrina se observa cómo conforme se va produciendo la elución del analito, éste pasa de ser incoloro a ser coloreado (amarillo-marrón). Esto se explica si tenemos en cuenta que durante la elución (posterior a la retención previa del analito sobre el soporte sólido), la disolución eluyente (pH básico) junto con el oxígeno atmosférico producen la oxidación de la epinefrina a adrenocromo. Sin embargo, esto no influye en el desarrollo del método propuesto ya que esta oxidación tiene lugar, tal y como se ha comentado, en la etapa de elución.

5.3. VARIABLES FIA

Se estudió la influencia de las variables FIA, manteniendo constante el diámetro interno de los tubos de la bomba así como las variables químicas en los valores anteriormente optimizados.

5.3.1. Caudal

El caudal se varió mediante el incremento de la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Para obtener su valor, basta con medir el tiempo que emplea un determinado volumen de disolución en salir del sistema hacia el desecho. En los dos sistemas se inyectaron $600 \mu\text{l}$ de volumen de muestra con una concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los resultados se representan en las *Figuras III-8.1 y III-8.2*.

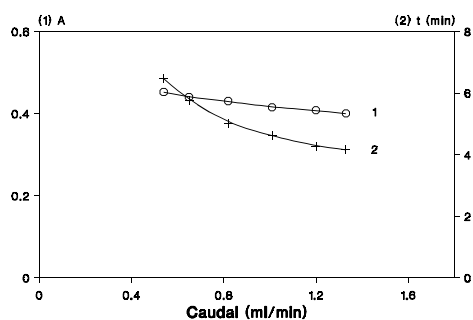


Figura III-8.1. Influencia del caudal para amoxicilina

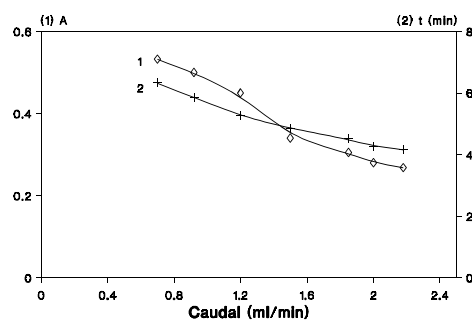


Figura III-8.2. Influencia del caudal para epinefrina

La retención de la amoxicilina en la microzona sensora presenta una cinética bastante rápida, pues apenas se afecta la señal al incrementar el caudal. En cambio, la fijación de la epinefrina obedece a una cinética bastante lenta, pues el incremento en el caudal conlleva una drástica disminución de la señal.

Un caudal muy bajo lleva consigo tiempos de residencia largos, disminuyendo la frecuencia de muestreo, por lo que hemos de adoptar una solución de compromiso que proporcione una buena señal analítica y una frecuencia de muestreo aceptable. Este valor se estima en un caudal de 0.82 y 1.20 ml min⁻¹ para amoxicilina y epinefrina, respectivamente.

5.3.2. Volumen de inyección

Para el estudio de esta variable se modifica el volumen de la válvula de inyección, conectando diferentes bucles de muestra de volúmenes variables y observando cómo se afecta la señal analítica mientras permanece constante la concentración de analito que se inyecta. Las Figuras III-9.1 y III-9.2 muestran el efecto de esta variable para una concentración de 10 µg ml⁻¹ de ambos analitos.

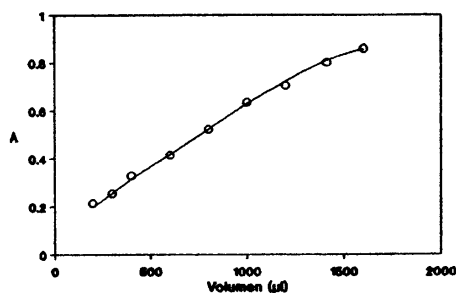


Figura III-9.1. *Volumen de muestra para amoxicilina*

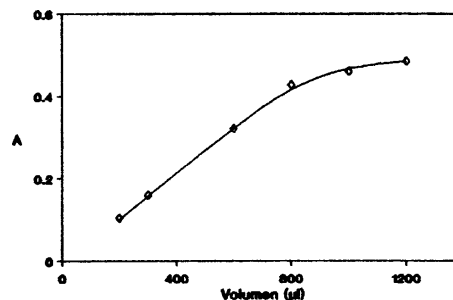


Figura III-9.2. *Volumen de muestra para epinefrina*

Se aprecia cómo al aumentar el volumen de muestra, la absorbancia aumenta debido a la retención de una mayor cantidad del analito sobre la misma masa de resina ubicada en la zona irradiada del detector. Para la amoxicilina se encuentra una linealidad perfecta de la señal analítica hasta un volumen de 1000 µl. Sin embargo, los volúmenes de 1200 µl y siguientes tampoco se desvían mucho de un comportamiento lineal. En cambio, para la epinefrina, sí se comprueba claramente cómo la señal analítica deja de responder linealmente respecto del volumen de muestra a partir de 800 µl. En ambos sistemas la señal deja de ser lineal, posiblemente, debido al efecto de autoelución del propio bolo de muestra cada vez de mayor longitud y además, en el caso de la epinefrina, debido también a la lenta cinética de fijación del analito, que para bucles tan largos requeriría un caudal más bajo.

Para conseguir por una parte buena frecuencia de muestreo, y por otra buena sensibilidad, se han escogido para la amoxicilina tres volúmenes de inyección: 300, 600 y 1200 µl. En cambio, para la epinefrina, dado que no hay posibilidad de incrementar linealmente la sensibilidad con empleo de volúmenes grandes de muestra, sólo se estudia un único volumen de inyección de 600 µl.

5.4. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se enumeran cuáles son las condiciones óptimas, incluidas las variables químicas y FIA, de cada uno de los sensores en estudio.

	<i>Amoxicilina</i>	<i>Epinefrina</i>
λ (nm)	248	287
<i>Soporte sólido</i>	Sephadex QAE A-25	Sephadex QAE A-25
<i>Nivel de soporte (mm)</i>	12	12
<i>Portador</i>	NaCl 0.1M (pH=12.5)	NaCl 0.05M (pH=12)
<i>Eluyente</i>	NaCl 0.5M (pH=12.5)	NaCl 0.7 M (pH=12)
<i>pH de la muestra</i>	3-13	2-13
<i>Caudal (ml min⁻¹)</i>	0.82	1.20
<i>Volumen de muestra (μl)</i>	300, 600 y 1200	600

6. CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES. PARÁMETROS ANALÍTICOS

6.1. Calibración de los sensores

Dado que se han calibrado tres volúmenes de muestra para la amoxicilina, en la *Figura III-10.1* aparece la representación gráfica de tres rectas de calibrado para este analito. En cambio, para la epinefrina (*Fig. III-10.2*) aparece una única recta correspondiente a un volumen de 600 μl. Las variables químicas y FIA de cada uno de los sensores se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, mientras que los rangos lineales para cada una de las rectas aparecen en las *Tablas III-1.1* y *III-1.2*.

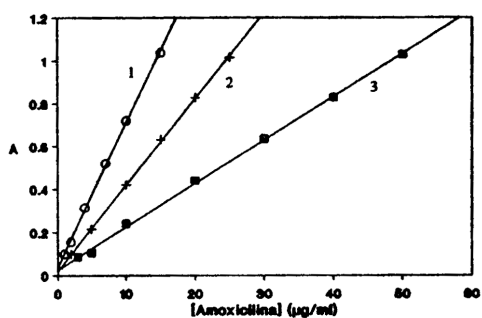


Figura III-10.1. Rectas de calibrado para amoxicilina
1) 1200 µl 2) 600 µl 3) 300 µl

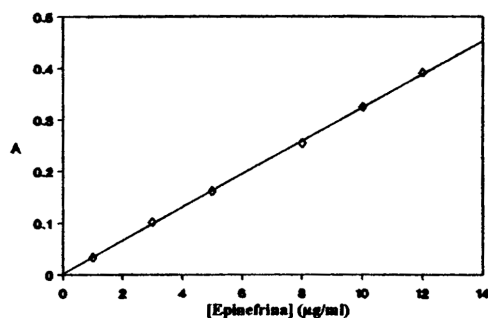


Figura III-10.2. Recta de calibrado para epinefrina
 $V_i=600 \mu\text{l}$

Mediante ajuste por mínimos cuadrados, se obtienen las siguientes ecuaciones de las rectas para los diferentes volúmenes de inyección:

Amoxicilina

Volumen: 300 µl	$A = 0.025 + 0.020 c$	$r=0.9993$
Volumen: 600 µl	$A = 0.019 + 0.040 c$	$r=0.9997$
Volumen: 1200 µl	$A = 0.040 + 0.066 c$	$r=0.9990$

Epinefrina

Volumen: 600 µl	$A = 0.002 + 0.032 c$	$r=0.9996$
-----------------	-----------------------	------------

donde :

- A: absorbancia
- c: concentración de analito ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
- r: coeficiente de correlación

6.2. Parámetros analíticos

En las *Tablas III-2.1 y III-2.2* se muestran los parámetros de los sensores para los diferentes volúmenes de inyección.

Tabla III-2.1. *Parámetros analíticos para amoxicilina*

<i>Parámetro</i>	<i>Volumen de inyección de muestra (μl)</i>		
	300	600	1200
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	0.025	0.019	0.040
<i>Pendiente (ml μg⁻¹)</i>	0.020	0.040	0.066
<i>Rango lineal (μg ml⁻¹)</i>	2.0-50.0	1.0-25.0	0.5-15.0
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9993	0.9997	0.9990
<i>Límite de detección (μg ml⁻¹)</i>	0.22	0.16	0.12
<i>Límite de cuantificación (μg ml⁻¹)*</i>	0.74	0.52	0.39
<i>RSD % (n=10)**</i>	0.87	1.01	0.99
<i>Frecuencia de muestreo (h⁻¹)</i>	17	13	10

*Criterio 3σ ; **Criterio 10σ

Tabla III-2.2. *Parámetros analíticos para epinefrina*

<i>Parámetro</i>	<i>Volumen de inyección de muestra (600 μl)</i>
<i>Línea de calibrado</i>	
<i>Ordenada en el origen</i>	0.002
<i>Pendiente (ml μg⁻¹)</i>	0.032
<i>Rango lineal (μg ml⁻¹)</i>	1-12
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9996
<i>Límite de detección (μg ml⁻¹)*</i>	0.17
<i>Límite de cuantificación (μg ml⁻¹)**</i>	0.57
<i>RSD % (n=10)</i>	1.36
<i>Frecuencia de muestreo (h⁻¹)</i>	12

*Criterio 3σ **Criterio 10σ

La vida media del sensor se estimó en al menos más de 200 inyecciones de muestra, ya que por debajo de esa cifra no resultó necesaria la sustitución de la microzona sensora.

Los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad y los parámetros calculados mediante el estudio estadístico de los mismos, así como los resultados de la determinación de los límites de detección y cuantificación se recogen en las *Tablas III-3.1 - III-3.3 y III-4.1 - III-4.3 del Apéndice*.

7. INTERFERENCIAS

Una vez estudiadas las variables que influyen en la determinación de amoxicilina y epinefrina por los métodos propuestos, se ha realizado un estudio de la interferencia que produce la presencia de diferentes especies extrañas sobre la respuesta de los sensores desarrollados. Dichas especies se seleccionaron entre aquellas que habitualmente acompañan a los analitos en estudio en los fármacos.

Utilizando un volumen de inyección de muestra de 600 μ l (tanto para la amoxicilina como la epinefrina), operamos con disoluciones que para cada especie extraña contienen 10 μ g ml^{-1} de un analito u otro. A dichas disoluciones se añaden cantidades variables de la especie cuyo efecto se quiere ensayar. Se considera que no existe interferencia cuando el error relativo de la medida no supera el 5%. En caso de producirse interferencia para una determinada concentración, se va bajando esta relación hasta que el error sea inferior o igual al 5%. La concentración máxima de especie interferente ensayada fue de 1000 μ g ml^{-1} . Los límites de tolerancia en la determinación de amoxicilina para las diferentes especies ensayadas aparecen en la *Tabla III-5*.

Tabla III-5. *Interferencias en la determinación de amoxicilina*
(10 . g ml⁻¹ de amoxicilina)

Especie extraña	Tolerancia (. g ml ⁻¹) [interferente] / [analito]
Sacarosa, Acetilcisteína, Carbocisteína	>100 ^a
Ampicilina	10
Dicloxacilina, Oxacilina, Cloxacilina	3
Bromhexina, sacarina	2
Cefalexina, Cefradina	1
Ácido clavulánico	0.1

^a Máxima relación interferente/analito ensayada

La amoxicilina se emplea a menudo combinada con otras penicilinas como dicloxacilina o cloxacilina [1], debido a que estas combinaciones muestran una actividad sinérgica proporcionando así un amplio espectro de actividad antibacteriana. A partir de los resultados de la *Tabla III-5* se observa que la tolerancia en la determinación de amoxicilina a la presencia de otras penicilinas (ampicilina, cloxacilina, etc.) es muy buena, sobre todo teniendo en cuenta que la determinación de amoxicilina en la presencia de aquellas no es posible por espectrofotometría convencional, debido al gran solapamiento espectral.

Podemos afirmar que ninguna de las penicilinas y cefalosporinas ensayadas interfieren en la determinación de amoxicilina a igualdad de concentración respecto de ésta. Sólo el ácido clavulánico, debido a su estructura molecular muy similar a la amoxicilina, compite con ésta en el proceso de retención sobre el cambiador aniónico Sephadex QAE A-25, siendo el interferente más serio.

En cuanto a la epinefrina, normalmente en su uso comercial no aparece combinada con ninguna otra especie. En los últimos años, sin embargo, han aparecido preparaciones farmacéuticas en las cuales aparece combinada con anestésicos locales tales como procaína y tetracaína. La estructura molecular de ambas especies es muy semejante pero distinta a la epinefrina, lo cual explica que el nivel de tolerancia (p/p) a la presencia de cada una de ellas sea la misma: 125 ([interferente]/[analito]).

8. APLICACIONES ANALÍTICAS

8.1. AMOXICILINA

El sensor desarrollado para la determinación de amoxicilina, ha sido aplicado al análisis de dicho compuesto en:

C *preparaciones farmacéuticas*

C *mezclas sintéticas*

8.1.1. Preparación de las muestras

Los medicamentos sólidos analizados, tanto cápsulas como sobres granulados, fueron disueltos en agua bidestilada con ayuda de un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. El excipiente insoluble se separó por filtración a través de filtro Millipore de 0.45 μ m, y la disolución obtenida se llevó a un volumen final conocido.

Aquellos fármacos que se presentaban en forma de solución (administración oral), fueron filtrados y diluidos a un volumen conveniente, sin ningún otro tratamiento. En estos fármacos se comprobó la existencia de efecto matriz, de forma que fue necesario aplicar el método de adición de patrón para la determinación de amoxicilina.

Todas las disoluciones fueron diluidas adecuadamente antes de ser inyectadas en la corriente de portador. En todos los casos se empleó un volumen de inyección de 600 μ l.

8.1.2. Determinación de amoxicilina

8.1.2.1. En preparaciones farmacéuticas

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Clamoxyl" (Lab. Beecham), sobres
 - Amoxicilina: 250 mg
 - Sacarosa: 1.3 g

- Excipientes c.s.p.
- 2. "Edoxil" (Lab. ICN Hubber), cápsulas
 - Amoxicilina: 500 mg
 - Excipientes c.s.p.
- 3. "Belmac 500" (Lab. Belmac), cápsulas
 - Amoxicilina: 500 mg
 - Excipientes c.s.p.
- 4. "Bronconovag" (Lab. Novag), suspensión
 - Amoxicilina: 250 mg
 - Bromhexina clorhidrato: 2 mg
 - Sacarina: 20 mg
 - Excipientes c.s.p.
- 5. "Ardine 250" (Lab. Pharmacia), sobres
 - Amoxicilina: 250 mg
 - Sacarosa: 2,6 g
 - Excipientes c.s.p.
- 6. "Metifarma" (Lab. Merck Farma Química), sobres
 - Amoxicilina: 250 mg
 - Bromhexina clorhidrato: 2 mg
 - Sacarina: 20 mg
- 7. "Salvapen" (Lab. Salvat), sobres
 - Amoxicilina: 250 mg
 - Sacarina
 - Sacarosa
- 8. "Edoxil Mucolítico" (Lab. ICN Hubber), suspensión
 - Amoxicilina: 500 mg
 - Bromhexina clorhidrato: 8 mg
 - Sacarina: 1.6 mg
- 9. "Flubiotic" (Lab. Pharmazam), sobres

- Amoxicilina: 250 mg
- Acetilcisteína: 100 mg
- Sacarina: 4 mg
- Sacarosa: 4.5 g

Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado se muestran en la siguiente *Tabla III-6* (cada dato es media de tres determinaciones independientes).

Tabla III-6. Determinación de amoxicilina en preparaciones farmacéuticas

Fármaco	Composición (mg)	Encontrado (mg)	Recuperación \pm : r (%)
Clamoxyl	^a 250	248.2	99.3 \pm 0.8
Edoxil	^b 500	498.0	99.6 \pm 0.4
Belmac 500	^b 500	503.0	100.6 \pm 0.7
Bronconovag	^c 250	248.0	99.2 \pm 1.1
Ardine 250	^a 250	249.3	99.7 \pm 0.5
Salvapen	^a 250	249.5	99.8 \pm 0.6
Metifarma	^a 250	250.8	100.3 \pm 0.7
Edoxil Mucolítico	^c 500	503.0	100.6 \pm 1.0
Flubiotic	^a 250	250.1	100.0 \pm 0.4

^a por sobre granulado; ^b por cápsula; ^c por cada 5 ml. Método de adición de patrón

Los valores obtenidos concuerdan con los indicados por el fabricante, ya que la recuperación se encuentra comprendida en todos los casos entre el 99.2 y el 100.6%. La desviación estándar relativa (r) se realizó para tres determinaciones. Para chequear la exactitud del método propuesto se llevó a cabo un estudio de recuperación de distintas cantidades de analito adicionadas sobre algunos de los fármacos anteriores (*Tabla III-7*), obteniéndose porcentajes de recuperación entre 98.8 y 101.1%.

Tabla III-7. Estudio de recuperación de amoxicilina en preparaciones farmacéuticas

Muestra	Añadido (mg/sobre granulado)	% Recuperación \pm σ_r (%) ^a
Clamoxyl	100	99.5 \pm 0.6
	200	98.9 \pm 0.7
Ardine 250	100	100 \pm 1
	200	99 \pm 1
Salvapen	100	101.1 \pm 0.9
	200	98.8 \pm 0.9
Metifarma	100	99.8 \pm 0.7
	200	99 \pm 1

^a Media de tres determinaciones

8.1.2.2. En mezclas sintéticas

La asociación de amoxicilina con cloxacilina o con dicloxacilina en fármacos comerciales puede encontrarse en el mercado farmacéutico. Sin embargo en la farmacopea española estas asociaciones no están disponibles. La aplicabilidad del sensor propuesto a la determinación de amoxicilina en presencia de estos otros antibióticos sería de gran utilidad, pues resolvería un problema que no puede abordarse por espectrofotometría convencional. A raíz de los resultados obtenidos en el estudio de interferencias (*Tabla III-5*) dicha determinación debe poder llevarse a cabo con éxito.

Se prepararon mezclas sintéticas sólidas de estos dos antibióticos a dos diferentes razones de concentración y se analizaron según el procedimiento expuesto anteriormente. Los resultados obtenidos, resumidos en la *Tabla III-8*, muestran que la determinación de amoxicilina en estas asociaciones puede llevarse a cabo satisfactoriamente mediante el sensor propuesto.

Tabla III-8. *Determinación de amoxicilina en mezclas sintéticas*

Mezclas Sintéticas	Composición (mg)	Recuperación \pm σ_r (%)
Amoxicilina-Dicloxacilina	250-250	99.3 \pm 0.9
	250-500	98.6 \pm 1.6
Amoxicilina-Cloxacilina	250-250	99.8 \pm 0.8
	250-500	99.1 \pm 1.2

8.2. EPINEFRINA

El sensor desarrollado para la determinación de epinefrina, ha sido aplicado al análisis de dicho analito en preparaciones farmacéuticas.

8.2.1. Preparación de las muestras

Dado que en todos los casos la epinefrina se encuentra en los fármacos en solución, bien en ampollas o en inyecciones, no fue necesario ningún tratamiento previo para disolver la muestra. La solución se filtró a través de filtro Millipore de 0.45 μ m de tamaño de poro, y se realizaron las diluciones adecuadas con agua bidestilada. En todos los casos se comprobó que no existía efecto matriz, de modo que para todos ellos se obtuvo la concentración de epinefrina por el método de calibración directa para el único volumen de muestra estudiado (600 μ l).

8.2.2. Determinación de epinefrina

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Adrenalina Braun" (Lab. Braun Medical), ampollas
- Epinefrina: 1 mg
2. "Adrenalina Level" (Lab. Ern), inyectable

- Epinefrina: 1 mg
- 3. "Adrenalina Llorente" (Lab. Ern), inyectable
 - Epinefrina: 1 mg
- 4. "Anestesia Loc Braun C/A" (Lab. Braun Medical), ampollas
 - Epinefrina: 1.25 mg
 - Procaína clorhidrato: 100 mg
 - Sulfitos (excipiente)
- 5. "Anestesia Topi Braun C/A" (Lab. Braun Medical), ampollas
 - Epinefrina: 0.1 mg
 - Tetracaína, clorhidrato: 10 mg
 - Sulfitos (excipiente)

Los resultados obtenidos (*Tabla III-9*) para todos los fármacos analizados nos dan valores muy satisfactorios respecto a los indicados por el fabricante, lo cual testifica la posible aplicabilidad de este sensor para controles de rutina.

Tabla III-9. *Determinación de epinefrina en preparaciones farmacéuticas*

Fármaco	^a Composición (mg)	Encontrado (mg)	Recuperación \pm σ_r (%)
Adrenalina Braun	1	0.991	99.1 \pm 0.7
Adrenalina Level	1	0.993	99.3 \pm 0.6
Adrenalina Llorente	1	1.021	102.1 \pm 1.1
Anestesia Loc Braun C/A	1.25	1.258	100.6 \pm 0.5
Anestesia Topi Braun C/A	0.1	0.099	99.0 \pm 0.7

^a por ampolla o jeringa

Asimismo, para chequear la exactitud del método propuesto se procedió a hacer un estudio de recuperación de epinefrina (*Tabla III-10*) sobre dos de los fármacos analizados anteriormente. En todos los casos las recuperaciones se encontraban en torno al 100%.

Tabla III-10. *Estudio de recuperación de epinefrina en preparaciones farmacéuticas*

Muestra	Añadido (mg/ampolla)	% Recuperación \pm σ (%) ^a
Adrenalina Level	0.5	100 \pm 1
	0.7	99.5 \pm 0.7
	1.0	98.8 \pm 0.9
Anestesia Loc Braun C/A	0.5	99.2 \pm 0.5
	0.7	101 \pm 1
	1.0	101 \pm 1

^a Media de tres determinaciones

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Martindale: The Extra Pharmacopeia, ed. J.E.F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, London, 30th edn., 1993.
- [2] M. B. Devani, I. T. Patel, T. M. Patel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 355.
- [3] A. S. Amin, A. L. El-Ansary, Y. M. Issa, *Talanta*, 41 (1994) 691.
- [4] A. S. Amin, M. E. Moustafa, Y. M. Issa, *Microchem. J.*, 50 (1994) 6.
- [5] F. S. El-Shafie, E. A. Gad-Kariem, K. A. Al-Rashood, H. A. Al-Khamees, H. A. El-Obeid, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 381.
- [6] G. A. Saleh, *Analyst*, 121 (1996) 641.
- [7] M. S. García, C. Sánchez Pedreño, M. I. Alberó, V. Ródenas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 1585.
- [8] H. F. Askal, G. A. Saleh, N. M. Omar, *Analyst*, 116 (1991) 387.
- [9] E. M. Abdel-Moety, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 187.
- [10] A. Yesilada, M. Ertan, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 2033.
- [11] J. A. Murillo, J. Rodríguez, J. M. Lemus, A. Alañón, *Analyst*, 115 (1990) 1117.
- [12] A. F. M. El-Walily, F. El-Anwar, M. A. Eid, H. Awaad, *Analyst*, 117 (1992) 981.
- [13] British Pharmacopoeia, HM Stationery Office, London, 1993.
- [14] The United States Pharmacopoeia (XX edn.), US Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, MD (1980).
- [15] P. Hjemdahl, *Am. J. Physiol.*, 247 (1984) 13.
- [16] D. S. Goldstain, G. Feuerstein, J. L. Izzo, I. J. Kopin, H. R. Keiser, *Life Sci.*, 28 (1981) 467.
- [17] P. Hjemdahl, *Acta Physiol. Scand.*, 527 (1984) 43.
- [18] J. Drozd, *J. Chromatogr.*, 113 (1975) 303.
- [19] S. Ahiya, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1976) 163.
- [20] M. A. Korany, A. M. Wahbi, M. H. Abdel-Hay, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2 (1994) 537.
- [21] M. Q. Al-Abachi, T. A. Al Grabsha, N. A. Shahbaz, *Microchem. J.*, 31 (1985) 272.
- [22] F. B. Salem, *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1959.
- [23] F. B. Salem, *Talanta*, 34 (1987) 810.
- [24] D. Gowri Sankar, C. S. P. Sastry, M. Narayana Reddy, *Indian Drugs*, 28 (1991) 272.

- [25] A. Kojlo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8 (1990) 663.
- [26] J. J. Berzas Nevado, J. M. Lemus Gallego, P. Buitrago Laguna, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 571.

CAPÍTULO IV

SENSORES BIPARÁMETRO
PARA SALICILAMIDA Y
PARACETAMOL

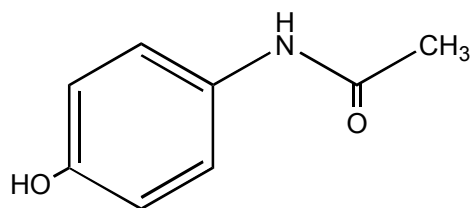


1. INTRODUCCIÓN

1.1. Paracetamol

La molécula de paracetamol surgió como consecuencia de la búsqueda de sustituciones en la molécula de *p*-aminofenol para disminuir su toxicidad. El paracetamol posee propiedades analgésicas y antipiréticas, en el primer caso aliviando los dolores especialmente somáticos (cefalea, dolores traumáticos, procesos reumáticos), y en el segundo caso provocando un descenso de la temperatura en animales y humanos febriles. Los estudios comparativos revelan, que con respecto a la dosis, el paracetamol es algo menos potente que la aspirina como analgésico y algo más como antipirético. Como el paracetamol es bien tolerado, no presenta muchos de los efectos secundarios de la aspirina y puede obtenerse sin prescripción médica, ocupa el lugar de “analgésico doméstico común”, pero la sobredosis aguda causa daños hepáticos fatales y el número de autoenvenenamientos y suicidios con paracetamol ha crecido de forma alarmante en los últimos años. Además, muchas personas, médicos incluidos, no parecen darse cuenta de la pobre actividad antiinflamatoria del paracetamol.

El paracetamol fue usado por primera vez en medicina por Mering en 1893, pero su popularidad data sólo de 1949, cuando se descubrió que era el principal metabolito activo de la acetanilida y la fenacetina. Puede adquirirse sin prescripción médica, y presenta la siguiente estructura:



En cuanto al modo y mecanismo de acción, es el mismo que para los salicilatos y demás analgésicos antipiréticos, es decir, de origen central y especialmente periférico para la acción analgésica, central para la antipirética, y tisular para la antiinflamatoria. Con dosis comunes, no se observan trastornos

digestivos ni erosiones gástricas. A dosis elevadas es capaz de provocar necrosis hepática centrolobulillar así como la transformación de la hemoglobina en metahemoglobina (compuesto estable incapaz de transportar oxígeno aprovechable para los tejidos). La administración continuada es capaz de producir lesiones renales crónicas que se denominan nefropatías analgésicas.

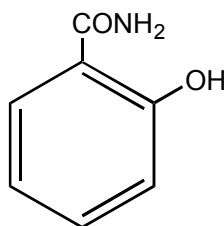
Los derivados del *p*-aminofenol se absorben por todas las vías, incluyendo la digestiva, siendo bases muy débiles; se absorben algo en el estómago y muy rápidamente en el intestino. Una vez absorbido el paracetamol pasa a la sangre en la que se alcanza una concentración plasmática máxima a la hora o las dos horas después de la ingestión. Con las dosis normales puede recuperarse entre el 90-100% de la droga en la orina del primer día, pero prácticamente nada se excreta sin cambio, ya que la mayor parte lo hace en forma conjugada con ácido glucurónico, sulfúrico o cisteína.

En las dosis terapéuticas recomendadas, el paracetamol es generalmente bien tolerado. Hay ocasionales erupciones cutáneas y otras reacciones alérgicas. La erupción es generalmente eritematosa o urticaria, pero a veces es más seria y puede acompañarse de fiebre y lesiones mucosas. Los pacientes que son sensibles a los salicilatos pueden también mostrar sensibilidad a estas drogas.

Se han propuesto diferentes técnicas cromatográficas para la determinación de paracetamol en presencia de otros compuestos [1-5], así como técnicas espectrofluorimétricas [6, 7] y electroquímicas [8, 9]. Las determinaciones espectro fotométricas, en general, se llevan a cabo con reacciones derivadoras [10, 11], para conseguir de este modo que la determinación sea selectiva.

1.2. Salicilamida

La salicilamida se engloba dentro del grupo de los salicilatos, cuyas características se han comentado en el *Capítulo II*. Este fármaco, también denominado *o*-hidroxibenzamida, se ha propuesto como sustituto eficaz de la aspirina, en las enfermedades reumáticas. Su estructura es la siguiente:



Es estable en preparados líquidos, no provoca úlceras gastrointestinales y puede administrarse a personas alérgicas a la aspirina.

Se ha descrito que la salicilamida es un analgésico efectivo contra el dolor de las enfermedades reumáticas, administrado en dosis de al menos 6 g. No obstante, otros investigadores han sido incapaces de hallar ninguna actividad clínica antirreumática, por lo que han concluido que la salicilamida no presenta actividad antirreumática digna de mención.

Los derivados de la anilina y del p-aminofenol, por ejemplo el acetaminofeno, poseen actividad analgésica similar a la de la aspirina, pero carecen de propiedades antiinflamatorias. Por tanto, los preparados que contienen salicilamida y acetaminofeno parecen tener baja aplicabilidad en el tratamiento de las enfermedades reumáticas. Las técnicas más utilizadas para la determinación de salicilamida, son técnicas cromatográficas [12-16].

1.3. Mezcla salicilamida-paracetamol

La combinación de paracetamol-salicilamida ha sido ampliamente prescrita debido a sus características analgésicas-antipiréticas. Mezclas binarias de ambos analitos han sido determinadas mediante titulación no acuosa diferencial [22].

La determinación espectrofotométrica de ambos compuestos está basada en la capacidad de sus grupos hidroxilo fenólicos para producir cromógenos mediante acoplamiento *diazo* [17, 18], reacciones de nitrosación [19, 20], o el uso de *polinitro derivados* [21]. También se han desarrollado determinaciones espectrofotométricas de mezclas, en la región UV, tales como salicilamida-paracetamol-cafeína [23], y salicilamida-paracetamol-codeína utilizando una función ortogonal y

métodos de diferencias de absorbancia [24]. Estos métodos UV tienen un gran inconveniente, y es que están muy influenciados por la interferencia de otras especies que acompañan a los analitos, principalmente aquellos que absorben en la región UV [23, 24]; por otro lado, los métodos espectrofotométricos en la región Visible precisan de un paso previo de derivación, lo que los hace más lentos.

Aprovechando el incremento de selectividad que ofrece la espectrofotometría en fase sólida, hemos abordado el desarrollo de un sensor biparámetro de flujo fotométrico U.V. para la resolución de la mezcla paracetamol-salicilamida, sin necesidad de derivación de ninguno de los analitos. Esta resolución está basada en la fijación de uno de los analitos sobre un soporte sólido a un determinado valor de pH, y la fijación simultánea (con aditividad en los valores de absorbancia) de ambos analitos a otro valor de pH diferente. Dicho sensor se aplicará a preparaciones farmacéuticas y a mezclas sintéticas.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón con una concentración de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de: paracetamol (FLUKA), y salicilamida (FLUKA). La disolución patrón de salicilamida se prepara en etanol/agua al 5% (v/v); mientras que el paracetamol, dado que es perfectamente soluble en agua, se prepara por disolución de éste en agua bidestilada; esta disolución era preparada a diario para evitar su posible oxidación. A partir de las disoluciones patrón (conservadas en frío a $4 \text{ }^\circ\text{C}$) se prepararon disoluciones de menor concentración mediante la adecuada dilución con agua bidestilada.
- b) Resina de cambio iónico Sephadex QAE A-25 (ALDRICH), en ciclo Cl⁻ utilizada sin tratamiento previo.
- c) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- d) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 0.1\text{M}$ (PANREAC R.A.).
- e) Disoluciones amortiguadoras: ácido cítrico/citrato Na, HAc/NaAc, ácido succínico/succinato Na, ácido maléico/maleato Na y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 μm .

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofotómetro UV-V Lambda 2 de Perkin Elmer controlado por ordenador personal compatible 386, programa PECCS 4.2.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Cubetas de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz, HELIMA 138-QS.
- f) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.
- g) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.

3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Se llevaron a cabo experimentos preliminares para establecer posibles diferencias espectrales entre los analitos en estudio, así como el efecto de su retención sobre un soporte sólido en la sensibilidad. Para ello se registraron los espectros de absorción de ambos, tanto en disolución acuosa como en fase resina, a los dos valores de pH elegidos óptimos para el desarrollo del sensor. Para registrar los espectros en fase sólida, se utilizó una cubeta Hellma 138-QS (*Fig. IV-2*), que posee 1-mm de paso óptico. En cambio, para los espectros en disolución se utilizó una cubeta de cuarzo con 1-cm de paso óptico.

Los espectros en disolución (pH 5 y 12 ajustados con HCl y NaOH 0.1M) se obtienen a partir de una solución de paracetamol y salicilamida con una concentración de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, en cada uno de ellos. Los espectros se realizaron frente a blancos que no contenían analitos.

Los espectros en fase resina se obtuvieron utilizando la configuración FIA mostrada en la *Fig. IV-1*. Para obtener los espectros a pH=5 se utilizó una disolución portadora de HAc/NaAc 0.045M, mientras que para obtener los espectros a pH=12 se utilizó una disolución de NaCl 0.1M, a la que se ajustó el pH con NaOH 0.1 M. En ambos portadores se inyectaron 600 μl de paracetamol o salicilamida respectivamente, con una concentración de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Como microzona activa se utilizó resina Sephadex QAE A-25. Los espectros se realizaron a flujo detenido frente a blancos correspondientes al portador circulando a través de la resina. Los espectros registrados para ambos analitos a valores de pH 5 y 12 tanto en solución homogénea como en resina, se muestran en la *Figura IV-1*.

Se observa que los espectros de ambos compuestos sufren un amplio solapamiento espectral tanto a valores de pH ácido como básico, no siendo pues posible la resolución de la mezcla por espectrofotometría convencional. A pH ácido se produce una disminución en la sensibilidad de la salicilamida al pasar de solución a fase sólida; sin embargo, estamos consiguiendo que la señal analítica debida al paracetamol en solución homogénea desaparezca al hacer uso de una fase sólida en un medio de pH=5.5.

En medio básico, por otro lado, para ambos analitos se produce un ligero efecto batocrómico así como un incremento en la sensibilidad al pasar de espectrofotometría convencional a espectrofotometría en fase sólida (pasamos de una célula de flujo de 1-cm a otra de 1-mm de paso óptico). Además se comprueba experimentalmente cómo a una $\lambda=300$ nm se produce aditividad en los valores de absorbancia de ambos analitos (medio básico). Si a esto sumamos que el máximo de la salicilamida en fase sólida para valores de pH ácido también aparece a esta misma λ , escogeremos la longitud de onda de 300 nm para el desarrollo del sensor propuesto.

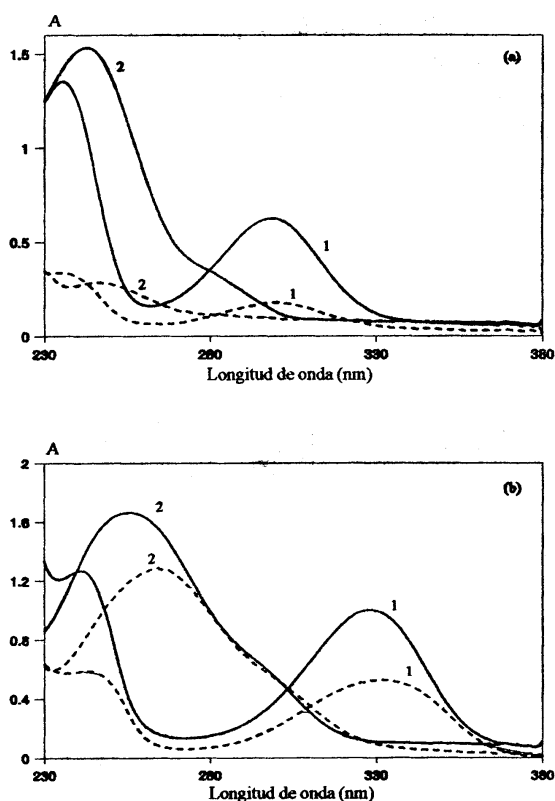


Figura IV-1. Espectros de salicilamida y paracetamol

(a) pH=5 (b) pH=12
 — Solución homogénea (1-cm paso óptico) ---- Fase sólida (1-mm paso óptico)
 (1) 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida (2) 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol

Figura IV-1. Espectros de salicilamida y paracetamol

(a) pH=5 (b) pH=12
 — Solución homogénea (1-cm paso óptico) ---- Fase sólida (1-mm paso óptico)
 (1) 20 . g ml^{-1} de salicilamida (2) 20 . g ml^{-1} de paracetamol

4. CONFIGURACIÓN FIA

Se empleó la configuración FIA mostrada en la Fig. IV-2. La muestra se inyecta en una corriente de portador que lo pone en contacto con el soporte sólido. Este portador P(a) (medio ácido), que permite la retención de la salicilamida, produce a su vez la autoelución de ésta. A continuación se gira la

válvula de selección (VS) y tras una nueva inyección conseguimos que un segundo portador P(b) (medio básico) permita la fijación y posterior elución del paracetamol y salicilamida simultáneamente. El sensor opera, pues, secuencialmente (requiere dos inyecciones sucesivas para determinar dos analitos), usando secuencialmente dos portadores diferentes.

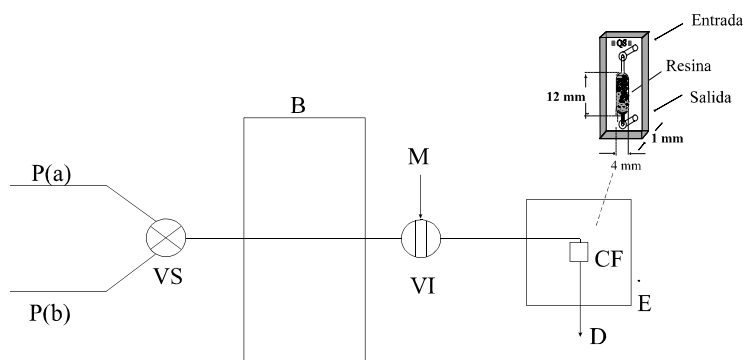


Figura IV-2. Configuración FIA

P(a): portador ácido (HAc/NaAc 0.045M pH=5); P(b): portador básico (NaCl 0.1M pH=12); VS: válvula de selección; B: bomba; M: muestra; VI: válvula de inyección; D: desecho; CF: célula de flujo; E: espectrofotómetro

A modo de ejemplo se representan a continuación dos diagramas para la salicilamida (Fig. IV-3.1 y IV-3.2), correspondientes al uso de dos portadores diferentes: HAc/NaAc 0.045M a pH=5 y NaCl 0.1M a pH=12, respectivamente. En ambos casos, el diagrama corresponde al estudio de la reproducibilidad del analito en el sensor espectrofotométrico de flujo (en sus condiciones operatorias óptimas) para la determinación de salicilamida.

