

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

NUEVOS PROCEDIMIENTOS EN FLUJO CONTÍNUO PARA
LA DETERMINACIÓN DE DIAZEPAM, AMARILLO DE
ACRIDINA Y NITRITOS-NITRATOS

RAMÓN ONOFRE SEGARRA GUERRERO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de Octubre de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. José Vicente García Mateo
- Dra. Dña. Mónica Catalá Icardo
- Dra. Dña. Ana María Mellado Romero
- Dr. D. Gerardo M. Antón Fos
- Dr. D. Pilar Aragón Revuelta

Va ser dirigida per:

Prof. Dr. D. Jose Martínez Calatayud

©Copyright: Servei de Publicacions
Ramón Onofre Segarra Guerrero

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5636-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica

**Nuevos procedimientos en flujo continuo para la
determinación de diazepam, amarillo de acridina y nitritos-
nitratos.**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Ciencias Químicas
presenta el Licenciado
RAMON O. SEGARRA GUERRERO

Valencia, junio de 2002

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

D. *José Martínez Calatayud*, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia , y Dña. *Carmen Gómez Benito*, Catedrática de Escuela Universitaria de la Universidad Politécnica de Valencia (Departamento de Química)

CERTIFICAN:

que la presente memoria, cuyo título es:

“Nuevos procedimientos en flujo continuo para la determinación de diazepam, amarillo de acridina y nitritos-nitratos”

constituye la Tesis Doctoral de Ramón O. Segarra Guerrero.

Asimismo certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo de investigación como la redacción de la presente Memoria.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, en junio de 2002.

Fdo.: José Martínez Calatayud

Fdo.: Carmen Gómez Benito

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

D. *Carlos Mongay Fernández*, Catedrático y director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia

CERTIFICA:

que la memoria, para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas realizada por el Licenciado *Ramón O. Segarra Guerrero*, cuyo título es:

“Nuevos procedimientos en flujo continuo para la determinación de diazepam, amarillo de acridina y nitritos-nitratos”

ha sido realizada en este Departamento bajo la dirección del Catedrático de este Departamento, D. *José Martínez Calatayud* y la Catedrática de Escuela Universitaria de la Universidad Politécnica de Valencia (Departamento de Química) Dña. *Carmen Gómez Benito*.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia, en junio de 2002.

Fdo.: *Carlos Mongay Fernández*
Director del Departamento

Expreso mi gratitud a las personas que han hecho posible este trabajo con su supervisión y apoyo moral, especialmente a los doctores D. José Martínez Calatayud y Dña. Carmen Gómez Benito, que me dirigieron en la realización de la presente Tesis.

Este agradecimiento es también para todos mis compañeros del departamento de Química Analítica, los cuales han sido muchos a lo largo de la realización de este trabajo y especialmente al laboratorio n°. 9, José Luis, Luis, Ana, Alicia, Begoña, José Vicente, Bárbara, Mónica, Gustavo y muchos más.

No hay que olvidar a mi familia, a quienes expreso una especial gratitud, ellos son los que más me han alentado.

A mi hija Mónica

ÍNDICE

Capítulo primero

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.2. REACCIONES FOTOQUÍMICAS EN FLUJO CONTINUO.....	7
1.2.1. Introducción	7
1.2.2. Características generales	8
1.2.3. Tipos de aplicaciones	9
a) En estático	9
b) En flujo continuo	9
1.2.4. Materiales y diseño de los reactores fotoquímicos	15
1.2.5. Variables experimentales	19
1.2.5.1. Tiempo de irradiación y dispersión de la muestra	19
1.2.5.2. Fuentes de irradiación : intensidad, espectro y longitud de onda	22
1.2.5.3. Polaridad del medio	25
1.2.5.4. Influencia del contenido en oxígeno disuelto	25
1.3. LECHOS INMOVILIZADOS	27
1.3.1. Generalidades	27
1.3.2. Lechos no enzimáticos	29
1.3.3. Lechos enzimáticos	32
1.3.4. Tipos de configuración y ubicación de los lechos reactivos	36
1.4. QUIMIOLUMINISCENCIA	45
1.4.1. Aspectos teóricos de la quimioluminiscencia	45
1.4.2. Quimioluminiscencia en fase líquida	49

1.4.2.1. Aplicaciones analíticas	51
a) Indicadores volumétricos	51
b) Determinación de trazas de metales	52
c) Determinación de oxidantes	52
d) Análisis de productos orgánicos	52
1.4.3. Aspectos operativos	54
1.4.3.1. Procedimientos en estático	55
1.4.3.2. Procedimientos en flujo continuo	55
1.4.3.2.1. Reacción muestra-reactivo	58
1.4.3.2.2. Celdas	59
1.4.3.2.3. Detectores	60

Capítulo segundo

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO 63

2.1. OBJETIVOS 65

2.2. PLAN DE TRABAJO 66

Capítulo tercero

3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS 69

3.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA 71

3.2. MATERIAL FIA 72

3.3. REACTIVOS 73

Capítulo cuarto

4. FOTORREACCIÓN Y DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE DIAZEPAM 77

INTRODUCCIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES DEL DIAZEPAM	79
4.1.1. Propiedades fisicoquímicas.....	80
4.1.2. Síntesis.....	80
4.1.3. Estabilidad y degradación.....	81
4.1.4. Propiedades farmacológicas.....	83
4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS	84
4.2.1. Métodos espectrométricos	84
4.2.2. Métodos cromatográficos.....	88
4.2.3. Otras técnicas analíticas.....	94

PARTE EXPERIMENTAL

4.3. ENSAYOS PREVIOS	97
4.3.1. Estabilidad y preparación de la muestra.....	97
4.3.2. Importancia del tiempo de exposición y potencia de la fuente luminosa	98
4.3.3. Influencia del medio y presencia de catalizadores.....	100
4.3.3.1. Influencia del etanol.	100
4.3.3.2. Influencia de la acidez/basicidad del medio.....	101
4.3.3.3. Influencia de catalizadores.....	102
4.3.3.4. Influencia del persulfato potásico.....	104

4.3.3.5. Elección del medio alcalino.....	104
4.3.4. Influencia de la temperatura.....	105
4.3.5. Selección de longitudes de onda de excitación y emisión.....	106
4.4. MONTAJE FIA SELECCIONADO.....	107
4.5. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES.....	110
4.5.1. Procedimiento de optimización.....	110
4.5.2. Influencia de la concentración de NaOH.....	111
4.5.3. Influencia de la concentración de Cu(II).....	112
4.5.4. Optimización del tiempo de irradiación.....	112
4.5.5. Optimización de la temperatura de trabajo.....	114
4.5.6. Optimización del volumen de muestra y longitud del reactor.....	117
4.5.7. Optimización del caudal.....	118
4.5.8. Optimización de la longitud del tramo en el baño refrigerante.....	119
4.5.9. Reoptimización de las variables químicas.....	121
4.5.9.1. Reoptimización de la concentración de NaOH.....	121
4.5.9.2. Reoptimización de la concentración de Cu(II).....	122
4.6. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES.....	123
4.6.1. Longitudes de onda de excitación y emisión.....	123
4.6.2. Influencia de la anchura de rendija del fluorímetro.....	124
4.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO.....	125
4.8. MECANISMO DE REACCIÓN	126
4.9. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.....	130
4.9.1. Intervalo de linealidad y límite de detección.....	130
4.9.2. Repetitividad y velocidad de inyección.....	131
4.9.3. Estudio de interferentes.....	132
4.9.4. Muestras reales.....	134
4.10. CONCLUSIONES.....	135

Capítulo quinto

5. DETERMINACIÓN FIA-ESPECTROFOTOMÉTRICA DE NITRITOS Y NITRATOS..... 139

INTRODUCCIÓN

5.1. IMPORTANCIA ANALÍTICA DE NITRATOS Y NITRITOS.....	141
5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	142
5.2.1. Volumetrías.....	143
5.2.2. Determinaciones colorimétricas.....	144
5.2.3. Métodos fluorimétricos.....	146
5.2.4. Determinación por quimioluminiscencia.....	147
5.2.5. Cromatografía.....	148
5.2.6. Uso de la técnicas FIA en la determinación de nitritos y nitratos	148
5.2.7. Métodos que utilizan acridinas.....	155

PARTE EXPERIMENTAL

5.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA PROFLAVIN-NITRITO.....	157
5.4. ELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO.....	158
5.5. ESTUDIO DEL MONTAJE FIA MÁS ADECUADO.....	161
5.5.1. Estudio de los dispositivos mezcladores en el montaje FIA.....	167
5.6. PROCESO DE OPTIMIZACIÓN.....	174
5.6.1. Precalibrado. Elección de la concentración de trabajo.....	174
5.6.2. Optimización de los parámetros experimentales.....	175
5.6.2.1. Parámetros químicos.....	176

5.6.2.1.1. Influencia de la concentración de ácido clorhídrico....	176
5.6.2.1.2. Verificación del medio ácido.....	178
5.6.2.1.3. Influencia de la concentración de proflavin.....	179
5.6.2.1.4. Elección de la disolución portador	180
5.6.2.1.5. Optimización de la temperatura de trabajo.....	181
5.6.2.1.6. Influencia del tiempo de reacción.....	182
5.6.2.2. Parámetros hidrodinámicos.....	184
5.6.2.2.1. Optimización del volumen de muestra.....	184
5.6.2.2.2. Optimización del caudal del portador.....	185
5.6.2.2.3. Optimización de la longitud del tramo “válvula de inyección – celda de flujo”.....	187
5.6.2.3. Parámetros del detector.....	188
5.6.2.3.1. Reoptimización de la longitud de onda.....	188
5.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO.....	190
5.8. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.....	191
5.8.1. Repetibilidad y velocidad de inyección.....	191
5.8.2. Intervalo de linealidad y límite de detección	192
5.8.3. Estudio de interferentes.....	193
5.9. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA FIA A LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS.....	195
5.9.1. Aplicación analítica al ión nitrato.....	195
5.9.1.1. Cambios en el montaje FIA.....	195
5.9.1.2. Columna reductora de cadmio-cuperizado.....	196
5.9.1.3. Influencia de la disolución de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$	197
5.9.1.4. Influencia de la concentración de HCl en la disolución reactivo.....	198
5.9.1.5. Influencia del caudal a través de la columna.....	199
5.9.1.6. Influencia de la longitud de la columna.....	200
5.9.1.7. Variación del caudal y empleo de flujo detenido.....	201

5.9.2. Condiciones FIA optimizadas para la determinación de nitratos.....	204
5.9.3. Aplicaciones analíticas.....	205
5.9.3.1. Intervalo de linealidad, caudal alto.....	205
5.9.3.2. Repetitividad y velocidad de inyección con caudal alto.....	206
5.9.3.3. Intervalo de linealidad, caudal bajo y límite de detección ..	207
5.9.3.4. Repetitividad y velocidad de inyección a caudal bajo.....	208
5.9.4. Estudio sobre el análisis conjunto de nitritos y nitratos.....	209
5.10. MUESTRAS REALES.....	210
5.11. CONCLUSIONES.....	211

Capítulo sexto

<u>6. DETERMINACIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA DEL AMARILLO DE ACRIDINA.....</u>	215
--	------------

INTRODUCCIÓN

6.1. PROPIEDADES Y USOS DE LAS ACRIDINAS.....	217
6.1.1. Diaminoacridinas	219
6.1.2. Acción antibacteriana de las acridinas	220
6.2. REACCIONES QUIMIOLUMINISCENTES DE LAS ACRIDINAS.....	221
6.3. ASPECTOS ANALÍTICOS DE LAS ACRIDINAS	224
6.3.1. Ensayos cualitativos.....	224
6.3.2. Métodos volumétricos.....	224
6.3.3. Métodos colorimétricos.....	225
6.3.4. Métodos fluorimétricos.....	226
6.3.5. Métodos electroanalíticos.....	227
6.3.6. Métodos cromatográficos.....	229
6.3.7. Métodos quimioluminiscentes.....	230

6.3.8. Uso de las acridinas como reactivos analíticos.....	231
6.4. CONECTIVIDAD MOLECULAR Y PREDICCIÓN DE PROPIEDADES	
.....	234
6.4.1. Quimioluminiscencia del sistema amarillo de acridina-MnO ₄ ⁻ en medio ácido.....	236

PARTE EXPERIMENTAL

6.5. ENSAYOS PREVIOS	239
6.5.1. Estudio de la elección del oxidante.....	239
6.5.2. Estudio de la elección del medio.....	241
6.5.3. Optimización de la concentración de oxidante.....	244
6.5.4. Estudio de la composición de canales.....	246
6.6. PROCESO DE OPTIMIZACIÓN	249
6.6.1. Optimización del caudal.....	249
6.6.2. Optimización del volumen de muestra.....	250
6.6.3. Influencia de los agentes tensioactivos.....	252
6.6.4. Influencia de la presencia de sustancias sensibilizadoras.....	253
6.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO	258
6.8. MECANISMO DE LA REACCIÓN	259
6.9. APLICACIONES ANALÍTICAS	261
6.9.1. Repetividad y velocidad de inserción.....	261
6.9.2. Límite de detección y reproducibilidad.....	262
6.9.3. Estudio de la influencia de interferentes.....	265
6.9.4. Muestras reales.....	267
6.10. CONCLUSIONES	268

Capítulo séptimo

7. CONCLUSIONES FINALES..... 271

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 275

Capítulo primero

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El creciente número de controles analíticos requeridos en áreas tales como la salud, el medio ambiente o la alimentación hizo surgir, en los años sesenta y setenta, la necesidad de una utilización intensiva de procesos analíticos automatizados. La automatización permite reemplazar la actividad humana en tareas tediosas e incluso peligrosas para el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano. La disponibilidad comercial de variado instrumental, las ventajas económicas que reporta a medio y largo plazo, y su incorporación a la industria, son también razones a las que atribuir el auge de estas técnicas.

Una de las metodologías de automatización, el Análisis por Inyección en Flujo (*Flow Injection Analysis*, F.I.A.), ha experimentado un rápido desarrollo desde la introducción del concepto original por Ruzicka y Hansen¹(Dinamarca) y Stewart² (USA) en 1975, abarcando en la actualidad casi todos los campos analíticos. Si bien resulta difícil formular una definición del F.I.A.^{3,4} que englobe a las diversas modalidades que del mismo han ido surgiendo desde sus comienzos, se podría decir que se trata de un tipo de análisis automatizado en flujo continuo no segmentado, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de disolución en una corriente continua de un portador, que lo transporta hasta el detector, donde genera una señal transitoria en forma de pico, denominado fiagrama. El detector contiene una celda de flujo. Cuando el analito u otra disolución es insertada puede tener lugar o no reacción química.

La utilización del flujo en régimen laminar conlleva a que la disolución insertada (muestra o a veces reactivo) fluya con un perfil parabólico debido a su

avance con diferente velocidad, más lentamente en las proximidades de las paredes del tubo, donde es frenada por fricción, y más rápidamente en el centro. De ello resulta una gradual dispersión de la muestra tanto en sentido radial como axial. La metodología FIA permite el control de la dispersión mediante el uso de condiciones que favorecen casi siempre la dispersión radial, tratando de reducir de este modo el grado de dispersión al mismo tiempo que se fuerza la mezcla entre muestra y portador.

Las medidas analíticas se llevan a cabo bajo condiciones de no equilibrio, ya que no se alcanzan ni la homogeneidad física ni el equilibrio químico durante el tiempo de detección. Esto facilita la medida de intermedios de reacción de vida corta tales como radicales, frente a las técnicas convencionales en estático. Bajo este punto de vista, el FIA, en su modalidad más frecuente, puede ser considerado como un método cinético de análisis bajo la modalidad de tiempo fijo.

La metodología FIA presenta dos ventajas que la hacen destacar sobre otros métodos: un diseño simple y barato y suficiente robustez para soportar el tratamiento habitual en un laboratorio analítico de control.

Existen numerosas publicaciones dedicadas a aspectos generales del análisis por inyección en flujo⁵⁻¹⁰, o parcelas concretas del análisis químico, tales como las áreas farmacéutica y medioambiental, dado el gran número de aplicaciones que ha encontrado el F.I.A. en este campo.

La comercialización de equipos a precios "asequibles", la disminución del tiempo de análisis con el consiguiente abaratamiento del mismo, la posibilidad de llevar a cabo las distintas operaciones asociadas al análisis clásico (filtración y redisolución, extracción líquido-líquido, valoraciones, uso de reactivos sólidos inmovilizados ,etc), el carácter modular de la metodología que permite el empleo de los distintos sistemas de detección (espectroscópicos, electroanalíticos, etc) ha

contribuido también a la expansión del FIA entre los métodos automáticos de análisis^{11,12}.

En la figura 1.1. se muestran los resultados de una revisión efectuada para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores aplicados en sistemas F.I.A. El período que abarca la búsqueda comprende desde el año 1980 hasta enero de 2002. Ésta se ha realizado sobre el Analytical Abstracts efectuando rastreos partiendo de las entradas “Flow injection” y “FIA” y de los distintos tipos de detectores.

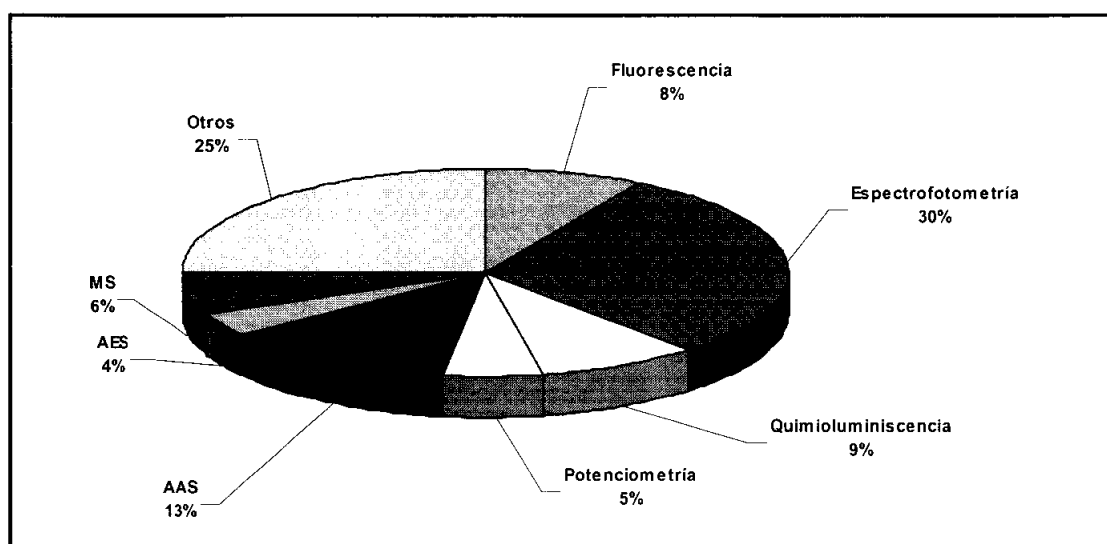


Figura 1.1.: Proporción entre los tipos de detectores acoplados a los sistemas de análisis por inyección en flujo.

AAS, *Atomic Absorption Spectrometry*: Espectrometría de Absorción Atómica.

AES, *Atomic Emission Spectrometry*: Espectrometría de Emisión Atómica.

MS, *Mass Spectrometry*: Espectroscopía de Masas.

En la figura 1.2., se comparan las proporciones de análisis sobre muestras del campo farmacéutico y biomédico que emplean la técnica F.I.A. La revisión bibliográfica fue análoga a la realizada para la confección de la Figura 1.1.

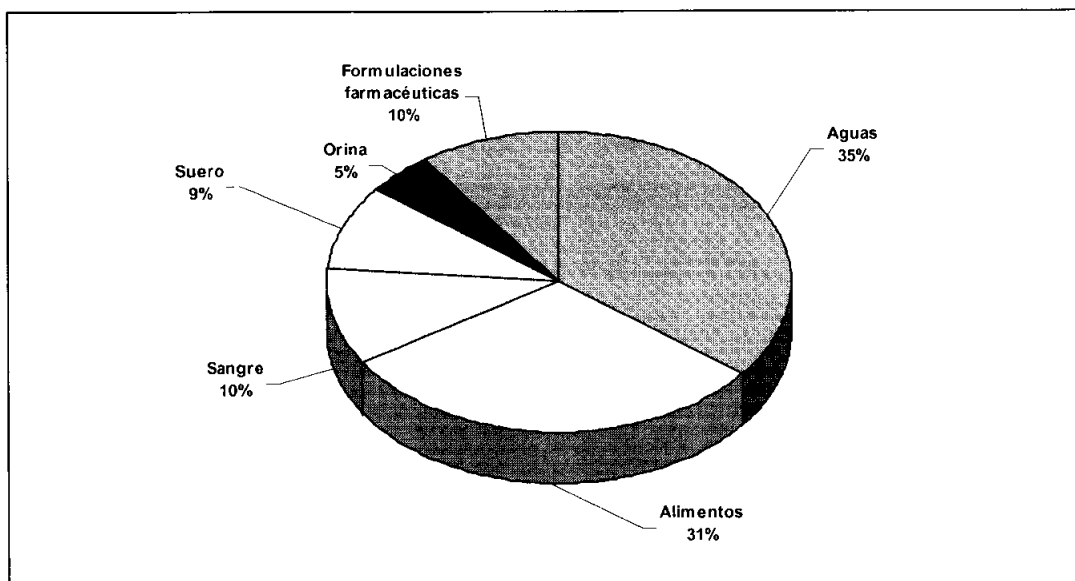


Figura 1.2.: Proporción entre tipos de muestras analizadas por inyección en flujo en las áreas farmacéutica, alimentaria y biomédica.

Como se ha dejado patente en el texto y las gráficas, las áreas y modalidades de las técnicas de inyección en flujo son muy diversas y están continuamente avanzando, algunas de éstas se desarrollan a continuación por estar directamente relacionadas con los trabajos de investigación que aquí se presentan.

1.2. REACCIONES FOTOQUÍMICAS EN FLUJO CONTÍNUO

1.2.1. Introducción

La utilización de la luz como coadyuvante de las reacciones químicas y su aplicación en Química Analítica es un hecho conocido y explotado. Ello es consecuencia directa de las características favorables que poseen los procesos fotoquímicos sobre aquellos otros basados en reacciones químicas. Con esta técnica se evitan excesos de reactivos, resulta fácil cambiar la longitud de onda de irradiación lo que equivale a variar la naturaleza del reactivo, “el fotón”, consiguiendo, en principio, mejorar la selectividad. También se pueden obtener, en general, procesos más rápidos mediante la optimización de las condiciones de irradiación (potencia de la lámpara y configuración del reactor) y además, se pueden adaptar fácilmente al trabajo en flujo continuo.

En cuanto a los análisis farmacéuticos es bien conocido que algunos de los analitos son inestables a la luz, tanto en disolución como en estado sólido. Esto proporciona una ventajosa posibilidad de utilizar fuentes de irradiación para proponer métodos analíticos simples, rápidos y económicos.

Todos estos factores conducen al desarrollo de métodos analíticos en flujo continuo con utilización de fuentes luminosas como reactivo en el análisis de muestras relacionadas con la farmacología, los análisis clínicos, control de pesticidas, de alimentos, etc.

1.2.2. Características generales

La luz reúne una serie de características que la convierten en un “reactivo” ideal en cuanto a su versatilidad. Según la estructura química del analito, éste puede sufrir oxidaciones, reducciones, hidrólisis, etc bajo la acción de la luz, dando lugar a derivados que permiten mejorar la detección. Las fuentes de luz de diferentes intensidades son fácilmente asequibles y además se pueden incorporar “en línea” en diferentes tipos de montaje y ser utilizadas con períodos de radiación flexibles. También existe la posibilidad de utilizar intervalos estrechos de longitud de onda con la finalidad de mejorar la selectividad. Por otra parte, las lámparas con espectro amplio, pueden ser usadas para extender su aplicabilidad a cromóforos multifuncionales.

Esta técnica ya ha demostrado indudables ventajas en la simplificación de los montajes analíticos, así como en las prestaciones de las reacciones fotoquímicas como herramienta en la obtención de derivados para mejorar tanto sensibilidad como selectividad en la detección. Esto es debido a la obtención durante el proceso de irradiación de productos de reacción con mejores características cromóforas, fluoróforas, electrolíticas, o bien por inducir desplazamiento en los máximos de absorción, emisión o en los potenciales red-ox.

Se pueden ilustrar estas afirmaciones con el caso de la tioridazina, que de una fluorescencia nativa de intensidad 17.5 pasa a 204 después de ser sometida a irradiación, lo que supone un factor de 11.5¹³. Otro ejemplo son las fenotiacinas, que exhiben en mayor o menor intensidad fluorescencia nativa, y que al ser sometidas a irradiación sufren una oxidación fotoquímica, cuyo resultado es un desplazamiento de los máximos de emisión a longitudes de onda más corta acompañado de un notable incremento en la intensidad de luz emitida^{13, 14}.

Las fuentes de radiación se pueden usar solas o combinadas con otras especies químicas que actúen como reactivos propiamente, o bien como sensibilizadores que, por reacción con un analito no fotoactivo, originan un compuesto capaz de experimentar procesos fotoquímicos.

1.2.3. Tipos de aplicaciones

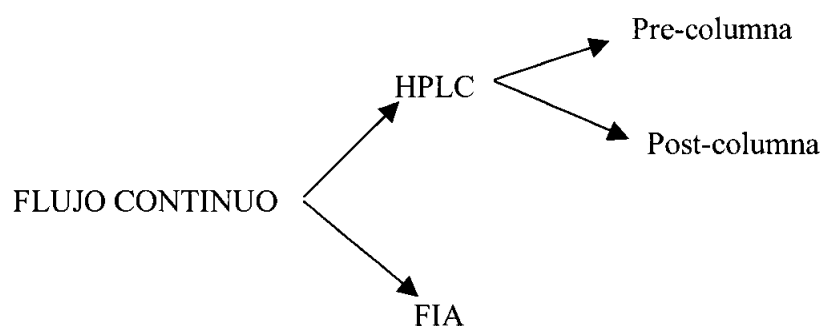
Atendiendo a la metodología analítica utilizada, podemos considerar dos tipos diferentes de aplicaciones:

a) ***En estático:*** se usa, en líneas generales para convertir uno o varios de los componentes presentes en la muestra en fotoproductos que posean propiedades diferentes a los productos originales, bien sea para favorecer la separación o la detección. Adicionalmente, la formación de un fotoproducto puede servir para confirmar la identificación en una muestra de elevada complejidad.

Estos procedimientos se han mostrado especialmente útiles para estudiar mecanismos y productos de fotodegradación. Existe una importante área de trabajo en la que se determina el efecto de la irradiación sobre fármacos tanto en condiciones aeróbicas como aneróbicas, para estudiar las reacciones alérgicas que éstos provocan en la piel durante el tiempo de tratamiento.

La metodología en estático presenta algunos inconvenientes operativos al compararla con la técnica en flujo continuo, ya que a menudo este tipo de procedimientos requieren tratamientos prolongados, así como la atención del operador.

b) ***En flujo continuo:*** las posibilidades de aplicación en esta área varían según las condiciones de ubicación de la fuente de radiación en el montaje analítico. Básicamente son:



En HPLC, la puesta a punto de sistemas en modo pre-columna no presenta dificultades; se trataría de una combinación de la irradiación en estático y la separación cromatográfica. Sin embargo ha sido utilizado muy escasamente¹⁵. El campo de aplicaciones se solapa con el de los métodos en estático. Salomoun y Slais compararon resultados pre y post-columna¹⁶. Las conclusiones indican que, según los objetivos que se pretendan, puede resultar más adecuada una modalidad u otra. En general, la configuración post-columna, debido a la variedad de productos que se forman tras la irradiación, conlleva menores dificultades al evitar la separación cromatográfica entre productos afines, así como límites de detección mejores, ya que diversos productos pueden contribuir en la señal cuantitativa.

En cuanto a la derivatización post-columna, el uso de reactores con un volumen muerto muy reducido, ha conseguido una disminución notoria de la dispersión. Además podemos citar otras características ventajosas de esta técnica:

- No provocan los problemas que conlleva el exceso de reactivo al detector.
- Posibilidad de mejorar la selectividad al utilizar lámparas con distinto espectro de emisión.
- Existencia de lámparas comerciales que permiten una gran variedad de opciones, con un costo asequible.
- Mejorar la sensibilidad de la detección.

- Se puede alcanzar un elevado rendimiento en la derivatización (eficiencia cuántica) como resultado de las relativamente rápidas cinéticas de reacción, que permiten obtener alto rendimiento en la transformación.
- Controlando las condiciones experimentales, se consiguen resultados de elevada reproducibilidad.
- Automatización total del proceso.
- Fácil combinación de varios detectores distintos.

Las características enunciadas exigen el cumplimiento de algunos requisitos que cabría considerar para la correcta aplicación de estos métodos. Entre otros cabe enumerar:

- Utilización de longitudes de onda para la activación que no sean absorbidas fuertemente por los fotoproductos.
- Los productos obtenidos en la reacción han de ser estables durante el tiempo requerido para su detección, normalmente tiempos muy cortos, inferiores a 1 minuto.
- Elevada eficacia en la fotoconversión.
- Estabilidad en el funcionamiento de la lámpara y del caudal para que el tratamiento lumínico sea altamente reproducible.
- Los fotoproductos obtenidos han de presentar características adecuadas para su detección: absorbancia, fluorescencia, o buenas propiedades red-ox.
- Adecuado diseño del reactor y del detector.

La primera aplicación de un proceso fotoquímico post-columna comentada por Birks y Frei¹⁷, fue la de Iwoka y Tunenbaum. Detectaron selectivamente compuestos N-nitrosos; los cuales eran transformados en nitritos por fotohidrólisis. El nitrito era determinado colorimétricamente por la conocida reacción de Griess.

Sur y colaboradores desarrollaron un método¹⁸ para la separación y determinación de compuestos arsenicales en orina. La separación se efectuó por cromatografía de intercambio iónico. En el sistema HPLC se empleó como fase móvil NaH_2PO_4 3 mM en agua a pH 2.33 (3.5 ml/min) y se acopló a un sistema FIA con un reactor de fotólisis UV y a otro que disponía de un horno microondas para someter la muestra a un proceso de digestión. La detección se realizaba mediante absorción atómica. Se pudo constatar que la fotólisis UV proporcionaba mejores resultados que la digestión por microondas.

El uso de una reacción fotoquímica “en línea” para la formación de un producto fluorescente o con absorbancia en el UV-VIS fue llevado a cabo por Twitchett y colaboradores¹⁹. Determinaron cannabinol en orina, convirtiéndolo en un producto altamente fluorescente después de la irradiación. Una inyección con la lámpara apagada proporcionaba la señal correspondiente a la línea base y la fluorescencia nativa del “analito”; la diferencia entre las señales obtenidas entre la lámpara encendida y apagada, proporcionaba el parámetro cuantitativo del método.

El binomio fotoquímica-electroquímica se utiliza desde principios del siglo XX, pero su aplicación analítica es muy posterior. Muchos estados excitados generados por irradiación (grados de oxidación inestables, radicales intermedios, productos finales, etc.) exhiben respuesta electroquímica.

Los primeros estudios realizados en medidas potenciométricas durante el tiempo de irradiación, caracterizaron cambios en la polaridad de la fuerza electromotriz durante el tiempo de tratamiento. La mayor parte de estos estudios previos generaron resultados contradictorios, por citar un ejemplo, en compuestos con el grupo carbonilo, determinados autores obtenían potenciales positivos, mientras que otros los conseguían negativos.

Posteriormente se han combinado todo tipo de técnicas electroquímicas: polarografía, amperometría, combinación con flash fotólisis, etc.

La primera aplicación en flujo continuo y con finalidad analítica dentro de este campo, se publicó en 1979. Las nitrosoaminas al pasar por el interior de un tubo de cuarzo irradiado por una lámpara de arco de xenón, reaccionaban generando nitrito, el cual era monitorizado a través de un electrodo de platino. El límite de detección que se alcanzaba era del orden de nanogramos, siendo el intervalo de aplicación entre 3 y 1000 ng. El sistema resultaba muy complicado, ya que requería mezcladores de reactivos, columna cromatográfica, reactores y sistemas de purificación²⁰.

Hall y Rodgers desarrollaron un fotoconductímetro como detector para HPLC²¹. En este detector se produce la fotólisis de compuestos que contienen halógenos, nitrógeno o sulfuro, formándose productos iónicos que son detectados en una celda conductimétrica. Los límites de detección se encontraron en el rango de picogramos para muchos compuestos.

En otros sistemas desarrollados posteriormente²², el eluyente pasa por un tubo de teflón alrededor de una lámpara de mercurio, donde es fotolizado o fotohidrolizado, formando especies electroquímicamente activas a potenciales oxidantes. La configuración de este tubo de teflón alrededor de la lámpara es muy concreta, se podría definir como “trenzado” o “tejido”; la bibliografía anglosajona los define con las siglas KOT, (*Kinitted Open Tubular*). Incluso el “analito” puede ser irradiado directamente sobre la superficie del electrodo. De esta manera, pueden detectarse estados excitados intermedios con vida media extraordinariamente corta (10^{-8} s). La técnica ha sido aplicada a compuestos que no presentan electroactividad ni a potenciales oxidantes ni reductores: pesticidas y medicamentos (penicilinas, cefalosporinas, tanto en preparados farmacéuticos como en fluidos fisiológicos).

Algunas revisiones anteriores en el campo de la fotoquímica utilizada para mejorar la detección en HPLC, pueden servir de ampliación^{17, 23-27}.

Se han desarrollado también sistemas dentro de la metodología FIA que incorporan fuentes de radiación “en línea” como forma de “derivatización”, obteniendo resultados muy competitivos. Así por ejemplo, se ha propuesto la determinación de clorpromacina mediante un sistema FIA, que permite determinar en preparados farmacéuticos concentraciones entre 6.24 y 0.031 ppm.

Recientemente, Martínez Calatayud²⁸ y colaboradores han determinado cloramfenicol en un sistema FIA con flujo segmentado, en el que la droga era fotodegradada “en línea” a pH 10.4. El fotorreactor consistió en un tubo de teflón de 697 cm de longitud y 0.8 mm de diámetro interno arrollado a una lámpara de mercurio de baja presión de 8W. El nitrito y los fotofragmentos orgánicos generados en la fotodegradación reaccionan con ioduro, el cual es monitorizado biamperométricamente. El trioduro formado en exceso de solución de ioduro es detectado por polarización con dos electrodos de Pt a 100 mv. La metodología se aplicó a preparados farmacéuticos y a muestras de orina.

La determinación biamperométrica de metronidazol²⁹ en un sistema FIA ha sido descrita también por Martínez Calatayud. El sistema estaba provisto de una lámpara de Hg de baja presión de 40 W y una celda de flujo “casera” biamperométrica con dos electrodos de Pt polarizados a 100 mV. La disolución de muestra, después de ser irradiada era insertada en un canal con agua destilada, el cual a su vez confluía con una solución mezclada “in situ” de KI en H₂SO₄. Las muestras analizadas eran preparados farmacéuticos y formulaciones galénicas.

La viabilidad del tandem³⁰ reacción fotoquímica-detección quimioluminiscente, ha sido estudiada por los mismos autores en otro trabajo para el caso del cloramfenicol y otros nitrocompuestos. La fotodegradación descrita en párrafos anteriores para el

cloramfenicol, se aprovechó para desarrollar un método FIA-quimioluminiscente. Los fotofragmentos orgánicos generados a partir de la droga reaccionaban con un sistema luminol-Co(II) que servía para su monitorización.

Perez Ruiz y colaboradores³¹ han descrito un método para el análisis de la vitamina K3 (menadiona) mediante una reacción quimioluminiscente fotoinducida en FIA. La muestra y etanol eran inyectados simultáneamente en dos canales de tampón fosfato a pH 7.5. Estos canales convergían posteriormente en el fotorreactor, el cual consistía en un tubo de PTFE de 60 cm. Una vez la muestra se encontraba en el fotorreactor, el flujo se detenía y era irradiada en el UV durante 1 minuto. Después de la radiación, la corriente que salía del fotorreactor confluía con otra solución tamponada a pH 12 y posteriormente con un canal de luminol 0.02mM/hematina 6mM, midiéndose la intensidad de la quimioluminiscencia. El método fue aplicado a la determinación de preparados farmacéuticos.

La determinación de pesticidas aromáticos en FIA por detección fluorescente fotoinducida también ha sido descrita. Coly y Aaron³² desarrollaron un método, en el que determinaban varios pesticidas que fluorescen de manera natural y otros que fluorescen bajo radiación a 254 nm (fenitrotion, fenvalerato, deltametrin y diflubenzuron). Para la fluorescencia fotoinducida, la mezcla muestra/fase móvil pasaba a través de un fotoreactor de tubo de teflon de 2.5 m arrollado a una lámpara germicida de 8W, cubierta con papel de aluminio. El método fue aplicado en la determinación de pesticidas en aguas.

1.2.4. Materiales y diseño de los reactores fotoquímicos

El diseño y el material que constituye el reactor fotoquímico han experimentado una evolución desde los primeros trabajos en los años setenta, hasta nuestros días.

La mayoría de las propuestas incorporan lámparas de arco (de mercurio, de xenón o de ambos), bien de presión alta o media^{33,34}, aunque también se han utilizado lámparas de mercurio de baja presión³⁵ y lámparas de “luz negra”³⁶.

Independientemente de la lámpara que se utilice, se tiene que cumplir la condición de que el espectro de radiación de ésta se solape con el de absorción del “analito”. La lámpara de arco de Xe-Hg presenta un espectro de abarca toda la zona del UV-VIS, teniendo validez general.

La desventaja que presentan las lámparas de arco es la cantidad de calor que generan, por lo que requieren el uso de sistemas de enfriamiento, ya que la elevación de la temperatura dentro del reactor puede provocar procesos químicos no deseados, tales como polimerizaciones. También la fluctuación de ésta es causa de un aumento en la irreproducibilidad de los resultados.

El uso de fuentes de baja presión ha sido propuesto³⁷ para sustituir a la anteriores, con objeto de conseguir la disminución en la complejidad, tamaño y costo de los reactores (no necesita de un equipo auxiliar). Este tipo de lámpara no provoca una elevación de la temperatura tan notable como las anteriores, con lo cual la reproducibilidad es mejor, al tiempo que no aparecen efectos negativos para el material de teflón utilizado en el reactor. Estas lámparas emiten un porcentaje alto de su radiación en el UV (el 85% de la radiación es emitida a la longitud de onda de 254 nm), radiación que resulta útil para muchas fotorreacciones.

La consideración última para elegir una lámpara de alta o baja presión, depende de la cinética particular de cada reacción. Tanto la intensidad de la fuente como el tiempo de irradiación influyen en la concentración de las especies intermedias. Esta concentración, a su vez, determina la de los distintos productos finales que, a menudo, corresponden a múltiples vías de reacción que existen en los procedimientos fotoquímicos. Un alto rendimiento en la obtención de la especie cuyas características

de detección son las más favorables, se puede conseguir con una adecuada combinación de intensidad y tiempo de irradiación.

Desde un punto vista práctico y mirando a su aplicación analítica, no resulta, sin embargo, imprescindible conocer la cinética de la reacción, dada la reproducibilidad en su avance.

Debido a la necesidad de utilizar radiación UV, los antiguos reactores eran de cuarzo y por lo tanto, frágiles, sin ninguna versatilidad para el operador, y difíciles de integrar en un montaje en flujo continuo. Posteriormente, se demostró la eficacia del material de teflón, que permite al operador variar la forma y condiciones de irradiación de un modo sencillo.

El politetrafluoroetileno (PTFE, teflón) es hoy en día el material más utilizado, sustituyendo ventajosamente al cuarzo. El PTFE resulta muy eficaz en la zona entre 200 y 300 nm a pesar de ser casi opaco a la radiación. Se explica su alta eficacia en esta zona por un mecanismo de reflexión interna (efecto "túnel de luz") de la escasa luz que atraviesa los microporos del polímero y que supone múltiples reflexiones en las caras internas del tubo. Unida a la gran eficacia del teflón, se presentan otras características como son el precio reducido, la facilidad de incorporarse a un sistema en continuo, la disponibilidad en varios diámetros, la obtención de picos con mejor simetría que con el cuarzo, y la facilidad de adaptación a cualquier geometría. Todo ello hace del teflón el material óptimo.

La única desventaja del teflón es su permeabilidad al oxígeno; esto puede hacer que en algún proceso la sensibilidad se vea disminuida si este elemento tiene un efecto negativo. En cuanto a la dispersión que provoca la incorporación del reactor al sistema, en líneas generales, ésta es pequeña.

Con el reactor utilizado por Scholten³³ para determinar fenotiacinas, se realizan experiencias de la dispersión que sufren las muestras, mediante la inyección de éstas con el reactor incorporado y sin él, tanto con la lámpara encendida como apagada. Los resultados son los que cabía esperar: aumento de la anchura de los picos con el reactor incorporado y modificación de la simetría del pico, siendo más simétrico si se dispone de un reactor con la lámpara funcionando. Experiencias complementarias demostraron que ello es debido al aumento de temperatura que provoca la lámpara (200W, Xe-Hg) y que afectaban a la difusión.

Con teflón se construyen los reactores simplemente con el tubo enfrente o enrollado en espiral a la fuente de radiación; también, como se ha citado anteriormente, y buscando la mayor eficacia posible, se proponen complicadas mallas del tipo KOT (*Knotted open tubular*), las cuales proporcionan la mínima dispersión en comparación con los enrollados en forma de espiral de las mismas dimensiones.

Engelhardt y Neue propusieron una disposición del tubo de teflón en la que éste formaba una figura de cuatro lados. Esta configuración se modificó por otra de seis lados con la intención de aumentar el área expuesta a la luz. El tubo no requiere soporte externo, y rodea directamente la lámpara, la cual va introducida dentro de una caja hecha con material tipo malla ("pegboard") a efectos de mejorar la ventilación y facilitar la comunicación entre la lámpara y el ventilador²². Se puede indicar que se ha determinado³⁷ que 12 metros de tubo de 0.3 mm de diámetro interno con esta configuración proporcionan la misma dispersión que un metro de tubo dispuesto linealmente. Existen otras propuestas posteriores que modifican las disposiciones citadas anteriormente, aumentando la complejidad en mayor o menor grado.

1.2.5. Variables experimentales

Las condiciones experimentales en las que tiene lugar la fotorreacción, tienen una importancia decisiva tanto en el rendimiento como en la velocidad de la “derivatización”. Entre las más influyentes, y según la reacción que se trate, se encuentran: el tiempo de irradiación (caudal y longitud del reactor), intensidad de la radiación (potencia de la lámpara y distancia hasta la disolución), así como la acidez y la polaridad del medio o la temperatura.

1.2.5.1. Tiempo de irradiación y dispersión de la muestra

El tiempo de irradiación constituye un factor clave, y en flujo continuo se encuentra muy ligado tanto al caudal como a la longitud del reactor; por tanto, es el efecto combinado de estos parámetros el que influye en la señal transitoria. Hay que recordar que se trata de procedimientos analíticos de tipo cinético (sin alcance del equilibrio final) y que en flujo continuo, el alargamiento de la longitud recorrida por la muestra o la disminución del caudal, influyen negativamente, sobre la dispersión de la muestra. Como ejemplo ilustrativo, en la figura 1.3. se puede apreciar la variación en el espectro de fluorescencia que proporciona una muestra de clorpromacina al ser irradiada a través de distintas longitudes de tubo de teflón dispuesto alrededor de una lámpara³⁸.

Este parámetro influye implícitamente en el ensanchamiento de las bandas, lo que provoca una menor resolución en los sistemas cromatográficos y un menor número de muestras procesables por unidad de tiempo en los sistemas FIA.

Gandelman y Birks³⁵, estudiaron la interrelación que existe entre el tiempo de irradiación y la dispersión, partiendo de la base de que cualquier reactor post-columna introduce al menos una pequeña dispersión y ésta puede ser minimizada al disminuir el radio, la longitud del reactor y el caudal. Puesto que el tiempo de reacción para un

reactor dado depende del volumen ($\pi r^2 L$) y del caudal, es claro que ambos parámetros influyen en la dispersión de modo contrapuesto. Llegan a la conclusión de que son más ventajosos los tubos con pequeño diámetro y con longitud alta. Sin embargo, por razones de conveniencia (trabajo a baja presión, precio, etc.), la mayoría de los estudios utilizan tubo con diámetro comprendido entre 0.2 y 2.0 mm de diámetro interno.

En los casos en que se necesita un tratamiento muy prolongado, se puede recurrir al empleo de flujo segmentado para reducir la dispersión. En esta técnica el eluyente se divide en segmentos por introducción de burbujas de aire o porciones de líquido inmisible. Después de suficiente tiempo de irradiación y antes del reactor, las burbujas son separadas, siendo la dispersión que se obtiene casi únicamente atribuible al tipo de separador utilizado.

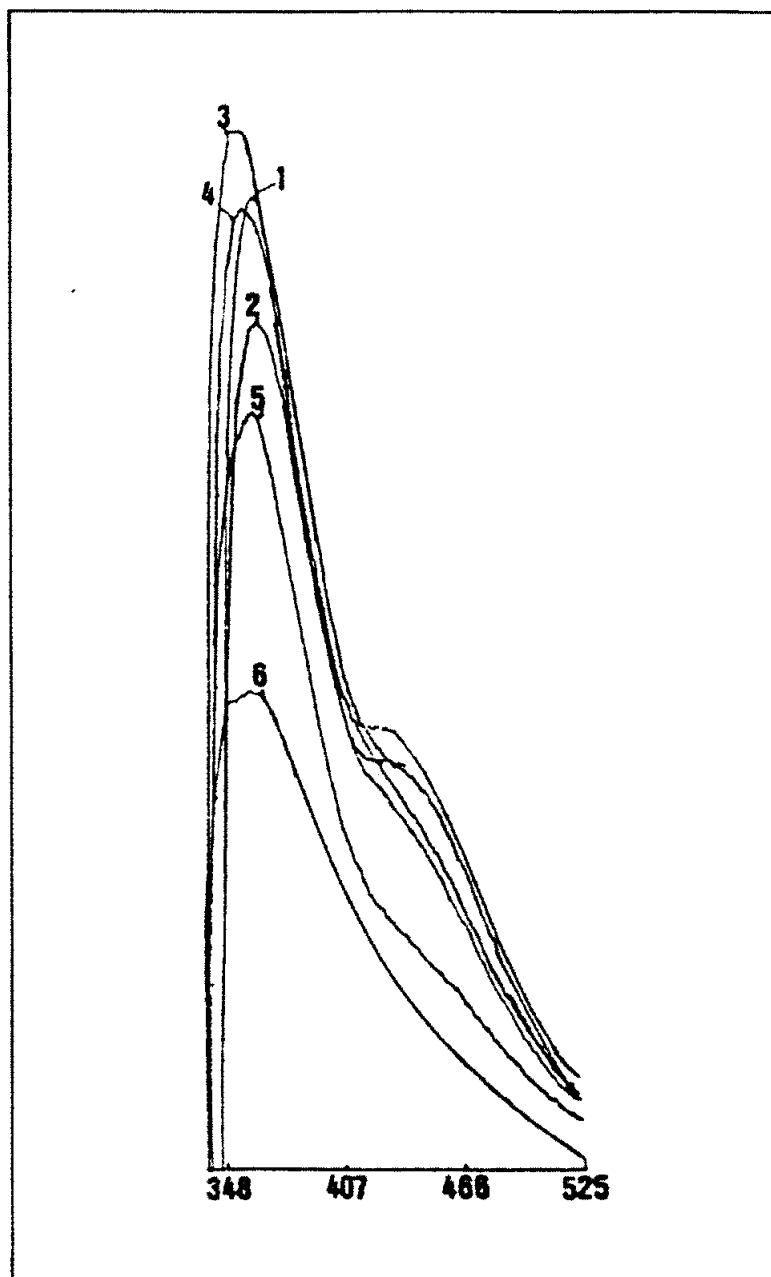


Figura 1.3.: Efecto de la variación de la longitud del tubo de teflón expuesto a la radiación UV. Espectros de emisión de una disolución de 20 ppm de clorhidrato de clorpromacina realizados con un caudal de 1.37 ml/min y con una longitud de onda excitación de 318 nm:

- 1) 25 cm (2.14 s); 2) 40 cm (3.43 s);
- 3) 60 cm (5.15 s); 4) 76 cm (6.43 s);
- 5) 1m (8.58 s); 6) 1.25 m (10.72 s)

Según las expresiones teóricas derivadas de estos estudios³⁶, la segmentación es ventajosa para tubos con diámetros de 0.15, 0.25 y 0.40 mm cuando los tiempos de reacción exceden de 1.3 – 26 s, 0.5 – 10 s y 0.2 – 4 s, respectivamente.

Bachman y Stewart³⁷ utilizan un método de optimización multivariante que aplican de modo conjunto al pH y al tiempo de irradiación utilizando un sistema HPLC fotoquímico y con detección amperométrica. La secuencia de experiencias que proponen estos autores consiste en el procesado de muestras preparadas a diferentes longitudes de reactores y manteniendo constante el caudal que resulta más adecuado para la separación cromatográfica.

1.2.5.2. Fuentes de radiación: intensidad, espectro y longitud de onda

Junto con el tiempo de irradiación, el espectro de la lámpara y su intensidad son los parámetros que caracterizan “el reactivo” utilizado en los procesos fotoquímicos.

La concentración instantánea de las especies intermedias tales como radicales o moléculas excitadas, depende de la intensidad de la luz, y en consecuencia, también los productos finales.

Según la cinética particular de la reacción, el rendimiento óptimo del producto de interés, puede obtenerse tanto para una alta intensidad y un tiempo de reacción corto, en algunos casos, como para bajas intensidades y tiempos de reacción largos, en otros. Incluso, es posible que resulte beneficioso un proceso que permita tiempos en que la reacción transcurre en la oscuridad y con ausencia de altas concentraciones de compuestos intermedios, continuando así el proceso químico por la vía que favorece el rendimiento del producto detectado.

Como se ha comentado anteriormente, la selectividad puede verse mejorada por la irradiación con longitudes de onda seleccionadas. Pese a ello, no se ha extendido el

uso de lámparas monocromáticas o de filtros ópticos; de hecho, la mayoría de las lámparas que se utilizan son aquellas que cubren todo el espectro o bien una zona en la que todas las sustancias absorben. En sistemas HPLC-hv-EC, se ha comprobado que es posible variar la selectividad³⁸ cambiando la usual lámpara de Hg por otra de Cd o Zn, pero entonces se ha de sustituir el reactor de teflón por otro de cuarzo, ya que las radiaciones propias de estas lámparas no son efectivas a través del teflón; esto supone, considerables desventajas operativas.

El estudio de la influencia de la longitud de onda óptima para conseguir la fotodegradación, se debería realizar actuando directamente sobre la disolución problema o si la disposición de las lámparas no lo permite, a través de un material transparente a las longitudes de onda ensayadas.

Con estas consideraciones, se realizó un estudio sobre la reserpina⁴⁰, utilizando las radiaciones de una lámpara de deuterio y otra de xenón, a través de una cubeta de cuarzo que contenía el fármaco. Los incrementos de altura de la señal obtenida en el registrador con respecto a la que ofrecía el blanco han sido representados (figura 1.4.) para las diferentes longitudes de onda ensayadas. En el examen de estas curvas se ha de tener en consideración que las lámparas no emiten con la misma intensidad en todo el espectro; esta es la razón por la que en la figura se adjuntan los espectros y potencias correspondientes a las dos lámparas. La serie de medidas realizadas con la lámpara de deuterio permiten descartar como óptimas el uso de radiaciones cuya longitud de onda sea menor de 244 nm. Los resultados obtenidos con la de xenón señalan las longitudes menores de 300 nm como las más apropiadas. En consecuencia, de estas experiencias, únicamente se puede extraer un intervalo conveniente de trabajo que, para la reserpina, se sitúa entre 244 y 300 nm. Finalmente, se usó una lámpara de baja presión de Hg porque emite en la zona óptima, proporcionando buenos resultados y además, resulta fácilmente accesible.

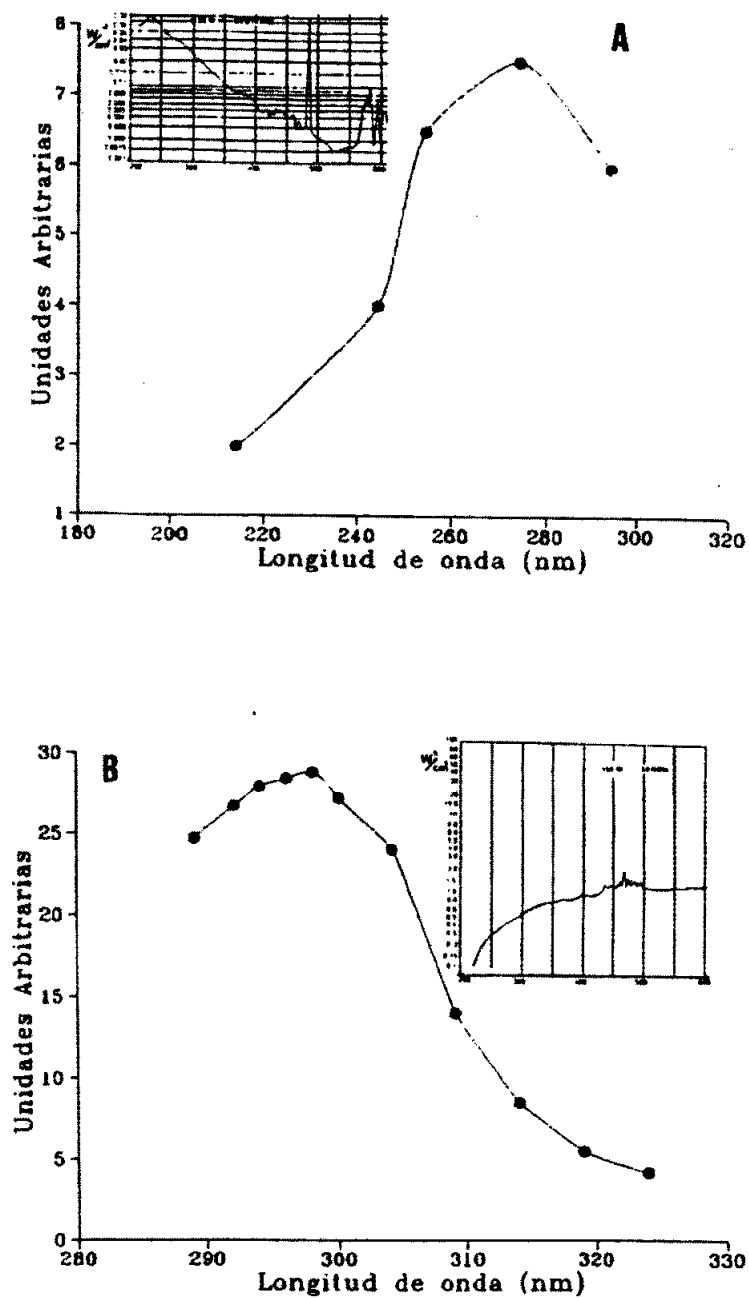


Figura 1.4.: Influencia de la longitud de onda con la que se irradia una disolución de reserpina (HAc 1M) en la variación que experimenta la intensidad de fluorescencia a λ excitación 382 nm y λ emisión 486 nm.

1.2.5.3. Polaridad del medio

La polaridad del medio puede resultar decisiva, especialmente cuando la detección es fluorimétrica. En un estudio³³ con el clobazán y el desmetilclobazán, fármacos ambos que no poseen fluorescencia propia, realizado con un sistema HPLC-hv-FI, se utilizan portadores de distinta polaridad, incluyendo el agua. Se observa que al aumentar la polaridad (desde el acetonitrilo al metanol), se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia en el caso del clobazán, mientras que la tendencia opuesta se manifiesta con el otro fármaco.

Se podría, por tanto, indicar que la polaridad del disolvente tiene, a menudo, un efecto decisivo sobre la respuesta obtenida. Todavía no se puede explicar el porqué muestran conductas opuestas, pero se sospecha que ello está relacionado con la distinta estabilidad de los estados excitados.

Aparecen resultados anómalos con el agua en los dos casos, si se considera exclusivamente su polaridad. La posible explicación a este comportamiento se atribuye a la gran diferencia que existe con respecto a los disolventes orgánicos en cuanto a viscosidad, capacidad calorífica, etc.

1.2.5.4. Influencia del contenido en oxígeno disuelto

Como en el caso de la polaridad, este factor tampoco exhibe un comportamiento uniforme.

La vitamina K y sus homólogos, fueron estudiados³⁷ profundizando en algunos de sus aspectos caracterizadores de las reacciones fotoquímicas, tales como el efecto del contenido en oxígeno. La vitamina K no posee fluorescencia nativa. Experiencias de irradiación en estático, proporcionan más de tres productos diferentes, pero si se

añaden pequeñas cantidades de ácido áscorbico, únicamente se forma la hidroquinona. Si en los disolventes empleados se reduce la cantidad de oxígeno por burbujeo previo con nitrógeno, resulta un incremento de la sensibilidad que los autores han atribuido a la potenciación de una de las vías de la fotodescomposición que conlleva a la formación de hidroquinona, cuyas propiedades fluorescentes son óptimas.

La concentración de oxígeno más conveniente dependerá, por tanto, de la ruta de degradación concreta a considerar. Además, en el caso de que el detector sea fluorimétrico, el exceso de oxígeno provoca un efecto amortiguador de la intensidad de emisión.

1.3. LECHOS INMOVILIZADOS

1.3.1. Generalidades

El análisis por inyección de flujo (FIA) fue diseñado originariamente como un vehículo para la conversión en sistemas homogéneos del componente de una muestra en una especie medible. Este rasgo continúa siendo todavía una de las principales funciones de la técnica, a pesar de ello, es muy alto el número de publicaciones que incluyen lechos reactivos dada la versatilidad y posibilidades de estos sistemas.

En los lechos reactivos tiene lugar una "inmovilización" o confinamiento de reactivos en un lugar del sistema de flujo continuo; a través o sobre ellos fluye el caudal de muestra-portador o de reactivos teniendo lugar la reacción en la interfase sólido-disolución. El confinamiento de estos reactivos se puede conseguir por tratarse de productos insolubles o bien por haber sido anclados a un soporte sólido estable al flujo con ayuda de algún mecanismo físico o químico.

Las ventajas inherentes de la conversión en fase heterogénea sólido-líquido que tiene lugar al utilizar lechos reactivos es que la conversión del analito tiene lugar donde no hay dispersión de la muestra, ya que dicha conversión ocurre en la interfase sólido-líquido⁴¹. Existen además algunas ventajas de tipo operativo en el uso de lechos reactivos en FIA frente a los métodos basados en sistemas homogéneos. Cuestiones como la simplificación de los montajes por reducción del número de canales; mejoras en sensibilidad y frecuencia de muestreo imputables a la menor dispersión que sufre la muestra y mayor grado de reactividad; mejora de la selectividad cinética al estar el reactivo confinado en un espacio reducido; posibilidad de utilizar reactivos inestables o insolubles, así como evitar que llegue al detector un exceso de reactivos, son entre otras las ventajas más llamativas.

Un lecho reactivo, entendido como tal el reactivo y el soporte empleado en el confinamiento del reactivo en el sistema de flujo, debe reunir una serie de características tales como el tamaño de partícula adecuado que permita el trabajo a bajas presiones, siendo ésta una de las principales ventajas de la metodología FIA; estabilidad mecánica al flujo continuo, inercia química frente al portador o reactivos y no adsorción ni de analitos ni de productos a fin de evitar la contaminación de unas muestras a otras. El soporte además debe reunir buenas características de mojabilidad, debe ser inmune frente a la degradación microbiana (imprescindible en aquellos sistemas para el tratamiento de muestras biológicas), y compatible con el sistema de detección (caso de que el reactor se emplaza en la misma celda del detector).

Las estrategias utilizadas en la obtención de lechos reactivos hacen referencia tanto a los mecanismos físico-químicos para inmovilizar el reactivo como a la forma o configuración que ha de tener el reactor.

Los sistemas para llevar a cabo la inmovilización son muy variados dependiendo de la naturaleza del reactivo a inmovilizar y de la finalidad de la inmovilización (reconcentración, conversión, etc.).

Atendiendo al número de aplicaciones encontradas, los lechos reactivos se clasifican en no enzimáticos y enzimáticos, según la naturaleza del reactivo inmovilizado (ya sea una enzima o no). La descripción de estos dos tipos se desarrolla posteriormente en sus correspondiente apartados.

Si se presta atención al tipo de inmovilización del reactivo en el lecho podemos considerar dos grandes grupos:

a) *Inmovilización natural:*

- Reactivos de baja solubilidad (sales inorgánicas, óxidos metálicos, minerales, metales, amalgamas, etc).
- Adsorbentes
- Resinas intercambiadoras
- Enzimas en su "entorno natural" (bacterias, tejidos animales o vegetales, células)

b) *Inmovilización física o química del reactivo sobre un soporte sólido.*

- Membranas microporosas
- Atrapamiento en gel
- Confinamiento (atrapamiento) físico
- Adsorción física
- Enlace covalente.- CPG (vidrio con tamaño de poro controlado) o vidrio silanizado (glutaraldehído, isotiocianato, carbodiimida, etc.)
- Carbón (carbodiimida, etc).

