

352
T.D

UNIVERSITAT DE VALENCIA
FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA



DETERMINACION DE CATECOLAMINAS MEDIANTE
CROMATOGRAFIA LIQUIDA MICELAR Y
ESPECTROSCOPIA DE LENTE TERMICA

MEMORIA que para alcanzar el
Grado de Doctor en Ciencias
Químicas presenta el Licenciado
José M^a Sanchis Mallols

Burjassot, Julio de 1993.



UMI Number: U607175

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607175

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

-> Química

Nº Registre 6049

DATA 24.XI.93

SIGNATURA

352.T.D

Nº LIBIS: R:1866121x

30 cms.



UNIVERSITAT DE VALENCIA
FACULTAD DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA
C/ D. Moliner 50. Tel. 386 43 00
46100 Burjassot (València)

Dña. ROSA M^a VILLANUEVA CAMAÑAS y D. GUILLERMO RAMIS RAMOS,
Profesora Titular y Catedrático, respectivamente, adscritos al Departamento de Química
Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

que la presente Memoria, "Determinación de Catecolaminas Mediante Cromatografía Líquida
Micelar y Espectrometría de Lente Térmica", constituye la Tesis Doctoral de D. JOSE
MARIA SANCHIS MALLOLS.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del
trabajo como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a
veintiocho de Julio de mil novecientos noventa y tres.

Rosa de Villanueva
2

Guillermo Ramis Ramos

Als meus pares

Quiero expresar mi agradecimiento a los Doctores Dña. ROSA M^a VILLANUEVA CAMAÑAS y D. GUILLERMO RAMIS RAMOS, por su apoyo y dirección en la labor investigadora, así como en el desarrollo de esta Memoria.

A los Doctores D. ERNESTO F. SIMO ALMONSO y M^a ANGELES RIUS REVERT por la construcción del espectrómetro de lente térmica.

Al Doctor JOSE VICENTE GIMENO ADELANTADO por su ayuda en el manejo del microscopio electrónico.

A D. JOSE RAMON TORRES LAPASIO por la realización de los programas que permitieron el tratamiento de las señales y la optimización de fases móviles.

A todos los compañeros del grupo de investigación por su apoyo y amistad.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a los compañeros del Departamento de Química Analítica, de los que siempre tendré un grato recuerdo.

INDICE

I.- INTRODUCCION GENERAL	1
1.- Catecolaminas: propiedades, origen y metabolismo en el hombre	3
2.- Determinación de catecolaminas en fluidos biológicos por HPLC.....	7
a) Cromatografía de intercambio iónico	8
b) Cromatografía en fase reversa	10
c) Cromatografía en fase reversa con pares iónicos	13
3.- Determinación de catecolaminas en preparados farmacéuticos	15
a) Métodos espectrofotométricos	15
b) HPLC.....	16
4.- Espectroscopía de lente térmica.....	17
a) Espectroscopías fototérmicas.....	17
b) Fundamento de la espectroscopía de lente térmica	18
c) Características analíticas.....	20
d) Aplicaciones analíticas	21
5.- Cromatografía líquida micelar	26
a) Reparto de los solutos	27
b) Interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y su influencia sobre la retención	28
c) Compuestos asociados no asociados y repelidos	30
d) Influencia del pH.....	31
e) Efecto de la fuerza iónica	31
f) Selectividad.....	32
g) Limitaciones de la cromatografía líquida micelar	32
h) Cromatografía micelar híbrida	33
i) Aplicaciones	36
4.- Bibliografía.....	38
II.- OBJETO.....	45
III.- ESTUDIOS ESPECTROFOTOMETRICOS Y DE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TERMICA SOBRE CATECOLAMINAS Y AMINOCROMOS.....	49
1.- Introducción.....	51
2.- Parte experimental	52
a) Aparatos	52
b) Reactivos	56

3.- Espectros y estabilidad de las catecolaminas	57
4.- Espectros, formación y estabilidad de los aminocromos	58
4.1.- Espectros de los aminocromos	58
4.2.- Elección del agente oxidante	59
4.3.- Efecto de la concentración de hexacianoferrato(III)	60
4.4.- Efecto de la presencia de tensioactivo	61
4.5.- Efecto del Cu(II)	61
4.6.- Optimización del pH	61
4.7.- Influencia del sistema amortiguador	64
4.8.- Influencia de la concentración	64
4.9.- Influencia de la presencia de etanol	64
4.10.- Procedimientos recomendados.....	66
5.- Características analíticas de la determinación de aminocromos mediante espectrofotometría y espectroscopía de lente térmica	68
6.-Bibliografía.....	70

IV.- EFECTOS FOTOLITICOS Y DE TRANSPORTE PRODUCIDOS POR LA RADIACION DE BOMBEO SOBRE LAS DISOLUCIONES DE HEXACIANO FERRATO(III)	71
1.-Introducción.....	73
2.-Parte experimental.....	74
a) Aparatos.....	74
b) Reactivos	74
3.-Resultados	74
4.- Discusión de resultados	82
5.-Bibliografía.....	85

V.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE AMINOCROMOS CON DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA Y MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TERMICA	87
1.-Introducción.....	89
2.- Parte experimental.....	92
a) Aparatos.....	92
b) Reactivos	93
c) Procedimientos.....	93
3.- Comportamiento cromatográfico y optimización	96
3.1.- Selección del tensioactivo	96
3.2.- Fases móviles micelares puras	97
3.3.- Fases móviles micelares híbridas	102

a) Influencia de la longitud de la cadena del alcohol	102
b) Influencia de la concentración de alcohol	106
c) Influencia de la concentración de SDS	115
3.4.- Influencia del pH	119
3.5.- Influencia de la naturaleza del sistema amortiguador	130
3.6.- Influencia de la fuerza iónica	131
3.7.- Influencia de los silanoles residuales	135
3.8.- Influencia del caudal de la fase móvil	139
4.- Estudios fisicoquímicos y modelización	145
4.1.- Determinación y estudio comparativo de K_{AM} y ΦP_{SW}	145
a) Comparación entre fases móviles micelares puras e híbridas	145
b) Efecto del pH sobre los valores de K_{AM} y ΦP_{SW}	149
4.2.- Modelización de la retención	149
5.- Ruido de Schlieren	156
6.- Características analíticas significativas. Comparación entre la detección espectrofotométrica y la de espectroscopía de lente térmica	161
a) Curvas de calibrado	161
b) Reproducibilidad	165
c) Límites de detección	165
7.- Bibliografía	168
VI.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE CATECOLAMINAS	169
1.- Introducción	171
2.- Parte experimental	172
a) Aparatos	172
b) Reactivos	173
c) Procedimientos	173
3.- Comportamiento cromatográfico y optimización	173
3.1.- Elución de catecolaminas con fases móviles de SDS sin tamponar	173
a) Fase móvil micelar no modificada	174
b) fase móvil micelar híbrida	179
3.2.- Fase móvil micelar de SDS modificada con trietilamina	187
3.3.- Influencia del pH	188
3.4.- Fases móviles de SDS tamponadas a pH 3	199
a) Fases móviles micelares puras	199
b) Fases móviles micelares híbridas	207

4.- Estudios fisicoquímicos y modelización	215
4.1.- Fuerza eluyente del propanol	215
4.2.- Determinación de K_{AM} y $\Phi_{P_{SW}}$	218
4.3.- Ecuaciones de retención para fases móviles de SDS en presencia de propanol.....	222
4.4.- Estimación cromatográfica de las constantes de protonación de L-dopa y 2-metildopa en medio micelar	227
5.- Predicción de la mejor separación cromatográfica de las catecolaminas endógenas ..	229
6.- Características analíticas significativas	232
6.1.- Curvas de calibrado	232
6.2.-Reproducibilidad.....	235
6.3.- Límites de detección	235
7.-Bibliografía.....	238

VII.- DETERMINACION DE LA SUMA DE CATECOLAMINAS NO CONJUGADAS EN ORINA

MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE LENTE TERMICA.....	241
1.-Introducción.....	243
2.-Parteexperimental.....	246
a)Aparatos.....	246
b)Reactivos.....	246
c)Procedimientos.....	247
3.-Resultados y discusión.....	249
3.1.- Optimización de las condiciones experimentales	249
3.2.- Eliminación de urocromos	250
3.3.- Recuperación de catecolaminas con columnas de sílice alquilada	252
3.4.- Determinación de catecolaminas no conjugadas en orina previa eliminación de urocromos.....	253
3.5.- Separación de catecolaminas urinarias con alúmina	255
3.6.- Características analíticas	257
3.7.- Uso de la dopamina como patrón. Errores sistemáticos esperados	258
3.8.- Influencia de la matriz de orina	260
3.9.- Análisis de muestras de orina	261
4.-Bibliografía.....	267

VIII.- DETERMINACION DE CATECOLAMINAS NO CONJUGADAS EN ORINA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA MICELAR CON DETECCION POR ESPECTROSCOPIA DELENTE TERMICA.....	269
1.-Objeto.....	271
2.-Parteexperimental.....	271
a)Aparatos.....	271
b)Reactivos.....	272
c)Procedimientos.....	272
3.-Resultados y discusión.....	274
3.1.- Selección del estándar interno	274
3.2.- Optimización de la extracción	274
a) Elución con HAc y con HClO ₄	275
b) Influencia del tiempo de extracción	279
c) Influencia del pH de la reacción de neutralización	279
3.3.- Curvas de calibrado	279
4.- Análisis de muestras de orina	282
5.-Bibliografía.....	287
IX.- ANALISIS DE PREPARADOS FARMACEUTICOS QUE CONTIENEN CATECOLAMINAS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA MICELAR CON DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA.....	289
1.-Introducción.....	291
2.-Parteexperimental.....	294
a)Aparatos.....	294
b)Reactivos.....	294
c)Procedimientos.....	295
3.-Resultados.....	296
4.-Bibliografía.....	299
X.- CONCLUSIONES.....	305

I.- INTRODUCCION GENERAL



I. INTRODUCCION GENERAL

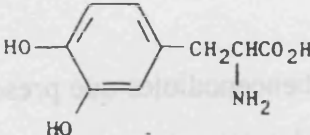
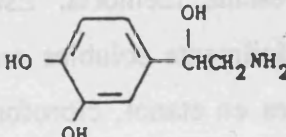
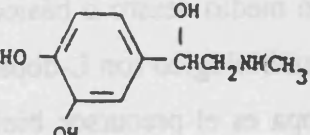
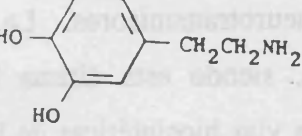
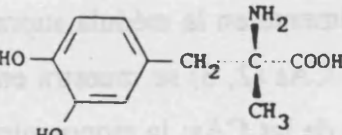
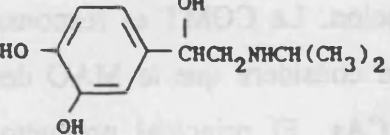
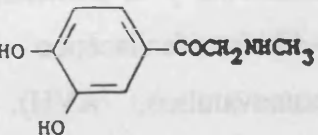
I.1.- Catecolaminas: propiedades, origen y metabolismo en el hombre

Las CAs (CAs) son 1,2-bencenodiolos que presentan un grupo aminoetil en posición 4. En la Tabla I.1 se muestran las estructuras y las constantes de protonación de las siete CAs que se estudian en la presente memoria. Estos compuestos son sólidos blancos ligeramente solubles en H₂O, fácilmente solubles en disoluciones de ácidos y de álcalis débiles y prácticamente insolubles en etanol, cloroformo y éter (1). Todos ellos son muy sensibles al oxígeno atmosférico, oxidándose con facilidad a los correspondientes aminocromos, especialmente en medio neutro o básico.

Las cuatro CAs de origen biológico son L-dopa (D), noradrenalina (NA), adrenalina (A) y dopamina (DA). El L-dopa es el precursor biológico de las CAs en los organismos vivos. En el sistema nervioso central, las neuronas producen dopamina y noradrenalina, hormonas que actúan como neurotransmisores. La médula suprarrenal produce tanto adrenalina como noradrenalina, siendo esta última liberada por los nervios simpáticos posganglionares. Las principales vías biosintéticas de las CAs se muestran en la Figura I.1. El precursor aminoacídico de las CAs es la tirosina. La conversión de noradrenalina en adrenalina se produce esencialmente en la médula suprarrenal (2).

El metabolismo de las CAs (2, 3) se muestra en la Figura I.2. Existen dos enzimas importantes en el metabolismo de las CAs: la monoamino-oxidasa (MAO), que es la enzima responsable de la oxidación desaminativa, y la catecol-o-metil-transferasa (COMT), que es responsable de la o-metilación. La COMT es responsable de la inactivación de las CAs circulantes, mientras que se considera que la MAO desempeña un papel destacado en la regulación del exceso de CAs. El principal producto terminal del metabolismo de la adrenalina y la noradrenalina es el ácido vanililmandélico (AVM). Otros metabolitos urinarios de las CAs son la metanefrina y la normetanefrina. Los derivados de la dopamina generan ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAc) y ácido 3-metoxi-4-hidroxi-fenilacético (ácido homovanílico, AVH). El metabolito 3-metoxi-4-hidroxi-feniletilenglicol (MPHG), que también aparece en la orina, aparentemente deriva de las CAs cerebrales. Por otra parte, también se eliminan por la orina pequeñas cantidades de

Tabla 1.1. - Estructura y constantes de protonación de las CAs (I = 0.1 M, 25 °C).

L-Dopa		$\log k_1 = 13.4$ $\log k_2 = 9.7$ $\log k_3 = 8.7$ $\log k_4 = 2.3$
Noradrenalina		$\log k_1 = 12.0$ $\log k_2 = 9.8$ $\log k_3 = 8.6$
Adrenalina		$\log k_1 = 12.0$ $\log k_2 = 10.2$ $\log k_3 = 8.7$
Dopamina		$\log k_1 = 13.0$ $\log k_2 = 9.9$ $\log k_3 = 8.7$
2-Metil-L-dopa		$\log k_1 = 12.0$ $\log k_2 = 10.6$ $\log k_3 = 9.2$ $\log k_4 = 2.2$
Isoprenalina		$\log k_1 = 12.0$ $\log k_2 = 10.1$ $\log k_3 = 8.6$
Adrenalona		

adrenalina, noradrenalina, dopamina y L-dopa, en forma libre y conjugada con sulfato o como glucurónidos (3).

El resto de las CAs de la Tabla I.1, 2-metil-L-dopa (MD), adrenalona (AO), e isoprenalina (ISO), son de origen sintético. El 2-metil-L-dopa y la isoprenalina tienen diversas aplicaciones farmacológicas. La adrenalona se utiliza en la industria como precursor en la síntesis de adrenalina (1).

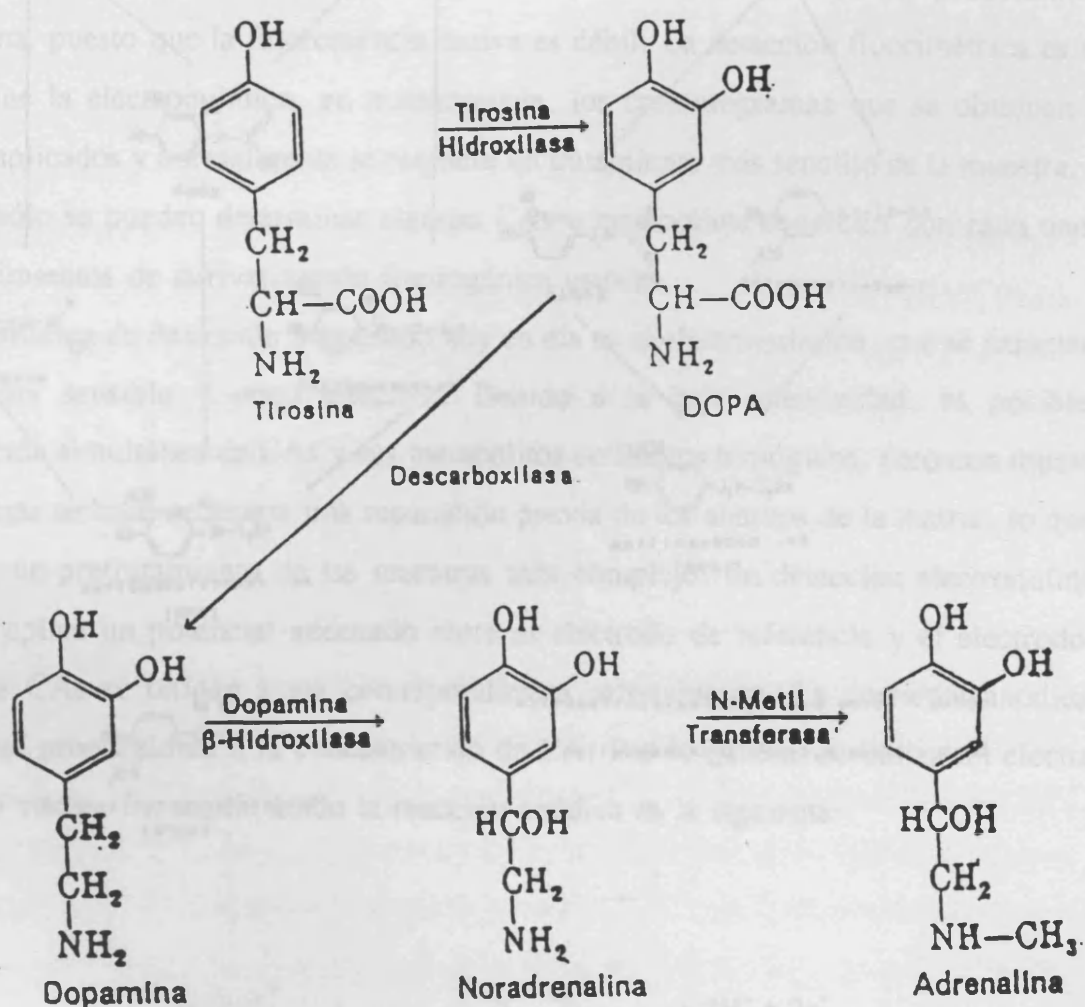


Figura I.1. - Biosíntesis de las CAs.

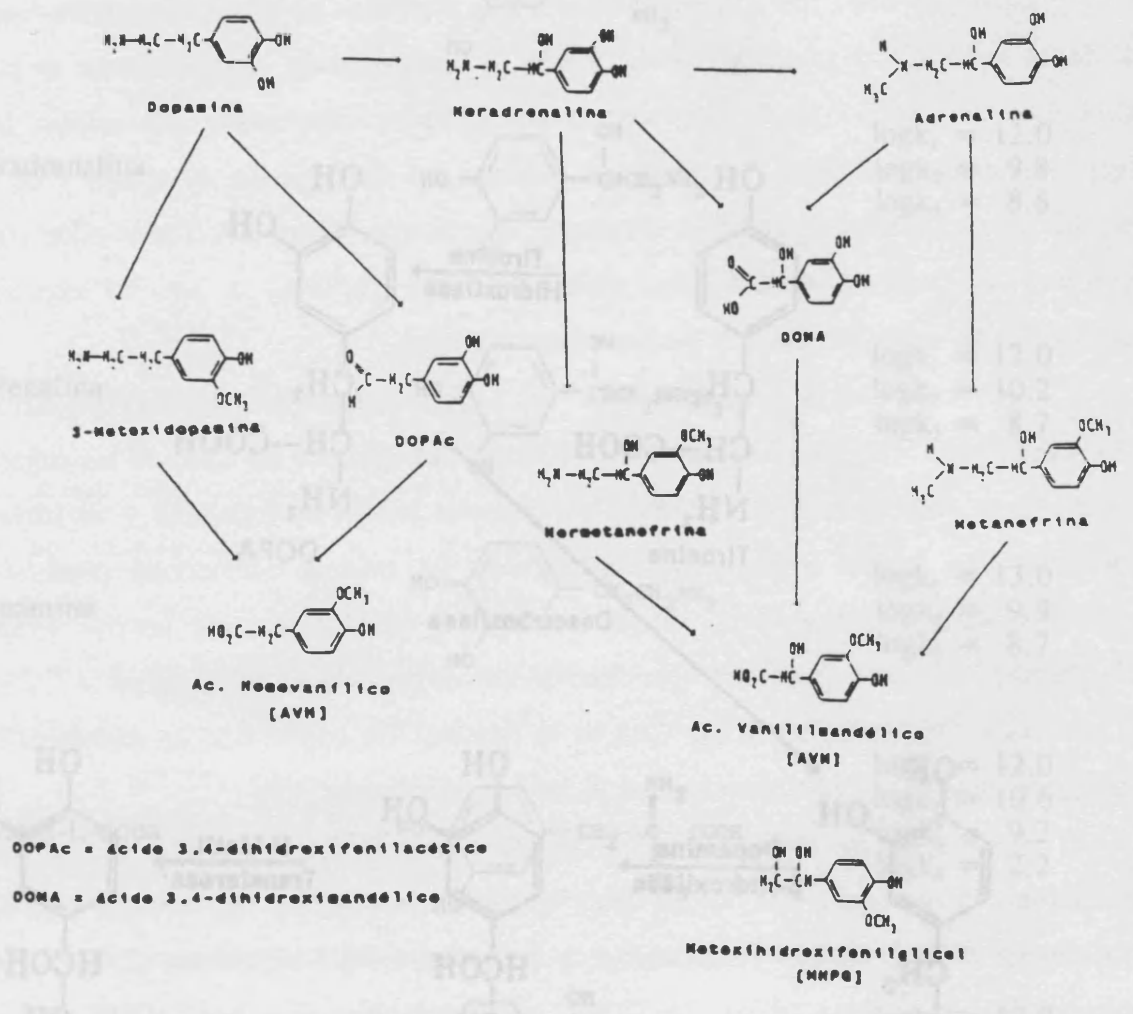


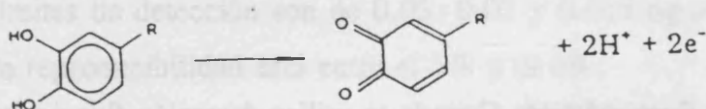
Figura 1.2.- Metabolismo de las CAs.

I.2.- Determinación de CAs en fluidos biológicos por HPLC

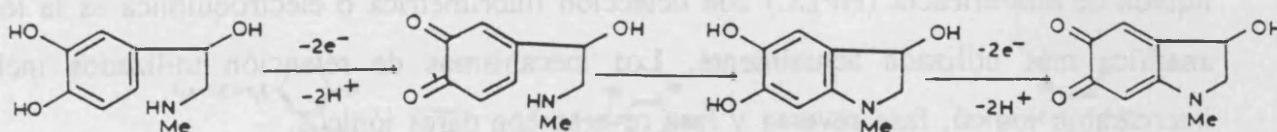
La determinación individual de CAs en fluidos biológicos requiere el uso de una técnica de separación selectiva, y de técnicas de detección muy sensibles. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica o electroquímica es la técnica analítica más utilizada actualmente. Los mecanismos de retención utilizados incluyen intercambio iónico, fase reversa y fase reversa con pares iónicos.

Con detección fluorimétrica, en general se utiliza derivatización precolumna o postcolumna, puesto que la fluorescencia nativa es débil. La detección fluorimétrica es más selectiva que la electroquímica, en consecuencia, los cromatogramas que se obtienen son menos complicados y normalmente se requiere un tratamiento más sencillo de la muestra. Sin embargo, sólo se pueden determinar algunas CAs o metabolitos concretos con cada uno de los procedimientos de derivatización fluorogénica usuales.

El sistema de detección más usado hoy en día es el electroquímico, que se caracteriza por ser muy sensible y poco selectivo. Debido a la baja selectividad, es posible la determinación simultánea de CAs y sus metabolitos en fluidos biológicos, pero con muestras tan complejas se hace necesaria una separación previa de los analitos de la matriz, lo que se traduce en un pretratamiento de las muestras más complejo. En detección electroquímica, cuando se aplica un potencial adecuado entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, las CAs se oxidan a sus correspondientes ortoquinonas. La corriente anódica es directamente proporcional a la concentración de CA. Por lo general se utiliza un electrodo de carbono vítreo. En medio ácido la reacción anódica es la siguiente:



Sin embargo, en medio básico, según indican Kissinger y col. (4) la base libre de la alquilamina ataca al núcleo aromático para dar un compuesto intermedio, el cual puede ser también oxidado según se muestra en la siguiente reacción:



Si esta adición nucleofílica fuese suficientemente rápida, respecto al tiempo de residencia del compuesto en la celda del detector, se obtendría una respuesta más sensible que la obtenida en medio ácido. Sin embargo, ya que este efecto depende de la velocidad de la adición nucleofílica, en realidad la respuesta para la noradrenalina y la dopamina no aumenta significativamente a pH 7.3. En consecuencia, la detección electroquímica se realiza en medio ácido.