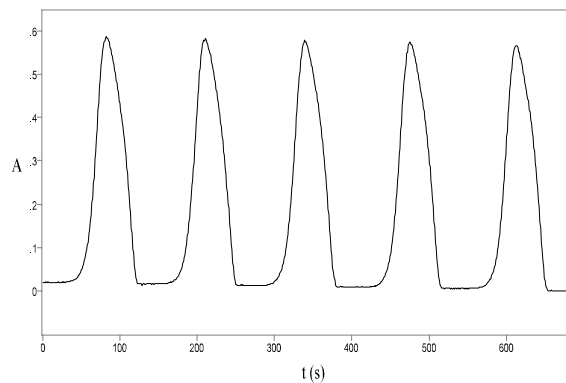


Figura IV-3.1. *Fiograma para salicilamida*
(*HAc/NaAc, pH=5*)
[Salicilamida]=90 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}$: 600 μl ;
Caudal: 1.60 ml min^{-1}

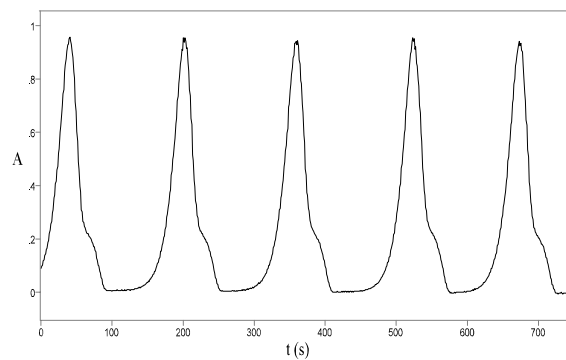


Figura IV-3.2. *Fiograma para salicilamida*
(*NaCl, pH=12*)
[Salicilamida]= 85 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}}$:600 μl ;
Caudal: 1.60 ml min^{-1}

El fiograma correspondiente al paracetamol presenta unos picos equivalentes a los obtenidos en la *Figura IV-3.1*.

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Como en casos anteriores, podemos considerar tres grupos de variables: químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección.

5.1. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.1.1. Naturaleza del soporte sólido

En espectrofotometría en fase sólida el primer paso es la elección de un soporte adecuado donde fijar el sistema. De todos los soportes disponibles seleccionamos adsorbentes tales como gel de sílice C₁₈ y resina Sephadex G-15, y resinas cambiadoras de iones tipo Sephadex (SP C-25, CM C-25, QAE A-25 y DAE A-25). Estas últimas son las que en experiencias preliminares produjeron menores valores de absorbancia de fondo. Las resinas cambiadoras tipo Dowex fueron descartadas dado la gran absorbancia de fondo que presentan.

Los adsorbentes estudiados no retenían de forma cuantitativa a las especies en cuestión. En cuanto a las resinas tipo Sephadex, se encontró que la fijación era mayor en las resinas aniónicas DAE A-25 y QAE A-25, probablemente debido a la fijación a través de los grupos -OH fenólicos previamente desprotonados. No se detecta fijación apreciable en las resinas catiónicas. La resina seleccionada para el estudio que nos proponemos fue Sephadex QAE A-25 por ser la que proporciona mejores resultados.

5.1.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

Dado que el cambio de pH en el portador afecta a la compactación del soporte sólido, debemos asegurarnos que cuando éste ocupe su menor volumen, todo el haz de luz pase aún a través de él; para cantidades mayores de resina, la absorbancia disminuye debido a la dilución del analito en la resina. Se elige la altura correspondiente a 12 mm, que equivale al bulbo totalmente completo, por ser ésta la que proporciona una mayor respuesta de la señal analítica.

5.2. VARIABLES QUÍMICAS

Durante el estudio de las variables químicas se mantienen fijas las variables FIA:

Salicilamida y Paracetamol

⇨ Caudal: 1.60 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 600 µl

5.2.1. pH de los portadores y de la muestra

El pH de la disolución regula el equilibrio ácido-base y determina la mayor o menor retención del analito sobre el soporte empleado siempre que el analito presente grupos que se vean afectados por la variación en la concentración de protones del medio, como es el caso.

Para establecer la dependencia de las señales de ambos analitos con el pH se preparan dos disoluciones, una de 40 µg ml⁻¹ de salicilamida y otra de 20 µg ml⁻¹ de paracetamol. Dado que utilizando como portador únicamente agua bidestilada, ajustada a un determinado valor de pH con HCl o NaCl, la fijación del analito se producía en la parte superior de la resina (para ciertos valores) no permitiendo el desplazamiento de éste hasta la zona de detección, se procedió a preparar distintas disoluciones con una concentración constante de sales (NaCl 0.1M) pero diferentes valores de pH, mediante adición de la cantidad necesaria de HCl o NaOH 0.1M, al objeto de facilitar que por elución avance a lo largo del soporte sólido. Se registró la señal a 300 nm, que es la longitud de onda escogida para la resolución de la mezcla. Los resultados obtenidos aparecen representados en la *Figura IV-4*.

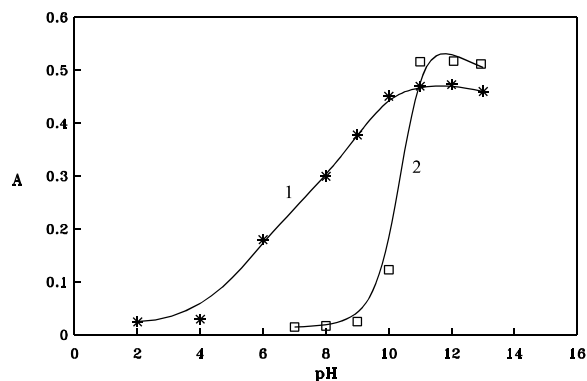


Figura IV-4. Influencia del pH del portador para salicilamida y paracetamol
(1) Salicilamida (2) Paracetamol

En ambos casos se comprueba cómo la señal alcanza su máximo a partir de $\text{pH}=11$, lo cual puede explicarse porque a ese valor de pH el grupo fenólico está totalmente dissociado y la fijación de los dos analitos en la resina aniónica es completa. En cambio, en el rango de pH comprendido entre 2-9 sólo la salicilamida es retenida, y sólo parcialmente. Ambos hechos van a permitir el desarrollo de un sensor para la determinación secuencial de ambos analitos trabajando a una longitud de onda de 300 nm, y usando dos soluciones portadoras: una de $\text{pH}=5$ al que sólo se produce la fijación de la salicilamida y la segunda a $\text{pH}=12$, al cual se produce la fijación de la salicilamida y el paracetamol cumpliéndose la aditividad de las absorbancias.

También se estudió la influencia del pH de la muestra, para lo cual se prepararon una serie de disoluciones todas ellas con una concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol y $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida, con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1M para poder ajustarlas a un determinado valor de pH . Se comprobó que el valor de la señal no variaba cuando utilizando el portador a $\text{pH}=5$ la muestra presentaba valores de pH comprendidos entre 3-10; el pH de la muestra debía estar comprendido en el rango 3.5-13 cuando se utilizaba el portador a $\text{pH}=12$. De acuerdo con los resultados obtenidos no es necesario un tamponamiento previo de la muestra, es decir, no es necesario un control estricto de esta variable.

5.2.2. Naturaleza y concentración de los portadores/eluyentes

Una vez elegidos los pH óptimos de las disoluciones portadoras se estudió la naturaleza de las mismas, así como su concentración.

En este estudio se utilizó una disolución muestra que contenía $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol y $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida (portador/eluyente básico), y una muestra que contenía con una concentración única de $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida (portador/eluyente ácido). Para la elección de la disolución portadora a pH=5 se probaron las siguientes disoluciones amortiguadoras: ácido cítrico/citrato sódico, HAc/NaAc, ácido succínico/succinato Na, ácido maléico/maleato Na y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M. De todas ellas la disolución de HAc/NaAc dió los mejores resultados para la determinación de salicilamida. Para la elección de la disolución portadora a pH=12 se emplearon disoluciones de diferentes sales de concentración 0.1M ajustadas al pH de trabajo con NaOH. Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , HK_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. De todos ellos el NaCl proporcionó los mejores resultados en el proceso de retención/elución simultáneo de ambos analitos.

Para estudiar la influencia de la concentración del portador, las disoluciones muestra utilizadas presentaban la misma concentración que las empleadas en el estudio de la naturaleza del portador. Para estudiar la concentración óptima de la disolución amortiguadora HAc/NaAc a pH=5, se prepararon disoluciones de concentraciones comprendidas entre 0.02-0.1M, mientras que para el portador a pH=12, las concentraciones de NaCl que se probaron estaban comprendidas entre 0.05-0.5M. Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras IV-5.1 y IV-5.2*.

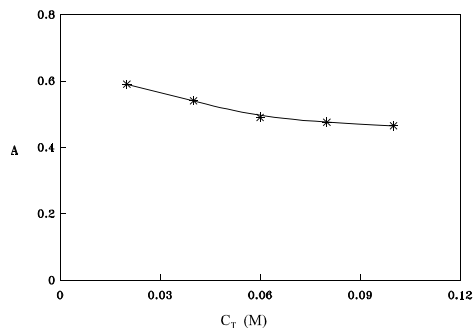


Figura IV-5.1. Influencia de la concentración de portador/eluyente para salicilamida (pH=5)

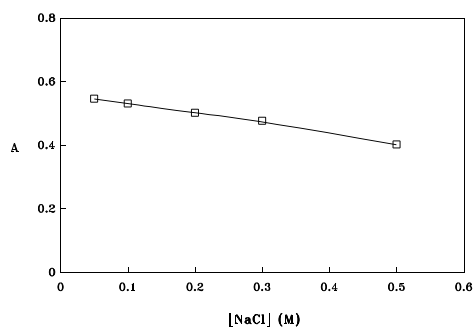


Figura IV-5.2. Influencia de la concentración de portador/eluyente para la mezcla (pH=12). La señal es debida a la respuesta global del sensor a los dos analitos

El incremento de la concentración de portador hace disminuir la señal analítica en ambos casos (así como los tiempos de desarrollo de la señal), debido a la mayor competencia de los iones del portador por los sitios activos del soporte sólido. Habrá que adoptar una solución de compromiso que proporcione una buena respuesta del sensor y una frecuencia de muestreo aceptable. Así se estimó en 0.1M la concentración óptima de NaCl para la determinación conjunta de salicilamida y paracetamol, mientras que la concentración escogida para la disolución amortiguadora de HAc/NaAc fue de 0.045M.

Ambas disoluciones portadoras actúan a su vez de eluyentes, no siendo por tanto necesario un posterior paso de elución, lo cual aumenta en gran medida la frecuencia de muestreo. Se obtienen así señales transitorias, pues al alcanzar el extremo posterior del bolo de la muestra del soporte sensor, el portador comienza la elución del analito retenido.

5.3. VARIABLES FIA

Se estudió la influencia de las variables FIA manteniendo constante las variables químicas en los valores anteriormente optimizados.

5.3.1. Caudal

Se procedió al estudio de la influencia del caudal, para lo cual se fue variando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Se estudió dicha variable para los dos portadores (pH 5 y 12). Para el portador ácido se inyectaron 600 μl de salicilamida con una concentración de 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que para el portador básico se inyectaron 600 μl de una mezcla de salicilamida y paracetamol con unas concentraciones de 20 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Los resultados se representan en la *Figura IV-6*.

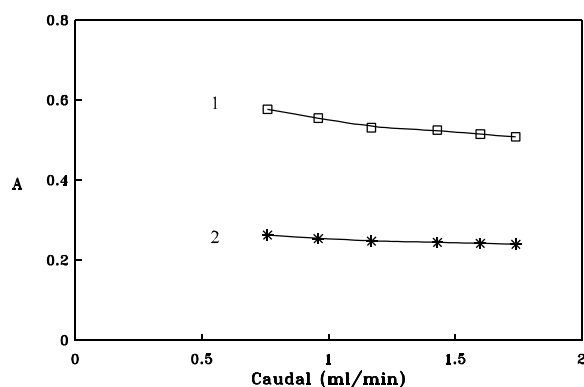


Figura IV-6. *Influencia del caudal*
1) Salicilamida-Paracetamol (pH=12)
2) Salicilamida (pH=5)

Puesto que los valores de absorbancia obtenidos en ambas curvas no se ven excesivamente afectados por el valor del caudal empleado, se seleccionó un caudal de 1.60 ml min^{-1} para conseguir una elevada frecuencia de muestreo.

5.3.2. Volumen de inyección

Un hecho característico de la espectrometría en fase sólida, comentado anteriormente en los otros capítulos, es que a medida que aumenta el volumen de muestra inyectado disminuye el límite de detección y aumenta la sensibilidad (hasta un determinado límite), debido a la retención en el soporte sólido de una mayor cantidad de analito. La consecuencia inmediata es que se puede trabajar a

más bajas concentraciones de analito sin más que aumentar el volumen de muestra que lo contenga. Esto permite, dentro de ciertos límites, poner a punto un mismo método para diferentes volúmenes de muestra según los requerimientos del problema.

Para establecer la dependencia del volumen de muestra para la determinación de cada uno de los analitos, se emplean diferentes bucles para la inyección de la muestra, observándose cómo se afecta la señal analítica mientras permanece constante la concentración de analito inyectada. La *Figura IV-7* muestra el efecto de esta variable para una concentración de 40 y 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida y paracetamol, respectivamente.

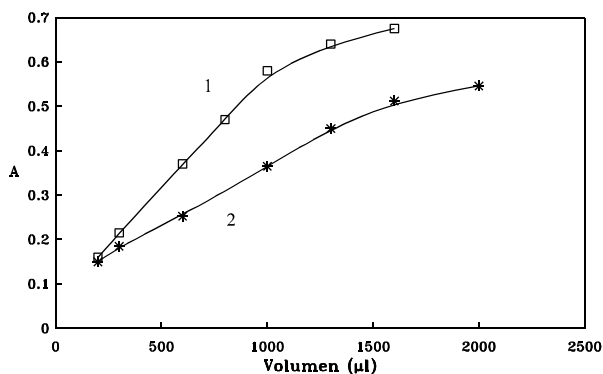


Figura IV-7. *Influencia del volumen*
1) Paracetamol 2) Salicilamida (pH=5)

Para la salicilamida se encuentra una linealidad de la señal analítica hasta un volumen aproximado de 1500 μl . En cambio, para el paracetamol, se comprueba cómo la señal analítica deja de responder linealmente respecto del volumen de muestra a partir de 1000 μl . En ambos sistemas la relación deja de ser lineal a partir de estos valores, lo cual puede explicarse a la vista de lo discutido en capítulos anteriores.

Se seleccionó un volumen de trabajo de 600 μl ya que aún no siendo el que proporciona una mayor sensibilidad en la determinación de ambos analitos, es perfectamente apropiado para el análisis de éstos en preparados farmacéuticos y a la vez permite una elevada frecuencia de muestreo.

5.4. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se enumeran cuales son las condiciones óptimas, incluidas las variables químicas y FIA, del sensor desarrollado en este capítulo.

	<i>Paracetamol-Salicilamida</i>	
<i>λ (nm)</i>	300	
<i>Soporte sólido</i>	Sephadex QAE A-25	
<i>Nivel de soporte (mm)</i>	12	
<i>Caudal (ml min⁻¹)</i>	1.6	
<i>Volumen de muestra (μl)</i>	600	
	pH=5	pH=12
<i>Portador/eluyente</i>	HAc/NaAc 0.045M	NaCl 0.1M
<i>pH de la muestra</i>	3-10	3.5-13

6. CALIBRACIÓN DEL SENSOR. PARÁMETROS ANALÍTICOS

A continuación se recogen los resultados encontrados para la calibración y parámetros de calidad para cada uno de los analitos estudiados. Las variables químicas y FIA se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados.

6.1. Metodología y calibración del sensor

Tal y como se ha ido describiendo, se van a utilizar dos disoluciones portador/eluyente en el desarrollo del sensor, siendo necesario por tanto una doble inyección secuencial de muestra para la resolución de la mezcla. Trabajando con la disolución portadora HAc/NaAc 0.045M a pH=5, se produce únicamente la fijación de la salicilamida, obteniendo del espectrofotómetro un valor de absorbancia A_T . Una vez eluido el analito retenido en el soporte sólido, giramos la válvula de selección de la configuración FIA para que sea la disolución portadora de NaCl

0.1M a pH=12 la que ponga la muestra (una segunda inyección) en contacto con la microzona activa. Con esta nueva inyección obtenemos un valor de absorbancia A_{II} que corresponde a la absorbancia suma de la salicilamida y del paracetamol, dado que a pH=12 se produce la fijación de ambos analitos ocurriendo además que los valores de absorbancia de los dos analitos son aditivos. Por consiguiente, de las dos inyecciones de muestra se obtienen del espectrofotómetro dos valores de absorbancia: A_I y A_{II} .

$$\begin{aligned} A_I &= A_{Sal} \\ A_{II} &= A_{Sal} + A_{Par} \end{aligned} \quad (1)$$

En la *Figura IV-8* se representan las señales obtenidas para el paracetamol, la salicilamida, así como la mezcla de ambos utilizando el portador de pH=12. Las concentraciones correspondientes en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada muestra inyectada (600 μl) se encuentran especificadas sobre cada pico del diagrama.

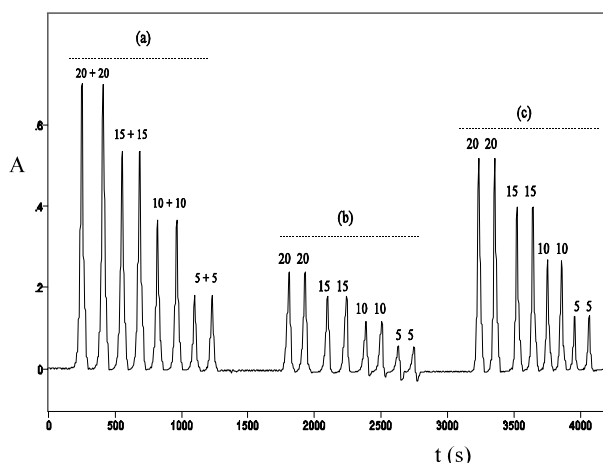


Figura IV-8. *Perfiles FIA correspondientes a salicilamida-paracetamol (pH=12)*
 (a) Mezcla (b) Salicilamida (c) Paracetamol

Una vez realizada la calibración para cada analito, mediante ajuste por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes ecuaciones de las rectas, que aparecen representadas en la *Figura IV-9*.

✓Salicilamida

📎 pH=5 $A = 0.011 + 6.23 \times 10^{-3} c$ $r=0.9998$

📎 pH=12 $A = 0.015 + 11.1 \times 10^{-3} c$ $r=0.9990$

✓Paracetamol

📎 pH=12 $A = 0.006 + 25.7 \times 10^{-3} c$ $r=0.9998$

donde :

A: absorbancia

c: concentración de analito ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

r: coeficiente de correlación

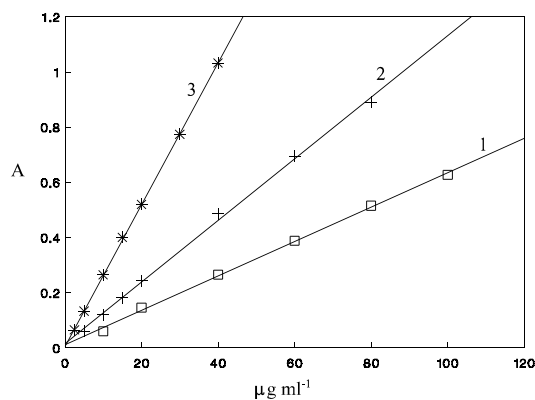


Figura IV-9. Calibración para salicilamida-paracetamol

- 1) Salicilamida pH=5 2) Salicilamida pH=12
3) Paracetamol pH=12

La concentración de salicilamida se determina directamente a partir del pico de absorbancia obtenido en la fijación de ésta a pH=5, es decir a partir de A_i . Esta concentración se interpola en la recta de calibrado que corresponde al proceso de retención de la salicilamida a pH=12, obteniendo así A_{Sal} , que sería su absorbancia para este valor de pH. Una vez conocido este valor de absorbancia, y haciendo uso de la ecuación (1), podemos conocer la absorbancia correspondiente al paracetamol.

$$A_{II} = A_{Sal'} + A_{Par}$$

$$A_{Par} = A_{II} - A_{Sal'}$$

Conocida la absorbancia del paracetamol A_{Par} se obtiene su concentración a partir de su recta de calibración.

Observando las pendientes de las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes a ambos analitos, se encuentra que los valores son relativamente bajos respecto al resto de sensores desarrollados en los capítulos anteriores. Sin embargo, pese a que la sensibilidad es menor por no medir la señal analítica a la longitud de onda correspondiente a los máximos de absorción de cada uno de los analitos, se consigue la resolución de la mezcla salicilamida-paracetamol, analitos que aparecen frecuentemente asociados en preparaciones farmacéuticas. En bibliografía son escasos los trabajos encontrados donde se permite la resolución de una mezcla de dos o más analitos mediante un sensor en flujo en fase sólida. De hecho, este sensor junto con los otros dos sensores biparámetro desarrollados en esta Memoria, son los primeros sensores en flujo en fase sólida con multideterminación secuencial.

6.2. Parámetros analíticos

En las *Tabla IV-1* se muestran los parámetros analíticos de cada una de las calibraciones necesarias para el desarrollo del sensor.

La vida media del sensor se estimó en más de 150 inyecciones de muestra. Los resultados obtenidos en el estudio de la reproducibilidad y los límites de detección y cuantificación de los dos analitos a sus valores de pH correspondientes, se recogen en las *Tablas IV-2.1 - IV-2.3, IV-3.1 - IV-3.3 y IV-4.1 - IV-4.3 del Apéndice*.

Tabla IV-1. Parámetros analíticos para salicilamida-paracetamol

Parámetro	Salicilamida		Paracetamol
	pH=5	pH=12	pH=12
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	0.011	0.015	0.006
<i>Pendiente (ml μg^{-1})</i>	6.23×10^{-3}	11.1×10^{-3}	25.7×10^{-3}
<i>Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	10-100	5-80	2.5-40
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9998	0.9990	0.9998
<i>Límite de detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	0.36	0.24	0.10
<i>Límite de cuantificación ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>	1.22	0.79	0.33
<i>RSD % (n=10)</i>	0.61	0.36	0.57
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	36	36	36

7. INTERFERENCIAS

Se ha realizado un estudio de la interferencia que produce la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas sobre la respuesta del sensor desarrollado. En concreto, se ha hecho un estudio de posibles interferentes (especies que aparecen acompañando a los analitos en estudio en los preparados farmacéuticos) de la salicilamida, a los dos valores de pH a los que se realiza su determinación, y del paracetamol.

La estrategia a seguir para decidir si una sustancia produce o no interferencia en la determinación de cada uno de los analitos será: se mide la señal analítica correspondiente al analito en presencia de una concentración concreta del interferente, y si el error obtenido en la misma (referido a la señal correspondiente al analito sólo) es superior al $\pm 5\%$, se concluye que la especie en ensayo interfiere cuando se encuentra en esa concentración; si por el contrario el error es igual o inferior a $\pm 5\%$ se considera que la especie no interfiere para ese nivel de concentración. Utilizando un volumen de inyección de muestra de 600 μl , se trabaja con disoluciones que para cada especie extraña contienen 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol. Los límites de tolerancia para las

diferentes especies ensayadas aparecen en la *Tabla IV-5*.

Tabla IV-5. *Tolerancia del sensor de paracetamol y salicilamida a especies extrañas*
(determinación de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol)

Especies extrañas	Tolerancia ([interferente]/[analito]) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	Salicilamida		Paracetamol
	pH=5	pH=12	pH=12
Sacarosa, Glucosa, Lactosa	>100 ^a	>100 ^a	>100 ^a
Ácido ascórbico	0.5	5	>20 ^a
Cafeína	>10 ^a	>10 ^a	1
Sacarina	0.5	2	1
Codeína	>10 ^a	10	10
Ácido acetil salicílico	--	--	1
Efedrina	--	--	>50 ^a

^aMáxima relación interferente/analito ensayada

Para la salicilamida, a ambos valores de pH, así como para el paracetamol, los niveles de tolerancia a las especies que normalmente aparecen acompañándoles en las preparaciones farmacéuticas es muy alta. La relación en la que todas estas especies aparecen en los fármacos respecto de los analitos de interés se encuentra siempre por debajo del nivel de tolerancia aceptado, lo cual significa que no cabe esperar en un principio interferencias por parte de estas especies extrañas en la determinación de paracetamol, salicilamida, o ambos simultáneamente, en los medicamentos analizados.

8. APLICACIONES ANALÍTICAS

Con el fin de demostrar la utilidad del sensor propuesto, éste ha sido aplicado al análisis de salicilamida, paracetamol o la mezcla de ambos en:

 preparaciones farmacéuticas

 mezclas sintéticas

8.1.1. Preparación de las muestras

Los medicamentos analizados que presentaban salicilamida en su composición (sea comprimidos, cápsulas, ampollas, etc.) fueron disueltos previamente en 5 ml de etanol, para posteriormente adicionar aproximadamente unos 50 ml de agua bidestilada y depositarlos en un baño ultrasonidos durante 10 minutos. El etanol facilita la disolución de la salicilamida, cuya solubilidad es baja. En los fármacos donde sólo aparece el paracetamol sin ir acompañado de salicilamida, se opera de igual forma pero sin necesidad de hacer uso de etanol. Por último, en ambos casos, el excipiente insoluble se separó por filtración a través de filtro Millipore de 0.45 μm , llevándose a un volumen final de 100 ml.

Todas las disoluciones fueron diluidas adecuadamente antes de ser inyectadas en la corriente del portador. En ningún caso se observó la existencia de efecto matriz, de forma que se aplicó el método de calibración directa para un volumen de inyección de 600 μl .

8.1.2. Determinación de paracetamol-salicilamida

8.1.2.1. En preparaciones farmacéuticas

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Coricidin" (Lab. Schering-Plough), cápsulas
 - Ácido ascórbico: 50 mg
 - Cafeína: 30 g
 - Clorfenamina, maleato: 4 mg
 - Salicilamida: 190 mg
 - Excipientes: almidón y otros c.s. 177.47 mg

2. "Percutalin" (Lab. Berenguer-Infale), ampollas
 - Dexametasona: 1 mg
 - Salicilamida: 170 mg
 - Salicilato de etilenglicol: 200 mg
 - Nicotinato de metilo: 10 mg
 - Excipientes: glicerina y etanol c.s.

3. "Hubergrip" (Lab. ICN Hubber), comprimidos
 - Salicilamida: 300 mg
 - Clorfenamina, maleato: 2 mg
 - Propifenazona: 250 mg
 - Cafeína: 25 mg
 - Almidón de trigo: 76 mg

4. "Yendol" (Lab. Faes), sobres
 - Paracetamol: 200 mg
 - Salicilamida: 500 mg
 - Clorfenamina, maleato: 3 mg
 - Cafeína: 30 mg
 - Sacarina sódica: 10 mg
 - Sacarosa: 6.56 g
 - Excipiente azucarado y aromatizado c.s.

5. "Pridio" (Lab. Quimifar), cápsulas
 - Salicilamida: 100 mg
 - Paracetamol: 300 mg
 - Clorfenamina, maleato: 2 mg
 - Cafeína: 25 mg

6. "Rinomicine" (Lab. Fardi), comprimidos
 - Salicilamida: 150 mg
 - Paracetamol: 150 mg
 - Cafeína: 30 mg
 - Clorfenamina, maleato: 4 mg
 - Fenilefrina, clorhidrato: 10 mg

7. "Duorol" (Lab. Pharmacia Upjohn), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg
 - Sacarina: 20 mg

8. "Apiretal gotas" (Lab. Ern), gotas
 - Paracetamol: 100 mg
 - Sacarina: 5 mg

9. “Analgilasa” (Lab. Lasa), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg
 - Cafeína: 30 mg
 - Codeína: 10 mg

10. “Veganin” (Lab. Warner Lambert Consumer Health), comprimidos
 - Paracetamol: 250 mg
 - Ácido acetil salicílico: 250 mg
 - Codeína: 9.78 mg

11. “Algidol” (Lab. Berenguer Infale), sobres
 - Paracetamol: 650 mg
 - Codeína: 10 mg
 - Ácido ascórbico: 500 mg
 - Sacarina: 2.5 mg
 - Sacarosa: 3.714 g

Los resultados obtenidos (media de tres determinaciones) en la determinación de uno de los analitos o ambos simultáneamente en cada medicamento analizado (mg/comprimido o mg/sobre granulado), se muestran en la *Tabla IV-6*.

Tabla IV-6. Determinación de salicilamida y paracetamol en preparaciones farmacéuticas

Fármaco	Composición (mg)/unidad		Recuperación $\pm \sigma_r$ (%)	
	Salicilamida	Paracetamol	Salicilamida	Paracetamol
Coricidin	190	-	99 \pm 1	-
Percutalin	170	-	99 \pm 2	-
Hubergrip	300	-	101.0 \pm 0.8	-
Yendol	500	200	100 \pm 1	100 \pm 2
Pridio	100	300	99 \pm 2	100 \pm 1
Rinomicine	150	150	100.2 \pm 0.6	101 \pm 1
Duorol	-	500	-	99.6 \pm 0.9
Apiretal gotas	-	^a 100	-	99 \pm 2
Analgilasa	-	500	-	100.0 \pm 0.4
Veganin	-	250	-	99.6 \pm 0.7
Algidol	-	650	-	100.1 \pm 0.3

^a por ml

Los resultados expuestos demuestran una vez más que no hay diferencia apreciable entre los obtenidos por el método propuesto y los indicados por el fabricante, dado que todas las recuperaciones se encuentran en torno al 100%.

Asimismo, se realizó un estudio de recuperación para comprobar la exactitud del método propuesto. Para ello, se adicionaron cantidades conocidas de los analitos a diferentes niveles de concentración, sobre fármacos estudiados previamente. Los resultados obtenidos en esta recuperación aparecen reflejados en la *Tabla IV-7*.

Tabla IV-7. Estudio de recuperación de salicilamida y paracetamol en fármacos

Muestra	Salicilamida		Paracetamol	
	Añadido/unidad (mg)	Encontrado ^a (mg)	Añadido/unidad (mg)	Encontrado ^a (mg)
Rinomicine	5	4.9 ± 0.1	5	5.0 ± 0.1
	10	10.0 ± 0.1	10	9.9 ± 0.2
	20	20.1 ± 0.2	20	19.9 ± 0.2
Yendol	10	9.8 ± 0.2	10	9.9 ± 0.2
	20	20.1 ± 0.1	20	20.1 ± 0.2
	30	29.9 ± 0.2	30	30.0 ± 0.2
Pridio	5	4.8 ± 0.3	20	19.8 ± 0.3
	10	9.8 ± 0.3	10	10.1 ± 0.3
	20	20.0 ± 0.3	5	4.9 ± 0.2

^a Valor medio encontrado ± desviación estándar de tres determinaciones

8.1.2.2. En mezclas sintéticas

Además de aplicar el sensor espectrofotométrico de flujo a los medicamentos anteriormente estudiados, éste también fue aplicado a diversas mezclas sintéticas preparadas a partir de disoluciones patrón. Estas mezclas se encontraban en unas relaciones de paracetamol-salicilamida del orden 1:5 y 5:1, respectivamente; tal y como muestra la *Tabla IV-8*, las recuperaciones obtenidas se encuentran entre el 99 y 101% para salicilamida y entre 98 y 101% para paracetamol.

Tabla IV-8. Determinación simultánea de salicilamida y paracetamol en mezclas sintéticas

Composición de la mezcla (µg ml ⁻¹)		^a Recuperación ± σ _r (%)	
Salicilamida	Paracetamol	Salicilamida	Paracetamol
50	15	100.4 ± 0.5	100.8 ± 0.1
15	3	99.6 ± 0.8	98 ± 1
20	20	100.2 ± 0.5	100.6 ± 0.5
15	30	99.7 ± 0.2	99.4 ± 0.8
8	24	99 ± 1	99.7 ± 0.4
6	30	100.8 ± 0.7	100 ± 1

^aMedia de tres determinaciones

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. L. Rau, A. R. Aroor, P. G. Rao, *Indian Drugs*, 28 (1991) 285.
- [2] B. Aaroe, J. Remme, B. Salvesen, *Meddr norsk farm Selsk.*, 37 (1975) 274.
- [3] E. Michael, M. E. El-Kommos, M. E. Kamla, *Talanta*, 36 (1989) 678.
- [4] G. G. Skellern, *Analyst*, 106 (1981) 1071.
- [5] L. F. Prescott, *J. Pharm. Pharmacol.*, 23 (1971) 111.
- [6] T. Kaito, K. Sagara, T. Yoshida, Ito-Yuzi, *J. Pharm. Soc. Japan*, 94 (1974) 633.
- [7] M. Dolegeal-Vendrely, M. Guernet, *Analisis*, 4 (1976) 223.
- [8] J. W. Munson, H. Abdine, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 1775.
- [9] A. Falkowski, R. Wei, *Anal. Lett. Part B*, 14 (1981) 1003.
- [10] J. W. Murfin, *Analyst*, 97 (1972) 663.
- [11] C. T. H. Ellock, A. G. Fogg, *Analyst*, 100 (1975) 16.
- [12] S. R. Gautam, V. Chungi, A. Hussain, S. Babhair, D. Papadimitrou, *Anal. Lett. Part B*, 14 (1981) 577.
- [13] M. E. Morris, G. Levy, *J. Pharm. Sci.*, 72 (1983) 612.
- [14] R. M. Fielding, J. A. Waschek, G. M. Rubin, S. M. Pond, T. N. Tozer, *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 1221.
- [15] X. Xu, K. S. Pang, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 64 (1987) 313.
- [16] A. G. De Boer, J. M. Gubbens-Stibbe, F. H. De Koning, A. Bosma, D. D. Breimer, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 4 (1979) 457.
- [17] S. Belal, A. A. El Kheir, A. A. El Shanwani, *Analyst*, 110 (1985) 205.
- [18] S. P. Agarwal, M. I. Walash, *Indian J. Pharm.*, 36 (1974) 47.
- [19] S. F. Belal, M. A. H. El Sayed, A. M. El Walily, H. Abdine, *Analyst*, 104 (1979) 919.
- [20] A. A. Ouf, M. I. Walash, S. M. Hassan, S. M. El Sayed, *Analyst*, 105 (1980) 169.
- [21] A. A. El Kheir, S. Belal, M. El Sadek, A. El Shanwani, *Analyst*, 111 (1986) 319.
- [22] M. I. Blake, L. B. Shumaker, *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 56 (1973) 653.
- [23] N. Shane, M. Kowblansky, *J. Pharm. Sci.*, 57 (1968) 1218.
- [24] M. A. H. El Sayed, S. F. Belal, A. M. El Walily, H. Abdine, *Analyst*, 104 (1979) 620.

CAPÍTULO V

SENSORES BIPARÁMETRO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO Y PARACETAMOL



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico ha sido ampliamente estudiado en el *Capítulo II*, tanto sus características como los métodos utilizados para su determinación. Entre las técnicas más empleadas para su determinación encontradas en bibliografía, en estos últimos años, caben destacar las técnicas espectrofotométricas [1, 2], HPLC [3, 4], quimioluminiscentes [5], y electroquímicas [6].

1.2. Paracetamol

Las características del paracetamol ya han sido comentadas en el *Capítulo IV*. En bibliografía aparecen recogidos numerosos métodos para el análisis de paracetamol en fármacos y en fluidos biológicos. En los laboratorios clínicos se emplean con gran frecuencia técnicas colorimétricas [7-10] y espectrofotométricas UV [11, 12], estando ambas sujetas a la interferencia causada por otros componentes que normalmente suelen acompañarles. La cromatografía de gases con [13, 14] o sin [15, 16] derivación así como HPLC [17, 18] son técnicas más específicas que permiten su determinación en plasma y orina. También se han desarrollado métodos fluorimétricos para su determinación en fármacos [19-21].

1.3. Mezcla ácido ascórbico-paracetamol

Esta mezcla se encuentra ampliamente distribuida en preparados farmacéuticos debido a su doble y elevado carácter analgésico y antipirético. En este Capítulo se propone un método que permite la determinación espectrofotométrica (UV) secuencial de la mezcla, basándose en la retención selectiva secuencial de los analitos, sobre un soporte sólido, en función del pH de la disolución portadora.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón de ácido ascórbico (PANREAC R.A.) y paracetamol (FLUKA) con una concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Ambas disoluciones patrón son poco estables como consecuencia de su oxidación, de modo que éstas son preparadas a diario. A partir de ellas, las disoluciones de menor concentración se obtienen mediante la adecuada dilución con agua bidestilada.
- b) Resina de cambio iónico Sephadex QAE A-25 (ALDRICH), en ciclo Cl^- utilizada sin tratamiento previo.
- c) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- d) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl , KCl , Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.05M (PANREAC R.A.).
- e) Disoluciones amortiguadoras: ácido cítrico/citrato sódico, HAc/NaAc , ácido maléico/maleato Na, ácido succínico/succinato Na y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$.

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofotómetro UV-V Lambda 2 de Perkin Elmer controlado por ordenador personal compatible 386, programa PECCS 4.2.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Cubetas de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz, HELLEMA 138-QS.
- f) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.
- g) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.

3. ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Los espectros tanto en disolución como en fase resina (Sephadex QAE A-25) para paracetamol y ácido ascórbico eran ya conocidos de los Capítulos anteriores de esta Memoria. En este caso se muestran los espectros del paracetamol en disolución acuosa y en fase resina a pH 12.5 a partir de disoluciones del mismo de una concentración de $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura V-1). El espectro en fase resina se obtuvo utilizando la configuración FIA que se muestra en la Figura V-3, empleando como portador NaCl 0.05M a pH = 12.5 y una célula (Hellma 138-QS) de 1-mm de paso de luz. Se observa un desplazamiento del máximo de absorción de 259 a 264 nm, producido por la retención sobre el soporte sólido.

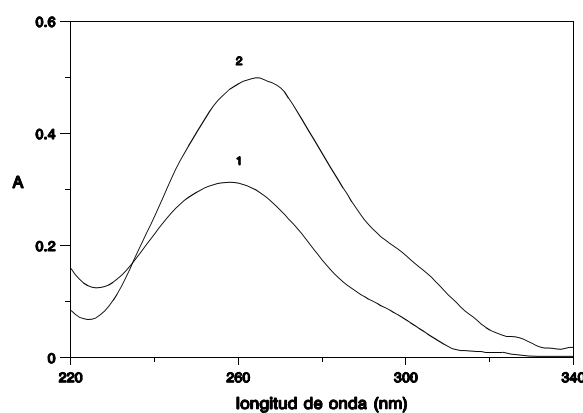


Figura V-1. Espectros de paracetamol
[paracetamol]= $6 \mu\text{g ml}^{-1}$; $V_i=600 \mu\text{l}$
1) Espectro en disolución 2) Espectro en resina

Asimismo, también se observa cómo se produce un fuerte efecto hipercrómico (a 260 nm la absorbancia es casi 20 veces mayor en la fase sólida si tenemos en cuenta que hemos cambiado la cubeta de 1-cm a otra de 1-mm de paso óptico). Esta característica es consecuencia de la preconcentración del analito sobre el soporte sólido.

Los espectros de absorción del ácido ascórbico en disolución acuosa y en fase resina a pH=5.6, ya han sido mostrados en el Capítulo II.

La resolución de una mezcla de los dos analitos no es posible llevarla a cabo mediante espectrofotometría convencional, ni en disolución ni en fase sólida, debido al solapamiento espectral. Para ver este solapamiento, en la *Figura V-2* se representan los espectros por separado de los dos analitos en fase sólida, para unas concentraciones de 9 y 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico y paracetamol, respectivamente, obtenidos inyectando: a) 600 μl de disolución de ácido ascórbico en una corriente de portador de HAc/NaAc 0.04M a pH=6; b) 600 μl de disolución de paracetamol en una corriente de portador de NaCl 0.05M a pH=12.5.

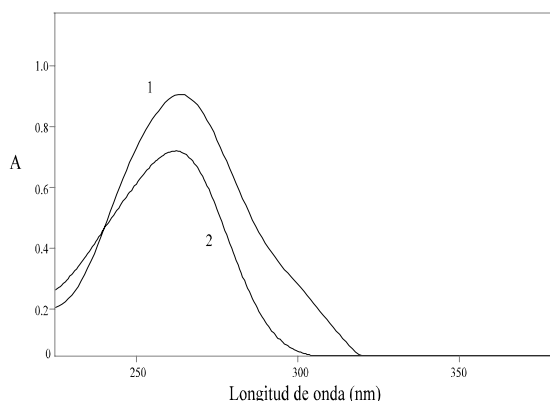


Figura V-2. *Espectros de paracetamol y ácido ascórbico en fase sólida.*

1) [ác. ascórbico]=9 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [paracetamol]=8 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Se comprueba cómo el solapamiento de ambos espectros es total, lo que impide, como antes hemos indicado, la resolución de su mezcla por espectrofotometría convencional. Una forma de resolver este problema sería mediante el desarrollo de un sensor en el que una vez inyectada la mezcla de paracetamol-ácido ascórbico, permitiese la fijación de tan solo uno de los analitos haciendo uso de un portador adecuado que a su vez eluya dicho analito tras el desarrollo de la señal, mientras que con otro portador diferente, se consiguiese (tras una segunda inyección de la muestra) la retención en el soporte sólido de sólo el otro analito y su posterior elución, sin que se produjese interferencia mutua en la determinación de cada uno de ellos. Este sería, pues, un sensor secuencial que permitiría la determinación de los dos analitos respondiendo alternativamente a cada uno de ellos, y a la vez serviría para determinar cualquiera de ellos cuando se

encuentren aislados, no mezclados. Este sensor se va a desarrollar midiendo los valores de absorbancia únicamente a una longitud de onda, correspondiente a 264 nm, valor que se encuentra intermedio entre los máximos de absorción del paracetamol y ácido ascórbico en fase sólida (262 y 267 nm, respectivamente).