1.3.2. Lechos no enzimáticos

La inmovilización "natural" es una técnica especialmente simple, ya que se reduce al confinamiento del reactivo en alguna parte del sistema FIA. Las restricciones impuestas a esta modalidad vienen dadas fundamentalmente por las limitaciones hidrodinámicas del material inmovilizado (fortaleza física al flujo continuo y compatibilidad con la metodología FIA de bajas presiones, aspecto este íntimamente relacionado con el tamaño de partícula) y la reactividad química (selectividad frente al analito e insolubilidad en el medio de reacción).

Esta estrategia es con diferencia la más empleada en la confección de lechos reactivos no enzimáticos para su uso en FIA y análisis farmacéutico.

Así, por ejemplo, se ha propuesto un método para la determinación de metadona por medio de la reducción del fármaco con una microcolumna reductora de Cd o Zn y detección por espectrofotometría de absorción atómica. La reducción de los grupos cetónicos del fármaco transcurre en medio ácido, produciéndose una disolución parcial del reactor. La diferencia entre las señales obtenidas al inyectar un blanco (agua a pH ácido idéntico a la muestra) y al inyectar metadona resulta ser proporcional a la cantidad de fármaco en la muestra⁴².

Un reactor de dióxido de manganeso microcristalino permite la determinación espectrofotométrica de epinefrina mediante la monitorización del producto de oxidación⁴³.

La oxidación de prometazina a un color rojo, imputable al radical libre producto de la oxidación del fármaco, se lleva a cabo haciendo uso de un reactor de arsenito de cerio(IV). Dicho compuesto es sintetizado previamente a partir de arsenito sódico y nitrato cérico. La detección se efectúa espectrofotométricamente a 514 nm.⁴⁴

Este mismo reactor ha servido para la determinación fluorimétrica de flufenacina en medio fosfórico 0.01 M.⁴⁵

La utilización de reactivos en polvo finamente dividido puede ser una limitación de la técnica FIA al obligar a utilizar elevadas presiones. Los problemas de presión derivados de la oposición mecánica que estos reactivos oponen al flujo continuo pueden resolverse mediante la utilización de un sistema de bombeo alternativo a la clásica y universalmente utilizada bomba peristáltica (una bomba de pistón de las utilizadas habitualmente en HPLC) y mediante el reforzamiento mecánico del sistema de flujo. La glicina ha sido determinada por espectrofotometría de absorción atómica en un sistema FIA de alta presión como el descrito. El reactor, una columna de carbonato básico de cobre en forma de polvo finamente dividido y de dimensiones extraordinariamente reducidas (0.5 cm de longitud y 0.9 mm de diámetro

interno), libera una cantidad de cobre proporcional a la concentración de aminoácido inyectada⁴⁶.

Otra de las técnicas empleadas en la preparación de lechos reactivos se basa en el atrapamiento o confinamiento del reactivo durante el proceso de inmovilización. Particularmente interesante ha resultado el uso de resinas de poliéster. El reactivo objeto de inmovilización queda físicamente atrapado en la matriz polimérica. El proceso de polimerización transcurre en condiciones suaves y permite que el bloque reactivo-resina obtenido sea manipulado mecánicamente para la obtención de "reactivo" con las características de tamaño y reactividad deseadas. Esta técnica se ha aplicado a la inmovilización de carbonato de cobre y determinación de aminoácidos: el cobre liberado en la reacción de complejación con el aminoácido monitorizado a 324.8 nm por espectrofotometría de absorción atómica⁴⁷ o por posterior reacción con zincon y detección espectrofotométrica a 600 nm, permite la determinación indirecta de glicina, alanina, histidina, leucina, prolina y fenilalanina⁴⁸.

El atrapamiento de dióxido de manganeso o de plomo^{49, 50} proporciona lechos oxidantes para diferentes medicamentos; la posterior monitorización por AAS del metal liberado ha permitido determinar isoniazid y dipirona a 279.5 nm y 217 nm respectivamente.

A medio camino entre la inmovilización "natural" y por enlace químico se encuentra la utilización de resinas de intercambio iónico. Pueden ser utilizadas varias modalidades diferentes y no solo como meros intercambiadores de iones.

La inmovilización de hexacianoferrato (III) sobre resinas aniónicas fuertes ha servido para la oxidación de varios fármacos. El paracetamol puede ser determinado espectrofotométricamente tras ser oxidado debido al color azul desarrollado con fenol en medio amoniacal⁵¹. La señal analítica obtenida de este modo es aproximadamente el doble de la obtenida cuando el oxidante se emplea en disolución. La detección

fluorimétrica de tiamina⁵² es posible también mediante estos lechos de preparación sencilla (basta poner en contacto la resina aniónica fuerte con una disolución concentrada de hexacianoferrato (III)) y gran capacidad de carga y estabilidad.

1.3.3. Lechos enzimáticos

Los enzimas son catalizadores biológicos extraordinariamente eficientes que pueden incrementar en varios ordenes de magnitud la velocidad de las reacciones químicas, en muchos casos muy complejas. Su interés analítico radica principalmente en su elevada selectividad y la capacidad de autoregeneración vía ciclo catalítico.

Gran número de reacciones serían analíticamente inútiles realizadas sin la presencia de enzimas. No obstante, la utilización de enzimas ha sido durante mucho tiempo muy restringida debido fundamentalmente a la dificultad y coste de los procesos de aislamiento y purificación y a la inestabilidad en solución acuosa de la mayor parte de enzimas, lo cual acarrea la consiguiente pérdida de su capacidad catalítica, no pudiéndose recuperar de tales disoluciones y regenerar su actividad.

Estos inconvenientes han sido minimizados por medio de las técnicas de "inmovilización" de enzimas, que consisten básicamente en la fijación de las proteínas enzimáticas a soportes sólidos o poliméricos. De este modo, la enzima retiene sus propiedades catalíticas durante mucho más tiempo, puede ser reutilizada un elevado número de veces y además de forma continua.

Existen numerosas maneras de inmovilizar una enzima, pero la mayoría de estas técnicas se pueden considerar bien como métodos químicos o físicos de inmovilización. La diferencia fundamental entre estas dos modalidades radica en la "agresividad" del procedimiento de inmovilización y en la estabilidad de los lechos obtenidos. Así pues, los métodos químicos proporcionan lechos de mayor estabilidad mecánica al flujo continuo y la reactividad es menos susceptible de variaciones con el

tiempo, no obstante, la naturaleza química de la unión enzima-soporte puede modificar el centro activo de la enzima y ocasionar pérdida de la actividad enzimática. Hay que resaltar la simplicidad de los métodos físicos de inmovilización.

Entre las técnicas y estrategias para llevar a cabo la inmovilización cabe resaltar:

1. Confinamiento de la disolución por membrana microporosa, técnica utilizada en la preparación de electrodos para su uso en flujo continuo⁵³.
2. Atrapamiento en gel, la enzima queda atrapada en la matriz del gel en formación⁵⁴, aquí podrían incluirse los electrodos de pasta de grafito⁵⁵.
3. Adsorción física de la enzima a un soporte inerte e insoluble (vidrio, óxidos metálicos), tiene muy poca aplicación en métodos en flujo continuo.
4. Resinas de intercambio iónico, por asociación con los grupos cargados de la superficie de la proteína⁵⁶.
5. Con la enzima ligada covalentemente a un soporte sólido por medio de los abundantes grupos nucleófilos (cadenas laterales de los aminoácidos)⁵⁷.

El grupo de los lechos reactivos que contienen una enzima ligada covalentemente a un soporte es el más importante. La obtención de estos lechos es muy fácil y puede ser realizada bajo condiciones químicas muy suaves. En la figura 1.5. se muestran los mecanismos propuestos para modificar una superficie y dejarla apta para enlazar químicamente sobre ella un enzima. Estas superficies pueden ser de poliestireno, nylon, nylon parcialmente hidrolizado, carbohidrato y vidrio o óxidos metálicos.

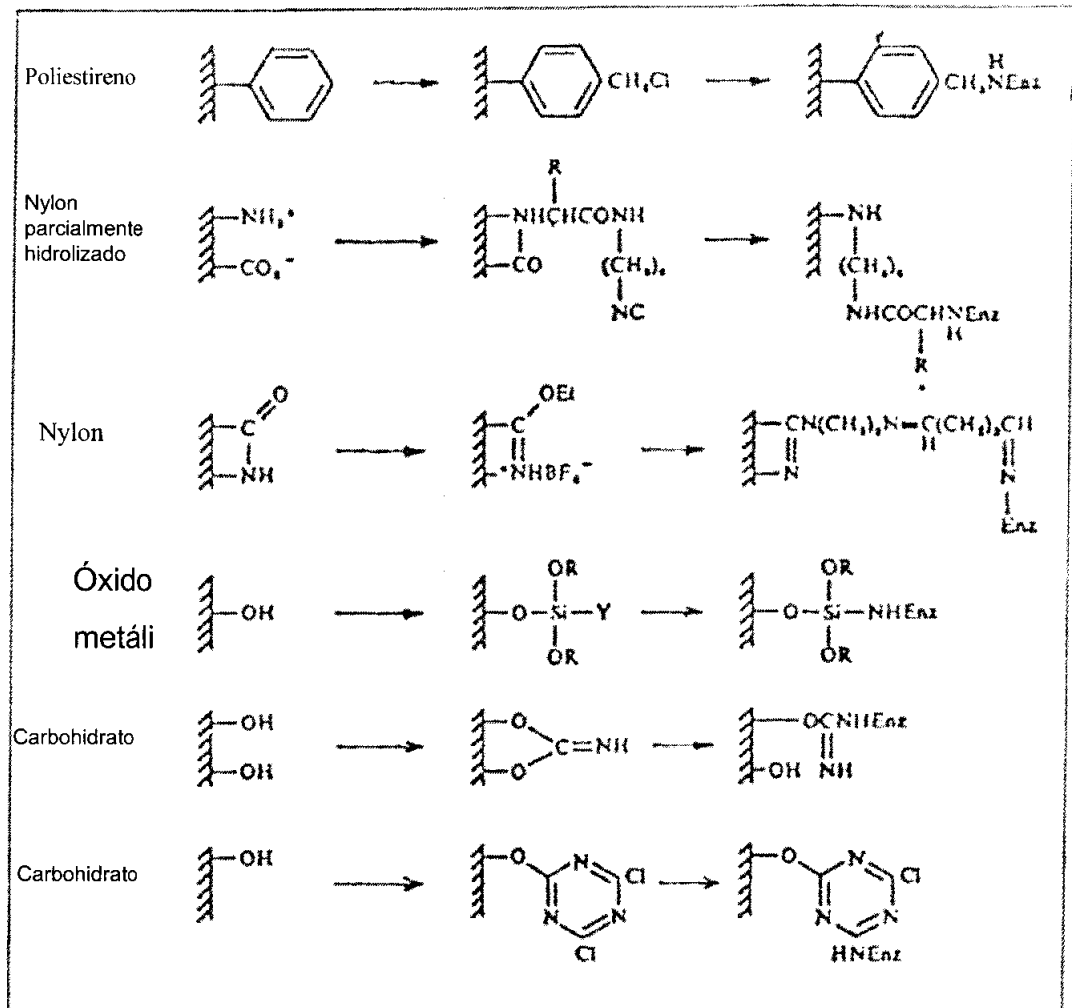


Figura 1.5.:

Mecanismos propuestos para la modificación de superficies e inmovilización de enzimas.

Enz: enzima.

El soporte más usado es el vidrio poroso controlado (CPG), el cual es silanizado con una solución en acetona del silano seleccionado durante 10-20 minutos. Posteriormente la enzima es fijada en el derivado resultante con la ayuda de compuestos como el glutaraldehído, isotiocianato, carbodiimida (en un soporte de fibra

de carbono)^{67, 68}, triazina o en un colorante azoico. Este procedimiento permite la inmovilización de una gran variedad de enzimas para obtener lechos reactivos de gran estabilidad para trabajar en flujo continuo, algunos de estos lechos pueden llegar a tener una vida de 2 años. El método escogido depende de la enzima implicada, de tal manera, que el glutaraldehido no es aconsejable para la inmovilización de peroxidasas por copulación azoica, pero resulta bastante más apropiado para lactato deshidrogenasa.

El glutaraldehido une los grupos amino de la superficie del vidrio y de la enzima. (figura 1.6.) Los aminosilanos se utilizan para proveer de grupos amino a la superficie del vidrio. En cualquier caso, la efectividad de la silanización viene determinada por el disolvente y el procedimiento experimental usado.

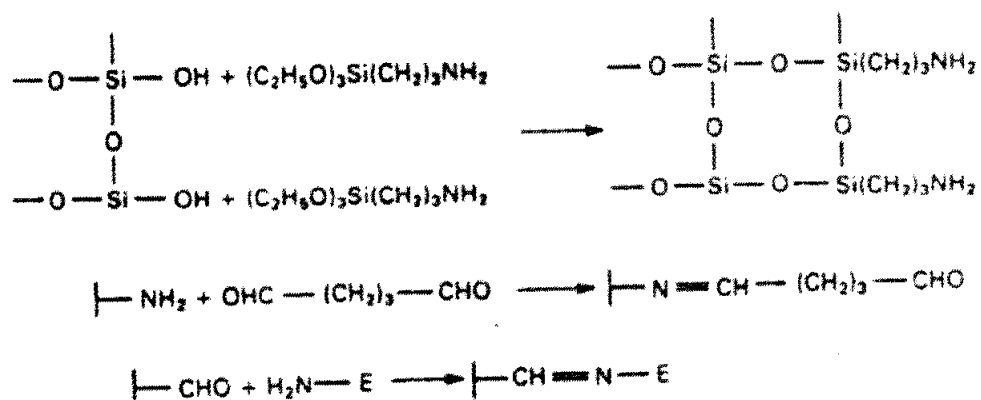


Figura 1.6.: Proceso químico de silanización con glutaraldehido.

E: enzima

La sílice proporciona excelentes propiedades para ser utilizada como soporte, incluso mejores que los polímeros orgánicos, gracias a la posibilidad de enlazar un gran número de grupos químicos por medio de diferentes agentes silanizantes, la relativamente alta relación de intercambio, el corto tiempo de equilibrio, y una buena resistencia a los cambios de disolvente por debajo de pH 9. El vidrio de poro controlado (CPG) proporciona poros de tamaño y superficie específica muy definidos, por tanto es el soporte usado mayoritariamente en estas técnicas.

1.3.4. Tipos de configuración y ubicación de los lechos reactivos

Al hablar de estrategias, como se ha indicado, también hay que tener en cuenta la configuración del lecho⁵⁸. Esto ha llevado a la preparación de reactores para su uso en FIA con una configuración distinta a la denominada packed-bead reactor. Las configuraciones posibles se muestran en la figura 1.7. y corresponden a los siguientes tipos:

Reactores abiertos: El fluido atraviesa libremente el reactor, sólo hay inmovilización en la zonas internas periféricas del mismo.

1. Reactor tubular abierto: el reactivo es inmovilizado en las paredes internas del tubo, que son de vidrio o de cuarzo.
2. Partículas incrustadas: Las partículas de vidrio, donde se encuentra inmovilizado el reactivo, están incrustadas en las paredes del reactor, normalmente de material polimérico.
3. “Estalagmitas”: Surgen con la intención de aumentar la superficie activa del reactor. Las paredes de vidrio sufren un tratamiento para obtener las protusiones que se muestran en la figura 1.7. Son reactores frágiles, ya que las “estalagmitas” se rompen con facilidad. Además presentan el problema de la falta de reproducibilidad. No se pueden obtener dos reactores iguales. Mottola y col. proponen un sistema de flujo para la determinación de reserpina por oxidación con

periodato en presencia del catalizador Mn(IV), el cual es inmovilizado como MnO cristalino y fijado en las paredes internas del tubo de tygon o de PTFE a modo de "estalagtitas"⁵⁹.

4. Impregnado: el reactivo se encuentra impregnado en las paredes del reactor, por ejemplo en las paredes internas de los tubos de succión de una bomba peristáltica.

Reactores rellenos: La superficie activa o de contacto con el fluido es mucho mayor.

1. Reactor de lecho empacado: Las partículas sólidas (reactivo o reactivo más soporte) son ubicadas dentro del reactor, de tal manera que ocupan la mayor parte del espacio disponible. Consideraciones teóricas sugieren que estos reactores minimizan la anchura de la base del pico FIA (menor dispersión) y son más sensibles (mayor concentración de reactivo y superficie específica). Por contra, la mayor exigencia al flujo supone mayores exigencias a los sistemas de propulsión y a la resistencia mecánica del sistema.
2. "Collar de perlas": La distribución de las partículas se aprecia en la figura 1.7. La diferencia con el reactor de lecho empacado consiste en el tamaño de las partículas. En el caso del collar de perlas, éstas tienen un tamaño de aproximadamente el 70% del diámetro del reactor.

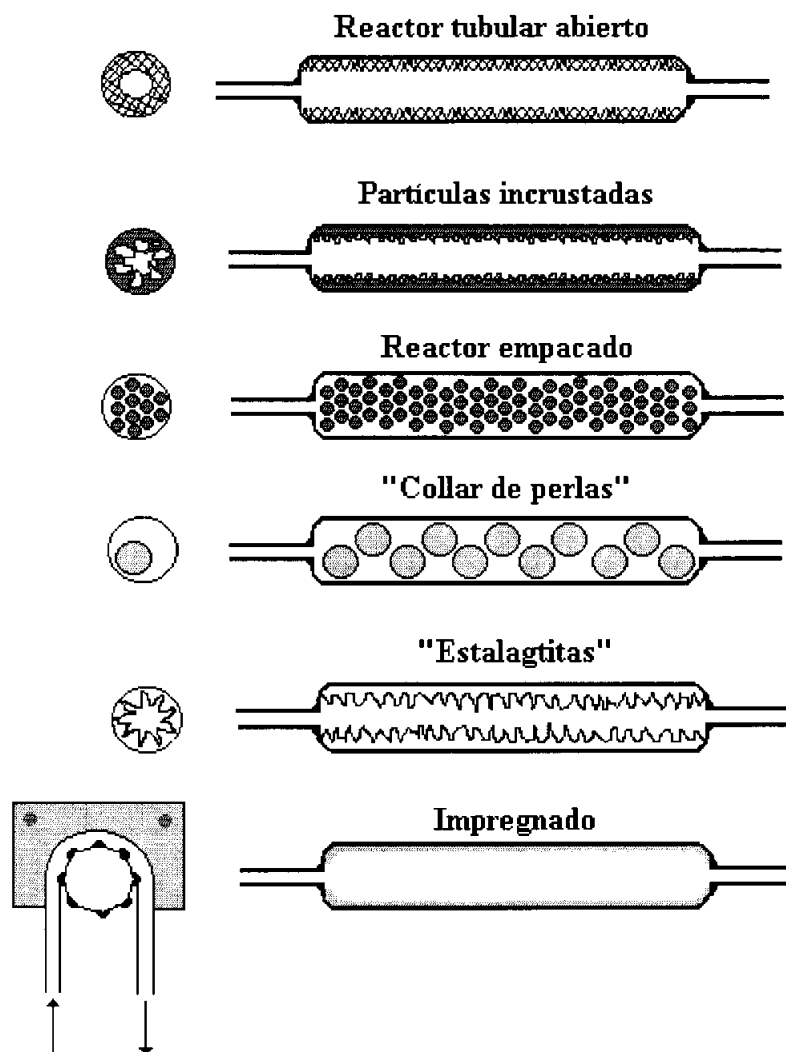


Figura 1.7.: Tipos de configuración de los lechos reactivos.

La ubicación del reactor dentro del montaje FIA ofrece un gran número de posibilidades (ver figura 1.8.) y esta íntimamente relacionada con la función analítica del reactor: conversión del analito, (es con diferencia la modalidad mas extendida), pretratamiento de muestra o reactivos, o combinación con el detector.

La ubicación 1 esquematizada en la figura 1.8. se utiliza para la preparación del reactivo, por ejemplo para su purificación mediante adsorbentes o resinas de intercambio iónico, o para su transformación. Podemos citar, la reducción de nitratos a

nitritos con una columna de Cd-cuperizado para obtener nitritos “in situ” (reactivo utilizado en muchos análisis de fármacos). Al utilizar disoluciones de nitratos, se elimina el problema de la inestabilidad de las disoluciones de nitritos, las cuales hay que preparar diariamente y conservar en frío.

El lecho reactivo se puede situar en el canal de la muestra antes de la válvula de inyección (fig. 1.8., ubicación 2) con la finalidad de realizar un tratamiento de la muestra, para casos en que sea necesaria una purificación, una reacción previa o una preconcentración (el analito es retenido en la columna y posteriormente es eluído).

La posibilidad explotada con más frecuencia sitúa al lecho reactivo entre la válvula de inyección y el detector en reacciones de conversión (fig. 1.8., ubicación 3).

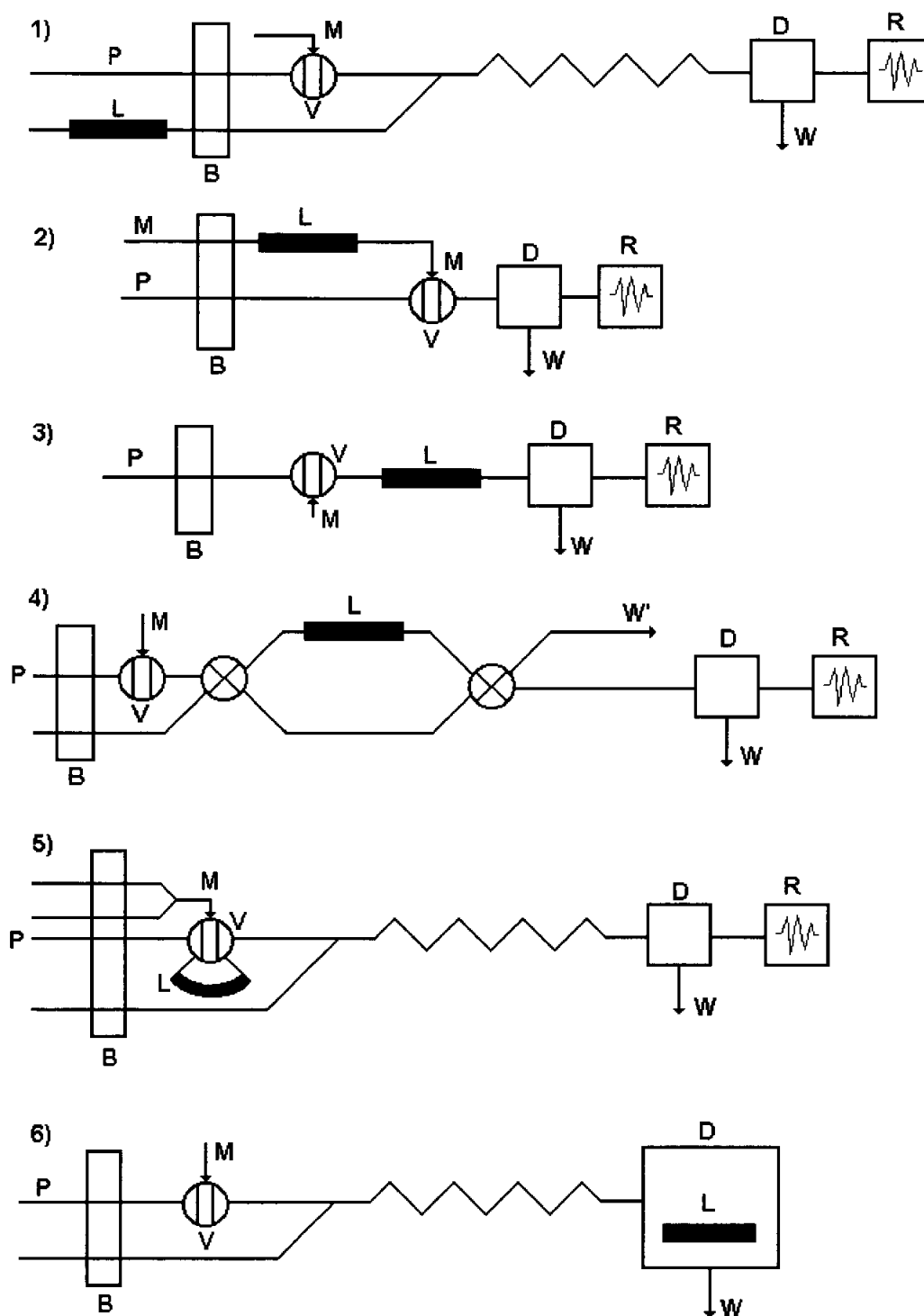


Figura 1.8.: Diferentes posibilidades de ubicación del reactor en el montaje FIA.

P: portador, M: muestra, B: bomba, V: válvula de inyección, D: detector, R: registro,
W: residuos, L: lecho reactivo.

Un montaje bicanal en el que uno de los canales dispone de un lecho reactivo permite la especiación o determinación sucesiva de varias sustancias (fig. 1.8., ubicación 4). Se ha propuesto un sistema de flujo para la resolución de mezcla de L-cisteína y L-cisteína. El procedimiento está basado en la rápida oxidación de L-cisteína por Ta(III) y determinación fluorimétrica del Ta(I) formado. La inclusión de una válvula selector y de una columna Cu-Cd permite el by-pass de la columna reductora (determinación de cisteína) o alternativamente la reducción de la mezcla (determinación conjunta de cisteína y cisteína)⁶⁰.

El reactor puede también situarse en el bucle de muestra (fig. 1.8., ubicación 5). Bajo esta configuración se ha determinado paracetamol mediante columnas oxidantes de hexacianoferrato(III) inmovilizado sobre resinas aniónicas fuertes⁶¹. Esta modalidad permite aumentar la señal analítica y disminuir el tiempo de residencia; también puede ser un montaje alternativo al tratamiento previo de las muestras, por ejemplo, para preconcentración del analito, facilita el simplificar el montaje al permitir con una sola llave seleccionar las distintas etapas del proceso: inyección de muestra, elución y reacondicionamiento de las resinas. Cuando su misión es la de conversión todo el volumen de muestra está en contacto con el reactivo antes de empezar la dispersión en el seno del portador y para reacciones lentas evitaría usar la técnica de stopped-flow que exige un perfecto control de los ciclos de apertura y cierre de las válvulas de inyección.

Otra posibilidad consiste en emplazar el lecho en el sistema de detección, bien formando parte del mismo (electodos), o bien en la celda de flujo del detector (fig. 1.8, ubicación 6).

Zhou y Wang han estudiado la selectividad de un electrodo recubierto con una película de Nafion que retiene fármacos catiónicos, como la prometazina, bajo distintas condiciones experimentales, tales como el efecto competitivo de los cationes de las tampones, el grosor del film, el pH de la fase móvil, etc⁶².

La integración de las etapas de conversión y detección es una tendencia lógica, no solo por que permite la miniaturización de los montajes FIA, sino también porque incrementa notablemente la sensibilidad de la detección, pues el analito que ha reaccionado no sufre dispersión en el camino hacia el detector.

“Optosensing at active surface” (optrodos) puede considerarse una cristalización de este concepto. En los *optosensing manifolds* se explotan las interacciones energía radiante-materia (reflectancia, fluorescencia, absorción) debidas a reacciones químicas que tienen lugar en una superficie (sobre ella o en sus cercanías) sobre la que fluye la disolución. Esta superficie puede ser de estructura fibrosa, una membrana de difusión, un intercambiador iónico, etc, cuyos cambios de color o de fluorescencia son la medida de las reacciones que tienen lugar en la celda de flujo. Operaciones analíticas de separación o concentración también son susceptibles de ser efectuadas con esta modalidad.

Valcarcel y col. determinan una mezcla de aminas inmovilizadas sobre C18 que retiene el analito en la celda de flujo. Un espectrofotómetro de fila de diodos permite el análisis de los componentes⁶³.

El éxito de los *optosensing manifolds* esta íntimamente ligado al desarrollo de nuevos sistemas de detección. Sensores químicos incluyen fibras ópticas que conectan los puntos en los tiene lugar reacción, retención o detección. Los microcircuitos integrados son el ejemplo más representativo del uso de fibras ópticas como interfase entre un detector convencional y un sistema FIA micro. Los *optosensing at active surface* han revolucionado las técnicas de espectroscopía molecular.

El acoplamiento FIA-AAS permite la determinación indirecta de gran numero de medicamentos mediante la precipitación in-situ con cationes metálicos.

Clorhexidina y levamisol se han determinado por precipitación con Cu(II) y tetraiodomercuriato respectivamente, seguido del lavado y posterior redisolución del precipitado con la consiguiente liberación del metal^{64, 65}.

Otra estrategia se basa en la inyección del agente precipitante en un portador formado por el medicamento. La diferencia entre las señales obtenidas cuando el portador es agua o el analito resulta ser proporcional a la concentración del medicamento. De este modo se incrementa substancialmente la velocidad de inyección⁶⁶.

El uso de lechos reactivos no solo ha supuesto la incorporación de nuevas modalidades de detección, sino que ha rescatado y explotado con éxito, ampliando su campo de determinaciones técnicas usuales en el análisis químico. Tal ha sido el caso de las técnicas electroquímicas, especialmente la proliferación de electrodos con selectividad y sensibilidad adecuadas que cubren un amplio espectro de necesidades analíticas.

1.4. QUIMIOLUMINISCENCIA

1.4.1. Aspectos teóricos de la quimioluminiscencia

Muchos sistemas químicos son luminiscentes, es decir, al ser excitados regresan a su estado normal por la emisión del exceso de energía que poseían, manifestándose ésta en forma de radiación electromagnética.

Los dos fenómenos de utilidad analítica más conocidos de luminiscencia son la fluorescencia y la fosforescencia. No obstante, existe otra manifestación de la luminiscencia que ha ido cobrando un mayor protagonismo analítico, se trata de la quimioluminiscencia.

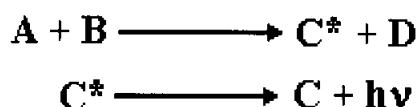
La quimioluminiscencia, empleando una definición sencilla, es la producción química de radiación, en la que el estado excitado se produce como consecuencia de la energía resultante en una reacción química, ya sea a temperaturas ordinarias o también se pueden incluir aquellos fenómenos en que la emisión de energía radiante es superior a la previsible para un cuerpo negro a las mismas longitudes de onda y temperatura, de esta manera se amplía el concepto de quimioluminiscencia a procesos que tienen lugar en llamas.

En la reacción quimioluminiscente, se origina un estado intermedio con una especie que se encuentra en un estado electrónico excitado y su desactivación provoca una emisión de radiación en las regiones UV, IR o visible del espectro. Según el mecanismo de la reacción quimioluminiscente se habla de quimioluminiscencia directa o de quimioluminiscencia indirecta.

El desarrollo de las aplicaciones de la quimioluminiscencia en química analítica es relativamente reciente, pero en un corto plazo de tiempo, estas técnicas han alcanzado una gran importancia práctica, sobre todo en el ámbito del control de la contaminación, y esto se debe básicamente a las sensibilidades que se pueden alcanzar, así como la selectividad que presentan estos métodos.

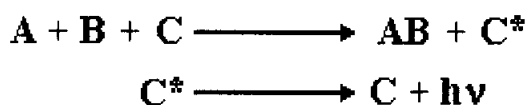
Quimioluminiscencia directa:

La emisión de radiación electromagnética tiene lugar a partir de un producto de la propia reacción.

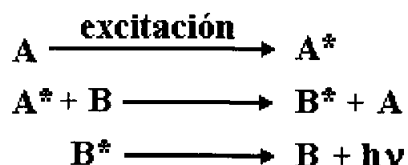


Quimioluminiscencia indirecta:

La emisión de radiación se produce a partir de otra molécula (C) a la que el producto excitado ha transferido su energía.



También se puede dar el caso de que la transferencia de energía se efectúe a través de un estado metaestable.



La especie que no participa directamente en la reacción recibe el nombre de fluoróforo.

La energía que se libera en estas reacciones proviene de transiciones electrónicas a niveles inferiores en las moléculas o iones. El hecho de que se trate de un proceso de fluoroquimioluminiscencia o de fosforoquimioluminiscencia, así como la longitud de onda emitida tras la reacción dependen del tipo de estado excitado que nos encontremos. Se define un rendimiento cuántico para los procesos de luminiscencia en base a las constantes de velocidad de aquellos procesos que se vean implicados en la emisión de radiación (desactivación energética).

En el caso de la quimioluminiscencia resulta conveniente expresar el rendimiento (Φ) mediante la expresión

$$\Phi = \frac{\text{n}^\circ. \text{ de fotones emitidos}}{\text{n}^\circ. \text{ de moléculas reaccionantes}}$$

En una reacción química existen procesos competitivos de activación y reacciones parásitas adicionales, teniendo esto en cuenta el rendimiento de la fluoroquimioluminiscencia (Φ_{QL}) viene dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_{QL} = \Phi_R \cdot \Phi_{ES} \cdot \Phi_L$$

siendo Φ_R la fracción de moléculas que siguen la reacción de interés, Φ_{ES} la eficacia en la producción de moléculas en estado excitado y Φ_L la eficacia luminiscente.

A la vista de la expresión anterior, se deduce que para que una reacción quimioluminiscente sea eficaz, ésta requiere una producción selectiva del intermedio y una eficaz conversión del mismo en un producto en un estado singlete excitado altamente fluorescente. En general, los rendimientos obtenidos en procesos quimioluminiscentes son relativamente bajos, para el caso del luminol, el rendimiento se encuentra en el intervalo 0.01 – 0.05.

Sin embargo, los procesos bioluminiscentes poseen un rendimiento mucho más elevado. Las luciferinas (responsables de la bioluminiscencia de las luciérnagas) tiene un rendimiento de aproximadamente 1 (100%).

Existen una serie de razones que explican el bajo rendimiento de las reacciones quimioluminiscentes:

- a) La energía requerida para la excitación de moléculas con emisión de radiación electromagnética es apreciablemente elevada, de tal manera que este requisito se ve satisfecho por un número muy limitado de reacciones. Cabe destacar entre éstas, aquellas en las que participan peróxidos como intermedios.
- b) Una excitación eficiente provoca la liberación instantánea de una gran cantidad de energía en una única etapa de excitación. Si aumenta el número de etapas se incrementa la probabilidad de que la energía sea transferida al medio.
- c) La mayoría de los procesos de desexcitación que podrían producir quimioluminiscencia transcurren a través de mecanismos no luminiscentes. Se emite la energía en forma de calor por colisiones intermoleculares.

Hay que recordar, que la mayoría de las moléculas tienen mayor probabilidad de sufrir la desactivación hasta el nivel fundamental a través de procesos no radiantes^{69, 70}.

1.4.2. Quimioluminiscencia en fase líquida

Las reacciones quimioluminiscentes en disolución tienen un considerable potencial analítico, debido entre otros motivos a los bajos límites de detección que se pueden conseguir con una instrumentación relativamente simple para monitorizar la emisión. La ausencia de fuentes de luz reduce el ruido de fondo, de tal manera que los límites de detección son regidos por el ruido de fondo del sistema químico. En estas reacciones por tanto, la pureza de disolventes y reactivos tiene una especial importancia.

Las reacciones que implican la presencia de peróxidos son las que han tenido una mayor importancia analítica. Dentro de este grupo podemos destacar aquellas reacciones que afectan a los siguientes grupos químicos: 1,2 dioxoetanos, 1,2 dioxetanonas, 1,2 dioxetanodionas, tetralquildioxetanos, tetraminoetilenos organometálicos, acilhidrazidas (luminol), acridinas (lucigenina, ésteres de acridinio), imidazoles (lofina).

En el caso de los dioxetanos, la reacción transcurre con la formación de dos compuestos carbonílicos; donde uno de ellos al menos, se encuentra en estado excitado.

Existen otras reacciones en las que se produce transferencia de electrones y en las que no intervienen peróxidos. Mediante métodos electroquímicos se generan radicales catiónicos y aniónicos que al recombinarse pueden producir quimioluminiscencia, como ocurre en el caso del difenil antraceno.

La intervención de estados singlete electrónicamente excitados del oxígeno, ha sido utilizada en muchas reacciones quimioluminiscentes. Cabe destacar aquellas relacionadas con la lucigenia (descrita en el apartado *Reacciones quimioluminiscentes de las acridinas*), lofina y luminol.

Reacción del luminol:

Implica la oxidación del luminol, (5-amino-2,3-dihidro-phthalazina-1,4-diona o 5-aminophthalhidrazida), en medio básico de pH 10-11. Ver figura (1.9.).

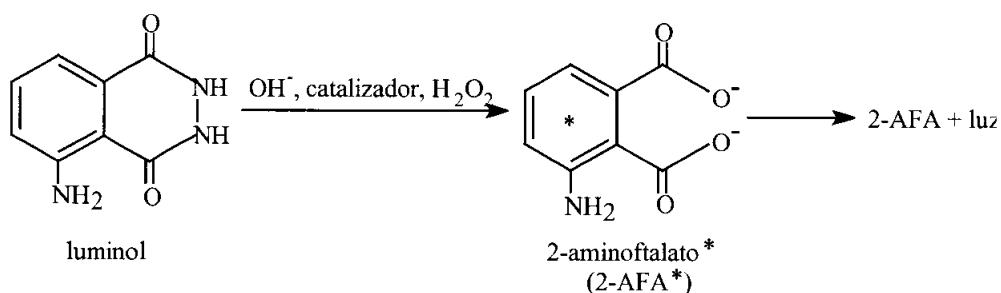


Figura 1.9.: Reacción quimioluminiscente del luminol.

Esta reacción requiere la presencia de un oxidante como H_2O_2 , NaClO , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, etc. La reacción está catalizada por determinadas enzimas, como las peroxidasas y por la presencia de iones metálicos entre los que el $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{II})$ son especialmente efectivos. El $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ puede actuar como catalizador/co-oxidante en la reacción. El luminol produce una luminiscencia azulada^{69,70}.

1.4.2.1. Aplicaciones analíticas

La quimioluminiscencia en fase líquida ha sido utilizada básicamente en cuatro tipos de aplicaciones.

- Indicadores volumétricos
- Determinación de trazas de metales
- Determinación de oxidantes
- Análisis de productos orgánicos.

a) Indicadores volumétricos:

Se han utilizado en los cuatro tipos de equilibrios iónicos clásicos.

En ácido-base su utilización reside en que la quimioluminiscencia aparece en medio alcalino. Al valorar un ácido con una base, el indicador produce la reacción quimioluminiscente al alcanzarse el medio alcalino, en presencia de un oxidante, generalmente H_2O_2 , y/o un catalizador. En valoraciones de bases, el indicador dejaría de ser quimioluminiscente al complejar completamente el ión metálico.

En las complexometrías, la detección del punto final esta basado en el efecto catalítico de algunos iones metálicos sobre los procesos quimioluminiscentes del luminol o lucigenina. Las valoraciones se producen en presencia de oxidante y la quimioluminiscencia desaparece al adicionar el primer exceso de valorante.

En las volumetrías de precipitación y red-ox también aprovechan el exceso de oxidante que se suele emplear como valorante para producir la luminiscencia del indicador.

b) Determinación de trazas de metales:

El efecto catalítico de algunos iones de metales de transición en la oxidación de luminol, lucigenina y lofina constituyen la base para muchas aplicaciones analíticas. La intensidad de emisión es proporcional a la concentración en un amplio margen de estos iones.

Como varios iones pueden activar una reacción de quimioluminiscencia bajo determinadas condiciones, el principal problema de estas determinaciones es la selectividad. La eliminación rigurosa de los contaminantes mejora sensiblemente los límites de detección.

c) Determinación de oxidantes:

Se ha utilizado el sistema basado en la catálisis del luminol por iones metálicos para el análisis de especies oxidantes como el H_2O_2 , ClO^- , Br_2 , I_2 , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, MnO_4^- , etc. El bajo ruido de los fotomultiplicadores actuales permite la determinación de cantidades muy pequeñas de compuesto, siendo de especial importancia la pureza de los reactivos.

d) Análisis de productos orgánicos:

Las aplicaciones de la quimioluminiscencia al análisis orgánico han tenido gran auge, principalmente a aquellos productos de interés bioquímico o farmacológico, basándose estas aplicaciones en muchos casos en propiedades óxido-reductoras.

En la bibliografía se pueden encontrar muchos metodologías que emplean esta técnica en la determinación de enzimas, nucleótidos, aminos, aminoácidos, carbohidratos, esteroides, hidrocarburos aromáticos policíclicos, drogas, etc.

Entre otros, Liu y colaboradores describieron la determinación de D-glucosa por quimioluminiscencia⁷¹. El método está basado en la reacción del luminol con el H₂O₂ formada en la oxidación catalizada por la glucosa oxidasa de la D-glucosa. La determinación se realiza en continuo y el montaje está equipado con un reactor enzimático preparado inmovilizando glucosa oxidasa en un tubo de nylon y un detector de fotodiodos.

Andrew desarrolló una metodología por inyección de flujo para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)⁷². La muestra era inyectada en el canal del portador (acetonitrilo), la cual se mezclaba con el canal del reactivo (2,4-dinitrofenil oxalato y H₂O₂, ambos en acetonitrilo). La quimioluminiscencia resultante se detectaba en un tubo fotomultiplicador de 12V.

Viñas y colaboradores determinaron drogas, que contenían el grupo tiol, por quimioluminiscencia⁷³. La muestra era disuelta en agua, y una alícuota de la misma era introducida en un sistema FIA consistente en luminol tamponado a pH 10,4 (KOH/ácido bórico), Cu(II) y H₂O₂. La metodología se aplicó en la determinación de cisteína, penicilamina, tiouracilo, N-acetilcisteína y mercaptopropionil-glicina.

Li y Zhang han descrito un método quimioluminiscente en flujo para la determinación de los D-aminoácidos totales en suero con reactivos inmovilizados⁷⁴. La D-aminoácido oxidasa se inmovilizó en sílica-gel amino modificada, activada por glutaraldehído y empacada en columna. Los otros reactivos, incluyendo el luminol y ferricianuro se inmovilizaron electrostáticamente en una columna de intercambio aniónico. Los aminoácidos eran detectados mediante la reacción quimioluminiscente

entre el H_2O_2 generado en la columna de enzimas, el luminol y el ferricianuro, el cual era eluido de la columna de intercambio mediante una inyección de fosfato sódico.

El efecto catalítico del Cu(II) en la reacción del luminol con H_2O_2 es cuantitativamente inhibido por la presencia de un α -aminoácido. Hara y colaboradores se basaron en este proceso para determinar 16 aminoácidos bajo condiciones diferentes⁷⁵.

1.4.3. Aspectos operativos

Las aplicaciones analíticas tradicionales de la quimioluminiscencia se derivan de reacciones con emisiones de gran intensidad y tiempos de vida del emisor de hasta varios minutos; esto permite efectuar el seguimiento de la reacción con una instrumentación y procedimientos muy simples. La intensidad de la luz emitida se mide mediante un tubo fotomultiplicador PMT. Como habitualmente sólo hay una sustancia en el medio de reacción que emite luz, no se necesita un monocromador para la discriminación de longitudes de onda. Avances recientes en la instrumentación analítica han facilitado la mecanización o automatización de las distintas operaciones: adición del reactivo, adquisición y procesado de datos, el uso de cubetas múltiples, etc. con una modificación no sustancial del proceso básico.

Existen dos modalidades básicas para realizar medidas de quimioluminiscencia:

- a) Procedimientos en estático
- b) Procedimientos en flujo, bien sea continuo o segmentado.

1.4.3.1. Procedimientos en estático.

En esta modalidad solamente se mezcla una porción de reactivo(s) quimioluminiscente(s) y de analito. La muestra se coloca en una cubeta que está dentro de una cámara del luminómetro, situada frente a la ventana del PMT y con ayuda de una jeringa se añaden porciones del reactivo quimioluminiscente o bioluminiscente. Se puede observar la curva en la Figura 1.10. de la intensidad de quimioluminiscencia frente al tiempo de reacción. Generalmente se mide la altura o área de la curva de la intensidad de emisión y se relaciona con la concentración del analito, aunque en algunas ocasiones se utilizan otros valores como la anchura del perfil o la velocidad de decaimiento desde el máximo.

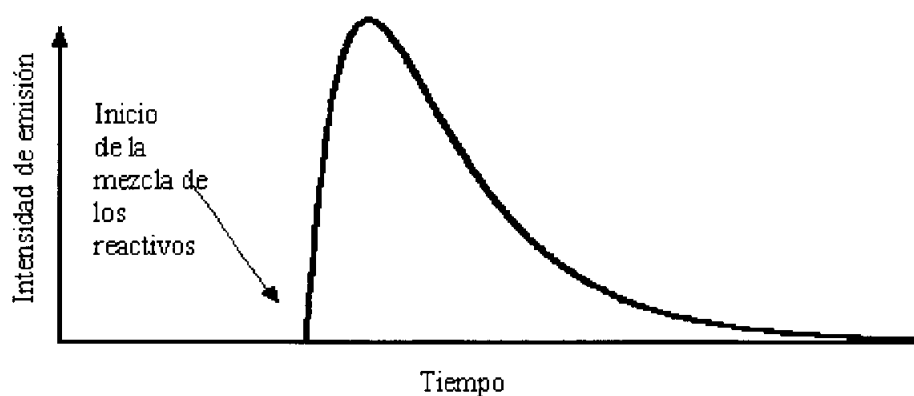


Figura 1.10.: Curva de intensidad de la emisión quimioluminiscente frente al tiempo.

1.4.3.2. Procedimientos en flujo continuo

En los métodos en flujo continuo, el reactivo quimioluminiscente y el analito fluyen en continuo por canales separados. Ambos flujos se mezclan en un solo

canal (Figura 1.11.). La observación se realiza en una posición fijada después de la confluencia. El volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación y el caudal del flujo, determinan el tiempo de reacción transcurrido y por tanto el perfil de la intensidad de la emisión quimioluminiscente frente al tiempo de reacción.

Los elementos esenciales para la determinación quimioluminiscente en flujo continuo son: cámara de mezclado de reactivos, celda de flujo, fotodetector (tubo fotomultiplicador) y un dispositivo electrónico para adquirir y procesar los datos. Muchos instrumentos diseñados para otros propósitos incluyen todos estos elementos y pueden servir para realizar medidas químico y bioluminiscentes. Como resultado de esto, es común en el trabajo en FIA el uso de sistemas no específicos adecuadamente modificados, tales como espectrofluorímetros en los que se sustituye el monocromador de emisión por sistemas adecuados para la reflexión total de radiación emitida.

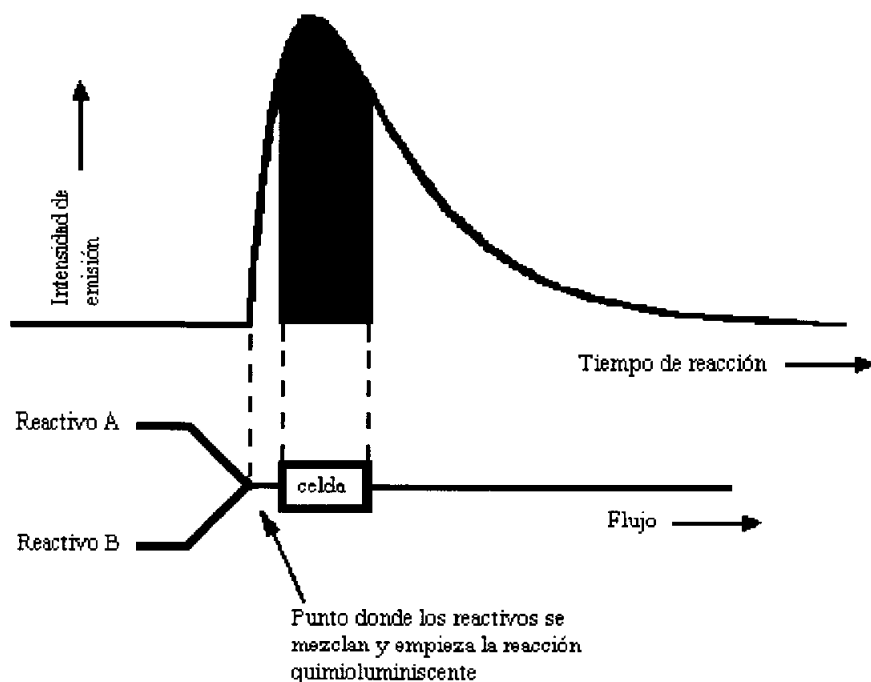


Figura 1.11.: Localización de la ventana de observación respecto de la curva de la emisión frente al tiempo para medidas quimioluminiscentes en flujo. La región sombreada de la curva representa la porción de emisión que se detecta.

La Figura 1.12. muestra un sistema básico FIA para determinaciones quimioluminiscentes. La muestra se inserta en un portador a un pH apropiado. El reactivo que circula en un canal diferente confluye con el flujo de muestra-portador tan cerca como sea posible de la celda de flujo; una vez en la celda, la emisión resultante de la mezcla de reacción se monotoriza mediante un tubo fotomultiplicador conectado al adecuado dispositivo electrónico.

Experimentalmente, la disposición de los elementos para las determinaciones quimioluminiscentes se optimiza normalmente atendiendo al tipo de conector empleado en la confluencia de flujos y al tamaño y configuración de la celda. Basándose en resultados puramente empíricos, muchos autores indican que las piezas en forma de T son los conectores más eficientes para mezclar dos flujos, mientras que otros opinan que las piezas en forma de Y son igualmente eficientes.

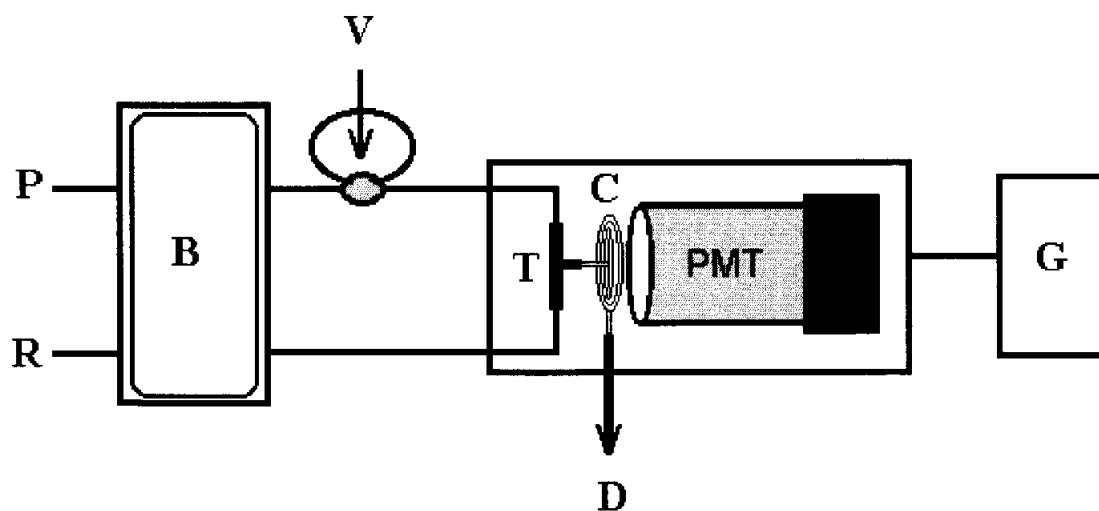


Figura 1.12.: Montaje FIA utilizado en combinación con detección quimioluminiscente.

P: portador, R: reactivos, B: bomba peristáltica, V: válvula de inserción de muestra, T: pieza en forma de T, C: celda, D: desecho, PMT: tubo fotomultiplicador, G: registrador

1.4.3.2.1. Reacción muestra-reactivo

La reacción quimioluminiscente en un sistema FIA tiene lugar al confluir dos flujos que contienen la muestra y el reactivo respectivamente. El mezclado debe ocurrir cerca de la celda por razones cinéticas. Las medidas de quimioluminiscencia se pueden hacer unas décimas de segundo inmediatamente después del mezclado, esto es particularmente útil para monitorizar cinéticas (reacción y emisión) rápidas.

Los sistemas heterogéneos en los que alguno de los reactivos que intervienen en el proceso quimioluminiscente se inmoviliza (física o químicamente) sobre un soporte sólido tienen también un gran interés analítico⁷⁶. La emisión quimioluminiscente depende tanto de la cinética de la reacción como de la eficacia de los procesos de transferencia de masas que entran en juego cuando los reactivos se ponen en contacto. Este tipo de sistemas ha sido ampliamente usado para inmovilizar enzimas sobre soportes sólidos y presentan muchas ventajas como menor consumo de reactivos en ocasiones caros, aumento de la estabilidad del enzima y compatibilidad con sistemas en flujo continuo automatizados.

La modalidad de flujo detenido constituye una técnica valiosa en asociación con el FIA y otras técnicas en flujo. Después de mezclarse la muestra y el reactivo eficientemente, la mezcla de reacción se detiene en la celda de flujo con el fin de realizar medidas basadas en curvas intensidad de emisión-tiempo. La información cinética se obtiene de la señal completa (de la velocidad de ascenso y decaimiento) y se puede relacionar con la concentración del analito con una precisión y selectividad mayores que la altura o el área de la curva intensidad de emisión-tiempo⁷⁷.

1.4.3.2.2. Celdas

El diseño de la celda es una de las variables de mayor interés. De hecho, la situación y la distancia al detector debe ser altamente reproducible.

En 1981 Seitz⁷⁸ estudió varias celdas para medidas quimioluminiscentes en flujo continuo y determinó cual era la más adecuada para cada tipo de técnica. El diseño más frecuentemente usado en FIA es una espiral plana que se sitúa tan cerca como sea posible del tubo fotomultiplicador (PMT).

El requisito primordial a la hora de diseñar una celda es que la máxima intensidad de luz se debe emitir mientras la mezcla analito-reactivo está delante del detector. Esto exige un mezclado rápido (particularmente en reacciones rápidas) y una celda que tenga un volumen apropiado para que el pico de emisión se pueda medir. La señal analítica se ve incrementada al aumentar la longitud de la espiral; la longitud mínima aceptable vendrá dada por la velocidad de reacción. No se obtiene ninguna ganancia adicional si se utiliza una longitud de tubo innecesaria. Para minimizar la dispersión de la muestra, la válvula de inyección y la celda se deben situar entre sí lo más cerca posible, a menos que el portador tenga funciones de reactivo, en cuyo caso el camino de reacción deberá ser optimizado para obtener el mejor compromiso entre la reacción y la dispersión⁷⁹.

En comparación con las celdas de flujo utilizadas en otros métodos espectrofotométricos (absorción y emisión), las celdas de quimioluminiscencia tienen volúmenes muy grandes, debido en parte a la necesidad de recoger una mayor cantidad de luz emitida y en parte porque la señal del ruido de fondo se atribuye normalmente al "blanco químico", por ejemplo, en la quimioluminiscencia sería la presencia de sustancias contaminantes en la mezcla de reacción^{70, 80}.

Se han desarrollado nuevos tipos de celdas quimioluminométricas con la finalidad de exponer al tubo fotomultiplicador una gran superficie de reacción con el mínimo volumen de celda posible. Otra celda que se ha utilizado en electroquimioluminiscencia es la de capa fina obtenida al situar en forma de “sandwich” un espaciador delgado (el cual determina el volumen de la celda) entre una delantera transparente de plexiglas y una pieza de teflón en la parte trasera. El área expuesta al detector es de 0.5 x 1.5 cm y el volumen de la celda es de 40 μl ⁸¹. Más recientemente se ha descrito otra celda de flujo que consiste en un disco rotatorio para facilitar la reacción y por tanto la exaltación de la señal⁸². El disco y el cuerpo de la celda se elaboran con PTFE; en la parte superior de la misma se ajustan dos entradas y una salida para el paso de la disolución. La superficie del disco se pule suavemente para reducir la dispersión y aumentar la reflexión de la luz.

1.4.3.2.3. Detectores

Los detectores adecuados para una gran variedad de aplicaciones quimioluminiscentes son los basados en tubos fotomultiplicadores (PMTs) donde los fotones incidentes causan la emisión de electrones por parte del fotocátodo y los electrones emitidos son amplificados en cascada. Aunque los PMTs son menos eficientes que los contadores de centelleo líquido (LSCs), continúan siendo los detectores preferidos para este propósito. Debido a que la respuesta espectral no es uniforme, el tubo fotomultiplicador debe poseer una respuesta apropiada a la longitud de onda o el intervalo de longitudes de onda donde se emite la radiación⁸³.

Cuando se tienen una intensidad de quimioluminiscencia baja, la precisión de la medida depende del tubo fotomultiplicador utilizado. Por este motivo, el PMT escogido debe dar la máxima relación señal-ruido de fondo, la cual a su vez depende de la diferencia de potencial a la que se somete el mismo y que debe ser optimizada.

Con emisiones quimioluminiscentes fuertes, la señal del detector puede incluso medirse analógicamente, mediante un polímetro o un registrador adecuado.

Los LSCs proporcionan mejor relación señal-ruido de fondo y se basan, esencialmente, en dos canales de contadores de fotones provistos de un discriminador variable. La muestra se sitúa entre los dos detectores para asegurar una alta eficiencia óptica. El discriminador se ajusta para la transmisión de los impactos de los fotones y el rechazo de pequeños pulsos del ruido de fondo. Este tipo de detector funciona muy bien con intensidades de quimioluminiscencia bajas pero da errores de conteo por saturación y proporcionan relaciones no lineales entre la intensidad quimioluminiscente y el número de cuentas total. Esta última deficiencia podría subsanarse con una dilución apropiada de reactivos y muestra, por disminución de la velocidad de reacción o reduciendo la fracción de luz que se transmite.

Independientemente del detector empleado, puede darse un elevado ruido de fondo si se requiere una ampliación de la señal. Por ejemplo, en la reacción del peroxioxalato, la quimioluminiscencia generada es muy débil en ausencia de sensibilizador⁸⁴ y requiere una gran amplificación; esto produce un elevado ruido de fondo y como consecuencia disminuye la relación señal-ruido de fondo. Finalmente, cabe señalar que el ruido de fondo también puede surgir a causa de otras variables experimentales⁸⁵ y del sistema químico.

Capítulo segundo

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

Desde la aparición de la metodología FIA, ésta ha experimentado un gran desarrollo, mostrándose como una herramienta de gran versatilidad, fácil manejo y bajo coste, útil en diversos campos del análisis químico.

Las experiencias presentadas en esta memoria responden a los siguientes objetivos fundamentales:

1. Aplicación de metodologías FIA a la determinación de muestras de interés farmacéutico y medioambiental. En estas áreas se requiere la realización de un gran número de análisis para el control de calidad de materias primas, productos finales, etc, además de los controles que las disposiciones legales exigen de manera cada vez más estricta. Dentro del campo de muestras farmacéuticas, el objetivo es el desarrollo de una metodología analítica para la molécula diazepam y posterior aplicación a formulaciones farmacéuticas. Enmarcándose dentro del campo de muestras de interés medioambiental, se fijan como objetivos la obtención de procedimientos para la determinación de nitritos y nitratos en aguas y de amarillo de acridina en aguas residuales de origen industrial.
2. Se pretende llevar a cabo estos objetivos empleando técnicas de detección robustas, fácilmente disponibles y asequibles para cualquier laboratorio analítico, como son los sistemas FIA y la detección fluorimétrica, colorimétrica o quimioluminiscente.

3. Por otro lado, la utilización en la técnicas de análisis por inyección de flujo de recursos como pueden ser el uso de reactivos inmovilizados o la propia luz, podrían aportar a los métodos propuestos ventajas asociadas, por lo que fue también uno de los objetivos que orientaron el desarrollo de los trabajos que constituyen la presente tesis doctoral.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Tras una etapa de revisión bibliográfica para conocer las posibilidades de las diversas técnicas a emplear y de las características analíticas de los posibles analitos, la estrategia general seguida en los trabajos incluidos en la presente memoria se traduce en las siguientes etapas:

1.- Ensayos previos

Consistió en la realización de experiencias encaminadas a obtener información cualitativa y semicuantitativa sobre la fotodegradación y posterior detección fluorimétrica (determinación de diazepam), sobre la reactividad de un lecho inmovilizado y reacción colorimétrica utilizados (determinación de nitritos/nitratos) y sobre los nuevos sistemas quimioluminiscentes (determinación de amarillo de acridina).

En esta etapa se estudió la adecuación de los reactivos y de las técnicas para el tratamiento de muestras (lámpara de Hg, columna reductora). También se estudiaron la influencia de variables tales como medio de reacción, pH y temperatura, tanto en modo estático como en flujo continuo.

La estabilidad de las disoluciones de reactivos y/o analitos también fue investigada en esta etapa.

2.- Optimización

Una vez seleccionada la configuración del sistema FIA más adecuada, se procedió a la optimización del sistema mediante un procedimiento de aproximaciones sucesivas y atendiendo a criterios de sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de inyección.

En primer lugar fueron optimizadas las variables químicas del sistema y a continuación se procedió a la optimización de las variables propias del sistema FIA. El procedimiento de optimización utilizado fue el clásico univariante. Finalmente, se reoptimizaron las variables químicas y/o otras según los casos.

3.- Aplicaciones analíticas.

En este apartado se determinaron en primer lugar las características analíticas del método, tales como intervalo de linealidad, reproducibilidad, repetividad y velocidad de inyección.