A continuación se comentan algunos métodos cromatográficos seleccionados, ordenados atendiendo al mecanismo de retención, y dentro de éste, al modo de detección.

a) Cromatografía de intercambio iónico

Detección electroquímica: Existen pocas referencias bibliográficas que utilicen la detección electroquímica cuando la separación de las CAs se realiza mediante cromatografía de intercambio iónico, y ésta se ha aplicado generalmente a la determinación en extractos de tejidos cerebrales. Así, Saraswat y col. (5) determinan DA en este tipo de muestras utilizando una fase estacionaria Zipax SCX y tampón citrato-acetato de pH 5.1. El potencial aplicado es +0.6 V.

Detección fluorimétrica: Cuando se utiliza detección fluorimétrica en cromatografía de intercambio iónico se realiza derivatización postcolumna. Froehlich y col. (6) utilizan una columna intercambiadora iónica fuerte Bondapak SCX, y como fase móvil un tampón cítrico-acético de pH 2.8 para separar NA, DA y D. La derivatización se realiza con o-ftaldehidomercaptoetanol (OPA-Me) a pH 10.2, que da lugar a la formación de isoindoles 1-alkil-2-

tiosustituidos, altamente fluorescentes. Los límites de detección están entre 4 y 9 ng y la reproducibilidad es del 8%. El método no permite la determinación de A ya que la reacción de derivatización sólo se produce con aminas primarias.

Seki (7) propone la formación de un derivado fluorescente de la DA mediante oxidación de ésta en medio básico a 80 °C con $K_3Fe(CN)_6$ y en presencia de ácido p-aminobenzoico, para su determinación en plasma. La DA es separada del plasma por adsorción en la resina intercambiadora catiónica Amberlita GC50 a pH 6.3, seguida de elución con disolución de ácido bórico. La separación cromatográfica se efectúa mediante una columna de Amberlita IRC50, utilizando como fase móvil tampón succinato-borato a pH 6.3. Los calibrados son lineales en el intervalo 0.05-100 ng.

Mori (8) determinó CAs en orina mediante la separación de las mismas con una columna Zipax SCX, tampón fosfato 0.04 M de pH 4.3 a 40 °C como fase móvil y utilizando el método del trihidroxi-indol (THI) en la derivatización postcolumna. Las CAs fueron separadas de la orina por extracción con alúmina. Las curvas de calibrado fueron lineales entre 0.5 y 50 ng para NA y A, y entre 0.02 y 0.5 μg para DA. La reproducibilidad fue del 0.5% para NA y A, y del 4.8% para DA. También pueden determinarse A y NA por inyección directa de orina centrifugada, utilizando una columna Hitachi gel 3011C, y como fase móvil tampón cítrico 0.075 M de pH 4.0 a 55 °C. En este último caso la columna debe acondicionarse previamente, para lo cual se utiliza la misma fase móvil anterior, modificada por adición de un 10% de acetonitrilo. Los calibrados son lineales entre 1 y 20 ng para NA, y entre 0.5 y 10 ng para A, con una reproducibilidad del 1%. (8).

Honda y col. (9) determinan CAs en orina, previa extracción con alúmina, utilizando como fase estacionaria una columna Hitachi 3011C, y una mezcla de K_2HPO_4 0.05 M y H_3PO_4 0.05 M a 45 °C como fase móvil. La derivatización postcolumna se realiza con 2-cianoacetamida a 100 °C en tampón borato, para formar compuestos n-heterocíclicos fluorescentes. Los límites de detección son de 0.05, 0.02 y 0.015 ng para A, NA y DA, respectivamente, y la reproducibilidad está entre el 3% y el 6%.

Seki y col. (10-12) utilizan glicilglicina en medio básico y en presencia de ferricianuro y sulfato de zinc para la derivatización de las CAs. La reacción tiene lugar a 90 °C, formándose un derivado heterocíclico fluorescente por condensación del grupo oxo de las CAs oxidadas con el grupo amino de la glicilglicina. El método ha sido aplicado a la

determinación de CAs en orina previa separación con Amberlita GC50, reteniéndolas a pH 6.5 con tampón fosfato y eluyendo con ácido bórico 0.67 M. La separación cromatográfica de las CAs se realizó con Amberlita IRC50 (10) o Asahipak ES-502C (11) utilizando como fase móvil una disolución que contenía ácido bórico 0.35 M, ácido tartárico 0.12 M, y EDTA 0.5 mM a 50 °C en el primer caso, y succinato sódico 0.05 M a pH 5.25 conteniendo borato 0.015 M y EDTA 0.5 mM a 60 °C, en el segundo. Los límites de detección están entre 0.2 y 0.6 ng, y la reproducibilidad en torno al 3%.

Los mismos autores utilizaron inyección directa de orina en un sistema "column-switching" y derivatización postcolumna con glicilglicina. El sistema estaba formado por una columna Asahipak ES-502N conectada en serie a una columna cromatográfica Asahipak ES-502C. La separación tiene lugar a 30 °C utilizando como fase móvil tampón succinato-borato de pH 6.7 conteniendo EDTA 0.5 mM. La muestra de orina, diluída de 5 a 20 veces, se inyecta directamente en la primera columna, donde permanece 53 min. Seguidamente se deja pasar fase móvil por ambas columnas durante 10 min antes de volver a inyectar la orina en la primera columna. Los límites de detección son de 0.9 ng para NA y A, y de 3.8 ng para DA, y la reproducibilidad está entre el 1 y el 3% (12).

b) Cromatografía en fase reversa

Detección electroquímica: Cuando se utiliza detección electroquímica, debido a los bajos factores de capacidad que se obtienen para NA y A, y a las complicadas cabezas de cromatograma que resultan para las muestras de fluidos biológicos, es necesario realizar un complejo pretratamiento de las muestras en varias etapas.

Benedict (13) determina CAs en orina y plasma, utilizando como fase estacionaria una columna capilar (minibore) formada por una columna C_{18} de 3 cm, acoplada a una columna C_8 de 22 cm, y como fase móvil tampón citrato-acetato de pH 2.3. El potencial aplicado es +0.7 V. La extracción se realiza en dos etapas. En la primera se pasan las CAs en medio ácido a través de dos columnas de extracción en fase sólida, con fases C_1 y SCX acopladas. La fase SCX retiene los urocromos catiónicos y la C_1 los hidrofóbicos. Seguidamente se ajusta el pH a 7.5 con Tris y se pasa a través de una columna de fenilborato, eluyendo con HCl 0.1 N. El plasma, previamente desproteinizado se pasa directamente a través de la

columna de fenilborato. Los calibrados son lineales entre 20 pg y 50 ng, y la reproducibilidad está entre el 8 y el 12%.

Weicker (14) determina CAs libres y sulfoconjugadas en muestras de orina y plasma. Las CAs se separan de la orina en dos etapas, utilizando una resina de intercambio iónico Bio-Rex 70 en la primera, y adsorción sobre alúmina en la segunda. Las CAs plasmáticas se adsorben directamente sobre alúmina. Las CAs sulfoconjugadas se hidrolizan previamente tratándolas a 37 °C con arilsulfatasa VI. La separación cromatográfica se realiza con una columna C₁₈ utilizando como fase móvil un tampón Tris de pH 8.7 conteniendo EDTA. El potencial aplicado para la detección es de + 0.7 V.

Detección fluorimétrica: En cromatografía de fase reversa, la detección fluorimétrica es la más utilizada, y generalmente se realiza derivatización precolumna. Tsuchiya y col. (15) adsorben las CAs sobre alúmina con tampón Tris de pH 8.6, las dansilan en la misma fase sólida durante 30 min a temperatura ambiente y eluyen los productos fluorescentes en medio ácido. La separación cromatográfica se realiza a 50 °C con una columna Lichrosorb RP-18, y utilizando como fase móvil una mezcla acetonitrilo-ácido acético-agua (30:5:65 v/v). La respuesta es lineal de 2 a 90 ng y el límite de detección es de 0.2 ng.

En la bibliografía aparecen diversos métodos en los que se ha utilizado la derivatización precolumna con o-ftaldehido-mercaptoetanol (OPA-ME) y posterior separación por fase reversa de los productos fluorescentes. Davis (16) determina NA, DA y otras aminos primarias en suero y orina. Las muestras, previamente desproteinizadas, se derivatizan a pH 10.4 y los productos fluorescentes se extraen en acetato de etilo. La separación cromatográfica se realiza sobre una columna μ Bondapak phenyl/porasil, con una fase móvil tampón fosfato de pH 5.1, al que se aplica un gradiente de metanol o acetonitrilo. Los calibrados son lineales de 200 pg a 50 ng y la reproducibilidad es del 6%.

Todoriki y col. (17) retienen las CAs de extractos de cerebro de rata en alúmina a pH 8.6, y las derivatizan con OPA-ME en la misma fase sólida, eluyendo los derivados fluorescentes con acético 0.4 M en etanol. La separación cromatográfica se hace a 50 °C con una columna Lichrosorb RP-18, utilizando como fase móvil acetonitrilo-tampón monocloroacetato de pH 2.5 (35:65 v/v). Como detector se emplea un fluorímetro equipado con un láser de Ar⁺ como fuente de excitación a 351 y 363 nm, con una potencia de 15 mW. Los límites de detección son de 5 pg para NA y de 16 pg para DA.

Nozaki y Ohba (18) proponen un sistema "on line" para determinar CAs en orina. La extracción y la derivatización con OPA-ME tienen lugar en una misma etapa. Las muestras de orina, diluídas en tampón fosfato de pH 8.4, son simultáneamente extraídas y derivatizadas en una columna de gel de ácido bórico a pH 11, con una fase móvil que contiene OPA y ME. Los derivados son eluídos y separados mediante una segunda columna ODS-4PW, utilizando una fase móvil 10 mM biftalato potásico-acetonitrilo-tetrahidrofurano-ácido fosfórico (280:120:20:0.33 v/v). Los límites de detección son de 0.2 y 20 ng para NA y DA, respectivamente, y la reproducibilidad es del 3.5%.

La 1,2-difeniletildiamina reacciona con las CAs en presencia de $K_3Fe(CN)_6$ a pH 6.5-7 y a 37 °C para formar productos altamente fluorescentes (19). Los límites de detección están entre 0.3 y 0.5 pg. Esta reacción se ha empleado como método de derivatización precolumna para la determinación de CAs en plasma y orina. Las CAs se separan previamente de la matriz de la orina o plasma mediante extracción líquido-líquido utilizando tampón amonio-amoníaco de pH 8.6, conteniendo 2% de complejo difenilborato-etilendiamina y 0.5% de EDTA como fase acuosa, y heptano-cloroformo (4:1) conteniendo 0.5% de bromuro de tetraoctilamonio como fase orgánica (20, 21). La separación cromatográfica de los derivados fluorescentes se realiza bien con una columna I.P. SGX C_{18} , empleando como fase móvil 0.05 M acetona-50 mM ácido cítrico-1 mM K_2HPO_4 (2:1:1 v/v) (20), o bien con una columna MicroSpher C_{18} utilizando como fase móvil acetato sódico 1 M de pH 7-acetonitrilo-metanol (50:40:8 v/v) (21).

Nohta y col. (22) proponen la separación de las CAs de orina o plasma mediante adsorción sobre resina de intercambio catiónico Toyopak IC-SP S a pH 5.8 con tampón fosfato, seguida de elución con 0.6 M KCl-MeCN (1:1 v/v) conteniendo $K_3Fe(CN)_6$ 0.6 M. Las CAs son posteriormente derivatizadas con 1,2- difeniletildiamina, y separadas cromatográficamente sobre una columna TSK-gel ODS-120T, utilizando como fase móvil una mezcla acetonitrilo-metanol-tampón Tris de pH 7 (5:1:4 v/v). Los mismos autores han propuesto la derivatización directa de las CAs en la orina, sin eliminar previamente la matriz (23).

c) Cromatografía en fase reversa con pares iónicos

Detección electroquímica: La cromatografía de fase reversa de pares iónicos con detección electroquímica es el método más utilizado hoy en día para la determinación de CAs en muestras de fluidos biológicos, sin embargo, debido a la complejidad de las matrices biológicas, al envenenamiento de los electrodos, a la alta sensibilidad y a la baja selectividad de este tipo de detección, los cromatogramas resultantes pueden ser muy complicados, siendo necesaria una o varias etapas de pretratamiento de la muestra.

Generalmente se hace uso de adsorción sobre alúmina en medio básico, selectiva para el grupo catecol. Además, la facilidad de oxidación de este grupo evita la interferencia de muchos compuestos que se oxidan a potenciales más altos. Para muchos autores la extracción con alúmina proporciona selectividad suficiente cuando se trata de muestras de tejidos cerebrales, sin embargo, para matrices biológicas más complejas, como plasma y sobre todo orina, se necesita normalmente una etapa previa adicional, en la que se utilizan columnas de extracción en fase sólida de intercambio catiónico débilmente ácidas (24-26), C_{18} (27) o extracción líquido-líquido (28-30).

Por otra parte, para confirmar la identidad de los picos, se han propuesto diversos métodos. Por ejemplo, pueden obtenerse los voltamperogramas característicos de cada soluto inyectando varias réplicas y detectando a varios potenciales. Representando el cociente entre la respuesta obtenida a cada potencial, y la respuesta máxima frente al potencial aplicado, aparecen curvas sigmoidales características de cada soluto que permiten caracterizar el pico (31). La identificación del pico también puede confirmarse por comparación de los cocientes corriente de oxidación/corriente de reducción obtenidos con los patrones, con los obtenidos en los cromatogramas de plasma y orina (26, 30, 31).

Rizzo y col. (32) han propuesto utilizar una matriz de electrodos constituida por electrodos coulombimétricos que operan a diferentes potenciales generando múltiples cromatogramas. El cociente entre las alturas de pico obtenidas a distintos potenciales es característico de cada sustancia. Con este sistema es posible un examen general cualitativo (screening) de CAs, metabolitos y otras sustancias de interés en muestras de fluidos biológicos.

Detección fluorimétrica: La detección fluorimétrica en cromatografía de fase reversa de pares iónicos es menos utilizada que la electroquímica, ya que su aplicabilidad queda restringida a algunas CAs, dependiendo de la reacción de derivatización utilizada.

Anderson (33) y Said y col. (34) determinan CAs libres en orina utilizando la fluorescencia nativa. Las CAs son separadas de la matriz mediante adsorción sobre alúmina a pH 8.6 con tampón Tris. Anderson parte de 2 ml de muestra y eluye con 200 μ l de HAc 1M, mientras que Said y col. parten de 4 ml, eluyendo con 1 ml de HClO₄ 0.15 M. Anderson separa cromatográficamente las CAs mediante una fase estacionaria Ultrasphere C₁₈, utilizando como fase móvil 27-30% acetonitrilo-70-73% tampón fosfato 0.1 M de pH 3.5 conteniendo 1 g/l de SDS y 25 mg/l de EDTA. Los límites de detección están entre 60 y 90 pg y los coeficientes de variación entre el 3 y el 12%. Said y col. emplearon como fase estacionaria una columna Nucleosil 100/C₁₈, y como fase móvil metanol-tampón fosfato 0.075 M de pH 4 conteniendo 0.15 mM EDTA y 6 mM heptanosulfonato sódico (18:32, v/v). Los límites de detección varían entre 0.17 y 0.46 ng, y los coeficientes de variación son inferiores al 10%.

Causon y Carruthers (35) determinan NA y A en muestras de tejidos cerebrales y en orina mediante extracción sobre alúmina, utilizando el método del THI para la derivatización postcolumna. La separación se hace mediante una columna Hypersil ODS, utilizando como fase móvil un tampón citrato-fosfato conteniendo ácido octanosulfónico. El límite de detección es de 10 pg.

Kamahori y col. (36) determinan CAs en plasma utilizando 1,2-difeniletildiamina para la derivatización precolumna. Utilizan un sistema "column switching", compuesto por una precolumna de polímeros porosos con residuos de butilo y una columna ODS. Las CAs, previamente complejadas en tampón borato, son derivatizadas y posteriormente retenidas en la precolumna a pH 7.3. La elución de los derivados fluorescentes de la primera columna, y su posterior separación cromatográfica, se hace utilizando como fase móvil tampón borato a pH 7.3 que contiene acetonitrilo, metanol y SDS.

I.3.- Determinación de CAs en preparados farmacéuticos

Los métodos más utilizados en la determinación de CAs en preparados farmacéuticos son los volumétricos, espectrofotométricos y HPLC. Dentro de los métodos volumétricos, generalmente se utilizan valoraciones ácido-base en medio acuoso y no acuoso (37, 38).

a) - Métodos espectrofotométricos

Existen una gran cantidad de métodos espectrofotométricos que han sido aplicados a la determinación de CAs en preparados farmacéuticos. Algunos de ellos se basan en la medida directa de la absorbancia a 280 nm (38) y otros muchos en la derivatización cromogénica. En muchos casos se hace uso de la oxidación a aminocromos, habiéndose empleado para ello diversos oxidantes como $K_3Fe(CN)_6$ (39), I_2 (40,41), NH_4VO_3 (42), Fe(III) (42), bromamina T (43), resazurina (44) y IO_3^- (45).

También se han propuesto otras reacciones cromogénicas. Así por ejemplo Salem (46) determinó metildopa y noradrenalina mediante oxidación con vainillina en medio alcalino, midiendo la absorbancia a 420 nm. El acoplamiento oxidativo con aminofenoles se ha utilizado para determinar diferentes CAs en preparados farmacéuticos (47-49). Las quinonas halogenadas también dan lugar a acoplamiento oxidativo con las CAs. La reacción ha sido utilizada para determinar NA (50,51) y A e ISO (52) en preparados farmacéuticos. El acoplamiento a pH 7.5 con p-fenilendiamina fue propuesto por Salem (53) para la determinación de A, NA, MD e ISO en preparados farmacéuticos.

La reacción entre las quinonas formadas por oxidación de la NA o del metildopa y el p-dimetilaminoformaldehído o el p-metilaminocinamaldehído, da lugar a iminas conjugadas coloreadas, lo que se ha utilizado para la determinación de estas CAs (54-56). La reducción de una sal de 2,3,5-trifeniltetrazolio por las CAs, y posterior medida del formazano formado a 485 nm se ha empleado para la determinación de A, NA y MD en diversos preparados farmacéuticos (57,58).

La oxidación con Fe(III) ofrece diferentes posibilidades para la determinación espectrofotométrica de las CAs. Además de poderse evaluar el aminocromo formado, es posible evaluar el Fe(II) obtenido en la reacción redox, complejándolo con o-fenantrolina (59) o con 2,4,6-tris(2-piridil-s-triazina) (60). Fujita y col. (61) proponen la reacción que tiene

lugar entre 1,2-difenoles, fenilfluorona y Fe(III) para la determinación espectrofotométrica de difenoles, midiendo la absorbancia a 630 nm. Los autores aplicaron esta reacción a la determinación de NA, D, ISO y MD en preparados farmacéuticos.

La p-benzoquinona, a temperatura ambiente y en medio agua/etanol, reacciona con las CAs con formación de derivados que absorben entre 485 y 500 nm. La reacción ha sido aplicada a la determinación de A, NA e ISO en preparados farmacéuticos (62). El ácido cloránico forma con las CAs complejos de transferencia de carga que absorben a 325 nm, lo que ha sido aplicado a la determinación de CAs en preparados farmacéuticos (63). El acoplamiento de compuestos fenólicos con sales de diazonio puede aplicarse a la determinación de las CAs, midiendo la absorbancia del azocolorante formado. Esta reacción ha sido aplicada a la determinación de A, NA e ISO en preparados farmacéuticos (64). También se han utilizado otros reactivos cromogénicos como NaNO_2 (65), xantidrol (66), resorcinol (67) y benzoilhidrazina (68).

b) HPLC

En la U.S. Pharmacopeia XXII (38) aparecen diversos métodos para la determinación de CAs mediante HPLC y detección UV a 280 nm. Para ello se utiliza cromatografía de fase reversa, con fases móviles acuosas tamponadas con fosfato a diferentes pHs, o hidroorgánicas conteniendo metanol y tampón fosfato, y cromatografía de pares iónicos.

Allgire y col. (69) determinan D- y L-adrenalina en anestésicos locales. Para ello, separan la A mediante extracción en fase sólida con cartuchos Sep-Pack C_{18} , la derivatizan con isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-*o*-acetil- β -D-glucopiranosilo, y separan los derivados cromatográficamente utilizando una fase estacionaria Lichrosorb RP-18 y una fase móvil conteniendo tampón fosfato de pH 2.9 y metanol (0.675:0.325).

Scott y col. (70) determinan D- y L-adrenalina en soluciones oftálmicas. Utilizan una columna Spherisorb ODS, y una fase móvil conteniendo tampón fosfato de pH 4 con heptanosulfonato sódico 0.14 M/acetronitrilo (97/3). La detección de los enantiómeros se realiza simultáneamente con un detector espectrofotométrico, a 250 nm, y un polarímetro modificado, a 303 nm.

Subrt y col. (71) determinan A en soluciones e inyectables mediante cromatografía de pares iónicos y detección UV a 280 nm y electroquímica. Como fase estacionaria utilizan

una columna C_{18} y como fase móvil una mezcla agua/acetonitrilo/dodecilsulfato sódico 0.01 M/ $HClO_4$ (500:400:100:0.10). También mediante cromatografía de pares iónicos, y detección UV a 220 nm, Smela y col. (72) determinan NA, A, ISO y otros fármacos simpatomiméticos en preparados farmacéuticos. Como fase estacionaria emplean una columna Partisil-5 ODS-3, y como fase móvil 1-octanosulfonato sódico 0.01 M en ácido acético 0.2%/metanol (70:30). Los límites de detección son del orden de 30-60 ng y la reproducibilidad está próxima al 1%.

I.4.- Espectroscopía de lente térmica

a) - Espectroscopías fototérmicas

La radiación láser, caracterizada por su elevada potencia, direccionalidad, monocromaticidad, coherencia espacial y temporal, permite obtener nueva información espectroscópica, la cual es muy difícil o imposible de obtener con las fuentes de radiación clásicas. Se han ido desarrollando diversas técnicas analíticas basadas en el uso del láser, entre ellas, en este trabajo se utiliza la espectroscopía fototérmica (EFT).

La espectroscopía fototérmica está basada en el efecto fototérmico, originado por la absorción de radiación láser. Cuando un haz láser es absorbido por una muestra, la relajación no radiante de las especies excitadas da lugar a un gradiente térmico en torno a la región iluminada, que a su vez origina gradientes de otras propiedades físicas, como la densidad y el índice de refracción. Concretamente la presencia de un gradiente de índice de refracción permite considerar la porción de muestra iluminada y su entorno como un elemento óptico. Las propiedades ópticas de este elemento (distancia focal en lentes, espaciado de los nodos en redes de difracción, etc.) dependen de la intensidad del gradiente, la cual a su vez es proporcional a la cantidad de energía absorbida y, por tanto, proporcional a la concentración de especies absorbentes. Esta última relación posibilita el aprovechamiento analítico del efecto fototérmico.

Las principales ventajas que ofrece la espectroscopía fototérmica frente a la espectrofotometría son su alta sensibilidad, bajo ruido de fondo y resolución espacial. Por otra parte, las diversas variantes de la espectroscopía fototérmica posibilitan la medida de absorbancias extremadamente bajas en gases, líquidos, superficies y sólidos transparentes,

pudiendo aplicarse a la resolución de problemas analíticos muy diversos. Además en estas técnicas es usual el utilizar volúmenes de muestra del orden del μl .

Desde mediados de los años 60 han ido apareciendo numerosas variantes de la espectroscopía fototérmica basadas en la formación de diferentes elementos ópticos fototérmicos. Así la formación de una lente térmica ha dado lugar a la espectroscopía de lente térmica (73), la de un prisma a la espectroscopía de deflexión térmica (74), la de una red de difracción a la espectroscopía de difracción térmica (75), etc. Existen en la bibliografía diversas revisiones acerca de estas técnicas y sus aplicaciones (76-83).

b) - Fundamento de la espectroscopía de lente térmica

La espectroscopía de lente térmica (ELT) en su variante de bomba-prueba utilizando dos láseres, es probablemente una de las técnicas fototérmicas más utilizadas. Otras variantes son la de haces cruzados y la de bomba-prueba utilizando una sola fuente láser cuyo haz se divide en dos. En la Figura I.3 se esquematiza el funcionamiento de un espectrómetro de lente térmica en configuración de bomba-prueba de haces concéntricos. Uno de los dos haces, "el haz de bombeo", es de mediana potencia (50-500 mW, si se utiliza un láser continuo) y de longitud de onda adecuada para ser absorbido por la muestra. Al ser absorbido crea el efecto fototérmico. El otro haz, "el haz de prueba", que se utiliza para medir la intensidad del efecto, es de baja potencia (unos pocos mW) y preferiblemente no debe ser absorbido por la muestra.