4. CONFIGURACIÓN FIA

La configuración FIA empleada se muestra en la *Fig.V-3*. La muestra se inyecta en la corriente de portador P(a) que la pone en contacto con el soporte sólido. Este portador (medio ácido), que permite la retención del ácido ascórbico, produce a su vez la autoelución de éste. A continuación se gira la válvula de selección (VS) y tras una nueva inyección se consigue que con el paso de un segundo portador P(b) (medio básico) se retenga y eluya a la vez el paracetamol.

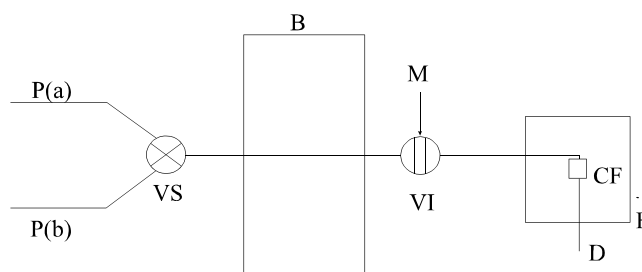


Figura V-3. *Configuración FIA*

P(a): portador ácido (HAc/NaAc 0.04M pH=5.6); P(b): portador básico (NaCl 0.05M pH=12.5); VS: válvula de selección; B: bomba; M: muestra; VI: válvula de inyección; D: desecho; CF: célula de flujo; E: espectrofotómetro

Se ha recogido el diagrama correspondiente a cada uno de los analitos (*Figura V-4*), haciendo uso de un portador P(a) en medio ácido (HAc/NaAc 0.04M a pH=5.6) para la determinación de ácido ascórbico, y utilizando un portador P(b) en medio básico (NaCl 0.05M a pH=12.5) para la determinación del paracetamol. En ambos casos, el diagrama corresponde a la calibración de cada uno de los analitos para un volumen de inyección de 600 μ l. La primera

serie de picos corresponden al ácido ascórbico, mientras que la segunda corresponden al paracetamol. Se observa como el cambio de portador produce un cambio en la línea base, el cual es resultado de una diferente compactación de la resina.

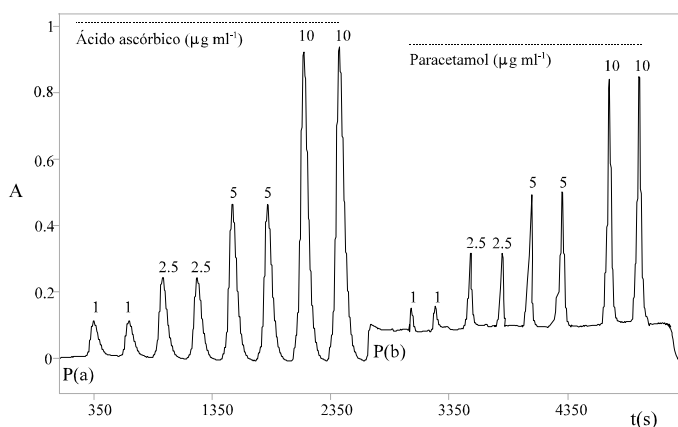


Figura V-4. *Fiagrama para paracetamol-ácido ascórbico*
 $V_{\text{inyección}}: 600 \mu\text{l}; \text{Caudal: } 1.0 \text{ ml/min}$

Para ambos analitos el propio portador actúa de eluyente, obteniéndose además una perfecta reproducibilidad de las señales.

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Tal y como se mencionó en el capítulo anterior, podemos considerar tres grupos de variables: químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección.

5.1. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.1.1. Naturaleza del soporte sólido

Para la elección de un soporte sólido adecuado, se realizaron varios ensayos de fijación de ambos analitos en los soportes siguientes: Dowex 50wx8, C₁₈, y Sephadex SP C-25, CM C-25, QAE A-25 y DAE A-25. A partir de la estructura de las moléculas de estos analitos, cabía esperar que un intercambiador de tipo aniónico fuese el que produjera mejores resultados en la fijación, concretamente la resina Sephadex QAE A-25, por lo que se elige ésta para el desarrollo del sensor en estudio.

5.1.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

Los cambios bruscos de pH en el portador afectan a la compactación del soporte sólido, de modo que debemos asegurarnos que el bulbo se encuentre totalmente lleno en todo momento para que en la zona de detección todo el haz de luz pase a través de la resina. Con una altura de 12 mm, estamos asegurando esto; sin embargo, para una cantidad mayor de resina se produciría una disminución de la señal analítica, debido a la “dilución” de los analitos en el soporte sólido. Por ello trabajamos con nivel de 12 mm.

5.2. VARIABLES QUÍMICAS

Durante el estudio de las variables químicas se mantuvo el caudal constante en un valor de 1.55 ml min⁻¹.

5.2.1. pH de los portadores y de la muestra

Se estudió la respuesta del sensor para cada analito al variar el valor del pH del portador, utilizando disoluciones de 5 µg ml⁻¹ de ácido ascórbico y de 6 µg ml⁻¹ de paracetamol, respectivamente. Se inyectaron 600 µl de muestra utilizando como portador disoluciones ajustadas a diferentes valores de pH, mediante la adición de la cantidad necesaria de HCl o NaOH 0.1M, y conteniendo una

concentración constante de NaCl (0.04M). Se obtienen los resultados que aparecen representados en la *Figura V-5*.

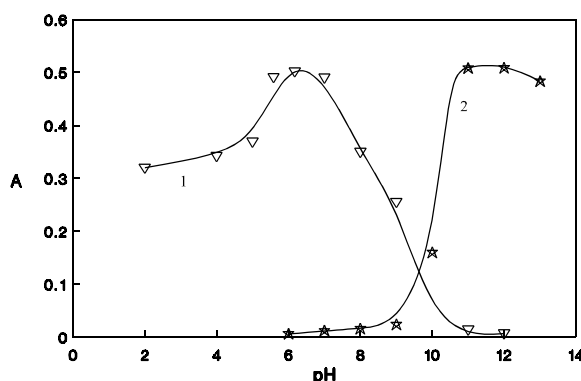


Figura V-5. *Influencia del pH del portador para la mezcla ácido ascórbico-paracetamol*
 (1) Ácido ascórbico (2) Paracetamol

Tal y como se observa, la retención sobre el soporte sólido es máxima para el ácido ascórbico utilizando un portador en el rango de pH comprendido entre 5.5-7 y en el rango 11-13 para el paracetamol. Teniendo esto en cuenta es posible la resolución de la mezcla utilizando dos portadores diferentes: (1) un portador ácido (pH=5.6) que permitiría la fijación exclusiva del ácido ascórbico, sin que exista interferencia por parte del paracetamol; (2) un portador básico (pH=12.5) que permitiría, tras una segunda inyección de muestra, la retención del paracetamol sin que exista interferencia alguna por parte del ácido ascórbico.

El siguiente estudio llevado a cabo fue el de la influencia del pH de la muestra, para lo cual se prepararon una serie de disoluciones mezcla con una concentración de $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol y $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico, junto con la cantidad adecuada de HCl ó NaOH 0.1M para poder ajustarlas a un determinado valor de pH. Inyectando un volumen de muestra de $600 \mu\text{l}$, se comprobó que trabajando con un portador a pH=5.6 la muestra debe presentar valores de pH comprendidos entre 3-10 para que no se produzcan diferencias significativas en los valores de absorbancia; mientras que estos valores de pH deben estar comprendidos en el rango 3-13 cuando se utiliza un portador a pH=12.5. De acuerdo con los resultados obtenidos no es necesario un

tamponamiento previo de la muestra, es decir, no es necesario un control estricto de esta variable.

5.2.2. Naturaleza y concentración de los portadores/eluyentes

Tal y como se ha ido exponiendo a lo largo de esta Memoria, para trabajar a pH=5.6 la mejor opción es buscar como portador una disolución amortiguadora; mientras que para pH=12.5, como portador se utilizará una disolución de electrolito ajustada a dicho valor de pH.

Trabajando con un volumen de inyección de 600 μl y una concentración de ácido ascórbico de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se probaron las siguientes disoluciones amortiguadoras a pH=5.6: ácido cítrico/citrato sódico, HAc/NaAc, ácido succínico/succinato Na, ácido maléico/maleato Na y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, con una concentración 0.1M para cada uno de ellos. De todas, los mejores resultados se obtuvieron con la disolución tampón HAc/NaAc.

Análogamente, en la elección del portador para la determinación de paracetamol, se hicieron inyecciones de 600 μl de una muestra con una concentración de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol. En este caso se emplearon disoluciones de diferentes sales de concentración 0.1M ajustadas a pH=12.5. Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , KH_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. De todos ellos, y al igual que en ocasiones anteriores, el NaCl proporcionó los mejores resultados.

En la optimización de la concentración de ambas soluciones portadoras, las muestras que se utilizaron presentaban la misma concentración que las empleadas en el estudio de la naturaleza del portador. Para obtener la concentración óptima de las mismas, las concentraciones de HAc/NaAc y de NaCl se variaron entre 0.02-0.12M y 0.01-0.6M, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras V-6.1 y V-6.2*, donde se representa también la anchura de picos.

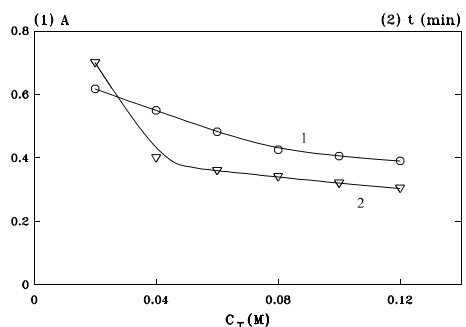


Figura V-6.1. Efecto de la concentración del portador para ácido ascórbico en la mezcla

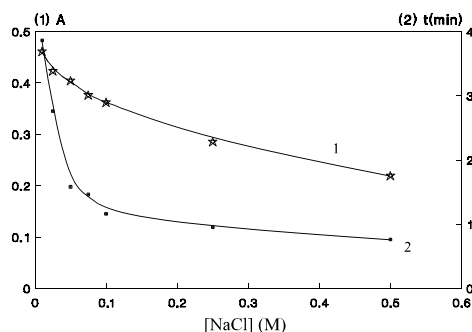


Figura V-6.2. Efecto de la concentración del portador para paracetamol en la mezcla

Como es usual en este tipo de sistemas el incremento de la concentración de portador hace disminuir, por un lado, la señal analítica pues existe mayor competencia de los iones del portador por los sitios activos del soporte sólido y, por otro lado, la anchura de picos, lo que significa que se incrementa la frecuencia de muestreo; por ello, como solución de compromiso, adoptamos una concentración óptima de portador 0.04M de HAc/NaAc para la determinación de ácido ascórbico y 0.05M de NaCl para la de paracetamol.

Ambas disoluciones portadoras actúan a la vez de eluyentes, respectivamente, no siendo por tanto necesario el empleo de disoluciones adicionales destinadas a tal fin. Esto incrementa la frecuencia de análisis.

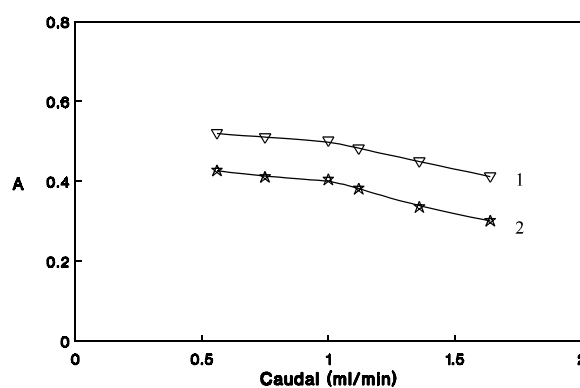
5.3. VARIABLES FIA

Se estudió la influencia de las variables FIA manteniendo constante las variables químicas en los valores anteriormente optimizados.

5.3.1. Caudal

Se realizó el estudio de la influencia del caudal en la respuesta del sensor espectrofotométrico propuesto, para lo cual se fue variando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Esta variable se estudió, obviamente, para los dos

analitos. Se inyectaron 600 μl de disolución de: a) ácido ascórbico con una concentración de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y b) paracetamol con una concentración equivalente. Los resultados se representan en la *Figura V-7*.



FiguraV-7. *Influencia del caudal*
1) Ácido ascórbico 2) Paracetamol

Como se ha ido repitiendo en el desarrollo de esta tesis doctoral, el hecho de trabajar con un caudal muy bajo lleva consigo tiempos de residencia largos, disminuyendo por tanto la frecuencia de muestreo. Para buscar una solución de compromiso que proporcione simultáneamente una señal analítica alta así como una elevada frecuencia de muestreo, se ha seleccionado un caudal de 1 ml min^{-1} , con el que la señal apenas es menor que con 0.5 ml min^{-1} , mientras que la frecuencia de muestreo se incrementa notablemente.

5.3.2. *Volumen de inyección*

Este estudio se lleva a cabo conectando a la válvula de inyección bucles de muestra de diferentes volúmenes, y observando cómo se afecta la señal analítica al variar el volumen de muestra mientras permanece constante la concentración de analito inyectada. Las *Figuras V-8.1* y *V-8.2* muestran el efecto de esta variable para una concentración de 5 y 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico y paracetamol, respectivamente.

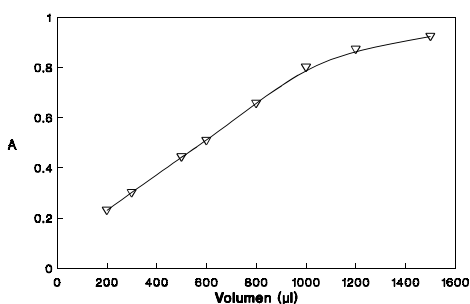


Figura V-8.1. Influencia del volumen de muestra para ácido ascórbico

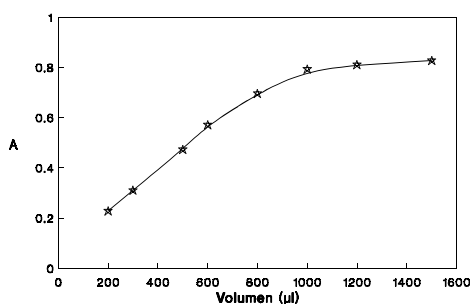


Figura V-8.2. Influencia del volumen de muestra para paracetamol

Para el ácido ascórbico se encuentra una linealidad de la señal analítica con el volumen, hasta un valor de éste de 1000 μl . Lo mismo se puede decir para el paracetamol, para el cual se comprueba cómo la señal analítica deja de responder linealmente respecto del volumen de muestra, aproximadamente, a partir de 800 μl . En ambos casos la señal deja de ser lineal a partir de un determinado volumen, como era de esperar, a la vista de lo discutido en capítulos anteriores. Se seleccionaron como volúmenes de trabajo 300, 600 y 1000 μl . Con los volúmenes de inyección más pequeños se consiguen altas frecuencias de muestreo, en cambio, con volúmenes superiores ganamos en sensibilidad.

5.4. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se enumeran las condiciones óptimas encontradas para el sensor biparámetro propuesto.

	<i>Ácido ascórbico-Paracetamol</i>	
<i>λ (nm)</i>	264	
<i>Soporte sólido</i>	Sephadex QAE A-25	
<i>Nivel de soporte (mm)</i>	12	
<i>Caudal (ml min⁻¹)</i>	1	
<i>Volumen de muestra (μl)</i>	300, 600 y 1000	
	pH=5.6	pH=12.5
<i>Portador/eluyente</i>	HAc/NaAc 0.04M	NaCl 0.05M
<i>pH de la muestra</i>	3-10	3-13

6. CALIBRACIÓN DEL SENSOR. PARÁMETROS ANALÍTICOS

A continuación se recogen los datos encontrados para la calibración así como los parámetros de calidad. Las variables químicas y FIA se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados.

6.1. Metodología y calibración del sensor

Para la determinación de la mezcla paracetamol-ácido ascórbico se utilizan dos disoluciones portador/eluyente, siendo necesario por tanto una doble inyección de muestra. Trabajando con la disolución portadora HAc/NaAc 0.04M a pH=5.6, se produce únicamente la fijación del ácido ascórbico a la vez que es eluído. Una vez se haya eluído éste, giramos la válvula de selección de la configuración FIA para que sea la disolución portadora de NaCl 0.05M a pH=12.5 la que ponga la muestra (una segunda inyección) en contacto con la microzona activa. Con esta nueva

inyección se produce únicamente la retención del paracetamol sobre el soporte sólido, seguida de su posterior elución. De esta forma se calibra cada uno de los analitos por separado a diferentes volúmenes de muestra, midiendo los valores correspondientes netos de los picos de absorbancia a una longitud de onda de 264 nm.

Una vez realizada la calibración de cada analito, se obtienen las siguientes rectas mediante ajuste por mínimo cuadrados, que aparecen representadas en la Figuras V-9.1 y V-9.2.

✓ **Ácido ascórbico**

✎ Volumen: 300 μ l	$A = 0.022 + 0.0558c$	$r=0.9998$
✎ Volumen: 600 μ l	$A = 0.008 + 0.0979c$	$r=0.9999$
✎ Volumen: 1000 μ l	$A = 0.011 + 0.1560c$	$r=0.9998$

✓ **Paracetamol**

✎ Volumen: 300 μ l	$A = 0.033 + 0.0391c$	$r=0.9996$
✎ Volumen: 600 μ l	$A = 0.003 + 0.0814c$	$r=0.9999$
✎ Volumen: 1000 μ l	$A = 0.020 + 0.0995c$	$r=0.9995$

donde :

A: absorbancia

c: concentración de analito (μ g ml⁻¹)

r: coeficiente de correlación

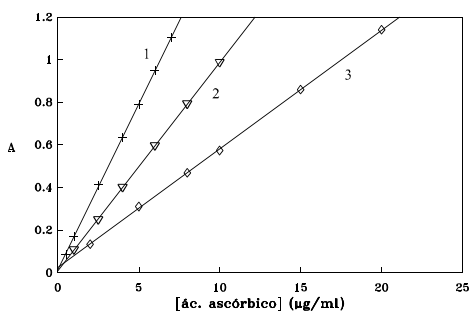


Figura V-9.1. Calibración para ácido ascórbico
1) 1000 μ l 2) 600 μ l 3) 300 μ l

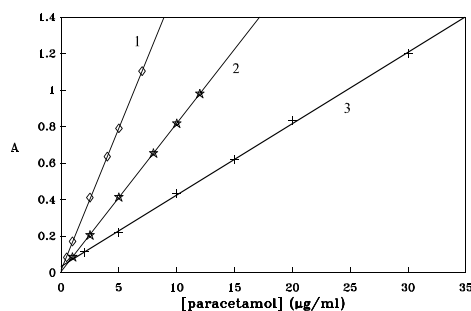


Figura V-9.2. Calibración para paracetamol
1) 1000 μ l 2) 600 μ l 3) 300 μ l

La concentración problema de paracetamol o de ácido ascórbico se obtiene directamente a partir de su recta de calibrado correspondiente por interpolación.

6.2. *Parámetros analíticos*

En las *Tablas V-1.1 y V-1.2* se muestran los parámetros analíticos de cada una de las calibraciones para el desarrollo del sensor, utilizando diferentes volúmenes de muestra.

Tabla V-1.1. *Parámetros analíticos para ácido ascórbico en la mezcla ácido ascórbico-paracetamol*

<i>Parámetro</i>	<i>Ácido ascórbico</i>		
	<i>300 μl</i>	<i>600 μl</i>	<i>1000 μl</i>
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u.a.)</i>	0.022	0.008	0.011
<i>Pendiente ($ml \mu g^{-1}$)</i>	0.0558	0.0979	0.1560
<i>Rango lineal ($\mu g ml^{-1}$)</i>	1-20	0.5-10	0.2-7
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9998	0.9999	0.9998
<i>Límite de detección ($\mu g ml^{-1}$)</i>	0.05	0.04	0.02
<i>Límite de cuantificación ($\mu g ml^{-1}$)</i>	0.15	0.13	0.06
<i>RSD % (n=10)</i>	1.06	1.23	0.88
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	23	20	18

Tabla V-1.2. *Parámetros analíticos para paracetamol en la mezcla ácido ascórbico-paracetamol*

Parámetro	Paracetamol		
	300 μ l	600 μ l	1000 μ l
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u.a.)</i>	0.033	0.003	0.020
<i>Pendiente (ml μg⁻¹)</i>	0.0391	0.0814	0.0995
<i>Rango lineal (μg ml⁻¹)</i>	2-30	1-12	0.5-10
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9996	0.9999	0.9995
<i>Límite de detección (μg ml⁻¹)</i>	0.08	0.04	0.02
<i>Límite de cuantificación (μg ml⁻¹)</i>	0.25	0.15	0.08
<i>RSD % (n=10)</i>	1.23	1.41	1.09
<i>Frecuencia de muestreo (h⁻¹)</i>	30	26	24

Se observan sensibilidades bastante altas a pesar de estar resolviendo una mezcla de analitos empleando una única longitud de onda de 264 nm. Esto se explica teniendo en cuenta que estamos midiendo la señal analítica a una longitud de onda muy próxima a los máximos de absorción del paracetamol y el ácido ascórbico, que son 262 y 267 nm, respectivamente. Además, se ha desarrollado un sensor que nos permite determinar simultáneamente mezclas de dos de los analitos que más frecuentemente aparecen en preparaciones farmacéuticas. La vida media del sensor se estimó en más de 140 inyecciones de muestra. Los resultados obtenidos en el estudio de la reproducibilidad y los límites de detección y cuantificación de los dos analitos, a diferentes volúmenes de inyección, se recogen en las *Tablas V-2.1 - V-2.3 y V-3.1 - V-3.3 (Apéndice)*.

7. INTERFERENCIAS

Hemos realizado un estudio de la interferencia que produce la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas sobre la respuesta del sensor desarrollado. Se han estudiado posibles interferentes (especies que acompañan

normalmente a los analitos en estudio en las preparaciones farmacéuticas) del ácido ascórbico y del paracetamol.

Con un volumen de inyección de muestra de 600 μl , se trabaja con disoluciones que para cada especie extraña contienen 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol o 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico. Los límites de tolerancia para las diferentes especies ensayadas aparecen en la *Tabla V-4*.

Tabla V-4. *Tolerancia del sensor biparámetro a especies extrañas*
(determinación de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido ascórbico y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paracetamol)

Especies extrañas	Tolerancia ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ([interferente]/[analito])	
	Ácido ascórbico	Paracetamol
Sacarosa, Glucosa, Lactosa	>500 ^a	>200 ^a
Efedrina	>50 ^a	>50 ^a
Ácido glutámico	30	20
Paracetamol	20	-
Ácido ascórbico	-	>20 ^a
Cafeína	20	1
Ácido acetil salicílico	20	1
Codeína	15	10
Ácido cítrico	6	5
Salicilamida	5	2
Ácido salicílico	5	1
Sacarina	1.5	1

^aMáxima relación interferente/analito ensayada

Se aprecia un excelente nivel de tolerancia a cada una de las especies que normalmente acompañan a la mezcla de paracetamol-ácido ascórbico en las preparaciones farmacéuticas. Las especies que pueden causar una mayor interferencia (sacarina, cafeína, etc.) siempre aparecen en los fármacos en unas relaciones muchísimo más pequeñas que las toleradas en este sensor.

La tolerancia a la presencia de paracetamol en la determinación de ácido ascórbico, y viceversa, resulta ser muy satisfactoria. Se repitió de nuevo la calibración de cada analito en presencia de diferentes concentraciones del otro, para conocer la influencia que producía en dicha calibración. Los resultados obtenidos para un volumen de inyección de 600 μl , se muestran en las *Tablas V-5.1 y V-5.2*.

Tabla V-5.1. Ecuación de la recta de calibración del ácido ascórbico en presencia de diferentes concentraciones de paracetamol

[Paracetamol] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Ecuación de la recta del Ácido ascórbico	Coefficiente de regresión
0	$A=0.008 + 0.0979c$	$r=0.9999$
5	$A=0.009 + 0.0980c$	$r=0.9998$
10	$A=0.008 + 0.0977c$	$r=0.9996$
20	$A=0.008 + 0.0975c$	$r=0.9997$

Tabla V-5.2. Ecuación de la recta de calibración del paracetamol en presencia de diferentes concentraciones de ácido ascórbico

[Ác. Ascórbico] ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Ecuación de la recta del Paracetamol	Coefficiente de regresión
0	$A=0.003 + 0.0814c$	$r=0.9999$
5	$A=0.004 + 0.0820c$	$r=0.9995$
10	$A=0.003 + 0.0807c$	$r=0.9998$
20	$A=0.005 + 0.0803c$	$r=0.9998$

Con objeto de comparar la igualdad de pendientes entre las rectas de calibrado en ausencia y presencia del otro analito de la mezcla, se calcula el parámetro estadístico “ s_{xy} ” (desviación estándar de los residuos de y). Con este valor es posible estimar a continuación el parámetro “ 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 nos dan unos intervalos de confianza para las pendientes de (0.0979 ± 0.0007) para la recta de calibración del ácido ascórbico en ausencia de paracetamol, y (0.0814 ± 0.0012) para la recta de calibración del

paracetamol en ausencia de ácido ascórbico. Se desprende que en todos los casos los valores de las pendientes obtenidos (*Tablas V-5.1 y V-5.2*) para la calibración de cada uno de los analitos, en presencia de diferentes concentraciones del otro analito de la mezcla, quedan incluidos dentro del intervalo de confianza ($P=0.05$).

8. APLICACIONES ANALÍTICAS

La aplicabilidad del sensor propuesto se ha demostrado mediante su aplicación al análisis de la mezcla paracetamol-ácido ascórbico en:

 *preparaciones farmacéuticas*

 *mezclas sintéticas*

También se ha aplicado a la determinación de cada componente individualmente en preparaciones farmacéuticas que contenían sólo uno de ellos.

8.1.1. Preparación de las muestras

Todos los fármacos, excepto “Febrectal”, analizados fueron disueltos en agua bidestilada y depositados en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. En todos los casos, el excipiente insoluble se separó por filtración a través de filtro Millipore de 0.45 μm , llevándose la disolución a un volumen final de 100 ml. Todas las disoluciones fueron diluidas adecuadamente antes de ser inyectadas en la corriente del portador. En ningún caso se comprobó la existencia de efecto matriz, excepto para el fármaco “Febrectal”, de forma que se aplicó el método de calibración directa para un volumen de inyección de 600 μl .

El fármaco “Febrectal” se presenta en forma de supositorios, por lo cual fue necesario realizar previamente una extracción líquido-líquido para la determinación de su contenido en paracetamol. Se disolvió en 50 ml de cloroformo pasándolo a continuación a un embudo de decantación, en el cual se realizaron 4 extracciones sucesivas cada vez con 25 ml de agua bidestilada a $\text{pH}=10$ (ajustado mediante adición de NaOH 0.1M), uniendo las cuatro soluciones acuosas y llevando a un volumen final de 1 litro. Una vez hechas las diluciones adecuadas se observa efecto

matriz, por lo que se aplica el método de adición de patrón utilizando un volumen de inyección de 600 μ l.

8.1.2. Determinación de ácido ascórbico-paracetamol

8.1.2.1. En preparaciones farmacéuticas

La composición de los preparados farmacéuticos analizados es la siguiente:

1. "Algídol" (Lab. Berenguer Infale), sobres
 - Ácido ascórbico: 500 mg
 - Codeína: 10 g
 - Paracetamol: 650 mg
 - Sacarosa: 3.69 g
 - Sacarina: 2.5 mg

2. "Veganin" (Lab. Warner Lambert Consumer Health), comprimidos
 - Ácido acetil salicílico: 250 mg
 - Codeína: 9.78 mg
 - Paracetamol: 250 mg

3. "Febrectal" (Lab. Funk), supositorios
 - Paracetamol: 300 mg
 - Mucopolisacaridasas: 15 mg
 - Pino silvestre, esencia: 30

4. "Frenadol" (Lab. Abello Farmacia), sobres
 - Paracetamol: 650 mg
 - Dextrometorfano, bromhidrato: 20 mg
 - Cafeína, citrato: 30 mg
 - Clorfenamina, maleato: 4 mg
 - Ácido ascórbico: 250 mg
 - Sacarosa: 8.2 mg

5. "Fludeten" (Lab. Alter), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg

- Codeína: 30 mg

- 6. “Fiorinal” (Lab. Sandoz), cápsulas
 - Paracetamol: 300 mg
 - Ácido Acetilsalicílico: 200 mg
 - Cafeína: 40 mg

- 7. “Rinomicine” (Lab. Fardi), sobres
 - Paracetamol: 400 mg
 - Salicilamida: 200 mg
 - Clorfeniramina, maleato: 4 mg
 - Fenilefrina, clorhidrato: 6 mg
 - Cafeína: 30 mg
 - Ácido ascórbico: 300 mg

- 8. “Apiretal” (Lab. Ern), gotas
 - Paracetamol: 100 mg

- 9. “Propalgina limón” (Lab. Roche Nicholas), sobres
 - Dextrometorfano, bromhidrato: 20 mg
 - Paracetamol: 500 mg
 - Pseudoefedrina, clorhidrato: 30 mg

- 10. “Duorol” (Lab. Pharmacia Upjohn), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg

- 11. “Termalgin” (Lab. Sandoz), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg

- 12. “Saldeva” (Lab. Roche Nicholas), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg
 - Dimenhidrinato: 15 mg
 - Cafeína: 50 mg

- 13. “Analgilasa” (Lab. Lasa), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg

- Codeína: 10 mg
 - Cafeína: 30 mg
14. "Cortafriol C" (Lab. Derly), sobres
- Paracetamol: 500 mg
 - Pseudoefedrina, sulfato: 30 mg
 - Ácido ascórbico: 250 mg
15. "Redoxón" (Lab. Roche Nicholas), comprimidos efervescentes
- Ácido ascórbico: 1000 mg
 - Sacarina sódica: 20 mg
 - Sacarosa: 1305 mg
16. "Citrovit" (Lab. Abello Farmacia), sobres
- Ácido ascórbico: 1000 mg
 - Sacarosa: 7090 mg
 - Glucosa líquida (R.S): 599 mg
 - Azúcar invertido: 178 mg
 - Otros excipientes: 10 g
17. "Cebión 500" (Lab. Merk), sobres
- Ácido ascórbico: 500 mg
 - Sacarosa: 420 mg
 - Excipiente aromatizado (incluido 7 mg de sacarina sódica)

Los resultados obtenidos en la determinación simultánea de ambos o, en su caso, de uno de los analitos en cada medicamento analizado, se muestran en la siguiente *Tabla V-6*.

Tabla V-6. *Determinación de paracetamol y ác. ascórbico en preparaciones farmacéuticas*

Fármaco	Composición (mg/unidad)		Recuperación $\pm \sigma_r$ (%)	
	Paracetamol 1	Ácido Ascórbico	Paracetamol	Ácido ascórbico
Algidol	650	500	100.7 \pm 0.8	100.4 \pm 0.9
Veganin	250	-	99.3 \pm 0.7	-
Febrectal	300 ^a	-	101 \pm 1	-
Frenadol	650	250	99.6 \pm 0.5	103 \pm 1
Fludeten	500	-	99 \pm 1	-
Fiorinal	300	-	101.4 \pm 0.8	-
Rinomicine	400	300	100.4 \pm 0.2	101.4 \pm 0.6
Apiretal	100 ^b	-	98 \pm 1	-
Propalgina Limón	500	-	98.8 \pm 0.8	-
Duorol	500	-	100.3 \pm 0.7	-
Termalgin	500	-	98.9 \pm 0.6	-
Saldeva	500	-	98 \pm 1	-
Analgilasa	500	-	101.1 \pm 0.5	-
Cortafriol	500	250	100.6 \pm 0.8	100.7 \pm 0.6
Redoxón	-	1000	-	99.7 \pm 0.4
Citrovit	-	1000	-	101.1 \pm 0.8
Cebión 500	-	500	-	99.2 \pm 0.5

^a Método de adición de patrón; ^b por ml

Los resultados obtenidos por el método propuesto muestran una excelente concordancia con los indicados por el fabricante, vistos los valores encontrados para cada uno de los analitos en los preparados farmacéuticos.

Se realizó un estudio de recuperación para chequear la exactitud del método propuesto. Para ello, se adicionaron cantidades conocidas de los analitos a diferentes niveles de concentración, sobre algunos preparados farmacéuticos estudiados previamente. Los resultados obtenidos en esta recuperación aparecen reflejados en la *Tabla V-7*.

Tabla V-7. Estudio de recuperación de paracetamol y ácido ascórbico en preparaciones farmacéuticas

Muestra	Ácido ascórbico		Paracetamol	
	Añadido/unidad (mg)	Encontrado ^a (mg)	Añadido/unidad (mg)	Encontrado ^a (mg)
Algídol	100	99.5 ± 0.4	100	100 ± 1
	200	200 ± 1	200	199.1 ± 0.9
Frenadol	100	100 ± 1	100	99.1 ± 0.7
	200	199 ± 1	200	200.1 ± 0.7
Rinomicine	100	99.5 ± 0.7	100	98.7 ± 0.9
	200	201 ± 2	200	200 ± 2
Cortafriol	100	98.7 ± 0.9	100	100 ± 1
	200	201 ± 1	200	200 ± 2

^a Valor medio encontrado ± desviación estándar de tres determinaciones

8.1.2.2. *En mezclas sintéticas*

El sensor espectrofotométrico en flujo también fue aplicado a diversas mezclas sintéticas preparadas a partir de disoluciones patrón, utilizando un volumen de inyección de 600 µl. Estas mezclas se encontraban en unas relaciones paracetamol-ácido ascórbico del orden 1:10 y 10:1, respectivamente; tal y como muestra la *Tabla V-8*, las recuperaciones obtenidas se encuentran muy próximas al 100% para los dos analitos.

Tabla V-8. *Determinación simultánea de paracetamol y ácido ascórbico en mezclas sintéticas*

Composición de la mezcla ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		^a Recuperación $\pm \sigma_r$ (%)	
Paracetamol	Ácido ascórbico	Paracetamol	Ácido ascórbico
1	10	99.2 \pm 0.8	101.1 \pm 0.7
1	5	101 \pm 1	100.2 \pm 0.3
10	1	99.0 \pm 0.5	99.8 \pm 0.5
5	1	100 \pm 1	99.1 \pm 0.6
5	5	99.5 \pm 0.2	100 \pm 1
2	7	100.2 \pm 0.4	100.7 \pm 0.9

^aMedia de tres determinaciones

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Simon H. R. Davies, Susan J. Masten, *Anal. Chim. Acta*, 248 (1991) 225.
- [2] Amir Besada, *Talanta*, 34 (1987) 731.
- [3] M. Tausz, I. Kranner, D. Grill, *Phytochem. Anal.*, 7 (1996) 69.
- [4] M. Y. Khaled, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 19 (1996) 3105.
- [5] Abdulrahman A. Alwarthan, *Analyst*, 118 (1993) 639.
- [6] H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 655 (1994) 195.
- [7] C. B. Walberg, *J. Anal. Tox.*, 1 (1977) 79.
- [8] T. Z. Liu, K. H. Oka, *Clin. Chem.*, 26 (1980) 69.
- [9] R. N. Gupta, R. Pickersgill, M. Stefanec, *Clin. Biochem.*, 16 (1983) 220.
- [10] C. S. Frings, J. M. Saloom, *Clin. Toxicol.*, 15 (1979) 67.
- [11] A. E. McDowell, R. S. Harner, H. L. Pardue, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1862.
- [12] S. M. Hassan, S. A. M. Shabaan, *J. Pharm. Belg.*, 38 (1983) 258.
- [13] L. F. Prescott, *J. Pharm. Pharmac.*, 23 (1971) 11.
- [14] K. C. Wahl, T. A. Rejent, *J. For. Sci.*, 23 (1978) 14.
- [15] J. Grove, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 289.
- [16] M. Jeevanandram, B. Novic, R. Savich, E. Wagman, *J. Anal. Tox.*, 4 (1980) 124.
- [17] B. R. Manno, J. E. Manno, C. A. Dempsey, M. A. Wood, *J. Anal. Tox.*, 5 (1981) 24.
- [18] E. Michael, M. E. Kommos, M. E. Kamla, *Talanta*, 36 (1989) 678.
- [19] J. L. Vilchez, R. Blanc, R. Avidad, A. Navalón, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 1119.
- [20] H. Nakamura, Z. Tamura, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2087.
- [21] A. Öztunç, *Sci. Pharm.*, 54 (1986) 111.

CAPÍTULO VI

MULTISENSOR PARA CAFEINA, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y PARACETAMOL



1. INTRODUCCIÓN

En los capítulos anteriores se han desarrollado sensores que responden a un único analito o que permiten la determinación secuencial de dos analitos; en este capítulo se aborda el desarrollo de un multisensor, capaz de determinar simultáneamente tres componentes: cafeína (CF), ácido acetil salicílico (AAS) y paracetamol (PCT), mediante el uso de la técnica de calibración multivariante de regresión por mínimos cuadrados parciales.

1.1. modelos de calibración multivariante

La calibración es la etapa del proceso analítico que permite relacionar la señal instrumental obtenida con la concentración de la especie de interés. Sólo si se aplican buenos métodos de calibración podrán obtenerse resultados satisfactorios en el análisis.

En los métodos desarrollados en capítulos anteriores se ha llevado a cabo, en todos los casos, una calibración univariante, esto es, se ha relacionado la concentración de analito con una única señal instrumental (la absorbancia a la longitud de onda de trabajo). Sin embargo, la instrumentación actual permite disponer de gran cantidad de información en un tiempo muy corto, pudiendo obtenerse datos que implican dos o más variables (señales multivariantes). Tratando estos datos mediante métodos apropiados de análisis multivariante puede obtenerse mucha más información acerca de la muestra, lo que permite, por ejemplo, la determinación simultánea de varios constituyentes de la misma [1-4].

Se han propuesto distintos modelos de calibración multivariante que presentan diferencias en los requisitos del modelo a aplicar y en los cálculos realizados en la etapa de calibración; los más utilizados son:

- análisis multicomponente clásico (CLS)
- regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS)
- regresión por componentes principales (PCR)
- regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

En todos los casos, el objetivo que se persigue es relacionar la matriz A formada por el conjunto de $(n \times p)$ respuestas instrumentales, correspondientes a los p diferentes canales de medida, de los n patrones (conteniendo a los r analitos) sobre los que se confecciona la matriz de calibración (estos patrones deben cubrir el rango de concentración esperado para las muestras y medirse en las mismas condiciones que los problemas) con la matriz C formada por las concentraciones conocidas de los r analitos en las n disoluciones patrón. Este modelo, que se obtiene en la etapa de calibración, debe comprobarse con muestras conocidas en la etapa de validación, para finalmente, hacer uso de él con el fin de calcular las concentraciones de muestras cuya composición es desconocida en la etapa de predicción.

Métodos basados en el cálculo de factores o componentes principales

Los dos primeros métodos (CLS y ILS) establecen relaciones entre los datos espectroscópicos y las concentraciones basándose en la aditividad de las absorbancias, determinada por el cumplimiento de la ley de Beer. La diferencia entre ambos estriba en el diseño del modelo de calibración; mientras que en el modelo clásico (CLS) se expresa la absorbancia como una función de las concentraciones, en el modelo de regresión inversa (ILS) son las concentraciones las que se expresan en función de los datos espectrales. Sin embargo estos métodos están muy limitados [5], especialmente por problemas en la línea base, desviaciones de la ley de Beer, interacciones entre los componentes y fuertes solapamientos espectrales. Por ello, son los métodos basados en el cálculo de los llamados factores o componentes principales los más adecuados para resolver estos problemas.

Estos métodos se caracterizan por calcular los factores o componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales del sistema en estudio, para describir la matriz A . Estos factores contienen diferente información; los primeros explican un mayor porcentaje de varianza del sistema, es decir, describen la mayor parte de las variaciones en los datos que forman la matriz A , mientras que los últimos describen variaciones en los datos que pueden ser debidas a ruido o errores experimentales, por ello es fundamental, como ya se verá, la selección del número de factores que deben ser incluidos en el modelo.

La diferencia fundamental entre los modelos PCR y PLS consiste en que en PLS durante la etapa de calibración se utiliza la información referente a la matriz de

concentraciones C , que se descompone también, mientras que en PCR únicamente se emplean los datos espectroscópicos (matriz A).

Los métodos de calibración multivariante han tomado gran importancia en el análisis multicomponente, especialmente aquellos que utilizan PLS [6]. Este método ya ha sido aplicado satisfactoriamente en fluorimetría [7], espectrofotometría [8], infrarrojo cercano [9], análisis cinético [10], y valoraciones ácido-base potenciométricas [11]. El método de calibración multivariante empleado en la presente Memoria ha sido el de PLS, dado que es el que presenta mayor robustez [8, 12], de forma que los parámetros que definen o caracterizan el sistema no se ven fuertemente afectados por el número de muestras utilizadas en la etapa de calibración.