A continuación se realizó un estudio de la influencia de posibles interferentes que permitió conocer la tolerancia del método frente a los compuestos comúnmente presentes en las muestras de estudio.

Finalmente, se procedió a la determinación de los analitos en las respectivas muestras reales.

Capítulo tercero

3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

3.1.- INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

El instrumental analítico empleado en las distintas etapas del trabajo experimental se describe a continuación:

- Lámpara de mercurio Vilmer-Lurmat T-60, utilizada para la reacción de fotodegradación del diazepam.
- Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS50 utilizado para la determinación de diazepam.
- Espectrofotómetro UV-VIS, modelo Lambda 3B de Perkin Elmer empleado en la determinación de nitritos y nitratos.
- Luminómetro de fabricación propia para la determinación de amarillo de acridina. Esta constituido por una caja hermética a la luz en cuyo interior se mezclan las disoluciones de reactivos mediante una confluencia en forma de T con un volumen muerto minimizado y preparada para efectuar conexiones FIA. El producto de reacción quimioluminiscente alcanza inmediatamente una celda de flujo de fabricación artesanal, que consiste en un tubo de cuarzo de 1.0 mm de diámetro interno, arrollado en forma de espiral plana (figura 3.1.), sin dejar huecos entre las espiras, presentando un diámetro total de 3 cm. Esta espiral plana se dispone entre la ventana de un tubo fotomultiplicador situado a 2 mm de distancia y un espejo perforado, para lograr mayor intensidad de luz. El tubo fotomultiplicador empleado fue el (PMT) P30CWAD5F-29 tipo 9125 de Electron Tubes, que operaba a 1280 V. Este fototubo exhibe una respuesta espectral entre 300 y 650 nm con un máximo a 400 nm. La altura de los picos se medían en kHz.

- Espectrofotómetro de diodos de barrido Hewlett Packard 8452A para las pruebas espectrofotométricas previas en los trabajos de determinación de diazepam y nitritos/nitratos.
- Balanza analítica modelo BP110S, de Sartorius.

3.2. MATERIAL FIA

En los montajes FIA realizados durante el desarrollo del trabajo experimental se empleó el siguiente material:

- Bomba peristáltica Minipuls 2 de Gilson.
- Bomba peristáltica digital Minipuls 3, modelo M312 de Gilson.
- Válvula de inyección de tres canales, modelo 5051 de Reodhyne.
- Tuercas, conexiones, tornillos y roscas de PTFE de Omnifit.
- Tubos de PTFE de Omnifit.
- Tubos de Tygon para bomba peristáltica de Omnifit.
- Celda de flujo (Hellma) de 1cm de camino óptico y 30 μ l de volumen interno.
- Celda de flujo artesanal de cuarzo, en espiral plana, para determinaciones quimioluminiscentes (figura 3.1.).

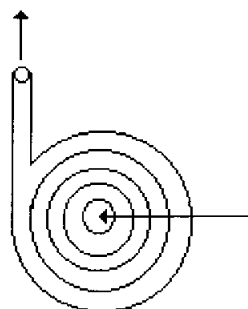


Figura 3.1. : Diseño de la celda de flujo en sistemas FIA con detección quimioluminiscente.

3.3. REACTIVOS

El agua empleada en la preparación de las disoluciones acuosas era purificada por ósmosis inversa y posteriormente desionizada con un sistema de cartuchos de intercambio iónico modelo Nanopure II, de Barnstead. Los reactivos utilizados en el desarrollo experimental, todos ellos de calidad analítica sino se especifica lo contrario, se detallan a continuación :

Determinación de diazepam

Para las diversas disoluciones acuosas empleadas en el presente estudio se empleo NaOH y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de la marca Panreac. El diazepam (Guinama) se disolvía previamente en etanol absoluto (Panreac), obteniéndose así las disoluciones concentradas patrón, éstas eran almacenadas a 5°C para evitar su degradación.

Se utilizaron además sales de diferentes metales en el estudio de los posibles catalizadores. Estas fueron $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y AgNO_3 (Merck).

Para el estudio de interferentes se empleó piridoxina (Guinama), glucosa (Panreac), lactosa (Panreac), sorbitol (Acofarma) y sacarosa (Acofarma).

Determinación de nitritos y nitratos

Fueron utilizadas disoluciones acuosas de sulfato de 3,6-diamino acridina (Sigma), NaNO_2 (Panreac), NaNO_3 (Panreac). También se usó Cd metálico (Merck) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (Panreac).

Para la conversión de nitratos en nitritos era necesaria una disolución tampón, la cual era preparada de la siguiente manera : disolviendo 14g de NH_4Cl (Panreac) y 1.7g de Na_2EDTA (Panreac) en agua, posteriormente se ajustaba el pH a 8.5 por adición de NH_3 (Probus) diluído gota a gota. Finalmente la mezcla resultante se enrasaba a un volumen de 1 litro con agua destilada.

Para la determinación de nitratos, fue necesario que estos experimentaran una reducción química a nitritos ; para ello se empleó “in-situ” una columna de cadmio cuperizado de 10 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro interno. Esta columna fue rellena con partículas cuyo tamaño medio era de 4 mm.

Para el estudio de interferentes se emplearon las siguientes sales : KBr , Na_2SO_4 , KCl , K_3PO_4 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de Panreac y FeCl_3 , CdSO_4 , AlCl_3 , ZnCl_2 , NH_4Cl , $\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , Na_2SiO_3 de Merck.

Determinación de amarillo de acridina

Para la preparación de las disoluciones de MnO_4^- se partía de disoluciones concentradas de KMnO_4 (Panreac). Estas disoluciones concentradas eran llevadas a ebullición durante un mínimo de 10 minutos, tras lo cual eran microfiltradas en placa porosa de 0.45 μ . Una vez microfiltrada esta disolución, se practicaban las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones deseadas para cada experiencia. La disoluciones de H_2SO_4 (Panreac), se preparaban a partir del ácido concentrado por dilución del mismo.

Se preparaban disoluciones “madre” de amarillo de acridina (Aldrich) en forma de clorhidrato en agua. A partir de estas disoluciones concentradas se obtenían las diversas soluciones de muestra por simple dilución.

En el estudio de los fotosensibilizadores se empleó sodio dodecilo sulfato, hexadecil piridinio, triton X100, rodamina B, riboflavina, ácido fórmico, sulfato de quinina de Guinama.

Para el estudio de interferentes se emplearon las siguientes sales : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NH_4SO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaNO_2 , $\text{NiNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Probus ; NaHCO_3 de Guinama ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , KCl , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ de Panreac ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de Merck ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ de UCB ; AgNO_3 y HgCl_2 de Prolabo.

También se estudio la interferencia de las siguientes acridinas : 9-aminoacridina (Merck), proflavine, acriflavina y naranja de acridina de Fluka.

Capítulo cuarto

**4. FOTORREACCIÓN Y DETERMINACIÓN
FLUORIMÉTRICA DE DIAZEPAM**

INTRODUCCIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES DEL DIAZEPAM

El diazepam es el 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil,1-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona. Es un fármaco muy conocido que presenta aspecto cristalino, es prácticamente inodoro y de color blanco amarillento⁸⁶.

Sus fórmulas estructural y molecular, así como su masa se muestran a continuación (Figura 1.):

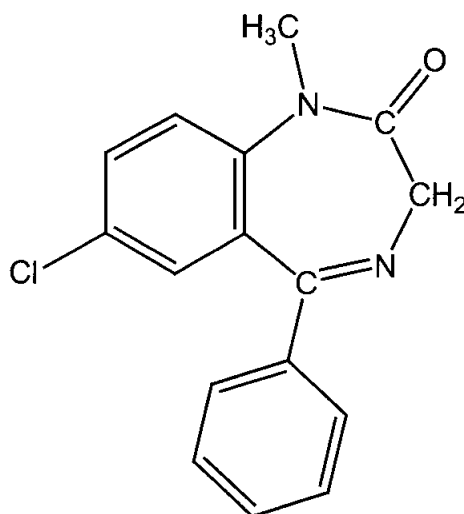
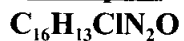


Figura 4.1.

Diazepam



M : 284.75 g/mol.

4.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Esta molécula resulta muy poco soluble en agua, tan solo 0.05 mg/ml. En etanol al 95% su solubilidad llega a alcanzar los 41 mg/ml. No obstante, en otros disolventes orgánicos como acetona, benceno, dimetilacetamida o cloroformo, el diazepam es mucho más soluble. Como ejemplo se puede indicar que en cloroformo la solubilidad supera los 500 mg/ml⁸⁶.

El pK_a de disociación de esta molécula se ha determinado espectrofotométricamente, siendo de 3.4⁸⁶.

El diazepam funde en el intervalo de temperaturas de 131-135°C y sufre descomposición a 180°C. Los análisis termogravimétricos desarrollados no muestran pérdidas de peso cuando se calientan a 105°C⁸⁶.

4.1.2. Síntesis

Una de las vías de síntesis industriales del diazepam⁸⁸ consiste en la reacción de la 2-metilamino-5-clorobenzofenona (MACB) con el ester etílico de la glicina en el seno de piridina. Así se obtiene la 7-cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2*H*-1,4,benzodiazepin-2-ona, la cual al metilarse con sulfato de metilo en presencia de etóxido de sodio, proporciona el diazepam (ver figura 4.2.). En la bibliografía sobre la química de las benzodiazepinas se describen otras posibles rutas sintéticas⁸⁶.

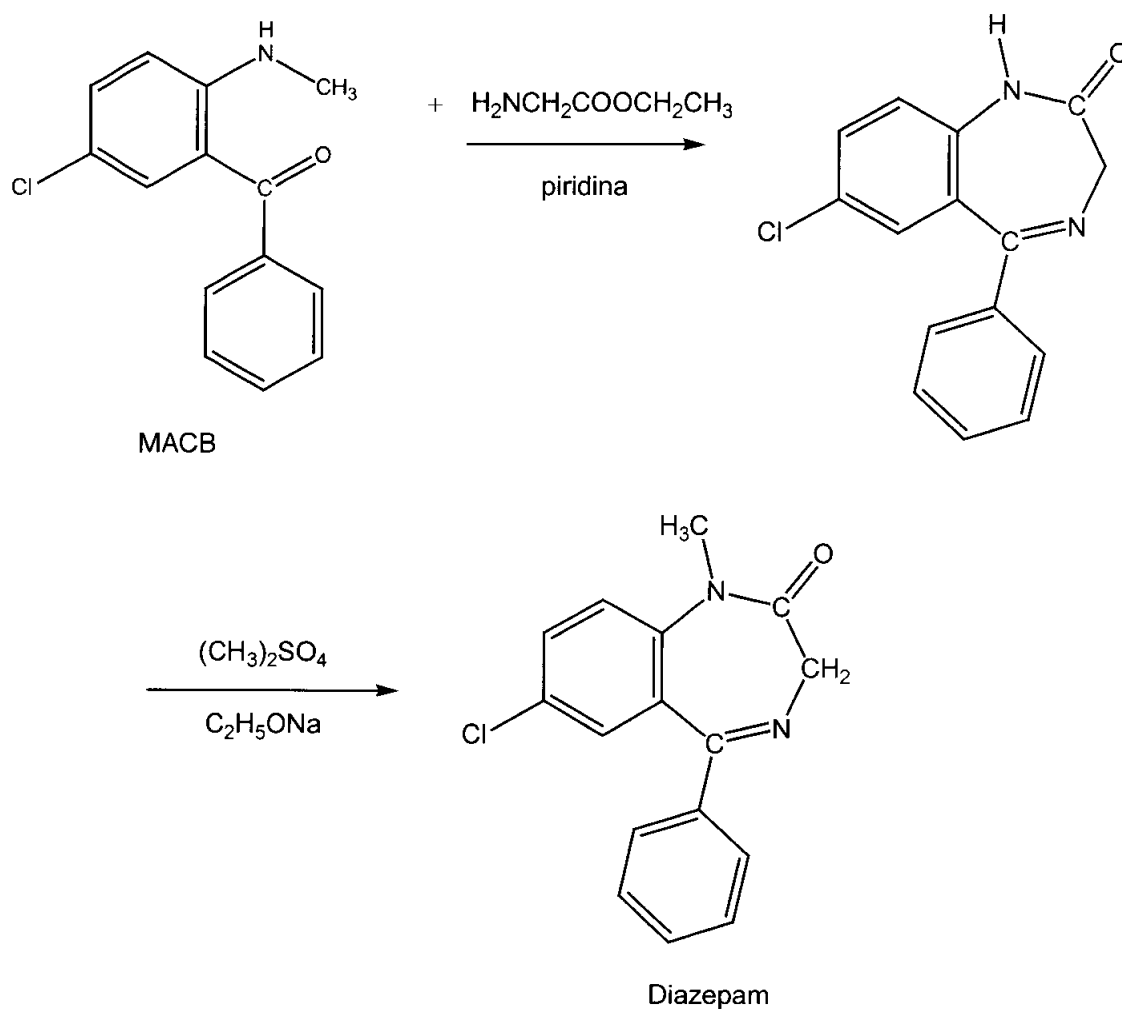


Figura 4.2.: Síntesis del diazepam

4.1.3. Estabilidad y degradación

Los productos de la hidrólisis ácida del diazepam y de su principal metabolito se muestran en la figura 4.3a. y 4.3b. La hidrólisis ácida del clordiazepóxido también se aprecia en la figura 4.3c., ya que el producto de su hidrólisis es el mismo que el de la hidrólisis del principal metabolito del diazepam⁸⁶.

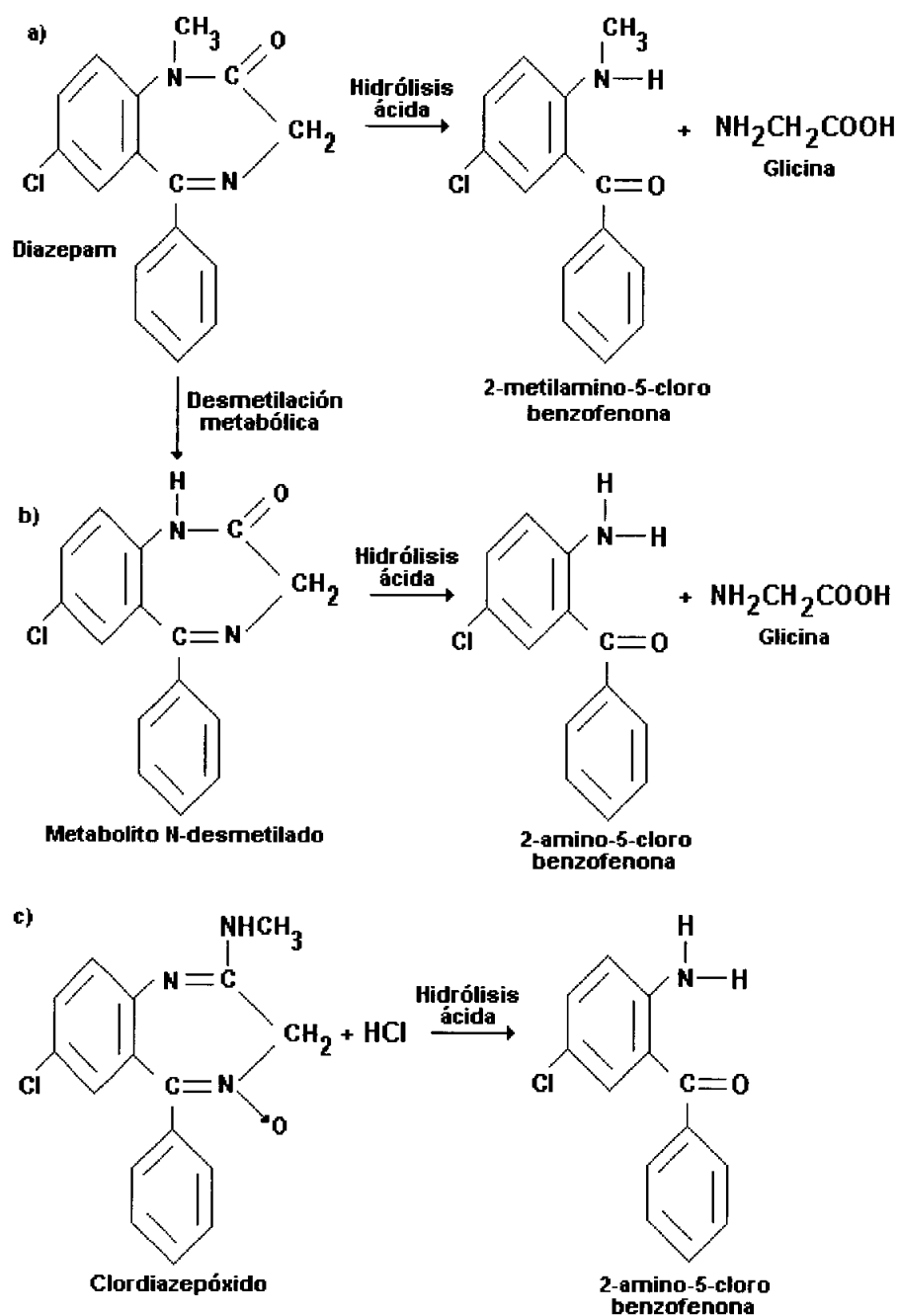


Figura 4.3. : a)Hidrólisis ácida del diazepam
b)Hidrólisis ácida del principal metabolito del diazepam
c) Hidrólisis ácida del clordiazepóxido.

El diazepam sometido a la acción de la luz también sufre cambios estructurales. Este aspecto se discute con más detalle en el apartado 4.8. de la parte experimental.

4.1.4. Propiedades farmacológicas

Esta molécula pertenece a la familia química de las benzodiazepinas, las cuales están indicadas en tratamientos contra la ansiedad. Los fármacos más utilizados como ansiolíticos pertenecientes a este grupo son el clordiazépoxico, el diazepam y el oxazepam. No obstante, existen otras benzodiazepinas en el mercado farmacéutico como el cloracepato, clonacepam, demoxepam, loracepam, tetracepam, etc⁸⁷.

Las benzodiazepinas se metabolizan in vivo por hidrólisis, hidroxilación, desalquilación, reducción y por conjugación, obteniéndose así, tanto compuestos activos como inactivos⁸⁷.

El diazepam, es una benzodiazepina sustituida que se introduce en el mercado farmacéutico en 1964. Esta molécula está relacionada en estructura y farmacología con el clordiazepóxido, siendo el diazepam más eficaz que éste en el tratamiento de la ansiedad y la tensión, si bien el clordiazepóxido produce menos somnolencia. También es utilizada para combatir los síntomas de inhibición en alcohólicos crónicos. Se usa, además, en premedicación en cirugía, como hipnótico, sedante y relajante muscular. Su empleo contra dolores del parto tiene ventajas frente al uso de otros fármacos. El diazepam ha demostrado ser beneficioso en el tratamiento de ciertos tipos de epilepsia^{87,88}.

El diazepam es metabolizado en el hígado, por N-desmetilación y por hidroxilación en la posición 3 para formar el oxacepam, uno de sus metabolitos, el cual también es activo contra la ansiedad y presenta propiedades sedantes y de relajante muscular. El oxacepam es excretado mayoritariamente en forma de glucurónido⁸⁸.

El diazepam está clasificado como un tranquilizante menor. Se usa ampliamente en gran número de formulaciones. Sus efectos secundarios resultan suaves y poco frecuentes⁸⁹.

4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.2.1. Métodos espectrométricos

Espectrofotometría UV-VIS

Es posible la determinación espectrofotométrica del diazepam disuelto en ácido sulfúrico 0.1N en medio alcohólico a 368 ± 2 nm, pero solamente cuando no están presentes cantidades significativas de contaminantes hidrolíticos⁸⁶. Lin y Zhang emplearon esta técnica para la determinación del fármaco en tabletas⁹⁰.

El-Brashy y colaboradores describieron la determinación de varias 1,4-benzodiazepinas en tabletas⁹¹. La extracción y posteriores diluciones eran llevadas a cabo con etanol. Los extractos eran divididos en dos porciones y acidificados con HCl, la primera de ellas era diluida con agua (solución de muestra) y la segunda era tratada con Zn metálico (solución de referencia). La absorbancia de la solución de muestra era medida frente a la solución de referencia. Este método se aplicó en la determinación de clordiazepóxido, nitrazepam, diazepam, lorazepam, oxacepam, temacepam y cinolazepam en preparados farmacéuticos.

Yan también empleó la espectrofotometría diferencial en el análisis de inyectables⁹². La muestra era diluida con etanol absoluto y se tomaban dos alícuotas. A una de ellas se le adicionaba ácido sulfúrico al 3% en medio etanólico (disolución de muestra) y a la segunda, una disolución tampón de pH 7 (disolución de referencia). Las diferencias de absorbancia eran medidas a 368 nm.

De la Guardia describió un método para la determinación simultánea de benzodiazepinas en un medio micelar⁹³. Las benzodiazepinas eran hidrolizadas a benzofenonas y éstas a su vez, eran determinadas por espectrofotometría en presencia de surfactantes. El empleo de estos surfactantes provocaba la exaltación de las diferencias espectrales, facilitando así la determinación.

Fartushnyi identificó y determinó algunas 1,4-benzodiazepinas presentes en matrices biológicas⁹⁴. Las drogas eran extraídas con éter etílico o cloroformo saturados en fosfato disódico. Para el análisis de diazepam el extracto era evaporado y disuelto el residuo en etanol, luego era tratado con NaOH al 10%, calentado en baño de agua, enfriado y tratado posteriormente con ácido acético. La determinación se realizaba midiendo la absorbancia a 450 nm.

También han sido descritas metodologías en las que se usa la formación de pares iónicos. Mañes y colaboradores determinaron diazepam y otras benzodiazepinas en preparados farmacéuticos mediante esta técnica⁹⁵. Las drogas eran extraídas con diclorometano del medio ácido en que se habían disuelto previamente y como pares iónicos se emplearon diversos colorantes orgánicos.

Mangala empleó la complejación con alizarinas para la determinación de reserpina y varias benzodiazepinas en tranquilizantes⁹⁶. Las drogas eran extraídas de la solución acuosa a pH 1.2 en que se encontraban, mediante la formación de complejos con las alizarinas en cloroformo.

En la bibliografía nos encontramos con varios métodos que emplean la primera y segunda derivada en la determinación de diazepam en presencia de otras drogas o en mezclas con otras 1,4-benzodiazepinas.

Jain y colaboradores desarrollaron un método para la determinación conjunta de diazepam y propanolol en tabletas empleando el espectro de la primera derivada⁹⁷. Las tabletas eran tratadas con HCl 0.1N, filtradas y diluídas para obtener una concentración final de 2.5 µg/ml de diazepam y de 20 µg/ml de propanolol. Las drogas se determinaban a partir de las absorbancias de la primera derivada a 250.6 y 264.6 nm respectivamente.

Morelli describió un método similar para la determinación de diazepam y bromuro de otilonio en tabletas. El tratamiento de las muestras también se realizó empleando HCl 0.1 N. Las longitudes de onda utilizadas para las determinaciones utilizando la primera y segunda derivada fueron 247 y 231 nm para el diazepam.

Bautista y otros también emplearon la técnica del cociente de la primera derivada para el análisis conjunto de diazepam y piridoxina en formulaciones farmacéuticas⁹⁸. La extracción también se efectuaba con HCl 0.1N. La λ empleada para el diazepam fue 232 nm. Este método fue utilizado para resolver mezclas con calibraciones binarias de estas drogas.

Anteriormente Umapathi y Parimoo habían usado la segunda derivada para el análisis de diazepam e imipramina en tabletas⁹⁹. La extracción de las drogas se realizó, en este caso, con metanol. La absorción del diazepam era medida a 275 nm.

El diazepam también ha sido determinado en plasma aplicando la segunda derivada. Cruz y otros¹⁰⁰ extraían el diazepam y la metaqualona del plasma con eter y NaOH 1M. Los extractos eran centrifugados y llevados a sequedad. El residuo se disolvía en HCl 0.1N antes de la determinación espectrofotométrica.

Espectroscopía IR

También han sido empleadas, aunque en menor medida, las técnicas espectrosópicas en el infrarrojo para el análisis de benzodiazepinas.

Corti y colaboradores determinaron diazepam conjuntamente con otros fármacos empleando la técnica NIRS (espectrometría reflectante en el infrarrojo cercano)¹⁰¹. En su estudio probaron diversas combinaciones de filtros, obteniendo buenos resultados cuantitativos para muestras de diferente origen.

Ficarra empleó la espectroscopía de reflectancia infrarroja difusa para la determinación de diazepam en el preparado farmacéutico *Valium*¹⁰². Las muestras en polvo se mezclaron con KBr y la reflectancia fue medida desde 4000 a 450 cm⁻¹.

Fluorescencia

Se han desarrollado varias metodologías analíticas para el diazepam basadas en técnicas fluorescentes, donde la adición de surfactantes incrementa la señal analítica fluorescente. De la Guardia y colaboradores¹⁰³ realizaron estudios al respecto, empleando laurilsulfato sódico, amonio dodecilsulfato y Tritón X-100 en medio sulfúrico.

Ouyang utilizó el laurilsulfato sódico en medio sulfúrico e irradiación con lámpara de Hg para desarrollar una metodología para la determinación de diazepam en tabletas¹⁰⁴.

Dolejsova describió un método FIA con detección fluorimétrica para el análisis de diazepam, nitrazepam y oxacepam en tabletas¹⁰⁵. El diazepam era extraído con etanol mediante ultrasonidos, el extracto filtrado era inyectado en el portador (H₂SO₄

0.01 M en etanol del 98%). La fluorescencia del diazepam se medía a 370 nm, siendo la longitud de onda de excitación de 241 nm.

En la bibliografía existen varios trabajos que describen el análisis de benzodiazepinas mediante la técnica de inmuno-ensayo con detector fluorimétrico con luz polarizada (*FPIA, fluorescence polarization immunoassay*)¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. En estos artículos se estudia el uso de analizadores específicos para esta técnica, tales como los de Abbott Diagnostics, Behring Diagnostics y otros que también emplean kits específicos de reactivos. Con ellos se realizan estudios comparativos entre los analizadores y en la aplicación para la determinación de diazepam y otras benzodiazepinas en diversas matrices (suero, orina, plasma, etc frente a técnicas convencionales de GC-MS, HPLC ,etc.

4.2.2. Métodos cromatográficos

Las diversas técnicas cromatográficas se han utilizado extensamente en la determinación de diazepam en todo tipo de matrices, encontrándonos en la bibliografía con un gran número de referencias.

TLC

Ha sido una metodología analítica clásicamente utilizada en el estudio de separación del diazepam. Se ha empleado la cromatografía de capa fina para la identificación y evaluación del diazepam. La muestra se prepara en acetona, y se usa silicagel G como fase estacionaria y n-heptano/acetato de etilo (1 : 1 v/v) como fase móvil. La localización del diazepam en la placa se verifica pulverizando con iodoplatinato de potasio, proporcionando un color púrpura⁸⁶.

Esta técnica también ha sido aplicada a la identificación del diazepam y sus metabolitos en extractos biológicos. En este caso se utiliza un desarrollo en dos

dimensiones en la cromatoplaça. Esta metodología fue desarrollada por Brinkman⁸⁶ empleando silicagel como fase estacionaria. Para la primera elución en una dimensión la fase móvil es cloroformo/heptano/etanol (10 :10 :1 v/v), mientras que para la segunda, la fase móvil es cloroformo acetona (90 :10 v/v). La muestra se prepara en una mezcla disolvente acetona/hexano (20 :80 v/v).

Cimpoiú y colaboradores realizaron un estudio comparativo de optimización para diferentes fases móviles en la separación de algunas 1,4-benzodiazepinas (medazepam, nitrazepam, clordiazepóxido, oxacepam y diazepam) por TLC¹¹⁰. Usaron platos de sílica gel 60 F254, empleando la técnica ascendente. Las fases móviles eran mezclas de cloroformo, éter dimetílico y propanol, la detección se efectuaba por densitometría a 254 nm en modo reflectante en zigzag. La mejor fase móvil encontrada fue cloroformo/éter dimetílico/propanol (17:2:1).

Kastner y Klimes probaron la cromatografía en capa fina empleando dos tipos de platos de sílica gel y uno del tipo RP-18 (Merck)¹¹¹. El estudio se realizó con varias mezclas de disolventes como eluyentes. Las manchas fueron detectadas por varios métodos: amortiguación de la fluorescencia a 254 nm, diazotación y copulación con los reactivos de Bratton-Marshall y Dragendorff, etc. La mejor separación para oxazepam, diazepam, nitrazepam, medazepam y clordiazepóxido se obtuvo con la placa soporte C18 en fase inversa, empleando como fase móvil: tampón acetato pH 3/metanol (1:3).

Sarbu y Marutoiu emplearon también esta misma técnica, con soportes de sílica gel y almidón conteniendo mezclas luminóforas para la determinación de benzodiazepinas¹¹². Se probaron tres de estas mezclas: fluorgermanato de magnesio activado con Zn, fluorgermanato de magnesio y germanato de zinc activados con Mn y sulfato de zinc activado con Ag. Como fase móvil se utilizó cloroformo/acetona (3:1) y la detección se realizó por fluorescencia en el UV. Así se determinaron soluciones de diazepam, nitrazepam, medazepam y clordiazepóxido.

Paw estudió la selectividad de la separación de zopiclona y benzodiazepinas por TLC sobre sílica y alumina con butanona, butanona/tolueno (3:2 v/v), tolueno/1,4-dioxano/trietilamina (12:7:1 v/v) y ciclohexano/acetato de etilo (1:1 v/v) como fases móviles¹¹³. Los componentes fueron separados en cámaras horizontales y visualizados por irradiación UV a 254 y 366 nm y por el uso de diferentes reactivos.

La espectroscopía de masas acoplada con la cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC, *high performance thin layer chromatography*) ha sido usada por Tames¹¹⁴ en el análisis e identificación de algunas benzodiazepinas en extractos de orina. La detección se efectuó directamente sobre la matriz de sílica, sin extracción previa.

Dongre y colaboradores emplearon la técnica HPTLC en la determinación de alprazolam, diazepam, clordiazepóxido, nitrazepam y oxazepam¹¹⁵. Usaron placas de sílica gel F254 y como fase móvil cloroformo/acetona (4:1 v/v). Una vez secados, se trataron con H₂SO₄ al 1% en pulverizador, posteriormente se calentaron a 100°C durante 10 minutos y tratados sucesivamente con NH₄Cl al 10%, NaNO₂ al 1% y N-(1-naftilehylene) diamina) al 0.1%, provocando la aparición de intensas manchas violeta en algunas benzodiazepinas. Los otros analitos fueron visualizados empleando el reactivo de Dragendorff.

GC

El uso de la cromatografía de gases en la determinación de diazepam y otras benzodiazepinas ha sido descrito en gran número de artículos. Los trabajos que se reseñan a continuación son una selección de lo que se ha publicado recientemente.

De Silva empleó la hidrólisis ácida del diazepam y sus metabolitos procedentes de extractos en sangre para preparar las respectivas benzofenonas como derivados

volátiles⁸⁶. La determinación se realizó mediante la cromatografía de gases con un detector de captura electrónica. Posteriormente De Silva desarrollo un método en cromatografía de gases para la determinación directa de las benzodiazepinas.

Jouvel y colaboradores emplearon la técnica cromatografía de gases acoplada a masas para la detección de diazepam en pelo de caballo¹¹⁶. La muestras de pelo eran incubadas con el tampón de Sorensen y posteriormente sufrían una extracción con disolventes.

Ugland describió el uso de la microextracción en fase líquida y la cromatografía de gases en la determinación de diazepam y nordazepam, su principal metabolito, en orina y plasma¹¹⁷. Los analitos eran extraídos de la muestra (3-3.5 ml) con 25 μ l de disolvente. El dispositivo de microextracción consistió en una fibra hueca porosa de polipropileno provista de dos agujas guiadas insertada a través de un septum en un recipiente de 4ml. La fibra conteniendo el disolvente de extracción era sumergido en la disolución de muestra. El dispositivo de extracción se sometió a 600 revoluciones por minuto durante 50 minutos y posteriormente, 1 μ l del disolvente de extracción con los analitos preconcentrados fue inyectado directamente en la columna capilar .

También han sido descritos métodos en los que se emplea la extracción en fase sólida (SPE) como paso previo al análisis cromatográfico. Opper y Gerhards usaron esta técnica¹¹⁸ utilizando diferentes rellenos de cartucho para la determinación de meconin, metadona, morfina y diazepam en orina. La preparación de la muestra incluía una derivatización con anhídrido acético. Se empleó un detector de masas, columnas capilares y gradiente de temperaturas. Este método resultó más rápido que los métodos convencionales.

Soriano y colaboradores describen un método para la identificación y determinación de opiáceos, cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas, etc en fluidos

biológicos¹¹⁹. El procedimiento descrito incluye una extracción en fase sólida, seguida del análisis por cromatografía de gases empleando un detector de nitrógeno-fósforo y posterior confirmación por masas. En los casos en que fue necesario se recurrió a la derivatización. Las muestras fueron sometidas a ultrasonidos durante 15 minutos y para el caso de las muestras de orina se efectuó una hidrólisis enzimática con beta-glucuronidasa. En el análisis de las benzodiazepinas se utilizó el prazepam como standard interno. Las benzodiazepinas fueron extraídas a pH 8-8.5. Las recuperaciones obtenidas para los compuestos estudiados fueron siempre superiores al 60%.

Inoue y colaboradores procedieron a la identificación y determinación de benzodiazepinas en sangre empleando la extracción en fase sólida¹²⁰. Las muestras eran centrifugadas a gran velocidad durante 20 minutos y el sobrenadante se trató con un tampón fosfato de pH 7. Las benzodiazepinas eran eluidas de la columna con diclorometano. El eluato era entonces centrifugado de nuevo a 4°C. Posteriormente, la capa orgánica era evaporada a sequedad a 45°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo se recogía en metanol, empleando el fludiazepam como standard interno. El análisis se efectuaba por gases-masas con columnas capilares y gradiente de temperaturas.

HPLC

En la bibliografía, la técnica más usada en el análisis de diazepam es la cromatografía líquida de alta resolución.

Iwase y colaboradores desarrollaron una metodología para la desproteinización de plasma¹²¹. Este método fue aplicado en la preparación del plasma para el análisis de teofilina y diazepam empleando la técnica HPLC con detección UV, con el procedimiento desarrollado se obtuvieron recuperaciones superiores al 90%.

Rau desarrolló un método para la determinación simultánea de diazepam y imipramina¹²², las muestras fueron analizadas por la técnica de fase inversa, empleando un columna de 25 cm, Nucleosil C18. La fase móvil empleada fue metanol/H₂O/ácido acético (16:3:1) y la detección se efectuó a 250 nm.

Husain y otros describieron una técnica para el análisis multicomponente en tabletas que contenían paracetamol, ibuprofeno y diazepam, mediante la técnica HPLC¹²³. Se empleó una columna de 25 cm Zorbax ODS con precolumna y la fase móvil fue acetonitrilo/ácido acético 0.5% (13:7). La detección se realizó a varias longitudes de onda, empleando para ello un sistema de fotodiodos de barrido.

Recientemente, Ferreyra y Ortiz han desarrollado un método en fase inversa para el análisis de fenilpropanolamina, cafeína y diazepam en preparados farmacéuticos¹²⁴. La única preparación de la muestra era la extracción y dilución con acetonitrilo. Tras microfiltrar la muestra, esta era inyectada en una columna Supelcosil LC-18, siendo la fase móvil acetonitrilo/agua (3:7 v/v) inicialmente, estableciéndose un gradiente de concentraciones hasta el 100% de acetonitrilo en 18 minutos. La detección se realizaba en el UV a 254 nm. El método descrito es simple y adecuado para el control de calidad de preparados farmacéuticos.

Kagan propone un método HPLC en fase normal, en el cual sustituye el n-hexano (habitual en estas aplicaciones) por el etoxinafluorobutano¹²⁵. Gradientes de metanol en etoxinafluorobutano en una columna ciano se aplicaron con éxito en la separación de esteroides, benzodiazepinas, etc.

Wilheim y colaboradores describieron un método para la determinación de benzodiazepinas y sus metabolitos¹²⁶. El protocolo incluye una extracción líquido-líquido con CHCl₃ seguida por un análisis en fase inversa en isocrático. La columna empleada fue Lichrospher-100 RP-8, siendo la fase móvil tampón acetato (pH 4.6)/acetonitrilo (11:9). La detección se realizó en el UV (250 nm) en serie con una

detección electroquímica por reducción (-1.4 V, frente a electrodo de Ag/AgCl) en el electrodo de goteo de Hg. Con esta técnica se obtienen mayores sensibilidades que con las técnicas HPLC convencionales.

4.2.3. Otras técnicas analíticas

Se han desarrollado métodos polarográficos en sistemas acuosos⁸⁶, en los que se atribuye la onda polarográfica de reducción al grupo $-C=N-$, siendo la corriente de difusión proporcional a la concentración en el intervalo $(2-7) \cdot 10^{-4}$ M.

En la bibliografía se encuentran diversos métodos que utilizan la polarografía de impulsos para la determinación de diazepam tanto en fluidos corporales como en preparaciones farmacéuticas. Guadalupe García y colaboradores analizaron el diazepam presente en tabletas empleando esta técnica¹²⁷, con un electrodo de trabajo de gota de mercurio, uno de Ag/AgCl como electrodo de referencia y como auxiliar uno de platino. Las muestras eran extraídas con éter etílico y tras un proceso de evaporaciones y disoluciones posteriores, eran finalmente diluídas con un tampón a pH 4.6 para proceder a su determinación.

Se ha analizado diazepam en sangre, suero, orina y en tabletas, también por polarografía de pulso diferencial empleando la adición estándar¹²⁸. El diazepam era extraído de la tabletas mediante metanol y de los fluidos biológicos con n-pentano, cambiándose luego por metanol para el análisis. Los extractos eran tamponados a pH 2.8 y analizados desde -0.5V a -0.95V. El pico de reducción del diazepam se observó a -0.73V.

Nie y colaboradores desarrollaron una metodología para la determinación potenciométrica de diazepam con un electrodo selectivo¹²⁹. Para ello, especies que forman pares iónicos con el diazepam, como el tetrafenilborato, dipicrilamina o

tungstosilicato se incorporaron al electrodo con membrana de PVC; la potenciometría directa se realizó a pH 2.3 .

El diazepam puede ser determinado por valoración en medio no acuoso usando como medio disolvente ácido acético glacial y como valorante HClO_4 0.1N en ácido glacial⁸⁶.

Zhang determinó diazepam en un preparado farmacéutico por valoración¹³⁰ con HClO_4 , la muestra fue sometida a un proceso cromatográfico con alumina neutra y eluída con etanol, para eliminar las dextrinas que interfieren en el análisis. El eluato era llevado a sequedad y disuelto en ácido acético, procediendo a su valoración con violeta de cristal como indicador.

PARTE EXPERIMENTAL

4.3. ENSAYOS PREVIOS

4.3.1. Estabilidad y preparación de la muestra

La estabilidad frente al tiempo de las disoluciones a emplear, muy especialmente la de la muestra, es un aspecto importante a considerar antes de desarrollar el posible procedimiento analítico.

Dada la poca solubilidad de la droga en agua, las disoluciones “madre” se preparan en etanol absoluto, con una concentración de 500 mg/ml. Las disoluciones de muestra se preparaban por dilución de éstas con agua, de tal manera que al final se obtenía un medio hidroalcohólico.

Las experiencias para determinar la estabilidad consistieron en efectuar registros periódicos del espectro UV-VIS de las disoluciones durante un tiempo máximo de una semana. Se puede concluir que las disoluciones de 500 ppm de diazepam en etanol absoluto son perfectamente estables durante más de una semana, su estabilidad se ve incrementada si se almacenan en un frigorífico a 5°C. Por el contrario, las disoluciones de muestra (≤ 20 ppm de diazepam en el medio descrito anteriormente) experimentan una degradación acusada a los pocos días, puesta de manifiesto a simple vista por un amarilleamiento de las mismas y por la aparición de precipitados pardos, por lo que se preparan para cada sesión de trabajo. Esto, en definitiva, permite almacenar disoluciones concentradas de diazepam (500 ppm) en etanol, diluyéndolas con agua sin ningún tipo de precaución especial.

4.3.2. Importancia del tiempo de exposición y potencia de la fuente luminosa

Las primeras experiencias, tenían por objeto comprobar que efectivamente la irradiación de las moléculas del fármaco provocaba su degradación.

Para estudiar la influencia de este factor, se utilizaron dos lámparas de 6W, una emitía con mayor intensidad a 254 nm y la segunda a 385 nm. Para el proceso de irradiación se utilizó 150 cm de tubo de teflon de 8 mm de diámetro interno enrollado alrededor de la lámpara UV que presentaba forma cilíndrica y era ubicado en un montaje en continuo sin válvula de inyección y con un fluorímetro como detector. (figura 4.4.).

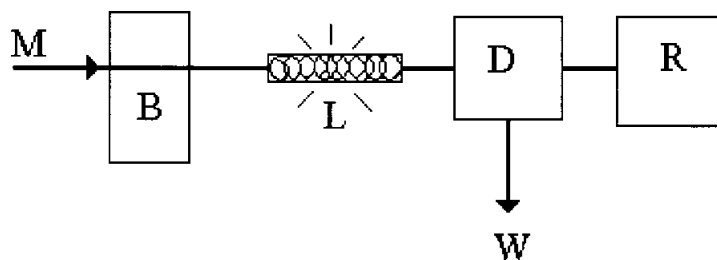


Figura 4.4. Montaje para el estudio del efecto de la irradiación.
M : disolución hidroalcohólica (10% v/v de etanol en agua) de 10 ppm de diazepam
B. bomba peristáltica ; L : fotorreactor; D : detector, fluorímetro ;
W : desecho ; R : registro

El portador empleado fue agua destilada. Se procedió a irradiar disoluciones acuosas de 10 ppm de diazepam que contenían un 10% v/v de etanol, con las dos lámparas, deteniendo el flujo distintos tiempos. Las experiencias realizadas con la lámpara de 385 nm demostraron no tener poder fotodegradante. No obstante, los estudios realizados a 254 nm sí produjeron la fotodegradación del fármaco y la aparición de un producto fluorescente.

El efecto de la irradiación fue estudiado recogiendo el espectro de fluorescencia de las disoluciones antes y después de ser irradiadas 5 y 10 minutos. Se constató la formación de un producto fluorescente con los máximos de longitud de onda de excitación en 328 nm y de emisión en 382 nm.

Se pudo observar en estos ensayos preliminares, que la formación de un producto fluorescente tras la fotodegradación del diazepam, requería detener el flujo para obtener señales significativas.

Como se ha mencionado anteriormente estas experiencias fueron realizadas con una lámpara de 6W. En un intento aumentar la señal analítica, se probó una lámpara más potente (30W) y trabajando en las mismas condiciones descritas. Sin embargo, no se pudo obtener señal analítica alguna con esta última lámpara.

Vistas las experiencias anteriores, el tiempo de exposición era una variable de especial importancia y se propone el montaje de la figura 4.5., donde el fotoreactor era ubicado en el bucle de muestra de la válvula de inyección del montaje FIA.

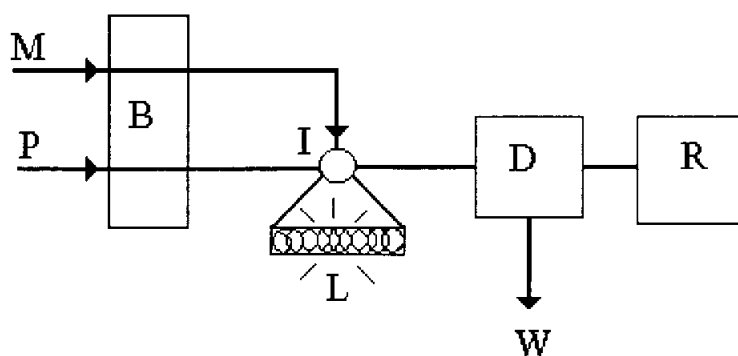


Figura 4.5. : Montaje FIA propuesto para los ensayos previos.
M : disolución hidroalcohólica (10% v/v de etanol en agua) de 10 ppm de diazepam
P : portador, agua ; B. bomba peristáltica ; I. válvula de inyección
L : fotoreactor ubicado en el bucle de muestra ; D : detector, fluorímetro ;
W : desecho ; R : registro

Había que parar el flujo de muestra en el bucle situado alrededor de la lámpara varios minutos para obtener una señal analítica apreciable.

En los primeros ensayos con el montaje FIA se apreció que 5 minutos de exposición resultaban suficientes en principio, ya que, más tiempo de irradiación no mejoraba sensiblemente la señal analítica y sí afectaría considerablemente a la velocidad de muestreo. La longitud del tubo de PTFE enrollado alrededor de la lámpara UV fue de 150 cm. Se escogió 5 minutos de tiempo de irradiación para continuar en posteriores experiencias.

4.3.3. Influencia del medio y presencia de catalizadores

En las primeras pruebas realizadas se pudo constatar que la señal analítica que proporcionaba una disolución de diazepam en etanol al 4% v/v era pequeña. Por tanto, se procedió a efectuar un estudio de los posibles medios que favorecieran la reacción.

4.3.3.1. Influencia del etanol

Esta experiencia se realizó con el montaje FIA mostrado en la figura 4.4. La concentración de diazepam utilizada en este estudio fue de 10 ppm, empleando agua como portador.

Se estudió la influencia de la concentración de etanol en la disolución de muestra y se pudo constatar que dicha concentración no afectaba a la intensidad de fluorescencia, pero al aumentar su concentración sí se provocaba un aumento en el ruido de fondo y en la génesis de burbujas, que afectan significativamente a la reproducibilidad de los resultados.

Los estudios efectuados demostraron que un contenido en etanol comprendido entre el 0.5% v/v y un 4% v/v en la disolución de muestra, era más que suficiente para garantizar la solubilidad del fármaco en la disolución y que además no producía ningún efecto negativo en las señales analíticas.

4.3.3.2. Influencia de la acidez/basicidad del medio

En este estudio las concentraciones de diazepam estudiadas fueron de 20 ppm en disolución hidroalcohólica (etanol 4% v/v), empleándose el mismo montaje FIA de la experiencia anterior.

Se estudió el empleo de los siguientes medios en la disolución de muestra :

- NaOH en el intervalo de concentraciones 0.040 - 0.120 M,
- HCl 0.050 M
- Tampón $\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{3-}$ 0.100 M.

El portador fue agua en todos los casos.

El pH demostró ser una variable muy importante para el buen desarrollo del proceso de fotodegradación. Las experiencias efectuadas indicaban que en medio hidróxido sódico diluido la señal analítica se incrementa. En el medio ácido estudiado se pudo constatar que prácticamente no se obtenía señal analítica alguna. Hay que tener en cuenta que el diazepam experimenta cambios hidrolíticos de consideración a valores bajos de pH, siendo ésta la posible causa de que los medios ácidos resulten inapropiados.

Todo esto se puede apreciar en la tabla 4.1. donde se muestran los resultados obtenidos tras inyectar 20 ppm de diazepam en estos medios.

Medio	Intensidad
diazepam 20 ppm	7
diazepam 20 ppm/NaOH 0.040 M	18
diazepam 20 ppm/NaOH 0.080 M	58
diazepam 20 ppm/NaOH 0.120 M	32
diazepam 20 ppm/HCl 0.050 M	5
diazepam 20 ppm/tampón $\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{3-}$ 0.100 M.	10

Tabla 4.1. : Influencia del pH del medio.

4.3.3.3. Influencia de catalizadores

En el momento en que se diseñó esta experiencia, se supuso de acuerdo con la bibliografía, que la degradación del diazepam podía transcurrir a través de un mecanismo red-ox, por lo que los catalizadores que se eligieron fueron los habituales en reacciones que implican intercambio de electrones.

En un principio se probaron como catalizadores diversos cationes metálicos de la serie de transición. Estos fueron estudiados adicionándolos a las disoluciones de muestra, las cuales eran disoluciones hidroalcohólicas (etanol 4% v/v) de 20 ppm de diazepam, tanto en medio neutro como en medio HCl 0.050 M y en el caso del Cu(II) también en medio NaOH 0.200 M, aprovechando su carácter anfótero y que la fotodegradación esta favorecida en medio alcalino. No se probó conjuntamente un medio alcalino con los otros metales para evitar la formación de precipitados de hidróxidos u óxidos básicos. Todos los resultados se compararon con las señales proporcionadas por una disolución de 20 ppm de diazepam en medio etanol al 4% v/v sin catalizador.

El portador fue agua destilada. Los catalizadores y medios probados con sus concentraciones en disolución acuosa, así como los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.2.

	Intensidad
diazepam 20 ppm	8
diazepam 20 ppm/ Co(II) 0.25 ppm	6
diazepam 20 ppm/ Co(II) 0.25ppm/HCl 0.050 M	3
diazepam 20 ppm/ Fe(III) 0.25 ppm	6
diazepam 20 ppm/ Fe (III) 0.25 ppm/HCl 0.050 M	3
diazepam 20 ppm/ Mn(II) 0.25 ppm	7
diazepam 20 ppm/ Mn(II) 0.25 ppm/HCl 0.050 M	3
diazepam 20 ppm/ Cu(II) 0.25 ppm	1.3
diazepam 20 ppm/ Cu(II) 0.25 ppm/HCl 0.050 M	3
diazepam 20 ppm/ Cu(II) 0.25 ppm/NaOH 0.040 M	70

Tabla 4.2. : Influencia de la presencia de catalizadores.

En todos los casos en que el metal se probó en medio ácido se obtuvieron peores señales que las proporcionadas por el analito sin metal. El Cu(II) en medio alcalino es el sistema que mejores resultados ofrece.

Hay que indicar que el poder catalizador del Cu(II) en medio alcalino provoca la degradación del diazepam incluso sin irradiación de luz UV. No obstante la señal analítica obtenida sin irradiación previa es muy baja.

4.3.3.4. Influencia del persulfato potásico

Se decidió ensayar el sistema oxidante persulfato potásico/Ag(I). El persulfato es un oxidante fuerte pero lento, de tal manera que tales características podían favorecer la reacción de fotodegradación sin llegar a sustituir a la luz como “reactivo”. Se comparó el comportamiento de este sistema oxidante con el uso de Cu(II) en medio alcalino.

Las disoluciones probadas y sus concentraciones, además de los resultados obtenidos se pueden apreciar en la tabla 4.3.

	Intensidad
diazepam 20 ppm	8
diazepam 20 ppm/ Cu(II) 0.25 ppm/NaOH 0.040 M	70
diazepam 20 ppm/ K ₂ S ₂ O ₆ 0.010 M/Ag(I) 0.25 ppm	35
diazepam 20 ppm/ K ₂ S ₂ O ₆ 0.010 M/Ag(I) 0.25 ppm/ HCl 0.050M	37

Tabla 4.3. : Influencia del sistema K₂S₂O₆/Ag(I)

El persulfato favorece la fotodegradación incluso en medio ácido, pero se puede apreciar que el Cu(II) en medio alcalino proporciona mejores señales analíticas.

4.3.3.5. Elección del medio alcalino

Para acabar de dilucidar cuál era el mejor medio, se probaron diversos medios básicos : NH₃, tampón PO₄³⁻/HPO₄³⁻ y NaOH a diversas concentraciones, fijando en todos los casos la concentración de Cu(II) en 0.25 ppm. Las bases y el catalizador eran incluidos en la disolución de muestra. El portador es agua y se mantiene la concentración de muestra en 20 ppm de diazepam.

Los intervalos de concentraciones estudiados fueron ; NaOH (0.020-0.080 M), NH₃ (0.100-1.000 M) y tampón (0.010-0.040 M). Los datos registrados se muestran en la tabla 4.4.

Medio	Intensidad
NaOH 0.020 M	97
NaOH 0.040 M	119
NaOH 0.060 M	93
NaOH 0.080 M	84
NH ₃ 0.100 M	44
NH ₃ 0.500 M	46
NH ₃ 1.000 M	46
tampón PO ₄ ³⁻ /HPO ₄ ³⁻ 0.010 M	70
tampón PO ₄ ³⁻ /HPO ₄ ³⁻ 0.020 M	75
tampón PO ₄ ³⁻ /HPO ₄ ³⁻ 0.040 M	71

Tabla 4.4. : Elección del medio alcalino.

Se puede concluir que las mejores respuestas se obtuvieron con NaOH 0.040 M y Cu(II) 0.25 ppm. Se elige este medio para abordar la optimización, manteniendo el agua como portador.

4.3.4. Influencia de la Temperatura

Se efectuó una prueba para estudiar la posible influencia de la temperatura en la reacción. Se calentaron las disoluciones del portador y de muestra a 50°C, ya que no era posible termostatar el bucle de muestra al estar enrollado a la lámpara. Se introdujo en un baño termostático un tramo largo de tubo de teflón (330 cm) que precedía al bucle de muestra y que actuaba de canal de toma de muestra. De esta manera, la muestra era precalentada antes de llegar a la lámpara

UV y las señales analíticas obtenidas en estas condiciones se compararon con las correspondientes al proceso analítico normal a temperatura ambiente (Tabla 4.5.)

Temperatura	50°C	ambiente
Intensidad	87	100

Tabla 4.5. : Influencia de la temperatura.

Se puede apreciar que la reacción progresa de manera más adecuada a T^a ambiente, además de que se atenúa la formación de burbujas.

4.3.5. Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión

Inicialmente se habían obtenido las longitudes de onda de excitación y emisión de la muestra fotodegrada ($\lambda=328$ nm y $\lambda=382$ nm). Una vez seleccionado el medio más adecuado (disolución hidroalcohólica, etanol 4% v/v/NaOH 0.04M/0.25 ppm de Cu(II)). Se procedió a reoptimizar las longitudes de onda de máxima absorción y emisión. Esta vez se utilizaron disoluciones con 5 ppm de diazepam, en lugar de las de 20 ppm estudiadas al principio, ya que con las nuevas condiciones químicas se obtuvo una mejora sustancial en la señal analítica.

La experiencia se realizó de la siguiente manera : después de someter la muestra al proceso de fotodegradación por irradiación UV, se detuvo el flujo justo en el momento en que la muestra fotodegradada se encontraba en la celda de flujo en el detector, para ello fue necesario cronometrar el tiempo que invertía en llegar la muestra a la celda de medida. Una vez que la muestra había llegado al detector y se había detenido el flujo, se efectuó un barrido de excitación, determinándose el máximo de absorción. Fijando este valor se efectuó un barrido de emisión, seleccionándose, así mismo, el máximo de emisión.

Las longitudes de onda obtenidas fueron 319 nm y 364 nm para la excitación y emisión respectivamente.

4.4. MONTAJE FIA SELECCIONADO

A tenor de los resultados encontrados en los experimentos previos con especial atención a dos aspectos relevantes :

- a) La necesidad de un tiempo de irradiación prolongado, minimizando la dispersión de la muestra.
- b) Como ya se ha indicado anteriormente la muestra se prepara en disolución hidroalcohólica. El etanol presente sufre un proceso de evaporación mientras el bolo de muestra se encuentra parado alrededor de la lámpara UV, con la consiguiente génesis de abundantes burbujas. Estas constituyeron un importante problema a salvar, entre otros efectos las burbujas introducen alteraciones en los caudales y por tanto en la reproducibilidad.

El primer aspecto se resolvía con el sistema FIA utilizado hasta el momento, ya que procuraba un modo sencillo de incrementar el tiempo de irradiación tanto como fuese necesario, sin afectar a la dispersión. Otras técnicas, como detener el flujo después de la inserción de la muestra requerían un control muy exacto de los tiempos que complicarían el sistema.

Para verificar que el responsable de la aparición de burbujas era el etanol, se efectuaron mediciones en disoluciones de diazepam saturado en agua y se pudo apreciar que en estas no aparecían más que ocasionalmente. Podemos concluir que el responsable mayoritario de la aparición de burbujas es el etanol, si bien y en un caso general no son descartables otras causas, como subproductos gaseosos de reacción, efectos térmicos, etc.

Para eliminar la presencia de burbujas, se incluyó en el montaje FIA un baño de hielo (0°C) a la salida de la lámpara, que condensara en lo posible el vapor de etanol. Para ello se introdujo un tramo de la conducción de teflón en dicho baño.

Se desechó el uso de cámaras desburbujeadoras por lo engorroso de su empleo. Por tanto, y teniendo presente que los vapores etílicos son los principales responsables de las burbujas, se consideró suficiente el empleo del baño frigorífico, ya que de hecho elimina en gran medida la presencia de las mismas.

Se decidió seleccionar como sistema FIA, el utilizado hasta ahora, pero incluyendo un baño refrigerante a la salida del bucle de muestra y que se representa en la figura 4.6. Esta configuración FIA permite al bolo de muestra estar en contacto con la fuente de irradiación (flujo-parado) durante un período de tiempo elevado sin incrementar la dispersión de la muestra y minimiza la génesis de burbujas.

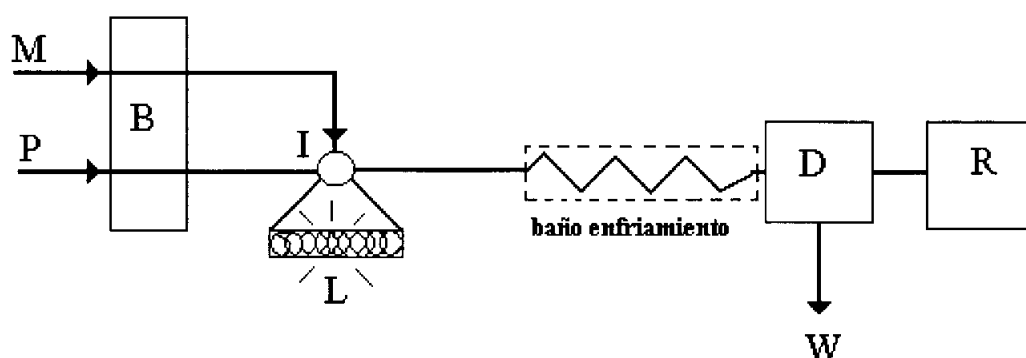


Figura 4.6. : Montaje FIA para la determinación de diazepam. P, portador (agua destilada) ; B, bomba peristáltica ; M, disolución de muestra (en medio alcalino y presencia de Cu(II)) ; I, válvula de inyección ; L, lámpara UV (254 nm, 6W) ; D, detector ; R, registro informático y W, depósito residuos.

La muestra consiste en una disolución de diazepam en medio hidroalcohólico, con un porcentaje variable de etanol entre 0.5% y 4%, dependiendo de la

concentración de analito, además de NaOH 0.040 M y de 0.25 mg/ml de Cu(II) como catalizador.

Se detenía el flujo de la muestra durante 5 minutos, para su irradiación con luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) a través del tubo de teflón (150 cm, 8 mm d.i.), el cual se encuentra enrollado alrededor de la lámpara de mercurio de 6 W y ésta a su vez esta emplazada en el bucle de muestra de la válvula de inyección. Aquí es donde el diazepam sufre un proceso de fotodegradación y como consecuencia del mismo, se obtiene un producto fluorescente. Esta fluorescencia es aprovechada para la determinación del fármaco.

Después de atravesar el baño, el bolo de muestra llega a la celda de flujo situada en el detector. Las longitudes de onda son $\lambda=319$ nm (excitación) y $\lambda=364$ nm (emisión). Este proceso nos proporciona una señal transitoria, en forma de pico, propia de un sistema FIA.

La altura de los picos obtenidos es proporcional a la concentración de analito en la muestra y constituye la señal analítica a usar tanto en la optimización de los diversos parámetros FIA y químicos, como para establecer las aplicaciones analíticas del método.

Con el montaje FIA seleccionado y las condiciones de trabajo indicadas se comprobó que 2.5 ppm de diazepam proporcionaban señal suficiente para abordar el proceso de optimización.

4.5. OPTIMIZACIÓN DE PARAMETROS EXPERIMENTALES

4.5.1. Procedimiento de optimización

Considerando el montaje FIA empleado y los reactivos participantes en la reacción, los parámetros experimentales que influyen directamente en la señal analítica del método son:

1. Variables químicas: concentraciones de NaOH, Cu(II) y el tiempo de irradiación
2. Variables FIA: caudal, longitud del bucle de muestra o volumen de muestra, longitud del tramo sumergido en el baño refrigerante
3. Condiciones del detector: longitudes de onda, anchura de rendija de excitación y de emisión.

Se empleó el método univariante para el proceso de optimización de las distintas variables del sistema.

En la optimización de cada variable se mantenían constantes los valores del resto de parámetros. La elección del valor óptimo se basaba no sólo en la altura de los picos, sino también en la anchura en la base de los mismos, la repetitividad y estabilidad de la línea base.

La optimización se inicia con las siguientes condiciones :

Disolución de muestra: 2.5 ppm de diazepam en disolución hidroalcohólica conteniendo etanol 0.5%v/v /NaOH 0.040 M/Cu(II) 0.25 ppm.

Portador: agua.

Longitud del reactor: 150 cm (8mm d.i.).

Longitud conducción de PTFE del baño refrigerante: 400 cm (8mm d.i.).

Tiempo de irradiación: 10 minutos

Caudal del portador: 2.37 ml/min.

Longitudes de onda : (excitación) $\lambda=319$ nm ; (emisión) $\lambda=364$ nm.