En espectroscopía de lente térmica se utilizan láseres que operan en el modo TEM_{00} , es decir que su perfil de intensidad es gaussiano, careciendo de nodos. La absorción del haz de bombeo por la muestra genera un aumento de temperatura en la región iluminada, mayor en el centro del haz que en las regiones externas, por lo que el elemento óptico así formado tiene forma de lente. En los disolventes más usuales, el gradiente del índice de refracción con la temperatura es negativo, por ello la lente formada es divergente. Con el fin de que el gradiente térmico tenga un valor máximo, el haz de bombeo debe ser enfocado en el interior de la muestra. Como se muestra en la Figura I.3, la cintura del haz de bombeo, es situada por la lente L1 en el interior de la cubeta de la muestra.

Por su parte el haz de prueba debe presentar cierta convergencia o divergencia neta antes de atravesar la lente térmica generada por el haz de bombeo. De este modo, la lente

térmica provocará un efecto de enfoque o desenfoque del haz de prueba en el campo lejano. Es usual colocar la cintura del haz de prueba antes de la muestra, observándose un máximo desenfoque del haz cuando la cintura del mismo se sitúa a una distancia confocal de la muestra. Esta función la desempeña la lente L2. Con ayuda del divisor de haz (D) se hacen coincidir coaxialmente los haces a su paso por la muestra.

Después de la muestra, el filtro, F, elimina el haz de bombeo y deja pasar el de prueba. El efecto de lente térmica, de aumentar la divergencia del haz de prueba, puede observarse a simple vista sobre una pantalla situada en el campo lejano. La distorsión del perfil de intensidad del haz de prueba puede medirse con un detector sensible a la intensidad. Para ello puede utilizarse un fotodiodo frente al que se sitúa una máscara de orificio (pinhole), o una rendija horizontal.

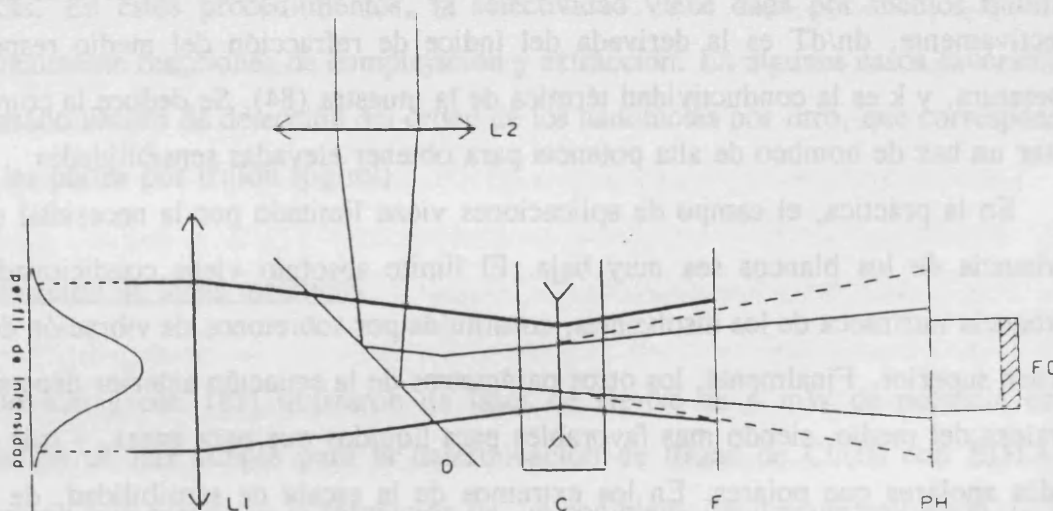


Figura 1.3.- Fundamento de la espectroscopía de lente térmica. Configuración bomba-prueba de haces coaxiales. L = lente, D = divisor de haz, C = cubeta, F = filtro, pH = máscara de orificio, FD = fotodiodo. Haces de bombeo y de prueba en trazo grueso y fino, respectivamente.

Usualmente se modula el haz de bombeo mediante un obturador rotatorio, lo que da lugar a una lente térmica pulsante que se crea y se disipa en cada ciclo, siendo por tanto el haz de prueba enfocado y desenfocado por la lente térmica a la frecuencia de modulación. Ello permite tomar medidas repetidas de la intensidad del haz de prueba en presencia y

ausencia de la lente térmica y promediar los resultados a lo largo de una serie de ciclos. En el detector se produce una corriente alterna cuya amplitud, medida por un registrador X-tiempo, un amplificador sincrónico (lock-in) o por un sistema computerizado de adquisición y tratamiento de datos, es proporcional a la concentración de especies absorbentes.

c) - Características analíticas

En un espectrómetro de lente térmica, la señal es directamente proporcional a la absorbancia y a un factor de amplificación, E, que viene dado por:

$$E = \frac{0.52 P (dn/dt)}{\lambda k} \quad [I.1]$$

donde P y λ son la potencia del haz de bombeo y la longitud de onda del haz de prueba, respectivamente, dn/dT es la derivada del índice de refracción del medio respecto a la temperatura, y k es la conductividad térmica de la muestra (84). Se deduce la conveniencia de usar un haz de bombeo de alta potencia para obtener elevadas sensibilidades.

En la práctica, el campo de aplicaciones viene limitado por la necesidad de que la absorbancia de los blancos sea muy baja. El límite absoluto viene condicionado por la absorbancia intrínseca de los disolventes, constituida por sobretonos de vibración de enlaces de orden superior. Finalmente, los otros parámetros de la ecuación anterior dependen de la naturaleza del medio, siendo mas favorables para líquidos que para gases, y más aún para líquidos apolares que polares. En los extremos de la escala de sensibilidad, de menor a mayor podrían citarse el agua y el tetracloruro de carbono, con valores de E entre 0.14 y 4.7 mW^{-1} , respectivamente. Estos valores están expresados por mW de potencia de bombeo y para un haz de prueba de 632.8 nm, que es una de las líneas de emisión del la mezcla He-Ne (81). Los valores de sensibilidad en agua pueden mejorarse considerablemente por adición de otro disolvente como etanol o acetona. Resulta particularmente prometedor el uso de fluidos supercríticos. Así, para CO_2 a 34°C y 77 atm, se tiene un valor de E de 790 mW^{-1} (a 632.8 nm) (78).

La combinación de la elevada sensibilidad con un ruido de fondo muy bajo da lugar a excelentes límites de detección que, expresados en absorbancias son del orden de 10^{-6} en agua y de hasta 10^{-8} en tetracloruro de carbono. Las curvas de calibrado presentan un

intervalo dinámico que, cuando el blanco presenta una señal y ruido de fondo muy bajos, puede abarcar mas de tres órdenes de magnitud.

d) - Aplicaciones analíticas

Hasta la fecha, el desarrollo de campos de aplicación específicos de la EFT ha venido propiciado, principalmente, por su extrema sensibilidad. Pueden distinguirse dos tendencias: la determinación de especies fuertemente absorbentes a nivel de ultratrazas, y el estudio y determinación de especies débilmente absorbentes a niveles de concentración relativamente bajos.

El primero de estos campos ha sido el más investigado, habiéndose descrito procedimientos para la determinación de ultratrazas de diversas especies tanto orgánicas como inorgánicas. En estos procedimientos, la selectividad viene dada por medios químicos, fundamentalmente reacciones de complejación y extracción. En algunos casos favorables se han alcanzado límites de detección del orden de los nanomoles por litro, que corresponde al nivel de las partes por trillón (pg/ml).

- Determinación de iones metálicos

Dovich y col. (85) utilizaron un láser de He-Ne de 4 mW de potencia en una configuración de haz simple para la determinación de trazas de Cu(II) con EDTA. La determinación está basada en la formación de un complejo débilmente coloreado ($\epsilon = 47 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que absorbe a 632.8 nm. Debido a la baja sensibilidad obtenida en agua, la determinación se llevó a cabo utilizando una mezcla acetona-agua 3:1. De esta forma se mejoró diez veces el límite de detección que, en términos absolutos, resultó ser de 3.3 ng de Cu(II).

En un estudio posterior, Mori y col. (86) mejoraron considerablemente estos resultados. Para ello, utilizaron compuestos porfirínicos como ligandos coloreados para la determinación de Cu(II), ya que la absorptividad molar de estos complejos es 1000 veces superior a la del complejo de Cu-EDTA ($\epsilon = 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Además los complejos pueden extraerse en cloroformo, aumentándose con ello la selectividad y, especialmente, la sensibilidad de las medidas fototérmicas.

Los compuestos porfirínicos presentan una estrecha banda de absorción sobre 420 nm, longitud de onda que no coincide con las líneas de emisión del láser de Ar^+ , por lo que recurrieron a un láser de colorante pulsado de 1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)]benceno ($\lambda_{\text{em}} = 417$ nm), cuya potencia fue de $20 \mu\text{J}/\text{impulso}$, a 3 Hz de frecuencia. El láser de colorante se bombeó a su vez con un láser de nitrógeno que operaba a una potencia de $0.5 \text{ mJ}/\text{impulso}$. Se utilizó un láser de He-Ne para proporcionar el haz de prueba en una configuración coaxial.

Los autores estudiaron la determinación de Cu(II) en disolución acuosa, basada en la reacción de intercambio iónico del sulfato de Pb(II)-tetrakis(4-N-metil-piridil) porfirín-tetra-p-tolueno. El intervalo dinámico lineal se extendió hasta 2.4×10^{-6} M. Asimismo se estudió la posibilidad de utilizar benceno como extractante, determinando el Cu(II) por reacción con el sulfato ácido de meso-tetrafenil-porfirín-trisulfónico. Sin embargo, la señal del blanco fue muy elevada debido a la absorción del benceno. El empleo de cloroformo como disolvente mejoró el límite de detección de Cu(II), que fue de 30 ppb, unas 30 veces inferior al obtenido en el primer estudio.

La espectroscopía de lente térmica se ha aplicado también a la determinación de Fe(II). Imasaka y col. (87) propusieron la determinación de Fe(II) con 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batofenantrolina) en disolución acuosa a pH 6.5, utilizando una configuración de doble haz. El complejo formado absorbe a 535 nm ($\epsilon = 2.23 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el empleo de la espectroscopía de lente térmica supuso un aumento en la sensibilidad de 7.3 veces respecto a la espectrofotometría. El límite de detección obtenido correspondió a una concentración de Fe(II) de 3×10^{-7} M.

Posteriormente estos mismos autores (88) mejoraron el procedimiento, incorporando a la configuración de doble haz (constituída por un láser de Ar^+ a 100 mW como haz de bombeo, y un láser de He-Ne como haz de prueba) un amplificador sincrónico que operaba a una frecuencia de modulación de 5-10 Hz. Con esta configuración los autores propusieron la determinación de Fe(II) con batofenantrolina, tanto en agua como en cloroformo, en este último caso, previa formación de un par iónico con cloruro de trioctilmetilamonio.

Utilizando 800 mW de potencia de bombeo, el aumento de sensibilidad respecto al procedimiento espectrofotométrico convencional, fue de 70 veces en agua y 1200 veces en cloroformo. El límite de detección correspondió a una concentración de Fe(II) de 2.9×10^{-9}

M en agua y 2×10^{-10} M en cloroformo. Se obtuvieron límites de detección similares utilizando un sistema de detección de fila de diodos, para monitorizar el perfil del haz de prueba (89).

Por último, se ha propuesto un procedimiento para la determinación de Fe(II) con 1,10-fenantrolina en medio metanol-agua 1:1 mediante análisis por inyección en flujo y detección por espectrometría de lente térmica. El límite de detección de hierro, utilizando una celda de flujo de 1 cm de paso óptico y un volumen de inyección de $100 \mu\text{L}$, resultó ser de 37 pg. Los autores indican que el análisis por inyección en flujo minimiza los problemas de inestabilidad fotoquímica de los analitos durante las medidas de lente térmica (90).

Ramis Ramos y col. (91) han estudiado la determinación fototérmica de varios iones metálicos (Pb, Zn, Cd, Hg, Ag, Cu, Bi) con ditizona previa extracción con CCl_4 , utilizando una configuración bomba-prueba de haces coaxiales. Las absortividades molares de los ditizonatos metálicos se encuentran en el intervalo $3 \times 10^4 - 9 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, presentando un máximo de absorción en la región de emisión del láser de Ar^+ . Se bombeó a una potencia de 22 mW y se usó una frecuencia de modulación de 2 Hz. Como haz de prueba se utilizó un láser de He-Ne.

Se obtuvieron para todos los ditizonatos estudiados relaciones prácticamente lineales entre la señal analítica y la concentración de metal. Los límites de detección encontrados para la mayoría de los ditizonatos metálicos, calculados para una relación señal/ruido de 3, fueron del orden de 0.01 ng/mL. Los valores correspondientes a extracciones independientes fueron superiores, debido principalmente a que la ditizona se extrae en cloroformo al pH de trabajo, contribuyendo a la absorbancia del blanco.

Una excepción la constituyó el cadmio, para el cual se obtuvieron límites de detección extremadamente bajos, del orden de 0.008 ng/ml, lo que supone, si asumimos un diámetro del haz de 0.25 mm, un límite de detección absoluto de 4 fg de cadmio. Los autores atribuyen este valor a la despreciable extracción de la ditizona y de ditizonatos de diversas impurezas metálicas en el medio fuertemente básico (NaOH 5%) óptimo para la formación del ditizonato de cadmio, lo que hace que las lecturas del blanco sean extremadamente bajas.

Berthoud y col. (92) propusieron la determinación de Pr^{3+} y Nd^{3+} en presencia de carbonato sódico, utilizando un espectrómetro de lente térmica diferencial en configuración coaxial. El sistema está constituido por un láser de Ar^+ de onda continua que bombea un láser de colorante, y dos cubetas, una de ellas situada antes de la cintura del haz de prueba y la otra después. Se produce una respuesta diferencial colocando en la primera

cubeta el blanco y en la segunda la muestra. La técnica permite la determinación de Pr^{3+} y Nd^{3+} en el intervalo de 7×10^{-5} a 7×10^{-6} M, siendo los límites de detección para ambos, del orden de 10^{-6} M.

- Determinación de especies no metálicas

Se ha utilizado también la espectrometría de lente térmica para la determinación de especies no metálicas. Así, se ha propuesto un procedimiento para la determinación de nitrito en medio acetona-agua 1:1, basado en la reacción de diazotación con dicloruro de N-naftil-etilendiamonio (NED, reactivo de Bratton-Marshall) y sulfanilamida en medio ácido perclórico, utilizando una configuración de haz simple con un láser de Ar^+ (514.5 nm), operando a una potencia de 300 mW. El procedimiento permite la determinación de nitrito en el intervalo 0.2-50 nM. El límite de detección es unas 200 veces inferior al obtenido por espectrofotometría (93).

En un experimento similar, utilizando un láser de colorante (a 600-800 nm), un láser de Ar^+ como haz de bombeo primario y un láser de He-Ne como haz de prueba, se determinó fósforo en agua de mar (94). El procedimiento está basado en su reacción con molibdato amónico para formar azul de molibdeno. La medida se llevó a cabo en medio acetona-agua 1:1. El procedimiento permite la detección de hasta 200 ppt de fósforo, siendo el límite de detección de 13.9 pg/ml.

Posteriormente, Phillips y col. (95) estudiaron la influencia del efecto matriz en la determinación de fósforo en agua de mar mediante EFT. Para ello llevaron a cabo la determinación de fósforo en una disolución de NaCl 0.5 M según el procedimiento anterior, encontrando que el efecto salino provoca un aumento en la señal, por lo que se requiere la preparación de curvas de calibrado con matrices similares, o la aplicación del método de adición estándar, para llevar a cabo la determinación. Más recientemente, en experiencias con lente térmica en las que la muestra se introducía en el seno de la cavidad resonante de un láser, se pudo detectar fósforo a niveles de 0.4 nM, y arsénico a niveles de 1.3 nM (96).

Nakanishi y col. (97) construyeron un espectrómetro de lente térmica utilizando un láser semiconductor, que emite en el infrarrojo cercano (823.9 nm), y lo aplicaron al análisis de trazas de fósforo. La sensibilidad teórica del instrumento utilizando una potencia de 10 mW, fue 61 veces mayor que la proporcionada por un espectrofotómetro. En disolución

acuosa, por el procedimiento del azul de molibdeno, los límites de detección encontrados fueron de 2.2 ppb y 0.7 ppb, utilizando la configuración de haz simple y doble haz, respectivamente. Cuando se realizó una extracción con 2-butanol, se mejoró el límite de detección obtenido por ambos procedimientos, siendo en ambos casos de 0.2 ppb. La determinación también se realizó después de una extracción en cloroformo del par iónico formado con zefiramina (sal de amonio cuaternaria de tetra-decil-dimetilbenceno), obteniendo resultados similares.

La espectrometría de lente térmica se ha propuesto también para la determinación de formaldehído como contaminante atmosférico (98). El procedimiento está basado en la reacción con el ácido cromotrópico. Se estudiaron dos montajes: el monohaz con detector de fotodiodo simple, y un sistema con dos haces que hace uso de un detector de fila de diodos. Los intervalos dinámicos lineales fueron 1.5×10^{-7} - 50×10^{-7} M y 1.5×10^{-8} - 500×10^{-8} M, respectivamente, y los límites de detección calculados como dos veces la desviación estándar del blanco fueron, para ambas configuraciones, de 2.2×10^{-8} M y 5.6×10^{-7} M, respectivamente.

Los autores indican que estos procedimientos suponen una atractiva alternativa a la cromatografía de gases y a la HPLC, ya que la determinación de formaldehído mediante estas técnicas requiere de 30 a 500 L de aire, con tiempos de muestreo de varias horas, mientras que en EFT se requiere tan sólo un litro de aire para detectar $5 \mu\text{g/L}$ de formaldehído.

- Otras aplicaciones

Se ha estudiado la oxidación enzimática de la dopamina en condiciones análogas a las del medio celular, utilizando un espectrómetro de lente térmica de doble haz con amplificador sincrónico, pudiendo detectarse concentraciones de dopamina de $1 \mu\text{M}$ por el método de la pendiente inicial (99).

Se han estudiado los equilibrios de complejación de U(VI) y otros actínidos como Am(III), U(IV), Pu(IV) y Pu(V), con el ion carbonato, utilizando un láser de colorante pulsado como haz de bombeo, y un haz de He-Ne como haz de prueba (100,101). El límite de detección correspondiente a la determinación de complejos de carbonato con U(VI) fue de 5×10^{-7} M. Las concentraciones límite para la especiación de actínidos fueron varios



órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas por espectrofotometría ($\epsilon = 350 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), estando comprendidas entre 3×10^{-8} y 2×10^{-6} M.

Finalmente, se han utilizado espectrómetros de lente térmica que permiten medir en la región del infrarrojo. Así, se ha llevado a cabo la determinación de hidrocarburos en fase condensada utilizando la línea de $3.39 \mu\text{m}$ de un láser de He-Ne, con un límite de detección absoluto de 8 ng de trimetilpentano (102).

En conclusión podemos decir que la EFT ha abierto nuevas perspectivas en el campo de la absorciometría molecular. Es de prever una mayor popularización de estas técnicas a medida que sigan desarrollándose aplicaciones específicas y también, a medida que se produzcan nuevos avances en la tecnología del láser. En buena medida, el desarrollo de las técnicas basadas en láseres de cierta potencia está condicionado por el alto precio, bajo rendimiento (y por tanto, elevado consumo) y excesivo tamaño de los mismos. Sin embargo, la tecnología del láser es un campo de investigación muy activo, en el que aparecen continuamente interesantes innovaciones. La reciente aparición del oscilador paramétrico óptico (OPO), con posibilidad de realizar barridos con radiación láser de alta potencia (rendimiento energético del 20%) entre 200 y 3000 nm abre nuevas y excitantes perspectivas.

I.5.- Cromatografía líquida micelar

La cromatografía líquida micelar (CLM) constituye una alternativa a la cromatografía líquida en fase reversa convencional (RPLC), y a la cromatografía en fase reversa de pares iónicos (RP-IP). En CLM se utilizan como fases móviles disoluciones de tensioactivos en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica (cmc), en lugar de mezclas hidroorgánicas (103-106), como en la cromatografía en fase reversa convencional, o en lugar de disoluciones de tensioactivos en concentraciones inferiores a la cmc, como en RP-IP.

Las micelas no son sistemas estáticos, ya que se encuentran en equilibrio con los monómeros de tensioactivo que existen en disolución en concentración igual a la cmc. Las fases estacionarias de sílice enlazada a cadenas alquílicas (C_1 , C_8 y C_{18}) pueden adsorber tensioactivo, quedando su superficie modificada. Todos los tensioactivos pueden ser adsorbidos hidrofólicamente, y los tensioactivos catiónicos pueden ser adsorbidos silanofílicamente (107). En la adsorción hidrofóbica, la cola apolar del tensioactivo es adsorbida, mientras que la cabeza polar y/o cargada se encuentra en contacto con la

disolución polar. En el caso de tensioactivos iónicos, la fase estacionaria adquirirá capacidad de intercambio iónico con los solutos cargados. En la adsorción silanofílica, la cabeza cargada del tensioactivo catiónico es adsorbida por los grupos silanol de la fase estacionaria, lo que dará a ésta un carácter más hidrofóbico. Para muchos tensioactivos y fases estacionarias, la cantidad de tensioactivo adsorbida una vez equilibrada la fase estacionaria, es independiente de la concentración de tensioactivo si ésta es superior a la cmc (108,109).

La CLM es mucho más compleja que la cromatografía en fase reversa tradicional y que la de pares iónicos. En RP-IP, aunque el tensioactivo se absorbe también sobre la fase estacionaria, confiriéndole capacidad de intercambio iónico, sin embargo en la fase móvil no existen micelas. En cromatografía micelar son posibles un gran número de interacciones de tipo electrostático, hidrofóbico y estérico, tanto con la fase móvil micelar como con la fase estacionaria modificada, que posibilitan la separación cromatográfica de prácticamente cualquier tipo de solutos (110).

a) - Reparto de los solutos

Para explicar el comportamiento cromatográfico de un soluto cuando se utilizan fases móviles micelares, Armstrong y Nome (111) propusieron un modelo de tres fases (fase estacionaria y pseudofases acuosa y micelar). Los solutos pueden repartirse no sólo entre el agua y la fase estacionaria, sino también en la fase móvil entre el agua y la micela, dependiendo la elución de los solutos de tres coeficientes de reparto: El coeficiente de reparto del soluto entre la fase estacionaria y el agua (P_{sw}), entre la fase estacionaria y la pseudofase micelar (P_{SM}), y entre la pseudofase micelar y la pseudofase acuosa (P_{MW}).

Armstrong y Nome (111), y posteriormente Arunyanart y Cline Love (112), propusieron varios modelos para describir los cambios de retención a diferentes concentraciones micelares. Las ecuaciones pueden ser reescritas de la siguiente forma:

$$\frac{1}{k'} = \frac{K_{AM}}{\Phi P_{sw}} [M] + \frac{1}{\Phi P_{sw}} \quad [I.2]$$

donde k' es el factor de capacidad, $[M]$ es la concentración de tensioactivo menos la cmc, Φ es el cociente entre el volumen de fase estacionaria (V_s) y el volumen de fase móvil (V_m) en la columna, y K_{AM} es la constante de asociación soluto-micela (113). La representación

de $1/k'$ vs $[M]$ da lugar a una línea recta, de cuya ordenada en el origen y de su pendiente pueden obtenerse respectivamente ΦP_{sw} y K_{AM} . La Ecuación [I.2] puede emplearse para describir la retención de solutos polares, apolares e iónicos cuando se cromatografían con tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos (110,114).

La determinación de P_{sw} requiere el conocimiento previo de V_s , el cual no es fácil de determinar. Normalmente se toma como valor de V_s la diferencia entre el volumen de la columna vacía y el volumen muerto de la misma, pero esta diferencia da una sobreestimación de V_s , ya que incluye el volumen total ocupado por las partículas de sílice en lugar del volumen verdadero de la fase estacionaria. Dicho valor de V_s originará valores de P_{sw} con un error sistemático significativo, por ello, para calcular V_s deben emplearse procedimientos que excluyan el volumen del material soporte de la fase estacionaria (115).

b) - Interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y su influencia sobre la retención

La naturaleza no homogénea de la fase móvil micelar y de las mismas micelas crea una situación única, en la que diferentes solutos pueden estar sometidos a microentornos de diferentes polaridades en una determinada fase móvil. La retención del soluto depende del tipo de interacción con la micela y con la fase estacionaria modificada. Como se esquematiza en la Figura I.4, los solutos no polares sólo pueden experimentar interacciones hidrofóbicas (Figura I.4a), pero para los solutos cargados pueden presentarse dos situaciones: que el soluto posea la misma carga que el tensioactivo (Figura I.4b), o que su carga sea opuesta (Figura I.4c).