Este método fue introducido por H.Wold [13], adquiriendo gran aceptación en sus aplicaciones al análisis químico. Existen dos planteamientos distintos que se conocen como PLS-1 y PLS-2. En el algoritmo PLS-2 se calibran todos los constituyentes a un tiempo, lo que a veces supone cierta pérdida de precisión, especialmente para mezclas complejas; en cambio, en PLS-1 se asigna un factor a cada constituyente y se optimiza la matriz de calibración para cada uno de ellos, obteniéndose generalmente resultados más precisos aunque el tiempo necesario es algo mayor. En este trabajo hemos escogido PLS-1 ya que, como se verá más adelante, por la naturaleza del sistema no era aconsejable la calibración para los tres componentes a la vez, de modo que los intentos de aplicación de PLS-2 no arrojaron resultados satisfactorios.

1.2. Componentes de la mezcla

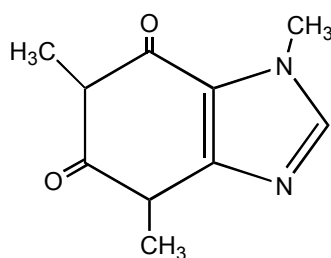
Como se ha indicado anteriormente, en este capítulo se aborda la resolución de una mezcla de tres componentes: cafeína (CF), ácido acetil salicílico (ASA) y paracetamol (PCT). Estas tres drogas aparecen frecuentemente asociadas en preparaciones farmacéuticas comerciales, ya sea como combinaciones binarias o ternarias. En todos los casos AAS y PCT aparecen en proporciones similares mientras que la CF suele presentarse en cantidades muy inferiores, a veces hasta doce veces menor que los otros dos componentes.

Las características del *ácido acetil salicílico y paracetamol* ya han sido expuestas en los *Capítulos II y IV*, respectivamente, donde han sido desarrollados y

aplicados un sensor monoparámetro para la determinación indirecta de AAS, y sensores biparámetro para la resolución de mezclas en las que el PCT es uno de los analitos.

La **cafeína** es un alcaloide que proviene de plantas de amplia distribución geográfica, y pertenece al grupo de las metilxantinas. La base de la popularidad de todas las bebidas que contienen cafeína ha sido la antigua creencia de que las mismas tenían acciones estimulantes y antisoporíficas que elevaban el ánimo, disminuían la fatiga y aumentaban la capacidad de trabajo. Los estudios farmacológicos clásicos realizados durante la primera mitad de este siglo, han confirmado estas creencias revelando que las metilxantinas, en general, poseen además otras importantes propiedades farmacológicas, las cuales se aprovecharon durante muchos años en diferentes aplicaciones terapéuticas. Estas propiedades han sido reemplazadas por agentes más efectivos.

La cafeína es una xantina metilada. La xantina en sí es dioxipurina y estructuralmente tiene relación con el ácido úrico. Su estructura es la siguiente:



La cafeína, presenta varias acciones farmacológicas de interés farmacéutico: estimula el sistema nervioso central, actúa sobre el riñón para producir diuresis, estimula el músculo cardíaco y relaja el músculo liso, especialmente el bronquial. El envenenamiento mortal humano por ingestión de cafeína es raro [16]. Aunque la emesis y las convulsiones son generalmente consecuencias prominentes de la sobredosis de cafeína, ninguno de estos síntomas se observó por lo menos en un caso de envenenamiento fatal.

La cafeína se absorbe fácilmente después de su administración oral, rectal o parenteral. Se distribuye en todos los compartimentos corporales y atraviesa la

placenta. Se elimina principalmente por su metabolismo hepático. Sólo un 1% se recupera en la orina sin cambios.

Las diversas acciones farmacológicas de las metilxantinas han encontrado muchas aplicaciones terapéuticas. Así, la cafeína se ha incorporado a numerosas preparaciones de venta libre muy usadas en analgesia. Su uso como estimulante del sistema nervioso central en el tratamiento de la sobredosis de barbitúricos u opiáceos ha disminuido mucho. El ácido acetil salicílico y el paracetamol se utilizan como agentes analgésicos y antipiréticos. Normalmente aparecen asociados con cafeína en muchos preparados farmacéuticos.

En general, se han realizado pocos estudios sobre determinación simultánea de analitos utilizando sensores espectrofotométricos en fase sólida. En este capítulo trataremos de aplicar dicha metodología a la determinación simultánea de estos tres analitos, en combinación con una calibración multivariante (PLS) y detección UV. Apenas existen antecedentes del desarrollo de sensores de este tipo. Se ha descrito un sensor de este tipo en donde la mezcla de analitos a determinar está formada por paracetamol-dimenhidrinato-cafeína [17], siendo el gel de sílice C_{18} el soporte sólido sobre el que se produce la retención de los analitos a diferentes tiempos.

Asimismo, existe un antecedente del empleo, en este tipo de sistemas, de técnicas de multicalibración que hagan uso de factores o componentes principales (PCR o PLS). Se trata del multisensor desarrollado por *Lacy y col.* [18] que permite la determinación de fosfato y silicato mediante la formación de heteropoliácidos al mezclarse la muestra con un canal de heptamolibdato en un sistema de flujo continuo, su retención sobre la microzona sensora (formada por un lecho de sílice C_{18}) y la posterior formación *in situ* de azul de molibdeno por reducción con ácido ascórbico, que tiene lugar simultáneamente con la detección a 600 nm. Los datos se analizan mediante regresión por mínimos cuadrados parciales, pudiéndose determinar fosfato y silicato en base a la diferente velocidad de reducción de sus heteropoliácidos. En este caso, el sensor permite la determinación simultánea de dos especies, basándose en el tratamiento de los datos, a pesar de tratarse de un sensor monoparámetro (ya que la medida se realiza a una sola longitud de onda).

El que se propone en este Capítulo es un verdadero sensor multiparámetro, ya que se registra la absorbancia a múltiples longitudes de onda (mediante un espectrofotómetro diodo-array), lo que permite la resolución de la mezcla haciendo uso de las diferencias tanto espectrales como cinéticas. Es decir, se tienen en cuenta las características espectrales de cada uno de los analitos sobre el soporte sólido así como sus diferentes comportamientos cinéticos en el proceso de retención-elución sobre dicha fase sólida (se seleccionaron los espectros a dos tiempos adecuados en los que las cinéticas de los analitos eran diferentes).

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón de cafeína (MERCK), ácido acetil salicílico (FLUKA) y paracetamol (FLUKA) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparadas por pesada directa y disolución en agua desionizada haciendo uso de un baño de ultrasonidos. Las disoluciones patrón de AAS y PCT eran preparadas cada dos días, debido a su baja estabilidad. A partir de éstas se prepararon, diariamente, disoluciones de menor concentración mediante la adecuada dilución.
- b) Ácido perclórico (PANREAC R.A.).
- c) Metanol (PANREAC R.A.).
- d) Gel de sílice C_{18} de 55-105 μm de tamaño de partícula (WATERS).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 μm .

2.2. Instrumentación utilizada

- a) Espectrofotómetro MILTON ROY 3000 ARRAY controlado mediante ordenador personal compatible 286, equipado con el programa informático de MILTON ROY Rapid Scan 2.01.
- b) Programa informático GRAMS 32 provisto de la aplicación PLSplus/IQ de GALACTIC.
- c) Cubeta de flujo de cuarzo de 1 mm de paso de luz HELLMA 138-QS.
- d) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.

- e) Válvulas de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- f) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- g) pH-metro digital CRISON, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- i) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.

3. ESPECTROS EN DISOLUCIÓN DE CAFEÍNA, ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO Y PARACETAMOL

Como se observa en la *Figura VI-1*, el amplio solapamiento de los espectros de absorción de CF, AAS y PCT, impide su determinación por medidas espectro fotométricas directas. Se aborda, por ello, la resolución de la mezcla mediante calibración multivariante. Por otro lado, el uso de un soporte sólido sobre el que los analitos muestran un comportamiento diferencial en la cinética del proceso de fijación-elución aporta mayor capacidad discriminante a la que, ya de por sí, presentan los métodos de calibración multivariante, pues uno de los analitos, el PCT, prácticamente es retenido muy débilmente sobre el soporte sólido, diferenciándose así su cinética respecto a la presentada por los otros dos analitos (CF y AAS) que son más fuertemente retenidos.

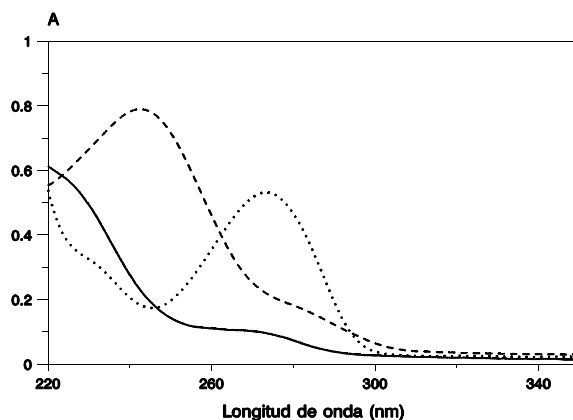


Figura VI-1. *Espectros en disolución*
..... [CF]=10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; — [AAS]=10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; --- [PCT]=10 $\mu\text{g ml}^{-1}$
pH=2; cubeta de 1cm de paso de luz

4. CONFIGURACIÓN FIA

La configuración FIA utilizada se esquematiza en la *Figura VI-2*. El diámetro de todos los tubos empleados fue de 0.5 mm.

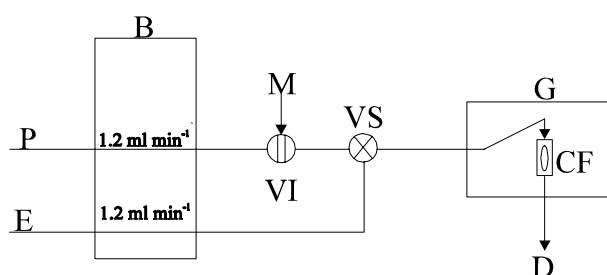


Figura VI-2. *Configuración FIA*

P: portador; E: eluyente; B: bomba; M: muestra; VI: válvula de inyección; VS: válvula de selección; CF: célula de flujo; D: desecho; G: detector

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Se procede al estudio de las variables, tanto químicas como del sistema de flujo, que influyen sobre la retención de cada uno de los tres componentes sobre el soporte sólido, siguiendo la metodología empleada en los capítulos anteriores.

5.1. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.1.1. Características de la célula de flujo

Se empleó una célula de flujo Hellma 138-QS, esquematizada en el *Cap. II*.

5.1.2. Elección del soporte sólido

Estudios preliminares de fijación sobre diferentes soportes (Sephadex QAE A-25, SP C-25, y gel de sílice C_{18}) llevaron a la elección del gel de sílice C_{18} como el soporte sólido más adecuado, por su gran capacidad de interacción con los tres analitos, ya que uno de los analitos, la CF, no era retenida por un cambiador aniónico ni por uno catiónico.

En cuanto al tamaño de partícula, los requerimientos hidrodinámicos del sistema y de transparencia a la radiación llevaron a la elección del mayor tamaño de grano disponible comercialmente: 50-120 μm ; tamaños inferiores creaban problemas de sobrepresión o incluso no llegaban a permitir el paso del flujo a su través. No se observaron desplazamientos apreciables de los máximos de absorción de estos compuestos al ser retenidos sobre el soporte. En las Figuras VI-3.1 - VI-3.3 se muestran los espectros de cada uno de los analitos retenidos sobre el soporte sólido, a dos tiempos diferentes medidos respecto del momento en que se inyecta la muestra (configuración FIA en Fig. VI-2).

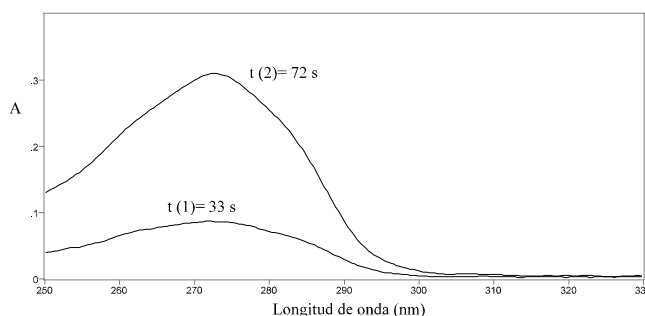


Figura VI-3.1. Espectro de CF en fase sólida
Portador: disolución HCl 10^{-2} M; V_i : 250 μl ;
Caudal: 1.15 ml min^{-1} ; [CF]= 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$

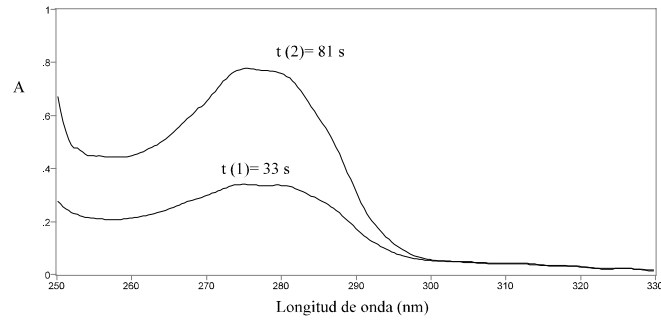


Figura VI-3.2. *Espectro de AAS en fase sólida*
Portador: disolución de HCl 10^{-2} M; V_i : $250\mu\text{l}$;
Caudal: 1.15 ml min^{-1} ; [AAS]: $60\mu\text{g ml}^{-1}$

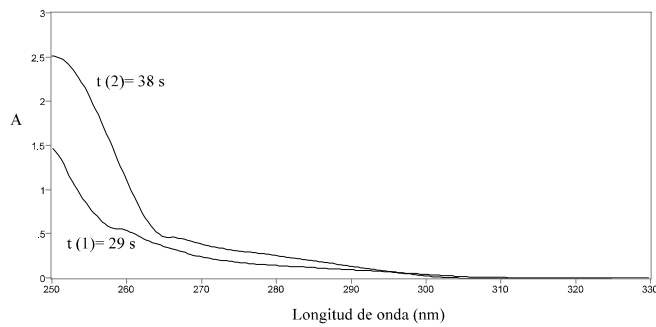


Figura VI-3.3. *Espectro de PCT en fase sólida*
Portador: disolución de HCl 10^{-2} M; V_i : $250\mu\text{l}$;
Caudal: 1.15 ml min^{-1} ; [PCT]: $25\mu\text{g ml}^{-1}$

5.1.3. Nivel de soporte sólido en la célula de flujo

Se estudió para cada uno de los tres analitos la influencia que la altura de soporte sólido ejercía sobre la señal. Los resultados se muestran en la *Figura VI.4*.

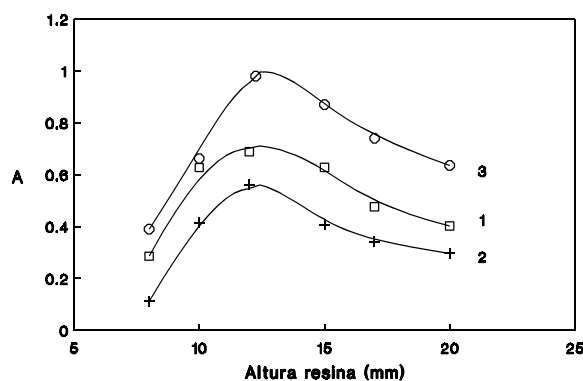


Figura VI-4. Influencia de la altura de C_{18} en la célula de flujo

1) [CF]= $15 \mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [AAS]= $75 \mu\text{g ml}^{-1}$; 3) [PCT]= $30 \mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: disolución de HCl 10^{-2} M; Eluyente: metanol; $V_{\text{inyección}} = 250 \mu\text{l}$; Caudal = 1.15 ml min^{-1}

Se observa que la máxima señal se produce cuando se llena totalmente el bulbo de la célula, cubriéndose totalmente el haz de luz (12 mm). En estas condiciones todo el analito retenido se encuentra en la zona del soporte sólido iluminada por el haz de luz, en el momento de efectuar la lectura.

5.1.4. Selección de las condiciones de medida

Empleando gel de sílice C_{18} como soporte sólido, se observa que CF y AAS son fuertemente retenidos, mientras que el PCT se eluye con mayor rapidez por el propio portador. En cada experiencia (trabajando con disoluciones individuales de cada analito) se han registrado las señales a la longitud de onda del máximo de absorción de cada analito que son 275, 275 (hombro) y 250 nm para la CF, AAS y PCT respectivamente. La medida se ha realizado una vez alcanzada la máxima señal de cada analito en el diagrama correspondiente (absorbancia frente a tiempo).

5.2. VARIABLES QUÍMICAS

5.2.1. pH de la disolución portadora

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia que sobre la señal de cada analito ejercía el empleo de portadores con diferentes valores de pH, ajustado con HCl o NaOH, se muestran en la *Figura VI-5*.

Se observa que la CF es retenida en todo el intervalo de pH estudiado (1-12), mientras que la retención de AAS y PCT empeora notablemente a pH comprendido entre 6-12 y 8-12 respectivamente, debido a procesos de desprotonación. Dado que la señal debida al AAS muestra su valor más alto a valores de pH inferiores a 2, y puesto que es ésta la especie que presenta menor sensibilidad, se ensayaron valores de pH inferiores a 2.

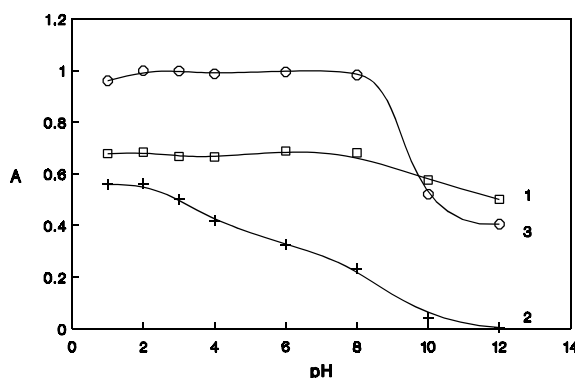


Figura VI-5. Efecto del pH del portador

1) [CF] = 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [AAS] = 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 3) [PCT] = 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Eluyente: metanol; $V_{\text{inyección}} = 250 \mu\text{l}$; Caudal = 1.15 ml min^{-1}

Para conocer la influencia de la naturaleza del ácido empleado en el portador, se ensayaron diferentes ácidos con objeto de proporcionar pH=1 al portador: HCl, HNO₃, H₃PO₄ y HClO₄, sin encontrar diferencias sustanciales en la respuesta del sensor. Señales ligeramente más altas, se encontraron empleando HClO₄, por lo que se escogió éste. Se probaron concentraciones entre 0.1-10.0 % de HClO₄. Los resultados obtenidos se recogen en la *Figura VI-6*.

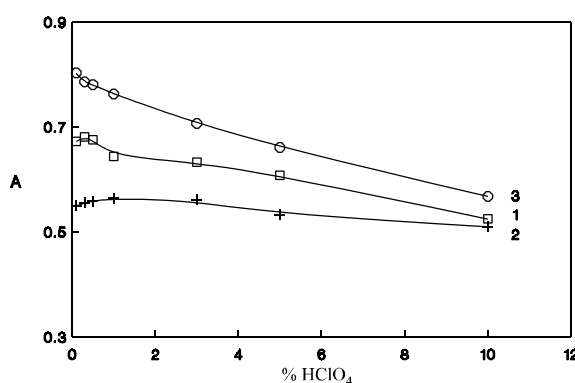


Figura VI.6. Efecto de la concentración de HClO₄
1) [CF] = 15 µg ml⁻¹; 2) [AAS] = 75 µg ml⁻¹; 3) [PCT] = 25 µg ml⁻¹
Eluyente: metanol; V_{inyección} = 250 µl; Caudal = 1.15 ml min⁻¹

En la gráfica encontramos que la señal decrece para concentraciones superiores a 0.5 % (aproximadamente pH=1), aunque en el caso de AAS la señal se mantiene hasta un 5%. Se escogió como mas adecuada 0.5 % para evitar que la CF empezase a ser eluída por el portador, efecto que empezaba a observarse por encima del 1%.

También se probó como portador metanol-agua en proporciones comprendidas entre 1-20%, observándose que la señal disminuía bruscamente, debido a la acción de éste como eluyente, por lo que se decantó su empleo.

5.2.2. pH de la muestra

Se efectuaron inyecciones de los tres analitos, variando el pH de las disoluciones inyectadas en el intervalo 1-12, con objeto de evaluar el efecto producido en la señal analítica. Los resultados se muestran en la *Figura VI-7*.

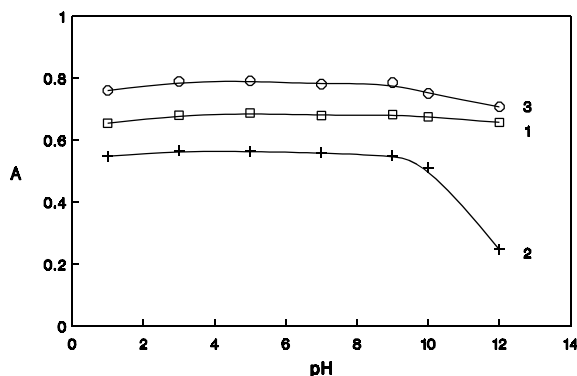


Figura VI-7. Efecto del pH de la muestra

1) [CF] = 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [AAS] = 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 3) [PCT] = 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$
 Eluyente: metanol; $V_{\text{inyección}} = 250 \mu\text{l}$; Caudal = 1.15 ml min^{-1}

En un amplio intervalo de pH, comprendido entre 1-9, no se observan variaciones en la señal, incluso para AAS que es la especie cuya fijación se afecta más por el pH; este hecho indicaba que no era preciso tamponar la muestra, pues es poco probable que el pH de las muestras en las que va a efectuarse el análisis (preparaciones farmacéuticas) esté fuera de ese rango.

5.2.3. Naturaleza del eluyente

Se ensayaron diferentes formas de lograr la desorción de las especies retenidas sobre el soporte sólido: empleo de surfactantes y de diferentes disolventes orgánicos, como acetonitrilo, etanol, metanol o acetona. Se probaron mezclas de agua-disolvente orgánico, en rangos comprendidos entre 10 y 100%. Los mejores resultados se consiguieron con metanol. Aunque el empleo de concentraciones de éste entre 40-80% lograban una caída inicial de la señal rápida, si se pretendía lograr una total recuperación de la línea base con rapidez era aconsejable el empleo de metanol solo, por lo que fue éste el eluyente seleccionado.

5.3. VARIABLES DEL SISTEMA DE FLUJO

5.3.1. Caudal

En la gráfica de la *Figura VI-8* se muestran los resultados obtenidos al modificar el caudal (ml min^{-1}) del portador cuando son inyectados volúmenes de $250 \mu\text{l}$ para los tres analitos.

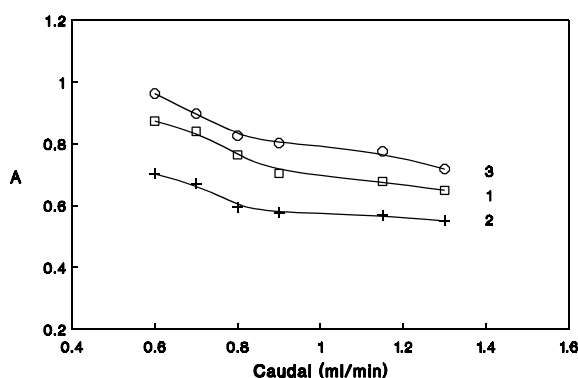


Figura VI-8. Efecto del caudal sobre la señal

1) [CF] = $15 \mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [AAS] = $75 \mu\text{g ml}^{-1}$; 3) [PCT] = $25 \mu\text{g mL}^{-1}$

Eluyente: metanol; $V_{\text{inyección}} = 250 \mu\text{l}$;

El efecto de esta variable, como ya se ha visto en capítulos anteriores, se traduce en una disminución de la señal al aumentar el caudal. Como caudal de trabajo, escogemos una solución de compromiso, que se estima en 1.15 ml/min , con objeto de obtener una buena señal y una frecuencia de muestreo aceptable.

5.3.2. Efecto del volumen de muestra inyectado

Como ya se vio anteriormente en el desarrollo de otros sensores, la posibilidad de incrementar la señal analítica aumentando el volumen de muestra inyectado es una herramienta de gran utilidad para ampliar el rango de

concentraciones en el que es operativo el sensor. La *Figura VI-9* muestra el comportamiento de la señal analítica, debida a los tres analitos, cuando se modifica el volumen de muestra inyectado.

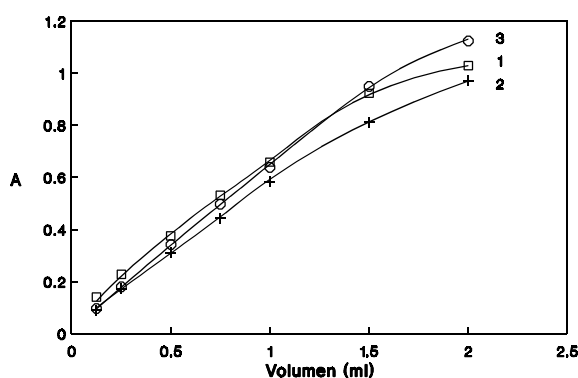


Figura VI-9. *Efecto del volumen de muestra inyectado*
1) [CF] = 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 2) [AAS] = 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 3) [PCT] = 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Eluyente: metanol; Caudal = 1.15 ml min^{-1}

Se observa para los tres analitos, que existe una relación lineal entre absorbancia y volumen de muestra hasta un volumen correspondiente a 1500 μl , a partir del cual dicho incremento deja de ser lineal.

Hemos seleccionado 250 μl como volumen de trabajo con objeto de obtener una buena frecuencia de muestreo; en caso necesario, bastaría con hacer una calibración con un volumen de muestra mayor para poder acceder a un rango de concentraciones menores, y viceversa.

6. FUNCIONES DE CALIBRACIÓN DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES

Antes de abordar la resolución de la mezcla de los tres analitos seleccionados, mediante el método de multicalibración PLS, es necesario

comprobar la existencia de una relación lineal entre la señal analítica empleada en el calibrado, absorbancia en nuestro caso, y la concentración de cada uno de los analitos a determinar, para lo que se construyeron las funciones de calibración del sensor para cada uno de ellos por separado.

Utilizando las condiciones seleccionadas en el estudio de variables previo, se inyectaron 250 μl de disoluciones de distintas concentraciones de cafeína, ácido acetil salicílico y paracetamol, registrando la señal a 275 (para los dos primeros analitos) y 250 nm, respectivamente, longitudes de onda correspondientes al máximo de absorción de cada analito.

Los resultados obtenidos se representan en la *Figura VI-10*.

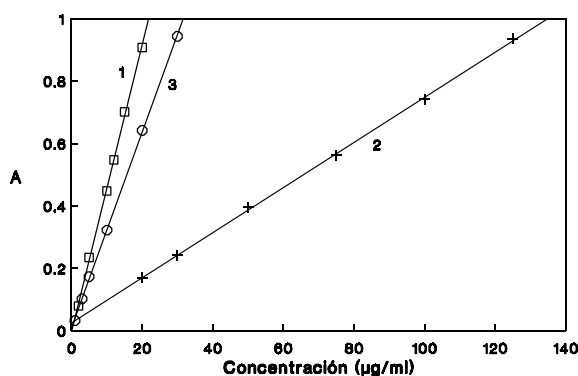


Figura VI-10. Calibración para los tres analitos (1) CF; (2) AAS; (3) PCT; $V_{\text{inyección}}: 250 \mu\text{l}$

Las ecuaciones de ajuste por mínimos cuadrados son:

$$\begin{aligned} \Rightarrow A_{\text{CF}} &= -0.005 + 4.60 \cdot 10^{-2}c & r &= 0.9994 \\ \Rightarrow A_{\text{AAS}} &= 0.025 + 7.22 \cdot 10^{-3}c & r &= 0.9997 \\ \Rightarrow A_{\text{PCT}} &= 0.010 + 3.10 \cdot 10^{-2}c & r &= 0.9998 \end{aligned}$$

siendo:

A: absorbancia

c: concentración de analito expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$

En todos los casos se observa una perfecta linealidad en los rangos de concentración estudiados.

7. RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA MEDIANTE REGRESIÓN POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES

El primer paso para la aplicación del método de multicalibración PLS es la obtención de la matriz de calibración, conjunto de patrones que son mezclas de los compuestos puros que constituyen el problema y que barren el intervalo de concentraciones esperado en las muestras que después se van a predecir haciendo uso de esta matriz. De cada patrón integrante de la matriz se registra el espectro completo a intervalos de 4.2 segundos, mientras que la inyección se hace a $t=22$ segundos desde el inicio del registro (con objeto de garantizar la estabilidad de la línea base). Se registran una totalidad de 35 espectros para cada muestra inyectada.

Para ello, se preparan disoluciones patrón que son mezclas ternarias y binarias, de los tres analitos, CF, AAS y PCT, de concentraciones comprendidas en los rangos de linealidad previamente establecidos y elegidos al azar. También se han incluido en dicha matriz, patrones que contienen únicamente uno de los analitos, al objeto de facilitar en la etapa de predicción la detección de la ausencia de más de un componente. Estas disoluciones se inyectan y se registran los espectros de absorción entre 240-320 nm. Por debajo de 240 nm no se han registrado los espectros porque el soporte sólido es ya muy poco transparente, produciéndose un gran aumento del ruido.

Dado que se habían registrado para cada muestra patrón espectros a lo largo del proceso de retención-elución, se construyeron 6 matrices de calibración a diferentes tiempos que contienen información diferente (25, 34, 42, 50, 55 y 59 segundos desde la inyección) con objeto de seleccionar la que conduzca a una mejor resolución de la mezcla. En las *Figuras VI-11.1, VI-11.2 y VI-11.3*, se muestran ejemplos de tres inyecciones de CF, AAS y PCT respectivamente.

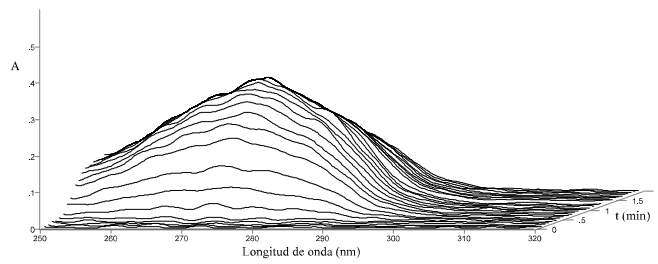


Figura VI-11.1. Inyección de 5 µg ml⁻¹ de CF
V_i=250 µl

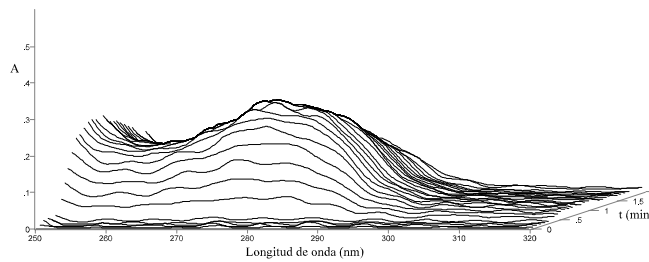


Figura VI-11.2. Inyección de 30 µg ml⁻¹ de AAS
V_i=250 µl

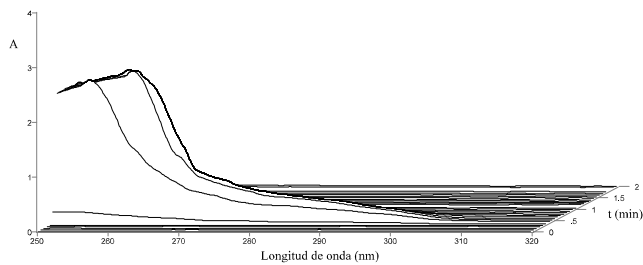


Figura VI.11.3. Inyección de 25 µg ml⁻¹ de PCT
V_i=250 µl

DetECCIÓN DE MUESTRAS ERRÓNEAS

Se partió de 30 disoluciones patrón iniciales, cuya composición (que se estableció al azar) se muestra en la *Tabla VI-1* con objeto de disponer de un amplio rango de concentraciones de cada analito. De acuerdo con nuestra experiencia previa en espectrofotometría en fase sólida, es sabido que un soporte sólido puede a veces producir interacción entre dos o más analitos cuando éstos son retenidos, no siendo por consiguiente lineal el comportamiento del sistema. Aparte, los efectos tales como la dispersión de luz y la elevada absorción de fondo debida a la fase sólida, también deben ser tenidos en cuenta. Por estas razones una matriz de calibración amplia con un elevado número de muestras patrón (30 disoluciones patrón) debería modelar el sistema estudiado (siempre que se haga uso del soporte sólido). Así conseguimos que, una vez eliminadas las posibles muestras erróneas, se pueda disponer de un número adecuado de muestras.

La detección de muestras desechables se lleva a cabo a través del proceso mediante el cual se calcula el PRESS, dejando sucesivamente, cada vez, una muestra fuera de la calibración. La diferencia entre la concentración puesta y la obtenida permite estimar si se trata de una muestra errónea. Lo que se hace es calcular para cada muestra el valor de su residuo, obteniéndose el valor de la desviación estándar del conjunto de todos los residuos. Aquellas muestras cuyo residuo es igual o mayor que tres veces la desviación estándar del conjunto (valor asociado a una probabilidad del 99%, en una distribución normal de los datos) son consideradas desechables. Este proceso se llevó a cabo para cada una de las seis matrices utilizadas.

Tabla VI-1. *Disoluciones empleadas para construir las matrices de calibración*

Muestra	Cafeína ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	AAS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Paracetamol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	5	---	---
2	15	---	---
3	---	30	---
4	---	100	---
5	---	---	25
6	---	---	40
7	10	20	---
8	5	100	---
9	---	75	20
10	---	50	30
11	3	---	50
12	8	---	20
13	2	80	40
14	10	50	10
15	4	40	60
16	6	60	15
17	3	20	60
18	6	70	5
19	9	15	25
20	12	15	30
21	15	10	10
22	2	90	10
23	1	8	70
24	4	5	60
25	5	25	15
26	7	20	25
27	2	25	35
28	10	15	15
29	15	10	10
30	5	80	5

Selección del número óptimo de factores

Los componentes principales o factores son combinaciones lineales de las variables originales del sistema, cada factor contiene información diferente y explica distinto porcentaje de varianza del sistema. En el proceso de cálculo de los factores, cada nuevo factor explica siempre una cantidad de varianza inferior al anterior.

La selección del número de factores que finalmente serán utilizados para modelar el sistema es un paso crítico en PLS, pues podrán ser excluidos del modelo todos aquellos factores que contengan información irrelevante, como puede ser la debida a ruido o errores experimentales. Si el número de factores elegido es pequeño el modelo resultante tendrá una capacidad de predicción pobre, pues empleará un número insuficiente de términos a la hora de modelar las variaciones espectrales importantes para calcular la concentración. Si por el contrario, el número de factores elegido es demasiado elevado puede llegarse incluso a modelar el ruido del sistema, con lo cual el error de predicción aumenta rápidamente.

Para determinar el número óptimo de factores lo que se hace es predecir la concentración de cada una de las muestras patrones, empleando una matriz de calibración que contiene a todas las demás y excluye a ésta (*validación cruzada*). Así se calcula el PRESS, suma de los cuadrados de los errores residuales de predicción:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2$$

siendo, \hat{c}_i la concentración calculada por el modelo, c_i la concentración teórica de analito en la muestra y n el número total de muestras de la matriz de calibración

El valor de PRESS nos da una medida de lo bien que una matriz de calibración predice la concentración a medida que se va aumentando el número de factores del modelo. Cuando al añadir más factores el error en las predicciones disminuye, se habla de una situación de infra-ajuste, pues no se están considerando suficientes factores para modelar los componentes de interés. Sin embargo, llega un momento en que el PRESS alcanza un mínimo y comienza a ascender de nuevo.

Esto sucede cuando se empiezan a incluir factores que contienen ruido, lo que se conoce como sobreajuste. Para obtener el mejor modelo debería elegirse el número de factores que proporciona el PRESS mínimo, aunque, en este caso ya suele presentarse sobreajuste.

Una solución a este problema fue propuesta por Haaland y Thomas [19]. Consiste en comparar los valores de PRESS, para cada número de factores, con el mínimo valor de PRESS obtenido, seleccionando como óptimo el modelo con menor número de factores, tal que su valor de PRESS no sea significativamente mayor que el PRESS mínimo. Esta comparación se realiza utilizando el parámetro estadístico F, definido como la razón entre el valor más pequeño obtenido para el PRESS y los distintos valores obtenidos empleando otro número de factores. Como nivel de probabilidad se selecciona el que Haaland y Thomas estimaron empíricamente como una buena solución, el 75 %.

Normalmente la naturaleza de los factores se desconoce; si exceptuamos los relacionados directamente con la concentración de los constituyentes, en general, se pueden atribuir a variaciones espectrales, ya sean de origen instrumental no aleatorio o químico. Actualmente se investiga sobre la interpretación de la información contenida en los factores mediante análisis de componentes principales.

En las Tablas *VI-2.1 - VI-2.6* del *Apéndice*, se muestran los resultados obtenidos para cada una de las matrices estudiadas, correspondientes a diferentes tiempos. En las *Figuras VI-12.1, VI-12.2 y VI-12.3* se representan, para cada componente, los valores de PRESS obtenidos a partir de las diferentes matrices.

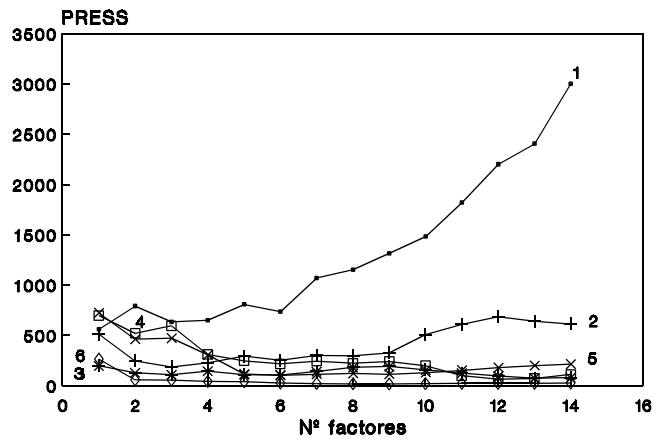


Figura VI-11.1. Valores de PRESS para CF

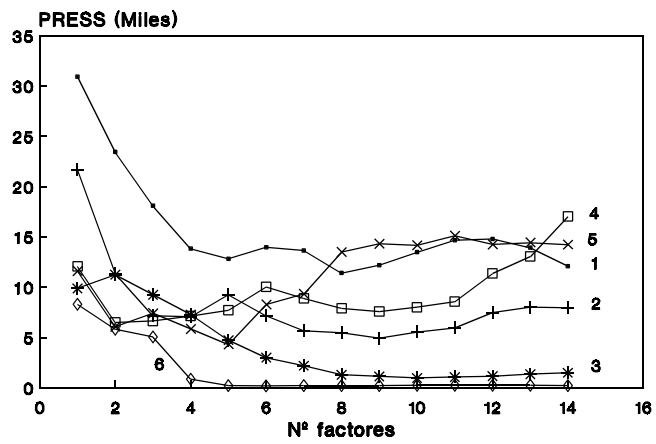


Figura VI-12.2. Valores de PRESS para AAS

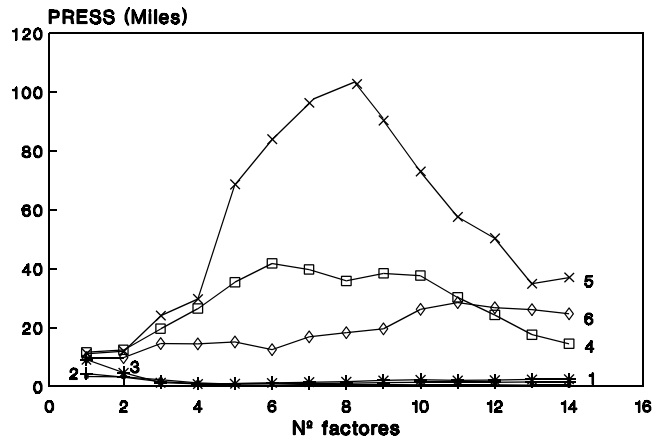


Figura VI-12.3. Valores de PRESS para PCT

Calidad de ajuste del modelo

La estimación del grado de ajuste entre los valores teóricos y los calculados por un modelo se realiza a través de distintos parámetros estadísticos. En la presente Memoria se ha hecho uso de los siguientes:

- **Coefficiente de determinación (R^2)**: permite la estimación de la bondad del ajuste de los datos a la regresión lineal. Viene dado por la siguiente expresión:

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

siendo, \hat{c}_i la concentración calculada por el modelo, c_i la concentración teórica de analito en la muestra, \bar{c} la media de las concentraciones teóricas y n el número de muestras patrón empleadas en la calibración.