4.5.2. Influencia de la concentración de NaOH

En los ensayos previos se concluyó que era necesario un pH alcalino para que la reacción de fotodegradación progresara adecuadamente. En la experiencia descrita en el apartado 4.3.3.4 (Elección del medio alcalino) se comprobó que de todas las bases empleadas era el hidróxido sódico la que proporcionaba mejores resultados.

En la figura 4.7. se representan gráficamente los resultados obtenidos en la optimización de la concentración de NaOH.

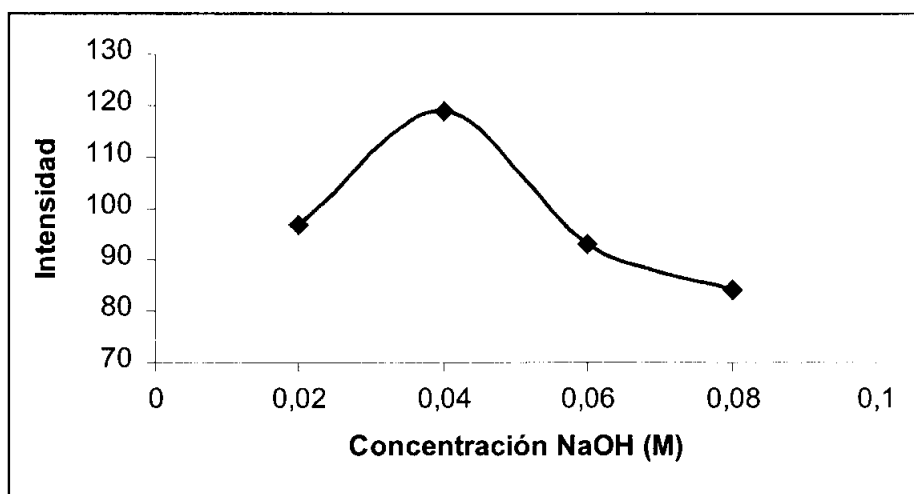


Figura 4.7. : Influencia de la concentración de NaOH.

Se elige la concentración de 0.040 M de NaOH, por su mejor señal analítica. No obstante al final de la optimización se volverá a reoptimizar este valor debido a que las nuevas condiciones del sistema que se hayan encontrado durante el proceso de optimización podrían afectar sensiblemente a las variables químicas, necesitando estas un ajuste final.

4.5.3. Influencia de la concentración de Cu(II)

Al principio de este estudio quedó claro la necesidad de un catalizador para obtener una señal analítica adecuada. De todos los posibles catalizadores probados, el Cu (II) demostró ser con mucho el más eficaz.

Para la optimización de la concentración de este catión que ha de estar presente en las disoluciones de muestra, se efectuaron una serie de inyecciones de muestra que contenían concentraciones de Cu(II) en el intervalo 0.05-10 ppm.

Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

[Cu (II)] ppm	0.05	0.25	0.5	6	10
Intensidad	50	119	156	172	161

Tabla 4.6.: Optimización de la concentración de Cu(II)

Las variaciones observadas indican que 6 ppm de Cu(II) proporcionan los mejores resultados, se toma esta concentración para seguir trabajando.

4.5.4. Optimización del tiempo de irradiación

En este procedimiento adquiere una singular importancia este parámetro, ya que la reacción de fotodegradación del diazepam requiere una fuerte y prolongada exposición a la luz UV.

La optimización se efectuó irradiando la muestra a diversos tiempos de parada del flujo en el bucle alrededor de la lámpara UV.

Los tiempos de irradiación estaban comprendidos en el intervalo 4-10 minutos para una concentración de diazepam de 2.5 ppm. Los resultados se muestran en la tabla 4.7.

Tiempo de irradiación (min)	4	5	6	10
Intensidad	88.49	96.95	105.48	109.33

Tabla 4.7.: Optimización del tiempo de irradiación (2.5 ppm de diazepam)

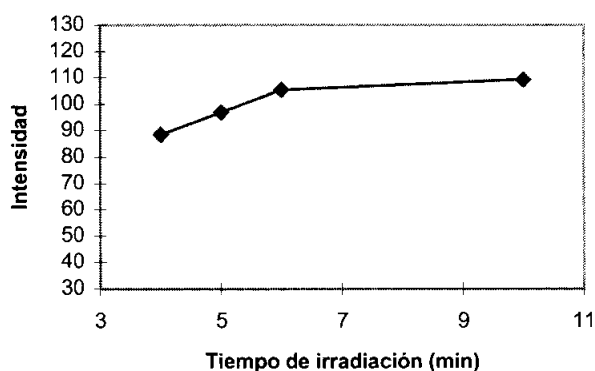


Figura 4.7.: Influencia del tiempo de irradiación (2.5 ppm de diazepam).

A los 5 minutos parece estabilizarse la señal, aunque existe un pequeño aumento al incrementar el tiempo de irradiación, éste no es significativo y podría afectar negativamente a una buena velocidad de muestreo.

Con la optimización se pretende obtener un valor de tiempo general que nos sirva para cualquier concentración de diazepam. Por lo tanto, para corroborar el valor seleccionado se repite la experiencia, pero utilizando una concentración de analito de 5 ppm. Los tiempos de irradiación estaban comprendidos en el intervalo 0-10 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.8.

Tiempo de irradiación (min)	0	3	4	5	6	10
Intensidad	40	150	200	230	230	220

Tabla 4.8: Optimización del tiempo de irradiación (5 ppm de diazepam)

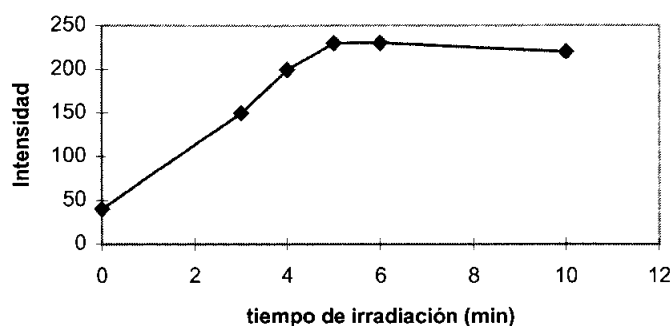


Figura 4.9.: Influencia del tiempo de irradiación (5 ppm de diazepam).

Se observa que 5 minutos de irradiación son suficientes, más tiempo de irradiación no supone una mejora de señal e incluso se aprecia a los 10 minutos una bajada de intensidad en la respuesta. Por otro lado, resulta importante seleccionar el menor tiempo posible, para de esta manera obtener una velocidad de inyección aceptable.

Se escoge, por tanto, 5 minutos como óptimo.

4.5.5. Optimización de la temperatura de trabajo

En las pruebas previas se estimó que era mejor trabajar a temperatura ambiente que en caliente, no obstante con las nuevas condiciones introducidas en el sistema, cabía la posibilidad de que en caliente la señal analítica aumentara.

Se probó, por tanto, de nuevo el efecto de la temperatura. Ante la imposibilidad de termostatar el bucle de muestra, al estar arrollado a la lámpara,

se decide introducir en un baño termostático un tramo largo de tubo de teflón (330 cm) que precediese al bucle de muestreo y que hiciera las veces de canal de toma de muestra. De esta manera, la muestra era precalentada antes de llegar a la lámpara UV (figura 4.10.). Fueron probadas diversas temperaturas : T^a ambiente, 37°C, 49°C y 80°C.

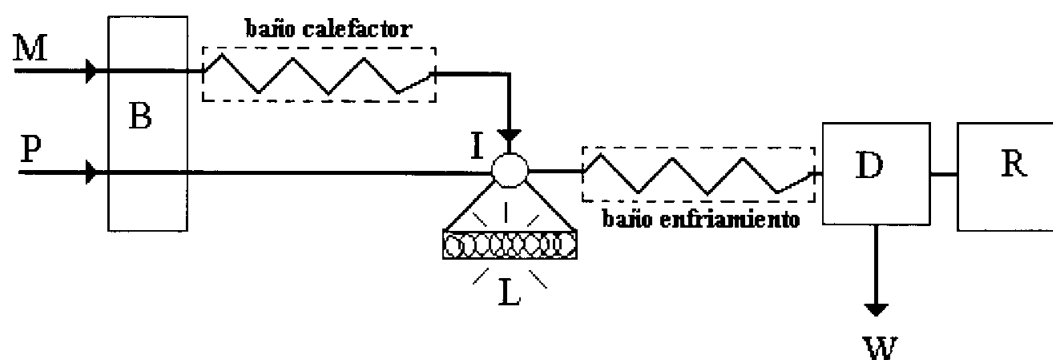


Figura 4.10. : Montaje FIA con baño termostático caliente para optimización de la temperatura de trabajo. P, portador ; M, disolución de muestra ; B, bomba peristáltica ; I, válvula de inyección ; L, lámpara UV (254 nm, 6W) ; D, detector ; R, registro informático y W, depósito residuos

En la tabla 4.9. se muestran los valores obtenidos inyectando disoluciones de muestra a las temperaturas mencionadas.

Temperatura °C	20	37	49	80
Intensidad	110	100	45	-

Tabla 4.9.: Optimización de la temperatura de trabajo.

Se puede observar que trabajando a temperatura ambiente se obtienen los mejores resultados, no solo en lo referente a la señal analítica sino también a la presencia de burbujas. En caliente se exagera la génesis de las mismas. A 80°C los resultados no eran medibles, debido precisamente a este efecto.

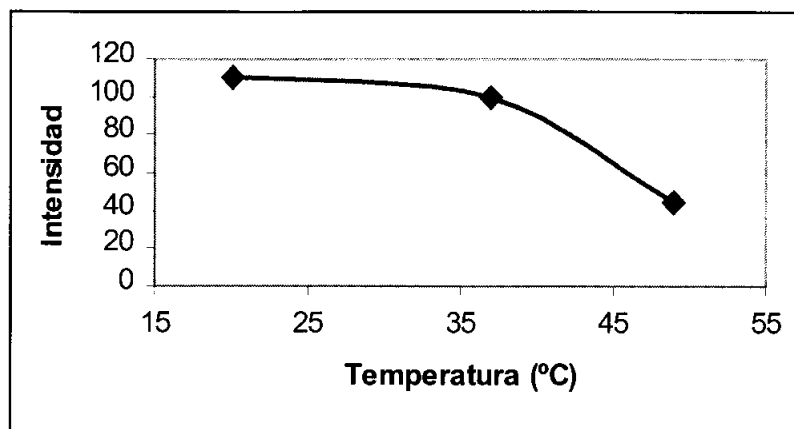


Figura 4.11.: Influencia de la temperatura en la señal analítica.

La posible explicación es que en caliente la reacción progresa hasta otra etapa, con lo cual proporcionaría menor cantidad de producto fluorescente.

En esta línea y con el objetivo de comprobar si la temperatura podría ser un factor que incrementara la velocidad del proceso, se efectuó un estudio comparativo a diversos tiempos de irradiación tanto a temperatura ambiente como en caliente (52°C). Se pudo comprobar que la producción de burbujas se exarcebaba en caliente e impedía efectuar mediciones demasiado fiables.

Esta experiencia se repitió con disoluciones saturadas de diazepam en agua, exentas de etanol para disminuir al máximo la formación de burbujas. Pero aún así, en caliente aparecen gran cantidad de burbujas, que no se eliminan con el baño refrigerante. Además las señales obtenidas son muy parecidas en uno y otro caso. Los datos se recogen en la tabla 4.10. Se observa que el recurso de incrementar la temperatura, en el caso de las disoluciones saturadas, no permite una reducción muy significativa del tiempo de irradiación y sin embargo actuaba muy negativamente sobre la reproducibilidad.

	Temperatura ambiente			Temperatura : 52°C		
	1	3	5	1	3	5
tiempo de irradiación (min)						
Intensidad (disolución hidroalcohólica de 2.5 ppm de diazepam)	14.29	35.71	45.24	*	*	*
Intensidad (disolución acuosa saturada de diazepam ≈ 50 ppm)	215.05	500.00	666.67	202.13	489.36	702.13

* la presencia de burbujas, proporcionaba lecturas irreproducibles.

Tabla 4.10.: Estudio de la interacción entre tiempo de irradiación y temperatura de trabajo.

Por tanto, se elige la temperatura ambiente como temperatura de trabajo.

4.5.6. Optimización volumen de muestra y longitud del reactor

Dadas las características inherentes al montaje FIA propuesto, el tramo que define el volumen de muestra al estar enrollado a la lámpara para recibir la irradiación se convierte así mismo, en el tramo reactor. Optimizar el volumen de muestra implica evidentemente optimizar la longitud del tramo reactor. Este constituye un parámetro importante tanto por el efecto de dispersión de la muestra como por el avance de la reacción, fenómenos contrapuestos en la calidad analítica de las señales que se obtengan.

Se realizaron una serie de inyecciones de muestra, modificando la longitud del reactor desde 1m a 4m.

Las señales analíticas obtenidas se reflejan en la tabla 4.11.

Longitud reactor (m)	1	2	2.5	3	3.5	4
Intensidad	60.54	116.24	124.48	132.26	143.09	145.17

Tabla 4.11.: Optimización de la longitud del reactor.

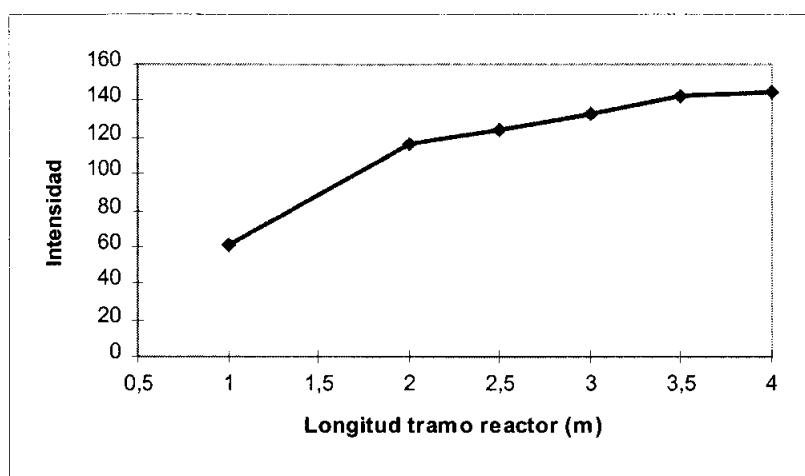


Figura 4.12.: Influencia de la longitud del reactor en la señal analítica.

Se aprecia que entre 2, 3 y 4 m no existe una variación muy acusada. Para 4 m los picos empezaban a ser muy anchos por la dispersión de la muestra.

Dada la poca variación de intensidades obtenidas y considerando el compromiso entre anchura y altura de picos, se escoge el tramo más corto, 2.5 m. Esta longitud para el reactor es la que menos dispersión provocará en la muestra en su camino hacia el detector.

4.5.7. Optimización del caudal

Para la optimización de este parámetro se efectuaron una serie de inyecciones de patrón para varios caudales del portador comprendidos en el intervalo 1.8 - 6.3 ml/min.

La selección del caudal óptimo se realizó a la vista de los resultados obtenidos y que se muestran en la tabla 4.12.

caudal (ml/min)	1.8	2.4	3	6.3
Intensidad	51.09	54.22	51.21	78.13

Tabla 4.12.: Optimización del caudal.

La intensidad de señal obtenida en cada caso fue prácticamente la misma en el intervalo comprendido entre 1.8 y 3.0 ml/min. El aumento del caudal a 6.3 ml/min, proporcionó no sólo un estrechamiento de los picos FIA y por tanto el efecto positivo de aumentar la velocidad de inyección, sino también un aumento de la señal analítica.

Se fija, por tanto, el caudal del portador en 6.3ml/min.

Con este caudal para el portador, el caudal para el conducto de muestra era de 3.4 ml/min. Este último caudal no reviste importancia y únicamente debe ser suficientemente rápido como para que el llenado del fotorreactor no necesite un tiempo significativo. Además, no requiere optimización pues la muestra esta parada mientras la reacción progresa (flujo detenido alrededor en la lámpara UV).

4.5.8.- Optimización de la longitud del tramo baño refrigerante

Durante el proceso de irradiación se generan abundantes burbujas. Estas constituyen un importante problema práctico por enmascaramiento de picos, alteraciones en el flujo normal y falta de reproducibilidad.

Para eliminar este efecto y como ya se ha mencionado al describir el montaje FIA seleccionado, se decidió incluir un tramo de tubo de PTFE a la salida del bucle de la lámpara que atravesara un baño refrigerante a 0°C.

La optimización de la longitud de este tramo se hizo considerando dos aspectos contrapuestos :

- a) A mayor longitud, más posibilidades hay de eliminar las burbujas.
- b) Un tramo largo implica una mayor dispersión de la muestra y consiguientemente picos bajos y anchos

Del justo compromiso entre ambos factores se obtiene el valor óptimo.

Las disoluciones de muestra utilizadas en esta experiencia eran de 2.5 ppm de diazepam y contenían un 0.5% v/v de etanol. Se estudiaron las longitudes 1m, 1.5m, 2m y 3m. Los valores obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 4.13.

Longitud tramo refrigerante (m)	1	1.5	2	3
Intensidad Picos I máx - I (línea base)	73.88	74.00	75.69	44.68

Tabla 4.13: Optimización de la longitud del tramo refrigerante.

En los casos de 1 y 1.5 m aún aparecen burbujas, de hecho el valor correspondiente a 1.5 m no resultó reproducible por la excesiva presencia de las mismas. Trabajando con 2 m ya disminuyen considerablemente. A longitudes mayores los picos se hacen más bajos y anchos. Parece que 2 m sería el valor óptimo, ya que los efectos de la dispersión de muestra no son importantes y se eliminan mayoritariamente las burbujas.

Para confirmar el valor de 2 m para este tramo, se inyectaron disoluciones de muestra con diferentes cantidades de alcohol en ellas. Se trataba de averiguar si el tramo elegido es capaz de eliminar burbujas a diversas concentraciones de etanol. Concretamente las disoluciones probadas fueron :

- a) 2.5 ppm diazepam/etanol 0.5% v/v
- b) 2.5 ppm diazepam/etanol 2% v/v

Con este tramo se elimina prácticamente la presencia de burbujas incluso con un 2% de etanol en disolución. Por esto se estima finalmente que 2 m es el valor óptimo.

4.5.9. Reoptimización de las variables químicas

Las concentraciones de NaOH y Cu(II) fueron sometidas a un proceso de reoptimización, tras establecer los valores definitivos del resto de parámetros por el método de optimización univariante.

4.5.9.1. Reoptimización de la concentración de NaOH

Para su reajuste se probaron en la disolución de muestra, concentraciones de NaOH en el intervalo 0.010 M - 0.060 M. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.14.

Concentración de NaOH (M)	0.010	0.020	0.030	0.040	0.050	0.060
Intensidad	50.72	59.92	48.88	49.28	45.13	44.32

Tabla 4.14: Reoptimización de la concentración de NaOH.

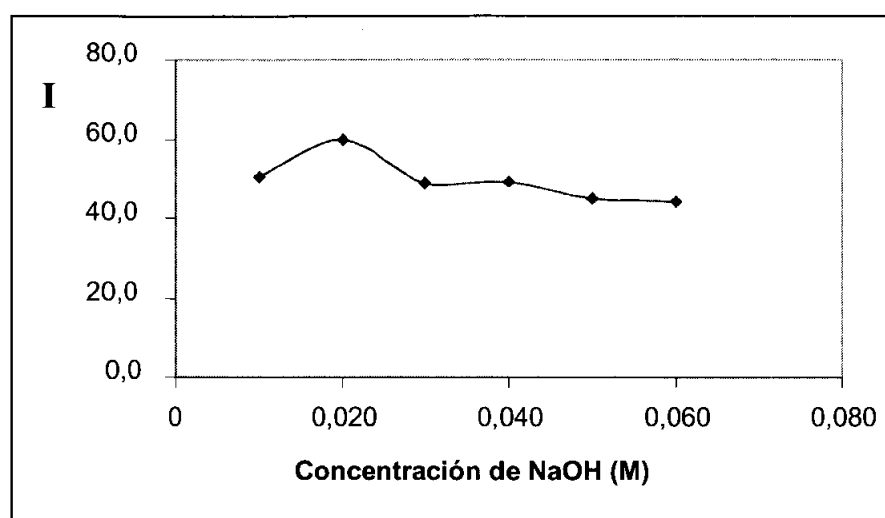


Figura 4.13.: Reoptimización concentración de NaOH.

A la vista de los resultados representados gráficamente en la figura 4.13., una concentración de NaOH 0.020 M proporcionaría la mejor señal analítica con las nuevas condiciones. Se aprecia también que el incremento de concentración implica un ligero decrecimiento de la señal analítica.

4.5.9.2. Reoptimización de la concentración de Cu(II)

Se realizó una experiencia semejante a la anterior para efectuar un reajuste de la concentración de Cu(II).

Se estudió ahora el intervalo 3-9 ppm de Cu(II). Los resultados se muestran en la tabla 4.15.

Concentración de Cu(II) ppm.	3	6	9
Intensidad	40.5	39.03	39.72

Tabla 4.15: Reoptimización de la concentración de Cu(II)

Se puede concluir que la altura de los picos es muy similar, observando la tabla anterior queda patente la poca variación en la señal analítica.

Se elige 3 ppm como valor óptimo para la concentración de Cu(II), porque proporciona una buena señal y al mismo tiempo supone un mayor ahorro de un reactivo contaminante.

4.6. OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES

4.6.1. Longitudes de onda de excitación y emisión

Para asegurar la idoneidad de las longitudes de onda utilizadas, se procedió a efectuar medidas en el intervalo de longitudes de onda próximas a los valores preseleccionados tanto para la emisión como para la excitación. Para optimizar la longitud de onda de excitación, se efectuaron varios picos variando esta longitud de onda y manteniendo fija la de emisión. La optimización de la longitud de onda de emisión se realizó a la inversa, es decir, se obtuvieron picos variando esta longitud de onda y fijando la de excitación en el valor optimizado anteriormente. Observando la tabla de resultados 4.16., se decide mantener las mismas longitudes de onda de excitación y emisión, ya que los valores obtenidos son muy similares entre sí y por tanto, se elige el valor intermedio.

	excitación			emisión		
λ (nm)	317	319	321	366	364	362
Intensidad	48.23	46.60	43.23	40.53	41.20	42.56

Tabla 4.16.: Reoptimización de las longitudes de onda de excitación y emisión.

4.6.2. Influencia de la anchura de rendija del fluorímetro

La anchura de las rendijas del fluorímetro posee una importancia singular, debido a que son componentes del detector, ajenos al sistema FIA y que afectan al ruido de fondo, consiguientemente al límite de detección y a la reproducibilidad.

La selección de estos valores se realizó optimizando primero la anchura en la ventana de excitación, para lo cual se mantuvo la ventana de emisión fija en un valor de 10 nm. Se efectuaron varias inyecciones de muestra modificando la anchura de la ventana de excitación progresivamente. Para seleccionar la ventana de emisión, el proceso efectuado fue el mismo, pero esta vez manteniendo fijo el valor de la ventana de excitación al valor seleccionado previamente (8 nm).

Los resultados obtenidos en esta experiencia quedan reflejados en la tabla 4.17. Se observó que al decrecer los valores de ambas ventanas disminuye la altura de la línea base y el ruido de fondo.

Anchura rendija emisión (nm)	10	10	10	8
Anchura rendija excitación (nm)	10	8	6	8
Intensidad	41.9	46.7	26.40	10.25

Tabla 4.17.: Influencia de las anchuras de rendija del fluorímetro.

Para la ventana de excitación se aprecia que 8 nm es la que proporciona mayor diferencia entre altura de pico y línea base, es decir, mayor señal analítica. Se selecciona este valor.

Para la ventana de emisión se observa que la disminución de anchura hace que los picos sean sensiblemente más pequeños, por lo que se elige el mayor valor que nos puede proporcionar el detector, o sea 10 nm.

4.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO

Tras el proceso de optimización, la configuración definitiva del sistema FIA para la determinación de diazepam por fotodegradación y detección fluorimétrica, es la que se muestra en la figura 4.14.

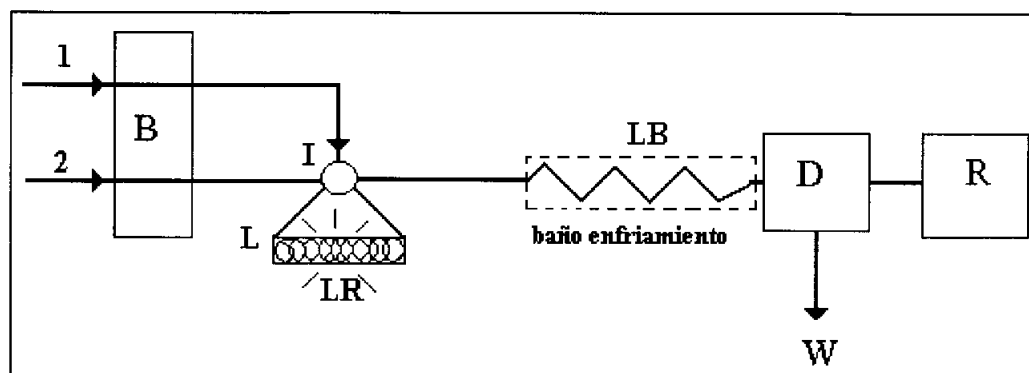


Figura 4.14.: Configuración definitiva del sistema FIA.

- 1: Muestra: diazepam en disolución hidroalcohólica, medio ajustado con NaOH 0.020 M y 3 ppm de Cu(II).
- 2: Portador: agua destilada.
- LR: Longitud del bucle de muestra: 3 m (8 mm d.i. conducción).
- LB: Longitud tramo baño refrigerante: 2m (8 mm d.i. conducción).
- B: Bomba peristáltica
- I: Válvula de inyección.
- L: Lámpara UV (254 nm).
- D: Detector (fluorímetro)
- R: Recolección, tratamiento y representación de resultados.
- W: Desecho
- Tiempo de irradiación : 5 minutos
- Caudal portador : 3 ml/min.
- Temperatura de trabajo : ambiente.

- excitación : 319 nm
- emisión : 364 nm
- Anchura ventana excitación : 8.0 nm
- Anchura ventana emisión : 10.0 nm

4.8. MECANISMO DE REACCIÓN

Son numerosos los mecanismos de fotodegradación de compuestos orgánicos que pueden encontrarse en la bibliografía analítica. No obstante el elevado número de ellos se echa en falta la existencia de conocimientos generales, es decir; de estudios teóricos con conclusiones de tipo general. También llama la atención encontrar artículos de diferente procedencia sobre la fotodegradación de un mismo compuesto y que proponen mecanismos y productos finales diferentes; en algunos casos las diferencias son considerables.

Las razones que puedan explicar tanto la ausencia de fundamentos y conclusiones generales así como las diferentes interpretaciones sobre un mismo producto pueden ser imputables a que las aplicaciones analíticas de la fotodegradación son numerosas (desde volumetrías a cualquier procedimiento espectrofotométrico o electroanalítico) y se llevan a cabo, cada vez, en condiciones experimentales diferentes. Obviamente, el resultado son productos finales distintos y por ende, mecanismos diferentes.

En el caso del diazepam se ha encontrado un trabajo que hace referencia a este producto y dos más que estudian un producto similar de la misma familia, el demoxepam.

El proceso de fotodegradación del diazepam fue estudiado primeramente por Cornelissen y colaboradores²²⁶, con un método radioquímico de marcaje, combinado con una separación por cromatografía de capa fina de los productos finales de la

descomposición fotoquímica²⁶. Para ello marcaron el diazepam con ¹⁴C en el grupo metilo enlazado al átomo de nitrógeno, ya que es un grupo que se mantiene inalterado en los productos de descomposición, excepto para un derivado benzofenónico minoritario y para la glicina. Los productos de descomposición observados dependen de las condiciones experimentales (longitud de onda y disolventes) empleadas.

Al irradiar el diazepam disuelto en metanol-agua (pH=7.4), con luz UV de 300 nm se produce un derivado de la benzofenona como único producto de descomposición, mientras que con luz UV de 254 nm, también se forma un derivado de la quinozolina como producto minoritario. No obstante, con metanol como disolvente ($\lambda=254$ nm) la situación se invierte, de tal manera que el derivado de la quinozolina se convierte en el principal producto y el derivado de benzofenona en producto minoritario.

La irradiación del diazepam con luz UV, a 300 y 254 nm (el diazepam resulta relativamente fotoestable a 350 nm) proporciona una mezcla de benzofenonas, 4-fenilquinazolinonas y 4-fenilquinazolininas y la presencia de glicina también ha sido constatada. De los resultados presentados en la tabla 4.18. se puede concluir claramente que la longitud de onda de irradiación determina qué productos de descomposición aparecerán.

% diazepam descompuesto	Disolvente : metanol-agua (pH=7.4)		Disolvente : metanol			
	% de productos de descomposición		% de productos de descomposición			
	254 nm	300 nm	254 nm			
	(II)	(III)	(II)	(II)	(III)	(IV)
10.0	10.0	-	10.0	4.3	5.7	-
20.0	17.5	2.5	20.0	7.4	12.6	-
30.0	24.3	5.7	30.0	9.3	16.7	4.0
40.0	31.3	8.7	40.0	11.0	20.7	8.3

Tabla 4.18. :Porcentajes de diazepam y de sus productos de descomposición.

(II) : 2-metilamino-5-clorobenzofenona.

(III) : 1-metil-6-cloro-1,4-dihidro-quinazolina.

(IV) : 1-metil-6-cloro-1,2-dihidro-quinazolina.

Irradiando a 300 nm en metanol-agua (pH=7.4), el diazepam se descompone en 2-metilamino-5-clorobenzofenona (II) y glicina, mientras que a 254 nm también se produce como producto minoritario 1-metil-6-cloro-1,4-dihidro-quinazolina (III). Cuando se comparan las irradiaciones a 254 nm en metanol-agua (pH=7.4) y en metanol, se evidencia la influencia del disolvente en las concentraciones de los productos formados. En metanol, el 1-metil-6-cloro-1,4-dihidro-quinazolina (III) pasa a ser el producto principal, el cual posteriormente se convierte en 1-metil-6-cloro-1,2-dihidro-quinazolina (IV), por irradiación a 254 nm. La ausencia de este último compuesto empleando metanol-agua como disolvente, puede ser debido al efecto de "filtro interno" de la radiación que ejercería el 1-metil-6-cloro-1,4-dihidro-quinazolina (III). En la figura 4.15. se muestra los productos propuestos en la descomposición fotoquímica del diazepam.

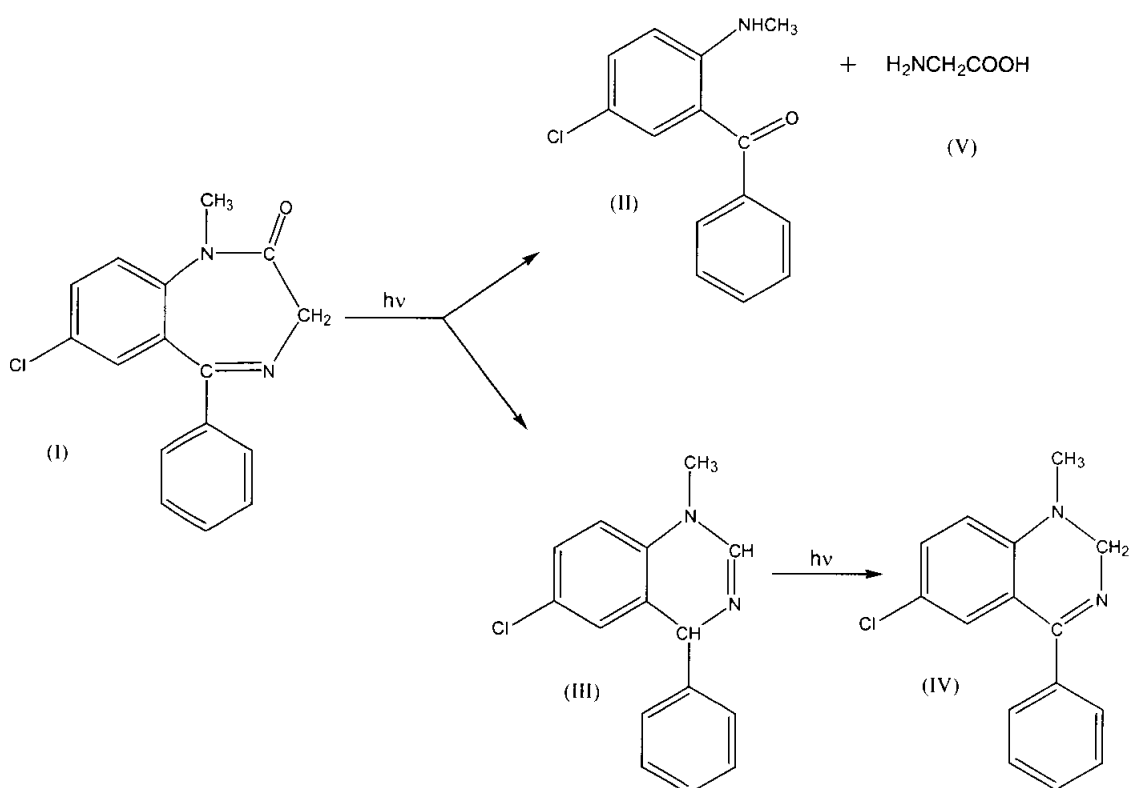


Figura 4.15. : productos de la descomposición fotoquímica del diazepam

(I) : diazepam ; (II): 2-metilamino-5-clorobenzofenona.

(III) : 1-metil-6-cloro-1,4-dihidro-quinazolina.

(IV): 1-metil-6-cloro-1,2-dihidro-quinazolina ; (V) : glicina.

Otros autores, Brinkman y colaboradores²²⁵, han estudiado un compuesto similar al diazepam, el demoxepam, un fármaco utilizado como ansiolítico y han aprovechado la fotoconversión de esta molécula para su análisis. En su trabajo se describe la descomposición propuesta por Strojny y De Silva²²⁷, y que se muestra en la figura 4.16, con la obtención de una quinazolinona altamente fluorescente. Los máximos de emisión y excitación de esta quinazolinona en NaOH 0.1 M son 380 y 460 nm, respectivamente.

Brinkman añade que tras los resultados preliminares de las medidas, realizadas por cromatografía de gases - espectrometría de masas, no aparece el átomo de cloro del principal fotoproducto formado en su estudio y sugiere la aparición de un grupo hidróxilo en posición 2. Es decir, el producto obtenido no sería idéntico a la quinazolinona (VII, fig. 4.16.) y además tendría diferentes máximos de emisión y excitación²²⁵.

En la fotodegradación de ambas benzodiazepinas (diazepam y demoxepam), se obtienen como productos moléculas de estructura química muy similar como son las quinazolinonas y las quinazolinonas.

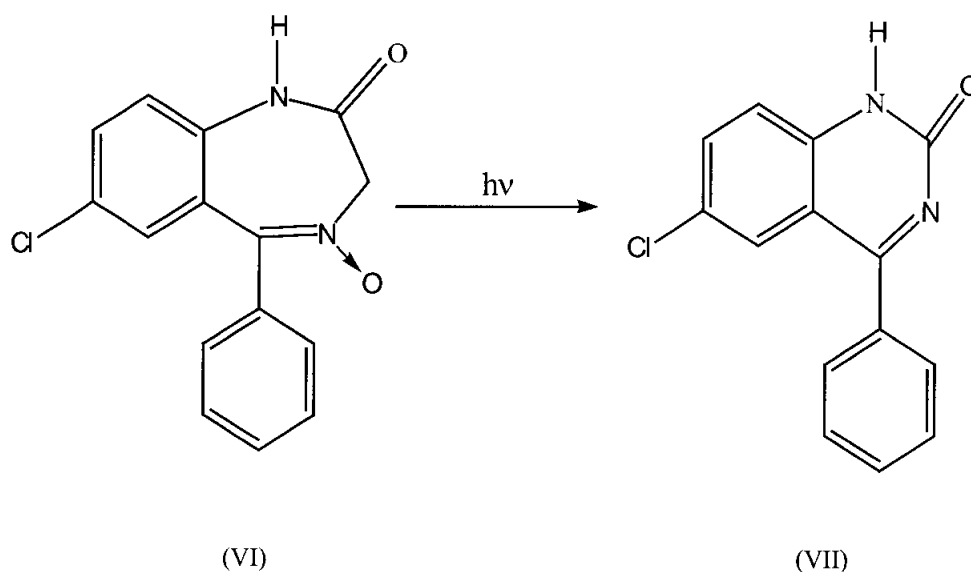


Figura 4.16.: Fotoconversión del demoxepam.
(VI) demoxepam; (VII) quinazolinona

4.9. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO

4.9.1.- Intervalo de linealidad y límite de detección

Utilizando las características finales del montaje FIA obtenidas en el proceso de optimización, se estableció el intervalo de linealidad útil de concentraciones de diazepam. El intervalo lineal está comprendido entre 0.5 y 40 ppm. Concentraciones superiores a 40 ppm proporcionaban señales que superaban la escala del aparato con las condiciones seleccionadas.

Se efectuó por tanto un ajuste lineal en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 40 ppm. Los resultados obtenidos en el calibrado se muestran en la tabla 4.19.

Concentración diazepam (ppm)	<i>Intensidad</i>
0.5	15.24
2.5	52.34
4.5	99.57
7	152.39
10	215.96
20	404.43
30	630.82
40	818.3

Tabla 4.19.: Calibrado, intervalo 0-40 ppm de diazepam.

Del cálculo de regresión efectuado con estos datos, la ecuación obtenida es :

$$I = 20.435 C + 6.152$$

$$r^2 = 0.9997$$

Siendo I la intensidad de fluorescencia, C la concentración de diazepam expresada en ppm y r el coeficiente de correlación.

La figura 4.17. muestra la gráfica de calibrado obtenida en el intervalo de concentraciones 0-40 ppm de diazepam.

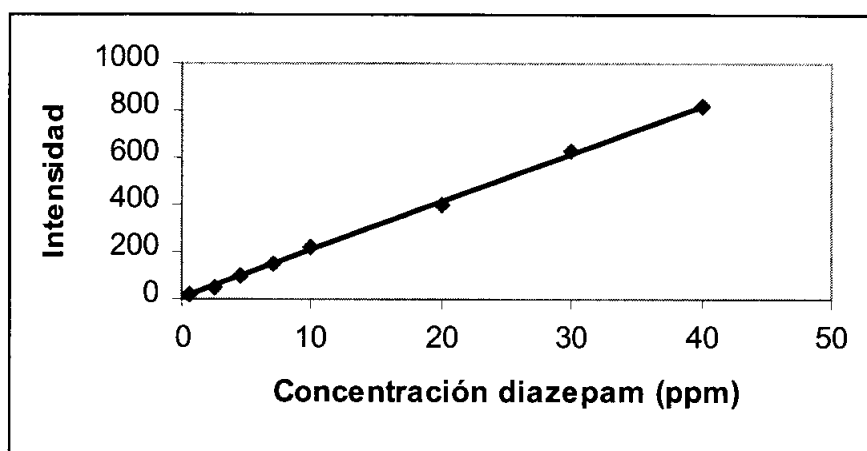


Figura 4.17.: Recta de calibrado, intervalo 0-40 ppm de diazepam.

El límite de detección fue calculado como el triple del ruido de fondo medio, obteniéndose un valor de 0.13 ppm.

4.9.2. Repetitividad y velocidad de inyección

Para la determinación de estos datos, se emplearon muestras de 7 ppm de diazepam y se realizaron 10 inyecciones consecutivas de la muestra. A partir de los picos obtenidos se calcula la repetitividad y la velocidad de muestreo (el número de inyecciones que se pueden realizar por unidad de tiempo). En la figura 4.18 se muestran los picos obtenidos en este estudio.

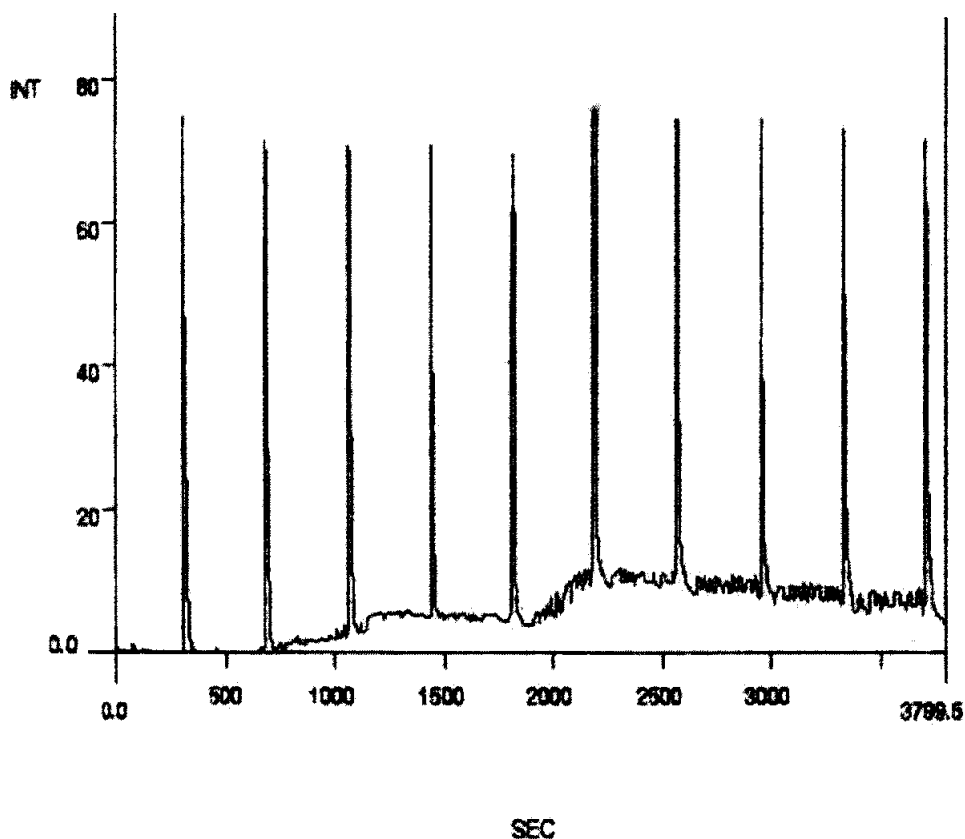


Figura 4.18: Diagrama obtenido en la experiencia para el cálculo de la velocidad de inyección.

Con los datos registrados se ha calculado una desviación estandar relativa (RSD) del 2.1%, lo cual implica una repetitividad alta. La velocidad de muestreo obtenida es de 10 muestras/hora.

4.9.3. Estudio de interferentes

Se investigó la tolerancia del método para aquellos componentes que suelen acompañar al diazepam en sus formulaciones farmacéuticas.

Se calcula la tolerancia en términos de error comparando con las señales proporcionadas por una disolución de 20 ppm de diazepam puro.

En el desarrollo de este estudio se usaron disoluciones de 20 ppm de diazepam, a las que se adicionaban diferentes concentraciones de los posibles interferentes hasta un máximo de 200 ppm.

Se estudiaron la piridoxina o vitamina B₆, glucosa, lactosa, sacarosa, sorbitol y propilenglicol.

Se pudo constatar que la piridoxina produce una fuerte interferencia. Por el contrario, los azúcares estudiados (sacarosa, glucosa y lactosa) y el sorbitol proporcionan una buena tolerancia, es decir, su interferencia no es muy acusada.

En la tabla 4.20 se exponen las concentraciones máximas de las sustancias estudiadas que no producen interferencias significativas, así como el error relativo que provocan en el análisis.

	[ppm]	ϵ_r %
<i>Piridoxina</i>	1	6.2
Glucosa	150	3.4
Lactosa	200	3.0
Sacarosa	200	4.1
Sorbitol	25	0.0
Propilenglicol	5200	5.2

Tabla 4.20.: Estudio de interferentes

4.9.4. Muestras reales

La determinación del contenido de la droga se realizó en dos fórmulas magistrales preparadas en el laboratorio de acuerdo con las instrucciones de “Martindale, The Extra Pharmacopoeia”⁸⁹.

La primera muestra consistió en una disolución estéril de propilenglicol que contenía 1001.0 ppm de diazepam. Se tomó una alícuota de 5 ml de la disolución de muestra, a la que se adicionó 2 ml de NaOH 2M y 6 ml de una disolución de 100 ppm de Cu(II). Se aforó la mezcla resultante con agua destilada a 200 ml. Las concentraciones patrón de diazepam empleadas para el calibrado fueron preparadas sustituyendo el etanol por el propilenglicol en la misma cantidad que en la muestra. De esta manera se eliminaba el efecto interferente de este alcohol. El resultado obtenido con el método propuesto fue de 1022.8 ppm, con un error relativo del 2.1%.

La segunda muestra problema analizada consistió en una solución estéril de diazepam en etanol de 5098 ppm y ajustando el pH en el intervalo 6.2-6.9. Esta muestra presentaba un contenido de la droga de 5098 ppm. Se tomó una alícuota de 1 ml de la muestra en un aforado de 200 ml, al que se adicionó 2 ml de NaOH 2.000 M y 6 ml de una disolución de 100 ppm de Cu(II). Finalmente se aforó con agua destilada. El resultado encontrado fue de 5190 ppm con un error relativo de 1.8%.

Por lo tanto, el método resulta adecuado para la determinación de este tipo de formulaciones, las cuales se preparan bajo prescripción médica con cierta frecuencia.

4.10. CONCLUSIONES

Se estudió el proceso de fotodegradación del fármaco diazepam en disolución hidroalcohólica, medio necesario para garantizar la solubilidad de la droga. Se constató que a pH alcalino progresaba mejor la reacción. El hidróxido sódico proporcionó los mejores resultados. También se requería la presencia de un catalizador, siendo el Cu(II) el más adecuado.

En el montaje FIA configurado, la muestra está contenida en una conducción de PTFE que se somete a irradiación UV con flujo parado en el bucle de la válvula de inyección. El portador consiste en agua destilada. La detección es fluorimétrica.

Las disoluciones de muestra contenían además de la droga, hidróxido sódico diluido y Cu(II) como catalizador, estas disoluciones son estables únicamente durante una jornada de trabajo de laboratorio.

De los espectros de excitación y emisión del producto resultante se seleccionaron las longitudes de onda para el sistema de detección. Se pudo comprobar que refrigerando el bolo de muestra antes de llegar al detector se eliminaban la gran mayoría de las burbujas. Estas eran generadas por calentamiento del etanol durante la irradiación.

Una vez diseñado el montaje FIA, se procedió a la optimización de variables químicas y FIA por el método univariante.

Los valores obtenidos al final de este proceso fueron:

- [NaOH] = 0.020 M.
- [Cu(II)] = 3 ppm.
- Longitud del bucle de muestra: 3 m (8 mm d.i. conducción).

- Longitud tramo baño refrigerante: 2m (8 mm d.i. conducción).
- Tiempo de irradiación : 5 minutos
- Caudal portador : 3 ml/min.
- Temperatura de trabajo : ambiente.
- λ excitación : 319 nm
- λ excitación : 364 nm
- Anchura ventana excitación : 8.0 nm
- Anchura ventana emisión : 10.0 nm

Por último se aplica el procedimiento desarrollado a la determinación de diazepam en formulaciones galénicas. Para ello, se estudiaron previamente el intervalo de aplicación del método, la ecuación de regresión correspondiente a la gráfica de calibrado lineal, la reproducibilidad y la velocidad de inyección. Además se efectuaron experiencias para determinar la interferencia que podían provocar los componentes que usualmente acompañan al diazepam en sus formulados.

Los resultados de la aplicación analítica del método se resumen en la tabla 4.21:

Intervalo de aplicación:	0.5 – 40 ppm
Recta de calibrado:	$I = 20.435 \cdot C + 6.152 ; r^2 = 0.9997$
Límite de detección	0.13 ppm
Velocidad de inyección:	10 h ⁻¹ (7 ppm diazepam)
Repetitividad:	RSD = 2.1% (7 ppm diazepam)
Interferentes:	Ver tabla resumen (tabla 4.20.)

Tabla 4.21.: Resultados de la aplicación analítica.

Con estos datos se estableció el contenido en diazepam en dos formulaciones galénicas ;

1. Disolución esteril de diazepam en propilenglicol (muestra A).
2. Disolución esteril de diazepam en vehículo adecuado ajustando el pH al intervalo 6.2 - 6.9 (muestra B).

Los errores relativos fueron del 2.1% para la muestra A y del 1.8% para la muestra B.

Capítulo quinto

**5. DETERMINACIÓN FIA-ESPECTROFOTOMÉTRICA
DE NITRITOS Y NITRATOS**

INTRODUCCIÓN

5.1. IMPORTANCIA ANALÍTICA DE NITRITOS Y NITRATOS

El número y la variedad de muestras donde se determinan nitritos y nitratos es muy grande. Los nitritos y también los nitratos se utilizan en productos alimenticios como estabilizantes del color (productos cárnicos) y conservantes químicos. Estos aniones transforman la hemoglobina y la mioglobina en compuestos de color resistente al asado, fritura, cocción y almacenamiento. Así se evita que el color rojo de la carne cambie a gris al cabo del tiempo. Se utilizan también en derivados de pescado, queso, nitrocelulosa, en el ácido sulfúrico de los acumuladores y en productos pirotécnicos¹⁹⁰.

Frente a las ventajas indiscutibles del curado con nitritos, éstos presentan ciertos riesgos para la salud. Se ha establecido su IDA (ingesta diaria admisible) en 0.1 mg de nitrito sódico por Kg de peso corporal al día. Actualmente, expertos y consumidores desaprueban el uso de nitritos, dada la potencial formación de nitrosoaminas, agentes altamente cancerígenos que se forman a partir de nitritos y aminas biogénicas (productos de desecho de los aminoácidos). No obstante, se siguen usando apelando a consideraciones higiénicas. Especialmente, para el caso de largos almacenamientos de grandes cantidades de productos cárnicos.

Los nitritos poseen acción bactericida e inhiben el desarrollo de la bacteria responsable del botulismo.

Las claves numéricas de aditivos alimentarios en la Unión Europea para el nitrito potásico y sódico son E249 y E250 respectivamente, y para el nitrato sódico y potásico son E251 y E252. Se utilizan en el queso, la carne, pescado, derivados de pescado de arenque o sardinas con especias¹⁹¹.

Por su parte, los nitratos además de encontrarse en muestras naturales, también son usados en la industria alimentaria. El nitrato potásico (salitre) se emplea en el curado de productos cárnicos. La acción antimicrobiana de los nitratos aparece cuando éstos se reducen a nitritos por la acción de microorganismos.

En el campo medio-ambiental y de la salud, las concentraciones de nitritos y nitratos constituyen parámetros de rutina para ser determinados en diferentes tipos de muestra de aguas (residuales, subterráneas, marinas, etc). El control de nitritos y nitratos ha cobrado gran importancia como consecuencia del aumento de la eutroficación de las aguas naturales y de la salinificación de acuíferos.

5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

En la bibliografía se aprecia que el análisis de nitritos y nitratos ha suscitado un gran interés analítico desde hace mucho tiempo y se han propuesto todo tipo de técnicas para estas determinaciones. Las más extendidas han sido las espectrofotometrías en el visible, pero se han descrito también métodos fluorimétricos, quimioluminiscentes, electroquímicos, etc.

En las determinaciones de nitrato, la mayoría de los métodos se han basado en técnicas espectrofotométricas de medida directa o después de un proceso de derivatización a ión nitrito ; estos últimos utilizan una reducción en fase homogénea o en fase heterogénea sólido-líquido con cinc amalgamado, cinc, cadmio, cadmio amalgamado, cadmio cuperizado y cadmio-plata cuperizados. La irradiación ultravioleta en un sistema homogéneo también ha sido propuesta, entre otros.

5.2.1. Volumetrías

Muralikrma y colaboradores establecieron la valoración de nitritos, empleando $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$ como valorante y ferroína como indicador¹³¹. La acidez adecuada para el análisis la proporciona el ácido sulfúrico en el intervalo de concentraciones 0.3 – 0.6 M.

Vaidya propuso la valoración indirecta del anión¹³². Las muestras eran tratadas con un exceso de isoniazida en medio sulfúrico. Como reactivo valorante utilizó el fenil iodosilacetato y rojo de metilo como indicador.

Myugchenko determinó nitrito en muestras acuosas, tratándolas con ácido ascórbico durante 1 minuto con agitación¹³³. El NO_2^- era reducido así a NO. Posteriormente se adicionaba HCl, KI e indicador de almidón. El exceso de I^- se valoraba con KIO_3 .

Dentro de las valoraciones potenciométricas, Gur'ev determinó nitritos en muestras de verduras y aguas residuales¹³⁴. Las muestras eran llevadas a pH 1 en presencia de NaBr, empleando un electrodo de trabajo de Pt y el de AgCl/Ag como electrodo de referencia. El valorante fue anilina/tetrafenilborato sódico. Para la determinación de nitratos, las muestras acuosas fueron tratadas previamente con Cd metal para la reducción del nitrato a nitrito antes de la determinación.

El nitrito ha sido también, determinado por valoración coulombimétrica por retroceso en muestras de aguas de consumo y de río¹³⁵. El método propuesto por He y otros se basa en la reacción estequiométrica del nitrito con la hidrazina. El exceso de hidracina se determina valorándola por retroceso con Br_2 electrogenerado. La valoración puede ser registrada tanto amperométrica como quimioluminométricamente.

Hahn combinó la valoración coulométrica para el análisis de fertilizantes, con una separación previa de interferentes empleando la técnica de intercambio iónico¹³⁶.

5.2.2. Determinaciones colorimétricas

Se han descrito varios métodos colorimétricos para la determinación de nitritos, muchos de ellos están basados en la reacción clásica de Griess o bien en variaciones de la misma,

La reacción de Griess es una reacción de diazotación que implica a dos aminas, el ácido sulfanílico y la α -naftilamina. En una primera etapa el ácido sulfanílico sufre una diazotación al reaccionar con el nitrito. El catión de diazonio originado copula con la α -naftilamina, originando un colorante azoico rojo¹⁹⁰.

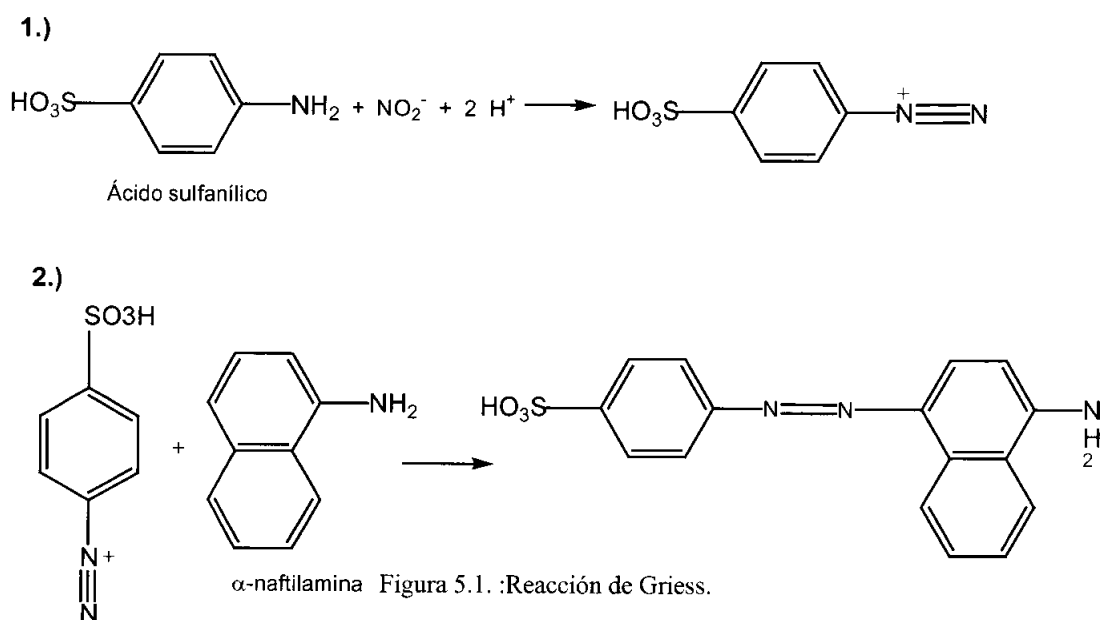


Figura 5.1.: Reacción de Griess

Sen y Donaldson describieron un método para nitritos que implicaba la diazotación de la sulfanilamida y posterior copulación con n-(1-naftil)-etilendiamina para formar un colorante azoico rosa, cuya absorbancia se mide a 543 nm¹³⁷.

Li y Hu determinaron nitrito en aguas tratando las muestras con 2-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol en medio sulfúrico y en presencia del anión SCN⁻¹³⁸. La mezcla así obtenida se mantiene durante 12 minutos en un baño de hielo, midiendo posteriormente la absorbancia a 630 nm.

Zhao y otros emplearon el 3-ciano-1,5-bis-(2-hidroxy-5-sulfofenil)formazan para la determinación de nitritos y nitratos¹³⁹. El nitrito se hacía reaccionar con el citado reactivo en medio HCl, en un baño María durante unos minutos. Tras la reacción se medía la absorbancia a 470 nm. Las muestras turbias se clarificaban mediante la adición de Al(OH)₃. Para la determinación conjunta de nitritos y nitratos, se utilizó el Zn como reductor del nitrato, determinando éste último por diferencia.

Yu y colaboradores determinaron nitratos (por reducción a nitritos) en muestras de agua natural empleando como reductor el Zn-Cd¹⁴⁰. Las muestras fueron tratadas con Zn metálico y CdCl₂ con agitación. Tras la reducción el nitrito generado se determinó por un método convencional de diazotación. Los resultados fueron comparables a los obtenidos mediante la reducción con Cd-cuperizado.

También han sido propuestos métodos de determinación indirecta de nitratos como el de Anwar y colaboradores¹⁴¹. Las muestras eran acidificadas con ácido sulfúrico y sometidas a una corriente de nitrógeno durante unos minutos. Se añadía Hg metálico a la muestra y se sometía a agitación. El Hg(II) generado se extraía complejándolo con ditizona disuelta en CCl₄ y determinado por espectrofotometría a 485 nm.

5.2.3. Métodos fluorimétricos

Los iones nitrito reaccionan con la 2,3-diaminonaftaleno a pH bajo para dar un producto que fluoresce fuertemente al cambiar el medio a pH alcalino¹⁴². Esta metodología es usada rutinariamente en la determinación de los niveles de nitrito/nitrato en fluidos biológicos y extractos celulares como un indicador de la actividad del óxido nítrico.

También se ha empleado el ácido 5,6-diamino-1,3-naftalendisulfónico en la determinación fluorimétrica de nitritos¹⁴³. La reacción entre ellos en medio ácido forma el ácido 1H-nafto(2,3-d)triazol-1,3-naftalendisulfonic, el cual es altamente fluorescente en medio alcalino.

Recientemente Feng y colaboradores han desarrollado una metodología de análisis para nitritos basada en la reacción de estos con pironina Y en medio sulfúrico¹⁴⁴. La reacción se verifica en un baño de agua en ebullición. Tras atemperar las muestras, se procede a la determinación de los nitritos por fluorescencia a 549.2 nm, la excitación se produce a 348.9 nm. También ha sido utilizada la pironina B en medio fósforico en un método similar al anterior (Zhang y otros).

La reacción entre el nitrito y safranin O proporciona una sal de diazonio que da lugar a una coloración fluorescente naranja-rojizo a la disolución para cambiar a un color azul no fluorescente. Basándose en esta reacción, Huang¹⁴⁵ ha descrito un método cinético para la determinación de nitritos y NO₂. La reacción se monitoriza fluorimétricamente midiendo la disminución de intensidad de fluorescencia a un tiempo fijo.

Helaleh y Korenaga desarrollaron un método fluorimétrico basado en la reacción del acetaminofen (paracetamol) con nitrito en medio ácido¹⁴⁶.

5.2.4. Determinación por quimioluminiscencia

Muchas las metodologías desarrolladas se basan en la reducción de nitratos y nitritos a NO y la posterior determinación quimioluminiscente del mismo. Existen varios métodos quimioluminiscentes para la determinación del óxido nítrico, de entre ellos el basado en la reacción del NO con el ozono es el que ha recibido la mayor atención¹⁴⁷.

La sensibilidad obtenida con estos métodos en el análisis de nitratos y nitritos resulta muy superior a las obtenidas empleando métodos colorimétricos. Además la quimioluminiscencia ofrece una mayor comodidad al no interferir materiales en suspensión o coloreados¹⁴⁷.

Pinche ha determinado simultáneamente ión nitrito y nitrocompuestos mediante esta técnica¹⁴⁸. Las muestras eran tratadas con ácido hidrobromico en medio acético a 65°C, el NO generado se determinaba por quimioluminiscencia. La destrucción del nitrito con ácido sulfámico, permitía la determinación de nitrito por diferencia.

Walters y colaboradores determinaron ión nitrito en alimentos haciéndolo reaccionar con NaI en medio acético y sometiéndolo a reflujo con corriente de N₂. El NO generado servía para la detección quimioluminiscente¹⁴⁹. El ión nitrato puede ser determinado independientemente del nitrito, tratando la muestra previamente con ácido ascórbico en una disolución desoxigenada.