La primera situación se encuentra cuando se cromatografían aniones con tensioactivos aniónicos, o cationes con tensioactivos catiónicos. Las interacciones repulsivas entre la micela cargada y el soluto, en la mayoría de los casos no afectan notablemente a la retención, sin embargo, la repulsión de los solutos por la fase estacionaria provoca una disminución de la retención, y cabría esperar que éstos eluyeran con el volumen muerto. Sin embargo, los solutos pueden ser retenidos por la fase estacionaria si existen interacciones hidrofóbicas, por ejemplo, los iones fenolato y el 2-naftolato pueden ser retenidos utilizando SDS.

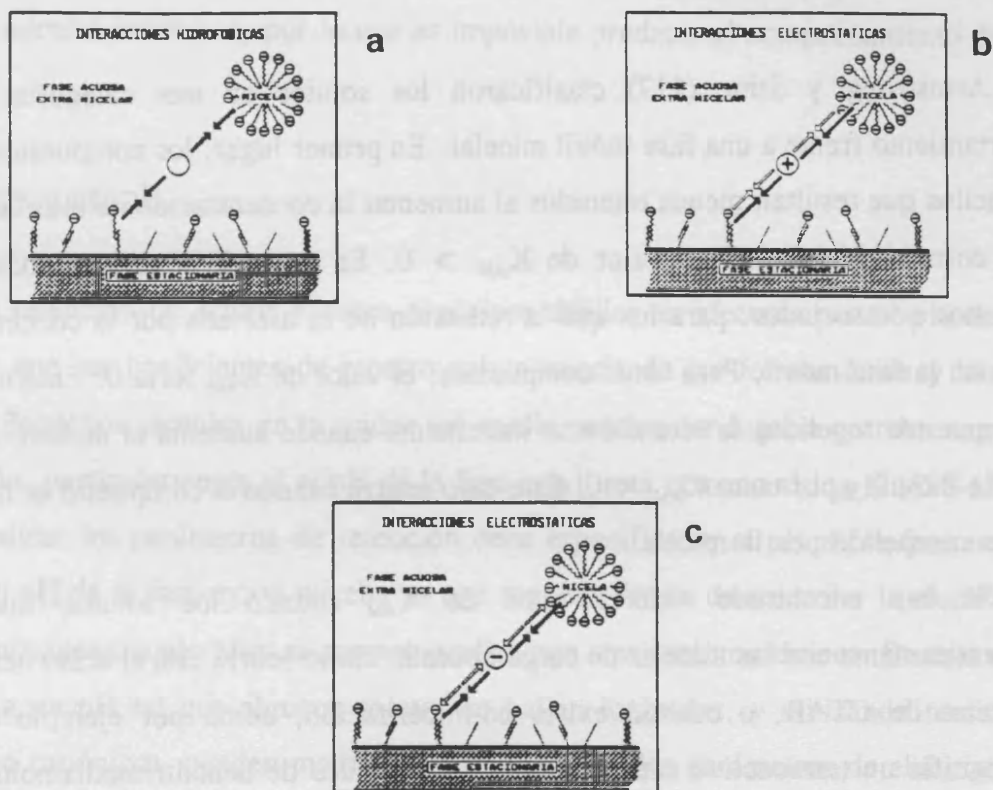


Figura 1.4.- Interacciones soluto-micela y soluto-fase estacionaria. (→) Interacciones hidrofóbicas, (⇒) interacciones electrostáticas de un tensioactivo aniónico con diversos solutos: (a) apolares, (b) aniónicos, (c) catiónicos.

La segunda situación se tiene cuando se cromatografía un soluto con un tensioactivo de carga opuesta. La atracción electrostática por la micela se complementa con la interacción hidrofóbica, y los solutos pueden pasar más tiempo en la fase móvil, disminuyendo su retención. Sin embargo, las interacciones electrostáticas con la fase estacionaria contribuirán a incrementar la retención, lo que competirá con las interacciones soluto-micela. Así por ejemplo, los iones fenolato y 2-naftolato son mucho más retenidos por una columna C_{18} utilizando DTAB (tensioactivo catiónico) que utilizando SDS (116).

c)- Compuestos asociados, no asociados y repelidos

Armstrong y Stine (117) clasificaron los solutos en tres categorías según su comportamiento frente a una fase móvil micelar. En primer lugar, los compuestos asociados son aquellos que resultan menos retenidos al aumentar la concentración de micelas en la fase móvil, correspondiéndoles un valor de $K_{AM} > 0$. En segundo lugar, se encuentran los compuestos no asociados, para los que la retención no es afectada por la concentración de micelas en la fase móvil. Para estos compuestos, el valor de K_{AM} sería 0. Finalmente, para los compuestos repelidos la retención se incrementa cuando aumenta el número de micelas en la fase móvil, y por tanto $K_{AM} < 0$. Este caso ocurre cuando el compuesto es fuertemente excluido o repelido por la micela.

Se han encontrado valores altos de K_{AM} cuando los solutos interactúan electrostáticamente con las micelas de carga opuesta, como ocurre con el ácido benzoico con las micelas de CTAB, o cuando existe co-micelización, como por ejemplo cuando se cromatografía un tensioactivo catiónico como el bromuro de benciltrimetilamonio con una fase móvil de SDS (110). Puede llamar la atención que se obtengan valores de K_{AM} negativos, sin embargo éstos valores son reproducibles, y así como los compuestos asociados tienen una constante de asociación positiva característica, los compuestos que son repelidos por la micela pueden tener una constante negativa característica (117).

Los compuestos que se han descrito como repelidos por las micelas de los tensioactivos iónicos presentan carga del mismo signo a la del tensioactivo, y no se ha encontrado nunca que un soluto cargado cromatografiado con un tensioactivo de carga opuesta se comporte como repelido. En consecuencia, la repulsión electrostática debe jugar un importante papel en este comportamiento. Es interesante señalar que no se han observado compuestos repelidos cuando se utilizan columnas que adsorben cantidades importantes de tensioactivo (C_8 y C_{18}) (117), ya que en estos casos los solutos que presentan carga de igual signo que la fase estacionaria tienden a eluir con el volumen muerto. Sin embargo, para columnas que no absorben cantidades apreciables de tensioactivo, como C_1 y sobretodo ciano, puede observarse aumento de la retención al incrementar la concentración de micelas.

Para que un compuesto sea repelido, parece una condición necesaria que posea la misma carga que el tensioactivo. Sin embargo, ésta no es una condición suficiente, ya que como se indicó en el subapartado anterior, en ocasiones se encuentran solutos cargados

negativamente que se asocian a micelas aniónicas, y solutos cargados positivamente que se asocian a micelas catiónicas, por lo que es imposible predecir el comportamiento de un ión orgánico.

d) - Influencia del pH

La retención de ácidos y bases orgánicos débiles es afectada por el pH de la fase móvil, ya que los coeficientes de reparto soluto-micela de las formas ácida y básica son distintos. Pequeños cambios en la acidez del medio pueden dar lugar a grandes cambios en la retención, particularmente si el pH de la fase móvil está cercano al $\log K$ (118-120). Por ello, al indicar los parámetros de retención debe especificarse el pH de la fase móvil. El control del pH de la fase móvil micelar es una segunda forma de controlar la elución de los solutos ionizables cuando éstos se cromatografían con tensioactivos iónicos. De esta manera, operando a un pH tal que algunos solutos se hallen ionizados, y utilizando tensioactivos aniónicos o catiónicos, pueden modificarse ampliamente los parámetros de elución.

e) - Efecto de la fuerza iónica

El efecto de la fuerza iónica sobre el comportamiento cromatográfico de los solutos dependerá en parte del tipo de interacciones soluto-micela que predominen y, por consiguiente, de la naturaleza del soluto. Su efecto puede ser muy acusado en el caso de compuestos repelidos que posean a la vez cierto carácter hidrofóbico. Estos solutos no son sólo excluidos de la micela, sino también de la doble capa cargada alrededor de la micela. Este hecho es debido principalmente a fenómenos electrostáticos, por tanto es de esperar que en estos casos el efecto salino afecte en gran medida el valor de K_{AM} .

Si se incrementa la fuerza iónica, disminuirá el espesor de la doble capa que rodea a la micela cargada, y ello favorecerá la interacción hidrofóbica del soluto con la micela (121). El incremento de la fuerza iónica puede hacer posible que un soluto repelido se comporte como asociado. Así el azul de bromofenol se comporta como repelido cuando se cromatografía con SDS en ausencia de sal, sin embargo a una concentración de NaCl de 0.02 M se comporta como no asociado, y a medida que se incrementa la concentración de sal en

el medio se une cada vez más fuertemente a las micelas, pasando a comportarse como asociado (121).

Sin embargo, para que ocurra la transición de compuesto repelido a asociado, el soluto debe tener suficiente carácter hidrofóbico para poder asociarse con la parte apolar de la micela, y de hecho otros solutos repelidos exhiben comportamientos distintos con el incremento de la fuerza iónica. Por ejemplo, la interacción del verde naftol B con las micelas de SDS no es afectada por la concentración de sal, mientras que K_{AM} del tiocianato se hace más negativa al aumentar la concentración de NaCl (121).

f) - Selectividad

Cuando se representa el logaritmo del factor de capacidad frente al logaritmo de la concentración de tensioactivo, para solutos eluidos utilizando fases móviles micelares, suelen obtenerse rectas que se interceptan, indicando por tanto una modificación del factor de selectividad α :

$$\alpha_{j,i} = \frac{k'_j}{k'_i} \quad [I.3]$$

Este orden reversible de elución ocurre por la existencia de dos equilibrios competitivos: la asociación soluto-micela y la interacción soluto-fase estacionaria. Los parámetros P_{SW} y K_{AM} muestran efectos opuestos sobre la retención. Cuando P_{SW} aumenta la retención aumenta, sin embargo cuando K_{AM} se hace más alta la retención disminuye. A bajas concentraciones micelares P_{SW} controla la retención. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de tensioactivo, el efecto de K_{AM} se hace más importante, y si las diferencias de los valores de K_{AM} de diferentes solutos son importantes pueden producirse inversiones en el orden de elución.

g) - Limitaciones de la CLM

Las principales limitaciones de la CLM son la débil fuerza eluyente de las fases móviles micelares puras, los bajos valores de eficacia y las altas asimetrías de los picos. La baja eficacia observada en CLM se ha atribuido a que la transferencia de masa a la fase

estacionaria está seriamente dificultada, lo que es debido a que el espesor de la fase estacionaria y su viscosidad aumentan significativamente cuando se adsorbe el tensioactivo, disminuyendo la capacidad de difusión del soluto hacia la fase estacionaria (115). Con el objeto de resolver estos problemas se ha propuesto la adición de diversos modificadores orgánicos a las fases móviles micelares, lo que ha dado lugar a la cromatografía micelar híbrida.

h) - Cromatografía micelar híbrida

Dorsey y col. (122) propusieron la adición de pequeñas cantidades de n-propanol a las fases móviles micelares para aumentar la fuerza eluyente, disminuir las asimetrías de pico y mejorar los valores de eficacia. Posteriormente ha sido estudiado el efecto de otros modificadores, tales como otros alcoholes de cadena corta, acetonitrilo y pentano (123). Los alcoholes de cadena corta han demostrado ser generalmente los reactivos modificadores más adecuados (123-125). A los sistemas ternarios agua-tensioactivo-modificador orgánico se les dió el nombre de fases micelares híbridas.

Se ha cuestionado la utilización de alcoholes en cromatografía micelar (124), alegando que la adición de grandes cantidades de modificador orgánico puede destruir completamente la estructura micelar, sin embargo la mayoría de los artículos aparecidos en los últimos cinco años sobre CLM hacen uso de fases micelares híbridas.

La adición de alcoholes puede causar cambios en algunas propiedades micelares, como una disminución del número de agregación y de la cmc, sin embargo los cambios que se observan en la retención y selectividad son demasiado grandes para poder explicarse por el cambio de las propiedades micelares, y la explicación hay que buscarla en cambios en el microentorno de las micelas y de la fase estacionaria.

La adición de alcohol a las fases móviles micelares reduce la cantidad de tensioactivo adsorbido por la fase estacionaria de forma proporcional a la concentración y a la hidrofobicidad del alcohol, ya que el alcohol solvata parcialmente la fase estacionaria impidiendo la adsorción de tensioactivo (126). La reducción del contenido de carbono y del grosor de la fase estacionaria por la adición de alcohol tiene como efecto una disminución de la rigidez de la fase estacionaria modificada. Por otra parte, la presencia de alcohol

aumenta la fluidez de la estructura micelar, y en consecuencia aumenta el coeficiente de difusión del soluto y por tanto la eficacia (123).

Las constantes de asociación soluto-micela, K_{AM} , y los coeficientes de reparto con la fase estacionaria P_{sw} , son menores en las fases móviles micelares híbridas que en las fases micelares puras, debido a los cambios que experimentan la fase estacionaria, las micelas y la pseudofase acuosa, que en presencia de alcohol se hace más apolar. La adición de alcohol desplaza la distribución del soluto desde la micela y la fase estacionaria a la pseudofase acuosa.

El mecanismo de separación con fases micelares híbridas se hace más parecido al obtenido con fases móviles hidroorgánicas, ya que el alcohol reduce la interacción entre el soluto y las micelas y la fase estacionaria se parece más a la que se obtiene para un sistema hidroorgánico, sin embargo mientras se mantenga la integridad de las micelas, la adición de alcohol no creará un sistema hidroorgánico.

- Eficacia

El incremento de la concentración de tensioactivo produce una disminución de la eficacia, tanto en ausencia de modificador como en su presencia. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de modificador a una concentración de tensioactivo constante, se produce una mejora de la eficacia (123). En consecuencia el control de la eficacia viene dado por el cociente entre la concentración de modificador orgánico y la de tensioactivo. Cuanto mayor es esta relación, mayor es la eficacia y más simétricos son los picos (123).

Cuando se cromatografían compuestos muy hidrofóbicos, como la 2-etilntraquinona, con tensioactivos iónicos, el soluto se introduce en la micela, y por tanto las bajas eficacias que se obtienen son debidas a que el reparto de estos solutos sólo puede hacerse directamente desde la micela a la fase estacionaria. Como las cargas de la superficie de la micela y de la fase estacionaria tienen el mismo signo se establece una barrera repulsiva que impide la transferencia de masa a través de la interfase. Cuanto mayor sea la fracción del reparto que tenga lugar mediante este mecanismo, peor será la eficacia. La eficacia para estos solutos es mayor cuando se utilizan tensioactivos no iónicos como el Brij 35, ya que en este caso no existe una barrera repulsiva que se oponga a la transferencia de masa.

La presencia de alcoholes en las fases móviles micelares de tensioactivos iónicos mejora la eficacia, debido a que disminuye la densidad de carga superficial de las micelas y de la fase estacionaria, disminuyendo la barrera repulsiva. Los alcanos por el contrario no disminuyen la densidad de carga sobre la superficie micelar y por lo tanto, aunque disminuyen la cantidad de tensioactivo adsorbida por la fase estacionaria, no mejoran la eficacia. Con fases micelares de tensioactivos no iónicos, los alcoholes de cadena corta no son capaces de desorber a este tipo de tensioactivos de la fase estacionaria, y por tanto en estos casos, no producen una mejora de la eficacia (123).

- Fuerza eluyente

La adición de un alcohol a las fases móviles micelares provoca una disminución del factor de capacidad, disminución que es tanto mayor cuanto mayores son la concentración y la hidrofobicidad del alcohol y la hidrofobicidad del soluto. Ahora bien, el efecto del modificador sobre el factor de capacidad se atenúa al aumentar la concentración de tensioactivo.

En cromatografía líquida convencional se ha encontrado una relación cuadrática entre $\log k'$ y la fracción en volumen de modificador orgánico, φ . Para pequeños márgenes de concentración de modificador, esta relación puede aproximarse a una expresión lineal:

$$\log k' = -s\varphi + \log k'_0 \quad [I.4]$$

donde S es la fuerza eluyente y k'_0 es el factor de capacidad correspondiente a una fase móvil puramente acuosa (en sistemas hidroorgánicos), o a una determinada concentración micelar ($k'_{0,[M]}$). Esta ecuación es válida únicamente para pequeños márgenes de concentración de modificador para fases móviles hidroorgánicas, pero se ha señalado que con fases móviles micelares híbridas se observa una excelente linealidad, incluso para fases móviles ricas en agua (e.g. 3-20% de PrOH) (127).

Los valores de la fuerza eluyente para los alcoholes C_1 - C_3 se hacen mayores al aumentar la longitud de la cadena del alcohol, tal como ocurre con las fases móviles hidroorgánicas (128, 129). Los valores notablemente mayores de S obtenidos para n-pentanol y n-butanol se deben a que estos alcoholes se incorporan a las micelas formando micelas

mixtas, sin embargo, aún para estos alcoholes los valores de la fuerza eluyente son más pequeños para sistemas micelares híbridos que para hidroorgánicos (127).

- Selectividad

Como ya se indicó, la presencia de modificador afecta a la retención del soluto disminuyéndola, tanto más cuanto mayores sean la hidrofobicidad del soluto y la del modificador. En consecuencia, la presencia del modificador y su naturaleza pueden afectar a la selectividad. En sistemas hidroorgánicos se observa una disminución de la selectividad al aumentar la concentración de modificador orgánico (y por tanto la fuerza eluyente). Sin embargo, en presencia de micelas la selectividad puede aumentar, disminuir o permanecer invariable al aumentar la fuerza eluyente de la fase móvil, ya que la disminución de las constantes de asociación no se produce en la misma extensión para solutos de diferente polaridad (128).

Al contrario de lo que ocurre para las fases móviles hidroorgánicas, con las fases micelares híbridas no se observan grandes variaciones de la fuerza eluyente en una serie homóloga al aumentar el tamaño del soluto. Esto es debido a que la localización del soluto en la micela reduce el factor de tamaño en lo que respecta a la solvatación de un soluto por el alcohol.

i) - Aplicaciones

Debido al gran número de interacciones posibles entre la fase móvil y la fase estacionaria modificada, prácticamente cualquier compuesto orgánico o inorgánico puede ser cromatografiado utilizando CLM. Así Mullins y col. (130) estudiaron la separación de aniones inorgánicos (IO_3^- , NO_3^- , Br^- , NO_2^- e I^-) utilizando como fase móvil cloruro de hexadeciltrimetilamonio (CTAC). Estos mismos autores estudiaron la separación de ditiocarbamatos con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (131,132). También se ha conseguido la separación entre los isómeros cis y trans del anión complejo Co(III) -iminodiacetato con CTAB, y de los complejos neutros de la 4,4'-etilendinitrilobispenta-2-ona con Cu(II) y Ni(II) (133). Okada utiliza fases móviles de SDS para separar cationes metálicos (Zn(II) , Ni(II) , Co(II) , Cd(II) , Mn(II) , Pb(II) y Fe(III)), llegando a la conclusión de que la

retención puede explicarse haciendo uso únicamente de mecanismos de intercambio iónico (134).

Barford y Sliwinski (135) describen la separación cromatográfica de proteínas utilizando tensioactivos no iónicos (Neodol 91-6 y β -octilglucósido). Se ha empleado una disolución micelar concentrada de Brij 35 para extraer aldehidos de muestras de tabaco, que se han separado cromatográficamente con una disolución más diluída del mismo tensioactivo (115). Stratton y col. (136) determinaron la actividad biológica de la enzima folilpoliglutamatohidroxilasa en extractos de tejidos, utilizando SDS para desnaturalizar la enzima y para separar cromatográficamente el sustrato y los productos de reacción.

Bonet y col. (129) determinan diuréticos de alta, media y baja eficacia en diversos preparados farmacéuticos, utilizando una fase móvil de SDS 0.05 M y 3% propanol. Biemer (137) utiliza fases móviles con mezclas de SDS y Brij 35 para determinar diversos fármacos en tabletas (acetaminofeno, clorhidrato de pseudoefedrina y maleato de clorfeniramina).

Se han descrito buenas correlaciones entre los factores de capacidad que se obtienen en CLM y ciertas propiedades bioquímicas de los solutos, por ejemplo entre la actividad biológica de 26 fenoles parasustituidos y los factores de capacidad obtenidos con bromuro de tetradeciltrimetilamonio (138), y entre los factores de capacidad de los diuréticos en una fase móvil 0.03 M SDS y su lugar de acción en la nefrona (139).

Una de las aplicaciones más importantes de la cromatografía micelar es la posibilidad de realizar la inyección directa de fluidos biológicos. Las disoluciones micelares de SDS o Brij 35 solubilizan las proteínas, las cuales eluyen en la cabeza del cromatograma. De Luccia y col. determinan mediante la inyección directa de suero en una fase móvil de SDS los siguientes fármacos: acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, carbamazepina, cloramfenicol, fenobarbital, fenitoina, procainamida, quinidina y teofilina (140). Arunyanart y col. determinan quinina, quinidina, propranolol y morfina en suero y orina, mediante la inyección directa de estos fluidos biológicos en fases móviles de SDS-10% Propanol (141). Haginaka y col. determinan cefalosporinas en suero utilizando SDS y SDS/2-propanol como fases móviles (142).

Kim y Brown estudian la separación de nucleósidos y bases orgánicas (ácido úrico, uracilo, timina, hipoxantina, xantina, adenina, citosina, uridina, inosina, timidina, guanosina y adenosina) utilizando fases móviles de SDS, y aplican el método a la separación de algunos de estos compuestos en suero humano (143). Menéndez Fraga y col. (144) determinan las

drogas anticancerígenas 6-tiopurina y 6-tioguanidina y tres de sus metabolitos en suero utilizando fases móviles de SDS. Palmisano y col. (118) determinan el fármaco antineoplástico metotrexato (MTX) por inyección directa de suero y orina, utilizando como fase móvil SDS, y estudian el efecto del pH que causa grandes cambios en la retención.

Haginaka y col. (145) estudian la recuperación de proteínas del suero y la determinación de diversas drogas hidrofóbicas (cefalosporinas y ácido salicílico), por inyección directa de suero en fases móviles de SDS, y utilizando como fases estacionarias columnas ODS y ISRP (internal-surface-reversed-phase), y comparan los resultados obtenidos con ambos tipos de columnas. Sentell y col. (146) determinan bumetanida en suero y orina por inyección directa de estos fluidos biológicos en fases móviles de SDS. Grohs y col. estudian la determinación de diversas drogas (carbamazepina, teobromina, teofilina y cafeína) en albúmina de suero bovino (BSA), utilizando fases móviles de diversos tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos (147).

La determinación de drogas prohibidas en el deporte mediante CLM es uno de los temas de investigación que actualmente nuestro grupo de investigación está desarrollando, habiéndose publicado ya algunas aportaciones como el estudio del comportamiento cromatográfico en CLM de diversas drogas (120), y de drogas prohibidas en el deporte en orina, por inyección directa de la muestra, utilizando una fase móvil de SDS y un alcohol como modificador (129,148).

I.4.- Bibliografía

- Catecolaminas

1. The Merck Index, 10th edition, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., USA, 1983.
2. J.B. Henry; en Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio; 9ª edición, Salvat 1993.
3. H. Wisser y E. Noll; Z. Klin. Chem. Klin. Biochem 1973, 11, 3.
4. P.T. Kissinger, K. Bratin, G.C. Davis y L.A. Pachla; J. Chromatogr. Sci. 1979, 17, 137.
5. L.D. Saraswat, M.R. Holdiness, J.B. Justice, J.D. Salamone y D.B. Neill; J. Chromatogr. 1981, 222, 353.
6. P.M. Froehlich y T.D. Cunningham; Anal. Chim. Acta. 1978, 97, 357.