- **Desviación estándar media residual (RMSD)**: es un parámetro indicativo del error medio cometido en el análisis. Viene dado por la raíz cuadrada de la media de cuadrados del error:

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

teniendo \hat{c}_i , c_i y n el mismo significado que en la ecuación anterior.

- **Error relativo de predicción** : permite estimar la capacidad de predicción del método para cada componente. Se calcula como la raíz cuadrada de la media del cuadrado de los errores cometidos en la predicción de cada componente, expresada como un porcentaje de la media de las concentraciones teóricas.

$$REP(\%) = \frac{100}{\bar{c}} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2 \right]^{0.5}$$

- **Criterio de información de Akaike (AIC)**. Se calcula:

$$AIC = n \ln \left(\frac{RMSD^2}{n} \right) + 2m$$

siendo n el nº de factores y m el nº de muestras empleadas. El modelo más adecuado será aquel que nos dé un valor más bajo de AIC [20].

En las *Tablas VI-3.1, VI-3.2 y VI-3.3*, se recogen, para los tres componentes (CF, AAS y PCT, respectivamente), los valores de los parámetros estadísticos relacionados con la calidad del ajuste del modelo para las 6 matrices utilizadas, indicándose también el número de factores óptimo en cada caso.

Tabla VI-3.1. Parámetros estadísticos de las matrices optimizadas para CF

Tiempo (s)	Matriz	Nº Factores	R ²	RMSD	AIC	REP
47	1	1	0.1497	4.4025	-11.10	64.42
56	2	3	0.7208	2.5268	-40.41	36.97
64	3	12	0.8857	1.8565	-40.91	27.16
72	4	12	0.9200	1.4847	-54.32	21.72
76	5	5	0.8568	1.9667	-51.45	28.78
81	6	7	0.9711	0.5034	-129.21	7.36

Tabla VI-3.2. Parámetros estadísticos de las matrices optimizadas para AAS

Tiempo (s)	Matriz	Nº Factores	R ²	RMSD	AIC	REP
47	1	4	0.5711	21.8379	90.98	51.74
56	2	7	0.8215	13.9748	70.19	33.11
64	3	9	0.9550	6.4111	27.44	15.19
72	4	2	0.7985	14.7229	63.32	34.88
76	5	5	0.8791	11.9850	56.98	28.40
81	6	5	0.9901	2.5780	-35.21	6.10

Tabla VI-3.3. Parámetros estadísticos de las matrices optimizadas para PCT

Tiempo (s)	Matriz	Nº Factores	R ²	RMSD	AIC	REP
47	1	10	0.9648	3.1688	-12.83	11.10
56	2	4	0.9229	5.6628	9.99	19.84
64	3	4	0.9312	5.4371	7.56	19.05
72	4	1	0.1266	19.6444	78.63	68.82
76	5	1	0.1547	19.2553	77.43	67.47
81	6	1	0.1816	18.9628	76.51	66.49

A la vista de estos resultados, podemos concluir que no es posible determinar con un error de predicción aceptable los tres analitos a un mismo tiempo, es decir, utilizando una única matriz. Los mejores resultados para paracetamol se obtienen utilizando la matriz 1, mientras que para cafeína y ácido acetil salicílico, el menor valor de REP se consigue con la matriz 6, esto es, cuando dichos analitos han alcanzado el máximo de absorbancia sobre el soporte sólido y el paracetamol se ha eluido. Con estas matrices se consigue también el valor de AIC más bajo. En estas condiciones, es posible la determinación de AAS y CF, con errores relativos de predicción del orden al 6 y 7% respectivamente; por otro lado, el error relativo de predicción del PCT es un poco más elevado, posiblemente debido a la variabilidad que introduce su rápida elución del soporte sólido. Hay que resaltar que el hecho de que sean necesarias dos matrices, a diferentes tiempos, para la resolución de la mezcla de los tres analitos, no supone la realización de experiencias diferentes ya que los tres se determinan con una única inyección de muestra.

En las condiciones operatorias descritas el sensor posee una vida media superior a 200 inyecciones.

8. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CAFEÍNA, PARACETAMOL Y ACETIL SALICÍLICO EN MEZCLAS SINTÉTICAS

La determinación de los tres analitos en mezclas sintéticas se realiza utilizando el multisensor propuesto empleando las matrices de calibración 1 (compuesta por 28 muestras patrón, ya que se rechazaron las muestras 8 y 15) para PCT, y 6 (compuesta por 27 muestras patrón, ya que fueron rechazadas 8, 9 y 30) para CF y AAS. El resto de las matrices no han sido utilizadas para la determinación de los analitos debido a los elevados errores de predicción que proporcionan.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla VI-4*, donde se incluyen muestras de mezclas tanto ternarias como binarias. El valor encontrado en todos los casos es media de tres determinaciones.

Tabla VI-4. Mezclas sintéticas

Muestra	Cafeína ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			AAS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			Paracetamol ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	C_{puesta}	C_{encon}	Rec $\pm \sigma_r$ (%)	C_{puesta}	C_{encon}	Rec $\pm \sigma_r$ (%)	C_{puesta}	C_{encon}	Rec $\pm \sigma_r$ (%)
1	10.00	9.72	97 \pm 5	25.00	25.51	102 \pm 4	10.00	10.10	101 \pm 3
2	5.00	4.64	93 \pm 1	40.00	41.18	103 \pm 3	20.0	19.69	98 \pm 3
3	3.00	3.23	107 \pm 2	75.00	77.58	103 \pm 2	20.0	19.68	98 \pm 2
4	8.00	8.41	105 \pm 1	50.00	52.03	104 \pm 2	8.00	8.14	102 \pm 2
5	15.00	14.02	94 \pm 3	15.00	16.32	109 \pm 2	10.0	10.03	100 \pm 4
6	15.00	14.42	96 \pm 4	20.00	21.40	107 \pm 6	30.00	32.56	108 \pm 1
7	10.00	10.18	102 \pm 1	40.00	42.19	105 \pm 3	20.00	21.14	106 \pm 2
8	2.00	1.90	95 \pm 2	50.00	54.19	108 \pm 1	50.00	44.90	90 \pm 3
9	5.00	5.32	106 \pm 6	60.00	60.35	100 \pm 2	40.00	37.77	94 \pm 3
10	6.00	5.82	97 \pm 3	60.00	59.19	99 \pm 2	15.00	15.06	100 \pm 2
11	2.00	1.90	95 \pm 3	25.00	23.82	95 \pm 3	35.00	32.60	93 \pm 4
12	10.00	9.96	100 \pm 2	12.00	11.90	99 \pm 5	50.00	53.43	107 \pm 2
13	15.00	15.00	100 \pm 5	15.00	14.59	97 \pm 2	50.00	48.82	98 \pm 2
14	7.00	7.39	105 \pm 2	50.00	46.86	94 \pm 1	30.00	32.63	109 \pm 3
15	10.00	10.01	100 \pm 1	20.00	20.01	100 \pm 6	30.00	27.79	93 \pm 1
16	4.00	4.27	107 \pm 5	40.00	39.22	98 \pm 2	45.00	45.18	100 \pm 6
17	15.00	15.02	100 \pm 4	---	2.12	---	---	0.29	---
18	5.00	4.59	92 \pm 6	100.00	91.68	92 \pm 5	---	0.17	---
19	---	0.56	---	100.00	86.52	87 \pm 3	20.00	17.97	90 \pm 1
20	---	-0.20	---	---	-2.89	---	30.00	30.59	102 \pm 2

En estas mezclas sintéticas los porcentajes de recuperación se encuentran comprendidos entre el 92% y el 107% para CF, 92% y 109% para AAS y entre 90% y 109% para PCT, resultados que pueden considerarse satisfactorios, teniendo en cuenta las características del sistema propuesto.

9. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CAFEÍNA, PARACETAMOL Y ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

Se ha llevado a cabo la determinación de los tres analitos mediante el uso del multisensor propuesto, en las siguientes preparaciones farmacéuticas:

1. “Aspirina” (Lab. Bayer), comprimidos
 - Ácido acetyl salicílico: 500 mg
2. “Tromalyt” (Lab. Madaus Cerafarin), comprimidos
 - Ácido acetyl salicílico: 300 mg
 - Sacarosa: 23 mg
3. “Apiretal” (Lab. Ern), comprimidos
 - Paracetamol: 100 mg
 - Sacarina: 5 mg
4. “Cafiaspirina” (Lab. Bayer), comprimidos
 - Ácido acetyl salicílico: 500 mg
 - Cafeína: 50 mg
5. “Analgilasa” (Lab. Lasa), comprimidos
 - Paracetamol: 500 mg
 - Cafeína: 30 mg
 - Fosfato de codeína: 10 mg
6. “Veganin” (Lab. Parke Davis), comprimidos
 - Paracetamol: 250 mg
 - Ácido acetyl salicílico: 250 mg
 - Fosfato de codeína: 10 mg
7. “Actrón Compuesto” (Lab. Bayer), comprimidos
 - Paracetamol: 133 mg
 - Ácido acetyl salicílico: 267 mg
 - Cafeína: 40 mg

8. “Neocibalena” (Lab. Zyma Farmacéutica), comprimidos

- Paracetamol: 150 mg
- Ácido acetil salicílico: 200 mg
- Cafeína: 50 mg

9. “Cerebrino Mandri” (Lab. Mandri), polvos

- Paracetamol: 200 mg
- Ácido acetil salicílico: 250 mg
- Cafeína: 20 mg

A la composición indicada debe añadirse siempre el excipiente, cuya naturaleza no se indica en la composición descrita por el fabricante.

9.1. Preparación de las muestras

Los comprimidos fueron finamente molturados en mortero de ágata y disueltos en agua desionizada con ayuda de un baño de ultrasonidos (10 min). El excipiente insoluble se separó por filtración a vacío a través de un filtro de 0.45 μm . En todos los casos se llevó a un volumen de 500 ml. A partir de esta disolución se prepararon, mediante adecuada dilución, las que se inyectaron en el sistema de flujo.

9.2. Determinación de paracetamol, cafeína y ácido acetil salicílico

En la *Tabla VI-5* se resumen los resultados de recuperación de los tres analitos, para cada uno de los fármacos estudiados.

Tabla VI-5. Preparaciones farmacéuticas

Fármaco	CF ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			AAS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			PCT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	$C_{\text{fármaco}}$	C_{encon}	Recup $\pm\sigma$ r (%)	$C_{\text{fármaco}}$	C_{encon}	Recup $\pm\sigma$ r (%)	$C_{\text{fármaco}}$	C_{encon}	Recup $\pm\sigma$ r (%)
1	-	-	-	50	48.9	98 \pm 4	-	-	-
2	-	-	-	300	272.6	91 \pm 3	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	100	94.6	95 \pm 2
4	50	52.4	105 \pm 3	500	543.0	108 \pm 5	-	-	-
5	30	35.0	116 \pm 4	-	-	-	500	477.0	95 \pm 2
6	-	-	-	250	282.0	112 \pm 4	250	220.5	88 \pm 3
7	40	37.3	93 \pm 6	267	274.4	103 \pm 2	133	112.8	85 \pm 7
8	50	55.4	110 \pm 3	200	177.4	89 \pm 6	150	132.4	88 \pm 5
9	20	18.2	91 \pm 5	250	237.7	95 \pm 2	200	204.5	102 \pm 2

Los resultados de recuperación podemos considerarlos satisfactorios respecto al valor indicado por el fabricante, oscilando éstos entre 91-116 % para cafeína, 89-112 % para ácido acetyl salicílico, y 85-102 % para paracetamol.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. M. Haaland, R. G. Eazterling, *Applied Spectroscopy*, 36 (1982) 665.
- [2] I. Durán Meras, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, F. Salinas, *Analyst*, 118 (1993) 807.
- [3] J. M. García, A. I. Jiménez, J. J. Arias, K. D. Khalaf, M. de la Guardia, *Analyst*, 120 (1995) 313.
- [4] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, J. Riba, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2905.
- [5] R. D. Bautista, F. Jiménez, A. I. Jiménez, J. J. Arias, *Talanta*, 40 (1993) 1687.
- [6] H. Wold, in *System under indirect observation*, eds. K.G. Joreskog and H. Wold, North-Holland, Amsterdam, vol. 2 (1982).
- [7] M. Del Olmo, C. Díez, A. Molina, I. De Orbe, J.L. Vilchez, *Anal. Chim. Acta*, 335 (1996) 23.
- [8] M. Otto and W. Wegscheider, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 63.
- [9] F.J. Rambla, S. Garrigues, M. De la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 344 (1997) 41.
- [10] J. Havel, J. Jiménez, R.D. Bautista, J.J. Arias León, *Analyst*, 118 (1993) 1355.
- [11] W. Lindberg, B. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 206 (1988) 125.
- [12] S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, W. Dunn, *J. Sci. Stat. Comput.*, 5 (1984) 735.
- [13] H. Wold, *Research paper in statistics*, Ed. Wiley, Nueva York, 1966.
- [14] P. MacLaurin, P.J. Worsfold, M. Crane, P. Norman, *Anal. Proc.*, 29 (1992) 65.
- [15] I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, A. Zamoro, *Anal. Chim. Acta*, 258 (1992) 47.
- [16] D. Robertson, E. Wade, R. Workman, R. L. Woosley, J. A. Oates, *J. Clin. Invest.*, 67 (1981) 1111.
- [17] M. J. Ayora Cañada, M. I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Talanta*, en prensa.
- [18] N. Lacy, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1482.
- [19] D. M. Haaland, D. V. Thomas, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1193.
- [20] J. Militky, Proc. Conf. European Simulation Conference 87, Prague, September, 1987.



SENSORES
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS
EN FLUJO EN FASE SÓLIDA



CAPÍTULO VII

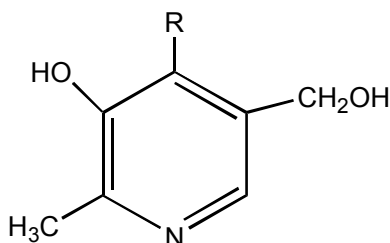
SENSOR MONOPARÁMETRO PARA PIRIDOXINA



1. INTRODUCCIÓN

Los animales alimentados con dietas purificadas suplementadas con concentraciones de tiamina y riboflavina no muestran un crecimiento satisfactorio y desarrollan una dermatitis caracterizada por el enrojecimiento e hinchazón de las extremidades. Este estado, denominado acrodinia, se previene por adición de levadura a la dieta y en su día se atribuyó a la carencia del complejo vitamínico B de la fracción hidrosoluble. El aislamiento de esta vitamina, que se llevó a cabo en el año 1938, pudo conseguirse a partir de la levadura y del salvado del arroz. Se designó específicamente como vitamina B₆, y se le dio el nombre común de piridoxina.

En ese año la vitamina se aisló en forma cristalina y pura, como clorhidrato, en cinco laboratorios diferentes. En 1939 la piridoxina fue sintetizada casi simultáneamente por el grupo de la Compañía Norteamericana “MERCK” y por Kuhn.



R: CH₂OH (piridoxina);
CHO (piridoxal);
CH₂NH₂ (piridoxamina)

Snell y col. [1] demostraron la existencia de otros compuestos con mayor actividad vitamínica B₆ que el piridoxol en algunas bacterias productoras de ácido láctico. Estos compuestos se identificaron como piridoxal y piridoxamina, y su constitución se comprobó por síntesis.

La piridoxina es la 4,5-di(hidroxi-metil)-3-hidroxi-2-metilpiridina y se ha llamado piridoxol. Su estructura se estableció a partir de pruebas químicas y espectroscópicas [2], en particular el espectro ultravioleta, que fue similar al de diversas 3-hidroxipiridinas. La metilación del grupo fenólico y la oxidación con

permanganato del producto al ácido dicarboxílico sirvió para localizar los grupos hidroximetileno sobre las posiciones 4 y 5, en base a un ensayo coloreado característico (FeCl_2), que no dan las 2- ni las 6-carboxipiridinas. La síntesis del diácido confirmó el ensayo y localizó el grupo C-metilo sobre la posición 2.

En el hombre, las tres piridoxinas (nombre general para estos compuestos) son fácilmente interconvertibles y tienen la misma actividad. En la célula, el piridoxal y la piridoxamina están presentes en el coenzima como los correspondientes 5-fosfatos. Una quinasa dependiente de ATP fosforila las tres piridoxinas y se forma piridoxal-5-fosfato tanto a partir de piridoxol-5-fosfato como de la piridoxamina-5-fosfato, por medio de una oxidasa. El piridoxal o su 5-fosfato, aunque son estables cuando son puros, pueden destruirse fácilmente si forman parte de una mezcla, ya que la función aldehído puede reaccionar con aminoácidos, aminas y grupos sulfhidrilo, especialmente si hay iones de metales pesados en el medio. Por lo tanto, la cocción de los alimentos da lugar a una pérdida considerable de actividad vitamínica B_6 .

La actividad B_6 puede valorarse enzimáticamente mediante la glutamato-aspartato aminotransferasa, microbiológicamente, utilizando numerosos microorganismos, y químicamente por medio de técnicas colorimétricas, espectro fotométricas y fluorimétricas. También puede valorarse biológicamente, utilizando pruebas con animales sometidos a dietas purificadas, pero el proceso es largo y costoso y, consecuentemente, no se utiliza con frecuencia. La dificultad principal de los restantes métodos estriba en la estimación exacta de la actividad B_6 , ya que la extracción cuantitativa de las piridoxinas de las mezclas, especialmente de la sangre, no siempre es posible.

Está clara la necesidad de piridoxinas en la nutrición humana. Los individuos con deficiencias inducidas por antagonistas, como el 4-desoxipiridoxol, presentaron lesiones en los ojos, nariz y boca similares a las observadas en las carencias de riboflavina y niacina, junto con una discrasia sanguínea. Los niños sometidos a un aporte restringido de piridoxol desarrollan alteraciones nerviosas, que se corrigen con una terapia a base de piridoxol. Una prueba sensible para la determinación temprana de deficiencias de vitamina B_6 se basa en el nivel de ácido xanturénico en orina, como resultado de una disminución de la actividad cinurenidásica (el coenzima es el piridoxal fosfato). La cinurenina se convierte normalmente en ácido

cinurénico, pero en casos de deficiencia de vitamina B₆ el metabolismo se desvía para formar ácido xanturénico.

Los requerimientos diarios de piridoxol se estiman entre 1 y 2 mg; puesto que se encuentran ampliamente distribuido en la carne, hígado, verduras, huevos y cereales sin moler, las dietas corrientes suplen su necesidad. Sin embargo, durante el embarazo y cuando se administra la hidrazida del ácido isonicotínico como antituberculoso, se requiere una cantidad mayor.

La fluorimetría es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de pequeñísimas cantidades de moléculas orgánicas e inorgánicas, debido a su elevada sensibilidad. De hecho, en gran número de ocasiones es el método oficial recomendado para la determinación de diversas sustancias con carácter farmacológico [3]. El FIA ha sido utilizado en conjunción con esta técnica de detección para medir la fluorescencia nativa de diferentes analitos: 9-aminoacridina [4], tartrato de ergotamina [5], sulfanilamida, sulfaguanidina y sulfametazina [6] y oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina [7].

Además, sustancias que no presentan fluorescencia o que presentan muy poca, son sometidas a reacciones de derivación que permitan su transformación en compuestos fluorescentes que posteriormente pueden ser determinados por metodología FIA. Así, el ácido ascórbico puede ser oxidado por cloruro de mercurio (II) [8], el ión cúprico es utilizado como oxidante para la determinación de cisteína y cistina [9], y piridoxal o su derivado 5-fosfato pueden determinarse por oxidación con cianuro [10].

Se han descrito algunos métodos espectrofotométricos para la determinación de piridoxina [11-12, 23] o determinación simultánea de múltiples vitaminas incluida la B₆ [13-16]. En cambio, sólo se ha encontrado un método fluorimétrico FIA para la determinación de esta vitamina [17].

En este capítulo se desarrolla y aplica un sensor fluorimétrico en flujo para piridoxina basado en: a) la retención transitoria de ésta, en forma catiónica, sobre una resina de intercambio catiónico ubicada en el interior de una célula de flujo convencional para fluorimetría; b) la medida de su fluorescencia nativa en la fase sólida; y c) su elución del soporte por el propio portador.

Sólo se han encontrado en bibliografía tres sensores fluorimétricos de flujo para principios activos en fármacos: uno para la determinación de riboflavina [18] basado en un principio similar al que aquí aplicamos, pero que posee menor selectividad (emplea gel de sílice C₁₈ como soporte), necesita además de una etapa de elución y trabaja con menor frecuencia de muestreo; y otros dos sensores para la determinación de vitámeros de la vitamina B₆. Se ha propuesto un sensor fluorimétrico para determinar piridoxal [19], basándose en la formación de un complejo con Be(II) y posterior retención sobre gel de sílice C₁₈. Asimismo, esta reacción es la base para la construcción de un multisensor secuencial que permite la resolución de mezclas de piridoxal, piridoxal 5-fosfato y ácido piridóxico mediante espectrofluorimetría sincrónica derivada [20], siendo para ello necesario el uso de dos portadores a pH 7.9 y 9.9. En estos dos sensores también es necesario el uso de una etapa de elución, produciéndose por tanto una disminución en la frecuencia de muestreo.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disolución patrón con una concentración de 1000 µg ml⁻¹ de clorhidrato de piridoxina (FLUKA). La disolución patrón es estable durante al menos dos semanas, a una t^a de 5° C. A partir de ésta se preparan disoluciones de menor concentración mediante la adecuada dilución con agua bidestilada.
- b) Resina de cambio iónico Sephadex SP C-25 (ALDRICH), en ciclo H⁺ utilizada sin tratamiento previo.
- c) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- d) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na₂CO₃, HK₂PO₄, NaNO₃ y Na₂B₄O₇ 0.05M en el catión (PANREAC R.A.).
- e) Disoluciones amortiguadoras: ácido tartárico/tartrato Na y ácido cítrico/citrato Na 0.05M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 µm.

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 controlado por ordenador personal compatible 386, y provisto de:
 - Lámpara de descarga modulada por Xenón de 20 kW.
 - Monocromadores Monk-Gillieson con intervalo de longitud de onda de 200 nm a 800 nm para excitación y de 200 a 900 nm para emisión.
 - Patrón de calibración. Agua certificada Perkin-Elmer.
 - Fotomultiplicador Gated.
 - Fluorescence Data Manager Software, versión 2.50.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Cubeta de flujo de cuarzo de 1.5 mm de paso de luz, HELLMMA 176-QS.
- f) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.
- g) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.
- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.
- j) Termostato P. SELECTA. Frigiterm 6000, 382.
- k) Programa informático GRAMS 32, de GALACTIC.

3. ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Se registraron los espectros de excitación y emisión de la piridoxina, tanto en disolución acuosa como en fase resina a pH=3, que es el pH óptimo para el desarrollo del sensor. Para registrar los espectros se utilizó una cubeta Hellma 176-QS (*Figura VII-1*), que posee 1.5-mm de paso óptico, en la que se ubicó la resina Sephadex SP C-25 tal y como se indica (cuando se hicieron los espectros en fase sólida).

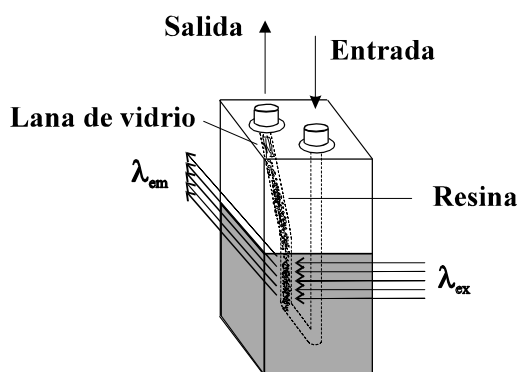


Figura VII-1. Célula de flujo Hellma 176-QS

3.1. Espectro de luminiscencia total

En espectrofluorimetría, para conseguir una descripción completa de las características fluorescentes de un determinado compuesto, se requiere un **espectro de luminiscencia total**. Se trata de un espectro tridimensional donde se representa: la intensidad de fluorescencia relativa en función de la longitud de onda de excitación y de la longitud de onda de emisión. Este espectro nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y a partir de él podemos elegir las características espectrales óptimas.

El 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, y a un programa de recogida y tratamiento de datos y presentación tridimensional (GRAMS 32). Para la obtención del espectro de luminiscencia total en disolución de la piridoxina, se inyectó 1000 μl de una disolución de ésta (pH=3) con una concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, en la célula de flujo Hellma 176-QS. A continuación, con el flujo detenido, se procedió al registro del espectro en las siguientes condiciones:

- Intervalo de emisión: 350-500
- Intervalo de excitación: 200-320
- $\Delta\lambda_{exc.}$: 4 nm
- Rendijas de excitación y de emisión: 2.5 y 5 nm
- Número de barridos: 30

El resultado se muestra en la Figuras VII-2A y VII-2B.

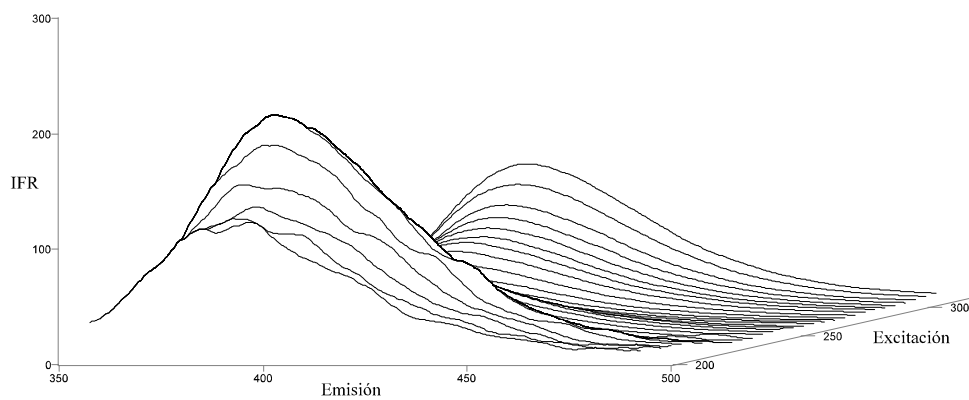


Figura VII-2A. Espectro de luminiscencia total (tridimensional) de la piridoxina en disolución

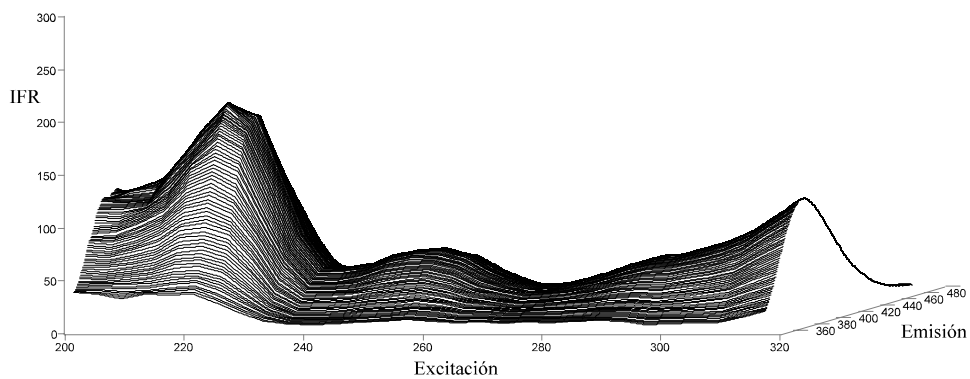


Figura VII-2B. Espectro de luminiscencia total (tridimensional) de la piridoxina en disolución

3.2. Topograma

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 del programa informático GRAMS 32. 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 como ventaja fundamental la posibilidad de determinación del máximo del sistema con una gran precisión. La curva de nivel correspondiente al analito en estudio (en disolución) se muestra en la *Figura VII-3*.

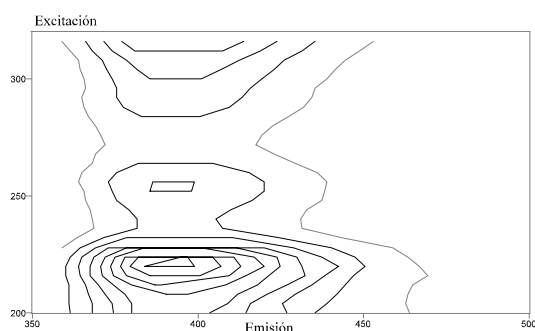


Figura VII-3. *Topograma correspondiente al espectro de luminiscencia total de la piridoxina en disolución*

A partir del topograma se observa cómo la longitud de onda de emisión óptima para la piridoxina se encuentra localizada a 390 nm, y la longitud de onda óptima correspondiente a la excitación se encuentra a 220 nm. Para el desarrollo de un sensor en fase sólida es posible mantener la longitud de onda de emisión en 390 nm, sin embargo, no es posible excitar a 220 nm puesto que para ésta la resina Sephadex SP C-25 presenta una señal de fondo tan elevada que impide la determinación del analito en estudio.

3.3. Espectros bidimensionales

A partir del espectro tridimensional es posible mediante la opción correspondiente del programa utilizado obtener los **espectros bidimensionales** (es

decir, los espectros de excitación y de emisión), que son una representación gráfica de la IFR frente a la longitud de onda (nm). Para poder comparar los espectros obtenidos en disolución con los obtenidos en fase sólida, se registraron ambos haciendo uso de la célula de flujo Hellma 176-QS (*Figura VII-1*). De este modo se hace patente el incremento de sensibilidad que se produce al pasar de espectrofluorimetría convencional a espectrofluorimetría en fase sólida.

Los espectros de excitación y de emisión de la piridoxina, tanto en disolución como en fase sólida, se obtienen utilizando la configuración FIA mostrada en la *Fig. VII-5*, y utilizando en ambos casos rendijas de excitación y emisión de 2.5 y 15 nm respectivamente. Como portador se utilizó una disolución de NaCl 0.03M a pH=3, en la que se inyectaron 200 μl de piridoxina con una concentración de 1.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Como microzona activa se utilizó resina Sephadex SP C-25 en la cual se fija fácilmente el analito, que a este pH se encuentra protonado y por tanto es una especie catiónica. Los espectros (*Fig. VII-4*) se realizaron frente a un blanco correspondiente al portador circulando a través de la resina ubicada en la célula de flujo (para los espectros en fase sólida), o a través de la célula sin resina alguna (para los espectros en disolución).

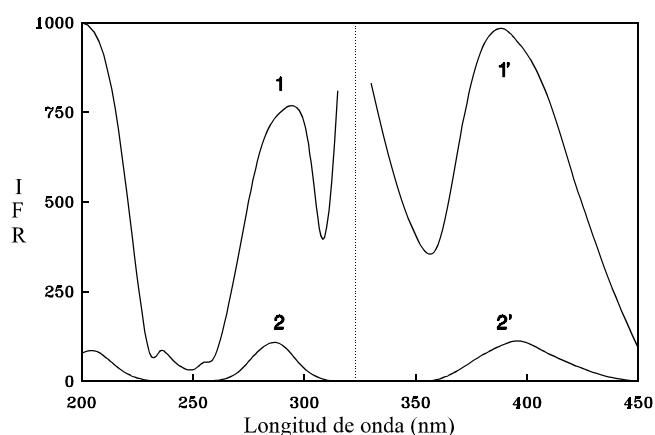


Figura VII-4. *Espectros de excitación y emisión de piridoxina*
 [clorhidrato de piridoxina]=1.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$; pH=3
 (1,1') Espectros en resina (2,2') Espectros en disolución
 λ_{ex} : 290 (1' y 2) λ_{em} : 390 (1 y 2)

Comparando los máximos de los espectros de excitación en disolución y en fase sólida, se observa un efecto batocrómico de 5 nm del segundo respecto del primero. En los espectros de emisión, se produce un efecto hipsocrómico de 5 nm en fase sólida con respecto al espectro en disolución. Esto puede atribuirse a la diferencia en el ambiente químico del entorno que rodea al analito retenido en el soporte, con respecto a disolución. El máximo de los espectros de excitación y emisión, en fase sólida, se localizan a 295 y 385 nm, respectivamente. A estas longitudes de onda la señal de emisión debida a resina es baja, por lo que se escogerán estas longitudes de onda para el posterior desarrollo del sensor. La retención y concentración del analito sobre el soporte sólido hace que se produzca un incremento de sensibilidad (en la emisión) del orden de 10 veces al pasar de una fase a otra. A este fuerte incremento en la sensibilidad hay que añadir, como después veremos, el incremento de selectividad que intrínsecamente impone el empleo de la fase sólida.

4. CONFIGURACIÓN FIA

Se empleó la configuración FIA mostrada en la *Fig. VII-5*. El analito se inyecta en una corriente de portador que lo pone en contacto con el soporte sólido, que lo retiene y concentra justo en la zona de detección, actuando el propio portador de eluyente y haciendo reutilizable el sensor.

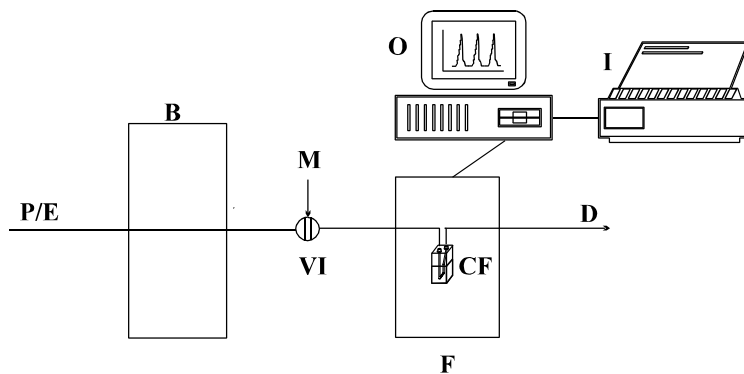


Figura VII-5. Configuración FIA
P/E: portador/eluyente; B: bomba; M: muestra; VI: Válvula de inyección; F: fluorímetro; CF: célula de flujo; D: desecho; O: ordenador; I: impresora

Un fiagrama obtenido con este sensor se muestra en la *Fig. VII-6*. Este fiagrama corresponde al proceso de calibración del sensor para un volumen de inyección de 200 μl (para sus condiciones óptimas). Al ser el eluyente el propio portador se obtienen señales transitorias. Como además la cinética de los procesos de fijación y elución es rápida, se consigue una elevada frecuencia de muestreo.

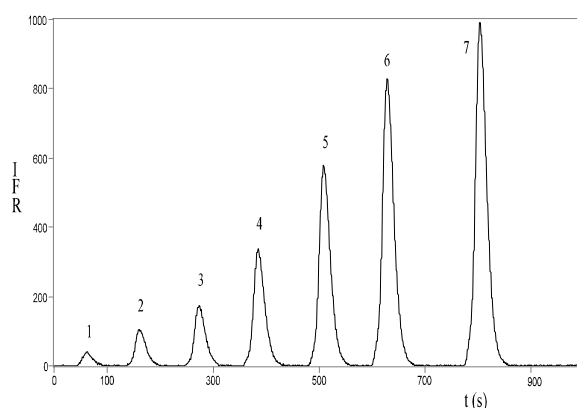


Figura VII-6. *Fiagrama para piridoxina*
V: 200 μl ; Caudal: 1.55 ml min^{-1}
1-7: 0.05, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 1.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

En nuestro estudio, podemos considerar cuatro grupos de variables: instrumentales, físicas y químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección.

5.1. VARIABLES INSTRUMENTALES

5.1.1. Rendijas de excitación y emisión

Para el estudio de la influencia que ejerce la anchura de las rendijas de

excitación y emisión sobre la intensidad de fluorescencia, se inyectaron 200 μl de piridoxina con una concentración de $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, y una vez fijado el analito en la zona de detección y alcanzado el máximo de la señal, se detuvo el sistema de flujo para poder medir la IFR a diferentes valores de anchura de rendija. Para estudiar cómo variaba la fluorescencia con la rendija de excitación, se mantenía fija la rendija de emisión a un valor de 10 nm; mientras que el estudio de la fluorescencia con la rendija de emisión se llevó a cabo manteniendo fija la rendija de excitación a un valor de 10 nm. Los resultados se muestran en la *Figura VII-7*.

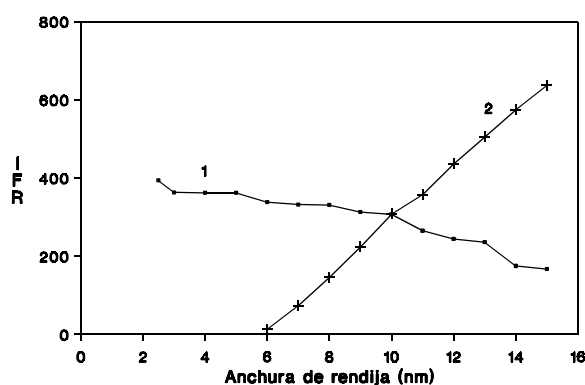


Figura VII-7. Estudio del efecto de la anchura de rendijas
 1) Rendija de excitación 2) Rendija de emisión

El comportamiento de la señal en fluorescencia, que está de acuerdo con las previsiones teóricas, nos llevó a fijar en 2.5 nm la anchura de la rendija de excitación, por ser la que al mismo tiempo que origina la máxima señal de fluorescencia, posee menor ancho de banda y por tanto menor dispersión de la radiación luminiscente emitida. La rendija de emisión se fijó para 15 nm, por ser para este valor para el que se obtienen los valores más altos de IFR y nos permite trabajar en un amplio rango de concentraciones. Además, para estos valores seleccionados, la señal de fondo debida a la resina de cambio iónico no es muy alta.

Dado que los distintos valores de velocidad de barrido, que fueron variados entre 100 y 1000 nm min^{-1} , no producen variación en los espectros de emisión, se utilizará una velocidad de 240 nm min^{-1} , valor que el programa usa por defecto.

5.2. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.2.1. Naturaleza del soporte sólido

De los soportes sólidos usuales se optó por utilizar cambiadores tipo Sephadex, dados los buenos resultados obtenidos en el desarrollo de los sensores propuestos. Se probaron resinas aniónicas y catiónicas fuertes y débiles: SP C-25, CM C-25, QAE A-25 y DAE A-25.

En la estructura de la piridoxina nos encontramos con la presencia de un grupo fenólico (-OH), lo que hace pensar que el analito pueda fijarse en un medio básico sobre un cambiador aniónico. Pero además también posee un nitrógeno piridínico, que posibilitaría la fijación del analito protonado en un medio ácido sobre un cambiador catiónico. El cambiador iónico que proporciona mejores resultados, tanto en la respuesta del sensor como el tiempo necesario para el retorno de la señal a la línea base, es la resina catiónica Sephadex SP C-25 trabajando a valores de $\text{pH} < 5$. Esto está de acuerdo con los valores del pK_a del clorhidrato de piridoxina, que son 5.00 y 8.96, puesto que a valores de pH ácidos ($\text{pH} < 5$) la piridoxina se encuentra protonada en el N piridínico, posibilitándose así su fijación en la resina catiónica.

5.2.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

Conforme la cantidad de resina utilizada aumenta, la señal analítica decrece debido a la fijación parcial del analito en la fase sólida fuera de la zona de detección. Dada la forma de la cubeta, es imposible medir la altura de cambiador iónico que se introduce dentro de ella, con lo cual, se introduce la mínima cantidad de éste que nos asegure que la zona de detección se encuentre totalmente cubierta con resina en todo momento, para que en dicha zona todo el haz de luz incida sobre la misma.

5.3. VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS

En este apartado, aparte de estudiar las variables químicas (pH del portador y de la muestra, así como la naturaleza y concentración del portador/eluyente), también se va a estudiar una variable física de interés en fluorimetría, como es la

influencia de la temperatura en la medida de la señal analítica. Durante el estudio de las variables físicas y químicas se mantienen fijas las longitudes de onda y anchos de rendija óptimos, y las variables hidrodinámicas:

✎ **Piridoxina** ⇨ Caudal: 1.55 ml min⁻¹; Volumen de inyección: 200 μl

5.3.1. pH del portador y de la muestra

Con el objeto de establecer la influencia que ejerce la acidez de la corriente de portador sobre la señal de fluorescencia, se ensayaron diferentes valores de pH para ver su influencia sobre la retención del analito en la resina de cambio iónico. Para ello, se inyectan disoluciones de piridoxina con una concentración de 1 μg ml⁻¹ ajustadas a diferentes valores de pH (con HCl ó NaOH 0.1 M).

Para valores de pH ácidos la fijación del analito sobre la resina se producía rápidamente (en la capa de resina inferior), de modo que éste no llegaba a la zona de detección donde el soporte sólido era irradiado. Por esta causa fue necesario el uso de un electrolito que desplazase al analito al área de detección. Se probó, en un principio, con NaCl 0.02M, obteniendo una señal máxima de fluorescencia para los valores de pH 2-3 (*Figura VII-8*). Esto era de esperar, puesto que para estos valores de pH el nitrógeno piridínico se encuentra protonado, favoreciéndose de este modo la fijación del analito sobre la resina catiónica Sephadex SP C-25. Se escoge pH=3 como valor óptimo para trabajar en las sucesivas experiencias en el desarrollo del sensor.