También se ha usado el luminol en la determinación quimioluminiscente de nitratos. Kalinichenko y otros analizaron nitrato en aguas mediante esta técnica¹⁵⁰. Para ello, se ajustaba el pH de las muestras a 5.5 con ácido sulfúrico y sometiéndolo a las mismas a posterior irradiación con una lámpara de Hg. Como producto de esta

reacción aparece peroxinitrito, el cual oxida al luminol en medio alcalino. La quimioluminiscencia generada es proporcional a la cantidad de ión nitrato.

5.2.5. Cromatografía

Jiang y colaboradores determinaron estos aniones en muestras de agua por inyección directa en un sistema de cromatografía de pares iónicos-HPLC en fase inversa, la columna fue una C18 y como fase móvil empleó una solución acuosa de metanol al 20% conteniendo tetraetilamonio 20 mM¹⁹².

Di-Matteo realizó un estudio sobre los métodos HPLC con detección electroquímica para la determinación de nitritos y nitratos en muestras biológicas y ambientales. Llegó a la conclusión de que la detección electroquímica en HPLC era más sensible, rápida y selectiva que la detección por absorción en el UV, fluorimétrica o quimioluminiscente¹⁹³.

La reducción electrocatalítica de nitrito sobre un electrodo modificado de carbono ha sido propuesta por Liu como sistema de detección amperométrico en HPLC. El electrodo modificado era preparado por electrodeposición de una película de polipirrol dopado con el anión difosfato de wolframio. La columna empleada fue una Nucleosil SA (20 cm x 4 mm d.i.) y la fase móvil era una disolución tampón de sulfato/ácido sulfúrico. Este método se aplicó a muestras de aguas¹⁹⁴.

5.2.5. Uso de la técnicas FIA a la determinación de nitritos y nitratos

Numerosos métodos FIA han sido propuestos para la determinación de nitritos y nitratos. La discusión que sigue se centra especialmente en las metodologías FIA con detección colorimétrica, ya que la metodología desarrollada en esta tesis se engloba dentro de este grupo.

La metodología FIA resulta muy aconsejable cuando un gran número de muestras tienen que ser consideradas. En la bibliografía se pueden encontrar numerosos artículos que versan sobre la determinación de nitritos empleando un montaje FIA, principalmente con la ayuda de la detección espectrofotométrica. El uso de detectores electroquímicos, fluorimétricos y de quimioluminiscencia también ha sido propuesto. Esta misma forma de trabajo en continuo se ha aplicado a los nitratos, casi siempre por reducción previa a nitritos.

En la figura 5.2. se muestran los resultados de una revisión efectuada para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores utilizados en los sistemas F.I.A. que han sido desarrollados para poder determinar nitritos y nitratos. La búsqueda realizada abarca el período comprendido desde el año 1980 hasta enero de 2002. Ésta se ha realizado sobre el Analytical Abstracts partiendo de las entradas “*Flow injection*”, “*FIA*” y de los distintos detectores que se muestran en la figura.

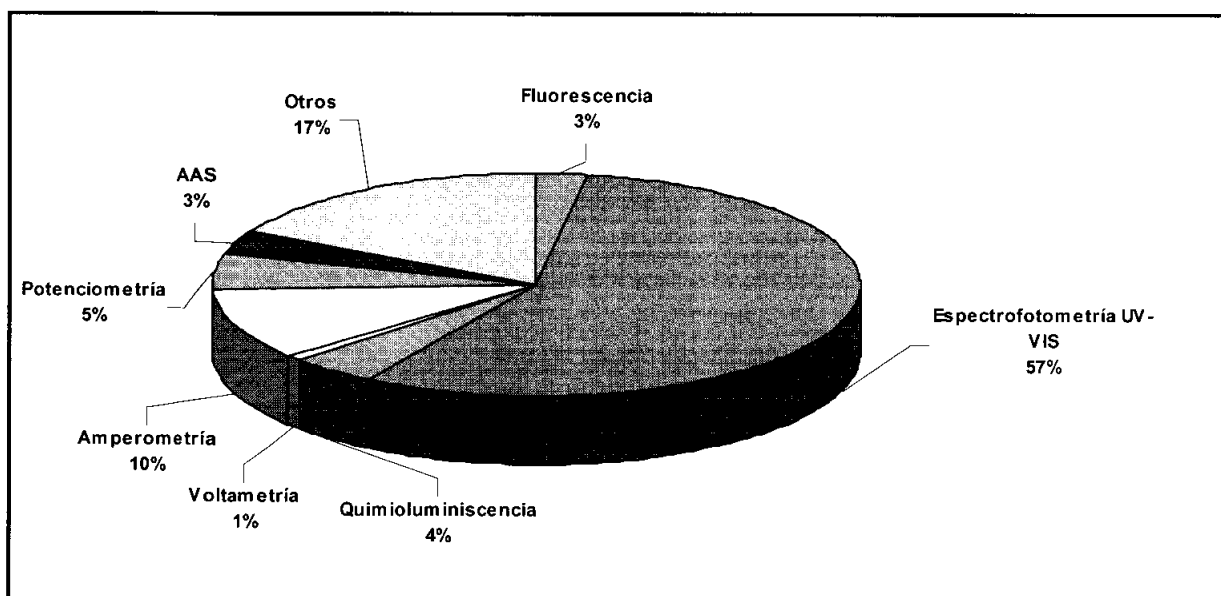


Figura 5.2.: Porcentaje entre los tipos de detectores acoplados a los sistemas de análisis por inyección en flujo para nitratos y nitritos.

AAS, *Atomic Absorption Spectrometry*: Espectrometría de Absorción Atómica.

Tal y como se avanzaba, la mayor parte de los trabajos FIA publicados al respecto utilizan como sistema de detección la espectrofotometría en el UV-VIS (57%, figura 5.2). Dado el interés que estos métodos revisten, se efectuó una búsqueda bibliográfica de los mismos y se confeccionó la tabla 5.1., donde se presenta un resumen de algunas de las aplicaciones descritas mediante esta técnica. En la misma, aparece la utilización de sistemas reductores para la transformación de nitratos, así como el tipo de muestras, reactivos, etc.

Podemos apreciar que la mayor parte de los trabajos se basan en la reacción de Griess o variantes de la misma (Griess-Llosvay, etc). El proceso de derivatización más utilizado en la obtención de nitrito a partir de nitrato, es el uso de una columna de Cd-cuperizado.

Tabla 5.1.: Métodos FIA de determinación conjunta de nitratos y nitritos por espectrofotometría.

Muestra	Reducción NO ₃ ⁻	Reacción NO ₂ ⁻	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (RSD%) (Velocidad de muestreo)	Ref.
Aguas	Columna Cd-Cu	Rojo de pirogalol BrO ₃ ⁻ / H ⁺	0.003 – 2.0 ppm nitritos 0.03 – 2.0 ppm nitratos	(20±3 h ⁻¹)	151
Aguas residuales	Columna Cd-Cu	Reac. Griess-Llosvay	0.05 – 25 ppm nitritos 0.05 – 15 ppm nitratos	2% nitritos, 1.3% nitratos (24 h ⁻¹)	152
Aguas de río		Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺			153
Aguas	Columna Cd-Cu	Reac. Diazotación-copulación	(sub ppm)		154
Verduras	Columna Cd-Cu	N-(1-naftil)etilendiamina			155
Aguas	Columna Cd-Cu		0 – 100 ppb nitritos (0.5 ppb) 0 – 1 ppm nitratos (0.5 ppb)	0.15% nitritos, 0.65% nitratos (40-50 h ⁻¹)	156
Muestras biológicas	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 10 mM nitritos (50 nM) 0 – 1 mM nitratos (50 nM)	0.14% nitritos, 1.29% nitratos (40 h ⁻¹)	157
Aguas, Alimentos	Columna Cd-Cu	Galocianina BrO ₃ ⁻ / H ₂ SO ₄	0.01 – 2.5 ppm nitritos (1 ng/ml) 0.02 – 3.5 ppm nitratos (2 ng/ml)	1.2% nitritos, 1.75% nitratos	158
	Columna Zn-Cd	Sulfanilida Ácido 1-naftilamin-7-sulfónico	Nitritos (0.003 ppm) Nitratos (0.001 ppm)	0.5% nitritos, 1% nitratos (45 h ⁻¹)	159
Aguas	Columna Cd-Cu	Reac. Griess modificada	0.5 – 40 mM nitritos (0.1 mM) 2 – 100 mM nitratos (0.45mM)	<2% (30 h ⁻¹)	160
Aguas	Columna Zn-Cd	Verde de naftol B KBrO ₃ / H ₃ PO ₄	2 – 200 ppb nitritos (0.5 ppb) 10 – 1000 ppb nitratos (2.5 ppb)	1.8% nitritos, 1.6% nitratos (30 h ⁻¹)	161

Tabla 5.1.: (Continuación)

Muestra	Reducción NO ₃ ⁻	Reacción NO ₂ ⁻	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (RSD%) (Velocidad de muestreo)	Ref.
Paté	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/H ₃ PO ₄			162
Aguas	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	Nitritos (0.1 mM) Nitratos (0.1 mM)		163
Aguas	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0.05 – 5 ppm nitritos 0.25 – 50 ppm nitratos	1.1% nitritos, 2.3% nitratos	164
Aguas, suelos, Fertilizantes, carnes	Fotoirradiación (lámpara Hg)	Sulfato de proflavin/ H ⁺	0 – 85 mM nitritos (0.33 mM) 0 – 145 mM nitratos (0.19 mM)	0.4% nitratos (15 h ⁻¹)	165
Aguas	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0.1- 55 mM nitrato (0.1 mM)		166
Aguas (determinación N total)	Hidrazina/OH ⁻	Reac. Griess-Llosvay	N total (0.21 ppm)	3%	167
Aguas	Cd metálico	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺			168
Muestras ambientales	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	2 – 250 mM nitritos (0.2mM) 6 – 250 mM nitratos (0.5 mM)		169
	hidrazida	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 300 mM nitritos (0.01 mM) 0 – 200 mM nitratos (0.05 mM)		
	Fotoirradiación (lámpara Hg)	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	1 – 300 mM nitrato 1 – 400 mM nitrato con radiación 1 – 200 mM sin radiación		
Productos cárnicos	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0.03 – 0.2 ppm nitritos 0 – 104 pm nitratos	1.1% nitritos, 0.7% nitratos	170
Alimento y suelos	Columna Cd-Cu	3-nitroanilina N-(1-naftil)etilendiamina	0.01 – 2.2 ppm nitritos (1 ppb) 0.1 – 3.5 ppm nitratos (10 ppb)	2% nitritos, 0.1% nitratos	171

Tabla 5.1.: (Continuación)

Muestra	Reducción NO ₃ ⁻	Reacción NO ₂ ⁻	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (RSD%) (Velocidad de muestreo)	Ref.
Aguas	Sulfato de hidrazida ZnSO ₄ /NaOH	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 220 mM nitritos (2 mM) 0 – 240 mM nitratos (8 mM)	1.5% nitritos, 2.3% nitratos	172
Aguas	Columna Cd	(Disolventes orgánicos degradados fotoquímicamente con TiO ₂ , Pt/TiO ₂ y lámpara de Hg)			173
		Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺			
Extractos filtros de aerosol atmosféricos, aguas	Hidrazida	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 400 mM nitritos (3.1 mM) 0 – 400 mM nitratos (1.6 mM)	1.5% nitritos, 3.1 nitratos	174
Muestras biológicas	Cd	Reacción de Griess	25 nM – 20 mM nitritos (25nM) nitratos (25 nM)		175
Aguas	Cd	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	Nitrato (0.45 mM)	5% nitratos	176
Aguas	Fotoirradiación (lámpara Hg)	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 0.1 mM nitratos (0.03 mM)	0.8% nitratos	177
Aguas	Columna Cd-Cu	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0 – 10 ppm nitritos 0 – 35 ppm nitratos	1.9% nitritos, 0.9% nitratos	178
	Columna Cd-Cu	Reacción de Griess	0.01 – 10 ppm nitritos 0.01 – 20 ppm nitratos		179
Aguas (Determinación de Nitrógeno total)	Columna Cd-Cu	Conversión de las especies nitrogenadas en nitratos por foto- oxidación UV y peroxodisulfato	0.03 – 3 ppm N total	0.47% nitrógeno total	180
		Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺			

Tabla 5.1.: (Continuación)

Muestra	Reducción NO₃⁻	Reacción NO₂⁻	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (RSD%) (Velocidad de muestreo)	Ref.
Aguas	Columna Cd-Cu	Ácido 4-aminobenzoico Quinolin-8-ol/OH ⁻	0.5 – 4.5 ppm nitritos (0.1 ppm) 1 – 9 ppm nitratos (0.3 ppm)	1% nitritos, 0.8% nitratos	181
	Columna Cd-Cu	N-(1-naftil)etilendiamina	0.1 – 7 ppm nitratos 1 – 20 pm nitratos	(6 h ⁻¹)	182
Alimentos y suelos	Cd	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺	0.02 – 2 ppm nitratos 0.5 – 20 ppm nitratos	(45 h ⁻¹)	183
Aguas	Determinación directa 210 nm	Sulfanilamida N-(1-naftil)etilendiamina/ H ⁺			184

5.2.6. Métodos que utilizan acridinas

Se han descrito métodos en los que la detección es espectrofotométrica, la determinación se basa en monitorizar la absorbancia del reactivo o de las especies coloreadas que se forman en determinadas condiciones químicas al reaccionar las acridinas con los nitritos.

Chen propuso un método FIA con flujo parado, basado en el efecto catalítico del ión nitrito en la oxidación del naranja de acridina con bromato potásico en medio fosfórico¹⁸⁷. La reacción se monitorizaba espectrofotométricamente midiendo la disminución de absorbancia del naranja de acridina.

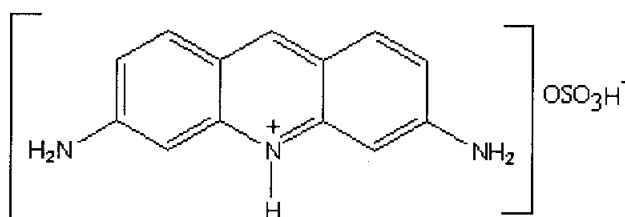
El rojo de acridina, también ha sido usado en determinaciones espectrofotométricas. La reacción con nitrito en presencia de ácido fosfórico y bromato potásico produce un especie coloreada, que se puede determinar a 526 nm. (Liu et al.¹⁸⁶).

También se ha empleado la reacción del amarillo de acridina con el ión nitrito para su determinación colorimétrica en medio HCl. Zi y colaboradores utilizaban esta reacción para analizar muestras de agua¹⁸⁸. Las medidas espectrofotométricas se realizaban a 551.6, 436.1, 350.6, 266.1 nm. La suma de absorbancias era proporcional a la concentración de nitrito.

El uso de las acridinas, también ha sido empleado con otros detectores. Como ejemplos se pueden citar los dos trabajos referidos a continuación. Xie determinó ión nitrito en aguas por polarografía. Para ello trataba las muestras con rojo de acridina en medio HCl¹⁸⁵. Tras las diluciones pertinentes, sometían las muestras a un proceso polarográfico. La onda de reducción aparecía a $-0.49V$.

Recientemente, en nuestro departamento y posterior a este trabajo, Catalá Icardo y Martínez Calatayud describieron la determinación indirecta de ión nitrito en un sistema FIA, basándose en la inhibición de la quimioluminiscencia producida al oxidar la acriflavina¹⁸⁹. Esta molécula reacciona con MnO_4^- en medio sulfúrico proporcionando una señal quimioluminiscente, la cual se ve afectada (inhibida) por la presencia de nitrito después de la reacción con la aminoacridina.

El presente estudio quiere proponer en un montaje FIA simple para la determinación espectrofotométrica de nitratos y nitritos por reacción con el sulfato de 3-6 diaminoacridina (sulfato de proflavin, figura 5.3.), reactivo no cancerígeno y fácilmente soluble en agua, el cual proporciona disoluciones estables durante mucho tiempo.



Sulfato de proflavin.



Figura 5.3.

El sulfato de proflavin monohidrato es marrón rojizo y presenta aspecto de polvo de cristales. Su solubilidad en agua es de 1g en 300 ml. Es ligeramente soluble en alcohol y prácticamente insoluble en cloroformo, éter, hidrocarburos y aceites. Su pH en agua al 1 :1000 es 2.6. Sus disoluciones son pardas y cuando se diluyen resultan fluorescentes. Estas disoluciones han de ser almacenadas en frascos de vidrio color topacio y ser desechadas cuando adquieran turbidez. El proflavin pertenece a la familia de las acridinas. Más datos acerca de las características de estos compuestos se presentan en los apartados 6.1. a 6.3. de esta memoria. En la bibliografía encontramos reflejada la reacción del anión nitrito con el proflavin y otras moléculas de la misma familia química^{195, 213}. En este trabajo se estudian las características analíticas de esta reacción para ser aplicada a la determinación de nitritos y nitratos en un sistema FIA.

PARTE EXPERIMENTAL

5.3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA PROFLAVIN-NITRITO.

Las disoluciones acuosas del proflavin (3,6-diaminoacridina) a pH 1 proporcionan un espectro UV-VIS con máximos de absorción a las siguientes longitudes de onda : 236, 282, 362 y 452 nm. Al incrementarse el pH se observa la aparición de dos bandas de absorción en las regiones 260-265 nm y 400-450 nm. Hay que señalar que las disoluciones ácidas de proflavin permanecen estables incluso frente a cambios de temperatura, no obstante es recomendable evitar su exposición a la luz.

A pH inferiores a 3 el anión nitrito reacciona con el proflavin desarrollando un producto de coloración violeta. La estequiometría del producto formado es 1 : 1 y permanece sin cambios durante al menos 2 horas a temperaturas por debajo de los 40°C. En la figura 5.4. se muestran los espectros UV-VIS correspondientes al proflavin en medio clorhídrico 0.1 M y al producto nitrito-proflavin en el mismo medio. Se pudo constatar que el espectro de absorción de este producto (estabilidad cinética) permaneció sin cambios durante largos periodos de tiempo.

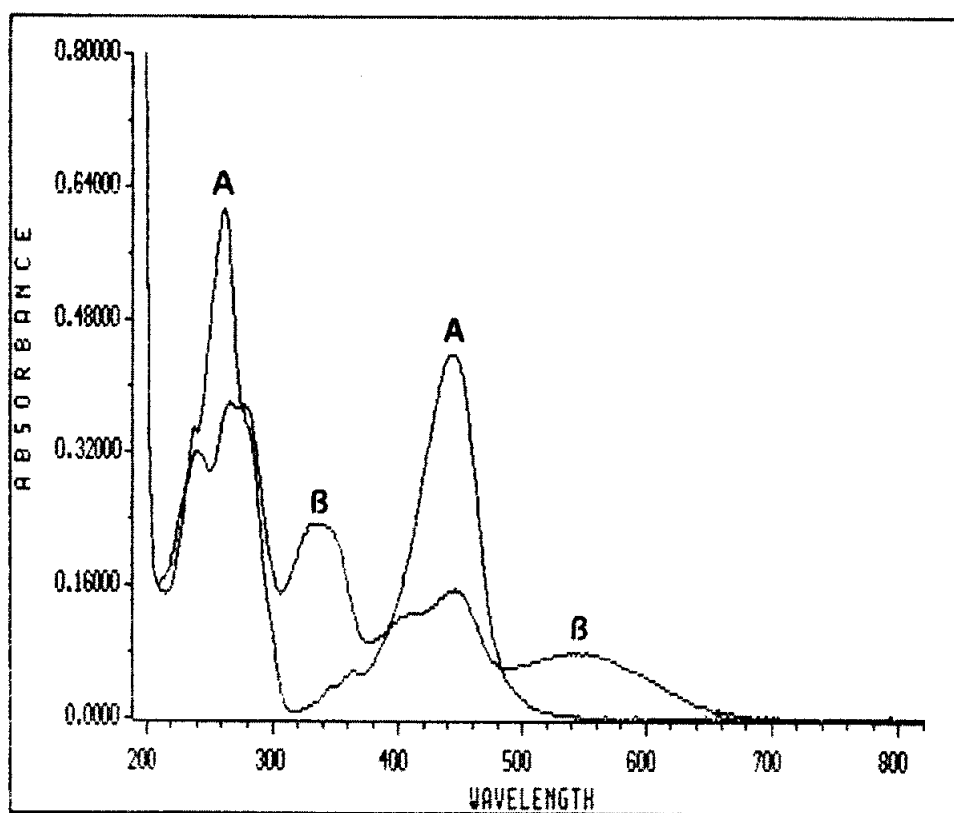


Figura 5.4.: Espectros UV-VIS correspondientes al proflavin en medio clorhídrico 0.1 M (espectro A) y al producto nitrito-proflavin en el mismo medio (espectro B).

5.4. ELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO

Para la elección de la longitud de onda de trabajo se efectuaron varios espectros de absorción del compuesto NO_2 -proflavin en diferentes condiciones de acidez. La experiencia se realizó en estático empleando un espectrofotómetro de diodos de barrido.

Se realizaron barridos de absorción de una disolución que contenía proflavin 10^{-4} M y NO_2^- $6.1 \cdot 10^{-5}$ M con diferentes concentraciones de HCl (0.1 M, 0.07 M, 0.03 M, 0.01 M). En estas primeras experiencias se utilizó el HCl, ácido que fue utilizado

en las referencias bibliográficas y además, al tratarse de un ácido que no posee carácter oxidante, se evita la aparición de otras reacciones colaterales.

En todos ellos se puede apreciar la aparición de máximos a 444 nm , 332 nm y un máximo que se fue desplazando desde 276 nm hacia longitudes de onda más cortas al disminuir la concentración de ácido del medio.

El espectro que se muestra en la figura 5.5. se obtiene al restar el espectro del proflavin en medio HCl 0.1 M al correspondiente al producto NO₂-proflavin en el mismo medio ácido.

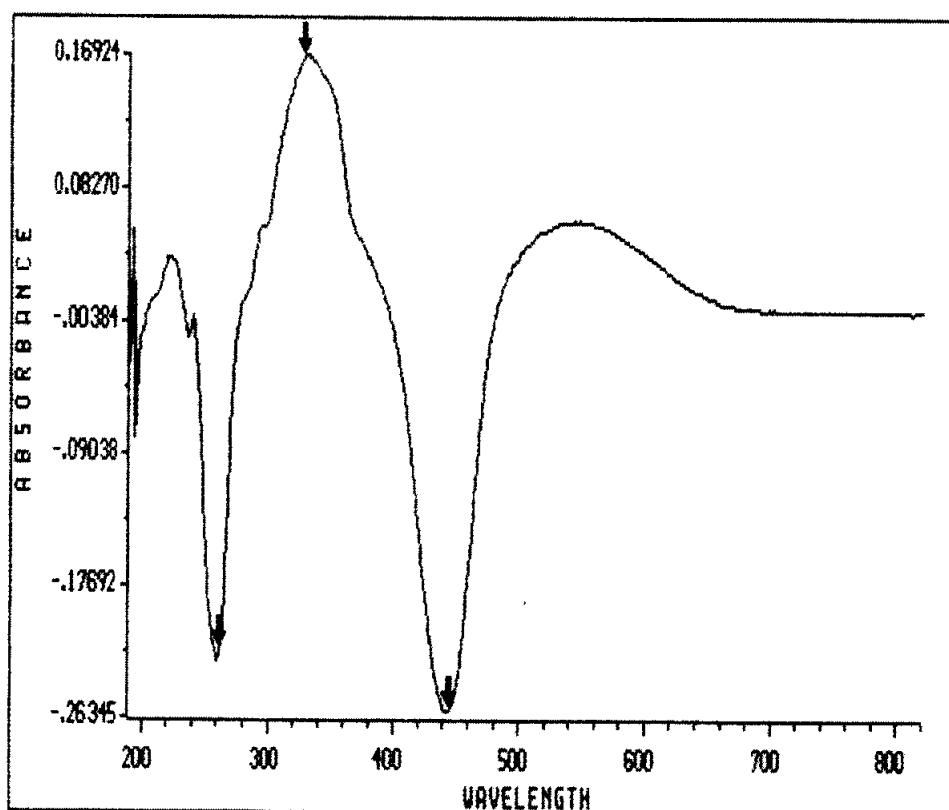


Figura 5.5.: espectro resta del proflavin en medio HCl 0.1 M al correspondiente al producto NO₂-proflavin en el mismo medio ácido.

Resulta evidente que 332 nm corresponde a un máximo del producto NO₂-proflavin, los otros máximos son debidos al medio (proflavin en medio ácido). También se puede observar que la absorbancia a 332 nm no experimenta una variación acusada en el intervalo de concentraciones 0.1- 0.03 M de HCl. No obstante cuando se trabaja a 0.01 M la absorbancia del máximo disminuye mucho. Es necesario pues, un medio francamente ácido. A la vista de estos resultados se selecciona la longitud de onda de 332 nm para abordar el trabajo, máximo que aparece en todo el intervalo de concentraciones de HCl estudiado.

Al incorporar la reacción a un montaje FIA, se cambia a un espectrofotómetro convencional, se tuvo que reajustar el valor de longitud de onda, debido a las pequeñas diferencias que pueden aparecer al trabajar en los dos espectrofotómetros comentados.

Se utilizó el montaje FIA mostrado en la figura 5.6. Fueron efectuadas inyecciones de 3.2 ppm de NO₂⁻ en un portador de agua destilada. Tras la inyección, el portador con el analito entraba en contacto con el reactivo proflavin 2·10⁻⁴ M en medio HCl 0.2 M. En las concentraciones empleadas se ha tenido en cuenta el efecto de la dilución 1 :1 en el punto de contacto del reactivo con el portador. Las inyecciones se efectuaron tomando como longitudes de onda de trabajo : 332, 330, 328 y 326 nm.

Los valores obtenidos en esta experiencia se muestran en la tabla 5.2.

λ (nm)	A
332	0.3671
330	0.3711
328	0.3725
326	0.3717

Tabla 5.2.: Elección de la longitud de onda.

328 nm es la longitud de onda de medida adecuada, ya que proporciona la máxima absorción midiendo en continuo y con el detector elegido.

5.5. ESTUDIO DEL MONTAJE FIA MÁS ADECUADO

Fueron propuestos tres posibles montajes FIA. Se tuvo muy en cuenta en todos ellos, conseguir una mezcla eficaz del analito con el reactivo.

El primer montaje estudiado (Montaje 1) se muestra en la figura 5.6. La unión entre el canal que sale de la válvula de inyección y el canal del reactivo (proflavin/ H^+) se realizó con una "Y" de metacrilato. El tramo desde esta confluencia a la celda de flujo ubicada en el detector fue de 1 m (0.5 mm d.i.).

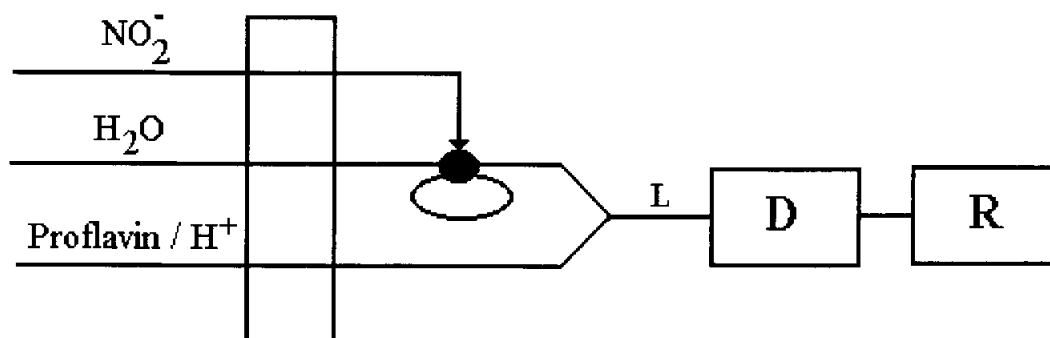


Figura 5.6. :Montaje 1. L : (longitud del tramo reactor),

D : detector, R : registro informático.

Se comenzó probando diversos caudales para observar las mejores condiciones de mezcla y señal analítica.

Las concentraciones de analito y reactivos utilizados fueron :

[proflavin] = 2×10^{-4} M

[HCl] = 0.200 M

[NO₂⁻] = 3 ppm

Los resultados obtenidos a diferentes caudales del canal portador (agua) y canal reactivo (proflavin) (ambos canales tenían el mismo caudal) se muestran en la tabla 5.3.

Caudal (ml/min)	A
1.3	0.5216
1.8	0.4818
2.4	0.4562
3.0	0.4247
3.6	0.4088
4.2	0.3845
4.7	0.3560
5.9	0.3160

Tabla 5.3. : Montaje 1.
Influencia del caudal de portador y reactivo en las condiciones de mezcla.

Se observó que al disminuir el caudal del sistema aumentaba la absorbancia media de los picos y el aumento de anchura de los mismos.

Es evidente que a caudales bajos la homogeneización de la mezcla analito-reactivo se realiza mejor con lo cual, la reacción avanza más y proporciona mayor señal analítica, a pesar de la mayor dilución de la muestra.

Se probaron también diversos volúmenes de muestra, con dos reactores de diferente longitud (tramo "L" de la figura 4.8.), concretamente de 1 m y 2 m. Las concentraciones de analito y reactivos utilizados fueron las mismas que en la experiencia anterior. El caudal del portador, en esta experiencia, se fijó en 2.4 ml/min buscando el justo compromiso entre absorbancia y velocidad de inyección.

Los resultados obtenidos para el reactor de 1 y 2 m se muestran en la tabla 5.4.

Longitud tramo reactor : 1m	
Volumen de muestra (μl)	A
140	0.3263
246	0.4020
352	0.4562
457	0.4885

Longitud tramo reactor : 2m	
Volumen de muestra (μl)	A
140	0.4329
246	0.5228
352	0.5746
457	0.6160

Tabla 5.4.: Señales obtenidas variando el volumen de muestra, utilizando reactores de 1 y 2 m.

De las experiencias realizadas se observa que con las concentraciones de reactivos empleadas, se obtiene mejor señal analítica al aumentar el volumen de muestra y el tiempo de reacción, bien sea por disminución del caudal (mayor facilidad de mezcla) o por aumento del tramo reactor.

El siguiente sistema ensayado (Montaje 2), se muestra en la figura 5.7.

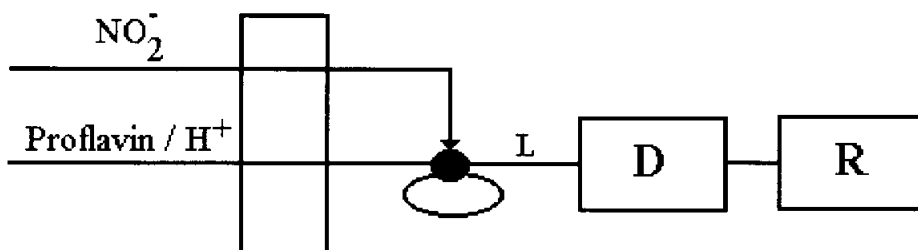


Figura 5.7. :Montaje 2.

L : (longitud del tramo reactor),

D : detector, R : registro informático.

En el montaje 2, montaje monocanal, se puede apreciar que la muestra se inserta directamente en el portador que es al mismo tiempo el medio reactivo.

Se efectuaron inyecciones de NO_2^- a diversos caudales, el bucle de muestra era de 1.5 m (0.5 mm d.i.) y el tramo reactor (L) tenía una longitud de 1 m. En esta experiencia se mantienen la concentración anterior de las disoluciones de proflavin, HCl y analito.

Los resultados obtenidos a diferentes caudales se muestran en la tabla 5.5.

Caudal (ml/min)	A
0.6	0.2750
0.9	0.2673
1.2	0.2902
1.5	0.2692
1.8	0.2680
2.1	0.2384
2.4	0.2369
2.7	0.2276
2.9	0.1659

Tabla 5.5. : Montaje 2.
Influencia del caudal en las condiciones de mezcla.

Empleando las mismas condiciones FIA, se inyectó la disolución de analito en el montaje 1, a un caudal de 2.1 ml/min para obtener un valor de referencia. El resultado de absorbancia fue de 0.3915 frente al de 0.2384 obtenido en el montaje 2.

Hay que añadir que en el montaje monocanal los picos aparecían dobles y con valores negativos en la línea base.

Comparando los dos montajes estudiados hasta el momento se concluye que el monocanal (montaje 2) es el peor, dos podrían ser los factores responsables :

- Mezcla de analito y reactivo sólo en las partes anterior y posterior de la muestra, quedándose sin contacto con el reactivo la zona central del bolo de muestra. Este hecho se pone de manifiesto por la aparición de picos dobles.
- Presencia de valores negativos en la línea base que debe ser imputable a las diferencias en el índice de refracción de muestra y portador, lo que no ocurre en el primer montaje al existir una confluencia de portador y reactivo.

Por tanto, parece que el montaje bicanal es adecuado, no obstante se pudo apreciar que la señal analítica aumentaba al aumentar el volumen de muestra y la longitud del tramo reactor. Por tanto, se pensó que si la muestra se mezclara previamente con el medio reactivo, mejoraría la señal (sensibilidad y reproducibilidad). Por ello se decidió ensayar el montaje 3, en el que se introduce en el bucle de muestra directamente la mezcla proflavin-nitrito, que se consigue previamente con la utilización de una cámara de mezclado tal y como se aprecia en la figura 5.8.

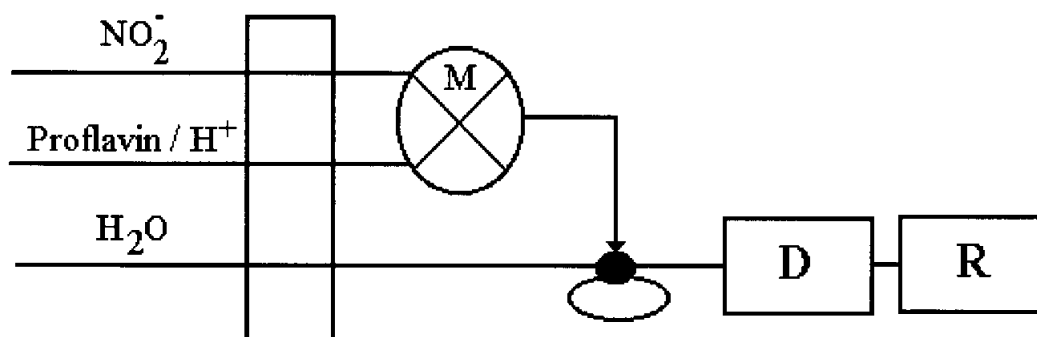


Figura 5.18. :Montaje 3.

M : mezclador, D : detector, R : registro informático.

Como mezclador fueron estudiados dos dispositivos de vidrio con diseño geométrico diferente y que permitían una agitación magnética en su interior. Estas dos cámaras de mezclado a estudiar se muestran en las figuras 5.9. y 5.10.

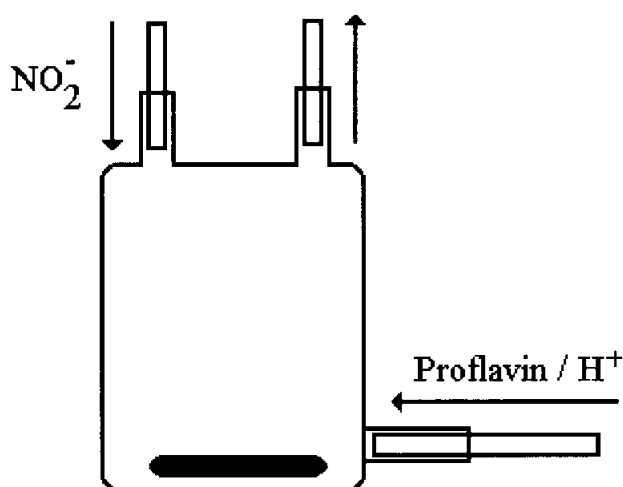


Figura 5.9. : mezclador 1 ; dimensiones : altura 1.5 cm, diámetro 0.8 cm.

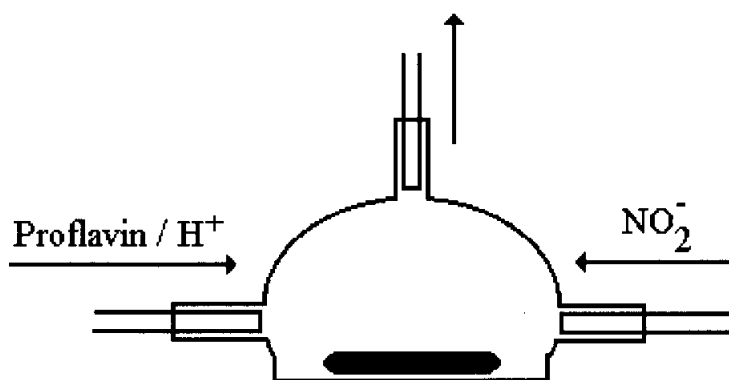


Figura 5.10. : mezclador 2 ; dimensiones : altura 1.5 cm, diámetro 1.5 cm.

5.5.1. Estudio de los dispositivos mezcladores en el montaje FIA

Debido a la importancia de la homogeneización en la mezcla proflavin/nitrito se ensayan dos dispositivos de mezcla. Los dos mezcladores estudiados en el presente trabajo permitían la existencia de agitación magnética en el interior de los mismos, gracias a un pequeño imán revestido de PTFE que se ubicaba en el interior. El empleo de un agitador magnético convencional de laboratorio permitía el giro del imán. La agitación era intensa y siempre constante, esta debía efectuarse cuando el mezclador estaba completamente lleno de líquido, para evitar la formación de burbujas.

El montaje FIA empleado en este estudio fue el tercero. Los primeros estudios se efectuaron con el mezclador 1 (figura 5.9.). Para estimar la bondad de su uso se procedió a efectuar una experiencia en la que se variaba la velocidad de la bomba peristáltica, esto afectaba simultáneamente y de la misma manera a todos los canales implicados en la experiencia (portador, canal de la muestra y canal del reactivo).

Las concentraciones de analito y reactivos utilizados fueron las mismas que en las experiencias anteriores y el volumen de muestra fue de 325 μ l.

Los resultados obtenidos a diferentes caudales del portador se muestran en la tabla 5.6.

Caudal (ml/min)	A
0.6	0.6050
0.9	0.6292
1.2	0.6397
1.4	0.6506
1.8	0.6615
2.1	0.6623
2.4	0.6521
2.7	0.6131

Tabla 5.6.: Montaje 3, mezclador 1
Influencia del caudal en la señal analítica.

Se constata que el empleo del mezclador aumenta considerablemente la absorbancia máxima de los picos FIA. La señal analítica aumenta hasta que se alcanza el valor de 1.8 ml/min en el caudal y a partir de aquí parece estabilizarse. Con caudal 2.7 ml/min, la presión que sufre la cámara de mezclado es demasiado alta, de tal

manera que fallaban a menudo las conexiones de las conducciones de alimentación y de salida del mismo.

Posteriormente se procedió a estudiar la relación entre caudales en el mezclador 1. Para ello se mantuvo el caudal del portador (agua destilada) y del sistema proflavin/ HCl a 1.8 ml/min en una bomba y el canal correspondiente a la muestra se conectó a otra bomba peristáltica a la que se le variaba su velocidad de giro.

Los resultados obtenidos, con las mismas condiciones químicas de las experiencias anteriores, al variar el caudal para el canal de la muestra se muestran en la tabla 5.7.

Caudal muestra (ml/min)	A
0.7	0.4269
1.5	0.5715
1.8	0.5892
2.0	0.6060
2.2	0.5953
2.5	0.6167
2.9	0.6258
3.2	0.6029

Tabla 5.7.: Montaje 3. Mezclador 1.
Datos obtenidos variando el caudal del canal de la muestra.

La representación gráfica de estos datos se muestra en la figura 5.11.

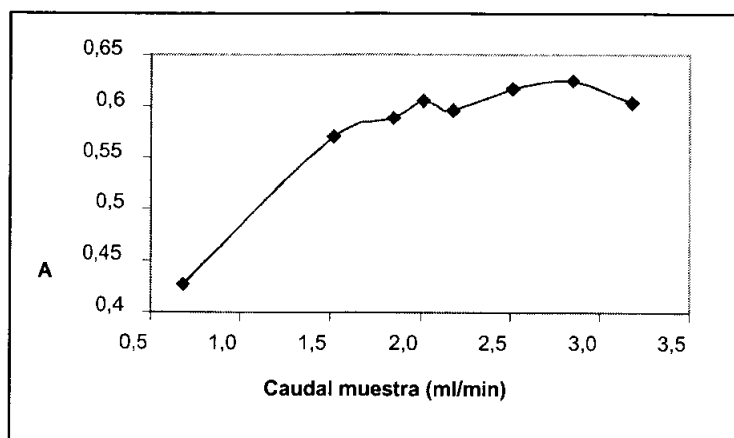


Figura 5.11.: Influencia del caudal de la muestra en la señal analítica.

Se puede apreciar que a caudales bajos para el canal de NO_2^- , la señal disminuye. La mejor señal analítica se obtiene para un caudal de 2.9 ml/min en el canal de la muestra.

El siguiente paso consistió en efectuar las mismas experiencias, pero esta vez con el mezclador 2 (figura 5.10.).

Al igual que en la experiencia anterior se procedió a variar la velocidad de la bomba peristáltica, afectando simultáneamente y de la misma manera a todos los caudales implicados en la experiencia (portador, canal de la muestra y canal del reactivo). Las condiciones químicas fueron las mismas utilizadas con el mezclador 1.

Los resultados obtenidos a diferentes caudales se muestran en la tabla 5.8.

Caudal muestra (ml/min)	A
0.6	0.6810
1.2	0.6350
1.8	0.5967
2.4	0.5751

Tabla 5.8.: Montaje 3, mezclador 2
Influencia del caudal en la señal analítica.

Para tomar un valor de referencia, se trabajó con el mezclador 1, con una velocidad de bomba de 1.8 ml/min y se obtuvo como absorbancia máxima el valor de 0.6143. Valor muy parecido al obtenido en las mismas condiciones con el mezclador 2. Se puede constatar que con este mezclador la señal analítica aumenta al disminuir el caudal, al contrario de lo que ocurría con la cámara de mezclado 1.

A continuación, se procedió a estudiar la relación entre caudales en el mezclador 2. Para ello se mantuvo el caudal del portador (agua) y del sistema proflavin/ HCl a un valor de 1.8 ml/min (el mismo valor utilizado en la experiencia realizada con el mezclador 1) y el canal correspondiente a la muestra se conectó a otra bomba a la que se le variaba su velocidad de giro.

Las concentraciones de analito y reactivos se mantuvieron.

Los resultados obtenidos al variar el caudal para el canal de la muestra se muestran en la tabla 5.9. y la figura 5.12.

Caudal muestra (ml/min)	A
0.6	0.4235
1.3	0.5413
2.0	0.6182
2.7	0.6453
3.4	0.6313

Tabla 5.9.: Montaje 3. Mezclador 2.
Datos obtenidos variando el caudal del canal de la muestra.

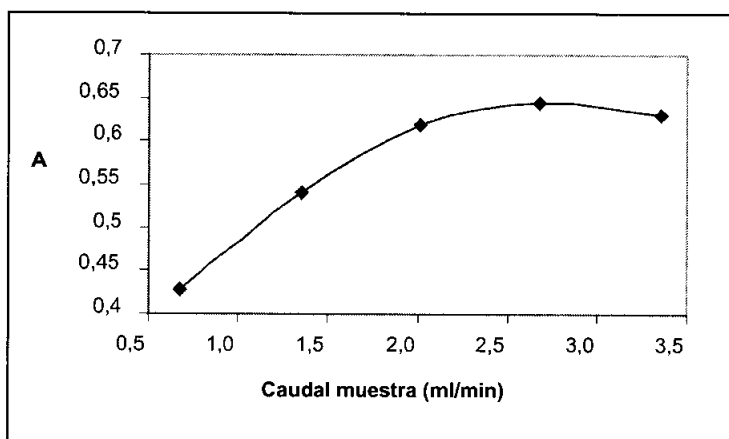


Figura 5.12.: Influencia del caudal de la muestra en la señal analítica.

Al aumentar el caudal del canal del NO_2^- aumenta la absorbancia, siendo el caudal de 2.7 ml/min, el que proporciona la mejor señal analítica.

Tras estos estudios comparativos entre ambos mezcladores, no se aprecian grandes diferencias. Los resultados son muy parejos en lo que concierne a una sustancial mejora de las señales analíticas.

Para dirimir entre uno u otro se decidió efectuar un estudio de reproducibilidad y de frecuencia de inyección para cada cámara de mezclado.

Se realizaron 15 inyecciones consecutivas de una disolución de NO_2^- en las condiciones de caudales, obtenidas anteriormente, para cada mezclador (ver tabla 5.10.) y con las mismas condiciones químicas.

	Mezclador (1)	Mezclador (2)
Caudal portador (ml/min)	1.8	1.8
Caudal canal proflavin/HCl (ml/min)	1.8	1.8
Caudal canal muestra (ml/min)	2.9	2.7

Tabla 5.10.: Caudales obtenidos para los dos dispositivos de mezcla.

Con los picos obtenidos se calculó la absorbancia máxima media, la desviación típica y la velocidad de inyección, los resultados se muestran en la tabla 5.11.

	Mezclador (1)	Mezclador (2)
Absorbancia media	0.6992	0.6159
desviación típica	0.001	0.002
velocidad de inyección	33 h ⁻¹	43 h ⁻¹

Tabla 5.11.: datos de absorbancia, desviación típica y velocidad de inyección de los dos dispositivos de mezcla

Los resultados en cuanto a señal analítica y desviación típica son similares en ambos casos; si bien el mezclador (1) proporciona mayores absorbancias, parece más indicado el mezclador (2) debido a la mayor velocidad de inyección.

Finalmente como montaje FIA se selecciona el montaje 3 (figura 5.12.), empleando el mezclador 2 (figura 5.10.). Las condiciones de caudales seleccionadas para seguir el estudio son las mostradas en la tabla 5.9. para el mezclador 2.

5.6. PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

5.6.1. Precalibrado. Elección de la concentración de analito de trabajo

A partir de ahora, se vuelve a trabajar con una sola bomba peristáltica, combinando adecuadamente el diámetro de los tubos de tygon y de velocidad de giro para obtener los caudales óptimos seleccionados.

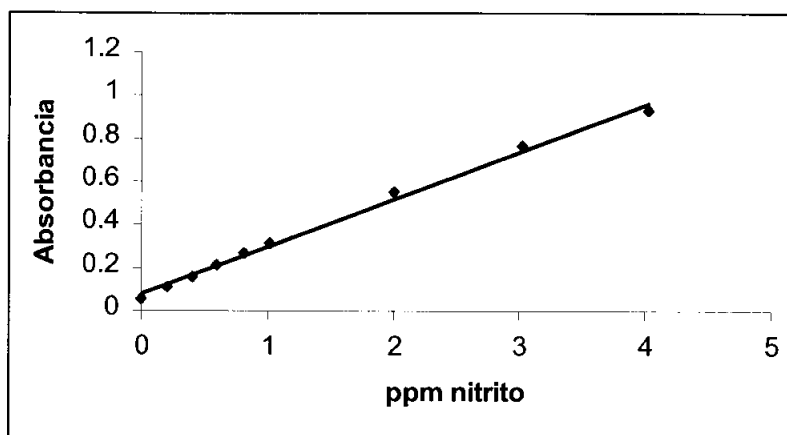
En esta etapa del trabajo experimental se comenzó por comprobar que, en efecto, la señal analítica tenía una relación lineal con la concentración del analito, para ello se procedió a efectuar un calibrado en las condiciones seleccionadas, con la intención de elegir una concentración adecuada de NO_2^- para abordar el proceso de optimización de variables. El calibrado se realizó en el intervalo 0 - 4 ppm de NO_2^- .

En la tabla 5.12. se muestran los resultados obtenidos.

[NO₂⁻] ppm	A
0	0.0527
0.20	0.1119
0.40	0.1603
0.60	0.2147
0.81	0.2666
1.01	0.3145
2.01	0.5546
3.02	0.7669
4.03	0.9290

Tabla 5.12.: datos del precalibrado.

La representación gráfica de la recta obtenida se muestra en la figura 5.13.



La ecuación de la recta obtenida es $A = 0.22043 \cdot [\text{NO}_2^-] + 0.07861$

El coeficiente de correlación es 0.9973

Se elige como concentración de trabajo 2 ppm de NO_2^- , ya que dicha concentración se encuentra en la zona de mínimo error de una lectura espectrofotométrica.

5.6.2. Optimización de los parámetros experimentales

Teniendo en cuenta las características del montaje FIA seleccionado, así como los reactivos que participan en la reacción; los parámetros experimentales que influyen directamente en la bondad analítica del método son :

- Las concentraciones de reactivos: proflavin y ácido clorhídrico.
- El volumen de muestra.
- Longitud del reactor o distancia entre la válvula y la celda de flujo.
- Relación de caudales.
- Longitud de onda.

Fue utilizado el método univariante para el proceso de optimización. En la optimización de cada variable, se mantenían constantes los valores del resto de parámetros. El valor óptimo se fija atendiendo al compromiso entre altura de pico, anchura de la base, reproducibilidad y estabilidad de la línea base.

Las condiciones FIA iniciales son:

- Caudal portador (agua destilada): 1.8 ml/min.
- Caudal reactivo (proflavin/HCl): 2.7 ml/min.
- Volumen muestra: 352 μ l.
- Longitud tramo válvula de inyección-celda de flujo: 1 m.

5.6.2.1. Parámetros químicos

5.6.2.1.1. Influencia de la concentración de ácido clorhídrico

Como se indica en las pruebas previas el medio adecuado para la reacción, según la bibliografía, se consigue con el ácido clorhídrico. En esta experiencia se pretende optimizar la concentración más adecuada del mismo para el sistema reactivo proflavin/HCl. Para ello se prepararon varias disoluciones reactivas, en todas ellas la concentración de proflavin fue $2 \cdot 10^{-4}$ M y la concentración de HCl se varió en el intervalo comprendido entre 0.050 – 1.000 M. Se realizaron inyecciones de 2 ppm de NO_2^- con las diversas disoluciones de reactivo.

Es conveniente destacar que la concentración de ácido en la muestra, depende no sólo de la concentración en la disolución del proflavin, sino que también depende significativamente de la relación en la que se mezclan los caudales de muestra y reactivo (HCl + proflavin).

La representación gráfica de los datos obtenidos se muestra en la figura 5.14.

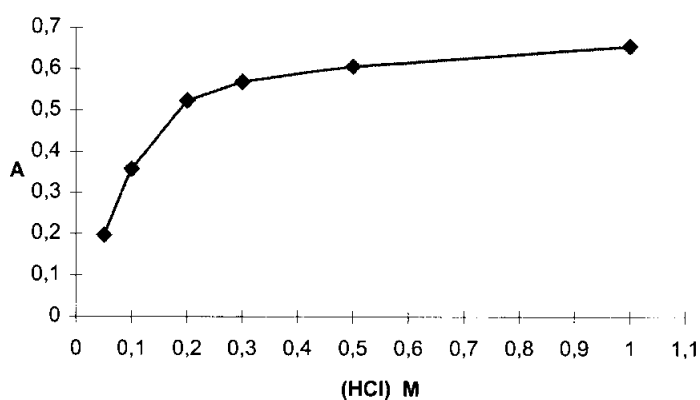


Figura 5.14.. Influencia de la concentración de HCl.

Observando la gráfica se aprecia una tendencia creciente de la señal analítica al aumentar la concentración de HCl, que comienza a estabilizarse a partir de una concentración de 0.3 M.

La concentración más adecuada se encontraría en el intervalo 0.300 – 1.000 M donde la señal se estabiliza notoriamente. El siguiente paso fue repetir la experiencia anterior, pero esta vez en este intervalo de concentraciones y efectuando también, inyecciones de agua (blanco) para estudiar su efecto en la señal analítica.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.13. :

[HCl] M	A	A blanco	A - A blanco
0.300	0.5418	0.0564	0.4854
0.500	0.5776	0.0875	0.4901
1.000	0.6308	0.1218	0.5090

Tabal 5.13.: Optimización de la concentración de HCl en el intervalo 0.300-1.000 M.

La representación gráfica de estos datos se muestra en la figura 5.15.

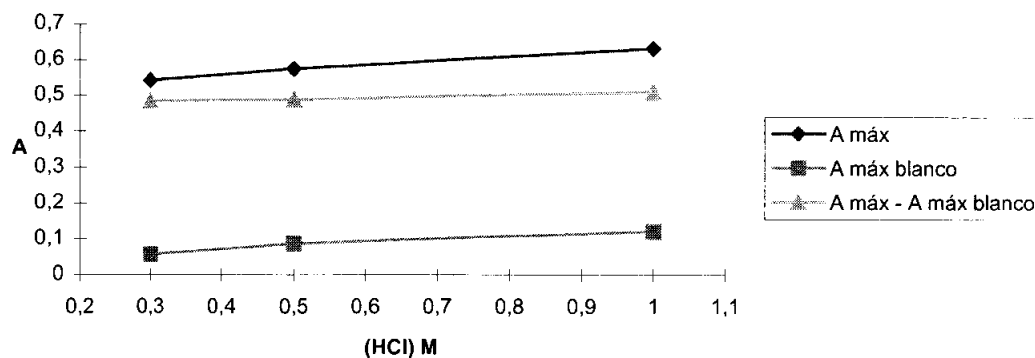


Figura 5.15.: Influencia del ácido clorhídrico en el intervalo 0.300-1.000 M

Observando la gráfica anterior, apreciamos que las diferencias no son muy acusadas al restar la señal que proporciona el blanco. Se elige la concentración de HCl 1.000 M que es la que proporciona mejor señal.

5.6.2.1.2. Verificación del medio ácido

Pese a que en la bibliografía se reseña que la reacción entre los nitritos y el proflavin se desarrolla en medio clorhídrico, se procedió a comprobar que otros medios ácidos no presentan un mejor comportamiento. Por ello, se diseñó una experiencia en la que se estudiaban los efectos de otros ácidos en la reacción y se trataba de confirmar que el HCl es el más adecuado para el sistema que estamos proponiendo.

Se probaron los ácidos clorhídrico, perclórico, acético y fosfórico. Todos ellos se emplearon conjuntamente con el proflavin en la misma disolución. La concentración de ácido estudiada fue 1.000 M y la de proflavin $2 \cdot 10^{-4}$ M y la de analito de 2 ppm. Se realizó la corrección del blanco con agua.

Los resultados se muestran en la tabla 5.14.

Ácido	A	A blanco	A - A blanco
HCl	0.6558	0.1532	0.5026
HClO ₄	0.5338	0.1290	0.4048
CH ₃ COOH	0.0639	0.0458	0.0181
H ₃ PO ₄	0.3093	0.0799	0.2294

Tabla 5.14. : Comportamiento de diferentes ácidos en el sistema proflavin/nitrito.

De los datos presentados en la tabla podemos decir que de mejor a peor el orden sería el siguiente : HCl > HClO₄ > H₃PO₄ > CH₃COOH.

El HCl es el que mejor relación presenta entre la señal analítica y la señal proporcionada por el blanco. Hay que señalar que el ácido perclórico y especialmente el fósforico proporcionan, este último probablemente debido a su viscosidad, picos FIA con colas largas por lo que no se consideró necesario ensayar otras concentraciones de estos ácidos.

Se confirma, por tanto, que el medio ácido más adecuado es HCl 1 M.

5.6.2.1.3. Influencia de la concentración de proflavin

Una vez seleccionado el ácido y la concentración más adecuada del mismo, el siguiente paso fue optimizar la concentración del proflavin. Se realizaron inserciones de 2 ppm de ión NO₂⁻, empleando varias concentraciones de proflavin en medio clorhídrico 1 M. El intervalo de concentraciones de proflavin fue 10⁻⁴ - 10⁻³ M. También se realizaron blancos de agua para cada concentración de proflavin.

La gráfica obtenida con estos datos se muestra en la figura 5.16.

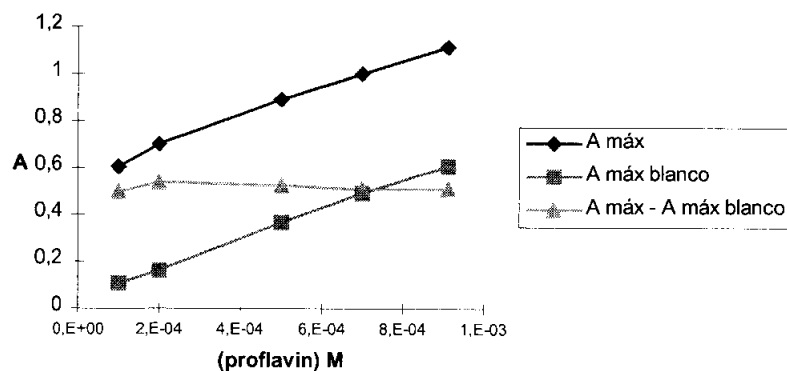


Figura 5.16. : Influencia de la concentración de proflavin.

Al evaluar la señal analítica del ión NO_2^- y la del blanco, es evidente que la concentración de proflavin que mejor resultado proporciona es de $2 \cdot 10^{-4}$ M, tal y como se puede apreciar en la gráfica anterior. Se toma este valor como óptimo para el trabajo posterior.

5.6.2.1.4. Elección de la disolución portador

Hasta ahora se ha venido utilizando agua como portador. Se diseñó una experiencia para probar otros posibles. Las combinaciones estudiadas fueron :

1. Portador : agua (configuración de referencia).
2. Portador : HCl 1.000 M.
3. Portador : proflavin 0.0002 M / HCl 1.000 M.

En todos los casos se inyectaron 2 ppm de ión NO_2^- .

En la tabla 5.15. se muestran los resultados de esta experiencia.

Disolución	portador	A	A blanco	A - A blanco
1	agua	0.6697	0.1561	0.5136
2	HCl 1.000 M	0.5235	0.1366	0.3869
3	proflavin/HCl	0.1715	-0.256	0.4275*

*Teniendo en cuenta la señal negativa del blanco.

Tabla 5.15. : Datos para la elección del portador

El empleo de proflavin/HCl como portador implica señales negativas para las inyecciones de blanco. A la vista de los resultados presentados, el agua se manifiesta como el mejor portador.

5.6.2.1.5. Optimización de la temperatura de trabajo

Con las condiciones químicas ya fijadas, se decide estudiar la influencia de la temperatura de trabajo. Las temperaturas estudiadas fueron: T^a ambiente, 50°C y 80°C. Se dispuso el bucle de muestra en el interior de un baño termostático a la temperatura de estudio. La experiencia consistió en calentar el bucle de muestra a varias temperaturas y en cada una de éstas, fueron probados varios caudales. Como en los casos anteriores se inyectaron 2 ppm de ión NO₂⁻.

La tabla 5.16. muestra los resultados obtenidos.

Tª °C	Caudal ml/min	A	A blanco	A - A blanco	% Δ señal
ambiente	1.788	0.7279	0.1749	0.5330	*
50	1.498	0.7930	0.1671	0.6259	11.6
50	1.788	0.7889	0.1583	0.6306	12.3
80	1.498	0.7861	0.1657	0.6204	10.9
80	1.788	0.7949	0.1592	0.6357	13.0
80	2.078	0.7807	0.1539	0.6268	11.08

*valor de referencia (condiciones habituales)

Tabla 5.16 : Optimización de la temperatura de trabajo.

Trabajando en caliente se obtienen señales analíticas ligeramente más altas, no existiendo mucha diferencia entre 50°C y 80°C. El incremento de señal respecto de trabajar a Tª ambiente no es muy acusado y además hay que tener en cuenta la aparición de burbujas cuando se calienta el bucle de muestra, por lo que se decide seguir trabajando a Tª ambiente.

5.6.2.1.6. Influencia del tiempo de reacción.

Con la finalidad de estudiar y optimizar el tiempo de reacción, se procedió a realizar la siguiente experiencia : se detenía el flujo de los canales de proflavin/HCl y de la muestra durante un tiempo determinado, sin detener la agitación magnética en el mezclador; a continuación se ponía nuevamente en funcionamiento y se realizaba una inserción, controlando el tiempo necesario para asegurar que la disolución insertada forma parte de la que se había mezclado durante el tiempo de parada. Los tiempos estudiados se encuentran en el intervalo 0 - 5 minutos.

Las condiciones químicas son las determinadas anteriormente.

La tabla 5.17. muestra los valores de las diversas señales analíticas :

tiempo de reacción	A
0''	0.7494
30''	0.7653
1'	0.7681
2'	0.7787
5'	0.7374

Tabla 5.17. : Optimización del tiempo de reacción.

La representación gráfica de estos datos se muestra en la figura 5.17.

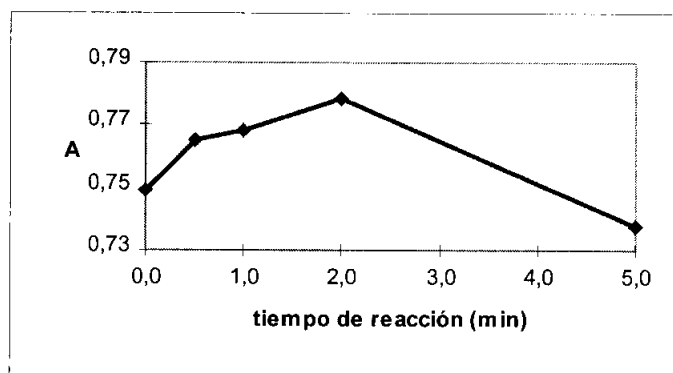


Figura 5.17. : Influencia del tiempo de reacción.