7. T. Seki; *J. Chromatogr.* 1979, 162, 388.
8. K. Mori; *J. Chromatogr.* 1981, 218, 631.
9. S. Honda, M. Takahashi, Y. Araki y K. Kakehi; *J. Chromatogr.* 1983, 274, 45.
10. T. Seki y Y. Yamaguchi; *J. Chromatogr.* 1984, 287, 407.
11. T. Seki, Y. Yamaguchi, K. Noguchi y Y. Yanagihara; *J. Chromatogr.* 1985, 332, 9.
12. T. Seki, Y. Yanagihara y K. Noguchi; *J. Chromatogr.* 1990, 515, 435.
13. C.R. Benedict; *J. Chromatogr.* 1987, 385, 369.
14. H. Weicker; *J. Sports. Med.* 1988, 9, 68.
15. H. Tsuchiya, M. Tatsumi, N. Takagi, T. Koike, H. Yamaguchi y T. Hayashi; *Anal. Biochem.* 1986, 155, 28.
16. T.P. Davis; *J. Chromatogr.* 1979, 162, 293.
17. H. Todoriki, T. Hayashi, H. Naruse y A.Y. Hirakawa; *J. Chromatogr.* 1983, 276, 45.
18. O. Nozaki y Y. Ohba; *J. Chromatogr.* 1990, 515, 621.
19. H. Nohta, A. Mitsui y Y. Ohkura; *Anal. Chim. Acta* 1984, 165, 171.
20. P. Husek, J. Malikova y G. Herzogova; *J. Chromatogr.* 1990, 533, 166.
21. F.A.J. Van der Hoorn, F. Boomsma, A.J. Man in't Veld y M.A.D.H. Schalekamp; *J. Chromatogr.* 1989, 487, 17.
22. A. Mitsui, H. Nohta y Y. Ohkura; *J. Chromatogr.* 1985, 344, 61.
23. H. Nohta, A. Mitsui y Y. Ohkura; *J. Chromatogr.* 1986, 380, 229.
24. D.S. Goldstein; *J. Chromatogr.* 1983, 275, 174.
25. R.M. Riggin; *Anal. Chem.* 1977, 49, 13.
26. C. Lucarelli, P. Betto; G. Ricciarello y G. Grossi; *J. Chromatogr.* 1991, 541, 285.
27. G. Grossi, A.M. Bargossi, C. Lucarelli, R. Paradisi, C. Sprovieri y G. Sprovieri; *J. Chromatogr.* 1991, 541, 273.
28. F. Smedes, J.C. Kraak y H. Poppe; *J. Chromatogr.* 1982, 231, 25.
29. G.A. Ross, E.C. Newbould, A. Grossman y D. Perret; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1990, 8, 1039
30. Z. Yi y P.R. Brown; *J. Liq. Chromatogr.* 1990, 13, 2161.
31. A.M. Krstulovic; *J. Chromatogr.* 1982, 229, 1.

32. V. Rizzo, G. Melzi d'Eril, G. Achilli y G.P. Cellerino; *J. Chromatogr.* 1991, 536, 229.
33. G.M. Anderson, *J. Chromatogr.* 1988, 424, 373.
34. R. Said, D. Robinet, C. Barbier, J. Sartre y C. Huguet; *J. Chromatogr.* 1990, 530, 11.
35. R.G. Causon y M.E. Carruthers; *J. Chromatogr.* 1982, 229, 301.
36. M. Kamahori, M. Taki, Y. Watanabe y J. Miura; *J. Chromatogr.* 1991, 567, 351.
37. *Farmacopea Europea*, 2^a Edición, 1992.
38. *U.S. Pharmacopeia*, revisión XXII, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, Mariland 1990.
39. M.I. Walash, A. Abou Ouf y F.B. Salem; *Indian J. Pharm. Sci.* 1983, 45, 223.
40. M.J. Oeterlig y R.L. Tse; *Am. J. Med. Technol.* 1961, 27, 112.
41. R.H. Leach y C. Ware; *J. Hosp. Pharm.* 1968, 25, 99.
42. F.B. Salem; *Talanta* 1987, 34, 810.
43. A. Abou Ouf, M.I. Walash y F.B. Salem; *Analyst* 1981, 106, 949.
44. F.B. Salem; *J. Pharm. Belg.* 1986, 41, 35.
45. A. Correia; *Anais. fac. farm. Porto* 1952, 12, 63.
46. F.B. Salem; *Anal. Lett.* 1985, 18, 1063.
47. K.E. Rao, K.V.S.S. Murthy y C.S.P. Sastry; *Indian Drugs* 1982, 20, 58.
48. C.S.P. Sastry, K.E. Rao y U.V. Prasad; *Talanta* 1982, 29, 917.
49. D.G. Sankar, C.S.P. Sastry, M.N. Reddy y N.R. Singh; *Indian Drugs* 1988, 25, 478.
50. M.B. Sidhom y S.R. El-Shabouri; *Egypt. J. Pharm. Sci.* 1986, 27, 67.
51. A. Abou Ouf, A.M. Taha y M.B. Sidhom; *J. Pharm. Sci.* 1973, 62, 1700
52. S.R. El-Shabouri, M.B. Sidhom y B. Madiha; *Egypt. J. Pharm. Sci.* 1986, 27, 59.
53. F.B. Salem; *J. Pharm. Belg.* 1985, 40, 185.
54. G.R. Rao y M.V. Krishnas; *Indian J. Pharm.* 1978, 40, 18.
55. F.B. Salem y M.I. Walash; *Analyst* 1985, 110, 1125.
56. M.I. Walash, A. Abou Ouf y F.B. Salem; *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 1985, 68, 91.
57. N.A. El-Rabbat y N.M. Omar; *J. Pharm. Sci.* 1978, 67, 771.
58. N.A. El-Rabbat y N.M. Omar; *Egypt. J. Pharm. Sci.* 1979, 18, 35.
59. A. Besada; *Anal. Lett.* 1987, 20, 427.

60. D.G. Sankar, C.S.P. Sastry, M.N. Reddy y M. Aruna; *Indian J. Pharm. Sci.* 1988, 50, 178.
61. Y. Fujita, I. Mori, K. Fujita, S. Kitano y T. Tanaka; *Chem. Pharm. Bull.* 1985, 33, 5385.
62. M.A. Korany, A.M. Wahbi y M.H. Abdel-Hay; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1984, 2, 537.
63. N.A. Zakhari, F.B. Salem y M.S. Rizk; *Farmaco. Ed. Prat.* 1987, 42, 103.
64. E.V. Gan, H.F. Haberman y I.A. Menon; *J. Invest. Dermatol.* 1975, 64, 139.
65. T.V. Koval'chuk, T.A. Koget, F.E. Kagan y A.A. Arzyaeva; *Farm. Zh.* 1986, 1, 36.
66. M.E. El-Kommos; *Bull. Pharm. Sci.* 1986, 9, 1.
67. R.T. Sane, B.D. Bamane y J.G. Mhalas; *Indian Drugs*, 1981, 19, 121.
68. A.H. El Obeid; *Anal. Lett.* 1984, 17, 771.
69. J.F. Allgire, E.C. Juenge, C.P. Damo, G.M. Sullivan y R.D. Kirchhoefer; *J. Chromatogr.* 1985, 325, 249.
70. B.S. Scott y D.L. Dunn; *J.Chromatogr.* 1985, 319, 419.
71. J. Subrt y K. Slais; *Cesk. Pharm.* 1983, 32, 156.
72. M.J. Smela y R. Stromberg; *J. Assoc. Anal. Chem.* 1991, 74, 289.

- Espectroscopía de lente térmica

73. J.R. Whinnery; *Acc. Chem. Res.* 1974, 7, 225.
74. W.B. Jackson, N.M. Amer, A.C. Boccara y D. Fournier, *Appl.Opt.* 1981, 20, 1333.
75. M.J. Pelletier, H.R. Thorsheim y J.M. Harris; *Anal. Chem.* 1982, 54, 239.
76. D.S. Kliger; *Acc. Chem. Res.* 1980, 13, 129.
77. J.M. Harris y N.J. Dovichi; *Anal. Chem.* 1980, 52, 695A.
78. R.L. Swofford, en *Lasers in Chemical Analysis* (editado por G.M. Hieftje, J.C. Travis, y F.E. Lytle); Humana, Clifton, NJ, págs. 143-56, 1981.
79. H.L. Fang y R.L. Swofford, en *Ultrasensitive Laser Spectroscopy* (editado por D.S. Kliger); Academic Press, New York, págs. 175-232, 1983.
80. T.D. Harris y F.E. Lytle, en *Ultrasensitive Laser Spectroscopy* (editado por D.S. Kliger); Academic Press, New york, págs. 369-83, 1983.
81. J.M. Harris, *Optics News*; págs 1986, 10, 8

82. J.M. Harris, en *Analytical Applications of Lasers* (editado por E.H. Piepmeier); Wiley, New York, págs. 451-76, 1986.
83. N.J. Dovichi; *CRC Crit. Rev. in Anal. Chem.* 1987, 14, 357.
84. J.R. Barker y T. Rotchem; *Chem. Phys.* 1982, 68, 331.
85. N.J. Dovichi y J.M. Harris; *Anal. Chem.* 1979, 51, 728.
86. K. Mori, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.* 1982, 54, 2034.
87. M. Miyaishi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta* 1981, 124, 381.
88. T. Imasaka, K. Miyaishi y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta* 1980, 115, 407.
89. K. Miyaishi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.* 1982, 54, 2039.
90. R.A. Leach y J.M. Harris; *Anal. Chim. Acta* 1984, 164, 91.
91. G. Ramis Ramos, M.C. García Alvarez-Coque, B.W. Smith, N. Omenetto y J.D. Winefordner; *Appl. Spectrosc.* 1988, 42, 341.
92. T. Berthoud y N. Delorme; *Appl. Spectrosc.* 1987, 41, 15.
93. K. Fujiwara, H. Uchiki, F. Shimokoshi, K.-I. Tsuonda, K. Fuwa y T. Kobayashi; *Appl. Spectrosc.* 1982, 36, 157.
94. K. Fujiwara, W. Lei, F. Shimokoshi, K. Fuwa y T. Kobayashi; *Anal. Chem.* 1982, 54, 2026.
95. C.M. Phillips, S.R. Crouch y G.E. Leroi; *Anal. Chem.* 1986, 58, 1710.
96. E. Cerrai y R. Trucco; *Energ. Nucl. (Milán)* 1968, 15, 581.
97. K. Nakanishi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.* 1985, 57, 1219.
98. J.A. Alfheim y C.H. Langford; *Anal. Chem.* 1985, 57, 861.
99. J.P. Haushalter y M.D. Morris; *Appl. Spectrosc.* 1980, 34, 445.
100. G. Bidoglio, G. Tanet, P. Cavalli y N. Omenetto; *Inorg. Chim. Acta* 1987, 140, 293.
101. N. Omenetto, P. Cavalli, G. Rossi, G. Bidoglio y G.C. Turk; *J. Anal. At. Spectrom.* 1987, 2, 579.
102. C.A. Carter, J.M. Brady y J.M. Harris; *Appl. Spectrosc.* 1982, 36, 309.

- Cromatografía micelar

103. W.L. Hinze, en *Ordered Media in Chemical Separations* (editado por W.L. Hinze y D.W. Armstrong); ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1987, vol 342, pag. 2.
104. J.G. Dorsey; *Adv. Chromatogr.* 1987, 27, 167.

105. A. Berthod y J.G. Dorsey; *Analisis* 1988, 16, 75.
106. M.G. Khaledi; *BioChromatography* 1988, 3, 20.
107. A. Berthod, I. Girard y C. Gonnet, en *Ordered Media in Chemical Separations* (editado por W.L. Hinze y D.W. Armstrong); ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 1987, vol 342, pag. 130.
108. J.G. Dorsey, M.G. Khaledi, J.S. Landy y J.L. Lin; *J. Chromatogr.* 1984, 316, 183.
109. A. Berthod, I. Girard y C. Gonnet C; *Anal. Chem.* 1986, 58, 1356.
110. A. Berthod, I. Girard y C. Gonnet; *Anal. Chem.* 1986, 58, 1359.
111. D.W. Armstrong y F. Nome; *Anal. Cem.* 1981, 53, 1662.
112. M. Arunyanart y L.J. Cline Love L.J; *Anal. Chem.* 1984, 56, 1557.
113. M.J. Medina Hernández y M.C. García Alvarez-Coque; *Analyst* 1992, 117, 831.
114. M.F. Borgerding y W.L. Hinze; *Anal. Chem.* 1985, 57, 2183.
115. M.F. Borgerding, F.H. Quina, W.L. Hinze, J. Bowermaster y H.M. McNair; *Anal. Chem.* 1988, 60, 2520.
116. P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch y L.J. Cline Love; *Anal. Chem.* 1982, 54, 2233.
117. D.W. Armstrong y G.Y. Stine; *Anal. Chem.* 1983, 55, 2317.
118. F. Palmisano, A. Guerrieri, P.G.Zambonin y T.R.I. Cataldi; *Anal. Chem.* 1989, 61, 946.
119. L.J. Cline Love y J. Fett; *Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9, 323.
120. I. Carretero, M. Maldonado, J.J. Laserna, E. Bonet E. y G. Ramis Ramos; *Anal. Chim. Acta.* 1992, 259, 203.
121. D.W. Armstrong y G.Y. Stine; *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 6220
122. J.G.Dorsey, M.T. De Echegaray y J.S. Landy; *Anal. Chem.* 1983, 55, 924.
123. M.F. Borgerding, R.L. Williams, W.L. Hinze y F.H. Quina; *J. Liq. Chromatogr.* 1989, 12, 1367.
124. P. Yarmchuck, R. Weinberger, R.F. Hirsch y L.C. Cline Love; *J. Chromatogr.* 1984, 283, 47.
125. A. Berthod y A. Roussel; *J. Chromatogr.* 1988, 449, 349.
126. M.F. Borgerding, W.L. Hinze, L.D. Stafford, G.W. Fulp y W.C. Hamlin; *Anal. Chem.* 1989, 61, 1353.
127. M.G. Khaledi, E. Peuler y J. Ngeh-Ngwainbi; *Anal. Chem.* 1987, 59, 2738.

128. M.G. Khaledi, J.K. Strasters, A.H. Rodgers y E.D. Breyer; *Anal. Chem.* 1990, 62, 130.
129. E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández, G. Ramis Ramos y M.C. García Álvarez-Coque; *Analyst* 1992, 117, 843.
130. F.G.P. Mullins y G.F. Kirkbright; *Analyst* 1984, 109, 1217.
131. G.F. Kirkbright y F.G.P. Mullins; *Analyst* 1984, 109, 493.
132. F.G.P. Mullins y G.F. Kirkbright; *Analyst* 1984, 111, 1273.
133. C.H. Kirkhman, C.H. Zu-Ben, P.C. Uden, W.J. Stratton y D.E. Henderson; *J. Chromatogr.* 1984, 317, 569.
134. T. Okada; *Anal. Chem.* 1992, 64, 589.
135. R.A. Barford y B.J. Sliwinski; *Anal. Chem.* 1984, 56, 1554.
136. L.P. Stratton, J.B. Hynes, D.G. Priest, M.T. Doig, D.A. Barron y G.L. Asleson; *J. Chromatogr.* 1986, 357, 183.
137. T.A. Biemer; *J. Chromatogr.* 1987, 410, 206.
138. E.D. Breyer, J.K. Strasters y M.G. Khaledi; *Anal. Chem.* 1991, 63, 828.
139. M.J. Medina Hernández, E. Bonet Domingo, G. Ramis Ramos y M.C. García Álvarez-Coque; *Anal. Lett.*, en prensa.
140. F. J. De Luccia, M. Arunyanart y L.J. Cline Love; *Anal. Chem.* 1985, 57, 1564.
141. M. Arunyanart y L.J. Cline Love; *J. Chromatogr.* 1985, 342, 293.
142. J. Haginaka, J. Wakai y H. Yasuda; *Anal. Chem.* 1987, 59, 2732.
143. Y.-N. Kim y P.R. Brown; *J. Chromatogr.* 1987, 384, 209.
144. P. Menendez Fraga, E. Blanco González y A. Sanz Medel; *Anal. Chim. Acta.* 1988, 212, 181.
145. J. Haginaka, J. Wakai y H. Yasuda; *J. Chromatogr.* 1989, 488, 341.
146. K.B. Sentell, J.P. Clos y J.G. Dorsey; *BioChromatography*, 1989, 4, 35.
147. R.A. Grohs, F.V. Warren y A. Bidlingmeyer; *Anal. Chem.* 1991, 63, 384.
148. E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández, G. Ramis Ramos y M.C. García Álvarez-Coque; *J. Chromatogr.* 1992, 582, 189.

II.- OBJETO



II.- OBJETO

Dentro de las líneas de investigación desarrolladas en el Departamento de Química Analítica se incluyen el desarrollo de la cromatografía líquida micelar y el desarrollo de instrumentación y aplicaciones en espectrometría de lente térmica. En la presente memoria se presentan una serie de trabajos en los que se hace extenso uso de ambas técnicas, incluyendo la utilización de la espectrometría de lente térmica como técnica de detección en cromatografía líquida micelar, haciendo un esfuerzo en el desarrollo de aplicaciones que hagan uso simultáneo de ambas técnicas.

Por otra parte, y desde hace años, una parte del esfuerzo investigador dentro del Departamento se orienta hacia el desarrollo de métodos de detección y determinación de compuestos bioactivos. Dentro de esta línea se planteó la determinación de catecolaminas en orina y en preparados farmacéuticos. Con frecuencia, las catecolaminas se han venido utilizando como sustancias modelo para la evaluación de nuevas técnicas cromatográficas, tanto en lo que se refiere a modificaciones del sistema separador, como a nuevas técnicas de detección. Por ello, en esta Memoria se hace uso de catecolaminas para evaluar tanto la cromatografía líquida micelar como la espectrometría de lente térmica. En cada caso se desarrollan aplicaciones relacionadas con el análisis de orina y de preparados farmacéuticos.

Para ello, en primer lugar se estudió la reacción de oxidación de las catecolaminas a aminocromos (Capítulo III). La utilización de una reacción cromogénica es necesaria en espectrometría de lente térmica, puesto que los analitos deben ser absorbentes a la longitud de onda de emisión del láser de bombeo. Por otra parte, la oxidación a aminocromos constituye probablemente la forma más sencilla y rápida de generar un cromóforo a partir de las catecolaminas. Por último, la formación de derivados que absorban en el visible es de gran interés en el análisis de muestras fisiológicas, puesto que se aumenta extraordinariamente la selectividad de los procedimientos, obteniéndose líneas base mucho más limpias en HPLC.

Se ha estudiado la estabilidad de las disoluciones de aminocromos, se han optimizado las condiciones de detección mediante espectrometría de lente térmica, y se han comparado las características analíticas significativas conseguidas mediante esta técnica con las obtenidas por espectrofotometría.

Durante el desarrollo de este estudio se observó que, en determinadas condiciones, las disoluciones de ferricianuro utilizadas en la oxidación de las catecolaminas daban lugar, por sí mismas, a importantes aumentos de la señal de lente térmica. El estudio de este efecto, relacionado con la formación de partículas de hidróxido férrico, y su transporte en el seno del haz, constituye el Capítulo IV de esta Memoria.

En el Capítulo V se optimiza la separación cromatográfica de los aminocromos utilizando fases móviles micelares. Se hace uso de las catecolaminas endógenas, así como también de una catecolamina sintética, la isoprenalina, con el objeto de utilizarla como patrón interno. Finalmente, se optimizan las condiciones de detección mediante espectrometría de lente térmica. En el Capítulo VI se optimiza la retención y elución de catecolaminas no derivatizadas en cromatografía líquida micelar con detección espectrofotométrica en el UV.

En los Capítulos siguientes se exponen las aplicaciones analíticas desarrolladas. Así, en el Capítulo VII se propone un procedimiento no cromatográfico que permite la determinación de la suma de catecolaminas no conjugadas en orina mediante espectrometría de lente térmica.

En el Capítulo VIII se propone un procedimiento de determinación de adrenalina, noradrenalina y dopamina en orina mediante cromatografía líquida micelar con detección por espectrometría de lente térmica. En este procedimiento se hace uso de isoprenalina como patrón interno, o alternativamente, puede utilizarse el mismo procedimiento para la determinación de este fármaco en orina. Por último, en el Capítulo IX se hace uso de los estudios desarrollados en el Capítulo VI para proponer un procedimiento de determinación de catecolaminas en preparados farmacéuticos.

**III.- ESTUDIOS ESPECTROFOTOMETRICOS Y DE
ESPECTROMETRIA DE LENTE TERMICA SOBRE
CATECOLAMINAS Y AMINOCROMOS**

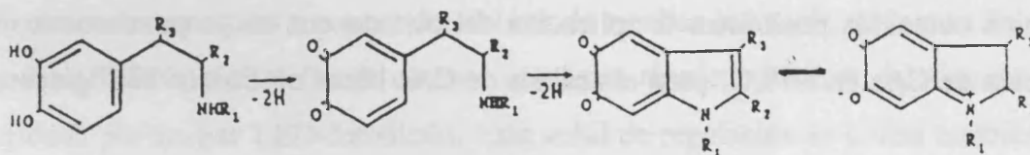
III.- ESTUDIOS ESPECTROFOTOMETRICOS Y DE ESPECTROMETRIA DE LENTE TERMICA SOBRE CATECOLAMINAS Y AMINOCROMOS

III.1.- Introducción

En el presente capítulo se presentan una serie de estudios espectrofotométricos básicos sobre las CAs D, MD, NA, A, AO, DA y ISO, y mediante espectrofotometría y espectroscopía de lente térmica para los aminocromos derivados de la oxidación de las cuatro CAs de origen biológico (D, NA, A y DA). Estos estudios servirán de base para la proposición de métodos de determinación de CAs en diferentes tipos de muestras de interés analítico.

Se han descrito diversos procedimientos espectrofotométricos para la determinación de CAs. Sin embargo, la baja sensibilidad, que es común a todos ellos, hace inviable la aplicación de los mismos a muestras biológicas, y así las aplicaciones descritas quedan restringidas a preparados farmacéuticos.

Las CAs pueden ser oxidadas a los correspondientes aminocromos de color rojo, según la reacción:



donde R_1 , R_2 , y R_3 son protones excepto $R_1 = \text{CH}_3$ para A, $R_2 = \text{COOH}$ para D y $R_3 = \text{OH}$ para NA y A.

Los aminocromos presentan máximos de absorción sobre 300 y 485 nm. La absorptividad molar a esta última longitud de onda varía entre 2500 y 3400 $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$, dependiendo del aminocromo de que se trate (1). La determinación espectrofotométrica de CAs, basada en la oxidación a los correspondientes aminocromos, no es aplicable a fluidos biológicos debido a su baja sensibilidad, sin embargo la banda de absorción de los aminocromos solapa con las líneas de emisión más intensas del láser de Ar^+ , situadas a 488 y a 514 nm, lo que puede permitir su determinación a niveles muy bajos de concentración.

Por otra parte los aminocromos en disolución no son estables, sino que sufren reordenamientos intramoleculares, oxidaciones y reacciones de autocondensación, formándose productos insolubles oscuros, denominados melaninas (2). Esta descomposición de los aminocromos depende en gran medida de la concentración, la temperatura y el pH, habiéndose comprobado que un aumento de estos tres parámetros da lugar a un aumento en la velocidad de descomposición (3, 4).

A pesar de que la oxidación de CAs a aminocromos es una reacción conocida desde hace mucho tiempo, que ha sido usada sobretodo como paso previo en el método del trihidroxiindol, no se ha llegado a establecer un procedimiento de uso general para la obtención de disoluciones de aminocromos. Nosotros presentamos en este capítulo un estudio espectrofotométrico de optimización de condiciones experimentales para la formación de aminocromos. Los resultados de este estudio sirven de base para establecer un procedimiento de determinación de aminocromos mediante espectroscopía de lente térmica. Esta técnica, caracterizada especialmente por su elevada sensibilidad, permite obtener límites de detección para A, NA, D y DA muy inferiores a los alcanzados por espectrofotometría. Los límites de detección obtenidos posibilitan la aplicación del método que se propone como sistema de detección de CAs en HPLC, para el análisis de CAs libres en fluidos biológicos.

III.2.- Parte experimental

a) Aparatos

- Espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard, modelo 8452A, provisto de un ordenador Hewlett-Packard modelo VECTRA ES/12.

- Espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-240, provisto de software OPI-2.
- pH-metro Crison modelo 2001, con electrodo combinado de vidrio-calomelanos.
- Espectrómetro de lente térmica de haces concéntricos que fue construido por nuestro grupo de investigación (5). En la Figura III.1 se muestra un esquema del mismo. Consta de los elementos que se exponen a continuación.
- El haz de bombeo, generado por un láser de Ar^+ [ver Figura, ítem núm. 1], marca Spectra-Physics, modelo 2016-04, con una potencia máxima en modo multilínea de 4 W. El láser de ion Ar^+ es de onda continua y presenta 8 líneas de emisión en el espectro visible. Entre ellas, las líneas a 514.5 y 488.0 nm son especialmente intensas y adecuadas para su uso analítico, sobre todo en espectroscopía Raman y espectroscopías fototérmicas. Con esta fuente es posible obtener radiaciones estables y fácilmente modulables, pero ya que el mecanismo de generación láser no es cuánticamente muy eficaz, la potencia máxima disponible es limitada. La potencia máxima de salida de las líneas a 514.5 y 488 nm es de 1.7 y 1.3 W, respectivamente, para un tubo nuevo.
- El haz de prueba, de 632.8 nm, generado por un láser de onda continua de He-Ne de 5 mW de la casa Spectra-Physics, modelo 105 [núm. 2].
- Un obturador rotatorio o modulador del haz de bombeo [núm. 4], de la casa Stanford, modelo SR540, con el fin de obtener una lente térmica pulsante. La frecuencia es regulada por un par LED-fotodiodo. Esta señal de regulación se utiliza también para sincronizar el proceso de formación-disipación de la lente con la adquisición de la señal.
- Tres espejos dicróicos de las casas Ealing y Newport para doblar los haces de bombeo y de prueba [núm. 5].

- Dos lentes de la casa Pedret [núms. 6 y 7], para situar la cintura del haz de bombeo en el interior de la cubeta y para situar la cintura del haz de prueba antes de la muestra, a una distancia confocal del centro de la cubeta.
- Un divisor de haz [núm. 8], de la casa Ealing constituido por un dioptrio plano de alta transmitancia, que refleja el 10% de la intensidad de los haces de bombeo y de prueba, permitiendo el paso del 90% de la intensidad del haz de bombeo, y el 10% del haz de prueba, haciendo coaxiales los haces en la región de la cubeta.
- Una cubeta de 1 cm de camino óptico [núm. 9].
- Un filtro interferencial [núm. 10], de la casa Ealing, y un filtro de gelatina de la casa Kodac [núm. 11], que eliminan el haz de bombeo y permiten el paso del haz de prueba.
- Una máscara de rendija horizontal de una décima de milímetro de anchura [núm. 12]. Dicha máscara permite el paso de luz únicamente de zonas seleccionadas del haz de prueba, en concreto del centro del haz.
- Un fotodiodo de la casa Centronic [núm. 13], en el cual se produce una corriente que se transforma en un voltaje y se amplifica [núm. 16]. El voltaje es medido por un registrador o por un sistema computerizado de adquisición y tratamiento de datos [núm. 15].
- Los láseres, junto con el resto de los elementos ópticos, se encuentran instalados sobre una mesa óptica de 180 x 90 cm, perforada cada 2.50 cm, de la casa Ealing, serie 1000, ref. 37-8307.

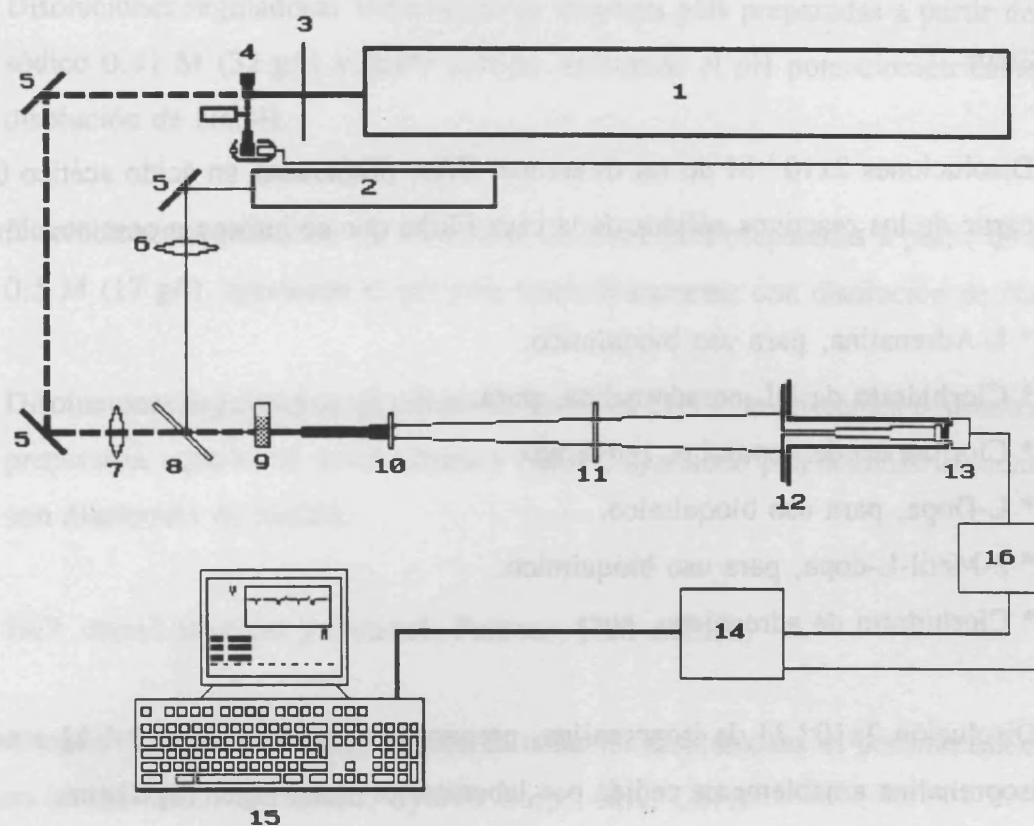


Figura III.1.- Esquema del espectrómetro de lente térmica: [1] láser de bombeo; [2] láser de prueba; [3] obturador manual; [4] modulador de haz; [5] espejos; [6]-[7] lentes biconvexas; [8] divisor de haz; [9] soporte de la cubeta; [10] filtro interferencial; [11] filtro de gelatina; [12] rendija; [13] fotodiodo; [14] caja de conexiones, [15] ordenador provisto de una tarjeta de adquisición de datos DAS-8; [16] conversión corriente-voltaje y amplificación.

Las medidas de lente térmica se realizaron a 514.5 nm y utilizando una frecuencia de modulación de 4 Hz y una potencia de bombeo de 100 mW. Los datos fueron adquiridos por un ordenador PC/AT provisto de una tarjeta de adquisición y tratamiento de datos MetraByte DAS-8. Se empleó una velocidad de adquisición de datos de 100 s^{-1} . La adquisición de las señales y su tratamiento se hizo utilizando el programa AUTOTLS (Automatic Thermal Lens Spectrometry), elaborado en nuestro laboratorio, escrito en QuickBASIC y fusionado con las subrutinas en lenguaje máquina de la interfase DAS-8 al ser compilado (6).

El programa contiene diversas subrutinas que permiten al usuario seleccionar los parámetros del sistema y tratar los datos.

b) Reactivos

- Disoluciones 2×10^{-3} M de las diferentes CAs, preparadas en ácido acético 0.1 M a partir de los reactivos sólidos de la casa Fluka que se indican a continuación:
 - * L-Adrenalina, para uso bioquímico.
 - * Clorhidrato de DL-noradrenalina, pura.
 - * Clorhidrato de dopamina, purísima.
 - * L-Dopa, para uso bioquímico.
 - * 2-Metil-L-dopa, para uso bioquímico.
 - * Clorhidrato de adrenalona, pura.

- Disolución 2×10^{-3} M de isoprenalina, preparada en ácido acético 0.1 M a partir de isoprenalina amablemente cedida por laboratorios Boehringer Ingelheim.

- Disolución acuosa 0.02 M de metavanadato amónico preparada a partir del producto sólido (Merck, R.A.).

- Disolución acuosa de $K_3Fe(CN)_6$ 0.0125 M preparada a partir del producto sólido, Merck, para análisis. Las disoluciones se guardan en frasco topacio en la oscuridad.

- Triton X-100, Panreac, puro.

- Dodecilsulfato sódico (SDS), Merck, de pureza 99%.

- Cloruro de N-cetilpiridinio, F.E.R.O.S.A., puro.

- Disolución de $Cu(Ac)_2 \cdot H_2O$ (Ac = acetato) preparada a partir del producto sólido, Merck, para análisis.

- Acido acético, Probus, para análisis.
- Disoluciones reguladoras HAc-NaAc de diversos pHs preparadas a partir de acetato sódico 0.41 M (32 g/l) y ácido acético, ajustando el pH potenciométricamente con disolución de NaOH.
- Disoluciones reguladoras de fosfato de diversos pHs preparadas a partir de KH_2PO_4 0.5 M (17 g/l), ajustando el pH potenciométricamente con disolución de NaOH.
- Disoluciones reguladoras de citrato de diversos pHs y de diferentes concentraciones, preparadas a partir de ácido cítrico y NaOH, ajustando potenciométricamente el pH con disolución de NaOH.
- HCl, etanol absoluto y metanol, Panreac, para análisis.

El agua utilizada en la preparación de todas las disoluciones es desionizada de grado nanopuro (desionizador Barnstead, Sybron Corp., MA, USA).

III.3.- Espectros y estabilidad de las CAs

Se obtuvieron los espectros de absorción de las diferentes CAs en medio acuoso, en ausencia y presencia de SDS 0.1 M. En la Figura III.2 se muestran los espectros obtenidos en medio no micelar para adrenalina y adrenalona. Los espectros de las restantes CAs son iguales al de la adrenalina. Como puede verse, las CAs presentan dos bandas de absorción cuyos máximos se sitúan a 225 y a 280 nm. La adrenalona presenta una banda de absorción con un máximo a 225 nm, y otra banda ancha entre 250 y 350 nm con dos máximos, uno mayor a 280 nm y otro menor a 325 nm. En medio SDS 0.1 M no se observaron desplazamientos de las bandas de absorción.

Las disoluciones de CAs son inestables en medio neutro o básico y se oxidan lentamente a los correspondientes aminocromos por acción del oxígeno atmosférico. Esta oxidación no tiene lugar en medio ligeramente ácido y a bajas temperaturas. Nosotros

comprobamos que si las disoluciones de CAs se preparaban en medio ácido acético 0.1 M y se guardaban en nevera a 4 °C, éstas eran estables durante al menos un mes.

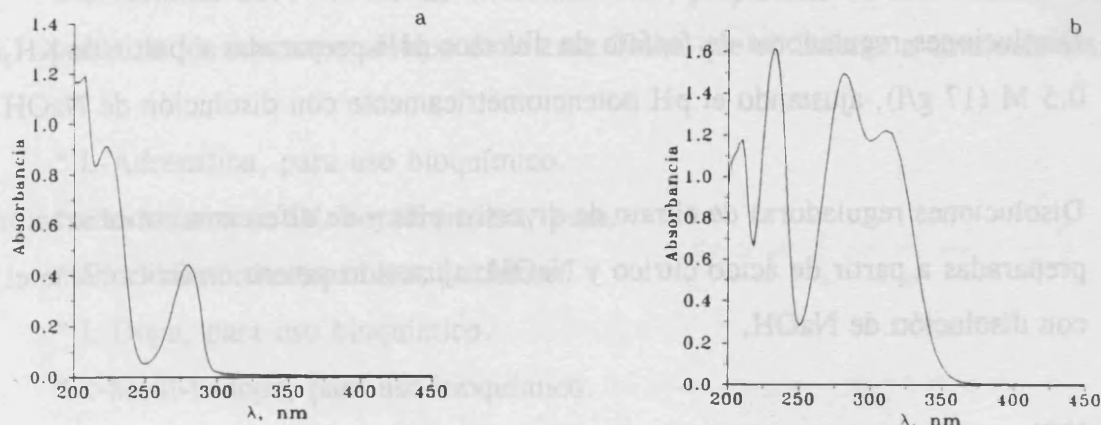


Figura III.2.- Espectros de absorción de (a) adrenalina y (b) adrenalona. $[CA] = 1.6 \times 10^{-4}$ M, en medio acuoso no micelar.

III.4.- Espectros, formación y estabilidad de los aminocromos

III.4.1.- Espectros de los aminocromos

En la Figura III.3 se muestran los espectros de absorción de los aminocromos obtenidos por oxidación de D, NA, A y DA, medidos frente a blanco de reactivos. Todos los aminocromos presentan una banda de absorción en el visible desde 450 a 550 nm., situándose el máximo de absorción a 488 nm para D, NA y A, y a 475 nm para DA.

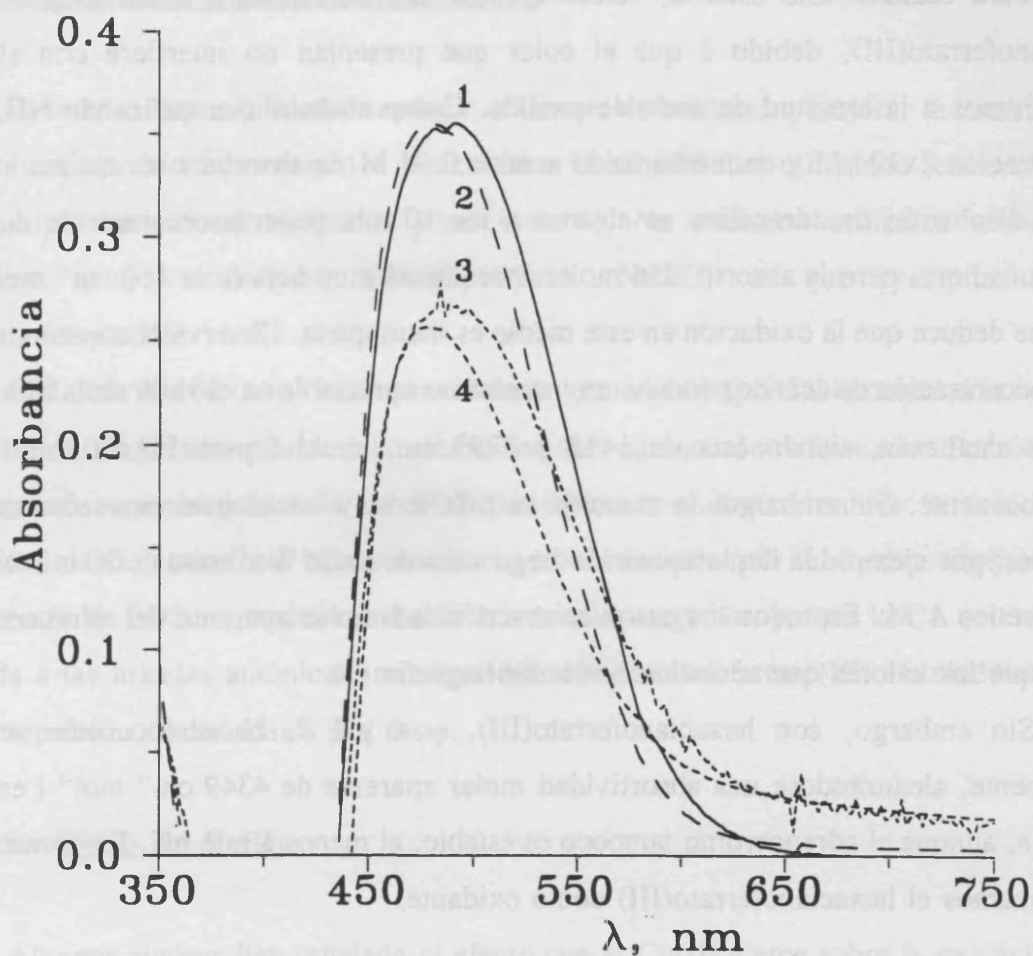


Figura III.3.- Espectros de absorción de los aminocromos correspondientes a: (1) adrenalina, (2) L-dopa, (3) noradrenalina y (4) dopamina. $[CA] = 8.5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

III.4.2.- Elección del agente oxidante

Para la oxidación de las CAs a aminocromos, se han empleado diversos oxidantes, en estado sólido Ag_2O (7, 8), PbO_2 (9, 10) y MnO_2 (11, 12) y en disolución $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ (13), MnO_4^- (14), I_2 (15, 16), NH_4VO_3 (17), Fe(III) (18), bromamina-T (19), resazurina (20), IO_3^- (21), BrO_3^- , bromo (2, 21) y hexacianoferrato(III) o ferricianuro (1). La oxidación de CAs con yodo, bromo, yodato y bromato puede dar lugar, dependiendo del pH y de la concentración de oxidante, a la formación de 2-haloaminocromos (2, 21). También el oxígeno atmosférico oxida a las CAs después de un periodo de inducción (22).

Para realizar este estudio, seleccionamos el metavanadato amónico y el potasio hexacianoferrato(III), debido a que el color que presentan no interfiere con el de los aminocromos a la longitud de onda de medida. Comprobamos que utilizando NH_4VO_3 en concentración 2×10^{-3} M y en medio ácido acético 0.01 M, la absorbancia máxima a 495 nm de una disolución de adrenalina se alcanza a los 10 min y permanece estable durante al menos una hora, pero la absorptividad molar aparente es muy baja ($\epsilon = 460 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$) por lo que se deduce que la oxidación en este medio es incompleta. Observamos que un aumento en la concentración de acético produce un incremento apreciable en el valor de la absorbancia máxima alcanzada, siendo ésta de 1418 y $2797 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$ para HAc 0.1 M y 1 M respectivamente. Sin embargo, la reacción es más lenta y los aminocromos formados son inestables, por ejemplo la descomposición llega a ser de un 35% al cabo de 30 min en medio ácido acético 1 M. En todos los casos la absorptividad molar aparente del adrenocromo es menor que los valores que se indican en la bibliografía (1).

Sin embargo, con hexacianoferrato(III), y a pH 7, el adrenocromo se forma rápidamente, alcanzándose una absorptividad molar aparente de $4349 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$ en menos de 1 min, aunque el adrenocromo tampoco es estable, al menos a este pH. En consecuencia, seleccionamos el hexacianoferrato(III) como oxidante.

III.4.3. - Efecto de la concentración de hexacianoferrato(III)

Mediante espectrofotometría comprobamos que para que la oxidación de las CAs sea completa y suficientemente rápida, la concentración de hexacianoferrato(III) debe ser superior a 5 veces la de CA. En base a ello proponemos una concentración de 2.5×10^{-3} M. A esta concentración la absorbancia de la disolución del blanco de reactivos es prácticamente nula a la longitud de onda de medida (488 nm), y los calibrados son lineales en un amplio margen de concentraciones.

Una de las causas que limitan la aplicabilidad de la ELT radica en la señal analítica de los blancos. Comprobamos que la señal de lente térmica del blanco permanece prácticamente invariable para concentraciones inferiores a 6×10^{-4} M de oxidante. Seleccionamos una concentración de hexacianoferrato(III) de 2×10^{-4} M, y comprobamos que con esta concentración la oxidación de las CAs era completa y suficientemente rápida en un amplio margen de concentraciones.

III.4.4.- Efecto de la presencia de tensioactivo

Se estudió la posibilidad de reducir el tiempo de oxidación, mejorar la estabilidad de las disoluciones de aminocromos e incrementar la sensibilidad utilizando tensioactivos de distinto tipo (catiónicos, aniónicos y no iónicos). No pudieron utilizarse tensioactivos catiónicos, como cloruro de N-cetilpiridinio (NCPC) ya que precipitan con el hexacianoferrato(III).

El Triton X-100 (tensioactivo no iónico) no modifica apreciablemente ni la velocidad de oxidación de la adrenalina ni la estabilidad del adrenocromo formado. Por otra parte comprobamos que la presencia de SDS (tensioactivo aniónico) reduce la velocidad de oxidación, siendo este efecto más acusado cuanto menor es el pH del medio. Probablemente en presencia de SDS se produce una catálisis micelar negativa, ya que la CA se encontrará enlazada a las micelas aniónicas, mientras que el hexacianoferrato(III), también aniónico, sufrirá repulsión electrostática por éstas.

- III.4.5.- Efecto del Cu(II)

Algunos autores han señalado el efecto que el Cu(II) ejerce sobre la oxidación de la adrenalina, debido a la formación de un complejo autooxidable adrenalina-metal (22, 23). Comprobamos que a la concentración de Cu(II) (3×10^{-4} M) propuesta por Weil-Malherbe y Bigelow (23) y a pH 4.75, se aprecia un incremento considerable de la velocidad de oxidación, pero con el tiempo se forma precipitado de hexacianoferrato(III) de cobre(II). Esta precipitación no se evita con SDS ni con Triton X-100. Por otra parte, con concentraciones suficientemente bajas de Cu(II) de 3.8×10^{-5} M, que evitan la precipitación, no se observó aumento en la velocidad de oxidación.

III.4.6.- Optimización del pH

En la bibliografía se describen procedimientos en los que la oxidación de las CAs con hexacianoferrato(III) se lleva a cabo en medios de diferente acidez, desde pH 3.5 hasta 7. Tanto la velocidad de oxidación de las CAs, como la estabilidad de los aminocromos formados dependen fuertemente del pH del medio. En general un incremento de pH entre 4.7

y 7 supone un aumento de la velocidad de oxidación. A pH 7 la oxidación de las cuatro CAs es casi instantánea mientras que a pH 6 los tiempos de formación de los aminocromos derivados de A, NA, D y DA son de 2, 8, 11 y 34 min respectivamente. En la Figura III.4 se muestra la variación de la velocidad de formación de los aminocromos con el pH.

Por otra parte un incremento de pH supone para las cuatro CAs estudiadas una mayor velocidad de descomposición de los aminocromos formados. En la Tabla III.1 se muestra la disminución de la absorbancia para los aminocromos, formados en diferentes medios, a los 30 min de haberse alcanzado la absorbancia máxima. Como puede observarse en dicha Tabla, la estabilidad de los aminocromos es menor a pH 7. Para este valor de pH, en el caso del noradrenocromo, y tras una etapa de descomposición inicial, la absorbancia parece estabilizarse, produciéndose posteriormente un aumento de absorbancia. Sin embargo, esto es debido a que el noradrenocromo se polimeriza rápidamente a este pH, dando un precipitado de melaninas de color azul en suspensión.

Tabla III.1 - Estabilidad de las disoluciones de aminocromos: disminución de la absorbancia o de la señal de lente térmica después de 30 min de haberse alcanzado la absorbancia máxima.

Condiciones experimentales				Disminución de la señal en 30 min (%)			
Conc. (M)	Método ^a	Tampón	pH	D	NA	A	DA
8×10^{-5}	esp	citrato	6.0	4.9	4.2	0.8	0.0
8×10^{-5}	esp	citrato	7.0	18	^b	6.9	19
8×10^{-5}	esp	fosfato	7.0	34	^b	19	17
2×10^{-6}	ELT	citrato	6.0	0.0	4.0	0.0	4.0
2×10^{-6}	ELT	citrato	7.0	17	0.0	0.0	0.0
2×10^{-6}	ELT	citrato ^c	7.0	20	5.6	7	12

^a esp = espectrofotometría; ELT = espectroscopía de lente térmica.

^b Formación de precipitado.

^c En medio agua/etanol 50:50 (v/v).