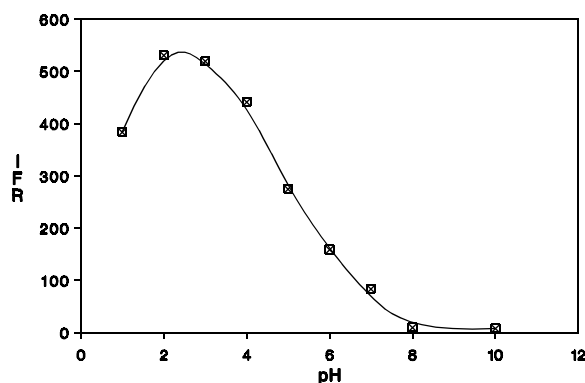


Figura VII-8. *Influencia del pH del portador para piridoxina*

También se estudió la influencia del pH de la muestra utilizando una disolución de piridoxina y portador de igual concentración que las empleadas anteriormente en este mismo apartado, mediante modificación del pH con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1M. Se comprobó que para valores de pH comprendidos entre 2-10 no se producen diferencias significativas en los valores de intensidad de fluorescencia, por lo cual no es necesario un tamponamiento de la muestra previo a la inyección.

5.3.2. Naturaleza y concentración del portador/eluyente

Elegido ya el pH óptimo de trabajo, se estudió el efecto que tenía la naturaleza de la disolución portador/eluyente y su concentración sobre la señal de emisión de fluorescencia. Para ello, se probaron disoluciones amortiguadoras de ácido tartárico/tartrato Na y ácido cítrico/citrato Na, así como disoluciones electrolíticas de diferentes sales, todas ellas con una concentración 0.05M en el catión y ajustadas a pH=3. Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na₂CO₃, HK₂PO₄, NaNO₃ y Na₂B₄O₇. De todas las disoluciones probadas los mejores resultados se obtuvieron con la disolución electrolítica de NaCl.

Para estudiar la influencia de la concentración del portador/eluyente, se prepararon disoluciones de NaCl a pH=3 de concentraciones comprendidas entre 0.01-0.2M para una concentración de piridoxina de 1 µg ml⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura VII-9*.

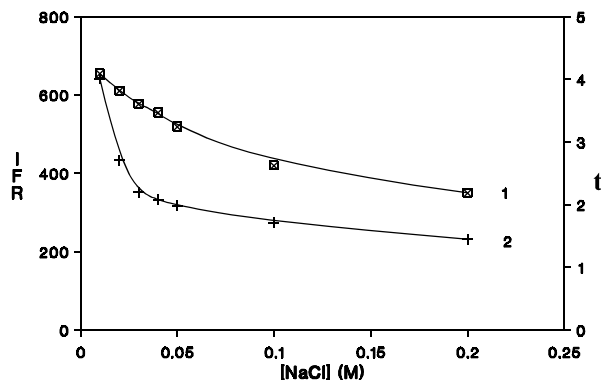


Figura VII-9. Efecto de la concentración del portador para piridoxina
1) IFR 2) Anchura de pico (min)

Tal y como era de esperar, el incremento de la concentración de portador hace disminuir la señal analítica, debido a la mayor competencia de los iones del portador por los sitios activos de la resina, pero simultáneamente disminuye el tiempo de desarrollo de la señal analítica. Como una solución de compromiso que proporcione no sólo una buena respuesta del sensor sino también una velocidad de muestreo aceptable, se estima en 0.03M como concentración óptima de NaCl para la determinación de piridoxina.

5.3.3. Temperatura

En general, en fluorescencia, la temperatura influye a valores altos disminuyendo la intensidad emitida [21, 22], ya que el aumento de la frecuencia de choques a t^a elevada aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. También es frecuente que al trabajar a altas temperaturas se produzca un desplazamiento en el máximo de la longitud de onda de emisión, por lo que es conveniente trabajar a bajas temperaturas para realizar las medidas de fluorescencia. Para estudiar la influencia de esta variable, se inyectaron disoluciones de piridoxina con una concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se registraron los valores de IFR al realizar, en un principio, un incremento (desde 5 a 45 °C) y posteriormente un descenso de la temperatura, hasta 5°C.

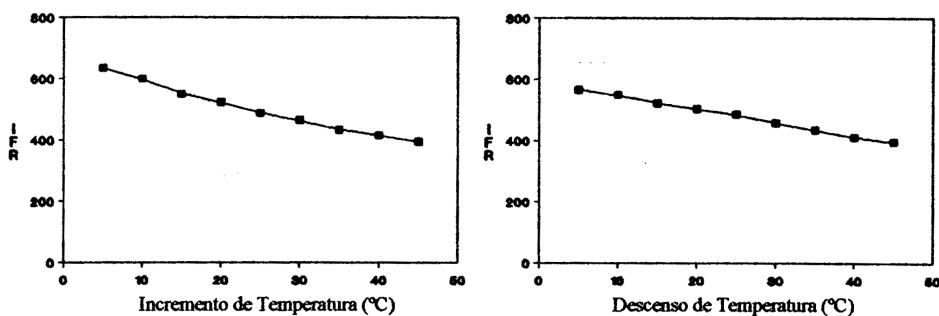


Figura VII.10. Influencia de la t^a en la intensidad de fluorescencia para la piridoxina

De la observación de la *Figura VII-10* puede deducirse que la intensidad de fluorescencia decrece con un incremento en la temperatura del sistema, lo cual obliga a fijar su valor. Esta disminución corresponde a un 23% hasta 25 °C y a un 38% hasta 45 °C. Sin embargo, el efecto observado en fase sólida es reversible, es decir, si se enfría nuevamente el sistema la intensidad de fluorescencia recupera prácticamente el valor inicial. Se ha elegido como temperatura de trabajo 20.0 ± 0.5 °C, próxima a la temperatura ambiente y fácil de conseguir mediante el empleo de un simple termostato.

5.4. VARIABLES FIA

Se realizó el estudio de la influencia de las variables FIA, como son el caudal y volumen de muestra. En todos los casos se utilizaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno. Las variables físicas y químicas se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados.

5.4.1. Caudal

Para estudiar la influencia del caudal en la intensidad de fluorescencia se inyectaron 200 μ l de volumen de muestra, para una disolución de piridoxina con una concentración de $0.75 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los resultados se muestran en la *Figura VII-11*.

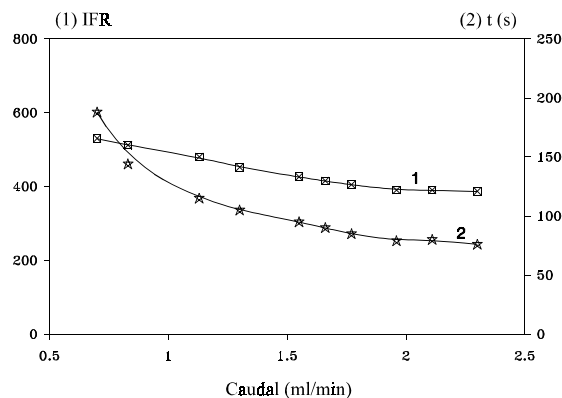


Figura VII-11. Influencia del caudal para piridoxina

Se observa que al aumentar la velocidad de la bomba (aumento del caudal), disminuye la IFR debido a una menor retención del analito en la resina, pero a su vez también disminuye el tiempo de elución, originándose por tanto un aumento en la velocidad de muestreo. Como solución de compromiso se elige una velocidad de flujo de 1.55 ml min^{-1} para próximas experiencias.

5.4.2. Volumen de inyección

Los métodos de espectrometría en fase sólida presentan como característica el hecho de que su sensibilidad y límite de detección es función del volumen de muestra utilizado, como consecuencia de la retención del analito en la fase sólida. Este efecto es tanto más acusado cuanto más fuertemente es retenido el analito fijado en el soporte sólido. Como consecuencia de esta característica, se podrán poner a punto diferentes métodos de acuerdo con las necesidades del problema a resolver. Si la concentración de analito en un problema concreto es pequeña, un aumento de volumen de muestra a usar podrá permitirnos, dentro de unos límites, efectuar su análisis con éxito.

Para el estudio de esta variable, se sigue la señal analítica (IFR) que origina la inyección de volúmenes crecientes de analito de la misma concentración, que en nuestro caso va a ser $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de piridoxina. La *Figura VII-12* muestra los resultados obtenidos.

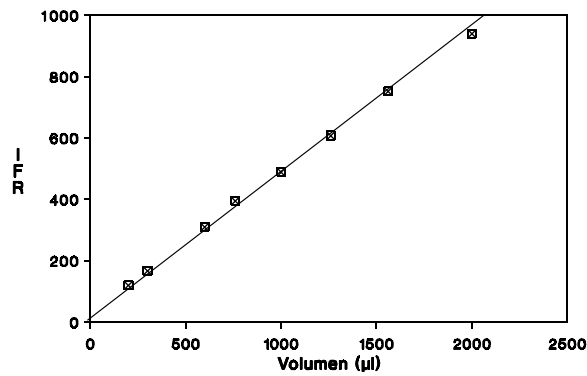


Figura VII-12. Efecto del volumen de muestra para piridoxina

Tal y como se observa, la señal analítica varía linealmente con el volumen hasta un valor de éste de 2000 µl. Para conseguir por una parte buena frecuencia de muestreo, pero por otra, buena sensibilidad, se han escogido tres volúmenes de inyección: 200, 1000 y 2000 µl.

5.5. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se enumeran las condiciones óptimas para el desarrollo del sensor de piridoxina.

$\lambda_{excitación} (nm)$	295
$\lambda_{emisión} (nm)$	385
Rendija de excitación (nm) ...	2.5
Rendija de emisión (nm)	15
Soporte sólido	Sephadex SP C-25
Portador/eluyente	NaCl 0.03M (pH=3)
pH de la muestra	2-10
Temperatura (°C)	20.0 ± 0.5
Caudal (ml min ⁻¹)	1.55
Volumen de muestra (μl)	200, 1000 y 2000

6. CALIBRACIÓN DEL SENSOR. PARÁMETROS ANALÍTICOS

6.1. Calibración del sensor

Dado que se han calibrado tres volúmenes de muestra para la piridoxina, en la *Figura VII-13* aparece la representación gráfica de tres rectas de calibrado. Además, también aparece insertado el fiagrama correspondiente a la influencia del volumen de muestra, en donde se recalcan numéricamente los picos correspondientes a los volúmenes de muestra para los que posteriormente se ha calibrado el sensor. Las variables químicas y FIA del sensor se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, mientras que los rangos lineales para cada una de las rectas aparecen en la *Tabla VII-1*.

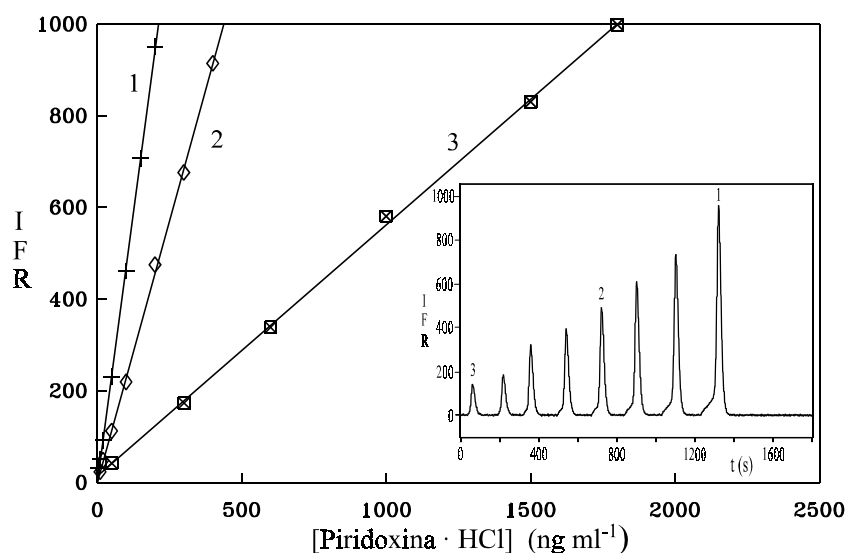


Figura VII-13. Rectas de calibrado para piridoxina usando tres volúmenes de inyección diferentes

1) 2000 µl 2) 1000 µl 3) 200 µl

La figura interior representa el diagrama correspondiente a la influencia del volumen de muestra para piridoxina

Aplicando el método de ajuste por mínimos cuadrados, las ecuaciones de las rectas para los diferentes volúmenes de inyección son las siguientes:

✓ **Piridoxina**

Volumen: 200 µl	IFR = 16.40 + 0.547 c	r=0.9995
Volumen: 1000 µl	IFR = 0.00 + 2.284 c	r=0.9996
Volumen: 2000 µl	IFR = -0.74 + 4.729 c	r=0.9998

donde :

A: absorbancia

c: concentración de analito (ng ml⁻¹)

r: coeficiente de correlación

6.2. Parámetros analíticos

En la *Tabla VII-1* se muestran los parámetros del sensor para los diferentes volúmenes de inyección empleados en el desarrollo de éste.

Tabla VII-1. *Parámetros analíticos para el sensor de piridoxina*

Parámetro	Volumen de inyección de muestra (μl)		
	200	1000	2000
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	16.40	0.00	-0.74
<i>Pendiente (ml ng^{-1})</i>	0.547	2.284	4.729
<i>Rango lineal (ng ml^{-1})</i>	50-1800	10-400	5-200
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9995	0.9996	0.9998
<i>Límite de detección (ng ml^{-1})</i>	5.70	0.67	0.33
<i>Límite de cuantificación (ng ml^{-1})</i>	19.00	2.26	1.11
<i>RSD % (n=10)</i>	0.45	0.70	1.31
<i>Frecuencia de muestreo (h^{-1})</i>	40	32	26

La vida media del sensor se estimó en más de 300 inyecciones de muestra. Los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad y los parámetros calculados mediante el estudio estadístico de los mismos, así como los resultados de la determinación de los límites de detección y cuantificación, se recogen en las *Tablas VII-2.1, VII-2.2 y VII-2.3* del *Apéndice*.

7. INTERFERENCIAS

Una vez realizadas las experiencias necesarias para la optimización de las variables que afectan a la respuesta del sensor, y la calibración del mismo para tres volúmenes de muestra, pasamos al estudio de la interferencia producida por la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas. Las especies que se han seleccionado como potencialmente interferentes son aquellas que más frecuentemente acompañan a la piridoxina en la mayoría de las preparaciones

farmacéuticas comercializadas, ya sean como principios activos o como excipientes.

Para ello, y empleando un volumen de inyección de 200 μl , trabajamos con disoluciones que para cada especie extraña ensayada contienen 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de piridoxina, y a las que se añaden cantidades variables de la especie cuyo efecto se va a estudiar. A partir de los valores obtenidos en cada caso y el correspondiente a una disolución exenta de especie interferente, se determina el nivel de tolerancia para cada una de las especies (*Tabla VII-3*) como en los casos anteriores.

Tabla VII-3. *Tolerancia de la piridoxina a especies interferentes*
(determinación de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de piridoxina)

Especie extraña	Tolerancia (p/p) [interferente]/[analito]
Glucosa, Sacarosa, Sacarina, L-Carnitina, L-Lisina, Nicotinamida, Pantotenato Ca, Metionina, Biotina, Ácido glutámico, Ácido cítrico	>100 ^a
Cafeína, Ácido ascórbico, Diclofenaco Na	100
Salicilamida	25
Vitamina B ₁₂ , Vitamina B ₂	10
Vitamina B ₁	100

^aMáxima relación interferente/analito ensayada

Se comprueba la alta tolerancia de la piridoxina a la especies que frecuentemente le acompañan en los preparados farmacéuticos, incluidas las vitaminas del grupo B. En espectrofluorimetría convencional en solución homogénea (ausencia de soporte sólido), encontramos que los niveles de tolerancia (relación p/p) a las vitaminas B₁₂, B₂, B₁, y a salicilamida son 2, 0.01, 1 y 1, respectivamente. Si estos valores los comparamos con las cantidades toleradas en el método propuesto, estas últimas son 5, 1000, 100 y 25 veces mayores que aquellas obtenidos con el método en solución homogénea. Así se pone de manifiesto cómo el método propuesto es altamente selectivo, lo cual es debido a la retención del catión de piridoxina sobre la resina y su consiguiente separación del resto de la matriz.

8. APLICACIONES ANALÍTICAS

El sensor desarrollado para la determinación de piridoxina ha sido aplicado al análisis de dicho compuesto en preparaciones farmacéuticas.

8.1. Preparación de las muestras

Los medicamentos analizados (comprimidos, soluciones y sobres) fueron disueltos en agua bidestilada con ayuda de un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación se procedió a una filtración a través de filtro Millipore de 0.45 μm , llevándose a un volumen final conocido. En ningún caso se comprobó la existencia de efecto matriz, de forma que se procedió a la determinación de la piridoxina por aplicación del método de calibración directa.

Todas las disoluciones fueron diluídas adecuadamente antes de ser inyectadas en la corriente de portador. En todos los casos se empleó un volumen de inyección de 200 μl .

8.2. Determinación de piridoxina

La composición de los medicamentos analizados es la siguiente:

1. "Vitagama Fluor" (Lab. Amirrall), solución

FNa: 0.5 mg; Vit. A, palmitato: 1250 u.i.; Vit. B₁ HCl: 1 mg; Vit. B₂: 1 mg; Nicotinamida: 25 mg; Pantotenato sódico: 10 mg; Sulfimida benzóica (sal sódica): 3 mg; Vit. C: 50 mg; Vit. D₃: 600 u.i.; Piridoxina HCl: 1 mg; Vit. E (acetato): 2 mg; Biotina: 15 mcg; Fe²⁺: 0.50 mg

2. "Astenolit" (Lab. Elmu), ampollas

Acetilglutamina: 50 mg; Ác. acetilaspártico: 70 mg; Carnitina HCl: 1000 mg; Inositol: 30 mg; Vit. B₁ (monohidrato): 50 mg; Piridoxina HCl: 50 mg; Vit. B₁₂: 50 mcg; Aspartato magnésico: 75 mg; Aspartato potásico: 75 mg; Sacarina sódica: 40 mg; Etanol 96°: 400 mg; Sacarosa: 3000 mg

3. "Neurodavor Plus" (Lab. Belmac), ampollas
Hidroxicoalamina (acetato): 5 mg; Vit. B₁ HCl: 50 mg; Piridoxina HCl: 50 mg; Dexametasona (fosfato sódico): 1.6 mg; Lidocaína HCl: 12.5 mg; Excipientes: Metilparaben, hidróxido sódico, agua bidestilada c.s.p.
4. "Antimiopic" (Lab. Cibavision), comprimidos
Extracto seco de bayas de Vaccinium Myrtillus: 50 mg; Retinol (acetato): 2500 u.i.; α -Tocoferol: 25 mg; Piridoxina HCl: 25 mg; L-Citrulina: 10 mg; Ácido L-acetil aspártico: 10 mg
5. "Trimetabol" (Lab. J. Uriach), solución
I Lisina HCl: 250 mg; dl Carnitina HCl: 375 mg; Vit. B₆ HCl: 30 mg; Piridoxina HCl: 30 mg; Vit. B₁₂: 1000 mcg; Sorbitol 70%: 1 g; Sacarina: 5 mg; Sacarosa: 2.25 g
6. "Vitalter" (Lab. Alter), sobres
Vit. A, palmitato: 0.375 mg; Vit. B₁(monohidrato): 0.6 mg; Vit. B₂: 0.9 mg; Nicotinamida: 10 mg; Pantotenato cálcico: 3.8 mg; Vit. C: 22.5 mg; Vit. D₃: 0.001 mg; Piridoxina HCl: 1.1 mg; Vit. E (acetato): 5 mg; Vit. B₁₂: 0.001 mg; Ácido fólico: 0.1 mg; Carbonato cálcico: 40 mg; Óxido magnésico: 7 mg; Gluconato ferroso: 3 mg; FNa: 0.125 mg; Hidratos de Carbono: 1.1 g
7. "Gota Cerebrina" (Lab. Derly), solución
Retinol: 2.78 mg; Colecalciferol: 46.3 mcg; Piridoxina HCl: 1.85 mg; Ácido pantoténico: 5.56 mg; Nicotinamida: 18.52 mg; Vit. B₁₂: 5.56 mcg; Sacarina sódica: 6 mg
8. "Actilevol Orex" (Lab. Wassermann), sobres
Ciproheptadina HCl: 1 mg; Carnosina: 100 mg; Hematoporfirina HCl: 3 mg; Ácido ascórbico: 250 mg; Vit. B₁ HCl: 50 mg; Piridoxina HCl: 50 mg; Vit. B₁₂: 0.25 mg; Sacarina sódica: 25 mg; Sacarosa: 1500 mg
9. "Antineurina" (Lab. Tedec-Meiji Farma), inyectable
Vit. B₁ HCl: 125 mg; Piridoxina HCl: 125 mg; Lidocaína HCl: 3 mg; Vit. B₁₂: 5000 gammas
10. "Agudil" (Lab. Sigma-Tau), comprimidos

L-asparagina: 25 mg; D,L-fosforilserina: 25 mg; L-glutamina: 25 mg;
 Piridoxina HCl: 10 mg

11. "Dolo-Nervobion" (Lab. Merck), cápsulas

Diclofenaco sódico: 50 mg; Vit. B₁ HCl: 50 mg; Piridoxina HCl: 200 mg;
 Metilcobalamina: 1 mg; Sacarosa: 63.74 mg

Los resultados obtenidos para cada medicamento analizado se muestran en la siguiente *Tabla VII-4*.

Tabla VII-4. *Determinación de piridoxina en preparaciones farmacéuticas*

Fármaco	Composición (mg)	Encontrado (mg)	Recuperación $\pm \sigma_r$ (%)
Vitagama Fluor	^a 1	1.02	101.7 \pm 0.5
Astenolit	^a 5	5.01	100.2 \pm 0.7
Neurodavor Plus	^a 20	20.35	101.7 \pm 0.8
Antimiopic	^b 25	24.94	99.8 \pm 0.7
Trimetabol	^a 6	6.10	101.6 \pm 0.5
Vitalter	^c 1.1	1.12	101.6 \pm 0.7
Gota Cerebrina	^a 1.85	1.85	100.2 \pm 0.8
Actilevol Orex	^c 50	50.63	101.3 \pm 1.5
Antineurina	^a 62.5	63.54	101.7 \pm 0.6
Agudil	^b 10	10.14	101.4 \pm 0.8
Dolo-Nervobion	^b 200	203.33	101.6 \pm 1.4

^a por ml; ^b por comprimido; ^c por sobre

De acuerdo con los resultados mostrados podemos decir que hay buena concordancia entre los resultados obtenidos por el método propuesto y los indicados por el fabricante. Para chequear la exactitud del método propuesto se llevó a cabo un estudio de recuperación de distintas cantidades de analito

adicionadas sobre algunos de los fármacos anteriores (*Tabla VII-5*), obteniéndose porcentajes de recuperación entre 98.0 y 102.0%.

VII-5. *Estudio de recuperación de piridoxina en preparaciones farmacéuticas*

Muestra	Añadido (mg)	% Recuperación $\pm \sigma_r$ (%) ^a
Antimiopic	5 ^c	99.7 \pm 0.6
	10 ^c	99.2 \pm 0.7
	20 ^c	99 \pm 1
Actilevol Ores	10 ^d	100.5 \pm 0.8
	20 ^d	99.4 \pm 0.6
	40 ^d	101.3 \pm 0.9
Antineurina	10 ^b	100 \pm 1
	20 ^b	99.5 \pm 0.5
	40 ^b	102 \pm 2
Dolo-Nervobion	20 ^c	100.6 \pm 0.9
	50 ^c	98.5 \pm 0.9
	100 ^c	98 \pm 2

^aMedia de tres determinaciones; ^b por ml; ^c por comprimido; ^d por sobre

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. E. Snell, B. M. Guirard, and R. J. Williams, *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 519.
- [2] E. T. Stiller, J. C. Keresztesy, and J. R. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1939) 1237.
- [3] J. Martínez Calatayud “*Flow Injection analysis of pharmaceuticals*”, Taylor & Francis, Great Britain, (1996) pp. 151-152.
- [4] J. Martínez Calatayud, A. Sánchez Sampedro, P. Villar Civera, C. Gómez Benito, *Anal. Lett.*, 23 (1990) 2315.
- [5] M. Polasek, P. Solich, R. Karlicek, *Ceskoslov. Farm.*, 38 (1989) 1.
- [6] M. C. Mahedero, J. J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 269 (1992) 193.
- [7] N. Haagsma, M. J. B. Mengelers, *Z-Lebensm-Unters-Forsch*, 188 (1989) 227; J. Martínez Calatayud, “*Flow Injection analysis of pharmaceuticals*”, Taylor & Francis, Great Britain, (1996) pp. 158.
- [8] H. K. Chung, J. D. Ingle, *Talanta*, 38 (1991) 355.
- [9] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomas, J. Carpena, *Analyst*, 117 (1992) 1025.
- [10] P. Linares, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Lett.*, 18 (1985) 67.
- [11] M. N. Reddy, S. P. Rao, D. G. Sankar, *Indian Drugs*, 33 (1996) 569.
- [12] M. K. Gupta, C. L. Jain, *Indian Drugs*, 26 (1991) 275.
- [13] Z. Li, M. Li, L. Zhi, G. Zheng, R. Yu, *J. Anal. Toxicol.*, 15 (1991) 260.
- [14] I. I. Hewala, *Anal. Lett.*, 26 (1993) 2217.
- [15] R. D. Bautista, A. I. Jiménez, F. Jiménez, J. J. Arias, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (1996) 183.
- [16] F. Onur, E. Dinc, *Gazi Univ Eczacilik Fak Derg*, 7 (1990) 77; *Anal. Abst.* 53 (1991) 11G7.
- [17] G. G. Gao, G. Y. Yang, *Shenyang Yaoxueyuan Xuebao*, 9 (1992) 18; *Anal. Abst.*, 55 (1993) 8G247.
- [18] G. Zhilong, Z. Zhujun, *Anal. Chim. Acta*, 339 (1997) 161.
- [19] Chen Danhua, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 269.
- [20] D. Chen, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 269.
- [21] E. J. Bowen, *J. Phys. Chem.*, 63 (1959) 4.
- [22] W. R. Ware, B. A. Baldwin, *J. Chem. Phys.*, 43 (1965) 1194.
- [23] M. J. Ayora, Tesis Doctoral, Universidad de Jaén, 1998.

CAPÍTULO VIII

SENSOR BIPARÁMETRO PARA ÁCIDO SALICÍLICO Y SALICILAMIDA



1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Ácido salicílico*

El ácido salicílico aparece en gran número de fármacos dermatológicos, debido a su potente actividad queratolítica. Sus características se describieron con gran detalle cuando se realizó el estudio de los *Salicilatos* en el *Capítulo II*. Su determinación se ha llevado a cabo en diferentes matrices: fluidos biológicos, fármacos y alimentos [1]. Los métodos más empleados para dicha determinación han sido los cromatográficos, bien para su detección aislada o en conjunción con ácido acetil salicílico: Cromatografía gas-líquido [2, 3], Cromatografía líquida [4], Cromatografía en capa fina [5], y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [6, 7]. De estas técnicas es la Cromatografía de gases la más específica aunque requiera de reacciones previas de derivación [2, 3], debido a la baja presión de vapor del ácido salicílico y a la presencia de grupos funcionales que causan absorción. Sin embargo, estos métodos requieren normalmente de una separación previa del analito respecto de los excipientes y antiácidos que les suelen acompañar en el fármaco [8], lo que supone un incremento en el tiempo de análisis.

1.2. *Salicilamida*

La salicilamida, al igual que el ácido salicílico, también se engloba dentro del grupo de los *Salicilatos*, habiendo sido ya comentadas sus características en los *Capítulos II y IV*. Este analito aparece en gran número de compuestos con carácter farmacológico debido a sus propiedades analgésico-antipiréticas. Su determinación también se ha llevado a cabo haciendo uso de técnicas cromatográficas [9, 10].

1.3. *Mezcla ácido salicílico-salicilamida*

Tanto para el ácido salicílico como para la salicilamida se han propuesto métodos de determinación por espectrofotometría convencional [11-13] y por espectrofluorimetría [14-18], para cada uno de ellos por separado. Nosotros hemos abordado el estudio de la mezcla formada por ambos, desarrollando para ello un sensor con detección fluorimétrica que nos permita la determinación secuencial de los dos analitos.

2. DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN UTILIZADAS

2.1. Disoluciones y reactivos empleados

- a) Disoluciones patrón de ácido salicílico y salicilamida (FLUKA) con una concentración de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Ambas disoluciones patrón son estables durante al menos un mes, a una t^{a} de 5°C , y ambas se preparan en etanol/agua al 5% (v/v). A partir de éstas las disoluciones de menor concentración se obtienen mediante la adecuada dilución con agua bidestilada.
- b) Resina de cambio iónico Sephadex QAE A-25 (ALDRICH), en ciclo Cl^{-} utilizada sin tratamiento previo.
- c) HCl 4M (PANREAC R.A.) y NaOH 4M (PANREAC R.A.).
- d) Los electrolitos utilizados fueron: NaCl , KCl , Na_2CO_3 , HK_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.05M (PANREAC R.A.).

Las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$.

2.2. Instrumentación empleada

- a) Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 controlado por ordenador personal compatible 386, y provisto de:
 - Lámpara de descarga modulada por Xenón de 20 kW.
 - Monocromadores Monk-Gillieson con intervalo de longitud de onda de 200 nm a 800 nm para excitación y de 200 a 900 nm para emisión.
 - Patrón de calibración. Agua certificada Perkin-Elmer.
 - Fotomultiplicador Gated.
 - Fluorescence Data Manager Software, versión 2.50.
- b) pH-metro digital Crison, modelo Micro-pH 2002 provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos y sonda de temperatura.
- c) Agitador magnético con termostato AGIMATIC SELECTA ref. 243.
- d) Balanza analítica METTLER AJ 100.
- e) Cubeta de flujo de cuarzo de 1.5 mm de paso de luz, HELIMA 176-QS.
- f) Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3.
- g) Válvula de inyección rotatoria REODHYNE tipo 50.
- h) Baño de ultrasonidos SELECTA.

- i) Tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno.
- j) Termostato P. SELECTA. Frigiterm 6000, 382.
- k) Programa informático GRAMS 32.

3. ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN EN SOLUCIÓN ACUOSA Y FASE SÓLIDA

Tanto para el registro de los espectros como para la construcción del sensor, se utilizó una cubeta Hellma 176-QS (*Capítulo VII*), que posee 1.5-mm de paso óptico.

3.1. Espectros de luminiscencia total

La disponibilidad de dos monocromadores en los espectrofluorímetros permite registrar dos tipos de espectros. Haciendo variar la longitud de onda de excitación (por la variación de la posición del correspondiente monocromador), a una longitud de onda de emisión fija, obtenemos el espectro de excitación; mientras que al variar la longitud de onda de emisión (moviendo el monocromador de emisión), a una longitud de excitación fija, obtenemos el espectro de emisión.

Así, los espectros de emisión y excitación convencionales, no son descripciones completas de las características fluorescentes de un determinado compuesto, pues para cada longitud de onda de excitación habría un espectro de emisión diferente. Una descripción completa requiere un espectro tridimensional en el cual uno de los ejes es la escala de longitud de onda de excitación; un segundo eje representa la longitud de onda de emisión, y el tercer eje es el eje de intensidad de fluorescencia. Tales espectros son conocidos como matriz de excitación-emisión o espectros de luminiscencia total.

Este espectro es una proyección que contiene n espectros individuales superpuestos. En nuestro caso, la obtención de los mismos ha sido posible (tal y como se describe en el *Capítulo VII*). Para la obtención de los espectros de luminiscencia total en disolución de salicilamida y ácido salicílico, se hizo circular por el sistema de flujo, representado en la *Figura VIII-4*, disoluciones de éstos con

una concentración de $0.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ (ajustadas a un $\text{pH}=11$ con $\text{NaOH } 0.1\text{M}$). A continuación, con el flujo detenido, se procedió al registro de los espectros correspondientes en las siguientes condiciones:

- Intervalo de emisión: 300-500
- Intervalo de excitación: 200-270
- $\Delta\lambda_{\text{exc.}}$: 2 nm
- Rendijas de excitación y de emisión: 2.5 y 5 nm
- Número de barridos: 35

Los resultados se muestran en las *Fig. VIII-1.1A-VIII-1.1B* y *VIII-1.2A-VIII-1.2B*.

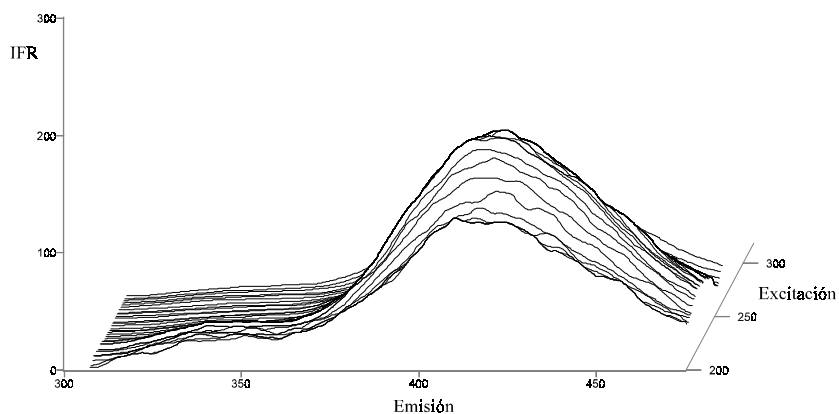


Figura VIII-1.1A. Espectro tridimensional de salicilamida en disolución

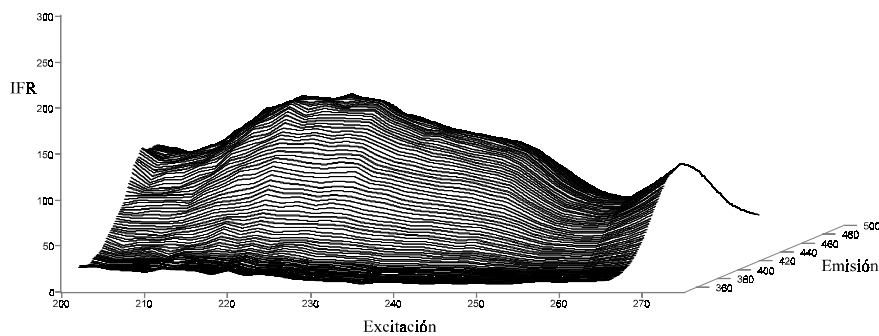


Figura VIII-1.1B. Espectro tridimensional de salicilamida en disolución

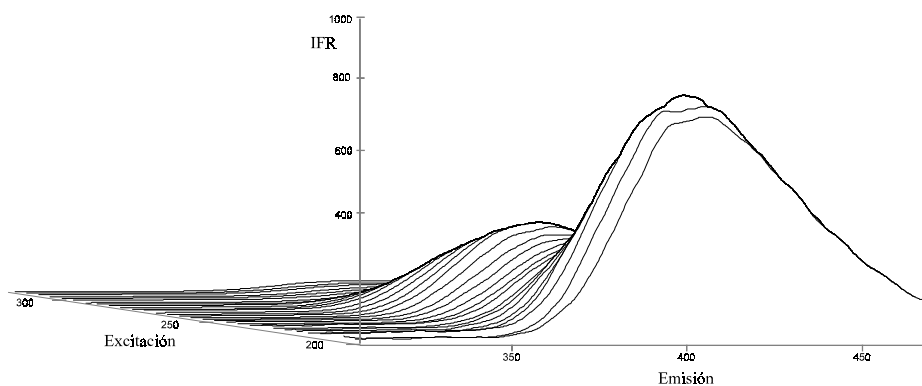


Figura VIII-1.2A. Espectro tridimensional de ácido salicílico en disolución

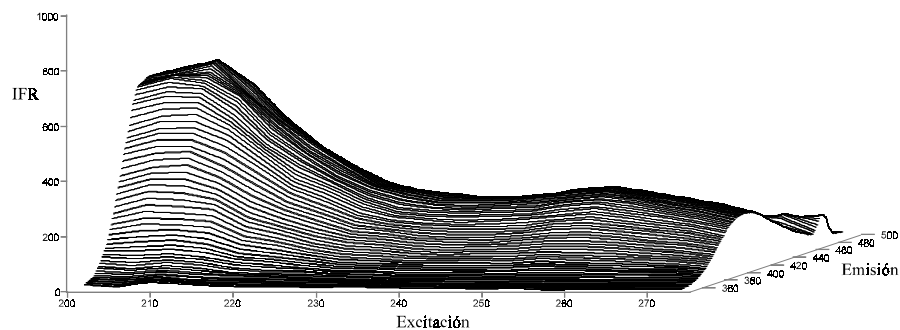


Figura VIII-1.2B. Espectro tridimensional de ácido salicílico en disolución

3.2. Topogramas

Un segundo método para representar los espectros de luminiscencia total es mediante **curvas de nivel ó topogramas**. Los dos ejes 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 como ventaja fundamental la determinación del máximo del sistema con una gran precisión. La curva de nivel correspondiente a los analitos en estudio se muestra en la *Figura VIII-2.1 y VIII-2.2*.

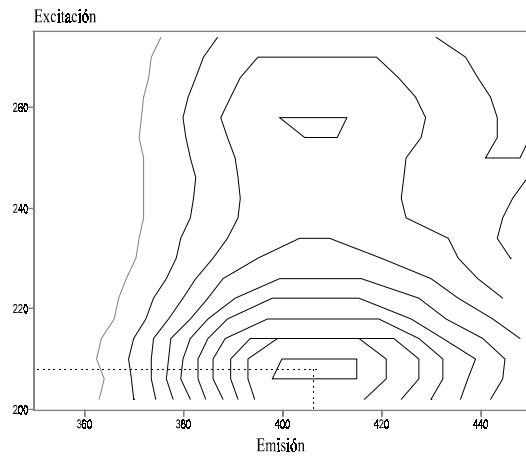


Figura VIII-2.1. *Topograma de ácido salicílico en disolución*

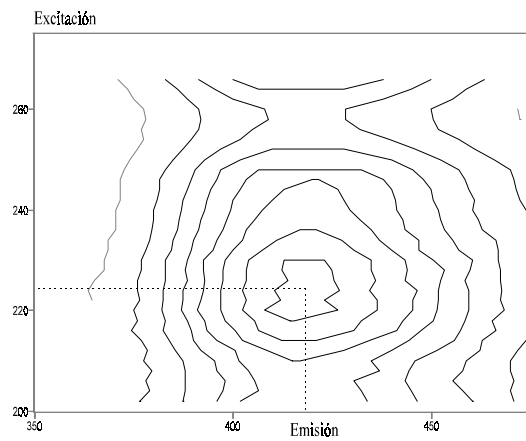


Figura VIII-2.2. *Topograma de salicilamida en disolución*

A partir de los topogramas se obtienen unas longitudes de onda de emisión y excitación del máximo: 208 y 405 nm para ácido salicílico y, 225 y 418 nm para salicilamida. Para las dos longitudes de onda de excitación se obtiene una señal muy elevada por parte del cambiador aniónico Sephadex QAE A-25. Por ello elegimos una longitud de onda de excitación en la que la señal de fondo de la resina sea baja.

3.3. Espectros bidimensionales

Para realizar las medidas de fluorescencia en fase sólida fue elegida una longitud de onda de excitación de 260 nm ya que, a este valor, la señal de fondo de la resina era mínima y además las longitudes de onda de emisión máxima para el ácido salicílico y la salicilamida eran muy próximas, 415 y 410 nm, respectivamente; la longitud de onda de emisión se fijó por ello a 415 nm.

En la *Figura VIII-3* se recogen los espectros del ácido salicílico y de la salicilamida en fase resina obtenidos utilizando la configuración FIA de la *Figura VIII-4* y como portador una disolución de NaCl 0.04 M (pH=11) en la que inyectaron, por separado, 1000 μl de disolución 0.2 y 0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico y salicilamida, respectivamente. Los espectros se registraron a flujo detenido frente a un blanco correspondiente al portador circulando a través de la resina (Sephadex QAE A-25) ubicada en la célula de flujo.

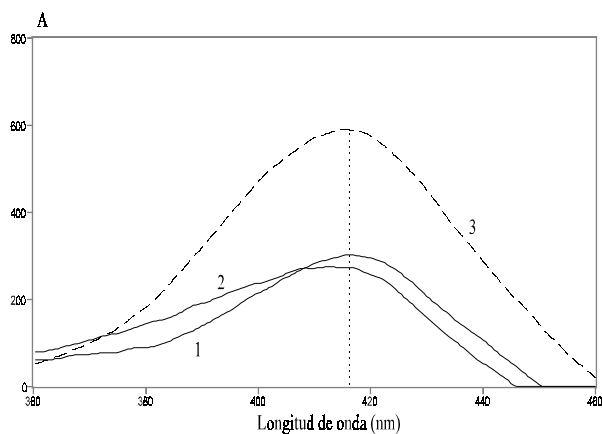


Figura VIII-3. Espectros de ácido salicílico y salicilamida en fase sólida
1) 0.20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ácido salicílico; 2) 0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Salicilamida
3) Mezcla (1+2)

Tal y como se muestra en la *Figura VIII-3*, se produce aditividad en la emisión de ambos analitos (415 nm) excitando a una longitud de onda de 260 nm.