Podemos apreciar que al aumentar el tiempo de reacción, se incrementa la señal analítica. La máxima señal analítica se obtiene a los 2 minutos, no obstante a los 5 minutos la señal disminuye y además aparecen burbujas, las cuales se ponen de manifiesto en la distorsión de los máximos de los picos FIA.

Se elige trabajar sin detener el flujo, ya que la mejora de señal obtenida a flujo detenido no es muy significativa y de esta manera se consigue además, una mayor velocidad de inyección y simplicidad del sistema.

5.6.2.2. Parámetros hidrodinámicos

5.6.2.2.1. Optimización del volumen de muestra

Para la optimización del volumen de muestra, se varió la longitud del tubo de teflón que constituía el bucle, en un intervalo entre 246 y 881 μl para el volumen de muestra. Las experiencias iniciales con el sistema indicaban que volúmenes más bajos daban malos resultados.

Las condiciones químicas fueron las seleccionadas anteriormente.

Los resultados obtenidos (incluyendo las señales de los blancos) se muestran en la tabla 5.18.

Volumen muestra (μl)	A	A blanco	A - A blanco
246	0.6768	0.1635	0.5133
352	0.7015	0.1695	0.5320
457	0.7098	0.1657	0.5441
563	0.7111	0.1692	0.5419
670	0.7146	0.1698	0.5448
881	0.7209	0.1678	0.5531

Tabla 5.18. : Optimización del volumen de muestra.

Representando gráficamente los resultados: (figura 5.18.)

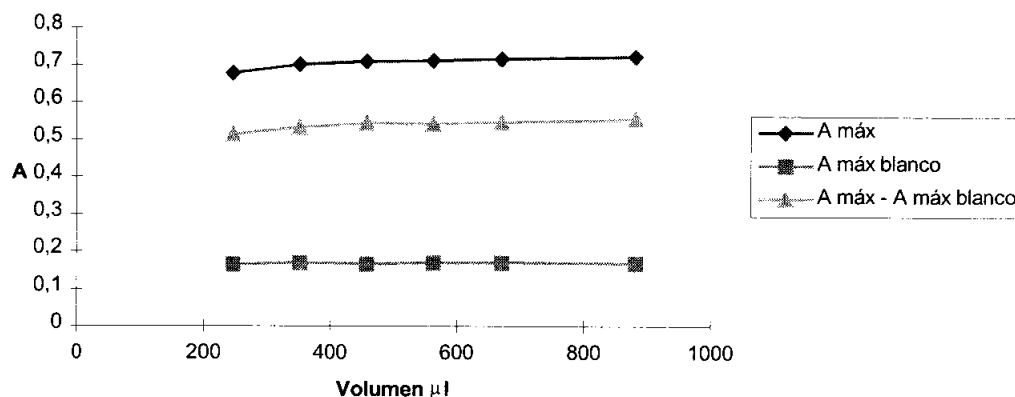


Figura 5.18. : Influencia del volumen de muestra.

La variación no es muy acusada en el intervalo ensayado, el pequeño aumento de señal parece estabilizarse en 457 μl .

Empleando 670 μl aparece un inicio de desdoblamiento en los picos, desdoblamiento que para 881 μl se confirma. Estos “picos dobles” son característicos de los volúmenes grandes de muestra e imputables al hecho de que la parte central de la muestra no llega a tener una composición semejante a la de ambos extremos.

Se elige como valor óptimo 457 μl .

5.6.2.2.2. Optimización del caudal del portador.

Aunque ya se hizo un estudio inicial de caudales para la elección del mezclador más adecuado, ahora se vuelve a reoptimizar. El empleo de los nuevos valores para los parámetros optimizados, podría haber hecho cambiar los valores optimizados de caudales. Por ello, se prueban de nuevo, diversas velocidades de bomba peristáltica,

que afectan al caudal del portador y permite mantener constante la relación de caudales reactivo/muestra, para seleccionar el mejor caudal.

Se puede apreciar que al aumentar la velocidad de la bomba disminuye la cola del pico, es decir se alcanza antes la línea base, lo que influirá en la mayor frecuencia de inserción.

Los resultados obtenidos, incluyendo los correspondientes al blanco se muestran en la gráfica de la figura 5.19.

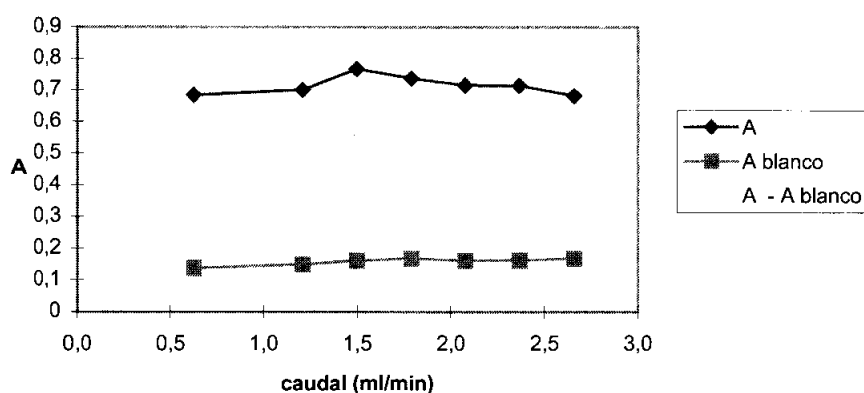


Figura 5.19. : Influencia del caudal del portador sobre la señal analítica.

En la gráfica de la figura 5.19 se observa que la señal analítica aumenta desde un caudal de 0,6 ml/min hasta 1,5 ml/min (máxima señal analítica) y luego disminuye hasta el caudal 2,7 ml/min donde se obtiene el valor mínimo. Los caudales 1,5 y 1,8 ml/min proporcionan valores muy similares.

Se elige usar un caudal de 1,8 ml/min, el cual proporcionará mejor velocidad de inserción.

5.6.2.2.4. Optimización de la longitud del tramo “válvula de inyección-celda de flujo”

La longitud de este tramo afecta a la dispersión de la muestra y al tiempo de reacción. El primer efecto no es deseable, ya que implica picos bajos y con colas largas ; es decir proporciona bajas sensibilidad y velocidad de muestreo.

Se probaron varias longitudes comprendidas en el intervalo 0 - 150 cm.

Los resultados se muestran en la tabla 5.19.

longitud conducción (cm)	A
0*	0.7269
20	0.7311
30	0.7345
50	0.7315
100	0.7345
150	0.7240

*solo la conducción mínima para conectar válvula y celda de flujo.

Tabla 5.19. : Optimización de la longitud del tramo “válvula-celda de flujo”.

No hay variaciones significativas, se decide minimizar esta conducción al valor imprescindible para disminuir la dispersión.

5.6.2.3. Parámetros del detector

5.6.2.3.1. Reoptimización de la longitud de onda

Con las nuevas condiciones obtenidas durante el proceso de optimización, se efectuaron inyecciones de ión nitrito modificando la longitud de onda. Nos encontramos con un extraño efecto; la absorbancia aumentaba desde la longitud de onda 328 nm (utilizada durante la optimización) hasta 348 nm donde se obtenía un máximo. Esta variación tan grande de longitud de onda no era lo que cabía esperar. Por lo tanto se procedió a efectuar espectros en estático del complejo proflavin-NO₂, del ión nitrito y del proflavin en medio HCl 1 M.

Se observó que la longitud de onda 328 nm sigue siendo adecuada para el complejo proflavin-NO₂. La longitud de onda 348 nm correspondía al sistema proflavin/HCl.

Por tanto para reoptimizar la longitud de onda empleando el montaje FIA, se deberá hacer teniendo en cuenta el blanco (inyecciones de agua), que son a efectos prácticos inyecciones de proflavin/HCl diluidas. Cuanto más alta sea la señal del blanco, más nos estaremos acercando al máximo del reactivo.

Durante la optimización se han efectuado inyecciones de 2 ppm de ión nitrito, pero ahora se inyectaron 3 ppm para disminuir en lo posible la relación [proflavin] / [nitrito].

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5.20.

λ nm	A	A blanco	A - A blanco
327	0.9581	0.1628	0.7953
328	0.9688	0.1709	0.7979
329	0.9788	0.1789	0.7988
330	0.9833	0.1857	0.7976

Tabla 5.20. : Reoptimización de la longitud de onda.

Los máximos valores se obtienen para 328 y 329 nm, no obstante a 329 nm empieza a subir la señal del blanco por aproximación al máximo del reactivo. Se elige por tanto 328 nm como longitud de onda óptima.

5.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO

La configuración definitiva del sistema FIA para la determinación de nitritos por reacción con proflavin en medio clorhídrico y detección espectrofotométrica, es la que se muestra en la figura 5.20.

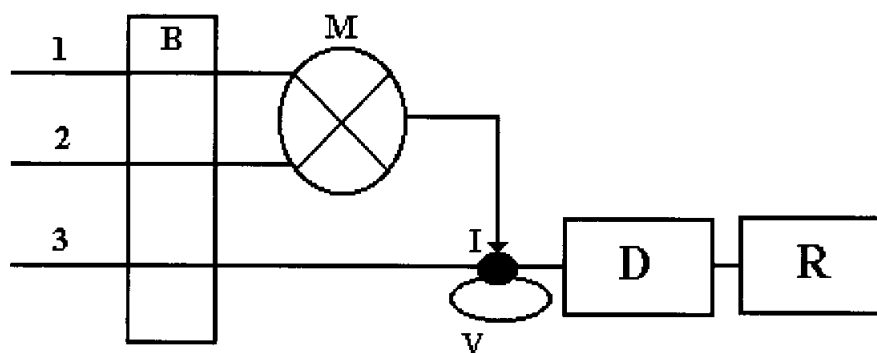


Figura 5.20.: Configuración definitiva del sistema FIA para análisis de nitritos.

- 1: Muestra : nitritos ; caudal : 2.7 ml/min
- 2: Reactivo : proflavin $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ / HCl 1.000 M ; caudal : 1.8 ml/min.
- 3 : Portador : agua; caudal : 1.8 ml/min.
- V: Volumen de muestra: 457 μl .
- B: Bomba peristáltica
- I: Válvula de inyección.
- D: Detector (Espectrofotómetro UV-VIS)
- R: Recolección, tratamiento y representación de resultados.
- W: Desecho.
- Temperatura de trabajo : ambiente.
- Longitud de onda : 328 nm

5.8. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO

5.8.1. Repetitividad y velocidad de inyección

Una vez finalizada la optimización de las diversas variables, se realizó el estudio de repetitividad y velocidad de inyección.

Para este estudio se efectuaron 11 inyecciones de 0.6 ppm de ión nitrito, a partir de los datos de absorbancia máxima y tiempo empleado en las inyecciones se calculó la desviación standard y la velocidad de inyección.

Los picos obtenidos se muestran en la figura 5.21.

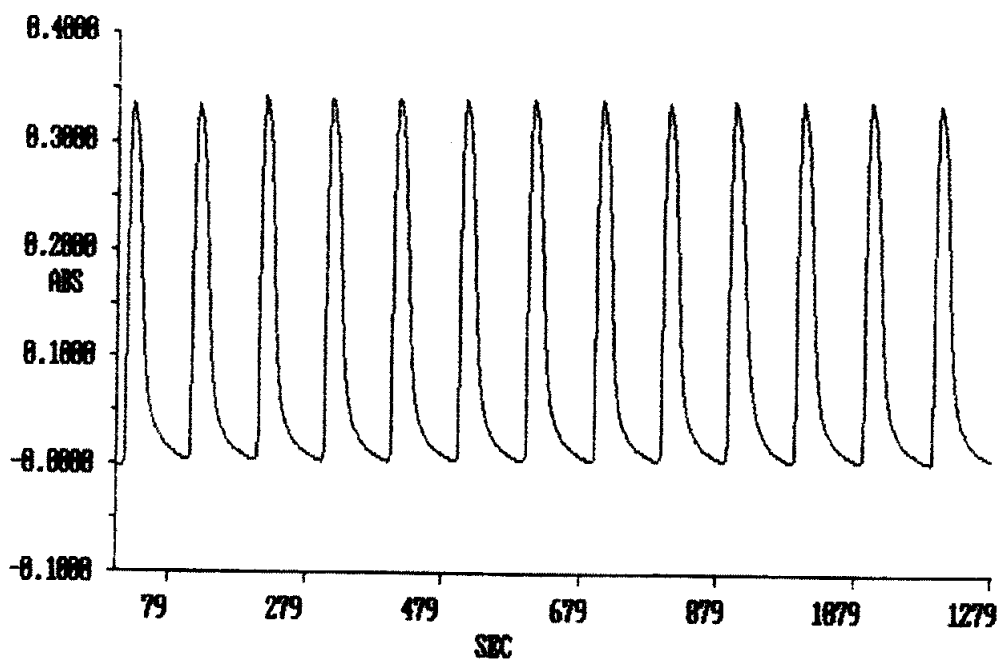


Figura 5.21.: Diagrama correspondiente a la experiencia del cálculo de la velocidad de inyección

Se obtuvo una desviación estandar relativa del 0.5%, lo cual implica una buena repetitividad.

La velocidad de inyección calculada fue de 37 muestras/hora para la concentración estudiada.

5.8.2. Intervalo de linealidad y límite de detección.

El calibrado abarcó las concentraciones de nitrito en el intervalo 0-6.6 ppm.

Los resultados se muestran en la tabla 5.21.

[NO₂⁻]ppm	A máx
0	0.1779
0.6	0.3476
1.0	0.4594
2.0	0.7483
2.6	0.9147
3.0	1.0346
4.0	1.2736
5.0	1.4171
6.0	1.4607
6.6	1.4611

Tabla 5.21. : Calibrado en el intervalo 0 -6.6 ppm de nitritos.

La representación gráfica sería : (Figura 5.22)

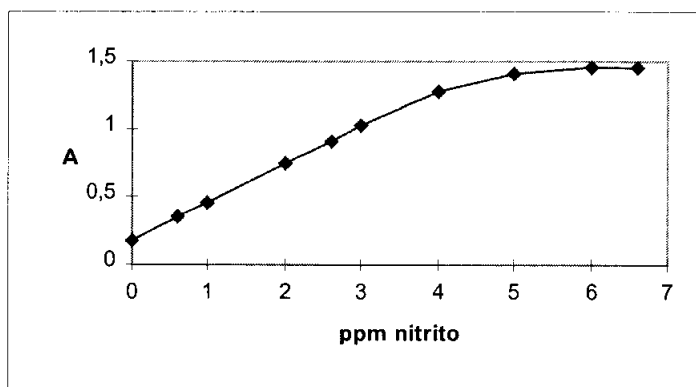


Figura 5.22. : Gráfica de calibrado (0-6.6 ppm nitrito)

Observando la gráfica podemos concluir que la linealidad se empieza a perder a partir de 4 ppm.

Por tanto, intervalo de linealidad : 0 - 4 ppm de NO_2^-

La ecuación de la recta para el tramo 0 - 4 ppm de ión nitrito por regresión

lineal es :

$$A = 0.27764 \times [\text{NO}_2^-] + 0.18446$$

siendo el coeficiente de correlación : $r^2 = 0.9995$.

El límite de detección fue calculado como el triple del ruido de fondo medio, obteniéndose un valor de 60 ppb.

5.8.3. Estudio de interferentes

Se procedió a realizar un estudio de la tolerancia del método para aquellos componentes que pueden acompañar al ión nitrito en una muestra real. Estas serán muestras de aguas, de tal manera que los posibles interferentes investigados fueron cationes y aniones inorgánicos.

La tolerancia al método se calcula en términos de error por comparación con las señales proporcionadas por una disolución de 2 ppm de ión nitrito.

El procedimiento seguido consistió en añadir varias concentraciones del posible interferente a una disolución de 2 ppm de ión nitrito, hasta que el error relativo (tolerancia) sea del 3%, o hasta un máximo de concentraciones de interferente cercano a 1000 ppm.

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 5.22 y el interferente más serio fue el Fe(III), el cual no interfería únicamente en concentraciones próximas a 1 ppm..Conviene destacar que el Fe(III) no sería un interferente para muestras de agua potable. La legislación española no permite más de 0.05 ppm de Fe(III) para agua de mesa.

Aniones	Conc. ppm	$\varepsilon(\%)$	Cationes	Conc.ppm	$\varepsilon(\%)$
Br ⁻	1010	0.37	Na ⁺	1201	0.86
SO ₄ ⁼	1001	0.41	K ⁺	1308	0.37
PO ₄ ⁼	990	0.92	Cd(II)	1016	0.88
Cl ⁻	1053	2.70	Zn(II)	1001	2.60
HCO ₃ ⁻	940	0.63	NH ₄ ⁺	975	2.50
CO ₃ ⁼	992	1.70	Ca(II)	1008	2.30
NO ₃ ⁻	987	2.66	Cu(II)	500	3.60
SiO ₃ ⁼	909	1.10	Al(III)	800	2.50
			Mg(II)	260	2.60
			Fe(III)	1	0.80

Tabla 5.22. : Interferentes estudiados y tolerancia del sistema a los mismos.

5.9. ADAPTACIÓN DEL SISTEMA FIA A LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS

5.9.1. Aplicación analítica al ión nitrato

La siguiente etapa fue el estudio de la adaptación del sistema a la posibilidad de la determinación de nitratos. Como se ha descrito en la introducción, en multitud de casos los sistemas aplicados a la determinación de nitritos, pueden ampliar su uso a la de nitratos, al introducir un elemento que provoque la transformación de éstos en nitritos, como operación de pre-tratamiento de la muestra. Los elementos utilizados más frecuentemente son columnas reductoras.

5.9.1.1. Cambios en el montaje FIA

Se introdujo una columna empacada de cadmio cuperizado en el montaje FIA desarrollado, de tal manera que la reducción se pudiera realizar en continuo. La columna utilizada al inicio de las pruebas fue de vidrio y tenía 10 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro interno. Hay que tener en cuenta que el volumen muerto en la columna fue bastante grande, ya que su ubicación en principio antes de la entrada del mezclador, no influye en la dispersión de la muestra. Ver figura 5.23 (montaje 4).

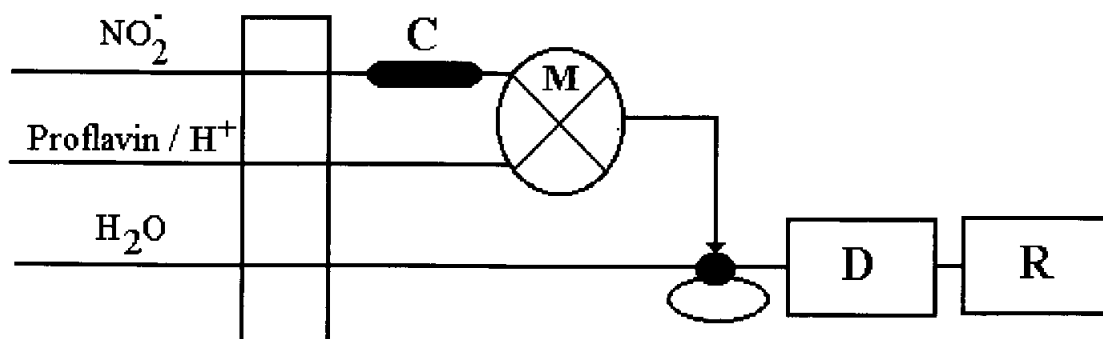


Figura 5.23. : Montaje 4.

C, columna Cd-cuperizado ; M, mezclador ; D, detector ; R, registro informático.

5.9.1.2. Columna de cadmio-cuperizado

Preparación : Se emplean gránulos de Cd metálico de un tamaño aproximado de 5 mm de diámetro, los cuales se lavan primero con HCl 6 M y posteriormente con agua. Tras esta operación son tratados con una disolución al 2% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con agitación hasta la desaparición del color azul de la disolución y consiguiente aparición de precipitado coloidal. Se repite la operación varias veces.

Después de este proceso se lavan los gránulos copiosamente con agua destilada, eliminando el Cu que no haya quedado adherido a las partículas de Cd. Con estos gránulos se rellena una columna de vidrio, que es la que se insertará en el montaje FIA mediante las roscas y la tornillería al efecto.

Esta columna se ha de conservar embebida en una disolución tampón de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, la cual se prepara de la siguiente manera : disolver 13 g de NH_4Cl y 1.7 g de EDTA-Na_2 en 900 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.5 con NH_3 concentrado y se diluye a 1 litro.

Acondicionamiento de la columna : La columna necesita un acondicionamiento previo a cada uso. Al principio la reducción es más acusada, pero poco a poco la señal va disminuyendo hasta estabilizarse en un valor. Las experiencias efectuadas en nuestros laboratorios nos indican que la columna se estabiliza tras pasar una disolución diluida de nitratos durante 30 minutos.

5.9.1.3. Influencia de la disolución de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$

Tal y como se ha indicado, para que la reacción de reducción se produzca en el interior de la columna es necesario que el medio de reacción se encuentre tamponado con la disolución $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, descrita anteriormente. Hay que tener en cuenta que después del proceso de reducción, el bolo de muestra entrará en contacto con el reactivo proflavin en el mezclador y para que transcurra esta reacción el medio tiene que ser ácido.

Se diseñó una experiencia para encontrar la mínima cantidad de tampón necesaria para la reducción y que no neutralice en demasía el medio ácido necesario para la formación del complejo proflavin- NO_2 .

Se prepararon muestras de nitrato, adicionando diferentes cantidades del tampón $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (su composición ya se ha descrito), de forma que la concentración final del mismo osciló entre el 5 y el 50%.

Las muestras contenían 2.7 ppm de ión nitrato. También se inyectaron dos muestras de 2 ppm de ión nitrito (2.7 ppm de nitrato al reducirse proporcionan 2 ppm de nitrito). Una de ellas, fue inyectada en el montaje sin columna y otra en el montaje con columna y con un 5% v/v de tampón en la disolución de nitrito como señales de referencia. Los resultados se exponen en la tabla 5.23.

anión	[tampón NH ₄ ⁺ /NH ₃] % v/v	A
NO ₂ ⁻	-	0.6931*
“	5	0.6813*
NO ₃ ⁻	50	0.7038
“	33	0.7089
“	25	0.7089
“	10	0.7107
“	5	0.7047

* valores de referencia.

Tabla 5.23 : Influencia de la disolución de NH₄⁺/NH₃.

En esta experiencia se ha podido constatar un elevado grado de conversión de nitrato a nitrito, ya que prácticamente coinciden las señales de nitritos y nitratos. La influencia del tampón en la señal analítica definitiva ha mostrado ser irrelevante. Se eligió una disolución del tampón del 25% v/v para el medio de la muestra.

5.9.1.4. Influencia de la concentración de HCl en la disolución reactivo

La muestra de nitratos tiene un pH alcalino (tampón), necesario para la reducción en el interior de la columna, no obstante la reacción de complejación proflavin-NO₂ requiere un medio HCl 1M. La mezcla de la muestra tamponada con el reactivo en el mezclador podría subir el pH afectando negativamente a la formación del compuesto coloreado. En la experiencia anterior, se ha visto que este efecto no debe tener demasiada importancia. No obstante, ahora se aborda el problema aumentando la concentración de HCl en la disolución reactiva.

Se insertaron disoluciones de 5 ppm de ión nitrato y se emplearon dos disoluciones reactivas, una con una concentración de HCl 1.000 M y otra con una concentración de ácido 2.000 M. Los resultados se muestran en la tabla 5.24.

[HCl] M	A
1.000	0.4658
2.000	0.5133

Tabla 5.24. : Influencia del HCl en la disolución reactiva.

La señal proporcionada para una concentración 2.000 M en HCl es mayor, no obstante la diferencia no es muy grande. Además conviene añadir que empleando esta concentración de ácido los picos presentan colas más largas. Por todo esto, se decide seguir utilizando una concentración 1.000 M de HCl y una dilución del tampón al 25% v/v en la disolución de muestra.

5.9.1.5. Influencia del caudal a través de la columna

Durante la realización de este estudio, se pudo comprobar que la columna de Cd(Cu⁰) presentaba un grado de conversión de nitrato a nitrito variable dependiendo del tiempo de utilización y de la columna misma. Dos columnas de iguales dimensiones, preparadas de la misma manera y en las mismas condiciones presentaban diferente grado de conversión, en los casos más desfavorables se obtuvieron conversiones inferiores al 50%.

Se efectuó un primer estudio del caudal a través de la columna, en un intento de mejorar y estabilizar el grado de conversión.

Las disoluciones de nitrato empleadas fueron de 20 ppm. Los resultados quedan reflejados en la tabla 5.25.

Caudal (ml/min)	A
2.0	1.3454
2.9	1.3083
3.9	1.1005

Tabla 5.25 : Influencia del caudal a través de la columna.

Como era de esperar, al disminuir el caudal aumenta la señal analítica, debido al mayor tiempo de residencia de la muestra en el interior de la columna. Hay que tener en cuenta que un caudal bajo proporcionaría una baja velocidad de inyección.

5.9.1.6. Influencia de la longitud de la columna

Se estudió la influencia de la longitud de la columna a emplear para conseguir el mayor grado de conversión posible y mayor tiempo de vida media del reactor a caudales elevados. Se probaron tres columnas de vidrio, de 5 cm, 10 cm y 15 cm.

En esta experiencia se inyectaron disoluciones de 2 ppm de nitrito como referencia (sin columna) y disoluciones de 2.7 ppm de nitrato.

Para cada longitud de columna se calculó su grado de conversión en %. (Tabla 5.26).

longitud columna (cm)	A	Grado de conversión %
-	0.6499*	-
5	0.2061	31.7
10	0.3044	46.8
15	0.3623	55.7

*señal de referencia (inyección de 2 ppm de ión nitrito).

Tabla 5.26. : Influencia de la longitud de la columna.

Como era de esperar, al aumentar la longitud de la columna aumenta el grado de conversión. No obstante se decide seguir trabajando con la columna de 10 cm, ya que la de 15 cm originaba problemas de sobrepresión en el montaje FIA.

5.9.1.7. Variación del caudal y empleo de flujo detenido

En las experiencias anteriores se observó que al aumentar el tiempo de contacto del ión nitrato con los gránulos de Cd-cuperizado se incrementaba la señal analítica, bien por la longitud de la columna, bien por los caudales de paso a través de la columna. Otro modo de prolongar el contacto sin los problemas ya comentados consiste en detener el flujo en el interior de la columna.

Trabajar a flujo detenido, es decir detener el bolo de muestra un tiempo concreto en la columna puede aún aumentar más el grado de conversión de nitrato a nitrito. Por ello se diseñó una experiencia en la que se detiene, durante varios tiempos diferentes, el flujo del bolo de muestra en la columna. Para ello se eliminó el portador y la válvula Rheodyne del montaje, es decir sólo existían los canales del reactivo y de la muestra, de tal manera que del mezclador salía el producto de reacción, dirigiéndose directamente a la celda de medida. El montaje descrito se muestra en la figura 5.24.

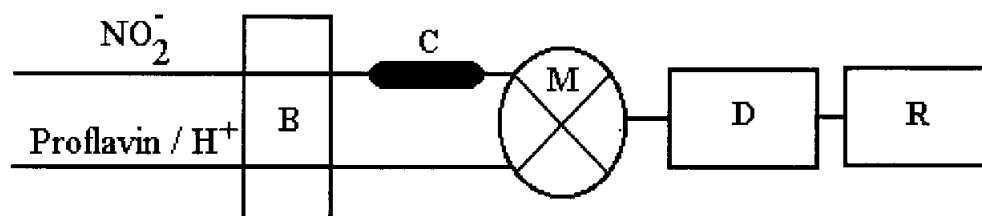


Figura 5.24. : B : bomba peristáltica, C : columna de CD-cuperizado, M : mezclador, D : detector, R : registro informático.

Para estudiar la bondad de la técnica de flujo detenido, se usó este montaje simplificado, ya que el montaje FIA habitual nos planteaba problemas, en el sentido de que eran necesarios controles de tiempo y del funcionamiento del sistema muy estrictos. El bolo de muestra tendría que estar detenido, por paro de la bomba, en la columna. Después de esperar el tiempo o tiempos predeterminados, se conectaría otra vez la bomba. Tendríamos que esperar otro lapso de tiempo hasta que el bolo de muestra llegara al bucle de la válvula de inyección y en ese momento inyectar. Con los cambios, ahora, introducidos el estudio se realiza con más comodidad y fiabilidad.

Con este montaje simplificado, también se probaron diversos caudales junto con los diversos tiempos de parada.

Los datos así obtenidos para la variación de caudal y tiempo de detención cero se muestran en la tabla 5.27 (caudales a través de la columna):

Caudal (ml/min)	A	Grado de conversión %
-	0.6873*	-
3.0	0.2837	41.3
2.2	0.3202	46.6
1.5	0.3881	56.5
0.8	0.1984	72.5
0.3	0.5600	81.5

*señal de referencia (inyección de 2 ppm de ión nitrito).

Tabla 5.27. : Datos de la variación de caudal y tiempo de detención cero.

Los datos obtenidos en esta experiencia empleando flujo detenido son mostrados en la tabla 5.28.

t flujo detenido (min)	A	Grado de conversión %
-	0.7331*	-
1	0.3615	49.3
2	0.3766	51.4
5	0.3635	49.6

*señal de referencia (inyección de 2 ppm de ión nitrito).

Tabla 5.28 : Influencia del flujo detenido.

El estudio realizado empleando flujo detenido no proporciona grandes variaciones, no obstante observando las señales obtenidas, se ve que al aumentar el tiempo aumenta la cola del pico FIA, probablemente se deba al hecho de que cuesta mayor tiempo “eluir” el nitrato reducido.

Comparando los resultados de ambas experiencias (tabla 5.27 y 5.28.) se puede establecer que detener el flujo proporciona valores similares a los que se pueden conseguir con el caudal.

El siguiente paso fue realizar un estudio manteniendo el caudal del portador en 1.8 ml/min y variando de forma simultánea los caudales de la muestra y del reactivo, manteniendo la proporción en la que se mezclan reactivo y muestra. Esto se consiguió empleando dos bombas peristálticas con la intención de encontrar unas condiciones que mantuvieran la relación de caudales en el mezclador sin alterar el caudal del portador. De esta forma la única alteración realizada no afecta a las condiciones ya optimizadas para los nitritos.

Se inyectaron disoluciones de 2.7 ppm de ión nitrato y como referencia se inyectaron 2 ppm de ión nitrito. Los datos que se obtuvieron son mostrados en la tabla 5.29., los caudales expresados corresponden al paso por el interior de la columna.

Caudal (ml/min)	A	Grado de conversión %
-	0.7026*	-
3.0	0.3500	49.8
2.0	0.3849	54.8
1.0	0.4692	66.8
0.3	0.5291	75.3

*señal de referencia (inyección de 2 ppm de ión nitrito).

Tabla 5.29. : Influencia del caudal a través de la columna, manteniendo el caudal del portador.

Cuanto más lento es el caudal, mayor señal analítica es producida.

Finalmente, se decide utilizar dos posibles caudales para los canales de muestra y reactivo. Un caudal rápido para un intervalo de concentraciones de nitratos más alto, 3.0 ml/min a través de la columna y un caudal lento 0.3 ml/min, a través de la columna para un intervalo de concentraciones de nitratos más bajo.

5.9.2. Condiciones FIA optimizadas para la determinación de nitratos.

- Muestra : nitratos en disolución acuosa conteniendo un 25% v/v de disolución tampón $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, caudal para intervalo de concentraciones alto : 3.0 ml/min ; caudal para intervalo de concentraciones bajo : 0.3 ml/min.
- Reactivo : proflavin $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$ / HCl 1.000 M ; caudal para intervalo de concentraciones de nitrato alto : 2.0 ml/min ; caudal para intervalo de concentraciones bajo : 0.2 ml/min.
- Portador : agua destilada ; caudal : 1.8 ml/min.
- Volumen de muestra : 246 μl .
- Dimensiones de la columna de Cd-cuperizado : 10 cm de longitud, 0.5 cm d.i.
- Temperatura de trabajo : ambiente.
- Longitud de onda : 328 nm.

5.9.3. Aplicaciones analíticas

5.9.3.1. Intervalo de linealidad, caudal alto

Se calculó el intervalo de linealidad para el ión nitrato empleando un caudal de 3.0 ml/min a través de la columna. El resto de condiciones son las óptimas. Se utilizó la columna de 10 cm para la reducción de nitrato a nitrito. Se probó el intervalo 0 - 25 ppm de ión nitrato.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.30. :

[NO ₃ ⁻] ppm	A
0	0.1446
0.075	0.1483
0.10	0.1509
0.50	0.1609
1.0	0.1855
5.0	0.3427
10	0.5400
15	0.7326
20	0.9099
25	1.0674

Tabla 5.30. : calibrado intervalo 0-25 ppm de nitrato

La ecuación de la recta es:

$$A = 0.03757 \times [\text{NO}_3^-] + 0.1511$$

El coeficiente de regresión es :

$$r^2 = 0.9995$$

La representación gráfica de la recta obtenida se aprecia en la figura 5.25.

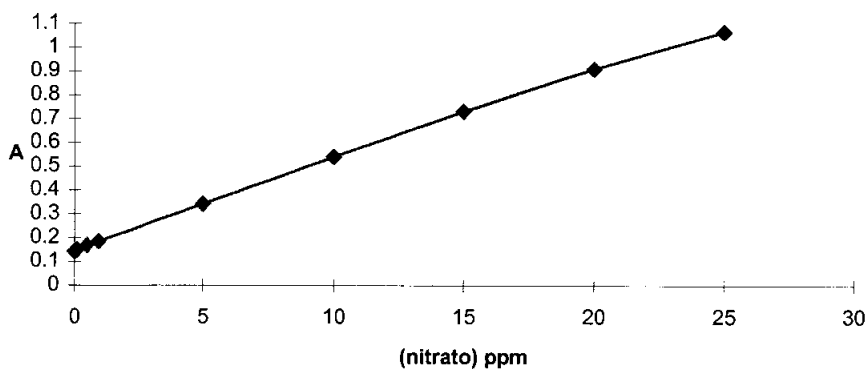


Figura 5.25. : recta de calibrado, intervalo 0-25 ppm nitrato.

5.9.3.2. Repetitividad y velocidad de inyección con caudal alto

Para este estudio se efectuaron 16 inyecciones de 5 ppm de ión nitrato. A partir de los datos de absorbancia máxima y tiempo empleado en las inyecciones se calculó la desviación standard y la velocidad de inyección.

Los picos obtenidos se muestran en la figura 5.31.

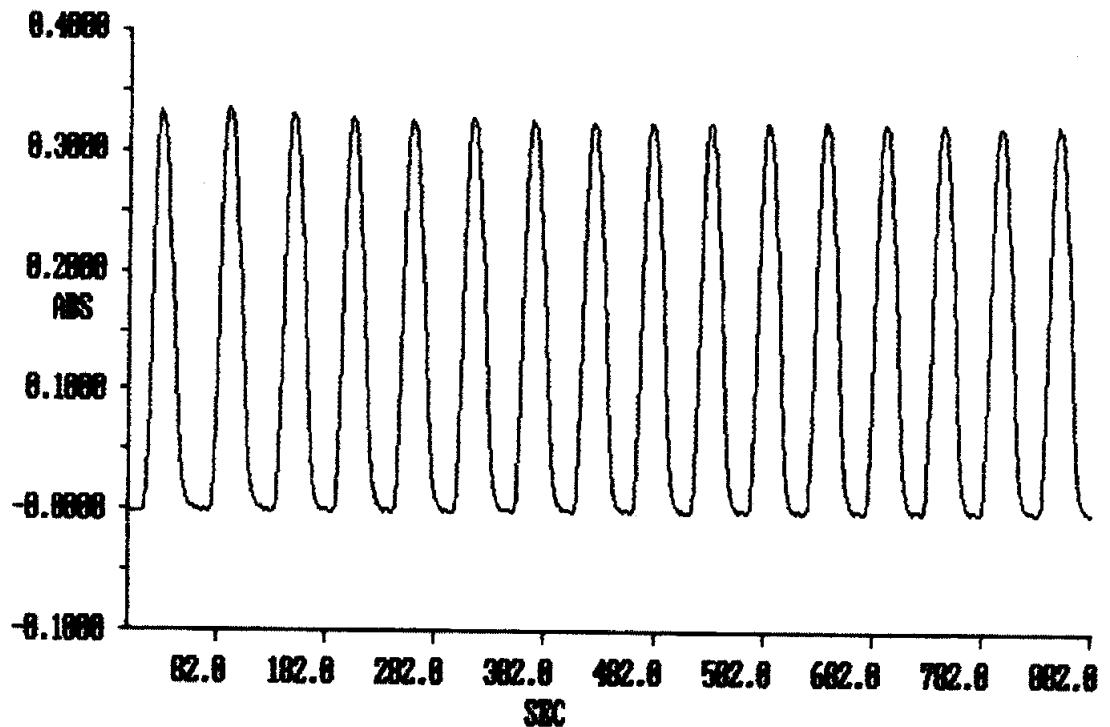


Figura 5.26.: Diagrama correspondiente al cálculo de velocidad de inyección, caudal alto

Se obtuvo una desviación estándar relativa del 0.49%, lo cual implica una gran repetitividad. La velocidad de inyección obtenida fue de 68 inserciones / hora para la concentración estudiada.

5.9.3.3. Intervalo de linealidad, caudal bajo y límite de detección

Se calculó el intervalo de linealidad para el ión nitrato empleando un caudal de 0.3 ml/min a través de la columna. En estas condiciones la sensibilidad será mayor. Se probó el intervalo 0 - 20 ppm de ión nitrato. Trabajando a este caudal, se pierde la linealidad por encima de 10 ppm de nitrato, como se podrá comprobar en la representación gráfica del calibrado (figura 5.27.).

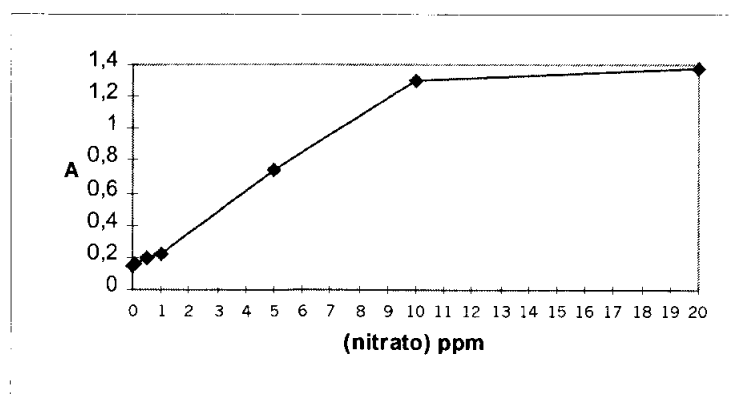


Figura 5.27. : calibrado, intervalo 0-20 ppm de nitrato

La ecuación de la recta sería (0-10 ppm):

$$A = 0.1165 \times [\text{NO}_3^-] + 0.148065$$

El coeficiente de regresión es :

$$r^2 = 0.99985.$$

El límite de detección fue calculado como el triple del ruido de fondo medio, obteniéndose un valor de 0.075 ppm.

5.9.3.4. Repetividad y velocidad de inyección a caudal bajo

Para este estudio se efectuaron 9 inyecciones de 5 ppm de ión nitrato. A partir de los datos de absorbancia máxima y tiempo empleado en las inyecciones se calculó la desviación standard y la velocidad de inyección.

Se obtuvo una desviación estándar relativa del 0.63%.

La velocidad de inyección obtenida fue de 24 inserciones/hora para la concentración estudiada.

5.9.4. Estudio sobre el análisis conjunto de nitritos y nitratos

A pesar de no obtener una conversión cuantitativa, se diseñó una experiencia para comprobar si las señales analíticas de nitritos y nitratos analizados conjuntamente eran aditivas. Para ello se inyectaron con un caudal de 1.8 ml/min para el portador y de 3.0 ml/min para el canal de la muestra, las siguientes concentraciones

- 0.4 ppm de nitrito
- 1.6 ppm de nitrito
- 5 ppm de nitrato
- 10 ppm de nitrato
- 0.4 ppm de nitrito + 5 ppm de nitrato
- 1.6 ppm de nitrito + 10 ppm de nitrato

En todos los casos se preparaban en disolución tampón al 25 % v/v.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 5.31.

Muestra	A sin columna	A con columna
0.4 ppm nitrito	0.2637	0.2773
1.6 ppm nitrito	0.5827	0.6009
5 ppm nitrato	0.1551	0.3589
10 ppm nitrato	0.1538	0.5295
0.4 ppm nitrito + 5 ppm nitrato	0.2553	0.4466
1.6 ppm nitrito + 10 ppm nitrato	0.5861	0.9425

Tabla 5.31. : Análisis conjunto de nitritos y nitratos.

Si las señales fueran aditivas, los resultados de absorbancia tendrían que haber sido en los dos últimos casos 0.6362 y 1.1304 respectivamente.

Por lo tanto, no es posible el análisis conjunto. Lo más recomendable es analizar cada ión por separado, con la única precaución de incluir la columna reductora en el montaje a la hora de analizar nitratos. Según el intervalo de concentraciones esperado, emplearíamos el caudal alto o bajo.

5.10. MUESTRAS REALES

Se efectuó la determinación de nitritos en dos muestras de aguas residuales procedentes de una empresa de productos cárnicos y también se efectuó el análisis de nitratos en una muestra de agua de mar de las costas de la Comunidad Valenciana.

En todos los casos los resultados fueron contrastados con métodos estándar para nitritos y nitratos. El método empleado como referencia para el caso de los nitritos fue el estándar colorimétrico de Griess y para el caso de los nitratos el método de absorción directa en el ultravioleta, ambos métodos son conocidos y fácilmente localizables en la bibliografía.

Las muestras de agua analizadas, por la metodología propuesta en este capítulo, no sufrieron ningún tratamiento previo y fueron inyectadas directamente en el montaje FIA.

Los resultados obtenidos en estos análisis junto con su error se muestran en la tabla 5.32.

Nitritos :

muestra	[NO ₂ ⁻] ppm GRIESS	[NO ₂ ⁻] ppm método propuesto	ε _r %
agua residual (I)	1.50	1.47	2.0
agua residual (II)	2.30	2.26	1.7

Nitratos :

muestra	[NO ₃ ⁻] ppm UV	[NO ₃ ⁻] ppm método propuesto	ε _r %
agua de mar	1.75	1.73	1.1

Tabla 5.32. : Resultados de los análisis de las muestras de agua.

5.11. CONCLUSIONES

Se puso a punto un procedimiento FIA simple y rápido para la determinación de nitritos. El método esta basado en la reacción del ión nitrito con el reactivo no carcinogénico 3,6-diaminoacridina (proflavin).

Las disoluciones de este reactivo son estables durante largos períodos de tiempo.

Muestra y reactivo se mezclan en continuo en el sistema y demostró ser un factor importante para la obtención de una adecuada señal analítica, por lo que se estudió e implantó el uso de una cámara de mezclado.

El método desarrollado muestra una gran precisión, selectividad y un amplio intervalo de linealidad, mayores que otros métodos FIA desarrollados.

Fueron optimizadas las diversas variables químicas y FIA. Los valores obtenidos al final de este proceso fueron :

- Relación de caudales (nitrito-proflavin) : 1.450
- Longitud de onda de absorción : 328 nm
- [HCl] : 1.000 M
- [proflavin] : $2 \cdot 10^{-4}$ M
- Caudal portador : 1.8 ml/min
- Volumen de muestra : 457 μ l

Se aplicó la metodología desarrollada a la determinación de nitritos. Para ello, se estudió previamente el intervalo de linealidad del método, la reproducibilidad y la velocidad de inyección. Además fueron efectuadas experiencias para establecer la interferencia que podían provocar los componentes que habitualmente acompañan al ión nitrito en muestras de agua.

Los resultados de esta aplicación analítica fueron :

Nitritos :

- Intervalo de aplicación : 0.06 - 4 ppm
- Curva calibrado : $A = 0.277 + 0.184C$; $r = 0.9995$
- Límite de detección : 0.06 ppm
- Velocidad de inyección : 37 h^{-1} para 0.6 ppm de nitrito.
- Repetitividad : RSD para 0.6 ppm de nitrito : 0.5%.
- Interferentes : se estudió la interferencia de gran cantidad de iones. Ver la tabla resumen (Tabla 5.22).

El método también puede ser aplicado a la determinación de nitratos, ubicando una columna reductora de Cd-cuperizado en el canal de la muestra (dimensiones de la columna: 10 cm de longitud, 0.5 cm d.i.). El sistema sigue conservando el resto de parámetros iguales.

Nitratos :

Se establecieron dos intervalos de aplicación, uno con un caudal alto a través de la columna reductora y otro con un caudal bajo.

Caudal 3.0 ml/min :

- Intervalo de aplicación : 0.1 - 25 ppm
- Curva calibrado : $A = 0.1506 + 0.003757C$; $r = 0.9995$
- Velocidad de inyección : 68 h^{-1} para 5 ppm de nitrato
- Repetitividad : RSD para 5 ppm de nitrato : 0.49%

Caudal 0.3 ml/min :

- Intervalo de aplicación : 0.075 - 10 ppm
- Curva calibrado : $A = 0.1481 + 0.1165C$; $r = 0.99985$
- Velocidad de inyección : 24 h^{-1} para 5 ppm de nitrato
- Repetitividad : RSD para 5 ppm de nitrato : 0.63%

- Límite de detección : 0.075 ppm.

Con estos datos se estableció el contenido en ión nitrito en dos muestras de aguas residuales procedentes de una empresa cárnica y el contenido en ión nitrato de una muestra de agua de mar tomada de las costas de la Comunidad Valenciana con resultados muy aceptables.

Se comprobó la imposibilidad de determinar conjuntamente nitratos y nitritos, puesto que en la modalidad que incorpora la columna, la señal de nitratos y nitritos no es aditiva.

Capítulo sexto

**6. DETERMINACIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA
DEL AMARILLO DE ACRIDINA.**

INTRODUCCIÓN

6.1. PROPIEDADES Y USOS DE LAS ACRIDINAS

El amarillo de acridina es la 3,6-diaminoacridina-2,7-dimetilacridina (figura 6.1.)

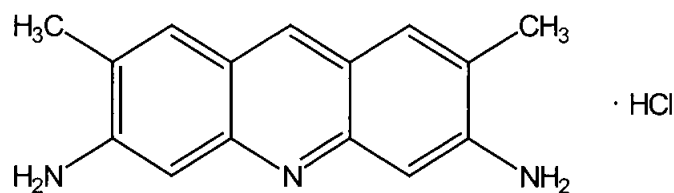


Figura 6.1.

Amarillo de acridina

Nº CAS : [135-49-9]

M : 273.77

$\lambda_{\text{máx}}$: 442 nm

El amarillo de acridina pertenece a una familia formada por una gran cantidad de compuestos considerados estructuralmente derivados de la acridina (figura 6.2).

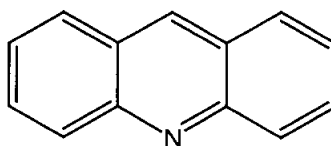


Figura 6.2.: Acridina

Las acridinas se encuentran en multitud de tipos de muestras.

La síntesis de una aminoacridina suele implicar la ciclación de un apropiado ácido difenilamina-2-carboxílico sustituido para obtener la correspondiente 9-acridanona o 9-cloroacridina. Estas pueden ser posteriormente reducidas a acridina por varias rutas químicas, o bien la 9-cloroacridina puede ser convertida a 9-aminoacridina²²⁸.

Ha sido determinado el carácter alcalino de un gran número de aminoacridinas, usualmente en conexión con estudios de actividad biológica. La mayoría de las determinaciones han sido realizadas mediante valoraciones potenciométricas, pero también se han usado otras técnicas como absorción, solubilidad y partición sobre soluciones tamponadas conteniendo la acridina. La 9-aminoacridina es la que presenta mayor fuerza alcalina²²⁸.

Todas las aminoacridinas proporcionan anillos al reaccionar con aldehidos aromáticos. Los isómeros 1- y 2- de manera cuantitativa, pero los 3- y 4- reaccionan con un rendimiento bajo²²⁸.

La hidrólisis de las aminoacridinas con HCl concentrado a 180° C proporciona las correspondientes hidroxiacridinas. La hidrólisis alcalina tiene un efecto muy pequeño²²⁸.

La reducción catalítica con Ni-Raney resulta en la formación de aminoacridanos y la ebullición de las aminoacridinas con anilina en presencia de HCl, produce las correspondientes anilinoacridinas²²⁸.

Las aminoacridinas presentan una gran variedad en su comportamiento químico y físico. Las propiedades de las 9-aminoacridinas, en particular, difieren

considerablemente del resto de isómeros, por esta razón las consideramos separadamente del resto de aminoacridinas²²⁸.

6.1.1. Diaminoacridinas

Las propiedades químicas de las diaminoacridinas pueden ser predichas aproximadamente a partir de las propiedades conocidas de las dos monoaminoacridinas con los grupos amino en posiciones análogas.

Las diaminoacridinas tras un proceso de diazotación producen, a menudo, compuestos de colores brillantes que van desde el violeta al naranja. Tras los estudios realizados sobre diazotación de las diaminoacridinas se concluyó que solo el grupo amino situado en la posición 6 participa en la diazotación²²⁸.

Se ha calculado la densidad electrónica en el anillo del nitrógeno, y la energía del orbital molecular más alto ocupado y del orbital molecular vacío más bajo en una serie de diaminoacridinas en un esfuerzo para correlacionar esos parámetros con los valores de pK_a y la actividad terapéutica²²⁸.

La 3,6-diaminoacridina se convierte en su dihidroxi compuesto por hidrólisis con ácido sulfúrico del 45% a 195°C. El proflavin (3,6-diaminoacridina) tiene importantes propiedades antisépticas y se prepara calentando *m*-fenilendiamina con ácido fórmico y cloruro de zinc en glicerina. Según la reacción de Skraup forma monoanillos con benzaldehído y otros aldehídos. Las sales de 3,6-diamino-10-metilacridinio también forman anillos con aldehídos aromáticos y alifáticos, así como con cetonas aromáticas²²⁸.

6.1.2. Acción antibacteriana de la acridinas

Los primeros trabajos que constatan a la acridinas como agentes antibacterianos se deben a Ehrlich y Benda, los cuales observaron que los cloruros de 3,6-diamino-2,7,10-trimetilacridinio y 3,6-diamino-10-metilacridinio poseían actividad contra *Trypanosoma brucei*, especialmente el último, al cual se le llamo tripaflavin. Posteriormente. Shiga constató que el tripaflavin era activo contra las infecciones de cólera²²⁸.

Las aminoacridinas poseen una importante actividad biológica. Browning en 1913 descubrió las propiedades como bactericida del proflavin. En 1930, Mauus y Mietzch describieron la actividad contra la malaria que presentaban algunas 9-aminoacridinas sustituidas. Recientemente se han descubierto las propiedades carcinoestáticas de algunas 9-aminoacridinas²²⁸.

Browning y Gilmour demostraron en sus trabajos que el amarillo de acridina (3,6-diamino-2,7-dimetilacridina) y el proflavin (3,6-diaminoacridina) inhibían el crecimiento de colonias de algunos estafilococos, bacilos, etc. estos trabajos estimularon el interés por las potencialidades de las acridinas como desinfectantes de heridas, desde su actividad antibacteriana, en contraste con otras muchas sustancias que no actuaban apropiadamente en presencia de fluidos corporales y pus²²⁸.

Las acridinas antibacterianas se usan principalmente en el tratamiento de quemaduras y heridas; en este aspecto hay un tendencia a sustituir las sulfonamidas y antibióticos por las acridinas, ya que son activas contra un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas y además el uso indiscriminado de antibióticos ha favorecido la aparición de resistencias a estos últimos²²⁸.

La 9-aminoacridina ha demostrado ser un potente agente antibacteriano superior al proflavin y la acriflavina. Estas dos últimas diaminoacridinas fueron usadas como desinfectantes de heridas durante las dos guerras mundiales²²⁸.

Se han efectuado estudios correlacionando el carácter alcalino y la actividad antibacteriana. Se ha podido constatar que una eficiente actividad contra bacterias solo ocurre cuando las acridinas se encuentran ionizadas al menos al 50% como cationes, de tal manera que si se ionizan como aniones o zwitteriones resultan inefectivas. La naturaleza química de los sustituyentes en el núcleo de las acridinas tiene importancia. El modo de acción se explica fácilmente sobre la base de la competición existente entre los cationes de acridina y los hidrogeniones por una localización aniónica vital en las células bacterianas²²⁸.

6.2. REACCIONES QUIMIOLUMINISCENTES DE LAS ACRIDINAS

Las propiedades quimioluminiscentes de las acridinas han sido estudiadas principalmente para el caso de las sales de biacridinio y de acridinio, así como el caso de los ésteres de acridinio.

Entre las sales de biacridinio, la lucigenina (nitrato de N, N'-dimetilacridinio) es el arquetípico quimioluminiscente derivado de las acridinas.

Como el luminol, la oxidación de la lucigenina, necesaria para la reacción quimioluminiscente (figura 6.3), ocurre en medio alcalino (pH 9-10) produciendo una emisión de luz azul-verdosa que dura algunos minutos. El oxidante más utilizado es el H₂O₂. Esta reacción está catalizada por varios metales, incluyendo algunos como el Bi(III), el cual no cataliza la reacción del luminol. El producto excitado de la reacción (N-metilacridona) es insoluble en agua y se deposita en las paredes de los sistemas de flujo y en las ventanas del detector, lo cual origina problemas prácticos. No obstante,

la adición del surfactante sodio dodecilsulfato a la disolución de lucigenina previene esa precipitación^{69, 70}.

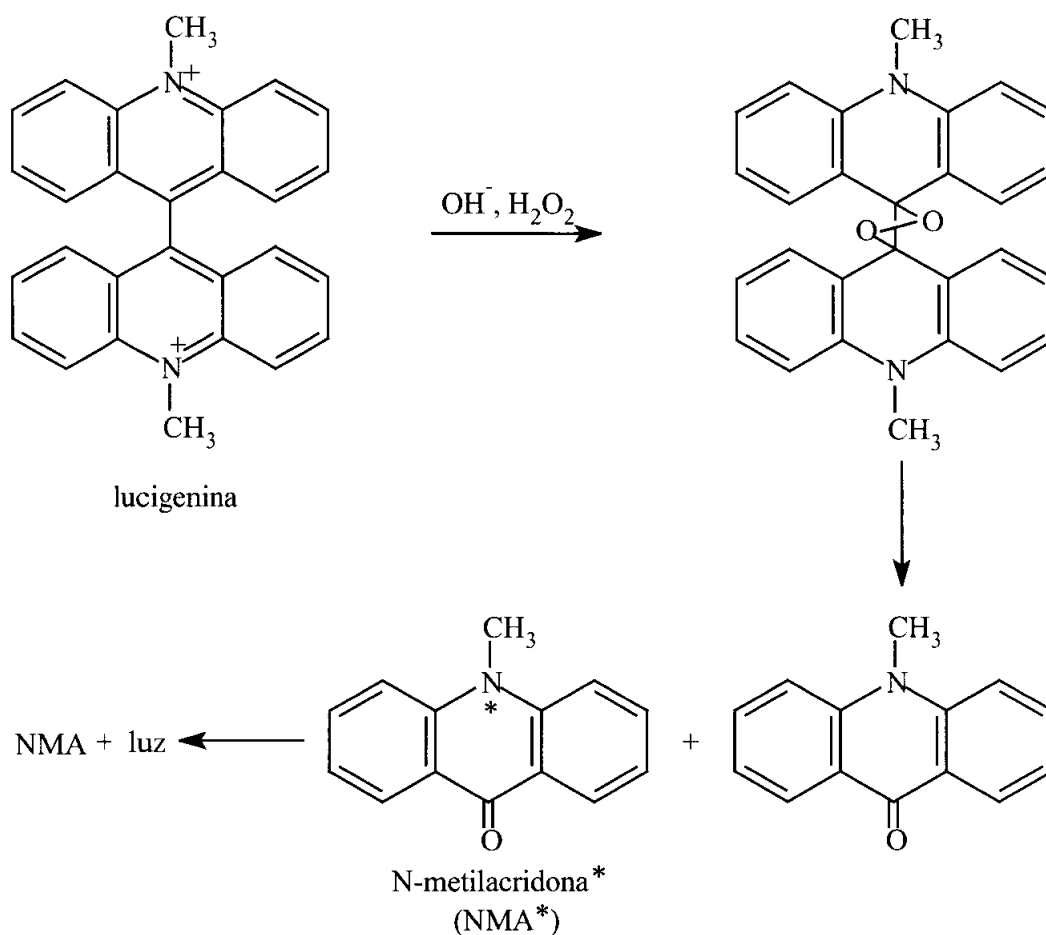


Figura 6.3.: Reacción quimioluminiscente de la lucigenina.

La 10,10'-dimetil-9,9'-biacridina-9,9'-óxido y la 10,10'-dimetil-9,9'-biacridina son quimioluminiscentes cuando son disueltas en piridina o metanol en presencia de H_2O_2 . La luminiscencia generada así es débil y requiere la presencia de radicales en el inicio de la reacción para producir una intensidad visible.

Dentro de las *sales de acridinio*, la oxidación con H_2O_2 en medio básico de los fenil ésteres proporcionan las mejores expectativas en cuanto a aplicaciones quimioluminiscentes. El H_2O_2 es esencial, *t*-butil y metilhidroperóxido son considerablemente menos efectivos. En estas reacciones el rendimiento cuántico no se ve afectado significativamente por la sustitución en el grupo fenilo. Conviene mencionar que el orden de adición de los reactivos, base y H_2O_2 es importante. Si el H_2O_2 es añadido después de la base, la rápida reacción brillante es reemplazada por una emisión mermada y lenta²²⁸.

Los *alquil ésteres de acridinio* también proporcionan reacciones quimioluminiscentes, pero de menor eficiencia que las de los fenil ésteres²²⁸.

La reducción de los *ésteres de acridinio* en ácido acético con zinc da lugar al correspondiente acridano, éste al reaccionar con una base fuerte en disolventes apróticos polares proporciona una brillante emisión quimioluminiscente. En el mecanismo de esta reacción se forma un peróxido. El rendimiento cuántico es alto, quizás por la formación directa del peróxido, excluyendo la competición con otros nucleófilos. Los ésteres de acridinio se encuentran entre los más brillantes de los compuestos orgánicos quimioluminiscentes²²⁸.

El acridano obtenido tras la reducción con Zn, es débilmente quimioluminiscente al ser oxidado con peróxido de benzoilo. El rendimiento cuántico es muy bajo. La emisión parece corresponder a la fluorescencia del catión acridinio, cuyo más bajo estado singlete excitado es significativamente de menor energía que el de la acridina por sí misma²²⁸.

Los *derivados del ácido acridina-9-carboxílico* son también quimioluminiscentes. La oxidación de la 9-metilacridina proporciona emisión de luz y se considera que esta reacción progresa según un mecanismo similar a los derivados antes mencionados²²⁸.

La acridina-9-carboxihidrazida es quimioluminiscente, proceso que puede ser debido tanto al grupo hidrazida como a la luminiscencia ya comentada de las acridinas²²⁸.

6.3. ASPECTOS ANALÍTICOS DE LAS ACRIDINAS

6.3.1. Ensayos cualitativos

Yalcindag pudo identificar diversas acridinas por los colores de reacción que presentaban con ácido nitroso, dimetilaminobenzaldehído y ácido cítrico¹⁹⁶. También se han empleado como ensayo de identificación los colores que proporciona el ión nitrito en medio sulfúrico con acriflavina y proflavin¹⁹⁷.

La fluorescencia característica de las acridinas ha servido para la detección y evaluación de estas. Neu propuso como test de identificación de acriflavina, la formación de un precipitado naranja-rojizo con óxido de tetrafenilborón. Este precipitado tiene comportamiento fluorescente cuando se somete a luz ultravioleta. La tripaflavina situada en papel de filtro y secada tiene un comportamiento fluorescente, el cual se puede reforzar mediante la adición de sorbitol. También se ha aprovechado la quimioluminiscencia que presentan estos compuestos al ser expuestos a la acción del ozono para su identificación¹⁹⁶.

6.3.2. Métodos volumétricos

El método de Hall y Powell ha sido el de uso más extendido y se ha aplicado ampliamente para el análisis de euflavina, acriflavina y proflavin. Consiste en la precipitación de las acridinas con ferricianuro, valorando el exceso de éste mediante una iodometría, tras eliminar el ferrocianuro formado con sulfato de zinc¹⁹⁶.

Otros métodos como el de Devi y Khorona, se basan en la diazotación de los grupos amino y posterior valoración con nitrito potásico utilizando yoduro-almidón como indicador. Amor y Foster determinan estas moléculas basándose en la estimación del cloruro o del nitrógeno mediante el método Kjeldahl. Hall y Powell indicaron que estos métodos podían presentar errores de hasta el 30%, siendo el propuesto por ellos o modificaciones posteriores del mismo los más utilizados¹⁹⁶.

Bollinger precipitaba las 3,6-diaminoacridinas con un exceso de ácido pícrico y valoraba el exceso de éste con azul de metileno¹⁹⁶.