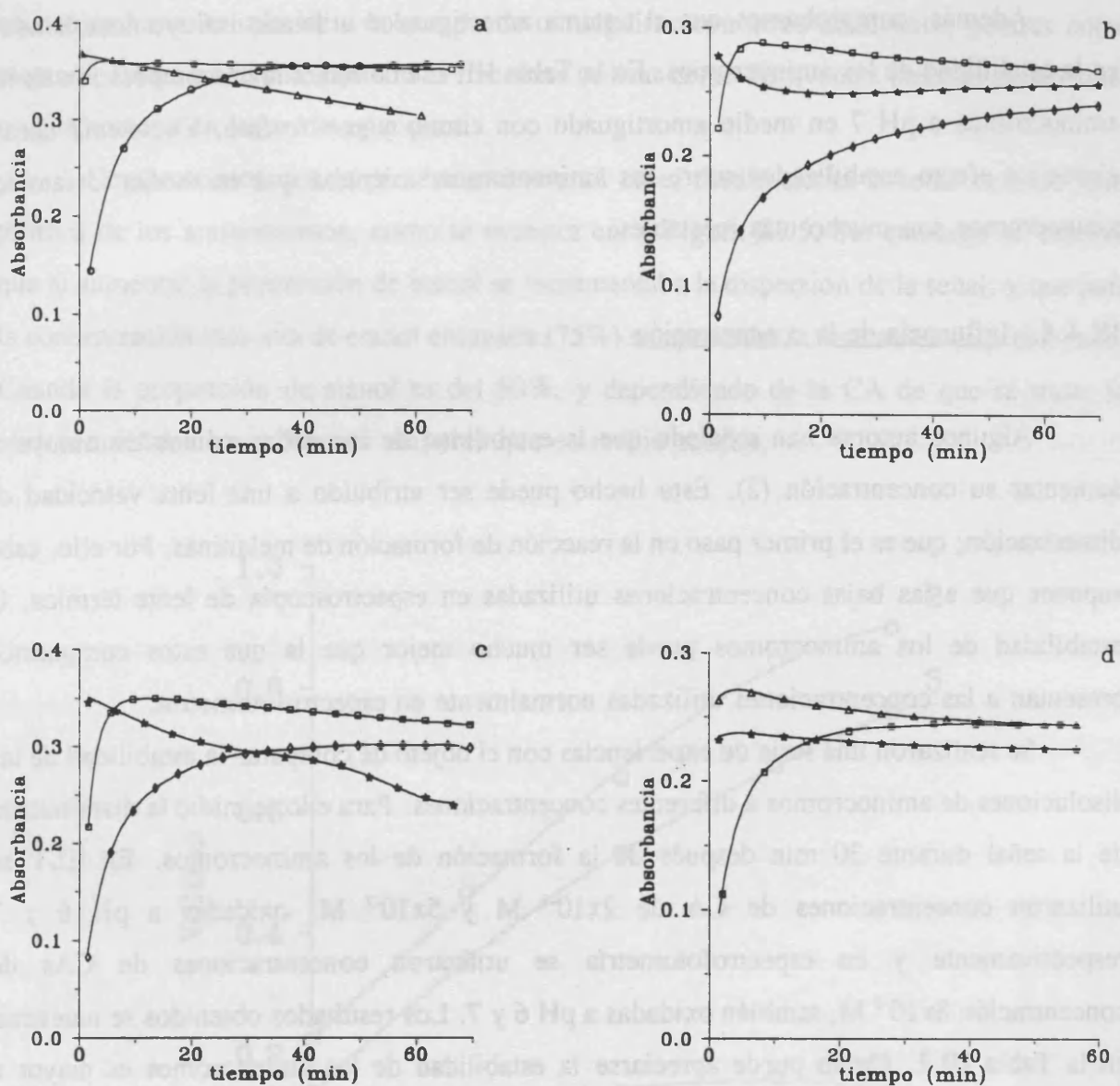


Figura III.4.- Cinéticas de formación y descomposición de los aminocromos: (a) adrenocromo, (b) noradrenocromo, (c) dopacromo, (d) dopaminocromo. pHs: (○) 4.8, (◇) 5.5, (□) 6.0, (★) 6.5, (△) 7.0.

III.4.7.- Influencia del sistema amortiguador

Además, comprobamos que el sistema amortiguador utilizado influye notablemente en la estabilidad de los aminocromos. En la Tabla III.1 se compara la descomposición de los aminocromos a pH 7 en medio amortiguado con citrato y con fosfato. El sistema citrato ejerce un efecto estabilizador sobre los aminocromos, mientras que en medio fosfato los aminocromos son mucho más inestables.

III.4.8.- Influencia de la concentración

Algunos autores han señalado que la estabilidad de los aminocromos disminuye al aumentar su concentración (2). Este hecho puede ser atribuido a una lenta velocidad de dimerización, que es el primer paso en la reacción de formación de melaninas. Por ello, cabe suponer que a las bajas concentraciones utilizadas en espectroscopía de lente térmica, la estabilidad de los aminocromos puede ser mucho mejor que la que estos compuestos presentan a las concentraciones utilizadas normalmente en espectrofotometría.

Se realizaron una serie de experiencias con el objeto de comparar la estabilidad de las disoluciones de aminocromos a diferentes concentraciones. Para ello se midió la disminución de la señal durante 30 min después de la formación de los aminocromos. En ELT se utilizaron concentraciones de CA de 2×10^{-6} M y 5×10^{-7} M, oxidadas a pH 6 y 7 respectivamente y en espectrofotometría se utilizaron concentraciones de CAs de concentración 8×10^{-5} M, también oxidadas a pH 6 y 7. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.1. Como puede apreciarse la estabilidad de los aminocromos es mayor a concentraciones bajas, excepto para el dopacromo a pH 7. Sin embargo, a pH 6 y a bajas concentraciones, el dopacromo es suficientemente estable como para permitir su determinación mediante espectroscopía de lente térmica.

III.4.9.- Influencia de la presencia de etanol

La sensibilidad de la señal analítica en espectroscopía de lente térmica depende en gran medida del valor de la derivada del índice de refracción respecto de la temperatura, siendo mayor cuando más alto es este valor. Por lo tanto los disolventes que proporcionan

una mayor sensibilidad serán los apolares como Cl_4C , S_2C , pentano, hexano etc., seguidos de los polares con el agua en último lugar. La sensibilidad que puede obtenerse en medio acuoso es bastante inferior a la que puede conseguirse con otros disolventes polares como metanol, etanol o acetona, por ello es frecuente utilizar como disolventes mezclas agua/etanol o agua/acetona en lugar de agua pura.

Comprobamos que la presencia de etanol en el medio exalta la señal neta de lente térmica de los aminocromos, como se muestra en la Figura III.5. Sin embargo se observó que al aumentar la proporción de etanol se incrementaba la dispersión de la señal, y que para la concentración más alta de etanol ensayada (75%) se apreciaba la formación de precipitado. Cuando la proporción de etanol es del 50%, y dependiendo de la CA de que se trate, se obtienen señales hasta 5 veces mayores que en medio acuoso.

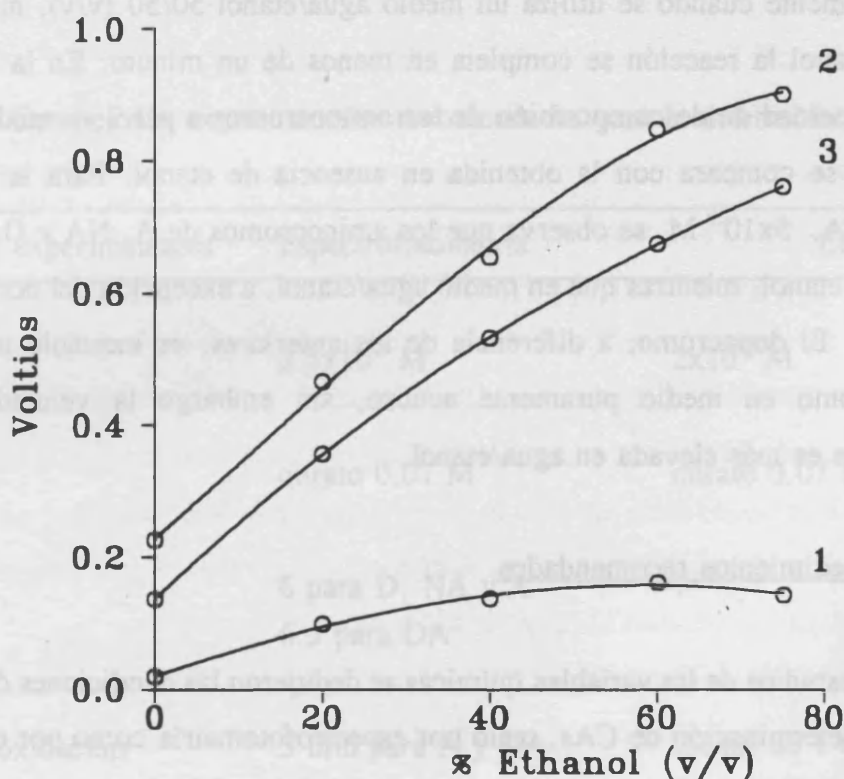


Figura III.5.- Influencia de la concentración de alcohol sobre la sensibilidad para el adrenocromo utilizando ELT: (1) blanco, (2) adrenocromo + blanco, (3) diferencia. Concentraciones finales: adrenalina, 7×10^{-7} M, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 2×10^{-4} M. La disolución acuosa contiene siempre tampón citrato 0.07 M de pH 6.

Por otra parte, también observamos que en medio acetato 0.1 M y pH 6, con una proporción de etanol en el medio del 50%, y tras un periodo de inducción, se producía un aumento continuo de las señales de lente térmica de las disoluciones de aminocromo y de los blancos, que llegaba a saturar el detector. Como se verá en el capítulo IV, éste efecto era debido a la formación en la pared de la cubeta de un depósito de precipitado de hidróxido de Fe(III), producido por fotodegradación del hexacianoferrato(III) inducida por la radiación láser. Sin embargo en medio citrato 0.07 M la señal de lente térmica del blanco es estable al menos durante 30 min.

Por otra parte, comprobamos que la presencia de etanol en el medio produce una disminución de la velocidad de formación de los aminocromos, y un aumento en la velocidad de descomposición del mismo. A pH 7 y para concentraciones de 5×10^{-7} M de CA, los tiempos de formación de los diferentes aminocromos oscilan entre 3 y 10 min para D y NA respectivamente cuando se utiliza un medio agua/etanol 50/50 (v/v), mientras que en ausencia de etanol la reacción se completa en menos de un minuto. En la Tabla III.1 se muestra la velocidad de descomposición de los aminocromos a pH 7 en medio agua/etanol 50/50 (v/v) y se compara con la obtenida en ausencia de etanol. Para la concentración estudiada de CA, 5×10^{-7} M, se observa que los aminocromos de A, NA y DA son estables en ausencia de etanol, mientras que en medio agua/etanol, a excepción del noradrenocromo, son inestables. El dopacromo, a diferencia de los anteriores, es inestable tanto en medio agua/etanol como en medio puramente acuoso, sin embargo la velocidad inicial de descomposición es más elevada en agua/etanol.

III.4.10.- Procedimientos recomendados

De los estudios de las variables químicas se dedujeron las condiciones óptimas (Tabla III.2) para la determinación de CAs, tanto por espectrofotometría como por espectroscopía de lente térmica. Los procedimientos que se recomiendan para la dererminación de CAs mediante espectrofotometría y espectroscopía de lente térmica son los siguientes:

Determinación espectrofotométrica: En aforados de 25 ml se introducen, en el orden indicado, 5 ml de disolución reguladora de citrato 0.035 M de pH 6 (pH 6.5 en el caso de la dopamina), 5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.0125 M, una alícuota de disolución de CAs conteniendo

de 0.04 a 5 μ moles de soluto y se afora con agua. La oxidación se completa en 3 min para A y DA, y en 10 min para NA y D. La absorbancia se mide a 488 nm frente a blanco de reactivos.

Determinación mediante espectroscopía de lente térmica: En tubos de ensayo secos se introducen, en el orden indicado, 1 ml de disolución reguladora de citrato 0.2 M de pH 7, 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 6×10^{-3} M y una alícuota de disolución de CAs conteniendo de 0.3 a 10 nmoles de soluto. El volumen se completa a 3 ml. La mezcla se introduce en el tubo forzándola a través de un filtro de 0.22 μ m que se acopla a una jeringa. Las señales de lente térmica se obtienen bombeando a 514.5 nm. Se puede aumentar la sensibilidad doblando el volumen de la disolución con etanol inmediatamente antes de medir.

Tabla III.2.- Condiciones experimentales recomendadas para la determinación de CAs.

Condiciones experimentales	Espectrofotometría	ELT
$K_3Fe(CN)_6$	2.5×10^{-3} M	2×10^{-4} M
Tampón	citrato 0.07 M	citrato 0.07 M
pH	6 para D, NA y A 6.5 para DA	7
Tiempo de oxidación	3 min para A y DA 10 min para D y NA	menos de 1 min
Composición del disolvente	agua	agua o agua/etanol 50:50 (v/v)

III.5.- Características analíticas de la determinación de aminocromos mediante espectrofotometría y ELT.

En la Tabla III.3 se comparan las características analíticas significativas (sensibilidad, reproducibilidad, límite de detección e intervalo dinámico lineal) obtenidas mediante espectrofotometría y espectroscopía de lente térmica al aplicar los procedimientos propuestos anteriormente. Mediante espectrofotometría se obtienen gráficas de calibrado que son lineales en todo el intervalo de concentraciones estudiado, hasta 2×10^{-4} M. Los coeficientes de correlación son en todos los casos superiores a 0.999. Mediante espectroscopía de lente térmica los calibrados obtenidos también son lineales, tanto en medio acuoso como en agua/etanol. Los coeficientes de correlación son superiores a 0.999, excepto para el L-dopa en medio acuoso, que fue de 0.990. El límite superior del intervalo dinámico corresponde a la diferencia entre el haz de prueba no modificado y la ausencia de luz en la rendija de entrada al fotodetector, cuyo valor fue de 3 V.

En comparación con la espectrofotometría, los límites de detección son unas 15 veces menores en espectroscopía de lente térmica, en medio acuoso, y unas 50 veces si la señal de lente térmica se mide en medio agua/etanol. Aunque los límites de detección obtenidos mediante espectroscopía de lente térmica son del orden de 1 ng/ml, podrían obtenerse aún mejores límites de detección aumentando la potencia del láser de bombeo y reduciendo el ruido de fondo producido por la inestabilidad del láser de prueba. En el caso del L-dopa, los aumentos de sensibilidad, así como la disminución de los límites de detección en espectroscopía de lente térmica, no son tan favorables como los obtenidos para otras CAs, especialmente en medio agua/etanol. Este hecho puede ser debido a la mayor inestabilidad del dopacromo a pH 7 respecto al resto de las CAs.

La reproducibilidad se obtuvo midiendo la señal de 10 disoluciones de cada CA, preparadas de forma independiente. Se utilizaron concentraciones de CA de 8×10^{-5} M para espectrofotometría y de 1×10^{-6} M para espectroscopía de lente térmica. Como puede verse en la Tabla III.3, la reproducibilidad obtenida con ambas técnicas es inferior a 1.2% en espectrofotometría y a 2.6% en espectroscopía de lente térmica. En la Tabla III.4 se muestran las señales obtenidas para espectroscopía de lente térmica utilizando un medio agua/etanol 50:50 (v/v).

Tabla III.3.- Características analíticas.

Característica	Proced.	D	NA	A	DA
Sensibilidad ^a	esp	3900	3500	4200	2700
	ELT	2.6×10^5	2.6×10^5	3.7×10^5	2.0×10^5
	ELT ^c	5.6×10^5	1.3×10^6	1.8×10^6	1.1×10^6
CV (%)	esp	0.3	0.5	0.6	1.2
	ELT	2.3	2.1	2.0	2.6
LOD (ng/ml) ^b	esp	64	62	55	83
	ELT	5	4	3	5
	ELT ^c	4	1	1	1
Intervalo dinámico lineal (límite superior, ng/ml)	ELT	2300	1900	1500	2300
	ELT ^c	1100	400	300	400

^a Unidades: $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$ para espectrofotometría y $\text{V mol}^{-1} \text{l}$ para espectroscopía de lente térmica. ^b LOD = límite de detección. ^c Medio agua/etanol 50:50 (v/v).

Tabla III.4.- Reproducibilidad de las señales de lente térmica.

Medida	D	NA	A	DA
1	0.678	1.538	1.851	1.383
2	0.672	1.540	1.920	1.405
3	0.681	1.558	1.836	1.332
4	0.660	1.500	1.885	1.338
5	0.647	1.550	1.848	1.353
6	0.680	1.528	1.814	1.438
7	0.637	1.494	1.899	1.426
8	0.681	1.507	1.893	1.405
9	0.666	1.466	1.822	1.393
10	0.668	1.476	1.824	1.387
Media, V	0.667	1.516	1.859	1.386
±s	0.015	0.032	0.037	0.036
CV (%)	2.3	2.1	2.0	2.6

III.VI.- Bibliografía

1. G.M. Ridder y D.W. Margerum; *Anal. Chem.* 1977, 49, 2090.
2. R.A Heacock; *Chem. Revs.* 1959, 59, 181.
3. V. Moret; *Giorn. Biochim.* 1954, 3, 210.
4. V. Zambotti y V. Moret; *Arch. Sci. Biol.* 1950, 34, 272.
5. E.F. Simó Alfonso, M.A. Rius Revert, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Appl. Spectrosc.* 1990, 44, 1501.
6. E.F. Simó Alfonso, M.C. García Alvarez-Coque, G. Ramis Ramos, A. Cladera Forteza, M. Estela Ripoll y V. Cerdá Martín; *Anal. Lett.* 1992, 25, 573.
7. I. Ehrlén; *Farm. Revy* 1948, 47, 321.
8. H. Sobotka y J. Austin; *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 3077.
9. J.D. Bu'lock y J. Harley-Mason; *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 712.
10. M. Rangier; *Compt. Rend.* 1945, 220, 246.
11. A. Lund; *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1949, 5, 231.
12. A. Lund; *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1950, 6, 137.
13. F.G. Stock y L.W. Hinson; *J. Pharm. and Pharmacol.* 1955, 7, 512.
14. T. Suzuki y T. Ozaki; *Tohoku J. Exptl. Med.* 1951, 54, 332.
15. M.J. Oesterling y R.L. Tse; *Am. J. Med. Technol.* 1961, 27, 112.
16. R.H. Leach, C. Ware y J. Hosp; *Pharm.* 1968, 25, 99.
17. F.B. Salem, *Talanta*; 1987, 34, 810.
18. M.I. Walsh, A. Abou Ouf y F.B. Salem; *Indian J. Pharm. Sci.* 1983, 45, 223.
19. A. Abou Ouf, M.I. Walsh, F.B. Salem; *Analyst* 1981, 106, 949.
20. F.B. Salem; *J. Pharm. Belg.* 1986, 41, 35.
21. A. Correia; *Anais fac. farm. Porto* 1952, 12, 63.
22. E.M. Trautner y T.R. Bradley; *Australian J. Sci. Res.* 1951, 4b, 303.
23. H. Weil-Malherbe y B. Bigelow, *Anal. Biochem.* 1968, 22, 321

***IV.- EFECTOS FOTOLITICOS Y DE TRANSPORTE PRODUCIDOS
POR LA RADIACION DE BOMBEO SOBRE LAS
DISOLUCIONES DE HEXACIANOFERRATO(III)***

IV.- EFECTOS FOTOLITICOS Y DE TRANSPORTE PRODUCIDOS POR LA RADIACION DE BOMBEO SOBRE LAS DISOLUCIONES DE HEXACIANOFERRATO(III)

IV.1.- Introducción

Con la aparición del láser en 1958 se abrieron nuevas posibilidades para la espectroscopía (1). Las perspectivas iniciales no se vieron defraudadas con el tiempo. Así, a finales de los años 70, se habían descrito un gran número de nuevas técnicas espectroscópicas basadas en el uso del láser, incluyendo una gran variedad de aplicaciones analíticas (2). Con el desarrollo de nuevas técnicas no sólo surgen nuevas aplicaciones sino también efectos asociados inesperados o incluso fenómenos nuevos. Algunos de estos efectos pueden originar interferencias, y pueden ser también de utilidad analítica.

Por ejemplo, en relación con la espectrometría de lente térmica (ELT), el calentamiento de la muestra en la región irradiada produce un movimiento convectivo del líquido que da lugar a ruido indeseable (3,4). Por el contrario, un efecto interesante desde puntos de vista teórico y práctico, es la falta de proporcionalidad directa entre la sensibilidad de la lente térmica y la absorbancia (5).

Hasta la fecha no se han descrito interferencias o aplicaciones basadas en efectos fotolíticos producidos por la intensa radiación del haz de bombeo que se utiliza en los experimentos de ELT. Por el contrario, se han descrito efectos de la presión de la radiación sobre partículas pequeñas, lo que se ha utilizado para sujetar o sustentar muestras como pueda ser una célula para cambiarla de lugar bajo microscopio (6) o una partícula sólida o líquida levitada, con el fin de obtener su espectro Raman (7,8).

En este capítulo se describe y estudia un fenómeno producido por la radiación de bombeo, cuya causa posible es la degradación fotolítica del hexacianoferrato(III) asociada al transporte de las partículas de hidróxido de hierro(III) generadas. Asimismo, se discute el interés analítico y las posibles aplicaciones del efecto observado.

IV.2.- Parte experimental

a) Aparatos

- Espectrómetro de lente térmica descrito en el apartado III.2.a. Se utilizó una longitud de onda de 514.5 nm para el bombeo y una frecuencia de modulación de 4 Hz. La señal se adquirió de la forma descrita en el apartado III.2.a.
- Celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y pequeños trozos de láminas de cuarzo (Hellma, Mülheim/Baden).
- Un microscopio electrónico de barrido (modelo S-500, Hitachi, Tokio) provisto de un detector de rayos X de energía dispersiva (Kevex) y un detector Robinson para electrones retrodispersados.

b) Reactivos

- Disolución acuosa de $K_3Fe(CN)_6$ 10^{-3} M, preparada a partir del producto sólido de Merck.
- Disoluciones amortiguadoras de pH 6.0 de acetato 0.5 M y de citrato 0.35 M.
- Etanol (grado analítico, Panreac), y acetona (pura, Quimón).

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA) y reactivos de grado analítico.

IV.3.- Resultados

Cuando una disolución de hexacianoferrato(III) potásico 2×10^{-4} M en una mezcla 1:1 (v/v) de tampón acetato 0.2 M y etanol se irradió con la radiación de 514.5 nm procedente

del láser de Ar^+ con una potencia de 250 mW, se observó que, después de un periodo de inducción de aproximadamente 3 min, la señal de lente térmica aumentaba de manera continua. Además, cuando la cubeta se desplazó lateral o verticalmente, después de regresar la señal a la línea base volvió a repetirse el fenómeno. Los resultados de una serie de experimentos se muestran en la Figura IV.1.

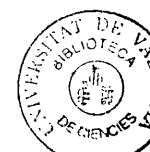
Además, como se muestra en la Figura IV.2, cuando el haz de bombeo se cortó durante unos pocos minutos y posteriormente, sin cambiar la posición de la cubeta, se irradió de nuevo, la señal continuó aumentando a partir del mismo valor y con la misma pendiente que antes de cortar el haz. El mismo fenómeno se observó con potencias mas bajas del haz de bombeo, aunque como se aprecia en la Figura IV.3, los periodos de inducción fueron mas largos y las pendientes menores. Para una potencia de bombeo de 100 mW, el periodo de inducción fué de unos 6 min, y la pendiente durante los 10 primeros minutos fue unas diez veces mas pequeña que para 250 mW.

Se observó que los periodos de inducción eran más cortos y las pendientes mas altas al incrementar el contenido de etanol en el medio. Sin embargo, si en lugar de etanol se añadía acetona, como se muestra en la Figura IV.4, la pendiente era menor y el periodo de inducción más largo, por ejemplo, para una potencia de bombeo de 100 mW fue de aproximadamente 20 min.

Como se muestra en la Figura IV.5, el aumento de la señal era inhibido o retrasado en presencia de agentes complejantes del Fe(III) , como citrato. También se observó que la inhibición era proporcional a la concentración de citrato. Por otra parte, no se observaron cambios en la señal si se utilizaban disoluciones de cloruro de Fe(III) en vez de hexacianoferrato(III).

El aumento continuo de la señal así como el periodo de inducción dependen de la concentración de hexacianoferrato(III). Como se muestra en la Figura IV.6, al incrementar la concentración de hexacianoferrato(III) el periodo de inducción disminuyó y la pendiente señal/tiempo aumentó. Sin embargo, ninguno de estos dos parámetros fueron suficientemente reproducibles para poder construir una gráfica de calibrado para el hexacianoferrato(III).