4. CONFIGURACIÓN FIA

La configuración FIA empleada se muestra en la *Fig. VIII-4*. La muestra se inyecta en una corriente de portador P(a) o P(b) que lo pone en contacto con el soporte sólido. Cuando se hace circular el portador P(a) (NaCl 0.025M, pH=2) sólo el ácido salicílico es retenido en la resina y a la vez eluido. A continuación, girando la válvula de selección VS y tras una nueva inyección, la circulación de un segundo portador P(b) (NaCl 0.05M, pH=11) permite la fijación y posterior elución de ambos, ácido salicílico y salicilamida. El sensor, pues, resuelve secuencialmente la mezcla de estos dos analitos.

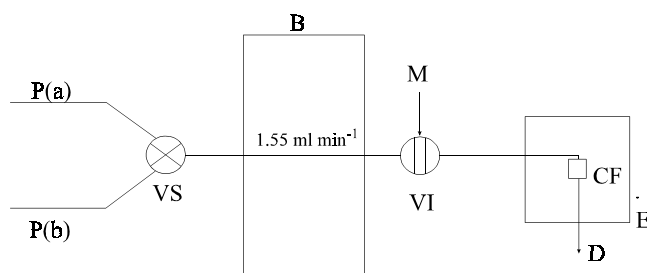


Figura VIII-4. Configuración FIA

P(a): portador ácido (NaCl 0.025M pH=2); P(b): portador básico (NaCl 0.05M pH=11); VS: válvula de selección; B: bomba; M: muestra; VI: válvula de inyección; D: desecho; CF: célula de flujo; E: espectrofluorímetro

Se han recogido dos fiagramas correspondientes a ácido salicílico y salicilamida, respectivamente, haciendo uso del portador NaCl 0.05M pH=11 (*Figuras VIII-5.1 y VIII-5.2*). En ambos casos, el fiagrama corresponde al estudio del caudal para cada uno de los analitos. El fiagrama para ácido salicílico, utilizando el portador NaCl 0.025M pH=2, es análogo al obtenido utilizando el portador de pH=11.

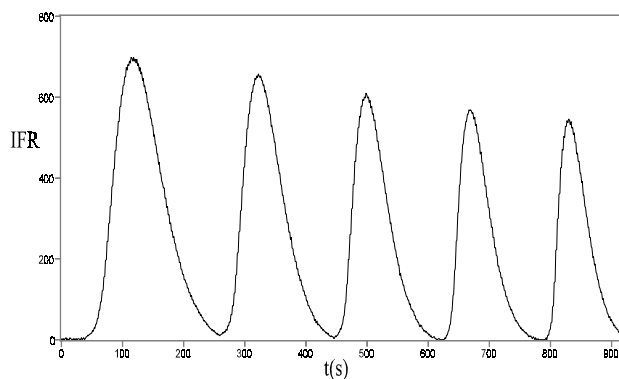


Figura VIII-5.1. *Fiagrama para ácido salicílico (pH=11)*
[Ácido salicílico]= $2 \mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}} = 200 \mu\text{l}$

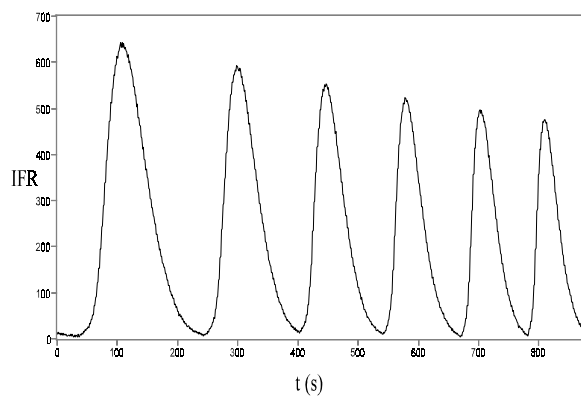


Figura VIII-5.2. *Fiagrama para salicilamida (pH=11)*
[Salicilamida]= $1 \mu\text{g ml}^{-1}$; $V_{\text{inyección}} = 200 \mu\text{l}$

En ambas Figuras se observa que se obtienen señales transitorias correspondientes a la fijación del analito respectivo mediante intercambio iónico con la resina y posterior elución de éste por el propio portador, empezando a producirse la disminución de la intensidad de fluorescencia justamente después de

que la dispersión causada por el propio portador (eluyente) en el extremo posterior del bolo de muestra, alcanza la zona de detección.

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

Podemos considerar cuatro grupos de variables: instrumentales, químicas, FIA, y las referentes a la unidad de retención-detección.

5.1. VARIABLES INSTRUMENTALES

5.1.1. Rendijas de excitación y emisión

Se estudió la influencia que ejerce la anchura de la rendija del monocromador de excitación y emisión sobre la intensidad de fluorescencia. Para ello, en un portador de NaCl 0.05M pH=11, se inyectaron 1000 μ l de disoluciones de ácido salicílico o salicilamida con una concentración de 0.4 y 0.15 μ g ml⁻¹, respectivamente, y una vez fijado el analito correspondiente en la zona de detección se detuvo el sistema de flujo para poder medir la IFR a diferentes valores de anchura de rendija, a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 260 y 415 nm, respectivamente. Para estudiar cómo variaba la fluorescencia con la rendija de excitación, se mantenía fija la rendija de emisión a un valor de 10 nm; mientras que el estudio de la fluorescencia con la rendija de emisión se llevó a cabo manteniendo fija la rendija de excitación a un valor de 10 nm. Los resultados se muestran en las Figuras *VIII-6.1* y *VIII-6.2*.

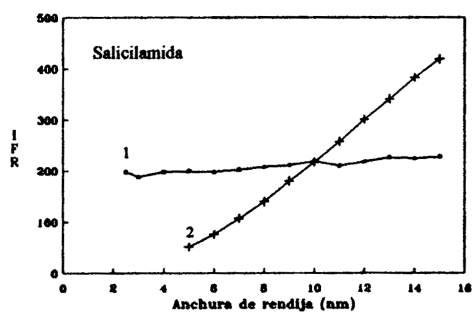


Figura VIII-6.1. Estudio de la influencia de la anchura de rendijas para salicilamida
1) Rend. de excitación 2) Rend. de emisión

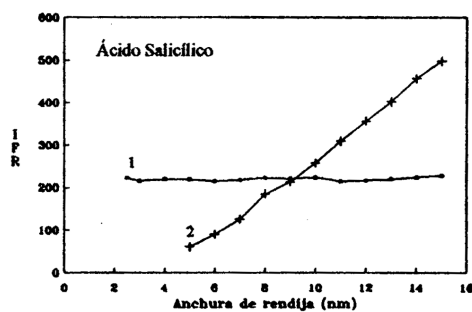


Figura VIII-6.2. Estudio de la influencia de la anchura de rendijas para ác. salicílico
1) Rend. de excitación 2) Rend. de emisión

En las Figuras anteriores se observa que aumentando la anchura de la rendija de excitación, permanece prácticamente constante la intensidad de fluorescencia; mientras que el aumento de la anchura de la rendija de emisión se traduce en un fuerte incremento de la intensidad de fluorescencia.

Fijamos en 5 nm la anchura de la rendija de excitación, con lo que nos aseguramos una baja dispersión de la radiación luminiscente emitida. La rendija de emisión se fijó en 15 nm, por ser para este valor para el que se obtienen los valores más altos de IFR y nos permite trabajar en un amplio rango de concentraciones.

Dado que se comprobó los distintos valores de velocidad de barrido no producen variación en los espectros de emisión, se utilizará una velocidad de 240 nm min⁻¹, valor que el programa usa por defecto.

5.2. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN-DETECCIÓN

5.2.1. Naturaleza del soporte sólido

Para la elección del soporte sólido más adecuado para la retención de salicilamida y ácido salicílico, se ensayaron diferentes tipos de soportes cromatográficos convencionales y cambiadores iónicos con diferentes grupos funcionales: cambiadores aniónicos sobre dextrano (QAE A-25 y DAE A-25), sorbentes no polares (gel de sílice C₁₈), y cambiadores aniónicos sobre

poliestireno (Dowex 1x8). El soporte que produce una mayor retención de los dos analitos es la resina Sephadex QAE A-25, por lo que se elige ésta para el desarrollo del sensor en estudio.

5.2.2. Nivel de la resina en la célula de flujo

Los cambios bruscos de pH en el portador afectan a la compactación del soporte sólido, de modo que debemos asegurarnos de que el haz de luz incida en una zona cubierta totalmente por resina. Se tratará de que la zona de detección se encuentre completa, sin que se introduzca una mayor cantidad de resina a partir de dicha zona, por ser así como se obtiene una mayor respuesta de la señal analítica. Para cantidades mayores de resina, la intensidad de fluorescencia disminuye debido a la dilución del analito en la resina.

5.3. VARIABLES QUÍMICAS

Durante el estudio de las variables químicas se mantuvo el caudal de portador a un valor constante de 1.55 ml min^{-1} .

5.3.1. pH de los portadores y de la muestra

Se estudió la dependencia de la señal analítica de cada uno de los analitos con el pH del portador, utilizando una disolución que contenía $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida y otra de $0.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico. Dado que utilizando como portador únicamente agua bidestilada, ajustada a un determinado valor de pH, la fijación de los analitos era muy fuerte y quedaban retenidos en la primera capa de resina que se extendía por debajo del haz de luz, se procedió a preparar distintas disoluciones con una concentración constante de electrolito (NaCl 0.03M) pero diferentes valores de pH, mediante adición de la cantidad necesaria de HCl ó NaOH 0.1M. La presencia de un electrolito en el portador evita la fuerte retención y permite que los analitos sean retenidos en una zona irradiada de la resina, a la vez que son fácil y rápidamente eluidos por el propio portador. Al inyectar $1000 \mu\text{l}$ de una u otra disolución se registró la señal de emisión a 415 nm , que es la longitud de onda de emisión escogida para la resolución de la mezcla, y excitando a 260 nm . Los resultados obtenidos aparecen representados en la *Figura VIII-7*.

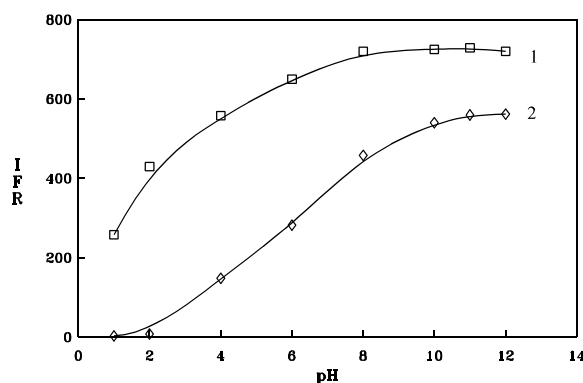


Figura VIII-7. Influencia del pH del portador para ácido salicílico y salicilamida
1) Ácido salicílico 2) Salicilamida

Tanto para el ácido salicílico como para la salicilamida se obtiene una intensidad de fluorescencia máxima para un valor de pH en el rango 10-12, lo que era de esperar dada la estructura de ambos analitos. Por debajo de pH=10 la intensidad de fluorescencia decrece en ambos casos, probablemente, debido a la incompleta desprotonación de los grupos -OH. En cambio, para valores de pH iguales a 2 ó inferiores, la retención se produce únicamente en el caso del ácido salicílico, aunque lógicamente ésta es sólo parcial debido a su valor de pK_a . Esto va a permitir el desarrollo de un sensor para la determinación de mezclas de ambos analitos mediante el uso de dos portadores diferentes (pH=2 y pH=11), dado que a pH=2 sólo se produce la fijación del ácido salicílico y a pH=11 se produce la fijación simultánea de la salicilamida y el ácido salicílico.

Otro estudio llevado a cabo fue dirigido a conocer el efecto del pH de la muestra, para lo cual se prepararon una serie de disoluciones con unas concentraciones 0.1 y 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida y ácido salicílico, respectivamente, con la cantidad adecuada de HCl ó NaOH 0.1M para poder ajustarlas a un determinado valor de pH. Inyectando un volumen de muestra de 1000 μl , se comprobó que trabajando con un portador a pH=2 la muestra debe presentar valores de pH comprendidos entre 1-10 para que no se produzcan diferencias significativas en los valores de intensidad de fluorescencia; mientras que los valores de pH deben estar comprendidos en el rango 3-13 cuando se utiliza un portador a pH=11. De acuerdo con los resultados obtenidos no es

necesario un tamponamiento previo de la muestra, es decir, no es necesario un control estricto de esta variable.

5.3.2. Naturaleza y concentración de los portadores/eluyentes

Puesto que las propias disoluciones portadoras actuaban a su vez como eluyentes, su concentración fue crucial para la determinación. Dado que los valores de pH elegidos para trabajar con la mezcla de analitos, 2 y 11, son valores de pH extremos, y dada la experiencia acumulada anteriormente, se probaron como portadores disoluciones de electrolitos de una determinada concentración ajustadas al valor de pH correspondiente por adición de HCl o NaOH.

En este estudio se hicieron inyecciones de 200 μl de una muestra con una concentración de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida o de una muestra con una concentración de 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico. Se emplearon disoluciones de diferentes sales de concentración 0.1M ajustadas a uno u otro pH (2 ó 11). Los electrolitos utilizados fueron: NaCl, KCl, Na_2CO_3 , HK_2PO_4 , NaNO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. De todos ellos, y al igual que en experiencias anteriores, el NaCl proporcionó los mejores resultados en ambos casos.

En la optimización de la concentración del portador, la muestras utilizadas poseían la misma concentración que las empleadas en el estudio de la naturaleza del portador. Las concentraciones de NaCl que se probaron estaban comprendidas entre 0.01-0.20M. Los resultados obtenidos se muestran en las *Figuras VIII-8.1 y VIII-8.2*.

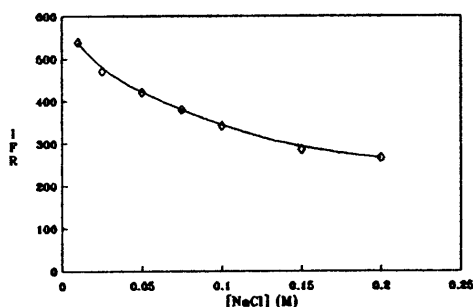


Figura VIII-8.1. Influencia de la concentración del portador/eluyente en la señal de salicilamida (pH=11)

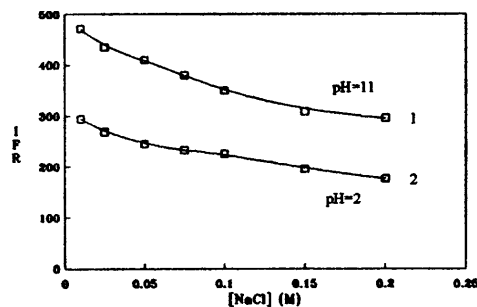


Figura VIII-8.2. Influencia de la concentración del portador/eluyente en la señal de ácido salicílico (pH 2 y 11)

Como puede apreciarse, el incremento de la concentración del portador hace en ambos casos disminuir la IFR, pues al tratarse de una señal analítica que se obtiene por fijación transitoria del analito mediante intercambio iónico en la resina, a mayor concentración de portador mayor competencia de los iones del mismo por los sitios activos del soporte sólido. Por otra parte, la eficiencia de elución crecía con concentraciones crecientes del electrolito. Por ello, adoptamos como concentración óptima un portador con una concentración de NaCl 0.05M para pH=11, y 0.025M para pH=2, ya que para estas concentraciones disminuye apreciablemente el tiempo de elución sin que se produzca una disminución muy significativa en la IFR. Esto permite mayor frecuencia de muestreo y alarga la vida del sensor.

5.3.3. Temperatura

Para estudiar la influencia de esta variable se inyectaron, utilizando el portador NaCl 0.05M pH=11, disoluciones de salicilamida y ácido salicílico (1000 μ l) de concentraciones 0.1 y 0.2 μ g ml⁻¹, respectivamente, y se registraron los valores de IFR al realizar un incremento de t^a , en un principio, y posteriormente un descenso de t^a (Figura VIII-9).

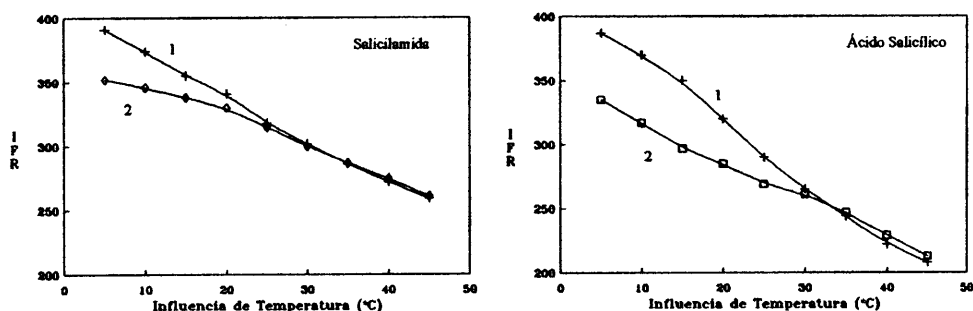


Figura VIII-9. Influencia de la t^a en la intensidad de fluorescencia

1) Descenso de t^a 2) Incremento de t^a

Como puede observarse en ambas Figuras, la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura. Se comprueba además, en ambos casos, que no se obtienen los mismos valores de intensidad de fluorescencia al enfriar el sistema previamente calentado, lo que indica que se trata de un sistema irreversible. La dependencia de la señal analítica con la temperatura nos obliga a fijar su valor. Se ha elegido como temperatura de trabajo 20.0 ± 0.5 °C, próxima a la ambiental y fácil de conseguir mediante el empleo de un simple termostato.

5.4. VARIABLES FIA

La influencia de las variables FIA se estudió manteniendo constante el diámetro interno de los tubos de la bomba así como las variables químicas en los valores anteriormente optimizados.

5.4.1. Caudal

Se procedió al estudio de la influencia del caudal de la disolución de portador, variando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Para ello, se inyectaron alternativamente 200 μ l de disolución de salicilamida o ácido salicílico, con concentraciones de 1 y 2 μ g ml^{-1} , respectivamente, y se hizo circular como portador la disolución de NaCl 0.05M pH=11 (con la que ambos

analitos son retenidos) a distintas velocidades, registrando la señal obtenida en cada caso para cada uno de los analitos. Los resultados se representan en las Figuras VIII-10.1 y VIII-10.2.

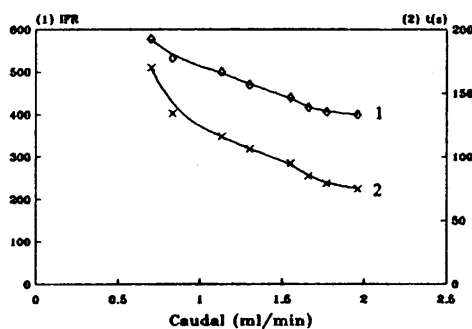


Figura VIII-10.1. Influencia del caudal para salicilamida
(1) IFR (2) tiempo de anchura de pico

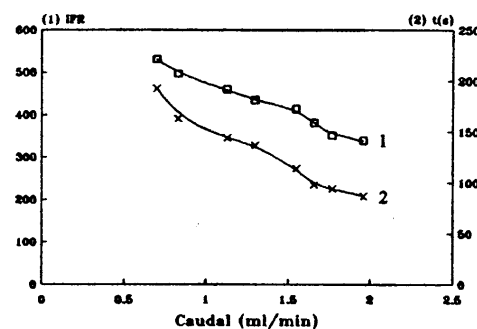


Figura VIII-10.2. Influencia del caudal para ácido salicílico
(1) IFR (2) tiempo de anchura de pico

Trabajar con un caudal muy bajo lleva consigo tiempos de residencia largos, disminuyendo por tanto la frecuencia de muestreo, aunque en contrapartida los valores de intensidad de fluorescencia son más elevados. Habrá que escoger una solución de compromiso teniendo en cuenta ambas características, estimándose ésta en 1.55 ml min^{-1} .

5.4.2. Volumen de inyección

La dependencia de la señal analítica con el volumen de muestra, para cada uno de los analitos, fue estudiada mediante la conexión a la válvula de inyección de diferentes bucles de muestra de volúmenes variables, observándose cómo se afectaba la intensidad de fluorescencia (para una concentración constante de analito). Las Figuras VIII-11.1 y VIII-11.2 muestran el efecto de esta variable para una concentración de 0.20 y $0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico y salicilamida, respectivamente, utilizando como portador NaCl 0.05M a $\text{Ph}=11$.

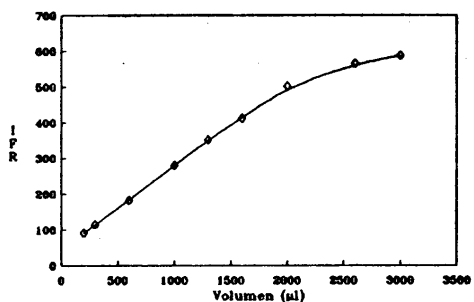


Figura VIII-11.1. *Influencia del volumen de muestra para salicilamida*

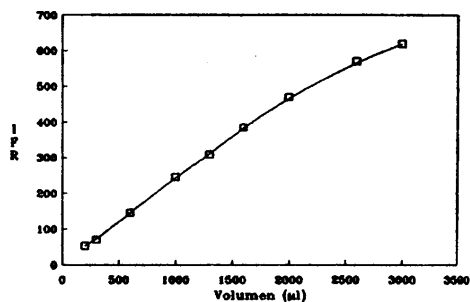


Figura VIII-11.2. *Influencia del volumen de muestra para ácido salicílico*

Para la salicilamida así como para el ácido salicílico se encuentra una linealidad de la señal analítica respecto del volumen de muestra hasta un valor aproximado de éste de 2000 µl. Por encima de este valor la señal deja de ser lineal en ambos sistemas, como era de esperar, a la vista de lo discutido en capítulos anteriores.

Como volumen de trabajo se ha seleccionado 1000 µl, ya que ofrece una sensibilidad elevada y simultáneamente permite una frecuencia de muestreo relativamente alta.

5.5. RESUMEN DE LAS CONDICIONES SELECCIONADAS

A continuación se enumeran cuales son las condiciones óptimas, incluidas las variables químicas y FIA, del sensor desarrollado en este capítulo.

	<i>Ácido salicílico-Salicilamida</i>	
$\lambda_{excitación} (nm)$	260	
$\lambda_{emisión} (nm)$	415	
<i>Soporte sólido</i>	Sephadex QAE A-25	
<i>Caudal (ml min⁻¹)</i>	1.55	
<i>Volumen de muestra (μl)</i>	1000	
	pH=2	pH=11
<i>Portador/eluyente</i>	NaCl 0.025M	NaCl 0.05M
<i>pH de la muestra</i>	1-10	3-13

6. CALIBRACIÓN DEL SENSOR. PARÁMETROS ANALÍTICOS

Una vez realizada la calibración para cada uno de los analitos, se calculan los parámetros de fiabilidad de cada uno de ellos. Las variables químicas y FIA se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados.

6.1. Metodología y calibración del sensor

Tal y como se ha ido describiendo, se van a utilizar dos disoluciones portador/eluyente en el sensor, siendo necesario por tanto una doble inyección de muestra para la resolución de la mezcla. Trabajando con la disolución portadora NaCl 0.025M a pH=2, se produce únicamente la fijación del ácido salicílico, obteniendo del espectrofluorímetro un valor de intensidad de fluorescencia IFR_i. Una vez se haya eluído el analito retenido en el soporte sólido, giramos la válvula

de selección de la configuración FIA para que sea la disolución portadora de NaCl 0.05M a pH=11 la que ponga la muestra en contacto con la microzona activa (una segunda inyección). Con esta nueva inyección obtenemos un valor de intensidad de fluorescencia IFR_{II} que corresponde a la fluorescencia de la salicilamida y del ácido salicílico (IFR_{ACS'}), dado que a pH=11 se produce la fijación de ambos analitos (salicilamida y ácido salicílico) existiendo aditividad en los valores de intensidad de fluorescencia de los dos analitos. Por consiguiente, de las dos inyecciones de muestra se obtienen del transductor dos valores de intensidad de fluorescencia, IFR_I e IFR_{II}, verificándose que:

$$\begin{aligned} \text{IFR}_I &= \text{IFR}_{\text{ACS}} \\ \text{IFR}_{II} &= \text{IFR}_{\text{ACS}'} + \text{IFR}_{\text{Sal}} \end{aligned} \quad (1)$$

Una vez realizada la calibración de cada analito, mediante ajuste por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes ecuaciones de las rectas, que aparecen representadas en la *Figura VIII-12*.

Ácido Salicílico

pH=2	IFR	$_{\text{ACS}} = 28.15 + 693.84 c$	r=0.9997
pH=11	IFR	$_{\text{ACS}'} = 36.79 + 1155.34 c$	r=0.9996

Salicilamida

pH=11	IFR	$_{\text{Sal}} = 36.31 + 2613.95 c$	r=0.9994
-------	-----	-------------------------------------	----------

donde :

- IFR: intensidad de fluorescencia relativa
- c: concentración de analito ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
- r: coeficiente de correlación

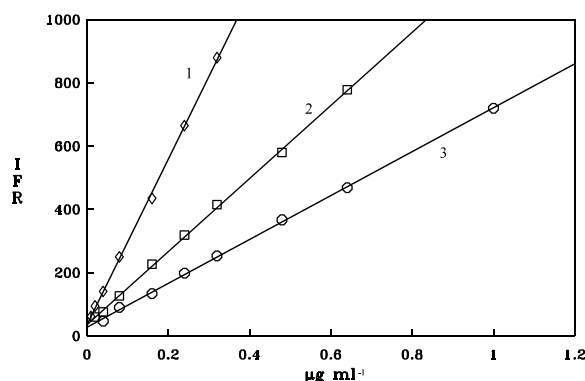


Figura VIII-12. Calibración salicilamida-ácido salicílico

- 1) Salicilamida pH=11 2) Ác. Salicílico pH=11
 3) Ác. Salicílico pH=2

La concentración de ácido salicílico se determina directamente a partir de la intensidad de fluorescencia obtenida en la fijación de ésta a pH=2, es decir, a partir de IFR_I . Esta concentración se puede interpolar en la recta de calibrado que corresponde al proceso de retención del ácido salicílico a pH=11, obteniendo así $IFR_{ACS'}$, que sería su fluorescencia para este valor de pH. Una vez conocido este valor de intensidad de fluorescencia, y haciendo uso de la ecuación (1), podemos conocer la intensidad de fluorescencia de la salicilamida.

$$IFR_{II} = IFR_{ACS'} + IFR_{Sal}$$

$$IFR_{Sal} = IFR_{II} - IFR_{ACS'}$$

Conocida la intensidad de fluorescencia de la salicilamida IFR_{Sal} es posible hallar su concentración a partir de su recta de calibración.

En bibliografía son escasos los trabajos encontrados donde se permite la determinación secuencial de dos ó más analitos mediante un sensor en flujo fluorimétrico en fase sólida. Se consigue un incremento en la sensibilidad del orden de 15 veces superior (para un volumen de inyección de 1000 µl) respecto a espectrofluorimetría convencional en disolución. No hay que olvidarse que el sensor responde también individualmente a cada uno de los analitos.

6.2. Parámetros analíticos

En la *Tabla VIII-1* se muestran los parámetros analíticos del sensor.

Tabla VIII-1. *Parámetros analíticos para salicilamida-ácido salicílico*

Parámetro	Ácido Salicílico		Salicilamida
	pH=2	pH=11	pH=11
<i>Línea de calibrado</i>			
<i>Ordenada en el origen (u. a.)</i>	28.15	36.79	36.31
<i>Pendiente (ml µg⁻¹)</i>	693.84	1155.34	2613.95
<i>Rango lineal (µg ml⁻¹)</i>	0.04-1.0	0.02-0.64	0.01-0.32
<i>Coefficiente de correlación (r)</i>	0.9997	0.9996	0.9994
<i>Límite de detección (ng ml⁻¹)</i>	4.46	2.04	0.90
<i>Límite de cuantificación (ng ml⁻¹)</i>	14.88	6.82	3.01
<i>RSD % (n=10)</i>	0.94	0.86	1.13
<i>Frecuencia de muestreo (h⁻¹)</i>	45	28	35

La vida media del sensor se estimó en más de 175 inyecciones de muestra. Los resultados obtenidos en el estudio de la reproducibilidad y los límites de detección y cuantificación de los dos analitos a sus valores de pH correspondientes, se recogen en las *Tablas VIII-2.1 - VIII-2.3, VIII-3.1 - VIII-3.3 y VIII-4.1 - VIII-4.3 del Apéndice*.

7. INTERFERENCIAS

Con objeto de investigar la selectividad del sensor fluorimétrico biparámetro propuesto, estudiamos el efecto que la presencia de otras especies (que aparecen acompañando a los analitos en estudio en los preparados farmacéuticos) ejerce en la determinación del ácido salicílico (a los dos valores de pH a los que se realiza su determinación) y salicilamida fijados en la resina Sephadex QAE A-25. Como criterio para decidir si la sustancia es o no

interferente hemos seguido el descrito en capítulos anteriores.

Utilizando un volumen de inyección de muestra de 1000 μl , se trabaja con disoluciones que para cada especie extraña contienen 0.5 mg ml^{-1} de ácido salicílico y 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida. Los límites de tolerancia de ambos analitos para las diferentes especies ensayadas aparecen en la *Tabla VIII-5*.

Tabla VIII-5. *Tolerancia del sensor propuesto a especies interferentes*
(determinación de 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido salicílico y 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de salicilamida)

Especies extrañas	Tolerancia [interferente]/[analito] (mg ml^{-1})		
	Ácido Salicílico		Salicilamida
	pH=11	pH=2	pH=11
Almidón, Sulfato de Zn y Cu, Ácido láctico, Sacarosa, Glucosa, Lactosa	>100 ^a	>100 ^a	>100 ^a
Dipiridamol	5	5	5
Cafeína	80	80	50
Sacarina	20	20	5
Codeína	80	80	80
Paracetamol	<0.5	10	<0.5
Resorcina	<0.5	5	<0.5

^aMáxima relación interferente/analito ensayada

Es necesario resaltar que la tolerancia a la presencia de codeína, cafeína y dipiridamol (muy serios interferentes en espectrofluorimetría convencional) es muy alta, permitiendo de este modo la determinación de salicilamida y ácido salicílico en presencia de cantidades de estos compuestos muy superiores a las encontradas en medicamentos. La interferencia más seria es del paracetamol y resorcina a pH=11, puesto que ambos se fijan sobre la resina a este valor de pH. Esta interferencia puede ser evitada en la determinación de ácido salicílico trabajando a pH=2 ya que a este valor de pH no pueden ser retenidos en la resina aniónica, mientras que sí lo son a pH=11 debido a su desprotonación. Así pues, el sensor para ácido salicílico es más selectivo, aunque menos sensible, a pH=2 que a pH básico.

8. APLICACIONES ANALÍTICAS

El sensor propuesto ha sido aplicado a la determinación de la mezcla salicilamida-ácido salicílico en:

preparaciones farmacéuticas

mezclas sintéticas

Asimismo se ha aplicado a la determinación de cada uno de los analitos en fármacos que contienen a sólo uno de ellos.

8.1.1. Preparación de las muestras

Todos los fármacos analizados fueron disueltos previamente en 5 ml de etanol, para posteriormente adicionar aproximadamente unos 50 ml de agua bidestilada y depositarlos en un baño ultrasonidos durante 10 minutos. El etanol facilita la disolución de la salicilamida y el ácido salicílico, cuya solubilidad es baja.

Como ya se ha indicado anteriormente, el sensor también puede ser aplicado a la determinación de ácido acetil salicílico, previa hidrólisis de éste a ácido salicílico. Para llevar a cabo la hidrólisis, el fármaco se disuelve en 50 ml de NaOH 2M en caliente (100 °C, aproximadamente) durante 5 minutos.

Por último, en todos los casos, el excipiente insoluble se separó por filtración a través de filtro Millipore de 0.45 µm, llevándose a un volumen final de 100 ml. Todas las disoluciones fueron diluídas adecuadamente antes de ser inyectadas en la corriente del portador. En ningún caso se comprobó la existencia de efecto matriz, de forma que se aplicó directamente el método de calibración directa.

8.1.2. Determinación de ácido salicílico-salicilamida

8.1.2.1. En preparaciones farmacéuticas

La composición de los preparados farmacéuticos analizados es la siguiente:

1. "Coricidin" (Lab. Schering-Plough), cápsulas
 - Ácido ascórbico: 50 mg
 - Cafeína: 30 g
 - Clorfenamina, maleato: 4 mg
 - Salicilamida: 190 mg
 - Excipientes: almidón y otros c.s. 177.47 mg

2. "Percutalin" (Lab. Berenguer-Infale), ampollas
 - Dexametasona: 1 mg
 - Salicilamida: 170 mg
 - Salicilato de etilenglicol: 200 mg
 - Nicotinato de metilo: 10 mg
 - Excipientes: glicerina y etanol c.s.

3. "Hubergrip" (Lab. ICN Hubber), comprimidos
 - Salicilamida: 300 mg
 - Clorfenamina, maleato: 2 mg
 - Propifenazona: 250 mg
 - Cafeína: 25 mg
 - Almidón de trigo: 76 mg

4. "Acnosan" (Lab. R. Bescansa), loción
 - Alcanfor: 12.80 g
 - Ácido Undecilénico: 8.75 g
 - Ácido Bórico: 6.45 g
 - Resorcina: 1.94 g
 - Ácido Salicílico: 1.20 g
 - Sulfato de Zn: 0.13 g
 - Sulfato de Cu: 0.13 g
 - Vehículo aromático

5. "Callicida Gras" (Lab. Quimifar), solución
 - Ácido salicílico: 250 mg
 - Etanol: 365 mg

6. "Verufil" (Lab. Stiefel), solución
 - Ácido láctico: 167 mg

- Ácido salicílico: 167 mg

- 7. “Asasantin” (Lab. Boehringer Ingelheim), cápsulas
 - Dipiridamol: 75 mg
 - Ácido acetyl salicílico: 50 mg
 - Sacarosa: 4.2 mg
 - Lactosa y otros excipientes

- 8. “Tromalyt 300” (Lab. Madaus), cápsulas
 - Ácido acetyl salicílico: 300 mg
 - Sacarosa: 23 mg

- 9. “Actrón Compuesto” (Lab. Bayer), comprimidos efervescentes
 - Ácido acetyl salicílico: 267 mg
 - Paracetamol: 133 mg
 - Cafeína: 40 mg

- 10. “Doloana” (Lab. Quimifar), comprimidos
 - Ácido acetyl salicílico: 350 mg
 - Salicilamida: 300 mg

Los resultados obtenidos para la composición de uno de los analitos ó ambos simultáneamente, en cada medicamento analizado, se muestran en la *Tabla VIII-6*, llevándose a cabo un estudio de recuperación a varios niveles de concentración, para chequear así la exactitud el método. En todos los casos, los resultados obtenidos son satisfactorios.

Sensor biparámetro para ácido salicílico-salicilamida

Tabla VIII-6. *Determinación de salicilamida y ácido salicílico (o acetil salicílico) en preparaciones farmacéuticas^a*

Muestra	Composición/mg			Recuperación			
	SAL	AS	AAS	SAL		AS	
				Añadido (µg ml ⁻¹)	Recup. ± σ (%) ^b	Añadido (µg ml ⁻¹)	Recup. ± σ (%) ^b
Coricidin	190 ^c	--	--	--	98.9 ± 1.1	--	--
				0.1	99.0 ± 1.2	0.2	99.5 ± 1.0
				0.2	100.2 ± 0.9	0.3	100.2 ± 0.9
Percutalín	170 ^c	--	--	--	97.4 ± 1.6	--	--
				0.1	98.5 ± 1.5	0.2	98.6 ± 1.1
				0.2	98.6 ± 1.2	0.3	99.4 ± 1.0
Hubergrip	300 ^c	--	--	--	99.6 ± 0.9	--	--
				0.1	99.8 ± 1.1	0.2 ^d	100.2 ± 1.1
				0.2	100.0 ± 1.1	0.3 ^d	100.1 ± 0.9
Acnosán	--	1.2 ^c	--	--	--	--	99.4 ± 0.6
				0.1	100.1 ± 0.9	0.2	99.4 ± 0.8
				0.2	99.9 ± 0.9	0.3	99.3 ± 1.2
Callicida Gras	--	250 ^f	--	--	--	--	99.7 ± 0.8
				0.1	99.9 ± 0.8	0.2	99.8 ± 1.0
				0.2	100.2 ± 0.9	0.3	99.8 ± 0.9
Verufil	--	167 ^c	--	--	--	--	100.2 ± 0.8
				0.1	97.9 ± 1.1	0.2	99.9 ± 1.0
				0.2	98.6 ± 1.0	0.3	99.8 ± 1.0
Asasantin	--	--	50 ^c	--	--	--	98.4 ± 1.2
				0.1	100.1 ± 0.8	0.2	99.0 ± 1.1
				0.2	99.7 ± 1.0	0.3	98.7 ± 1.2
Tromalyt 300	--	--	300 ^c	--	--	--	97.3 ± 0.7
				0.1	99.8 ± 1.1	0.2 ^d	98.0 ± 0.8
				0.2	99.9 ± 1.2	0.3 ^d	97.9 ± 1.2
Actrón compuesto	--	--	267 ^c	--	--	--	101.4 ± 1.9
				0.1	100.5 ± 1.3	0.2 ^d	100.4 ± 1.2
				0.2	99.9 ± 1.2	0.3 ^d	99.9 ± 1.0
Doloana	300 ^c	--	350 ^c	--	101.5 ± 1.1	--	98.3 ± 2.3
				0.1	100.0 ± 0.9	0.2 ^d	99.1 ± 1.1
				0.2	99.9 ± 1.0	0.3 ^d	100.1 ± 1.0

^a SAL=Salicilamida; AS=Ácido salicílico; AAS=Ácido acetil salicílico; ^b Media de tres determinaciones; ^c mg/comprimido; ^d añadido como ácido acetil salicílico; ^e mg ml⁻¹; ^f mg g⁻¹

8.1.2.2. *En mezclas sintéticas*

El sensor espectrofluorimétrico de flujo también fue aplicado a la determinación de ambos analitos en diversas mezclas sintéticas preparadas a partir de las disoluciones patrón iniciales. Estas mezclas se encontraban en unas relaciones de salicilamida-ácido salicílico comprendidas entre 1:10 y 5:1, respectivamente; tal y como muestra la *Tabla VIII-7*, las recuperaciones obtenidas se encuentran entre el 99 y 101% para los dos analitos.

Tabla VIII-7. *Determinación simultánea de salicilamida y ácido salicílico en mezclas sintéticas*

Composición de la mezcla (ng ml ⁻¹)		^a Recuperación (%)	
Salicilamida	Ácido Salicílico	Salicilamida	Ácido Salicílico
50	500	100.2 ± 0.8	99.8 ± 0.3
250	250	100.2 ± 0.6	100 ± 1
100	400	101.2 ± 0.9	99.2 ± 0.8
100	30	99 ± 1	99.7 ± 0.5
20	150	99.6 ± 0.5	101 ± 2
300	60	98.9 ± 0.8	100.5 ± 0.6

^aMedia de tres determinaciones

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Neumayr, O. Friedrich, G. Sontag, F. Pittner, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993) 469.
- [2] L. J. Walter, D. F. Biggs, R. T. Coutts, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 1754.
- [3] S. L. Ali, *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 651.
- [4] R. G. Baum, F. F. Cantwell, *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 1066.
- [5] J. C. Morrison, J. M. Orr, *J. Pharm. Sci.*, 55 (1966) 936.
- [6] F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker, *J. Chromatogr. B*, 677 (1996) 172.
- [7] S. K. Bakar, S. Niazi, *J. Pharm. Sci.*, 72 (1983) 1020.
- [8] A. Villari, N. Micali, M. Fresta, G. Puglisi, *J. Pharm. Sci.*, 81 (1992) 895.
- [9] R. M. Fielding, J. A. Waschek, G. M. Rubin, S. M. Pond, T. N. Tozer, *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 1221.
- [10] X. Xu, K. S. Pang, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 64 (1987) 313.
- [11] P. Trinder, *Biochem. J.*, 57 (1954) 301.
- [12] U. Saha, K. Baksi, *Analyst*, 110 (1985) 739.
- [13] A. A. El Kheir, S. Belal, M. El Sadek, A. El Shanwani, *Analyst*, 111 (1986) 319.
- [14] A. M. de la Pena, F. Salinas, I. D. Meràs, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2493.
- [15] M. Kleinerman, *Anal. Lett.*, 10 (1977) 205.
- [16] C. I. Miles, G. H. Schenk, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 656.
- [17] A. Villari, N. Micali, M. Fresta, G. Puglisi, *Analyst*, 119 (1994) 1561.
- [18] K.W. Street jun., G. H. Schenk, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 641.