Knud Jackerott propuso un método para acridinas basado en la precipitación de éstas con un exceso controlado de dicromato potásico y posterior valoración de éste exceso con yodo¹⁹⁶.

Thoma y colaboradores propusieron una metodología para derivados farmacéuticos de acridina, los cuales se valoraban con laurilsulfato sódico, y la floculación del precipitado formado marcaba el punto final¹⁹⁶.

También se han descrito valoraciones en medio no acuoso para derivados de acridina. Sing y colaboradores propusieron la valoración en medio acético con N-bromosuccinimida hasta la desaparición del color¹⁹⁶.

6.3.3. Métodos colorimétricos

Son muchos los métodos colorimétricos utilizados en la determinación de acridinas y derivados.

Reimer propuso la absorción directa del hidrocloreto de 3,6-diamino acridina en euflavina usando alcohol isopropílico como disolvente y azul de timol como indicador¹⁹⁶.

Homes empleó ácido nítrico con acriflavina y euflavina, midiendo el color rojo desarrollado, pero los resultados se veían muy afectados por la calidad del ácido nítrico utilizado¹⁹⁶.

Schulte describió un método basado en la diazotación que resulta en la formación de color violeta por adición de ácido nitroso naciente (obtenido a partir de nitrito sódico y ácido clorhídrico)¹⁹⁶.

Devi y Khorona, copulaban el proflavin diazotado con resorcinol en medio alcalino, determinando el color del compuesto formado mediante espectrofotometría. Shaw y Wilkinson describieron un método similar al anterior (proflavin diazotado formando una quinonaimina) pero empleando como agente copulante el N-(1-naftil)etilendiamina, eliminando el exceso de ácido nitroso con ácido sulfámico. Se obtiene un compuesto de coloración violeta¹⁹⁶.

Sokol determinó tripaflavina diazotando el compuesto en ambos grupos amino y utilizando el mismo agente copulante que el método anterior¹⁹⁶.

J.R. Picó y J. Martínez Calatayud describieron la formación de un compuesto violeta, al reaccionar el proflavin con ión nitrito en medio clorhídrico¹⁹⁵.

6.3.4. Métodos fluorimétricos

Bykovskaya y colaboradores emplearon la excitación selectiva láser en el análisis luminiscente para diversas moléculas orgánicas complejas, la 9-aminoacridina entre otras¹⁹⁶.

Jurgensen estudiaron los picos de excitación y emisión de gran número de compuestos, encontrándose la acridina entre las moléculas estudiadas¹⁹⁶.

Bican-Fister determinó acriflavina midiendo la intensidad de fluorescencia de una solución del analito en un tampón McIlvaine (pH 6) comparándolo con una solución estándar en el mismo tampón¹⁹⁶.

Bernanose y otros estudiaron las propiedades fluorescentes y fosforescentes de la acriflavina para su determinación cuantitativa. Señalaron que para concentraciones superiores a 10^{-5} M es aconsejable emplear la técnica de la fluorescencia y por debajo de esta concentración es recomendable emplear la fosforescencia¹⁹⁶.

6.3.5. Métodos electroanalíticos

Las valoraciones potenciométricas han sido utilizadas con éxito en las determinación de acridina y derivados, valorando estas moléculas con ácido perclórico. Los medios utilizados son solventes ácidos, en los que la acridina ve exaltada su carácter alcalino.

Ramachandra y Krishnan utilizaron ácido acético glacial como disolvente, empleando como electrodo de referencia uno de calomelanos y como indicador un electrodo de platino¹⁹⁶.

En otros trabajos se han utilizado como valorantes ácidos de Lewis tales como SnCl_4 , TiCl_4 , ZrCl_4 , AlCl_3 , FeCl_3 y como disolventes el nitrobenzono o acetonitrilo¹⁹⁶.

Espersen elaboró un método potenciométrico para la determinación de aminoacridinas-HCl en preparados farmacéuticos¹⁹⁶, en este método el tetrafenilborato era utilizado como valorante y un sistema de electrodos vidrio-Ag/AgCl. Selig empleó un electrodo indicador selectivo de fluoborato¹⁹⁶.

Matrka Miroslav usó la reacción de diazotación de la acriflavina con nitrito para proceder a la valoración potenciométrica de ésta en medio ácido mineral o acético¹⁹⁶.

También se han descrito en la bibliografía otras valoraciones potenciométricas de sales de acridina en medio no acuoso¹⁹⁶.

Aunque en menor medida que las técnicas potenciométricas, también se han utilizado las técnicas conductimétricas para la determinación de acridinas.

Bertoglio y Fulle valoraron acridina mediante conductimetría de alta frecuencia con AlBr_3 , GaBr_3 y BBr_3 ¹⁹⁶.

Se ha determinado acriflavina amperométricamente (Popovici y Schweiger), disolviendo la acriflavina en agua y añadiendo al medio HCl, acético y KBr. La valoración amperométrica se realiza con NaNO_2 ¹⁹⁶.

Las técnicas polarográficas también se han utilizado para la determinación de acriflavina, proflavin, etc., tanto en estado puro como en comprimidos; para ello se aprovecha la reacción de precipitación con K_2CrO_7 en medio acético/acetato de pH 4.8; siguiendo esta metodología se obtienen ondas polarográficas reproducibles que resultan apropiadas para la determinación de estas moléculas¹⁹⁶.

Vanickova y otros investigaron recientemente el comportamiento y la determinación de trazas de catequinas y derivados de acridina usando la técnica voltamétrica de pulso diferencial y procedimientos fluorimétricos con biosensores DNA¹⁹⁸.

Bareck y colaboradores también emplearon la voltametría de pulso diferencial para la determinación de compuestos carcinogénicos, concretamente acridina y derivados¹⁹⁹.

6.3.6. Métodos cromatográficos

En la bibliografía encontramos gran número de métodos cromatográficos para la determinación de acridinas y sus derivados, en los que se describe el uso tanto de cromatografía de gases como líquida, esta última también en capa fina.

Deleenheer y colaboradores describieron el uso de la cromatografía de gases para la determinación de derivados de la 9-aminoacridina. Grimmer empleó también esta técnica para la determinación de compuestos aromáticos policíclicos de comportamiento carcinogénico que se encuentran en muestras ambientales¹⁹⁶.

También se han analizado acridinas en restos de incendio de edificios prefabricados (Sturaro y otros) mediante la técnica GC-MS aplicada a los extractos toluénicos de estos restos²⁰⁰.

Polyakova y otros describen una metodología para determinar compuestos con heteroátomos en petróleo, entre otros las acridinas. Los concentrados de estos compuestos básicos se analizan mediante GC-MS²⁰¹.

Carlsson y Ostman describen la separación y aislamiento de acridinas y carbazoles en matrices de disolventes por HPLC, mediante el empleo de Kieselgel 60 en columna de vidrio, separan los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los compuestos heterocíclicos de nitrogénos policíclicos aromáticos eluyendo con diferentes mezclas disolventes, determinando las acridinas mediante HPLC²⁰².

Mao y otros, determinaron benzoquimolinas y acridinas en combustible diesel del Brasil, el método implica extracciones en medio ácido y ajustes de pH. El extracto final en metanol es analizado por HPLC empleando diversas fases móviles²⁰³.

Strozyk y Warzecha realizaron la determinación de acridinas mediante la técnica HPLC-UV empleando diversos tipos de rellenos y fase móviles con gradiente de elución²⁰⁴.

Legaz y otros, determinaron naranja de acridina en ácidos nucleicos aislados de la *Himantormia lugubris thalli* por HPLC y detección fluorimétrica²⁰⁵.

Durante los años 60 y 70 se describieron varios métodos de determinación de acridinas y derivados empleando cromatografía en capa fina y en papel, y algunas de estos trabajos combinaban estas técnicas con el análisis fluorescente para la detección de pequeñas cantidades de estos compuestos.

En general, podemos decir que las técnicas cromatográficas han sido útiles en la determinación de acridinas y derivados de ellas. Mediante técnicas GC se han descrito metodologías para la determinación de acridinas en la atmósfera y en productos de licuefacción y destilación del carbón. Empleando la técnica HPLC se han podido determinar derivados de acridina tanto en tejidos humanos como de otros mamíferos.

6.3.7. Métodos quimioluminiscentes

Recientemente y en el mismo laboratorio donde se ha desarrollado esta tesis, Martínez Calatayud y colaboradores han desarrollado una metodología FIA para la determinación de acriflavina y proflavin basándose en su comportamiento quimioluminiscente al reaccionar con KMnO_4 en medio ácido sulfúrico. Este método ha sido aplicado en la determinación de estos compuestos en aguas residuales²⁰⁶.

6.3.8. Uso de las acridinas como reactivos analíticos

Las acridinas han sido utilizadas como reactivos en Química Analítica, si bien su uso como tales ha sido mucho más amplio y relevante en bioquímica, farmacia y medicina.

Los trabajos más antiguos que aparecen en la bibliografía describen el uso de las acridinas circunscritas únicamente a volumetrías y gravimetrías, posteriormente se ha ido extendiendo su uso a métodos de absorción UV-VIS, fluorimétricos y quimioluminiscentes más recientemente.

En el análisis cualitativo de cationes metálicos, el uso de los derivados de acridina ha sido útil por la formación de precipitados y compuestos coloreados que facilitaban una rápida identificación¹⁹⁶.

Las acridinas han sido utilizadas como indicadores fluorescentes en diferentes tipos de volumetría. Incluso se ha empleado la tripaflavina como valorante, detectándose el punto final por la fluorescencia originada por la primera gota en exceso de la misma. También, se han empleado estos derivados como indicadores de absorción en valoraciones de plata con haluros o con rodamina¹⁹⁶.

La acriflavina ha tenido entre otras aplicaciones la de indicador interno en las valoraciones con nitrito, usándose también con éxito en las valoraciones de miembros de la familia de sulfanilamidas por diazotación con nitrito¹⁹⁶.

Se han descrito numerosos métodos de determinación colorimétrica como la determinación indirecta de antimonio, donde el complejo formado entre SbI_4^- y acridina libera yodo con HNO_3 y CCl_4 , midiendo la absorbancia a 530 nm¹⁹⁶.

Moléculas orgánicas como el nitrazol, nitroglicerina, cafeína y otras han sido analizadas mediante determinación espectrofotométrica con proflavin o flavacridina en medio HCl, previa transformación a la forma de nitritos¹⁹⁶.

El fósforo se ha determinado mediante colorimetría con naranja de acridina, midiendo la absorbancia del par iónico naranja de acridina-ácido fosfomolibdico en acetona¹⁹⁶.

Aly y colaboradores, han desarrollado recientemente un método espectrofotométrico para la determinación de uranio con amarillo de acridina. Las soluciones estándar de uranio en medio sulfúrico diluido con benzoato sódico y amarillo de acridina son extraídas con dicloroetano/acetato isoamílico. La absorbancia de la fase orgánica se mide a 450 nm²⁰⁷.

En general se han aplicado las acridinas para la determinación de muchos iones inorgánicos empleando métodos analíticos basados en la absorción en el UV-VIS.

Las técnicas fluorimétricas presentan especial importancia en las aplicaciones analíticas de las acridinas, las cuales han sido utilizadas principalmente en la determinación de iones metálicos. Grigoryan y colaboradores determinaron oro en cantidades de microgramos mediante extracción de los pares iónicos formados entre tetracloroaurato y una acridina, como acriflavina, naranja de acridina o amarillo de acridina^{196, 208}.

Recientemente se ha aplicado el amarillo de acridina en la determinación de Fe en aguas y cabello por Bao y colaboradores, los cuales han realizado un estudio de la transferencia de energía en un proceso de amortiguación de la fluorescencia por mezclado de amarillo de acridina con 4-(2-piridilazo)-resorcinol²⁰⁹.

Pérez Ruiz y colaboradores han estudiado la fotooxidación de la acridina y del amarillo de acridina en presencia de Fe(III) para la determinación de microcantidades de Fe(III), F⁻ y PO₄³⁻. La decoloración de la acridina y del amarillo de acridina en presencia de Fe(III) se efectúa por irradiación a longitudes de onda inferiores a 360 nm, y en presencia de oxígeno, el Fe actúa como catalizador en el proceso fotoquímico. Esta propiedad se usa como base para determinar trazas de los aniones citados, F⁻ y PO₄³⁻, que inhiben la fotooxidación catalizada por Fe de las acridinas)²¹⁰.

Goryacheva y otros han estudiado la posibilidad de la determinación selectiva de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante fosforescencia. Las moléculas tripaflavina, amarillo de acridina y naranja de acridina se usaron como dadores de energía y los hidrocarburos aromáticos policíclicos como receptores, siendo necesaria la presencia de Tl(I)²¹¹.

Zhang y colaboradores han desarrollado un método fluorimétrico para la determinación de ácidos nucleicos. Este método está basado en el equilibrio dímero-monómero del amarillo de acridina. Esta molécula en un medio micelar aniónico forma un dímero sin propiedades fluorescentes y la adición de DNA libera el amarillo de acridina en su forma de monómero, el cual sí proporciona una señal fluorescente, que se utiliza como señal analítica²¹².

M. Catalá Icardo y J. Martínez Calatayud han descrito la determinación indirecta de ión nitrito basándose en la quimioluminiscencia obtenida en la oxidación de acriflavina en medio sulfúrico. La presencia de ión nitrito afecta al proceso quimioluminiscente inhibiéndolo. La detección se realiza en un luminómetro acoplado a un montaje FIA²¹³.

Entre otras aplicaciones de las acridinas se puede incluir la caracterización de compuestos húmicos con acriflavina, separación cromatográfica de oligonucleótidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, separación de mezclas de purinas y pirimidinas,

nucleósidos y nucleótidos, piridina, flavinas y aminoácidos aromáticos. Estas moléculas también tienen su aplicación en el análisis de DNA y de proteínas, ya que han sido utilizadas en métodos de tinción rápida.

6.4. CONECTIVIDAD MOLECULAR Y PREDICCIÓN DE PROPIEDADES

Esta última parte de la tesis pasa a integrarse en los estudios que se realizan desde hace unos años sobre predicción y desarrollo de nuevos métodos quimioluminiscentes para el análisis de productos orgánicos, básicamente fármacos y pesticidas.

El estudio de predicción de propiedades de compuestos basado en *Conectividad Molecular* radica en los índices topológicos como variables fundamentales de las que dependen el resto de propiedades moleculares. Una vez calculados los índices de conectividad molecular, estos se pueden correlacionar con distintas propiedades, obteniendo así las ecuaciones llamadas funciones de conectividad, que nos permiten predecir los teóricos valores de las propiedades correlacionadas para nuevos compuestos. Aunque originariamente el método fue aplicado a la predicción de propiedades físicas y químicas de las moléculas (Kier, 1976) (Radic, 1983) (Gálvez, 1987), diversos autores han llegado a resultados muy sugerentes en cuanto a la capacidad predictiva de propiedades biológicas. Por ejemplo, se han hallado dependencias entre los índices de conectividad y la unión a proteínas celulares de un grupo de pesticidas (Murakami, 1985).

Por su parte Kier y May han correlacionado una amplia variedad de propiedades biológicas y farmacológicas (Kier, 1976), llegando en algunos casos, a notables concordancias entre valores teóricos y experimentales. Particularmente interesantes son los trabajos de aplicación al estudio de fármacos, reseñado por Kier y Hall.

Es precisamente la aplicación al diseño de fármacos, uno de los campos donde la Conectividad Molecular ha obtenido importantes aportaciones. El grupo dirigido por el Dr. Gálvez Álvarez (Facultad de Farmacia-Universidad de Valencia) ha descrito aplicaciones de este método de diseño molecular en el campo de analgésicos, antibacterianos, antifúngicos, hipoglucemiantes, antivíricos y antineoplásicos.

Es de destacar el carácter altamente competitivo de la topología molecular en el diseño de fármacos frente a otras corrientes de búsqueda y diseño asistido por ordenador, tales como algunos métodos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) que emplean descriptores físico-químicos, métodos mecanocuánticos o de modelización molecular. Aunque algunos de los procedimientos mencionados poseen una extraordinaria precisión en la obtención de datos moleculares y un gran vigor teórico, necesitan conocer con detalle cuál es el mecanismo de acción farmacológica del fármaco que se pretende diseñar, particularmente cuando se trata de obtener un nuevo cabeza de serie. Cuando se trata de encontrar éste, sin conocer la estructura de su receptor, los métodos antes descritos tienen una eficacia muy limitada.

Dentro de este campo de la conectividad molecular cabe destacar la bibliografía existente relacionando la conectividad molecular con la actividad de la estructura química de las moléculas, así como publicaciones en el área farmacológica²²²⁻²²⁴.

6.4.1. Quimioluminiscencia del sistema amarillo de acridina-MnO₄⁻ en medio ácido

La búsqueda de analitos que den lugar a reacciones quimioluminiscentes lleva asociados procedimientos sistemáticos ensayo-error que consumen mucho tiempo, son costosos y exigen disponer de considerable número de sustancias a ensayar. Sin embargo, es posible aplicar métodos de diseño molecular para la predicción de distintas propiedades de las sustancias. El postulado principal de cualquier método de diseño molecular es que las propiedades macroscópicas o microscópicas de un compuesto químico dependen de su estructura. Los métodos convencionales al uso emplean variables físicas o geométricas para describir la estructura molecular. La topología molecular, aplicada a las moléculas, estudia sin embargo las posiciones e interconexiones de los átomos dentro de ellas. El método topológico emplea los llamados índices topológicos para caracterizar estructuralmente de manera única a un compuesto; así se pueden enunciar ecuaciones que relacionan tales propiedades con la estructura molecular caracterizada a través de sus índices. Estas ecuaciones se conocen como funciones de conectividad.

Las relaciones de conectividad pueden utilizarse de forma inversa a la convencional, ya que sirven para predecir la propiedad y de este modo poder sintetizar sustancias que cumplan con ese requisito. Este último, es precisamente el aspecto más interesante de los índices topológicos, ya que al ser una traducción algebraica de la estructura molecular de un compuesto, pueden también emplearse en el diseño de compuestos con propiedades preestablecidas. En este sentido, se propuso un desarrollo matemático basado en la conectividad molecular para predecir con finalidad analítica compuestos orgánicos determinables por quimioluminiscencia.

Las tareas de predicción corren paralelas en su desarrollo al estudio experimental, que confirma el grado de validez de las predicciones. En un estudio anterior se realizó un “screening” sobre unos doscientos compuestos orgánicos. En la

familia de las acridinas se predijeron con alto grado de probabilidad (lo que indica una relativamente fuerte intensidad de emisión) la quimioluminiscencia de varias diaminoacridinas (amarillo de acridina, proflavin y acriflavina) que en estudios experimentales anteriores se catalogaron como no quimioluminiscentes o con quimioluminiscencia tan baja que no sería aprovechable. También se predijó, aunque en menor grado de probabilidad, la quimioluminiscencia del naranja de acridina.

El presente estudio trata de aprovechar este comportamiento para desarrollar una metodología para el análisis del amarillo de acridina. Dada la gran sensibilidad encontrada en los métodos basados en la quimioluminiscencia, se pretende obtener un método rápido y que proporcione un límite de detección bajo. La determinación de amarillo de acridina tiene interés per se, no obstante también resultan interesantes las posibles aplicaciones de esta metodología como análisis indirecto de otras especies químicas.

PARTE EXPERIMENTAL

6.5. ENSAYOS PREVIOS

6.5.1. Estudio de la elección del oxidante

El amarillo de acridina forma una especie quimioluminiscente tras sufrir una oxidación.

El trabajo experimental se inició para confirmar y optimizar qué oxidante es el más adecuado de los utilizados en el “screening” previo. Para este estudio se empleó como analito una disolución de 20 ppm de amarillo de acridina.

Los sistemas oxidantes estudiados, elegidos entre los oxidantes fuertes más habituales, fueron los siguientes :

- 1) KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / H_2SO_4 2.50 M
- 2) Ce (IV) $3 \cdot 10^{-4}$ M / H_2SO_4 2.500 M
- 3) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $3 \cdot 10^{-4}$ M / H_2SO_4 2.500 M
- 4) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $3 \cdot 10^{-3}$ M / NaOH 0.500 M
- 5) H_2O_2 3.3% p/p
- 6) H_2O_2 3.3% p/p + NaClO 0.5% p/v

Este estudio se realizó en un montaje sin utilizar válvula de inyección, ni canal portador, sino que únicamente se emplearon los canales correspondientes al reactivo y a la muestra. En la unión de ambos canales se produciría la reacción y el producto

quimioluminiscente originado se dirigía directamente al detector. Con este montaje simplificado no se obtendrían picos FIA sino “escalones de señal”.

El montaje utilizado se muestra en la figura (6.4.), siendo el caudal de 2.4 ml/min en ambos canales.

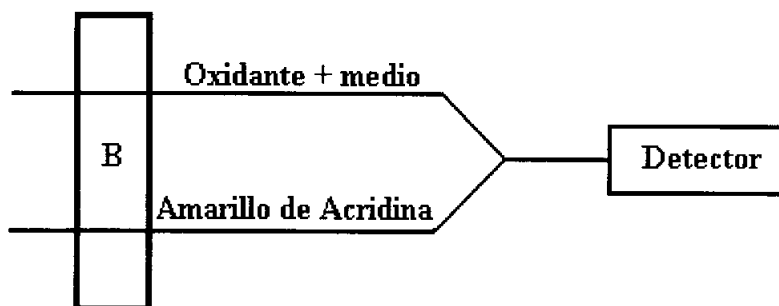


Figura 6.4.

B : bomba peristáltica

No obstante, para sistemas de reactivos incompatibles frente al tiempo como la mezcla oxidante nº6 (H_2O_2 3.3% p/p + $NaClO$ 0.5% p/v) se empleó el montaje que se muestra en la figura 6.5. El caudal fue de 2.4 ml/min en todos los canales.

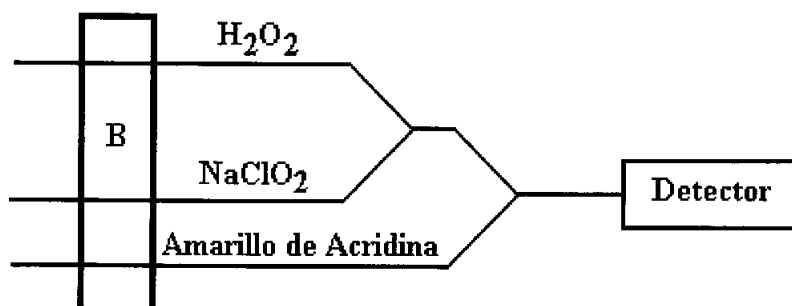


Figura 6.5.

B : bomba peristáltica

Con este montaje alternativo se consiguió que al reaccionar el H_2O_2 con el NaClO se generará oxígeno espontáneamente y se podía estudiar el efecto del mismo.

Tras realizar el estudio, pudimos constatar que de todos los sistemas experimentados, únicamente la mezcla reactiva KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / H_2SO_4 2.500 M producía señal quimioluminiscente.

Considerando la experiencia adquirida anteriormente y los resultados obtenidos, el oxidante seleccionado es por tanto el KMnO_4 , el cual reacciona adecuadamente con el amarillo de acridina en medio ácido, el ácido sulfúrico en el caso estudiado. El siguiente paso fue la elección del medio más adecuado para el KMnO_4 en la mezcla reactiva.

6.5.2. Estudio de la elección del medio

Esta fase se realiza en el montaje FIA que se representa en la figura 6.6., en el que se inserta la disolución de amarillo de acridina. Se selecciona esta configuración, pues existía la experiencia en el laboratorio con sistemas similares, de ser la opción más favorable.

Los medios estudiados fueron:

- 1) KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / HNO_3 2.500 M
- 2) KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / HClO_4 2.500 M
- 3) KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / H_2SO_4 2.500 M
- 4) KMnO_4 $3 \cdot 10^{-4}$ M / NaOH 1.000 M

La muestra consistió en una disolución de 1 ppm de amarillo de acridina. El caudal empleado fue de 5.3 ml/min en todos los canales. El volumen de muestra ensayado era de 1610 μ l.

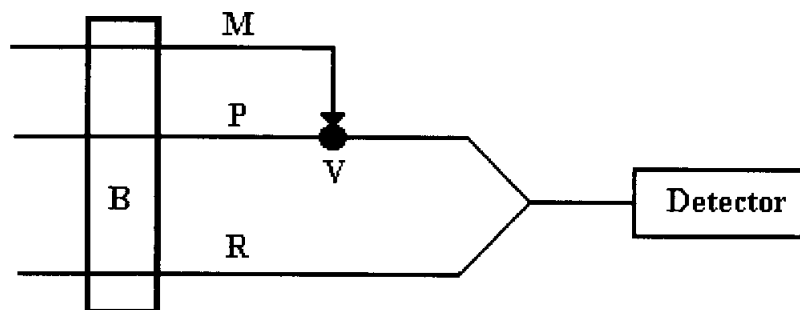


Figura: 6.6.

B : bomba peristáltica, V : válvula de inyección,
M : canal de la muestra, P : canal del portador (agua), R : canal del reactivo.

El canal de la muestra (M) era una disolución acuosa de 1 ppm de amarillo de acridina, por el canal del portador (P) circulaba agua y en el canal del reactivo (R) se encontraban las diversas mezclas reactivas de KMnO_4 y ácido a estudiar.

Los datos correspondientes a las señales analíticas se muestran en la siguiente tabla.

medio reactivo	Señal (kHz)
$\text{KMnO}_4 3 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{HNO}_3 2.500 \text{ M}$	2.0
$\text{KMnO}_4 3 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{HClO}_4 2.500 \text{ M}$	1.9
$\text{KMnO}_4 3 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{H}_2\text{SO}_4 2.500 \text{ M}$	2.7
$\text{KMnO}_4 3 \cdot 10^{-4} \text{ M} / \text{NaOH} 1.000 \text{ M}$	-

Tabla 6.1.: Estudio del medio. 1ªExperiencia

Podemos apreciar que es necesario la existencia de un medio ácido para que la reacción quimioluminiscente tenga lugar, puesto que la mezcla reactiva de KMnO_4 con NaOH no proporciona señal analítica. Los señales obtenidas tanto en medio nítrico como perclórico son similares e inferiores a las proporcionadas por el sulfúrico, el cual parece ser la mejor opción en las concentraciones estudiadas. No obstante y antes de descartar los otros ácidos se decidió repetir esta experiencia pero trabajando a diversas concentraciones de los diferentes ácidos a estudiar. Para ello se fijó la concentración de KMnO_4 en $3 \cdot 10^{-4}$ M y el intervalo de concentraciones estudiado para los ácidos así como los resultados se recogen en la tabla 6.2.

$[\text{H}_2\text{SO}_4]$ M	Señal (kHz)	$[\text{HNO}_3]$ M	Señal (kHz)	$[\text{HClO}_4]$ M	Señal (kHz)
3.000	1.2	5.000	1.0	2.500	1.4
2.500	1.5	2.500	1.6	0.500	3.0
0.500	1.9	0.500	3.2	0.100	3.3
0.100	2.8	0.010	3.3	0.070	3.9
0.050	1.4			0.040	3.8
				0.010	1.9

Tabla 6.2.: Estudio del medio. 2ª experiencia.

Los mejores resultados para el ácido sulfúrico se obtienen en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.100 - 0.500 M. En el caso del nítrico, las concentraciones que proporcionan mejor señal se encuentran en el intervalo 0.010 - 0.500 M y finalmente, para el perclórico el intervalo más adecuado sería el comprendido entre 0.040 - 0.070 M.

Tras lo visto, se decide estudiar estos intervalos de concentraciones seleccionadas con más detalle, para proceder a la elección del ácido y la concentración más adecuada de manera conjunta.

Las concentraciones de cada ácido estudiadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.3.

[H ₂ SO ₄] M	Señal (kHz)	[HNO ₃] M	Señal (kHz)	[HClO ₄] M	Señal (kHz)
0.500	2.5	0.300	2.0	0.070	2.2
0.300	2.1	0.100	2.8	0.050	2.2
0.100	3.2	0.010	1.2	0.030	1.8

Tabla 6.3. : Estudio del medio. 3ª experiencia.

No se han probado concentraciones de ácido perclórico superiores a 0.070 M, ya que en la experiencia anterior, se vió que estas proporcionaban menor señal analítica. En el caso del ácido nítrico, no se han estudiado concentraciones de ácido superiores a 0.300 M, puesto que se producía una disminución en la señal.

La mejor respuesta analítica la hemos obtenido empleando ácido sulfúrico a la concentración de 0.100 M. Por tanto, se seleccionan estas condiciones para posteriores experiencias.

Conviene señalar que la respuesta proporcionada por el luminómetro, sobretodo en las experiencias previas, varía para diferentes jornadas de trabajo, esa es la razón de las diferentes valores obtenidos para las mismas concentraciones de ácido en las tablas 6.2. y 6.3.

6.5.3. Optimización de la concentración de oxidante

Hasta ahora la concentración empleada de KMnO₄ ha sido 3·10⁻⁴ M. En el presente estudio se trata de seleccionar la concentración de KMnO₄ que proporcione mayor señal analítica, una vez que ya se ha fijado el medio ácido más adecuado.

Se empleó el montaje FIA que se muestra en la figura 6.3. Siendo el portador una disolución de H_2SO_4 0.100 M y el reactivo empleado son disoluciones acuosas de KMnO_4 de diferentes concentraciones en medio H_2SO_4 0.100 M.

Las condiciones FIA fueron las mismas empleadas en anteriores experiencias y las concentraciones de oxidante estudiadas fueron : $5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M, $3 \cdot 10^{-4}$ M, $1 \cdot 10^{-3}$ M, estas junto con los resultados obtenidos se aprecian en la tabla 6.4.

[KMnO ₄] M	Señal (kHz)
$5 \cdot 10^{-5}$	6.0
$1 \cdot 10^{-4}$	5.6
$3 \cdot 10^{-4}$	2.7
$1 \cdot 10^{-3}$	1.0

Tabla 6.4. : Optimización de la concentración de oxidante.

Estos datos se representan gráficamente en la figura 6.7. :

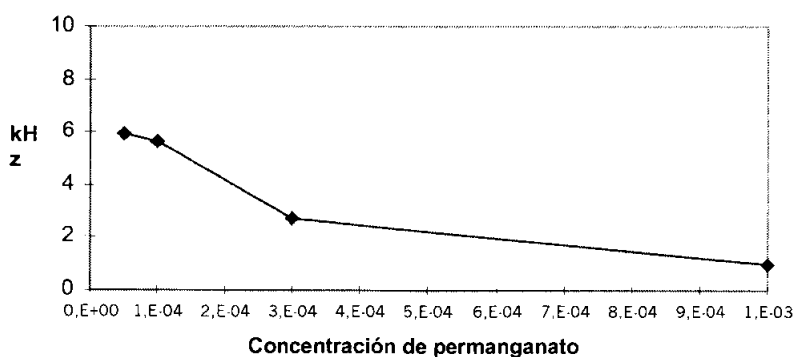


Figura 6.7. : Optimización de la concentración de oxidante.

Se puede apreciar parece estabilizarse la respuesta en concentraciones por debajo de $1 \cdot 10^{-4}$ M. Se decide tomar como valor óptimo $7 \cdot 10^{-5}$ M para la concentración de MnO_4^- , ya que esta concentración se encontraría en la zona de máxima señal.

6.5.4. Estudio de la composición de canales

Tras la selección efectuada del medio ácido y el oxidante adecuados, así como la optimización de las concentraciones de los mismos a emplear; se procede ahora a realizar un estudio del orden de adición de los reactivos en el montaje FIA final. La ubicación de los diversos componentes químicos en los canales del montaje FIA podrá afectar a la señal del luminómetro, ya que la mezcla de reactivos en un momento u otro del proceso modifica sensiblemente el comportamiento químico-cinético de la reacción.

En la figura 6.8. se representa el montaje FIA a configurar.

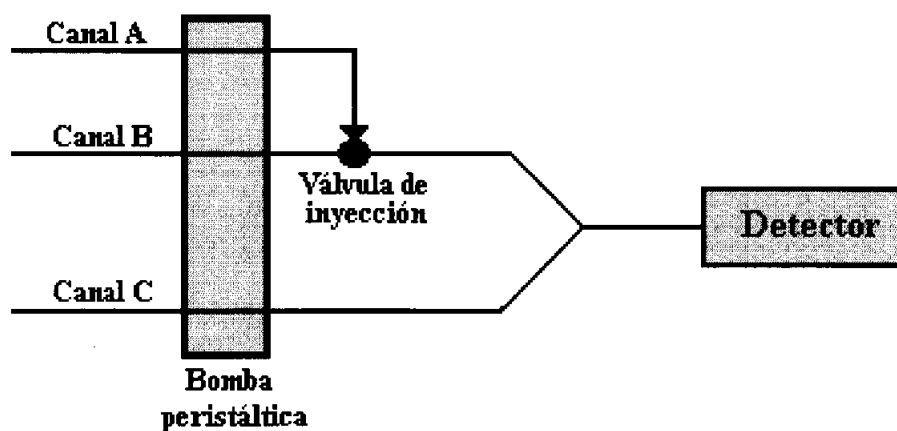


Figura 6.8. : Montaje FIA para el estudio de la composición de los canales.

El canal A es el canal de la muestra, el canal B es el correspondiente al portador y el canal C al oxidante.

Las diferentes combinaciones estudiadas para las disoluciones se detalla a continuación :

Combinación (1) :

canal A : 1 ppm de amarillo de acridina / H₂SO₄ 0.100 M

canal B : H₂SO₄ 0.100 M

canal C : MnO₄⁻ 7·10⁻⁵ M / H₂SO₄ 0.100 M

Combinación (2) :

canal A : 1 ppm de amarillo de acridina en agua

canal B : H₂SO₄ 0.100 M

canal C : MnO₄⁻ 7·10⁻⁵ M / H₂SO₄ 0.100 M

Combinación (3) :

canal A : 1 ppm de amarillo de acridina en agua

canal B : Agua

canal C : MnO₄⁻ 7·10⁻⁵ M / H₂SO₄ 0.100 M

Los resultados obtenidos para cada combinación se muestran en la tabla 6.5.

	Señal analítica (kHz)	Valor medio (kHz)
<i>Combinación (1)</i>	11.2	11.1
	11.2	
	10.8	
	11.1	
	11.1	
<i>Combinación (2)</i>	16.8	17.6
	17.3	
	18.5	
	17.8	
<i>Combinación (3)</i>	7.4	8.1
	7.9	
	8.3	
	8.2	
	8.7	

Tabla 6.5. : Estudio composición de canales.

La combinación 2, en la que se produce la adición sucesiva de ácido y oxidante, es claramente la que mejor resultados proporciona. En todas las experiencias que se realicen a partir de ahora se mantendrá esta disposición en el orden de adición de los reactivos.

6.6. PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

Seleccionadas las concentraciones de MnO_4^- y ácido se pasó a la optimización de los parámetros FIA. A continuación se estudió la posible adición de compuestos que exaltaran la señal quimioluminiscente.

6.6.1. Optimización del caudal

Empleando las concentraciones de ácido y oxidante establecidas anteriormente, así como la combinación que demostró ser la más adecuada, se procede ahora, a la optimización de los caudales de portador y oxidante. La muestra fue una disolución acuosa de 1 ppm de amarillo de acridina.

El intervalo de caudales estudiado fue 3.9 - 7.9 ml/min, se modificaba a la vez los caudales de portador y oxidante. No se consideró necesario variar la relación de caudales portador/oxidante, puesto que esto haría variar las condiciones químicas ya optimizadas.

Los datos obtenidos en esta experiencia se pueden apreciar en la tabla 6.6.

Caudal (ml/min).	Señal (kHz)
3.9	11.5
5.6	14.1
6.5	21.3
7.2	17.0
7.9	17.5

Tabla 6.6 : Optimización del caudal.

La representación gráfica de estos datos se muestra en la figura 6.9.

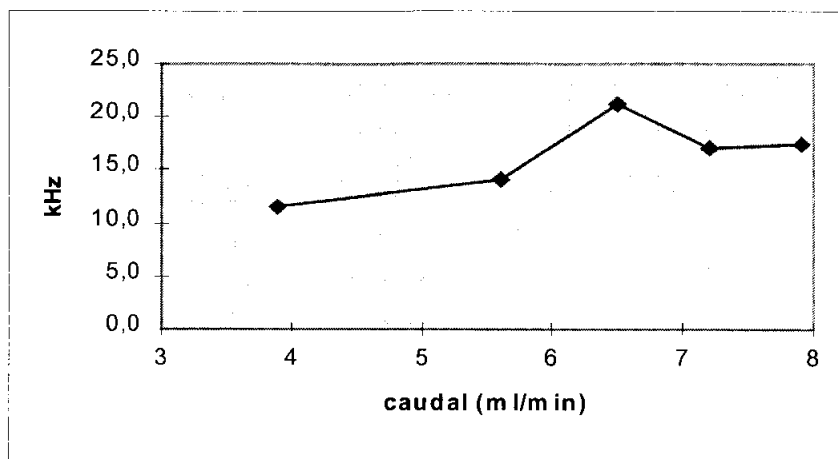


Figura 6.9. : Influencia del caudal.

Se aprecia claramente que la señal analítica aumenta con el caudal desde 3.9 a 6.5 ml/min. que se corresponde con la máxima señal obtenida. Aumentando el caudal (valores 7.2 y 7.9 ml/min.) la señal decrece. Por tanto se selecciona como valor óptimo para el caudal el valor de 6.5 ml/min.

El caudal es un parámetro crítico en quimioluminiscencia, puesto que es el factor que “obliga” a que el grueso de la reacción se realice en la celda de flujo. Caudales bajos dejan que la reacción ocurra antes de entrar en la celda y caudales demasiado altos tienen el efecto contrario, la reacción ocurre a la salida de la celda.

6.6.2. Optimización del volumen de muestra

Una vez seleccionado el caudal más adecuado, se procedió a la optimización del volumen de muestra. Para ello se efectuaron inyecciones de 1 ppm de amarillo de acridina, manteniendo todas las condiciones FIA y químicas establecidas en experiencias anteriores, y variando únicamente el volumen de muestra.

El intervalo estudiado fue de 126 a 1755 μl . Los datos que se obtuvieron tras efectuar la experiencia quedan reflejados en la tabla 6.7.

Volumen de muestra (μl)	Señal (kHz)
126	6.4
236	11.0
393	11.6
518	12.7
628	14.9
785	15.4
1021	17.8
1147	17.7
1755	18.0

Tabla 6.7. : Influencia del volumen de muestra.

La representación gráfica de estos datos se encuentra en la figura 6.10.

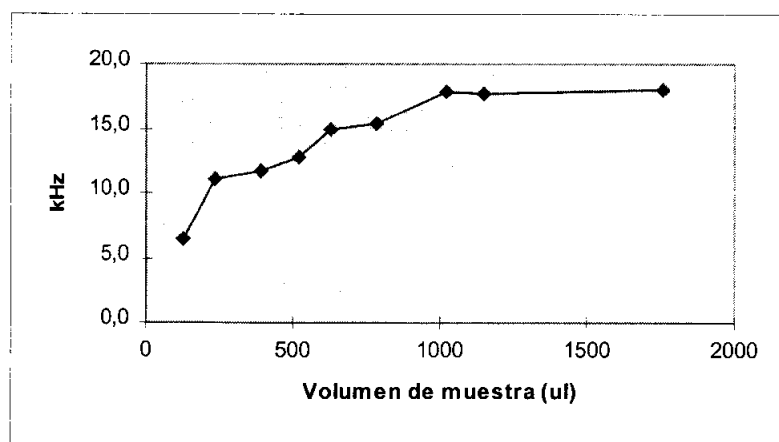


Figura 6.10. : Influencia del volumen de muestra.

Se aprecia claramente que a partir de 1021 μl la señal se estabiliza, es decir mayor volumen de muestra no produce un incremento apreciable de la señal. Conviene mencionar también que a valores superiores a 1021 μl los picos se hacen dobles, efecto

que aparece cuando la mezcla analito-reactivo no se llega a homogeneizar totalmente y el centro del “bolo” de muestra es distinto a los extremos. Suele ser claramente imputable a volúmenes grandes de muestra. En este momento el medio ácido del portador puede ser la variable responsable de que el centro y los extremos del “bolo” sean distintos.

6.6.3. Influencia de los agentes tensioactivos

Los medios organizados (agentes tensioactivos) pueden aumentar la intensidad de la emisión quimioluminiscente²¹⁴⁻²¹⁵ al proteger a la especie emisora de luz de mecanismos de relajación no radiantes. Por esta razón se ensayaron distintos tipos de tensioactivos, basándose en datos bibliográficos y en trabajos anteriores. Estos tensioactivos fueron: dodecil sulfato sódico (SDS) (aniónico), cloruro de hexadecilpiridinio (HD) (catiónico) y Triton X-100[®] (no iónico).

En esta primera experiencia el tensioactivo se añadía a la disolución de amarillo de acridina. Se empleó una disolución de 1 ppm de analito como referencia y se prepararon a su vez los tensioactivos en agua de forma que las concentraciones en la muestra fueran superiores a su c.m.c. (*concentración micelar crítica*), para poder determinar su influencia en la señal analítica.

Las concentraciones de tensioactivos fueron :

Dodecil sulfato sódico $8.1 \cdot 10^{-3}$ M.

Hexadecil piridinio $9 \cdot 10^{-4}$ M.

Tritón X-100 $3.1 \cdot 10^{-3}$ M.

Se apreció claramente que el uso de estas moléculas a estas concentraciones inhibía la señal quimioluminiscente. Es el Tritón X-100 el que menor influencia

negativa tenía sobre la señal analítica, siendo el dodecil sulfato sódico el que más influyó en la inhibición de respuesta.

Los datos analíticos obtenidos aparecen en la tabla 6.8.

	Señal (kHz)
amarillo de acridina 1 ppm	13.6
amarillo de acridina 1 ppm + Dodecil sulfato sódico $8.1 \cdot 10^{-3}$ M	0.85
amarillo de acridina 1 ppm + Hexadecil piridinio $9 \cdot 10^{-4}$ M	3.2
amarillo de acridina 1 ppm + Tritón X-100 $3.1 \cdot 10^{-3}$ M	10.1

Tabla 6.8. Influencia de los agentes tensioactivos.

Los estudios realizados con estos tensioactivos a concentraciones menores de las expuestas en la tabla 6.8., tampoco proporcionaron resultados positivos, ya que en ningún momento se produjo una exaltación de señal analítica.

6.6.4. Influencia de la presencia de sustancias sensibilizadoras

En ciertas reacciones quimioluminiscentes²¹⁶⁻²¹⁹ se han utilizado compuestos fluoróforos como reactivos para la transferencia de energía de la especie excitada en la reacción; de este modo la radiación emitida procede del fluoróforo o sensibilizador. Por ello, se realizó un estudio para ver la influencia de la presencia de sensibilizadores en el sistema analítico.

Los sensibilizadores ensayados fueron: rodamina B, riboflavina, ácido fórmico y sulfato de quinina.

La experiencia realizada es similar a la efectuada con los tensioactivos, estas moléculas se encontraban en la disolución de muestra conjuntamente con el amarillo de acridina. Las disoluciones estudiadas y sus resultados se muestran en la tabla 6.9., 6.10, 6.11. y 6.12.

	Señal (kHz)
amarillo de acridina 1 ppm	14.5
Rodamina B 0.025 M	10.4
amarillo de acridina 1 ppm + Rodamina B 0.025 M	13.3

Tabla 6.9. Influencia de la rodamina B

	Señal (kHz)
Amarillo de acridina 1 ppm	16.7
Riboflavina $2.5 \cdot 10^{-5}$ M	-
Riboflavina $1.25 \cdot 10^{-4}$ M	-
Amarillo de acridina 1 ppm + Riboflavina $2.5 \cdot 10^{-5}$ M	17.9
Amarillo de acridina 1 ppm + Riboflavina $1.25 \cdot 10^{-4}$ M	18.0

Tabla 6.10.: Influencia de la riboflavina.

	Señal (kHz)
Amarillo de acridina 1 ppm	7.41
HCOOH $1 \cdot 10^{-2}$ M	6.2
HCOOH $5 \cdot 10^{-4}$ M	5.4
HCOOH $1 \cdot 10^{-5}$ M	6.1
Amarillo de acridina 1 ppm + HCOOH $1 \cdot 10^{-2}$ M	-
Amarillo de acridina 1 ppm + HCOOH $5 \cdot 10^{-4}$ M	-
Amarillo de acridina 1 ppm + HCOOH $1 \cdot 10^{-5}$ M	-

Tabla 6.11.: Influencia del ácido fórmico.

	Señal (kHz)
Amarillo de acridina 1 ppm	13.7
Sulfato de Quinina $1 \cdot 10^{-5}$ M	4.1
Amarillo de acridina 1 ppm + Sulfato de Quinina $1 \cdot 10^{-5}$ M	22.5
Amarillo de acridina 1 ppm + Sulfato de Quinina $1 \cdot 10^{-6}$ M	16.8

Tabla 6.12.: Influencia del sulfato de quinina.

La rodamina B por sí sola proporcionó una señal considerable. Con la inyección de la disolución de amarillo de acridina y rodamina se obtuvo una señal analítica inferior a la suma de las señales de la rodamina B y del amarillo de acridina a las mismas concentraciones. Por otra parte, si eliminamos el oxidante del medio reactivo, la rodamina B no proporciona señal alguna. Cabría pensar que se produce un consumo del oxidante por reacción con la rodamina, de tal manera que la señal analítica es inferior a lo previsto.

Las inyecciones de riboflavina no proporcionaron señal analítica. Las inyecciones de las disoluciones conjuntas de riboflavina y amarillo de acridina proporcionaron una señal prácticamente igual a la del amarillo de acridina por sí solo.

Se desestima el uso de la rodamina B, riboflavina y ácido fórmico como sensibilizadores, ya que no producen el incremento de respuesta analítica deseado, o bien inhiben la señal.

Parece que el sulfato de quinina exalta ligeramente la señal quimioluminiscente. Se decide por tanto, seguir estudiando el comportamiento del sulfato de quinina, pero variando las concentraciones de oxidante. Se pretende que el efecto del sensibilizador se vea incrementado.

Las concentraciones de oxidante estudiadas y su efecto en la señal analítica se refleja en tabla 6.13. La concentración de amarillo de acridina fue de 1 ppm y la de sulfato de quinina de $2.5 \cdot 10^{-5}$ M

Conc. MnO_4^- (M)	Señal (kHz) Amarillo de acridina	Señal (kHz) Amarillo de acridina + Sulfato de quinina	$\Delta\%$
$7 \cdot 10^{-5}$	25.5	24.9	-2.4
$1 \cdot 10^{-4}$	24.3	23.4	-3.9
$2.8 \cdot 10^{-4}$	12.6	13.7	8.2
$5.6 \cdot 10^{-4}$	8.2	8.3	1.3

Tabla 6.13.: Efecto del sulfato de quinina a diversas concentraciones de oxidante.

Se desestima el uso del sulfato de quinina como fotosensibilizador, ya que no produce el incremento de respuesta analítica deseado.

6.7. SISTEMA FIA OPTIMIZADO

La configuración definitiva del sistema FIA para la determinación de amarillo de acridina por quimioluminiscencia, es la que se muestra en la figura 6.11.

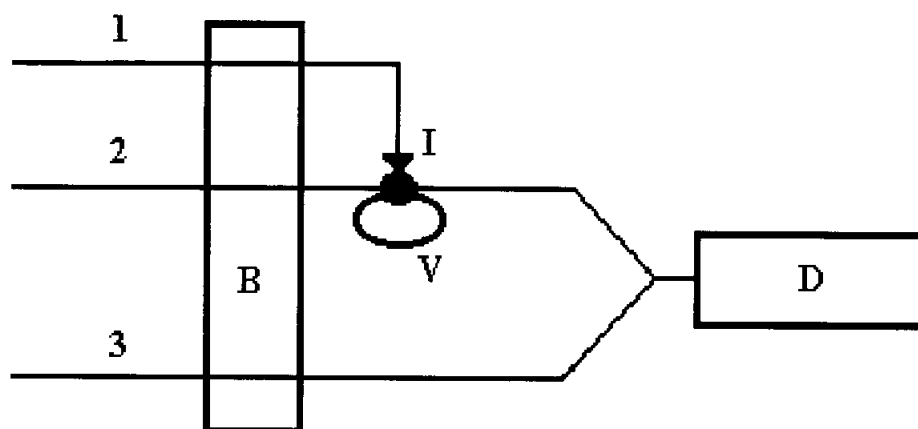


Figura 6.11.: Configuración definitiva del sistema FIA.

- 1: Muestra: amarillo de acridina en disolución acuosa.
- 2: Portador: H_2SO_4 0.100 M.
- 3: Oxidante: KMnO_4 $7 \cdot 10^{-5}$ M / H_2SO_4 0.100 M.
- B: Bomba peristáltica
- I: Válvula de inyección.
- V: Volumen de muestra: 1021 μl .
- D: Detector (luminómetro)
- Caudales del portador y oxidante: 6.5 ml/min.

6.8. MECANISMO DE LA REACCIÓN

Basándonos en la similar estructura química de todas las diaminoacridinas, podemos pensar que el mecanismo de la reacción quimioluminiscente del amarillo de acridina con el permanganato debe ser similar al propuesto en este laboratorio por Rubio y colaboradores para la acriflavina²⁰⁶.

La acriflavina fue seleccionada para el desarrollo de un estudio teórico del mecanismo de la emisión quimioluminiscente. El estudio se basó en la técnica CNDO (*complet neglect of differential overlap*) desarrollada por Pople y Segal^{220, 221}.

Se aplicó inicialmente al cálculo de los ángulos de enlace, constantes de fuerza de enlace, barreras rotacionales y la estereoquímica de pequeñas moléculas. Este método se puede aplicar al cálculo de espectros electrónicos. De hecho, el método CNDO ha sido diseñado para la correlación y predicción de las longitudes de onda e intensidades de las principales bandas de absorción en el UV-VIS y por lo tanto, puede ser una útil herramienta para la interpretación de compuestos que presenten tanto enlaces π , como electrones no enlazados.

La quimioluminiscencia, implica usualmente a compuestos con una estructura electrónica como la descrita. El método CNDO se puede usar para predecir las transiciones electrónicas más probables, la estabilidad relativa de los intermedios y espectros de emisión, información esencial para la quimioluminiscencia.

Como resultado de la aplicación de este método, se propuso el mecanismo dibujado en la figura 6.12.b) En ella se muestra una explicación de la emisión quimioluminiscente en medio ácido usando permanganato potásico como oxidante. El mecanismo implica la protonación de la acridina y su oxidación por transferencia de dos electrones. La formación de la acridona como intermedio se propone como estructura responsable de la emisión de la radiación electromagnética.

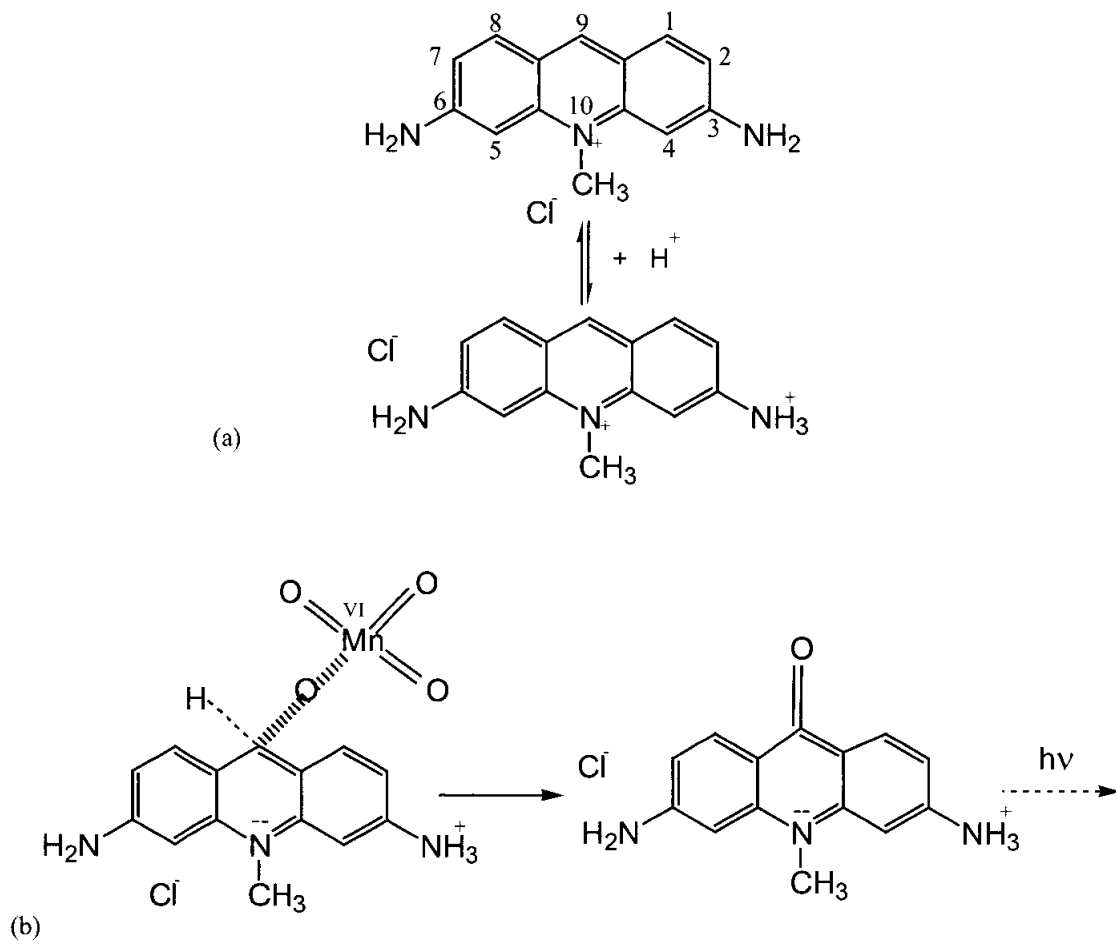


Figura 6.12

a) equilibrio ácido de la acriflavina.

b) Mecanismo propuesto para la reacción quimioluminiscente entre amino acridinas y permanganato potásico en medio ácido.

6.9. APLICACIONES ANALÍTICAS

6.9.1. Repetitividad y velocidad de inserción

La repetitividad se determinó a partir de 15 inserciones de amarillo de acridina a dos concentraciones distintas. Para 1 ppm de amarillo de acridina la señal media obtenida fue (19.9 ± 0.5) kHz, con una desviación estándar relativa del 2.5%. Para una concentración de 20 ppm del analito la señal promedio fue (263 ± 4) kHz, desviación estándar relativa del 1.5%.

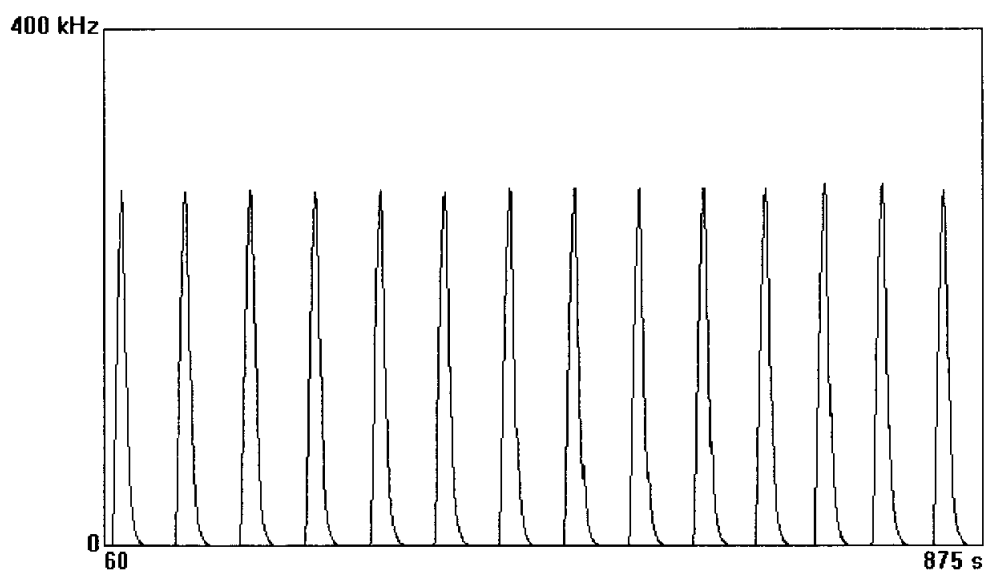


Figura 6.13. Fiagrama del estudio de la repetitividad (amarillo de acridina, 20 ppm)

La velocidad de inserción, determinada a partir de las series anteriores fue de 60 h^{-1} .

6.9.2. Límite de detección y reproducibilidad

El límite de detección, tomado como la mínima concentración que dio una señal igual o superior a la media del blanco más tres veces la desviación estándar absoluta del mismo, fue de 5 ppb.

Para determinar la reproducibilidad del método propuesto, se obtuvieron 5 curvas de calibrado en sesiones de trabajo diferentes, empleando cada vez disoluciones nuevas recientemente preparadas. Se utilizó el tramo en el que la relación entre la intensidad quimioluminiscente y la concentración es lineal. Este tramo lineal comprende concentraciones hasta 2 ppm de amarillo de acridina.

En la tabla 6.14. se muestran las rectas obtenidas por ajuste de mínimos cuadrados.

La desviación estándar relativa de la pendiente fue del 1.6%.

Sesión	Recta (0-2 ppm amarillo de acridina)	r ²
1	I = 11.466 [ppm] + 0.191	0.997
2	I = 11.779 [ppm] + 0.769	0.998
3	I = 11.327 [ppm] + 0.649	0.996
4	I = 11.633 [ppm] - 1.328	0.997
5	I = 11.394 [ppm] + 1.274	0.998
media	I = (11.52 ± 0.18)[ppm] + (0.3 ± 1.0)	0.997

Tabla 6.14. : Calibrados lineales, estudio reproducibilidad.

Para concentraciones mayores se perdió la linealidad y se pudo relacionar la señal obtenida con la concentración mediante una ecuación de segundo grado. En

la tabla 6.15. se muestran las curvas obtenidas para concentraciones de amarillo de acridina hasta 100 ppm.

Sesión	Curva (0-100 ppm amarillo de acridina)	r ²
1	$I = 0.0646 [\text{ppm}]^2 + 4.3326 [\text{ppm}] + 8.4275$	0.9993
2	$I = 0.0630 [\text{ppm}]^2 + 4.8441 [\text{ppm}] + 8.8256$	0.9993
3	$I = 0.0667 [\text{ppm}]^2 + 4.5372 [\text{ppm}] + 9.9313$	0.9994
4	$I = 0.0626 [\text{ppm}]^2 + 4.7384 [\text{ppm}] + 13.527$	0.9990
5	$I = 0.0625 [\text{ppm}]^2 + 4.5696 [\text{ppm}] + 10.795$	0.9990
media	$I = (0.0639 \pm 0.0018)[\text{ppm}]^2 + 4.60 \pm 0.20[\text{ppm}] + 10.3 \pm 2.0$	0.9992

Tabla 6.15. :Calibrados no lineales, estudio reproducibilidad.

La desviación estándar relativa del parámetro de segundo grado fue de 2.8% y la correspondiente al parámetro de primer grado fue de 4.3%.

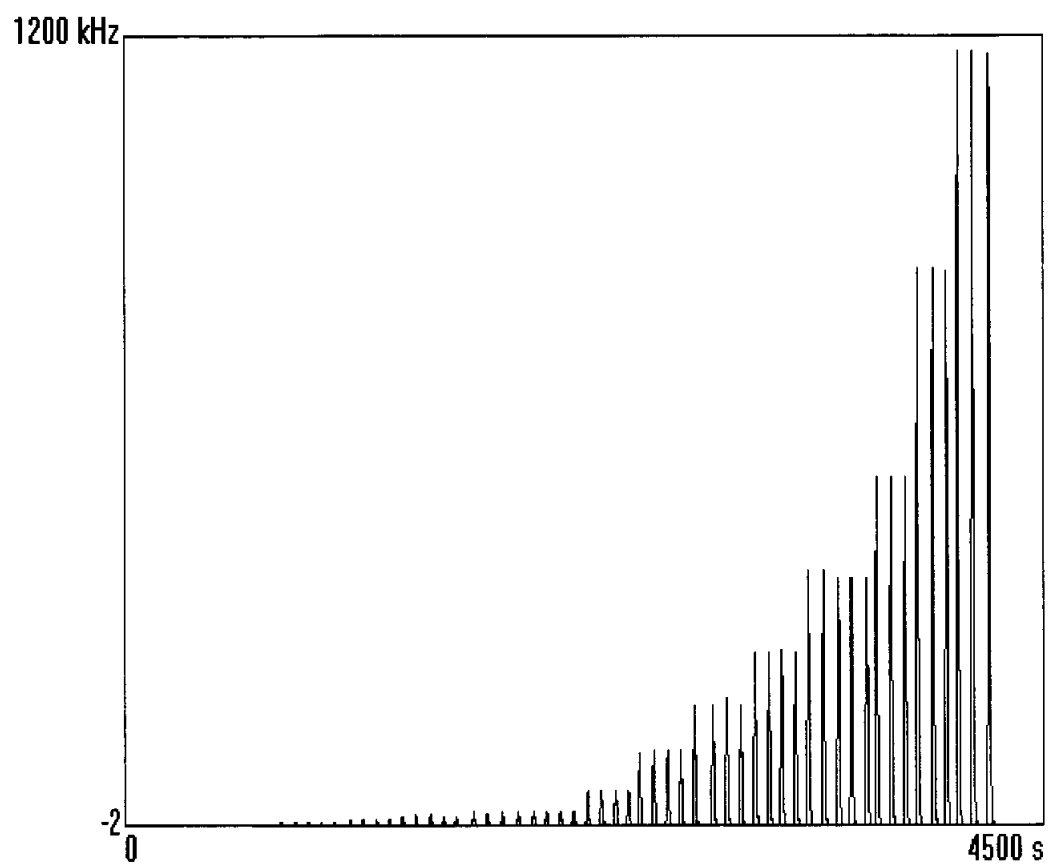


Figura 6.14. Fiagrama del estudio del intervalo de aplicación (0-100 pm amarillo de acridina)

6.9.3. Estudio de la influencia de interferentes

Se estudió la influencia de aniones y cationes que se encuentran frecuentemente en las muestras de aguas residuales a las que se quiere aplicar el método propuesto. Para ello se prepararon disoluciones que contenían 1 ppm de amarillo de acridina junto con la cantidad del ion en estudio. La señal de esta disolución se comparó con la proporcionada por una disolución que únicamente contenía amarillo de acridina en la misma concentración (1 ppm). Cuando el error relativo obtenido al comparar ambas disoluciones fue superior al 5% se disminuyó la concentración de la especie interferente en estudio, hasta alcanzar una concentración para la que el error fuera inferior al citado 5%.

En la tabla 6.16. se muestran los resultados obtenidos. Para el estudio de aniones se emplearon sales de sodio, y en el caso de los cationes sales de sulfato o nitrato.

<u>Interferente</u>	<u>Concentración (ppm)</u>	<u>Error (%)</u>
SO ₄ ²⁻	1044*	+0.8
NO ₃ ⁻	317*	-4.0
Cl ⁻	154*	-4.2
CH ₃ COO ⁻	300*	+4.5
HCO ₃ ⁻	50	-2.0
H ₂ PO ₄ ⁻	450*	-2.4
NO ₂ ⁻	0.08	-4.5
Na ⁺	500*	+0.8
K ⁺	200*	-4.0
NH ₄ ⁺	75	-1.5
Zn ²⁺	20	-5.0
Cu ²⁺	5	-1.8
Ca ²⁺	500*	-4.1
Co ²⁺	200*	+3.4
Al ³⁺	0.5	+1.7
Ba ²⁺	100*	-4.0
Ni ²⁺	10	-2.0
Mn ²⁺	1	-0.2
Mg ²⁺	200*	-4.4
Cd ²⁺	20	-1.2
Pb ²⁺	2	-0.9
Hg ²⁺	0.4	-2.1
Ag ⁺	50	+0.3
Cr ³⁺	0.5	+0.4
Fe ³⁺	0.1	-2.9

* Concentración máxima ensayada.
 Tabla 6.16. : Interferentes inorgánicos.

También se estudió la posible interferencia de otros miembros de la misma familia del amarillo de acridina. El procedimiento seguido fue el mismo que para el estudio de iones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

	Concentración (ppm)	Relación molar interferente/AA	Error (%)
Naranja de acridina	3	9:2	+4.9
Acriflavina	0.08	1:12	+1.0
Proflavin	0.06	1:13	+4.2
9-aminoacridina	10*	14:1	+0.5

AA : amarillo de acridina

* Concentración máxima ensayada

Tabla 6.17. : Interferentes de la familia química de las acridinas

Como cabía esperar, al ensayar este tipo de compuestos el grado de interferencia se intensifica; especialmente en el caso de la acriflavina y el proflavin.

6.9.4. Muestras reales

El método propuesto se aplicó a la determinación de amarillo de acridina en muestras de aguas de acequia, pozo y río. Las muestras se doparon con 5 cantidades variables de amarillo de acridina comprendidas entre 0.1 y 1 ppm. Además de determinar las recuperaciones obtenidas se estudió la presencia de errores proporcionales sistemáticos y constantes del método propuesto. La regresión lineal entre la concentración propuesta por el método FIA y la adicionada ($c_{\text{método propuesto}}$ versus $c_{\text{adicionado}}$) dio una pendiente estadísticamente igual a 1 y una ordenada igual a 0 para 3 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%, lo que indica que no hay evidencia de errores proporcionales sistemáticos ni constantes.

Las recuperaciones medias obtenidas fueron las siguientes.

Agua de pozo (Moncada, Valencia) : $102 \pm 7\%$

Agua acequia (Moncada, Valencia): $97.2 \pm 1\%$

Agua acequia (El Puig, Valencia): $121 \pm 8\%$

Agua río Vaca (Navarrés, Valencia): $80 \pm 4\%$

Los resultados indican que el método propuesto es adecuado para la determinación del amarillo de acridina.

6.10. CONCLUSIONES

Se estudió la emisión quimioluminiscente del amarillo de acridina al oxidarse en medio ácido. El oxidante más adecuado para este proceso fue el permanganato potásico y el ácido que mejores resultados proporcionó fue el sulfúrico. La detección se realizaba con un luminómetro.

La muestra se inserta en el portador (ácido sulfúrico diluido) y confluye posteriormente con el canal oxidante (permanganato en medio sulfúrico).

Una vez diseñado el montaje FIA, se procedió a la optimización de variables químicas y FIA, para ello se empleó el método univariante.

Los valores obtenidos tras este proceso fueron:

- Portador: H_2SO_4 0.100 M.
- Oxidante: KMnO_4 $7 \cdot 10^{-5}$ M / H_2SO_4 0.100 M.
- Volumen de muestra: 1021 μl .
- Caudal del portador y oxidante: 6.5 ml/min.

El procedimiento desarrollado se aplicó a la determinación de amarillo de acridina en muestras de aguas superficiales y subterráneas. Previamente, se estudió el intervalo de aplicación, repetitividad, velocidad de inyección, etc. Además se realizaron experiencias para determinar la interferencia que podían provocar los componentes que usualmente acompañarían al analito en el tipo de muestras a analizar.

Los resultados de la aplicación analítica del método se resumen en la tabla 6.18.

Intervalo de aplicación lineal:	0-2 ppm
Recta de calibrado:	$I = 11.52 \cdot C + 0.3$
Intervalo de aplicación alto:	0-100 ppm
Curva de calibrado:	$I = 0.0639 \cdot C^2 + 4.6 \cdot C + 10.3$
Límite de detección:	5 ppb
Repetitividad:	RSD = 2.5% (1 ppm amarillo de acridina) RSD = 1.5% (20 ppm amarillo de acridina)
Interferentes:	Ver tablas 6.16. y 6.17.

Tabla 6.18.: Resumen aplicaciones analíticas.

El método propuesto se aplicó a la determinación de amarillo de acridina en muestras de aguas de acequia, pozo y río.

Las recuperaciones medias obtenidas fueron las siguientes.

Agua de pozo (Moncada, Valencia) : $102 \pm 7\%$

Agua acequia (Moncada, Valencia): $97.2 \pm 1.1\%$

Agua acequia (El Puig, Valencia): $121 \pm 8\%$

Agua río Vaca (Navarrés, Valencia): $80 \pm 4\%$

Capítulo séptimo

7. CONCLUSIONES FINALES

Se han desarrollado tres nuevos métodos FIA para la determinación de muestras de interés farmacéutico y medioambiental. Los analitos estudiados fueron diazepam, los aniones nitritos y nitratos, y el amarillo de acridina.

En el caso del diazepam, se utilizó un fotorreactor con posterior determinación fluorimétrica. La fotodegradación del fármaco ocurría en medio hidroalcohólico/NaOH y en presencia de Cu(II) como catalizador.

Los nitritos eran determinados espectrofotométricamente por su reacción con el proflavin en medio HCl, y se utilizó una cámara de mezclado para favorecer la reacción. El estudio se amplió a la determinación de nitratos, previa reducción de los mismos a nitritos mediante el empleo de una columna de Cd-cuperizado.

El amarillo de acridina se determinó por quimioluminiscencia directa, la cual se obtenía utilizando el oxidante fuerte permanganato potásico en medio ácido sulfúrico.

Las características analíticas correspondientes a las determinaciones de diazepam, nitritos y nitratos, y amarillo de acridina se muestran en la tabla 7.1.

	Diazepam	nitritos	nitratos	amarillo de acridina
Intervalo de aplicación (ppm)	0.5 - 40	0.06 - 4	0.1 - 25 (a) 0.075 - 10 (b)	0-100
Límite de detección	0.13 ppm	0.06 ppm	0.075 ppm	5 ppb
Velocidad de inyección	10 h ⁻¹ (7 ppm)	37 h ⁻¹ (0.6 ppm) 26 h ⁻¹ (2 ppm)	68 h ⁻¹ (5 ppm) (a) 24 h ⁻¹ (5 ppm) (b)	60 h ⁻¹ (1ppm)
Repetitividad (%RSD)	2.1%	0.5% (0.6 ppm) 0.1% (2 ppm)	0.49% (5 ppm) (a) 0.63% (5 ppm) (b)	2.5% (1 ppm) 1.5% (20 ppm)

(a) caudal alto : 3.0 ml/min.

(b) caudal bajo : 0.3 ml/min.

Tabal 7.1. : Características analíticas.

Los tres nuevos métodos analíticos se aplicaron satisfactoriamente al análisis por inyección en flujo de distintas muestras reales. El diazepam se determinó en muestras de interés farmacéutico : preparaciones galénicas. Los nitritos y nitratos se determinaron en muestras de interés ambiental : aguas residuales y de mar, así como el amarillo de acridina que fue determinado en muestras de aguas residuales dopadas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruzicka J., Hansen E.H.

“Flow injection analyses I. New concept of fast continuous flow analysis”

Anal. Chim. Acta, 1975, 78, 145-147.

2. Stewart K.K., Beecher G.R., Hare P.

“Rapid analysis of discrete samples: the use of nonsegmented continuous flow”

Anal. Biochem., 1976, 70, 167-173.

3. Fang Z.

“Nonequilibrated sample manipulation –the essence of flow injection analysis”.

Microchem. J., 45, 137-142.

4. Martínez Calatayud J.

“Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory”

Taylor & Francis, London, 1996.

5. Ruzicka J., Hansen E.H.

“Flow Injection Analysis”.

J. Wiley, Chichester, Sussex, U.K., 1981.

6. Ruzicka J., Hansen E.H.

“Flow Injection Analysis”

J. Wiley, Chichester, Sussex, U.K., 1988.

7. Flow injection Atomic Spectroscopy.

Ed. Burguera J.L., Dekker M., New York, USA, 1989.

8. Flow injection Analysis. A practical guide.
Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1989.

9. Stewart K.K.
“Flow injection analysis: a review of its early history”
Talanta, 1981, 28(11), 789-797.

10. Válcárcer M., Luque de Castro M.D.
“Flow-injection analysis: an important new method in analytical chemistry”
Quim. Anal., 1982, 1 (4), 201-217.

11. Martínez Calatayud J.
“Nuevas tendencias y posibilidades en automatización en el área de los análisis farmacéuticos”
Ciencia Farmacéutica, 1991, 1(3), 139-149.

12. Martínez Calatayud J., Sagrado Vives S., Sanmiguel Roche F.
“Flow injection analysis in the field of pharmaceuticals and related drugs”
Quim.Anal., 1990, 9(1), 1-31.

13. Scholten AHMT, Brinkman Uath, Frei RW
“Photochemical reaction Detectors in continuous-flow”
Anal. Chim. Acta, 1980; 114:137.

14. Martínez Calatayud J., Gómez Benito C.
“Photochemical derivatization and spectrofluorimetric determination of clorpromacine by flow injection”
Anal Chim Acta, en prensa.

15. Salomoun J., Slais K.
"On-line precolumn photochemical generation of pH gradient: micro-high-Performance Liquid Chromatography of methotrexate and its impurities"
J. Chromatogr, 1990; 522:205.

16. Salomoun J., Macka M.
"Identification of products formed during UV irradiation of Tamoxifen and their use for fluorescence detection in High-Performance Liquid Chromatography"
J. Chromatogr, 1990; 514:179

17. Birks J.W., Frei R.W.
"Photochemical reaction detection in High-performance Liquid Chromatography"
Trends Anal Chem, 1982, 1:361

18. Sur R., Begerow J., Dunemann L.
"Determination of arsenic species in human urine using HPLC with on-line photooxidation or microwave-assisted oxidation combined with flow injection HG-AAS"
Fresenius J Anal Chem. Mar 1999; 363(5-6): 526-530.

19. Twichett P.J., Williams P.L., Moffat A.C.
"Photochemical Detection in High-Performance Liquid Chromatography and its application to cannabinoid analysis"
Chromatogr, 1978; 149:683.

20. Snider B.G., Johnson D.C.
"Anal Chim Acta, 1979; 106:1, citado en La Course WR, Krull IS. Photochemical detection in analytical chemistry"
Trends Anal Chem, 1985; 4 (5): 118.

21. Popovich D.J., Dixon J.B., Erch B.J.: J Cromatogr. Sci. 1979; 17:643, citado en Birks J.W., Frei R.W.

“Photochemical reaction detection in High-Performance Liquid Chromatography”
Trends Anal Chem, 1982; 1:361

22. Kikuta C., Schmid R.W.

“Specific High-Performance Liquid Chromatography analysis of tamoxifen and its major metabolites by “on line” extraction and post-column photochemical reaction”
J. Pharm. Biom. Analysis, 1989; 7 (3):329.

23. Stewart J.T.

“Optimization in photochemical reaction detection. Application to High-Performance liquid chromatography-photolysis-electrochemical detection”
Trends Anal Chem, 1982; 1:170.

24. Frei R.W., Lawrence J.F.

Chemical Derivatization in Analytical Chemistry. Plenum Press, New York, 1981.

25. Krull I.S. (ed): Reaction Detection in Liquid Chromatography. Marcel Dekker, New York, 1986.

26. Krull I.S., Colgan S.T., Selavka C.M.

“High Performance Liquid Chromatography”
Brow P.R. , Harwich R.A. (ed). Wiley-Interscience, New York, 1989; 393-413.

27. La Course W.R., Krull I.S.

“Photochemical detection in Analytical Chemistry”
Trends Anal Chem, 1985; 4 (5):118

28. Martínez Calatayud J., García Bautista J.A., García Mateo, J.V.
“Flow Injection biamperometric determination of cloramphenicol and related nitro compounds by on-line chemical photodegradation”
Anal Chim Acta 10 Jan 2000; 404(1): 141-150
29. Martínez Calatayud J., Palomeque M., García Bautista J.A., García Mateo, J.V.
“Flow injection biamperometric determination of metronidazole with on-line photodegradation”
Anal Chim Acta. 29 Nov 1999; 401(1-2): 229-236.
30. Martínez Calatayud J., David V., Marin Saez R.M., García Mateo, J.V.
“Enhanced chemiluminiscent determination of cloramphenicol and related nitro compounds by “on-line” photochemical reaction”
Analyst (Cambridge, UK) Jul 2000; 125(7): 1313-1319.
31. Perez ruiz, T., Martínez Lozano C., Tomás V., Martín J.
“Flow injection determination of vitamin K3 by a photoinduced chemiluminescent reaction”
Analyst (Cambridge UK) Feb 1999; 124(2): 197-201.
32. Coly A., Aaron J.J.
“Flow injection analysis of several aromatic pesticides using fluorescence and photoinduced fluorescence detection”
Analysis: May 1996; 24(4): 107-112.
33. Scholten AHMT, Welling PLM. Brinkman UATH, Frei R.W.
“Photochemical reaction detectors in continuous-flow systems. Applications to pharmaceuticals”
J Chromatogr, 1980; 199:239.

34. Harman P.J., Blackman G.L., Phillipou G.
“HPLC determination of clomiphenol using post-column on line photolysis and fluorescence detection.”
J. Chromatogr, 1981; 225(131).
35. Uilein M., Schwab E: *Chromatographia*, 1982; 15:40. Citado en Birks J.W. y Frei R.W. Photochemical reaction in High Performance Liquid Chromatography. *Trends Anal Chem*, 1982; 1:361.
36. Scholten AHMT, Brinkman Uath, Frei R.W.
“Solvent segmentation in liquid chromatography. Application to photochemical reaction detectors”
J. Chromatogr, 1981; 205:229.
37. Bachman W.J., Stewart J.T.
“Optimization in photochemical reaction detection; application to high performance liquid chromatography-photolysis-electrochemical detection”
J. Chromatogra, 1989; 481:121.
38. Krull I.S. Selavka C.M., Lookabaugh M., Childress W.R.
“Photochemical derivations for improved detection in High-Performance Liquid Chromatography.”
LC GC, 1989; 7:758.
39. Gandelman M.S., Birks J.W.
“Photo-oxygenation Chemiluminescence HPLC Detector for the determination of aliphatic alcohols, aldehydes, ethers and saccharides”
J Chromatogr, 1982 ; 242 :21.

40. Martínez Calatayud J. Gómez Benito C.

“Photochemical derivatization and fluorimetric determination of reserpine in a flow-injection assembly”

Anal. Chim. Acta, 245(1991) 101-107.

41. Hansen E.H., Ruzicka J.

“Homogeneous and heterogeneous systems. Flow injection analysis today and tomorrow”

Anal. Chim. Acta., 214(1-2) (1988) 1-27.

42. Montero. R., Gallego. M., Valcarcel.

“Indirect flow-injection determination of methadone by atomic absorption spectrometry”

M., Anal. Chim. Acta., 16 Jul 1990 ;234(2) : 433-437.

43. Kojlo. A., Martinez Calatayud. J.

“Spectrophotometric determination of adredaline with an oxidative column in a flow injection analysis assembly”

J. Pharm-Biomed-Analysis, 1990, 8(8-12) :663-666.

44. Martinez Calatayud. J., Garcia Mateo. J.V.

“Cerium (IV) arsenite as a solid-phase reactor for use in flow-injection analysis. Spectrophotometric determination of promethazine (hydrochloride)”

Anal. Chim. Acta., 15 Jul 1992 ;264(2) : 283-289.

45. Laredo Ortiz S., Gómez Benito C., Martínez Calatayud J.

“Determination of fluphenazine hydrochloride in a flow assembly incorporating cerium (IV) arsenite as a solid-bed reactor”

Anal. Chim. Acta. 30 Apr 1993 ; 276(2) : 281-286.

46. Martinez Calatayud. J., Garcia Mateo. J. V.
“High-pressure flow-injection determination assembly. Indirect determination of glycine by atomic-absorption spectrometry”
Analyst., Mar 1991, 116(3) : 327-329.
47. Martinez Calatayud. J., Garcia Mateo. J. V.
“Entrapped copper (II) carbonate for indirect determination of glycine by flow-injection atomic absorption spectrometry”
Anal. Chim. Acta., 15 Mar 1993 ; 274(2) : 275-281.
48. Lahuerta Zamora L., Martínez Calatayud J.
“Flow-injection spectrophotometric determination of amino-acids based on an immobilized copper(II)-zincon system”
Anl. Chim. Acta. 24 Sep 1993 ; 281(3) : 601-605.
49. Martinez Calatayud. J., Garcia Mateo. J. V., Lahuerta Zamora. L.
“Entrapment of reagents in polymeric materials. Indirect atomic-absorption-spectrometric determination of isoniazid by oxidation with manganese dioxide incorporated in polyester resin-beds in a flow-injection system”
Anal. Chim. Acta., 1 Aug 1992 ; 265(1) :81-86.
50. Lahuerta Zamora L., Martínez Calatayud J.
“Immobilization of reagents by polimeric materials. Determination of metamizol”
Talanta, Jul 1993 ; 40(7) : 1067-1071.
51. Martinez Calatayud. J., Sagrado Vives. S.
“Oxidative column for the flow-injection analysis-spectrophotometric determination of paracetamol”
J-Pharm-Biomed-Anal.1989. 7(10) : 1165-1172.

52. Martínez Calatayud J., Gómez Benito C., Gaspar Giménez D.
“Flow-injection analysis-fluorimetric determination of thiamine”
J-Pharm-Biomed-Anal.1990, 8(8-12) :667-670.
53. Hamid, J. A., Moody, G. J., Thomas, J. D. R.
Flow-through multienzyme electrodes for the determination of lactose”
Analyst., 12/1989, 114, 1587-1592.
54. Yamato S., Shimada K.
“Flow-injection spectrophotometric determination of acetyl coenzyme A with immobilized phosphotranscetylase”
Anal. Chim. Acta., 1990, 232, 281
55. Matuszewski W., Trojanowicz M.
“Graphite paste-based enzymic glucose electrode for flow-injection analysis”
Analyst., May 1988 ; 113(5) : 735.-738.
56. Girotti S., Grigolo B., Ferri E., Ghini S., Carrea G., Bovara R., Roda A., Motta R., Petilino R.
“Bioluminescent flow sensor for the determination of L-(+)-lactate”
Analyst., Jul 1990 ; 115(7) : 889-894.
57. Ruiz J., Luque de Castro M.D., Valcarcel M.
“Flow-injection analysis : use of immobilized enzymes for the determination of ethanol in serum”
Analyst., Mar 1987, 112(3), 259-261.
58. Mottola A. H.
“Strategies for the use of immobilized reagents in continuous-flow situations”
Química Analítica., 1989, vol.8, núm. 2, 119-128.

59. Mottola H., Martínez Calatayud J., Varma S.R.

“Continuous-flow determination of reserpine by oxidation with periodate ion and catalysis by manganese (II) in solution or by a solid manganese dioxide reactor”

Anal. Chim. Acta., 15 Jun 1990 ;233(2) : 235-241.

60. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Carpena J.

“Spectrofluorimetric flow-injection method for the individual and successive determination of L-cysteine and L-cystine in pharmaceutical and urine samples”

Analyst.(London) ; Jun 1992, 117(6) : 1025-1028.

61. Martínez Calatayud J., Gómez Benito C.

“Flow-injection spectrofluorimetric determination of paracetamol”

Anal. Chim. Acta. ; 17 Apr 1990 ; 231(2) : 259-264.

62. Zhou J., Wang E.

“Ion exchange of cationic drugs at a Nafion-coated electrode in flow-through analysis”

Anal. Chim. Acta. : 10 Sep 1991 ; 12(2) : 489-494.

63. Fernández-Band B., Lázaro F., Luque de Castro M. D., Valcarcel. M.

“Flow-injection determination of mixtures of amines immobilized in the flow cell of a photometric diode array detector”

Anal. Chim. Acta. ; 115 Feb 1990 ; 229(2) : 177-182.

64. Martínez Calatayud J., García Mateo J. V.

“FIA (flow-injection analysis) determination of chlorhexidine by means of the precipitation with copper(II)”

J-Pharm-Biomed-Anal. 1989; 7(12): 1441-1445.

65. Martínez Calatayud J., García Mateo J. V., Laredo Ortiz S.
“Indirect determination of levamisol by AAS and precipitation in a continuous –flow assembly”
Microchem-J. Aug 1993; 48(1): 112-117.
66. Montero R., Gallego M., Valcarcel M.
“Indirect atomic-absorption spectrometric determination of local anaesthetics in pharmaceuticals preparations with a flow-injection precipitation technique”
Anal. Chim. Acta.; 15 Dec 1988; 215(1-2): 241-248.
67. Gubitz G.
“Selective sampling handling and detection in liquid chromatography. Part A”
Frei R.W., Zech K. Edits. Elsevier, Amsterdam, 1988, p.145.
68. Marko Varga G., Gorton L.
“Post-column derivatization in liquid chromatography using immobilized reactors and amperometric detection”
Anal. Chim. Acta.; 234, 1990, 13-29.
69. Bernal J.L., Cerdá V.
“Métodos quimioluminiscentes de análisis”
Química Analítica, 1985. Vol.4, nº3, pp. 205-235.
70. Robards K., Worsfold P.J.
“Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence”
Anal. Chim. Acta, 266 (1992) 147-173.

71. Liu X., Hansen E.H.

“Sequential-injection determination of D-glucose by chemiluminescence using an open tubular immobilized enzyme detector”

Anal. Chim. Acta. 10 Jun 1996; 326(1-3): 1-12.

72. Andrew K.N., Sanders M.G., Forbes S., Worsfold P.J.

“Flow method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using low power photomultiplier tube and charge coupled device chemiluminescence detection”

Anal. Chim. Acta. 30 Jun 1997, 346(1): 113-120.

73. Viñas P., López García I., Martínez Gil J.A.

“Determination of thiol-containing drugs by chemiluminescence-flow-injection analysis”

J-Pharm-Biomed-Anal. Jan 1993, 11(1): 15-20.

74. Li B.X., Zhang Z.J.

“Chemiluminescence flow biosensor for determination of total D-amino-acid in serum with immobilized reagents”

Sens Actuators,-B. 10 Sep 2000; b 69(1-2): 70-74.

75. Hara T., Toriyama M., Ebuchi T.

“Flow-injection analysis of alpha-amino-acids by the chemiluminescence method”

Chem-lett. Mar 1985: (3) 341-342.

76. Kricka L.J., Thorpe G.H.G.

“Chemiluminescence and bioluminescent methods in analytical chemistry. A review”

Analyst, 1983, 108 (1292), 1274-1296.

77. Ventura S., Silva M., Pérez Bendito D.

“Stopped-flow chemiluminescence spectrometry to improve the determination of penicillins based on the luminol-iodine reaction”

Anal. Chim. Acta, 1992, 266(2), 301-307.

78. Seitz W.R.

“Chemiluminescence and bioluminescence analysis: fundamentals and biomedical applications”

Crit. Rev. Anal. Chem., 1981, 13, 1-58.

79. Burguera J.L., Burguera M., Townshend A.

“Principles, applications and trends of flow injection analysis for monitoring chemiluminescent reactions”

R. Roum. Chim.; 1982, 27(7), 879-883.

80. Mary Elvire Weeks

“Descubrimientos y conquistas de la química”

Ed. Manuel Marín y Cía., Barcelona, 1954.

81. Swindlehurst C.A., Nieman T.A.

“Flow injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection”

Anal. Chim. Acta., 1988, 205(1-2), 195-205.

82. Lan Z.H., Mottola H.A.

“Continuous-flow chemiluminescence detection comprising a rotating reactor”

Anal. Chim. Acta., 1994, 293 (1-2), 139-146.

83. Frei R.W. y Birks J.W.

“Recent developments in luminescence detectors for continuous-flow systems, including HPLC”

Eur. Spectrosc. News, 1984, (57), 15-20.

84. Capomacchia A.C., Jennings R.N., Hemingway S.M., D'Souza P., Prapaitrakul W.

“Native peroxyoxalate chemiluminescence from the reaction of bis-(2,4-dinitrophenyl) oxalate and hydrogen peroxide perturbed by non-fluorophores”

Anal. Chim. Acta, 1987, 196, 305-310.

85. Townshend A.

“Solution chemiluminescence-some recent analytical developments”

Analyst, 1990, 115 (5), 495-500.

86. Mac Donald A., Michaelis A.F., Senkowski B.Z.

“Analytical Profiles of Drugs Substances”, Vol (1), 79-99.

Ed. Academic Press. New York, 1985.

87. Korolkovas A., Burckhalter J.H.

“Compendio esencial de química farmacéutica” p. 221-222.

Ed. Reverté, S.A. Barcelona, 1983

88. Wilson, Gisvold, Doerge.

“Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry” p. 419-422

Ed. J.P. Lippincott Company, Philadelphia-Toronto. Sixth ed., 1971

89. Martindale. The Extra Pharmacopoeia 6th Ed.

Ed. JEF Reynolds. The Pharmaceutical Press London, 1972. p.1529

90. Lin L., Zhang N.

“Determination of the content of diazepam in Queveian tablets by differential spectrophotometry”

YaoWu-Fenxi-Zazhi. 1991 ; 11(2) : 111-112.

91. El-Brashy A., Aly F.A., Belal F.

“Determination of 1,4-benzodiazepines in drug dosage forms by difference spectrophotometry”

Mikrochim. Acta. 1993 ;110(1-3), 55-60.

92. Yan Z.

Differential spectrophotometric determination of the content of diazepam injection”

Yaowu-Fenxi-Zazhi. 1987 ; 7(5) : 311-312.

93. De la Guardia M., Galdu M.V., Monzó J., Salvador A.

“Simultaneous determination of benzodiazepines by ultra-violet-visible spectrophotometry in micelar media”

Analyst (London). Apr 1989 ; 114(4) : 509-512.

94. Fartushnyi A.F., Muzhanovskii E.B. Sukhin A.P., Sedov A.I., Kvasov E.B.

“Identification and determination of some 1,4-benzodiazepine derivatives in biological material”

Farm-Zh (Kiev). Sep-Oct 1986 ; (5) : 47-50.

95. Manes J., Civera J., Font G., Bosch F.

“Spectrophotometric determination of benzodiazepines in pharmaceuticals by ion pairing”

Cienc-Ind-Farm. 1987 ; 6(9) : 333-338.

96. Mangala D.S., Reddy B.S., Satry C.S.P.

“Extraction spectrophotometric method for the determination of reserpine and few benzodiazepine tranquillizers”

Indian-Drugs. Aug 1984 ; 21(11) 526-528.

97. Jain S., Tiwari M., Chaturvedi, S.C.

“Propranolol hydrochloride-diazepam: simultaneous estimation by first order derivative spectroscopy”

Indian-Drugs. Nov 1998; 35(11): 696-699.

98. Bautista R.D., Jiménez A.I., Jiménez F., Arias J.J.

“Simultaneous determination of diazepam and pyridoxine in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations using graphical and multivariate calibration-prediction methods”

J-Pharm-Biomed-Anal. Nov 1996; 15(2): 183-192.

99. Umapathi P., Parimoo P.

“Second-order-derivative-spectrophotometric assay for imipramine hydrochloride and diazepam in pure admixtures and in dosage forms”

J-Pharm-Biomed-Anal. Jul 1995; 13(8): 1003-1009.

100. Cruz A., Bermejo A., Lopez-Rivadulla M., Fernández P.

“Simultaneous determination of methaqualone and diazepam in plasma by derivative spectroscopy”

Anal-Lett. Feb 1992; 25(2): 253-256.

101. Corti P., Dreassi E., Corbini G., Ballerini R., Gravina S.

“Application of reflectance NIRS (near-infra-red reflectance spectrometry) to pharmaceutical quality control solid binary mixtures”

Pharm-Acta_Helv. 1990; 65(7): 189-193.

102. Ficarra P., Villari A., Ficarra R., Mondio G.
“Analysis of pharmaceutical solid forms by diffuse infra-red reflectance spectroscopy. II”
Farmaco, Ed. Prat. Sep 1987; 42(9): 241-252.
103. De la Guardia Cirugeda M., Rodilla Soriano F.
“Micellar enhancement of benzodiazepine fluorescence.”
Analyst (London). Jan 1989; 114(1): 77-82.
104. Ouyang Y., Cai W., Xue S., Xu J., Guo X.
“Study of the photochemical – fluorimetric method. III. Determination of diazepam in tablets and injections”
Fenxi-Huaxue. Jan 1992; 20(1): 48-50.
105. Dolejsova J., Solich P., Polydorou C.K., Koupparis M.A., Efstathiou C.E.
“Flow-injection-fluorimetric determination of 1,4-benzodiazepines in pharmaceutical formulations after acid hydrolysis”
J-Pharm-Biomed-Anal. Jun 1999; 20(1-2): 357-362.
106. Schwenzer K.S., Pearlman R., Tsilimidos M., Salomone S.J., Cannon R.C., Wong S.H.Y., Gock S.B. Jentzen J.J.
“New fluorescence polarization immunoassays for analysis of barbiturates and benzodiazepines in serum and urine: performance characteristics”
107. Charlier C.J., Plomteux G.J.
“Evaluation of Emit tox benzodiazepine and barbiturate assays on the Vitalab Viva analyzer and FPIA on the Abbott Adx analyzer”
Clin-Chem-Lab-Med. Jul 2000; 38(7): 615-618.

108. Simonsson P., Liden A., Lindberg S.

“Effect of beta-glucuronidase on urinary benzodiazepine concentrations determined by fluorescence polarization immunoassay”

Clin-Chem (Winston-Salem, N.C.) Jun 1995; 41(6): 920-923.

109. Becker J., Correll A., Koepf W., Rittner C.

“Comparative studies on the detection of benzodiazepines in serum by means of immunoassays (FPIA) (fluorescence polarization immunoassay)”

J-Anal-Toxicol. Mar-Apr 1993; 17(2): 103-108.

110. Cimpoi C., Hodisan T., Nascu H.

“Comparative study of mobile phase optimization for the separation of some 1,4-benzodiazepines”

J-Planar-Chromatography-Modern-TLC. May-Jun 1997; 10(3): 195-199.

111. Kastner P.; Klimes J.

“Analysis of benzodiazepines by adsorption and ion-pair reversed-phase TLC”

J-Planar-Chromatography-Modern-TLC. Sep-Oct 1996; 9(5): 382-387.

112. Sarbu C., Marutoiu C.

“Use of a mixture of luminophores for thin-layer chromatography with fluorescence detection. III. Separation and detection of some 1,4-benzodiazepines”

Rev-Chim (Bucharest).Oct 1986; 37(10): 913-914.

113. Paw B., Misztal G.

“Chromatographic analysis (TLC) of zopiclone and benzodiazepines”

J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC. May-Jun 2000; 13(3): 195-198.

114. Tames F., Watson I.D., Morden W.E., Wilson I.D.
“Analysis of benzodiazepines by thin-layer chromatography and tandem mass spectrometry”
J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC. Nov-Dec 2000; 13(6): 432-436.
115. Dongre V.G., Kamble V.W., Janrao D.M.
“High-performance thin-layer chromatographic detection of 1,4-benzodiazepines”
J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC. Nov-Dec 2000; 13(6): 468-470.
116. Jouvel C., Maciejewski P., García P., Bonnaire Y., Horning S., Popot M.A.
“Detection of diazepam in horse air samples by mass spectrometric methods”
Analyst (Cambridge, UK) Oct 2000; 125(10): 1765-1769.
117. Uglund H.G., Krogh M., Rasmussen K.E.
“Liquid-phase micro-extraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic determination of benzodiazepines in biological matrices”
J-Chromatogr,-B:-Biomed-Appl. 10 Nov 2000; 749(1): 85-92.
118. Opper C., Gerhards P.
“Quick determination of drugs by fast GC-MS”
GIT-Labor-Fachz. Dec 2000; 44(12): 1442-1443.
119. Soriano T., Jurado C., Menéndez M., Repetto M.
“Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids”
J-Anal-Toxicol. Mar 2001; 25(2): 137-143.

120. Inoue H., Maeno Y., Iwasa M., Matoba R., Nagao M.

“Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry”

Forensic-Sci-Int. 11 Sep 2000; 113(1-3): 367-373.

121. Iwase H., Gondo K., Koike T., Ono I.

“Novel pre-column deproteinization method using a hydroxyapatite cartridge for the determination of theophylline and diazepam in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultra-violet detection”

J-Chromatogr-B, Biomed-Appl. 22 Apr 1994; 655(1): 73-81.

122. Rau H.L., Aroor A.R., Rao P.G.

“Simultaneous determination of imipramine and diazepam by HPLC in combined dosage forms”

Indian-Drugs. Mar 1991; 28(6): 281-282.

123. Husain S., Murty A.S.R.K., Narasimha R.

“Analysis of multi-component tablets containing paracetamol, ibuprofen and diazepam by HPLC using variable wavelength UV-visible and photodiode-array detectors”

Indian-Drugs. Jul 1989; 26(10): 557-560.

124. Ferreyra C., Ortiz C.

“Analysis of multicomponent formulations containing phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine and diazepam by using LC”

J-Pharm-Biomed-Anal. Jun 2001; 25(3-4): 496-499.

125. Kagan M.Z.

“Normal-phase high-performance liquid chromatographic separations using ethoxynonafluorobutane as hexane alternative. I. Analytical and chiral applications”

J-Chromatogr,-A. 25 May 2001; 918(2): 293-302.

126. Wilhelm M., Battista H.J., Obendorf D.

“HPLC with simultaneous UV and reductive electrochemical detection at the hanging mercury drop electrode: a highly sensitive and selective tool for the determination of benzodiazepines in forensic samples”

J-Anal-Toxicol. May-Jun 2001; 25(4): 250-257.

127. Guadalupe García M., García A., Gonzalez I.

“Extraction and electrochemical quantification of the active ingredient (diazepam) in pharmaceutical products”

Talanta. Dec 1993; 40(12): 1775-1779.

128. Application bulletin – “Polarographic determination of diazepam in body fluids and pharmaceutical preparations”

Metrohm Application Bulletin, 250/1 e, 2001; Pp 10.

129. Nie L., Liu D., Yao S.

“Potentiometric determination of diazepam with a diazepam ion-selective electrode”

J-Pharm-Biomed-Anal. 1990; 8(4): 379-383.

130. Zhang S., Deng R., Huang T.

“Determination of diazepam in aqueous preparations”

Yaowu-Fenxi-Zazhi. 1983; 3(4): 238-240.

131. Muralikrisna U., Subrahmanyam K., Krishnamurthy M.
“Use of quadrivalent manganese in solutions of sulphuric acid as an oxidant for the direct titration of nitrite”
Microchem-J. Jun 1986 ; 33(3) : 376-378.
132. Vaidya S.K., Damodaran C., Verma K.K.
“Determination of bromide and nitrite by indirect redox titration using phenol iodosylacetate”
Mikrochim-Acta. 1992 ; 106(3-6) : 211-217.
133. Myugchenko A.P., Batsunova L.D.
“Determination of nitrites in aqueous solutions using titration with ascorbic acid”
Gig-Sanit. 1991 ; (7) : 83-84.
134. Gur'ev I.A., Lizunova G.M., Kyzenkova G.V.
“Potenciometric determination of nitrates and nitrites”
Zh-Anal-khim. Jan 1993 ; 48(1) : 121-124.
135. He Z.K., Fuhrman B., Spohn U.
“Precise and sensitive determination of nitrite by coulometric backtitration under flow conditions”
Fresenius-J-Anal-Chem. Jun 2000 ; 367(3) : 264-269.
136. Hahn M., Voight C., Ruettinger H.H., Matschiner H.
“Coulometric titrations with an ion-exchange separation step”
Fresenius-J-Anal-Chem. Nov 1992 ; 344(7-8) : 311-315.
137. Sen y Donalson.
J.Assoc.Off.Anal.Chem., 1978, 61, 1389.

138. Li X., Hu X.C.

“Spectrophotometric determination of nitrite with 2-(3,5-dibromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and thiocyanate”

Fenxi-Shiyanshi. Jan 1999 ; 18(1) : 64-66.

139. Zhao X., Kou Z., Hu Z.

“Determination of nitrite and nitrate by spectrophotometry based on oxidation of 3-cyano-1,5-bis-(2-hydroxy-5-sulphophenyl) formazan (DSPCF)”

Fenxi-Huaxue. Nov 1988; 16(11): 1009-1011.

140. Yu Z.G., yao Q.Z., Zhang J.

“Modification on the determination of nitrate in natural water by zinc-cadmium reduction method”

Lihua-Jiannan,-Huanxue-Fence. Nov 1998 ; 34(11) : 496-497.

141. Anwar J., farooqui M.I., Zaib-un-Nisa.

“Indirect determination of nitrate by spectrophotometry”

J-Chem-Soc-PaK. 1986 ; 8(4) : 475-480.

142. Odake T., Tabuchi M., Sato T., Susaki H., Korenaga T.

“Fluorescent derivatization of nitrite ions with 2,3-diaminonaphthalene utilizing a pH gradient in a Y-shaped microchannel”

Anal-Sci. Apr 2001 ; 17(4) : 535-538.

143. Wang H., Yang W. Liang S.C., Zhang Z.M., Zhang H.S.

“Spectrofluorimetric determination of nitrite with 5,6-diamino-1,3-naphthalenedisulfonic acid”

Anal-Chim-Acta. 1 Sep 2000 ; 419(2) : 169-173.

144. Feng S.L., Tang A.N., Fan J.
“Determination of nitrite by fluorimetry”
Fenxi-Shiyanshi. 28 Mar 2001 ; 20(2) : 41-43.
145. Huang Z., Korenaga T., Helaleh, M.I.H.
“Kinetic spectrofluorimetric determination of nitrite in water samples and nitrogen dioxide in the atmosphere sampled by the liquid droplet method”
Mikrochim-Acta. 2000 ; 134(3-4) : 179-183.
146. Helaleh M .I.H., Korenaga T.
“Fluorometric determination of nitrite with acetaminophen”
Microchem-J. May 2000 ; 64(3) : 241-246.
147. Bernal J.L., Cerdá V.
“Métodos quimioluminiscentes de análisis”
Química Analítica. 1985 ; 4(3) : 205-235.
148. Pinche C., Billard J.P., Frasey A.M., Bargnoux H., Vud B.D., Yonger J., Poma J.P., Saudan M., Petit J., Berger J.A.
“Differential determination by chemiluminescence of nitrite and nitroso compounds in pork products”
Sci-Aliments. 1991 ; 11(2) : 215-233.
149. Walters C.L., Gillart P.N., Palmer R.C., Smith P.L.R.
“Rapid method for the determination of nitrate and nitrite by chemiluminescence”
Food-Addit-Contam. Apr-Jun 1987 ; 4(2) : 133-140.
150. Kalinichenko I.E., Kushchevskaya N.F., Pilipenko A.T.
“Chemiluminescence determination of nitrate with photochemical activation”
Zh-Anal-Khim. Jun 1988 ; 43(6) : 1051-1054.

151. Kazemzadeh A., Ensafi A.A.

“Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection spectrophotometric detection”

Microchem-J. Jun 2001 ; 69(2) : 159-166.

152. Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Pinto I.V.O.S.

“Sequential injection analysis-based system for on-line monitoring of nitrite and nitrate in waste waters”

Anal-Sci. Nov 2000, 16(11) : 1157-1160.

153. Wiryawan A.

“Use of flow injection analysis for continuous monitoring of river water quality”

Lab-Rob-Autom. Aug 2000 ; 12(3) : 142-148.

154. Ma L., Tsuboi T., Hattori T., Oshima M., Takayanagi T., Motomizu S.

“On-site chemical analysis for nitrogen, phosphorous and sulfate compounds in the environment : sensitive determination by microflow-injection method”

J-Flow-Injection-Anal. Jun 1999 ; 16(1) : 79-87.

155. Petersen A., Stoltze S.

“Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market : content and intake”

Food-Addit-Contam. Jul 1999 ; 16(7) : 291-299.

156. Higuchi K., Inoue A., Tamanouchi H., Hattori T., Motomizu S.

“On-site analysis for nitrogen oxides using a newly developed portable flow-injection analyzer”

Bunseki-Kagaku : May 1999 ; 48(5) : 477-482.

157. Higuchi k., Motomizu S.

“Flow-injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in biological samples”

Anal-Sci. Feb 1999 ; 15(2) : 129-134.

158. Ensafi A.A., Kazemzadeh A.

“Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection”

Anal-Chim-Acta. 23 Feb 1999 ; 382(1-2) : 15-21.

159. Ma H.B., Liu R.X., Li J.X., Xiao W.

“Flow-injection photometric determination of nitrate and nitrite in blood serum”

Lihua-Jinayan,-Huaxue-Fence. Feb 1999 ; 35(2) : 72-74.

160. Cerdá A., Oms M.T., Forteza R., Cerdá V.

“Sequential injection sandwich technique for the simultaneous determination of nitrate and nitrite”

Anal-Chim-Acta. 21 Sep 1998 ; 371(81) : 63-71.

161. Zhang, Z.Q. ; Gao L.J., Zhan H.Y., Liu Q.G.

“Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system”

Anal-Chim-Acta. 31 Aug 1998 ; 370(1) : 59-63.

162. Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A.

“FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pates”

Food-Chem. Jul 1998 ; 62(3) 359-362.

163. Ma L., Oshima M., Motomizu S. ; Hattori T.
“Simultaneous determination of nitrate and nitrite by micro-flow injection analysis”
Bunseki-Kagaku. Jun 1998 ; 47(6) : 375-380.
164. Gabriel D., Baeza J., Valero F., Lafuente J.
“A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on nitrification/denitrification criteria”
Anal-Chim-Acta. 19 Feb 1998 ; 359(1-2) : 173-183.
165. Martínez Calatayud J., García Mateo J.V., David V.
“Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulfate”
Analyst (Cambridge, UK). Mar 1998 ; 123(3) :429-434.
166. David A.R.J., McCormack T., Morris A.W., Worsfold P.J.
“A submersible flow injection-based sensor for the determination of total oxidized nitrogen in coastal waters”
Anal-Chim-Acta. 31 Mar 1998 ; 361(1-2) : 63-72.
167. Cerdá A., Oms M.T., Forteza R., Cerdá V.
“Total nitrogen determination by flow injection using online microwave-assisted digestion”
Anal-Chim-Acta. 30 Sep 1997 ; 351(1-3) : 273-279.
168. British-Standards-Institution.: water quality. Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection.
British Standard, BS EN ISO 13395:1996, 15 Nov 1996; Pp. 28.

169. Cerdá A., Oms M.T., Cerdá V. Forteza R.

“Comparison of flow injection methods analysis in aqueous environmental samples”

Anal-Methods-and-Instrumentation. 1995; 2(6): 330-336.

170. Ferreira I.M.P.L.V.O., Lima J.L.F.C., Montenegro M.C.B.S.M., Pérez –Olmos R., Ríos A.

“Simultaneous assay of nitrite, nitrate and chloride in meat products by a flow-injection method”

Analyst (Cambridge, UK). Oct 1996; 121(10): 1393-1396.

171. Ahmed M.J., Stalikas C.D., Tzouwara-Karayanni S.M., Karayannis M.I.

“Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis”

Talanta. Jul 1996, 43(7) : 1009-1018.

172. Cerdá A., Oms M.T., Forteza R., Cerdá V.

“Speciation of nitrogen in waste water by flow injection”

Analyst (Cambridge, UK). Jan 1996; 121(1): 13-17.

173. Takeda K., Fujiwara K.

“Characteristics on the determination of dissolved organic nitrogen compounds in natural waters using titanium dioxide and platinumized titanium dioxide mediated photocatalytic degradation”

Water-Res. Feb 1996; 30(2): 323-330.

174. Oms M.T., Cerdá A., Cerdá V.

“Sequential injection analysis of nitrites and nitrates”

Anal-Chim-Acta. 10 Nov 1995; 315(3): 321-330.

175. Pratt P.F., Nithipatikom K., Campbell W.B.

“Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological samples by multichannel flow-injection analysis”

Anal-Biochem. 1 Nov 1995; 231(2): 383-386.

176. Daniel A., Birot D., Lehaire M., Poncin J.

“Characterization and reduction of interferences in flow-injection analysis for the in situ determination of nitrate and nitrite in sea water”

Anal-Chim-Acta. 9 Jun 1995; 308(1-3): 413-424.

177. Motomizu S., Sanada M.

“Photo-induced reduction of nitrate to nitrite and its application to the sensitive determination of nitrate in natural waters”

Anal-Chim-Acta. 9 Jun 1995; 308(1-3): 406-412.

178. Kojlo A., Gorodkiewicz E.

“Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in a flow-injection system”

Anal-Chim-Acta. 20 Feb 1995; 302(2-3): 283-287.

179. Novie M., Tezak S., Pihlar B., Hudnik V.

“Error sources in simultaneous nitrate/nitrite determinations using copperized cadmium as nitrate reducing agent”

Fresenius-J-Anal-Chem. Dec 1994; 350(10-11): 653-655.

180. McKelvie I.D., Mitri M., Hart B.T., Hamilton I.C., Stuart A.D.

“Analysis of total dissolved nitrogen in natural waters by online photooxidation and flow injection”

Anal-Chim-Acta. 20 Jul 1994; 293(1-2): 155-162.

181. Yaqoob M., Siddiqui M.A., Masoom M.
“Spectrophotometric flow-injection determination of nitrate and nitrite in potable waters using quinolin-8-ol”
J-Chem-Soc-pak. 1991; 13(4): 248-252.
182. Shirato F., Okajima Y., Maekoya C., Takata Y.
“Determination of nitrite and nitrate and ammonium nitrogens in soil by FIA (Flow-injection analysis)”
Bunseki-Kagaku. Sep 1989; 38(9): 413-418.
183. Karlicek R., Dolejsova J., Polasek M.
“Simultaneous determination of nitrites and nitrates by flow-injection analysis”
Agrochemia (Bratislava). 1988; 28(4): 119-122.
184. Jones, E.A.
“Determination, by flow-injection analysis, of fluoride, chloride, phosphate, ammonia, nitrite and nitrate”
Rep.-MINTEK, M200, 30 May 1985; p. 65.
185. Xie L., Lu C.L., Tian F.
“Polarographic determination of nitrite based on the nitrosation reaction with acridine red”
Lihua-Jianyan,-Huanxue-Fence. Jul 2000; 36(7): 289-290, 293.
186. Liu X.D., Liu S.P.
“Catalytic Kinetic-spectrophotometric method for the determination of trace nitrite with acridine red”
Fenxie-Huaxue. Apr 1998; 26(4): 491.

187. Chen H., Fang Y.J., An T.C., Jin X.L.
“Flow-injection catalytic spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite”
Anal-Lett. Nov 1999; 32(14): 2887-2897.
188. Zi Y.Q., Chen L.G., Chen J.
“Determination of trace amounts of nitrite by four-wavelength spectrophotometry”
Fenxi-Huaxue. Jun 1999; 27(6): 691-693.
189. Catalá Icardo M., García Mateo J.V., Martínez Calatayud J.
“Determination of nitrite by inhibition of the chemiluminescence of acriflavine in a flow-injection assembly”
Analyst, 2001, 126, 1423-1427.
190. Burriel Martí F., Lucena Conde F., Arribas Jimeno S., Hernández Méndez J.
“Química Analítica Cualitativa”
11ª Ed. Editorial Paraninfo, Madrid 1983.
191. Elmadfa I., Muskat E., Fritzsche D.
“Guía de los aditivos, colorantes y conservantes”
Ed. RBA libros S.A. 1999, Manuales Integral.
192. Jiang H., He R.H., Xiu M.L., Han R.Y.
“Simultaneous determination of nitrate and nitrite in water by ion-pair reversed-phase chromatography”
Fenxi-Huazue. Jul 2001; 29(7): 867

193. Di-Matteo V., Esposito E.

“Methods for the determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection”

J-Chromatography,-A. 21 Nov 1997; 789(1-2): 213-219.

194. Liu Z.M., Xi Z.D., Dong S.J., Wang E.K.

“Liquid chromatography- amperometric detection of nitrite using a polypyrrole-modified glassy carbon electrode doped with tungstodiphosphate anion”

Anal-Chim-Acta. 20 Jun 1997; 345(1-3): 147-153.

195. Bosch Reig F., Martínez Calatayud J., Picó Puchades J.R.

“La 3-6 diamino acridina como reactivo analítico: estudio espectrofotométrico del compuesto formado con ácido nitroso(I)”

Quim. Anal. 31 (1977) 347-352.

196. Martínez Calatayud J., Villanueva Camañas R.M^a.

“Aspectos químico-analíticos de las acridinas”

Química Analítica, 1985. Vol 4, n^o2, 91-116.

197. Formulario español de Farmacia militar.

Ed. por el laboratorio y parque central de Farmacia militar.

Madrid 1975, 7.^a Ed., p.1420

198. Vanickova, M., Labuda, J., Buckova, M. Surugiu, I., Mecklenburg, M. y Danielsson, B.

“Investigation of catechin and acridine derivatives using voltammetric and fluorimetric DNA-based sensors.”

Collect-Czech-Chem-Commun. Jun 2000; 65(6); 1055-1066.

199. Barek, J., Matejka, J. y Zima, J.

“Analysis of chemical carcinogens. XXV. Determination of acridine, benzacridine and dibenzacridine by fast-scan differential pulse voltammetry and adsorptive stripping voltammetry.”

Collect-Czech-Chem-Commun. Feb 1994; 59(2); 294-308.

200. Sturaro, A., Parvoli, G., Doretto, L.

“Determination and origin of aromatic compounds in soot derived from a burned prefabricated building.”

Sci-Total-Environ. 29 Apr 1994; 144 (1); 285-295.

201. Polyakova, A.A., Zhil'tsov, N.I. y Ershov, V.A.

“Mass-spectrometric analysis of petroleum for hetero-atom compounds.”

Zh-Anal-Khim. Oct 1983; 38 (10); 1846-1850.

202. Carlsson, H. y Ostman, C.

“Clean-up and analysis of carbazole and acridine type polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics in complex sample matrices”.

Journal of Chromatography, A. 28 Nov 1997; 790 (1-2); 73-82.

203. Mao, J., Pacheco, C.R., Traficante, D.D. y Rosen, W.

“Analysis of benzoquinolines and acridines in a Brazilian diesel oil by particle beam LC-MS and HPLC-UV”.

J-Liq-Chromatogra. Mar 1995; 18 (5); 903-916.

204. Strozyk, M. y Warzecha, L.

“HPLC determination of acridine-type polycyclic aromatic nitrogen heterocompounds (PANHs, Azaarenes).”

Acta-Chromatographica 1999; (9); 142-153.

205. Legaz, M.E., Pedrosa, M.M., Mateos, J.L., Caffaro, S.V., y Vicente C.
“High-performance liquid-chromatographic determination of acridine orange in nucleic acids isolated from dye-treaed *Himantornia lugubris thalli*.”
J-Chromatogr. 28 Aug 1992; 607(2); 245-251.
206. Rubio, O., Martínez, D., García, J.V. y Martínez Calatayud, J.
“Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine.”
Anal. Chim. Acta. 438 (2001) 149-156.
207. Aly, M.M., Shehata, M.K. y Moneir, A.A.
“The use of acridine yellow basic dye for extraction-spectrophotometric microdetermination of uranium.”
Egypt-J-Anal-Chem. Jan 1994 ; 3(1) ; 99-102.
208. Grigoryan, L.A., Mikaelyan, D.A. y Tarayan, V.M. Zh.
“Extraction-fluorimetric determination of gold with acridine yellow.”
Anal. Khim., 1980, 35 (1), 45-48.
209. Bao, S.Y., Wang, G.H., liu, B.S., Sun, H.W., Huang, Y.Z. y Shi, S.X.
“Study of energy transfer fluorescence quenching during mixing of Acridine yellow with PAR : determination of trace iron.”
Guangpuxue-Yu-Guangpu-Fenxi. Feb 2001 ; 21 (1) ; 87-89.
210. Pérez Ruíz, T., Martínez, C. y Tomas, V.
“Photo-oxidation of acridine and acridine yellow in the presence of iron (III) : determination of micro-amounts of iron, fluoride and phosphate.”
Analyst (London). Nov 1984 ; 109 (11) ; 1401-1404.

211. Goryacheva, I.Y., Mel'nikov, G.V., Shtykov, S.N.
"Acridine dyes in the triplet state as reagents for the selective luminiscence determination of policyclic aromatic".
J-Anal-Chem (transl-of-Zh-Anal-Khim). Sep 2000; 55 (9); 874-878.
212. Zhang, H.M., Guo, X.Q., Zhao, Y.B., Wang, D.Y. y Xu, J.G.
"Study on the dimer-monomer equilibrium of a fluorescent dye and it application in nucleic acids determination"
Anal-Chim-Acta. 31 Mar 1998; 361 (1-2); 9-17.
213. Catalá Icardo, M., García Mateo, J.V., Martínez Calatayud, J.
"Determination of nitrite by inhibition of the chemiluminescence of acriflavine in a flow-injection assembly"
Analyst, 2001, 126, 1423-1427.
214. Hasebe T., Kawashima T.
"Flow-injection determination of ascorbic acid by iron (III)-catalysed lucigenin chemiluminescence in a micellar system"
Anal. Sci., 1996, 12(5), 773-777.
215. Alwarthan A.A., Al-Lohedan H.A., Issa Z.A.
"Micellar effect upon the lucigenin chemiluminescent reaction system with isoprenaline"
Anal, Lett., 1996, 29(9), 1589-1602.
216. Zhang Z.D., Baeyens W.R.G., Zhang X.R., Van der Waken G.
"Chemiluminescence determination of penicillamine via flow injection applying a quinine-cerium (IV) system"
Analyst, 1996, 121 (11), 1569-1572.

217. Ouyang J., Baeyens W.R.G., Delanghe J., Van der Waken G., Calokerinos A.C.
“Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide”
Talanta, 1998, 46(5), 961-968.
218. Andrews A.R.J., Towshend A.
“Chemiluminescence detection of the benzodiazepine loprozalam”
Anal. Chim. Acta., 1989, 227(1), 65-71.
219. Zhang X.R., Baeyens W.R.G., Van der Waken G., Clokerinos A.C., Nakashima K.
“Chemiluminescence determination of captopril based on a rhodamine B sensitized cerium (IV) method”
Anal. Chim. Acta., 1995, 303(1), 121-125.
220. Pople J.A. , Segal G.A.
J.Chem. Phys. 43 (1965) 136.
221. Pople J.A. , Segal G.A.
J.Chem. Phys. 44 (1966) 3289.
222. Kier L.B., Hall L.H
“Molecular Conectivity in Structure-Activity Analisis”
Research Studies Press, Letchworth, England, 1986
223. Randic M., Krajs G.A. Deonauv-Jerman-Blazic, B.
“Chemical applications of topology and graph theory”
King R.B., Elsevier Amsterdam, 1983, p.192-205.

224. Gálvez J., García R., Julián J.V., De Gregorio C., Soler R.
“New Antibacterial Drugas designed by Molecular Conectivity. Advances in Molecular Similarity”.
JAI Book Series. I, 1996a., p.267-280.
225. Brinkman U.A. Th., Welling P.L.M., De Vries G., Scholten A.H.M.T., Frei R.W.
“Liquid chromatography of demoxepam and phenothiazines using a post-column photochemical reactor and fluorescence detector”
Journal of Chromatography, 217 (1981) 463-471.
226. Cornelissen P.J.G., Beijersbergen-van-Henegouwen G.M.J.
“Photochemical decomposition of 1,4-benzodiazepines. Quantitative analyses of decomposed solutions of chlordiazepoxide and diazepam”
Pharm-Weekbl,-Sci-Ed. 1980; 2(2): 547-556.
227. Strojny N., De Silva J.A.F.
“Laser induced fluorometric analysis of drugs”
Anal. Chem. 1980, 52, 1554-1559.
228. Acheson H.M.
“Acridines: Chemistry of Heterocyclic Compounds”
New York: John Wiley and Sons Incorporated, 1973.

Fe de erratas

Apartado 1.3.4., pág 41 ; sustituir el primer párrafo por :

Un montaje bicanal en el que uno de los canales dispone de un lecho reactivo permite la especiación o determinación sucesiva de varias sustancias (fig. 1.8., ubicación 4). Se ha propuesto un sistema de flujo para la resolución de mezcla de L-cisteína y L-cistina. El procedimiento esta basado en la rápida oxidación de L-cisteína por Ta(III) y determinación fluorimétrica del Ta(I) formado. La inclusión de una válvula selector y de una columna Cu-Cd permite el by-pass de la columna reductora (determinación de cistina) o alternativamente la reducción de la mezcla (determinación conjunta de cisteína y cistina)⁶⁰.

Apartado 4.3.1. pág 97 ; sustituir 500 mg/ml por 500 mg/l.

Apartado 4.3.2. pág 98 ; sustituir lámpara UV por lámpara.

Apartado 4.3.3.1. pág 100 ; sustituir figura 4.4. por figura 4.5..

Apartado 4.5.1. pág 110 ; sustituir **Tiempo de irradiación : 10 minutos** por **Tiempo de irradiación : 5 minutos**.

Apartado 4.7. pág 125 ; sustituir *Longitud del bucle de muestra : 3 m* por *Longitud del bucle de muestra : 2.5 m*.

Apartado 4.7. pág 125 ; sustituir *Caudal portador : 3 ml/min* por *Caudal portador : 6.3 ml/min*.

Apartado 4.10. pág 135 ; sustituir *Longitud del bucle de muestra : 3 m* por *Longitud del bucle de muestra : 2.5 m*.

Apartado 4.10. pág 136 ; sustituir *Caudal portador : 3 ml/min* por *Caudal portador : 6.3 ml/min*.

Apartado 5.5. pág 166 ; sustituir *Figura 5.18.* por *Figura 5.8.*

Apartado 5.5.1. pág 173 ; sustituir *tabla 5.9.* por *tabla 5.10.*

Apartado 5.6.2. pág 176 ; sustituir *Caudal reactivo (proflavin/HCL) : 2.7 ml/min* por *Caudal reactivo (proflavin/HCL) : 1.8 ml/min.* e incluir *Caudal muestra : 2.7 ml/min.*

Apartado 5.9.1.1. (figura 5.23.) pág 195 ; sustituir NO_2^- por NO_3^- .

Apartado 5.9.1.7. (figura 5.24.) pág 201 ; sustituir NO_2^- por NO_3^- .

Apartado 5.9.2. pág 204 ; sustituir 246 μ l por 457 μ l.

Apartado 5.11. pág 212 ; sustituir *RSD* por %*RSD*.