CONCLUSIONES GENERALES



La idea que ha presidido la presenta Memoria ha sido desarrollar nuevos métodos de análisis por inyección en flujo continuo no segmentado con detección espectroscópica en fase sólida, basados en la medida de una propiedad intrínseca del(os) analito(s) (absorción o emisión molecular), sin necesidad de reacción derivadora, por fijación del(os) mismo(s) sobre un soporte sólido (resina de intercambio iónico o gel de sílice C₁₈) en la zona de detección.

La regeneración del soporte sólido se ha llevado a cabo, generalmente, mediante el propio portador (convenientemente seleccionado) cuando la fase sólida es una resina intercambiadora de iones, o con un disolvente orgánico cuando se trata de gel de sílice C₁₈. Se ha pretendido, pues, desarrollar nuevos sensores espectroscópicos en flujo continuo con detección fotométrica o fluorimétrica que respondan, en cada caso, a uno, dos e incluso tres analitos. Todos los sensores poseen una alta frecuencia de muestro y un costo económico reducido.

Como consecuencia del estudio realizado, se han obtenido las siguientes conclusiones generales:

1. Se han desarrollado sensores monoparámetro en flujo que permiten la determinación rápida y directa de especies farmacológicas que tienen un amplio uso comercial: ácido ascórbico, minoxidil, ácido salicílico, amoxicilina, epinefrina (con detección espectrofotométrica UV), y piridoxina (con detección espectrofluorimétrica), siendo aplicables al control de calidad de estos principios activos en preparados farmacéuticos. Asimismo, se puede determinar indirectamente ácido acetyl salicílico como ácido salicílico, previa hidrólisis alcalina del primero.
2. Los sensores biparámetro propuestos, usando dos disoluciones portadoras diferentes convenientemente seleccionadas, nos han permitido la resolución secuencial en modo automático de mezclas de analitos que aparecen frecuentemente combinados en productos farmacéuticos: salicilamida-paracetamol y ácido ascórbico-paracetamol (ambos con detección espectrofotométrica UV); y salicilamida-ácido (acetyl)salicílico (con detección espectrofluorimétrica). Constituyen los primeros sensores en flujo continuo con detección espectroscópica en fase sólida que operan de esta forma.

Conclusiones

3. El empleo de una resina intercambiadora de iones como soporte sólido en la misma zona de detección proporciona, en todos los casos: a) un gran incremento en la sensibilidad; y b) una considerable exaltación de la selectividad con respecto al método convencional en disolución, como consecuencia de la retención selectiva y preconcentración del analito en la zona de detección.
4. Se ha estudiado el efecto de las variables experimentales que afectan a la respuesta de los sensores y se han optimizado los valores de las mismas. Dichas variables se han dividido en cuatro categorías: variables instrumentales (sólo para sensores espectrofluorimétricos), variables de la unidad de retención-detección, variables químicas y variables del sistema de flujo continuo.
5. Una característica común de los sensores desarrollados es la dependencia de su sensibilidad con el volumen de muestra inyectado. Por ello, su calibración para diferentes volúmenes de muestra permite la determinación de los analitos dentro de un amplio margen de concentraciones. Por tanto, dentro de este margen, el sensor se puede adaptar a la concentración del analito en la muestra escogiendo un bucle de volumen adecuado para la inyección.
6. El estudio de las interferencias originadas por un elevado número de especies que normalmente acompañan a cada analito en los preparados farmacéuticos indica que los sensores propuestos, en todos los casos, muestran una elevada selectividad a estas especies extrañas, como consecuencia del empleo de un soporte sólido que permite la retención selectiva del(os) analito(s) de interés.
7. Se ha demostrado la aplicabilidad de todos los sensores desarrollados al análisis de productos farmacéuticos comercializados. La exactitud se chequeó mediante estudios de recuperación. En el caso del sensor del ácido ascórbico se utilizó un método de referencia.
8. Finalmente, se ha desarrollado un multisensor que nos ha permitido la determinación espectrofotométrica UV simultánea de cafeína, paracetamol y ácido acetil salicílico, mediante la aplicación del método de calibración multivariante de regresión por mínimos cuadrados parciales, empleando un detector de diodos en fila. Ha sido aplicado con éxito a la determinación de estos analitos en mezclas sintéticas y en preparaciones farmacéuticas, en las que aparecen combinaciones binarias y ternarias de los citados analitos.



APÉNDICE



Tabla II-3.1. *Reproducibilidad del sensor de ácido ascórbico*
 [Ácido ascórbico]=15 µg ml⁻¹ (300 µl); 5 µg ml⁻¹ (600 µl); 4 µg ml⁻¹ (1000 µl)

Det.	300 µl		600 µl		1000 µl	
	A	[Ác. Ascórb.] _{enc} (µg ml ⁻¹)	A	[Ác. Ascórb.] _{enc} (µg ml ⁻¹)	A	[Ác. Ascórb.] _{enc} (µg ml ⁻¹)
1	0.853	15.02	0.570	4.88	0.769	4.04
2	0.845	14.88	0.562	4.81	0.760	3.99
3	0.840	14.79	0.579	4.95	0.750	3.94
4	0.835	14.70	0.568	4.86	0.761	4.00
5	0.842	14.82	0.569	4.87	0.752	3.95
6	0.837	14.73	0.567	4.85	0.765	4.02
7	0.840	14.79	0.570	4.88	0.762	4.01
8	0.851	14.98	0.582	4.98	0.770	4.05
9	0.841	14.80	0.569	4.87	0.758	3.98
10	0.857	15.09	0.579	4.95	0.758	3.98

Tabla II-3.2. *Parámetros analíticos del sensor de ácido ascórbico*

Parámetro	300 µl	600 µl	1000 µl
\bar{x}	14.86	4.89	3.99
σ	0.129	0.053	0.035
σ^2	0.016	0.003	0.001
σ_m	0.041	0.017	0.011
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	14.9 ± 0.3	4.9 ± 0.1	3.99 ± 0.08
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	14.86 ± 0.09	4.89 ± 0.04	3.99 ± 0.02
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.87	1.08	0.90
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.62	0.78	0.62

Tabla II-4.1. *Reproducibilidad del sensor de minoxidil*
 [Minoxidil]=5 µg ml⁻¹ (600 µl); 2 µg ml⁻¹ (1000 µl); 0.2 µg ml⁻¹ (2000 µl)

Det.	600 µl		1000 µl		2000 µl	
	A	[Minoxidil] _{enc} (µg ml ⁻¹)	A	[Minoxidil] _{enc} (µg ml ⁻¹)	A	[Minoxidil] _{enc} (µg ml ⁻¹)
1	0.740	4.97	0.502	2.07	0.100	0.20
2	0.743	5.00	0.508	2.10	0.100	0.20
3	0.750	5.04	0.505	2.09	0.098	0.19
4	0.752	5.06	0.493	2.03	0.099	0.20
5	0.748	5.03	0.495	2.04	0.095	0.19
6	0.745	5.01	0.499	2.06	0.103	0.21
7	0.746	5.02	0.506	2.09	0.104	0.21
8	0.748	5.03	0.506	2.09	0.099	0.20
9	0.745	5.01	0.498	2.06	0.102	0.21
10	0.753	5.06	0.500	2.07	0.102	0.21

Tabla II-4.2. *Parámetros analíticos del sensor de minoxidil*

Parámetro	600 µl	1000 µl	2000 µl
\bar{x}	5.03	2.07	0.20
σ	2.60×10^{-3}	2.19×10^{-2}	5.31×10^{-3}
σ^2	6.76×10^{-4}	4.79×10^{-4}	2.81×10^{-5}
σ_m	8.36×10^{-3}	6.92×10^{-3}	1.68×10^{-3}
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	5.03 ± 0.06	2.07 ± 0.05	0.20 ± 0.01
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	5.03 ± 0.02	2.07 ± 0.02	0.200 ± 0.004
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.52	1.06	2.63
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.38	0.75	1.87

Tabla II-5.1. *Reproducibilidad del sensor de ácido salicílico*
 [Ácido salicílico]=30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (300 μl); 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (600 μl); 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1000 μl)

Det.	300 μl		600 μl		1000 μl	
	A	[Ác. Salicil.] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Ác. Salicil.] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Ác. Salicil.] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.687	30.15	0.728	20.01	0.580	10.52
2	0.690	30.29	0.729	20.03	0.576	10.44
3	0.692	30.38	0.732	20.12	0.574	10.40
4	0.690	30.29	0.725	19.92	0.575	10.42
5	0.688	30.20	0.730	20.06	0.575	10.42
6	0.695	30.51	0.730	20.06	0.574	10.40
7	0.687	30.15	0.728	20.01	0.573	10.38
8	0.688	30.20	0.737	20.26	0.570	10.32
9	0.687	30.15	0.729	20.03	0.573	10.38
10	0.689	30.24	0.726	19.95	0.571	10.34

Tabla II-5.2. *Parámetros analíticos del sensor de ácido salicílico*

Parámetro	300 μl	600 μl	1000 μl
\bar{x}	30.26	20.05	10.40
σ	0.117	0.096	0.053
σ^2	0.014	0.009	0.003
σ_m	0.037	0.030	0.017
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	30.3 \pm 0.3	20.0 \pm 0.2	10.4 \pm 0.1
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	30.26 \pm 0.08	20.05 \pm 0.07	10.40 \pm 0.04
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.38	0.47	0.52
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.27	0.34	0.37

Tabla II-3.3. Límites de detección y cuantificación de ácido ascórbico

Nº Blanco	A (300 µl)	A (600 µl)	A (100 µl)
1	0.005	0.007	0.008
2	0.005	0.009	0.008
3	0.006	0.008	0.010
4	0.005	0.008	0.009
5	0.006	0.008	0.009
6	0.004	0.007	0.010
7	0.006	0.009	0.008
8	0.005	0.010	0.010
9	0.004	0.008	0.010
10	0.005	0.010	0.011
\bar{x}	0.005	0.008	0.009
σ	$7.40 \cdot 10^{-4}$	$1.70 \cdot 10^{-3}$	$1.06 \cdot 10^{-3}$
$c_L=3\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.04	0.03	0.02
$c_Q=10\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.13	0.10	0.06

Tabla II-4.3. Límites de detección y cuantificación de minoxidil

Nº Blanco	A (600 µl)	A (1000 µl)	A (2000 µl)
1	-0.039	-0.038	-0.037
2	-0.040	-0.034	-0.038
3	-0.036	-0.036	-0.035
4	-0.038	-0.035	-0.037
5	-0.035	-0.037	-0.037
6	-0.036	-0.036	-0.036
7	-0.030	-0.035	-0.038
8	-0.035	-0.030	-0.037
9	-0.037	-0.036	-0.035
10	-0.039	-0.038	-0.036
\bar{x}	-0.036	-0.036	-0.037
σ	$2.87 \cdot 10^{-3}$	$2.50 \cdot 10^{-3}$	$1.07 \cdot 10^{-3}$
$c_L=3\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.06	0.03	0.01
$c_Q=10\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.20	0.11	0.02

Tabla II-5.3. Límites de detección y cuantificación de ácido salicílico

Nº Blanco	A (300 µl)	A (600 µl)	A (100 µl)
1	-0.042	-0.053	-0.050
2	-0.044	-0.051	-0.052
3	-0.043	-0.052	-0.051
4	-0.044	-0.052	-0.051
5	-0.043	-0.051	-0.050
6	-0.043	-0.050	-0.052
7	-0.042	-0.053	-0.051
8	-0.043	-0.051	-0.053
9	-0.044	-0.051	-0.052
10	-0.041	-0.052	-0.053
\bar{x}	-0.043	-0.052	-0.051
σ	$9.94 \cdot 10^{-4}$	$9.66 \cdot 10^{-4}$	$1.08 \cdot 10^{-3}$
$c_L=3\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.13	0.08	0.06
$c_Q=10\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.45	0.27	0.21

Tabla III-3.1. Reproducibilidad del sensor de amoxicilina
 [Amoxicilina]=30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (300 µl); 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (600 µl); 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1200 µl)

Det.	300 µl		600 µl		1200 µl	
	A	[Amoxicilina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Amoxicilina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Amoxicilina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.630	29.98	0.420	9.98	0.715	10.17
2	0.633	30.12	0.423	10.05	0.718	10.21
3	0.638	30.37	0.418	9.93	0.720	10.24
4	0.633	30.12	0.528	10.17	0.706	10.03
5	0.640	30.47	0.415	9.85	0.725	10.32
6	0.628	29.88	0.421	10.00	0.720	10.24
7	0.635	30.22	0.421	10.00	0.703	9.99
8	0.635	30.22	0.418	9.93	0.715	10.17
9	0.642	30.57	0.419	9.95	0.714	10.15
10	0.625	29.72	0.427	10.15	0.710	10.09

Tabla III-3.2. *Parámetros analíticos del sensor de amoxicilina*

Parámetro	300 μ l	600 μ l	1200 μ l
\bar{x}	30.17	10.00	10.15
σ	0.262	0.101	0.100
σ^2	0.069	0.010	0.010
σ_m	0.083	0.032	0.032
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	30.2 \pm 0.6	10.0 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	30.2 \pm 0.2	10.00 \pm 0.07	10.15 \pm 0.07
C.V.(%)=(σ/\bar{x}) \cdot 100	0.87	1.01	0.99
E_r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$) \cdot 100	0.62	0.72	0.71

Tabla III-3.3. *Límites de detección y cuantificación de amoxicilina*

Nº Blanco	A (300 μ l)	A (600 μ l)	A (1200 μ l)
1	0.020	0.030	0.042
2	0.018	0.032	0.040
3	0.019	0.029	0.042
4	0.018	0.027	0.038
5	0.015	0.027	0.045
6	0.020	0.028	0.036
7	0.019	0.029	0.038
8	0.018	0.031	0.040
9	0.017	0.025	0.041
10	0.019	0.028	0.042
\bar{x}	0.018	0.029	0.040
σ	1.49 x 10 ⁻³	2.06 x 10 ⁻³	2.59 x 10 ⁻³
$c_L=3\sigma/m$ (μ g ml ⁻¹)	0.22	0.16	0.12
$c_Q=10\sigma/m$ (μ g ml ⁻¹)	0.74	0.52	0.39

Tabla III.4.1. Reproducibilidad del sensor de epinefrina
 [Epinefrina]=10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Volumen=300 μl

Determinación	A	[Epinefrina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.325	10.09
2	0.324	10.06
3	0.320	9.94
4	0.327	10.16
5	0.325	10.09
6	0.333	10.34
7	0.323	10.03
8	0.330	10.25
9	0.321	9.97
10	0.319	9.91

Tabla III-4.2. Parámetros analíticos del sensor de epinefrina

\bar{x}	10.08
σ	0.137
σ^2	0.019
σ_m	0.043
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	10.1 \pm 0.3
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	10.1 \pm 0.1
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	1.36
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.97

Tabla III-4.3. Límites de detección y cuantificación de epinefrina

Nº Blanco	A	
1	0.114	$\bar{x}=0.115$ $\sigma=1.82 \times 10^{-3}$ $c_L=0.17 \mu\text{g ml}^{-1}$ $c_Q=0.57 \mu\text{g ml}^{-1}$
2	0.114	
3	0.116	
4	0.115	
5	0.116	
6	0.115	
7	0.112	
8	0.119	
9	0.115	
10	0.114	

Tabla IV-2.1. Reproducibilidad en la determinación de salicilamida (medio ácido) para el sensor de paracetamol-salicilamida

[Salicilamida]=90 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: HAc/NaAc 0.045M pH=5; Volumen=600 μl

Determinación	A	[Salicilamida] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.570	90.00
2	0.573	90.49
3	0.569	89.83
4	0.572	90.33
5	0.570	90.00
6	0.570	90.00
7	0.579	91.48
8	0.575	90.82
9	0.568	89.67
10	0.569	89.83

Tabla IV-2.2. *Parámetros analíticos en la determinación de salicilamida (medio ácido) para el sensor de paracetamol-salicilamida*

\bar{x}	90.24
σ	0.555
σ^2	0.308
σ_m	0.176
$t(0.05)$	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	90.2 ± 1.2
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	10.1 ± 0.4
$C.V.(%)=(\sigma/\bar{x}) \cdot 100$	0.61
$E_r(%)=(\sigma_m t_s/\bar{x}) \cdot 100$	0.44

Tabla IV-2.3. *Límites de detección y cuantificación de salicilamida (medio ácido)*

Nº Blanco	A	
1	-0.009	$\bar{x}=-0.009$ $\sigma=7.36 \times 10^{-4}$ $c_L=0.35 \mu\text{g ml}^{-1}$ $c_Q=1.22 \mu\text{g ml}^{-1}$
2	-0.010	
3	-0.010	
4	-0.009	
5	-0.008	
6	-0.009	
7	-0.010	
8	-0.009	
9	-0.009	
10	-0.008	

Tabla IV-3.1. *Reproducibilidad en la determinación de salicilamida (medio básico) para el sensor de paracetamol-salicilamida*

[Salicilamida]=85 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: NaCl 0.1M pH=12; Volumen=600 μl

Determinación	A	[Salicilamida] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.950	84.23
2	0.954	84.59
3	0.949	84.14
4	0.957	84.86
5	0.957	84.86
6	0.960	85.13
7	0.958	84.95
8	0.955	84.68
9	0.954	84.59
10	0.955	84.68

Tabla IV-3.2. *Parámetros analíticos en la determinación de salicilamida (medio básico) en el sensor de paracetamol-salicilamida*

\bar{x}	84.67
σ	0.307
σ^2	0.094
σ_m	0.097
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	84.7 ± 0.7
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	84.7 ± 0.2
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.36
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.26

Tabla IV-3.3. Límites de detección y cuantificación de salicilamida (medio básico)

Nº Blanco	A	
1	-0.027	$\bar{x}=-0.028$ $\sigma=8.82 \times 10^{-4}$ $c_L=0.24 \mu\text{g ml}^{-1}$ $c_Q=0.79 \mu\text{g ml}^{-1}$
2	-0.028	
3	-0.028	
4	-0.029	
5	-0.029	
6	-0.030	
7	-0.028	
8	-0.029	
9	-0.028	
10	-0.028	

Tabla IV-4.1. Reproducibilidad en la determinación de paracetamol para el sensor de paracetamol-salicilamida

[Paracetamol]=20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: NaCl 0.1M pH=12; Volumen=600 μl

Determinación	A	[Paracetamol] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.520	20.00
2	0.523	20.11
3	0.519	19.96
4	0.522	20.07
5	0.524	20.17
6	0.521	20.05
7	0.518	19.92
8	0.516	19.86
9	0.523	20.13
10	0.525	20.22

Tabla IV-4.2. *Parámetros analíticos en la determinación de paracetamol para el sensor de paracetamol-salicilamida*

\bar{x}	20.05
σ	0.568
σ^2	0.323
σ_m	0.179
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	20.0 \pm 1.3
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	20.0 \pm 0.4
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.57
$E_r(\%)=(\sigma_m t_s/\bar{x}) \cdot 100$	2.02

Tabla IV-4.3. *Límites de detección y cuantificación de paracetamol*

Nº Blanco	A	
1	-0.014	$\bar{x}=-0.015$ $\sigma=8.70 \times 10^{-4}$ $c_L=0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ $c_Q=0.33 \mu\text{g ml}^{-1}$
2	-0.014	
3	-0.015	
4	-0.016	
5	-0.016	
6	-0.014	
7	-0.015	
8	-0.015	
9	-0.016	
10	-0.014	

Tabla V-2.1. Reproducibilidad en la determinación de ácido ascórbico en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol
 [Ácido ascórbico]=10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (300 μl); 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (600 μl); 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1000 μl)

Det.	300 μl		600 μl		1000 μl	
	A	[Ác. Ascórbico] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Ác. Ascórbico] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Ác. Ascórbico] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.575	9.91	0.500	5.02	0.790	4.98
2	0.583	10.05	0.493	4.95	0.795	5.01
3	0.587	10.13	0.497	4.99	0.798	5.03
4	0.580	10.00	0.509	5.11	0.803	5.06
5	0.575	9.91	0.502	5.04	0.809	5.10
6	0.578	9.97	0.503	5.05	0.792	4.99
7	0.590	10.18	0.490	4.92	0.790	4.98
8	0.580	10.00	0.497	4.99	0.800	5.04
9	0.581	10.02	0.508	5.10	0.805	5.07
10	0.570	9.82	0.502	5.04	0.790	4.98

Tabla V-2.2. Parámetros analíticos en la determinación de ácido ascórbico en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol

Parámetro	300 μl	600 μl	1000 μl
\bar{x}	10.00	5.02	5.02
σ	0.105	0.062	0.044
σ^2	0.011	0.004	0.002
σ_m	0.033	0.020	0.014
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	10.0 \pm 0.2	5.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	10.00 \pm 0.07	5.02 \pm 0.04	5.02 \pm 0.03
C.V.(%)=(σ/\bar{x}) \cdot 100	1.06	1.23	0.88
$E_t(\%)=(\sigma_m t_s/\bar{x})\cdot 100$	0.75	0.88	0.63

Tabla V-2.3. Límites de detección y cuantificación de ácido ascórbico en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol

Nº Blanco	A (300 µl)	A (600 µl)	A (1000 µl)
1	0.007	0.012	0.042
2	0.008	0.014	0.040
3	0.008	0.012	0.042
4	0.008	0.013	0.038
5	0.007	0.014	0.045
6	0.006	0.012	0.036
7	0.007	0.010	0.038
8	0.009	0.013	0.040
9	0.008	0.014	0.041
10	0.007	0.012	0.042
\bar{x}	0.007	0.013	0.014
σ	8.50×10^{-4}	1.26×10^{-3}	9.94×10^{-4}
$c_L=3\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.05	0.04	0.02
$c_Q=10\sigma/m$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0.15	0.13	0.06

Tabla V-3.1. Reproducibilidad en la determinación de paracetamol en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol

[Paracetamol]=20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (300 µl); 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (600 µl); 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1000 µl)

Det.	300 µl		600 µl		1000 µl	
	A	[Paracetamol] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Paracetamol] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	A	[Paracetamol] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	0.821	20.12	0.410	4.99	0.530	5.12
2	0.828	20.30	0.415	5.05	0.520	5.02
3	0.803	19.67	0.408	4.97	0.527	5.09
4	0.814	19.95	0.420	5.12	0.533	5.15
5	0.808	19.77	0.403	4.91	0.526	5.08
6	0.825	20.23	0.415	5.05	0.519	5.01
7	0.828	20.30	0.412	5.02	0.520	5.02
8	0.817	20.02	0.410	4.99	0.525	5.07
9	0.802	19.63	0.401	4.88	0.519	5.01
10	0.814	19.95	0.407	4.96	0.516	4.98

Tabla V-3.2. *Parámetros analíticos en la determinación de paracetamol en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol*

Parámetro	300 μ l	600 μ l	1000 μ l
\bar{x}	19.99	4.99	5.05
σ	0.246	0.071	0.055
σ^2	0.060	0.005	0.003
σ_m	0.078	0.022	0.017
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	19.9 \pm 0.6	4.9 \pm 0.2	5.0 \pm 0.1
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	19.9 \pm 0.2	4.99 \pm 0.05	5.05 \pm 0.04
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	1.23	1.41	1.09
E_t (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.88	1.01	0.78

Tabla V-3.3. *Límites de detección y cuantificación de paracetamol en el sensor de ácido ascórbico-paracetamol*

Nº Blanco	A (300 μ l)	A (600 μ l)	A (1000 μ l)
1	0.013	0.019	0.022
2	0.014	0.020	0.021
3	0.014	0.020	0.022
4	0.015	0.022	0.020
5	0.015	0.019	0.019
6	0.014	0.020	0.019
7	0.013	0.021	0.022
8	0.014	0.019	0.020
9	0.015	0.021	0.020
10	0.012	0.018	0.022
\bar{x}	0.014	0.020	0.021
σ	9.94×10^{-4}	1.19×10^{-3}	1.25×10^{-3}
$c_L=3\sigma/m$ (μ g ml ⁻¹)	0.08	0.04	0.02
$c_Q=10\sigma/m$ (μ g ml ⁻¹)	0.25	0.15	0.08

Tabla VI-2.1. Selección del óptimo número de factores. Matriz I

Nº factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	562.095	1.000	0.5000	30915.789	2.709	0.9938	3340.174	8.071	0.9999
2	792.956	-	-	23436.135	2.053	0.9668	3264.725	7.889	0.9999
3	634.226	-	-	18091.478	1.585	0.8811	2231.634	5.392	0.9999
4	651.013	-	-	13829.983	1.212	0.6899	1204.740	2.911	0.9961
5	808.697	-	-	12816.903	1.123	0.6177	696.929	1.684	0.9089
6	737.586	-	-	13961.627	1.223	0.6985	822.940	1.988	0.9603
7	1070.120	-	-	13650.778	1.196	0.6780	687.957	1.662	0.9034
8	1152.658	-	-	11410.388	1.000	0.500	660.454	1.595	0.8844
9	1315.373	-	-	12183.139	-	-	594.312	1.436	0.8235
10	1482.384	-	-	13471.683	-	-	528.471	1.277	0.7355
11	1822.064	-	-	14678.591	-	-	486.430	1.175	0.6616
12	2201.534	-	-	14807.401	-	-	480.793	1.161	0.6505
13	2405.196	-	-	13924.571	-	-	456.857	1.103	0.6005
14	3003.222	-	-	12095.041	-	-	413.820	-	-

Tabla VI-2.2. Selección del óptimo número de factores. Matriz 2

Nº factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	513.983	2.775	0.9947	21665.283	4.399	0.9997	4307.061	4.631	0.9998
2	246.058	1.328	0.7676	11378.005	2.310	0.9832	3091.119	3.323	0.9984
3	185.170	1.000	0.5	7162.505	1.454	0.8318	1589.439	1.709	0.9149
4	227.424	-	-	7071.317	1.435	0.8234	929.961	1.000	0.5000
5	294.086	-	-	9276.359	1.883	0.9471	938.512	-	-
6	253.731	-	-	7158.862	1.453	0.8314	1093.427	-	-
7	301.785	-	-	5663.558	1.150	0.6407	940.826	-	-
8	298.261	-	-	5464.526	1.109	0.6056	1116.909	-	-
9	327.367	-	-	4924.647	1.000	0.5000	1227.474	-	-
10	507.005	-	-	5554.953	-	-	1334.605	-	-
11	609.662	-	-	5938.051	-	-	1390.472	-	-
12	687.452	-	-	7477.234	-	-	1366.792	-	-
13	641.560	-	-	8013.873	-	-	1520.847	-	-
14	614.927	-	-	7972.371	-	-	1533.990	-	-

Tabla VI-2.3. Selección del óptimo número de factores. Matriz 3

Nº factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	198.541	2.592	0.9907	9889.622	10.051	0.9999	9085.228	10.976	0.9999
2	130.925	1.709	0.9107	11250.695	11.434	0.9999	4637.200	5.602	0.9999
3	111.496	1.455	0.8277	9250.921	9.402	0.9999	1259.323	1.521	0.8543
4	146.696	1.915	0.9482	7277.715	7.396	0.9999	827.763	1.000	0.5000
5	111.211	1.451	0.8260	4754.099	4.831	0.9998	957.429	-	-
6	107.747	1.406	0.8050	3010.644	3.059	0.9967	1205.144	-	-
7	142.071	1.854	0.9393	2208.203	2.244	0.9781	1436.085	-	-
8	182.698	2.385	0.9846	1298.255	1.319	0.7579	1638.241	-	-
9	193.326	2.523	0.9891	1150.890	1.169	0.6541	2006.767	-	-
10	158.410	2.068	0.9654	983.930	1.000	0.5000	2234.471	-	-
11	126.528	1.651	0.8962	1074.266	-	-	2060.317	-	-
12	96.510	1.259	0.7203	1161.782	-	-	2132.603	-	-
13	76.596	1.000	0.5000	1375.529	-	-	2327.240	-	-
14	82.312	-	-	1506.017	-	-	2414.345	-	-

Tabla VI-2.4. Selección del óptimo número de factores. Matriz 4

Nº factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	698.425	10.561	0.9999	12064.545	1.855	0.9462	11577.105	1.000	0.5000
2	520.186	7.865	0.9999	6502.961	1.000	0.5000	12390.290	-	-
3	596.093	9.013	0.9999	6643.377	-	-	19596.682	-	-
4	311.328	4.707	0.9998	7140.935	-	-	26414.099	-	-
5	247.110	3.736	0.9993	7717.759	-	-	35373.709	-	-
6	217.338	3.286	0.9985	10035.420	-	-	41790.683	-	-
7	244.623	3.699	0.9993	8889.705	-	-	39722.059	-	-
8	223.317	3.376	0.9987	7911.542	-	-	35820.496	-	-
9	241.984	3.659	0.9992	7580.362	-	-	38394.273	-	-
10	200.303	3.028	0.9974	8009.705	-	-	37659.031	-	-
11	99.741	1.508	0.8584	8566.394	-	-	30234.485	-	-
12	66.131	1.000	0.5000	11368.556	-	-	24271.240	-	-
13	71.513	-	-	13057.984	-	-	17561.235	-	-
14	112.125	-	-	17033.330	-	-	14473.387	-	-

Tabla VI-2.5. Selección del óptimo número de factores. Matriz 5

N° factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	725.036	7.058	0.9999	11607.483	2.693	0.9943	11123.025	1.000	0.5000
2	463.041	4.507	0.9998	6086.740	1.412	0.8168	11965.167	-	-
3	473.233	4.607	0.9998	7406.080	1.718	0.9209	23973.458	-	-
4	306.414	2.983	0.9971	5864.285	1.360	0.7900	29649.861	-	-
5	116..041	1.129	0.6255	4309.372	1.000	0.5000	68625.189	-	-
6	102.719	1.000	0.5000	8262.883	-	-	83936.734	-	-
7	114.708	-	-	9332.458	-	-	96252.718	-	-
8	123.771	-	-	13481.275	-	-	115464.72	-	-
9	114.001	-	-	14305.298	-	-	90310.293	-	-
10	130.458	-	-	14177.389	-	-	72998.379	-	-
11	152.526	-	-	15101.537	-	-	57630.046	-	-
12	180.856	-	-	14259.568	-	-	50340.152	-	-
13	200.516	-	-	14430.000	-	-	34860.127	-	-
14	213.511	-	-	14238.612	-	-	36981.446	-	-

Tabla VI-2.6. Selección del óptimo número de factores. Matriz 6

Nº factores	Cafeína			AAS			Paracetamol		
	PRESS	F	P	PRESS	F	P	PRESS	F	P
1	265.392	13.991	0.9999	8311.256	41.322	0.9999	9708.945	1.000	0.5000
2	58.636	3.091	0.9964	5821.094	28.941	0.9999	9738.882	-	-
3	55.126	2.906	0.9948	5066.283	25.189	0.9999	14502.538	-	-
4	42.849	2.258	0.9768	857.658	4.264	0.9995	14458.773	-	-
5	41.220	2.173	0.9712	239.453	1.190	0.6672	15057.552	-	-
6	26.843	1.415	0.8044	201.130	1.000	0.5000	12498.716	-	-
7	22.036	1.161	0.6449	216.713	-	-	16844.011	-	-
8	19.601	1.033	0.5322	238.794	-	-	18242.800	-	-
9	18.968	1.000	0.5000	244.285	-	-	19563.938	-	-
10	20.924	-	-	261.104	-	-	26195.453	-	-
11	23.248	-	-	267.982	-	-	28500.159	-	-
12	23.480	-	-	250.423	-	-	26749.939	-	-
13	24.881	-	-	240.378	-	-	26044.620	-	-
14	26.859	-	-	14238.612	-	-	24639.831	-	-

Tabla VII-2.1. *Reproducibilidad del sensor de piridoxina*
 [Piridoxina]=1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (200 μl); 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1000 μl); 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (2000 μl)

Det.	200 μl		1000 μl		2000 μl	
	IFR	[Piridoxina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	IFR	[Piridoxina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	IFR	[Piridoxina] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	579	1.028	480	0.210	230	0.049
2	579	1.028	483	0.211	227	0.048
3	578	1.026	476	0.208	220	0.047
4	583	1.036	475	0.208	230	0.049
5	577	1.025	475	0.208	225	0.048
6	575	1.021	472	0.206	225	0.048
7	576	1.023	477	0.209	227	0.048
8	577	1.025	480	0.210	226	0.048
9	577	1.025	479	0.210	230	0.049
10	582	1.034	476	0.208	227	0.048

Tabla VII-2.2. *Parámetros analíticos del sensor de piridoxina*

Parámetro	200 μl	1000 μl	2000 μl
\bar{x}	1.027	0.209	0.048
σ	4.68×10^{-3}	1.47×10^{-3}	6.32×10^{-4}
σ^2	2.19×10^{-5}	2.16×10^{-6}	3.99×10^{-7}
σ_m	1.48×10^{-3}	4.66×10^{-4}	2.00×10^{-4}
t (0.05)	2.262	2.262	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	1.03 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.048 ± 0.001
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	1.027 ± 0.003	0.21 ± 0.01	0.0480 ± 0.0004
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.45	0.70	1.31
E_r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.32	0.50	0.94

Tabla VII-2.3. Límites de detección y cuantificación de piridoxina

Nº Blanco	IFR (200 µl)	IFR (1000 µl)	IFR (2000 µl)
1	2	5	8
2	2	6	9
3	3	5	9
4	3	6	8
5	4	6	8
6	2	6	9
7	3	5	8
8	3	5	9
9	2	6	9
10	3	6	8
\bar{x}	2.4	5.6	8.5
σ	1.035	0.516	0.527
$c_L=3\sigma/m$ (ng ml ⁻¹)	5.70	0.67	0.33
$c_Q=10\sigma/m$ (ng ml ⁻¹)	19.00	2.26	1.11

Tabla VIII-2.1. Reproducibilidad en la determinación de ácido salicílico (medio ácido) para el sensor de ácido salicílico-salicilamida

[Ácido salicílico]=0.70 µg ml⁻¹; Portador: NaCl 0.025M pH=2; Volumen=1000 µl

Determinación	IFR	[Ácido Salicílico] _{enc} (µg ml ⁻¹)
1	510	0.695
2	513	0.699
3	515	0.702
4	518	0.707
5	515	0.702
6	512	0.698
7	520	0.709
8	507	0.691
9	505	0.688
10	514	0.701

Tabla VIII-2.2. *Parámetros analíticos en la determinación de ácido salicílico (medio ácido) para el sensor de ácido salicílico-salicilamida*

\bar{x}	0.699
σ	6.56×10^{-3}
σ^2	4.30×10^{-5}
σ_m	2.07×10^{-3}
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	0.69 ± 0.01
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	0.699 ± 0.004
C.V.(%)= $(\sigma/\bar{x}) \cdot 100$	0.94
$E_r(\%)=(\sigma_m t_s/\bar{x}) \cdot 100$	0.67

Tabla VIII-2.3. *Límites de detección y cuantificación de ácido salicílico (medio ácido)*

Nº Blanco	IFR	
1	10	$\bar{x}=9.2$ $\sigma=1.032$ $c_L=4.46 \text{ ng ml}^{-1}$ $c_Q=14.88 \text{ ng ml}^{-1}$
2	8	
3	11	
4	9	
5	10	
6	9	
7	8	
8	8	
9	9	
10	10	

Tabla VIII-3.1. *Reproducibilidad en la determinación de ácido salicílico (medio básico) para el sensor de ácido salicílico-salicilamida*

[Ácido salicílico]=0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: NaCl 0.05M pH=11; Volumen=1000 μl

Determinación	IFR	[Ácido Salicílico] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	610	0.497
2	620	0.505
3	620	0.505
4	615	0.501
5	618	0.504
6	612	0.498
7	612	0.498
8	610	0.497
9	617	0.503
10	604	0.492

Tabla VIII-3.2. *Parámetros analíticos en la determinación de ácido salicílico (medio básico) en el sensor de ácido salicílico-salicilamida*

\bar{x}	0.500
σ	4.29×10^{-3}
σ^2	1.84×10^{-5}
σ_m	1.35×10^{-3}
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	0.50 ± 0.01
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	0.500 ± 0.003
C.V.(%)=(σ/\bar{x})·100	0.86
E _r (%)=($\sigma_m t_s/\bar{x}$)·100	0.61

Tabla VIII-3.3. Límites de detección y cuantificación de ácido salicílico (medio básico)

Nº Blanco	IFR	
1	7	$\bar{x}=7.8$ $\sigma=0.788$ $c_L=2.04 \text{ ng ml}^{-1}$ $c_Q=6.82 \text{ ng ml}^{-1}$
2	7	
3	8	
4	8	
5	9	
6	7	
7	9	
8	8	
9	8	
10	7	

Tabla VIII-4.1. Reproducibilidad en la determinación de salicilamida para el sensor de ácido salicílico-salicilamida

[Salicilamida]=0.20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Portador: NaCl 0.05M pH=11; Volumen=1000 μl

Determinación	IFR	[Salicilamida] _{enc} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	560	0.201
2	555	0.198
3	559	0.200
4	562	0.202
5	560	0.201
6	551	0.197
7	569	0.204
8	565	0.202
9	564	0.202
10	570	0.204

Tabla VIII-4.2. *Parámetros analíticos en la determinación de salicilamida para el sensor de ácido salicílico-salicilamida*

\bar{x}	0.201
σ	2.28×10^{-3}
σ^2	5.19×10^{-6}
σ_m	7.22×10^{-4}
t (0.05)	2.262
$\bar{x} \pm \sigma t_s$	0.201 ± 0.005
$\bar{x} \pm \sigma_m t_s$	0.201 ± 0.002
C.V.(%)= $(\sigma/\bar{x}) \cdot 100$	1.13
$E_t(\%)=(\sigma_m t_s/\bar{x}) \cdot 100$	0.81

Tabla VIII-4.3. *Límites de detección y cuantificación de salicilamida*

Nº Blanco	IFR	
1	7	$\bar{x}=7.8$ $\sigma=0.788$ $c_L=0.90 \text{ ng ml}^{-1}$ $c_Q=3.01 \text{ ng ml}^{-1}$
2	7	
3	8	
4	8	
5	9	
6	7	
7	9	
8	8	
9	8	
10	7	

Apéndice



CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS
QUE FORMAN PARTE DE ESTA
TESIS DOCTORAL



La elaboración de esta Tesis Doctoral ha dado lugar, hasta la fecha, a las siguientes contribuciones de carácter científico:

PUBLICACIONES

- 1.- **Determination of ascorbic acid by use of a continuous flow-through solid phase UV spectrophotometric system**
A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba
Fresenius' J. Anal. Chem., 363 (1999) 92
- 2.- **FI-Solid Phase spectrofluorimetric determination of pyridoxine in presence of other group-B vitamins**
A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz
Fresenius' J. Anal. Chem., 363 (1999) 265
- 3.- **Integrated flow injection-solid phase spectrophotometric determination of minoxidil**
A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz
Talanta, (aceptado para su publicación 12-11-98)
- 4.- **Flow-through solid phase UV spectrophotometric determination of amoxicillin**
A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz
Anal. Lett., próxima fecha de publicación Abril de 1999, Vol. 32 (4)
- 5.- **A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow-injection-solid phase spectrophotometry**
A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz
Anal. Chim. Acta, (aceptado para su publicación 3-2-99)
- 6.- **Determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations by use of a flow-through UV spectrophotometric sensor**
A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz
Enviado a *Mikrochim. Acta*

7.- Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet PLS multiptosensing device

A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz

Enviado a *J. Pharm. Biomed. Anal.*

8.- A simple solid phase spectrofluorimetric method combined with flow analysis for the rapid determination of salicylamide and salicylic acid in pharmaceutical samples

A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz

Enviado a *Talanta*

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1.- Desarrollo de un sensor fotométrico de flujo para la determinación secuencial de ácido ascórbico y paracetamol

A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba

XXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química, Ref. 7S-30

Cádiz, 1997

2.- Flow-through solid phase UV spectrophotometric determination of amoxicillin

A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, M. L. Fernández de Córdoba

Deauville Conference '98 (6th SAS), Ref. P311

Valencia, 1998

3.- Integrated flow injection-solid-phase spectrophotometric determination of minoxidil

I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba

Deauville Conference '98 (6th SAS), Ref. P313

Valencia, 1998

4.- Determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations by use of a flow-through UV spectrophotometric sensor

P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz

Deauville Conference '98 (6th SAS), Ref. P329

Valencia, 1998

5.- Determination of ascorbic acid by use of a continuous flow-through solid phase UV spectrophotometric system

A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba

Deauville Conference '98 (6th SAS), Ref. P312

Valencia, 1998

6.- Determinación de piridoxina en presencia de otras vitaminas del grupo B, por espectrofluorimetría en fase sólida en flujo continuo

A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz

XVI Reunión Nacional de Espectroscopía, Ref. J34

Sevilla, 1998