Si la disolución de hexacianoferrato(III) se irradiaba durante 30 min con una potencia de 500 mW se producía un depósito puntual de sólido sobre la cara posterior de la cubeta. Sin embargo, usando potencias menores de 100 y 250 mW, no se distinguía ninguna mancha sobre la pared, incluso después de un tiempo de irradiación continuo de 90 minutos. El



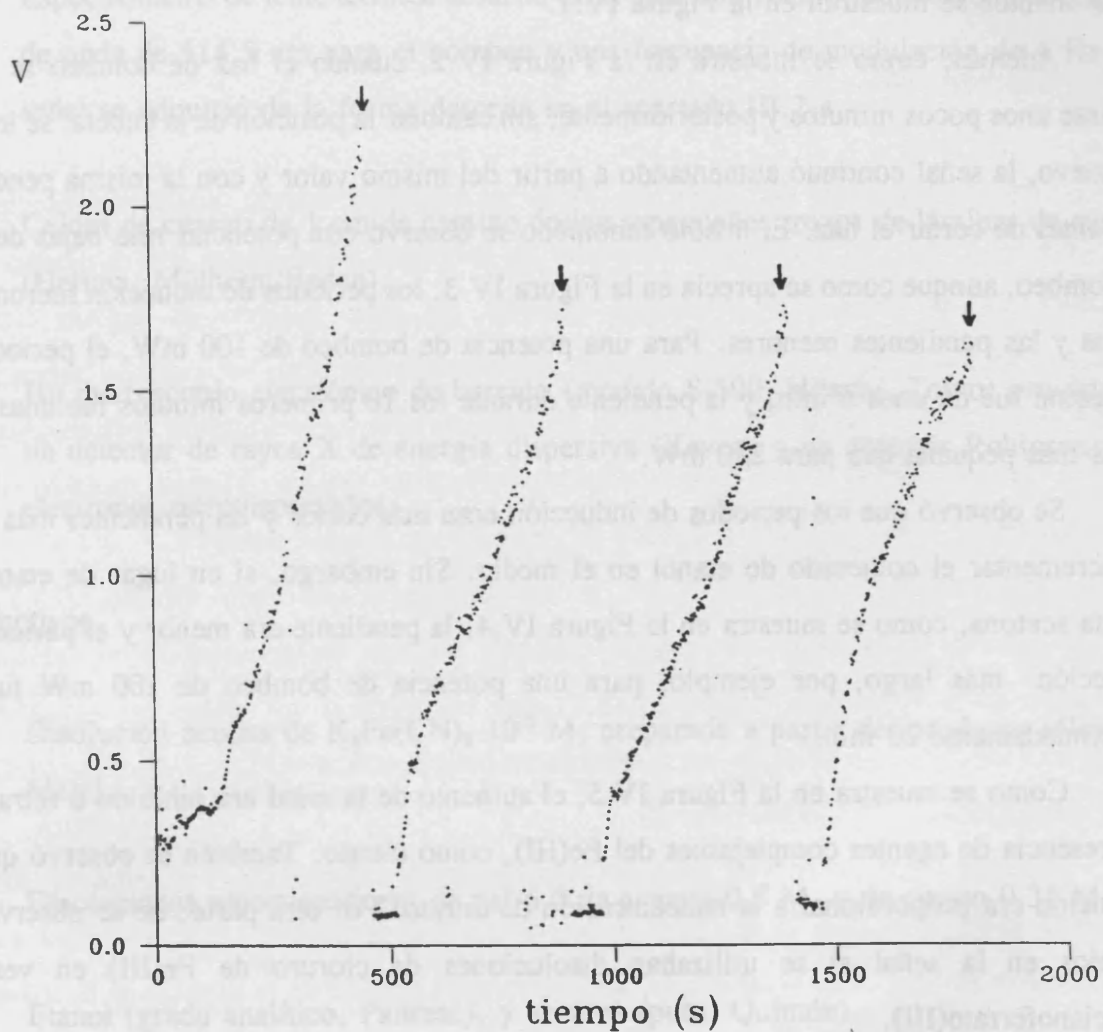


Figura IV.1.- Variación de la señal de lente térmica con el tiempo. Disolución de $K_3Fe(CN)_6$, 2×10^{-4} M en tampón HAc/NaAc 0.1 M de pH 6.0 y medio agua/etanol 50/50 (v/v). Potencia de bombeo = 250 mW. (↓) Tiempos en los que se corta el haz de bombeo y se modifica la posición de la cubeta.

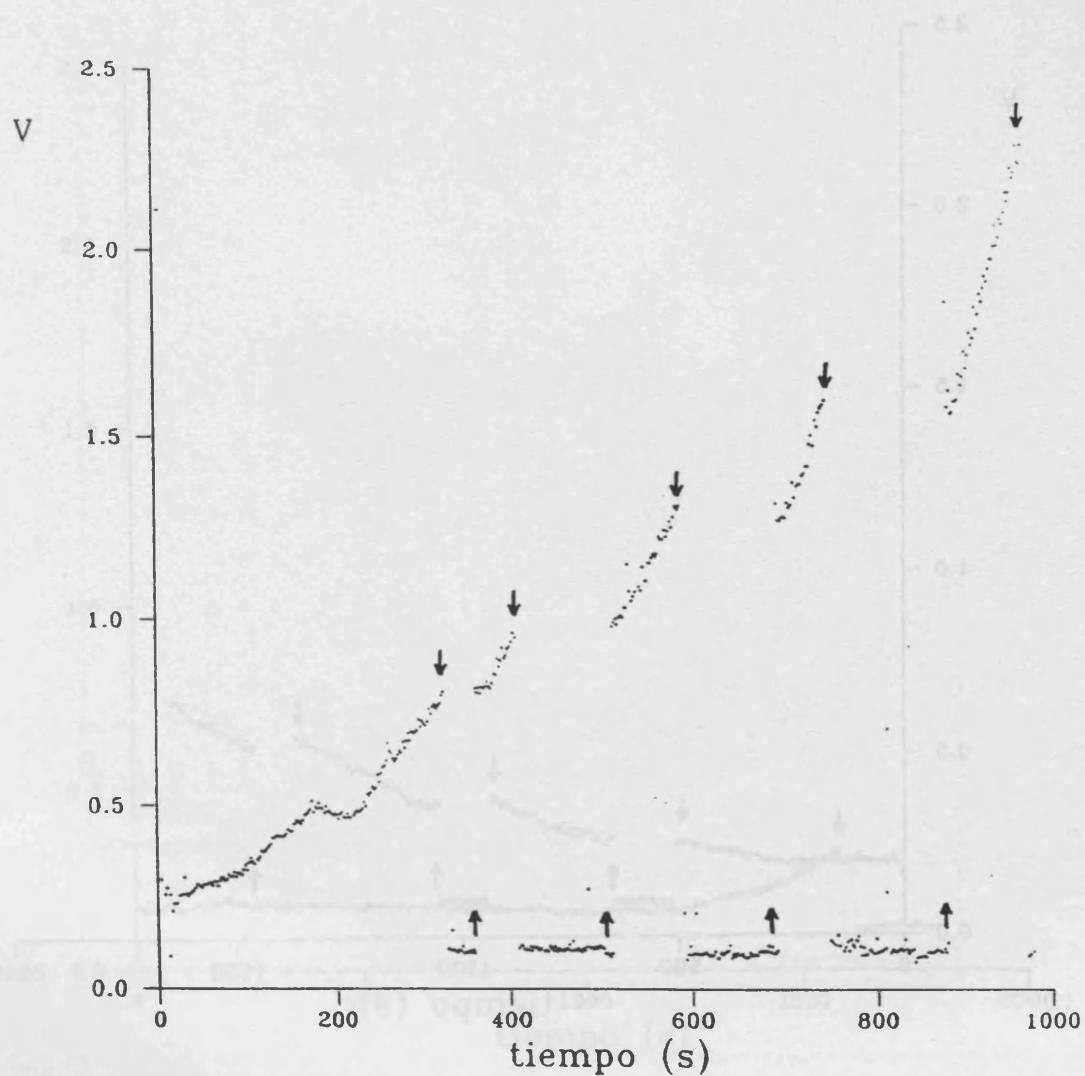


Figura IV.2.- Variación de la señal de lente térmica con el tiempo. Disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-4} M en tampón HAc/NaAc 0.1 M de pH 6.0 y medio agua/etanol 50/50 (v/v). Potencia de bombeo = 250 mW. (↓) Tiempos a los que se corta el haz de bombeo y no se modifica la posición de la cubeta. (↑) Se restaura el bombeo.

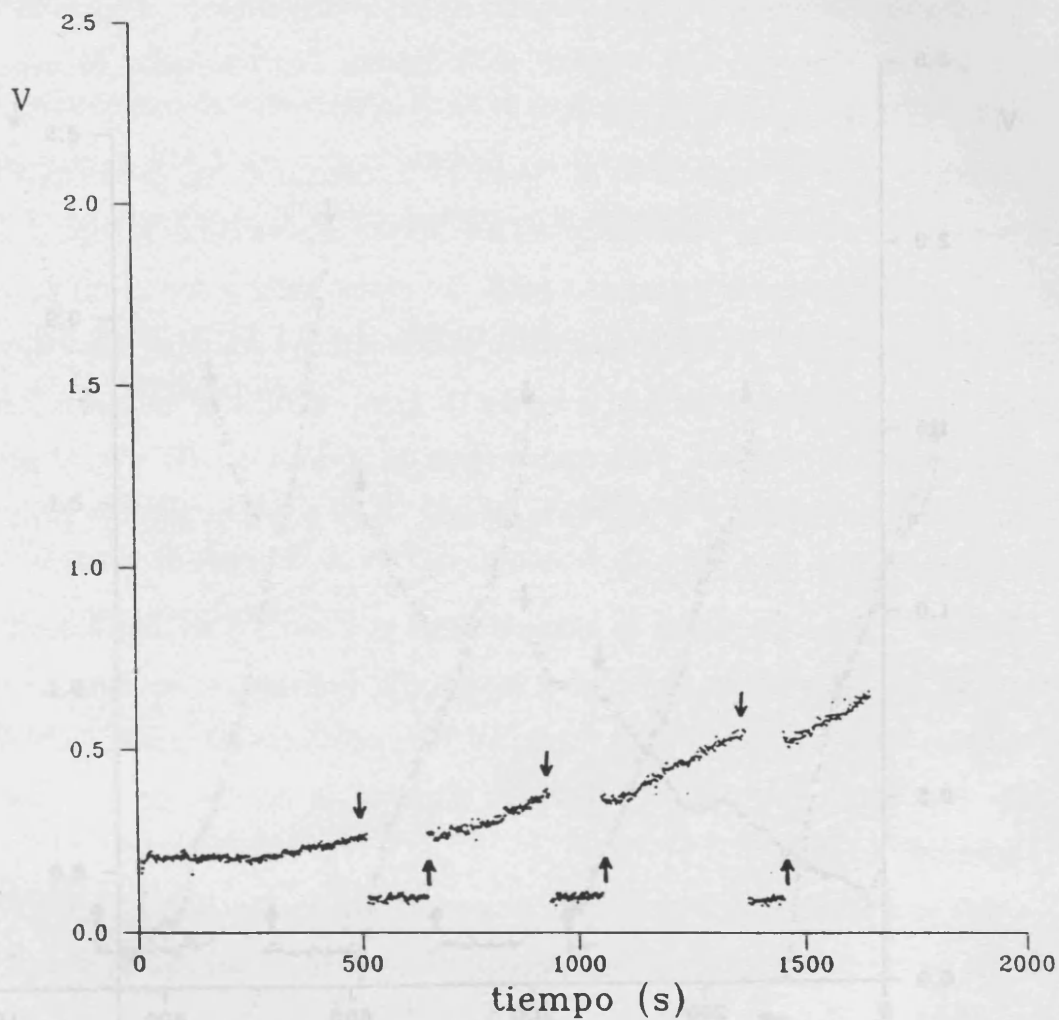


Figura IV.3.- Variación de la señal de lente térmica con el tiempo. Disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-4} M en tampón HAc/NaAc 0.1 M de pH 6.0 y medio agua/etanol 50/50 (v/v). Potencia de bombeo = 100 mW. (↓) Tiempos en los que se corta el haz de bombeo y no se modifica la posición de la cubeta. (↑) Se restaura el bombeo.

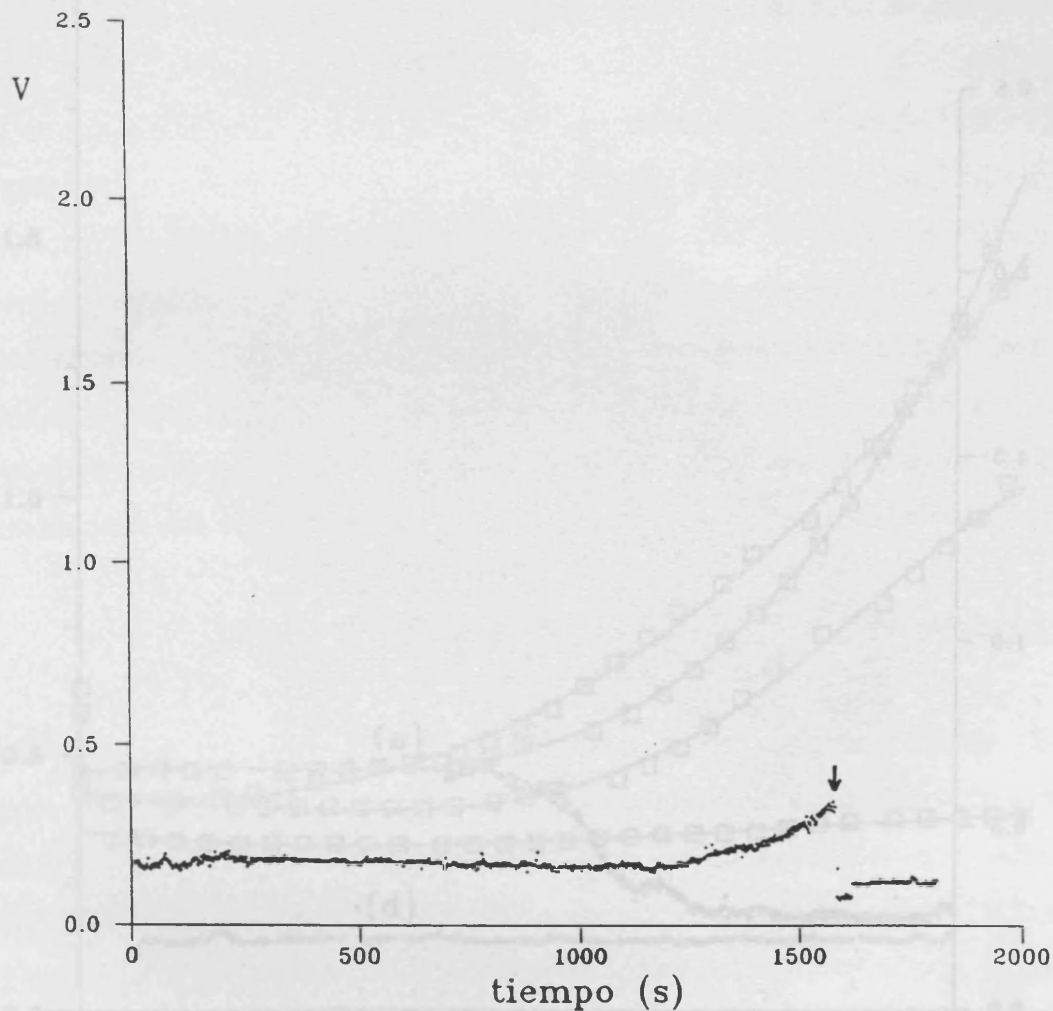


Figura IV.4.- Variación de la señal de lente térmica con el tiempo. Disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-4} M en tampón HAc/NaAc 0.1 M de pH 6.0 y medio agua/acetona 50/50 (v/v). Potencia de bombeo = 100 mW. (↓) Tiempo en el que se corta el haz de bombeo y se modifica la posición de la cubeta.

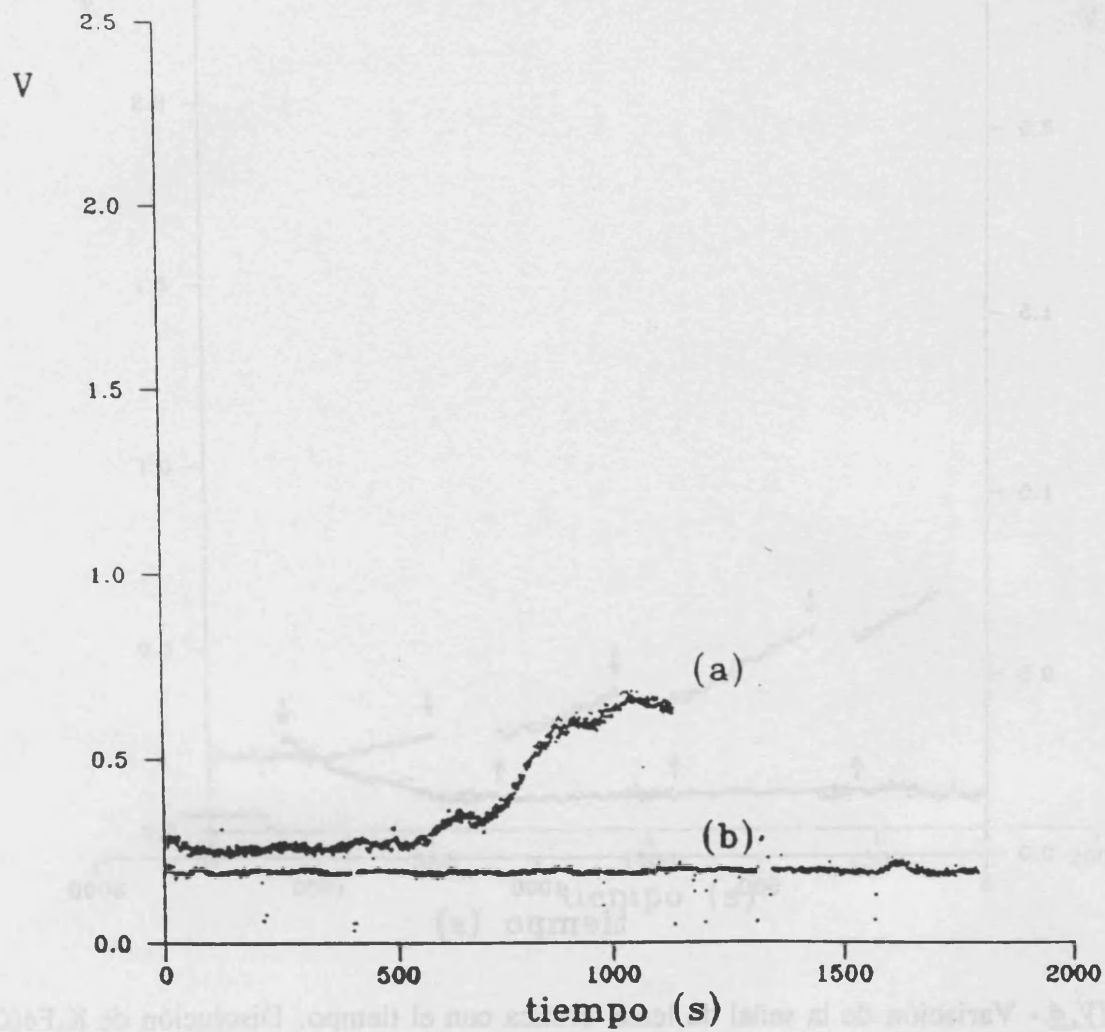


Figura IV.5. - Variación de la señal de lente térmica con el tiempo. Disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-4} M en tampón citrato 0.07 M en medio agua/etanol 50/50 (v/v). Potencia de bombeo: (a) 250 mW, (b) 100 mW.

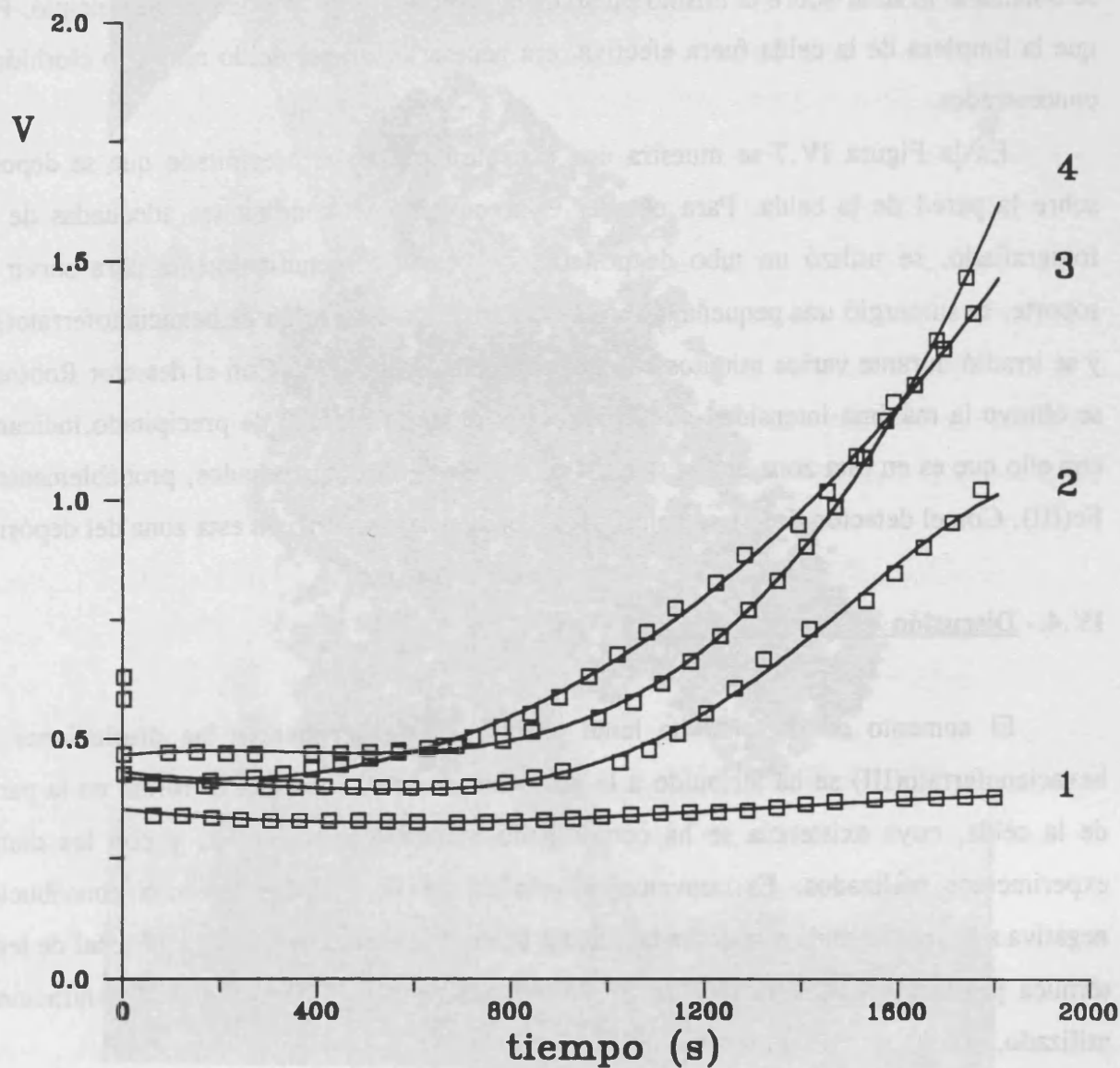


Figura IV.6.- Variación de la señal de lente térmica con el tiempo para disoluciones de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-4} M de concentración creciente en tampón HAc/NaAc 0.1 M de pH 6.0 y medio agua/etanol 50/50 (v/v). (1) 5×10^{-5} M, (2) 10^{-4} M, (3) 2×10^{-4} M, (4) 5×10^{-4} M. Potencia de bombeo = 250 mW.

precipitado que se depositaba sobre la pared no desaparecía mediante lavado con agua o con ácidos minerales diluídos, ya que si posteriormente la celda se llenaba con agua, la señal que se obtenía al irradiar sobre el mismo punto de la pared era muy alta desde un principio. Para que la limpieza de la celda fuera efectiva, era necesario utilizar ácido nítrico o clorhídrico concentrados.

En la Figura IV.7 se muestra una microfotografía del precipitado que se deposita sobre la pared de la celda. Para obtener el precipitado en condiciones adecuadas de ser fotografiado, se utilizó un tubo de polietileno cortado longitudinalmente para servir de soporte, se sumergió una pequeña lámina de cuarzo en la disolución de hexacianoferrato(III) y se irradió durante varios minutos con una potencia de 500 mW. Con el detector Robinson se obtuvo la máxima intensidad en la parte inferior de la mancha de precipitado, indicando con ello que es en esta zona donde se situaron los elementos más pesados, probablemente el Fe(III). Con el detector Kevex se comprobó la presencia de hierro en esta zona del depósito.

IV.4.- Discusión de resultados

El aumento de la señal de lente térmica que experimentan las disoluciones de hexacianoferrato(III) se ha atribuído a la presencia de la mancha que se forma en la pared de la celda, cuya existencia se ha comprobado mediante microscopía, y con los demás experimentos realizados. Es conveniente señalar que no puede haber una contribución negativa a la señal debida a la degradación del hexacianoferrato(III), ya que la señal de lente térmica producida por la disolución de hexacianoferrato(III) al nivel de concentraciones utilizado, apenas se distingue del ruido de fondo.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados sugieren que la radiación laser fotolizó las disoluciones de hexacianoferrato(III), dando lugar a pequeñas partículas de hidróxido las cuales, bajo los efectos combinados de la presión de la radiación y el movimiento convectivo, fueron depositadas sobre la pared posterior de la celda. Además, como el hidróxido de hierro es de color marrón rojizo, debe absorber la radiación de 514.5 nm del laser de Ar⁺, lo que explicaría el incremento de la señal de lente térmica con el tiempo. Probablemente, para que la señal de lente térmica sea mayor que el ruido de fondo, debe de haberse depositado previamente algo de material, lo que a su vez explicaría el período de inducción.

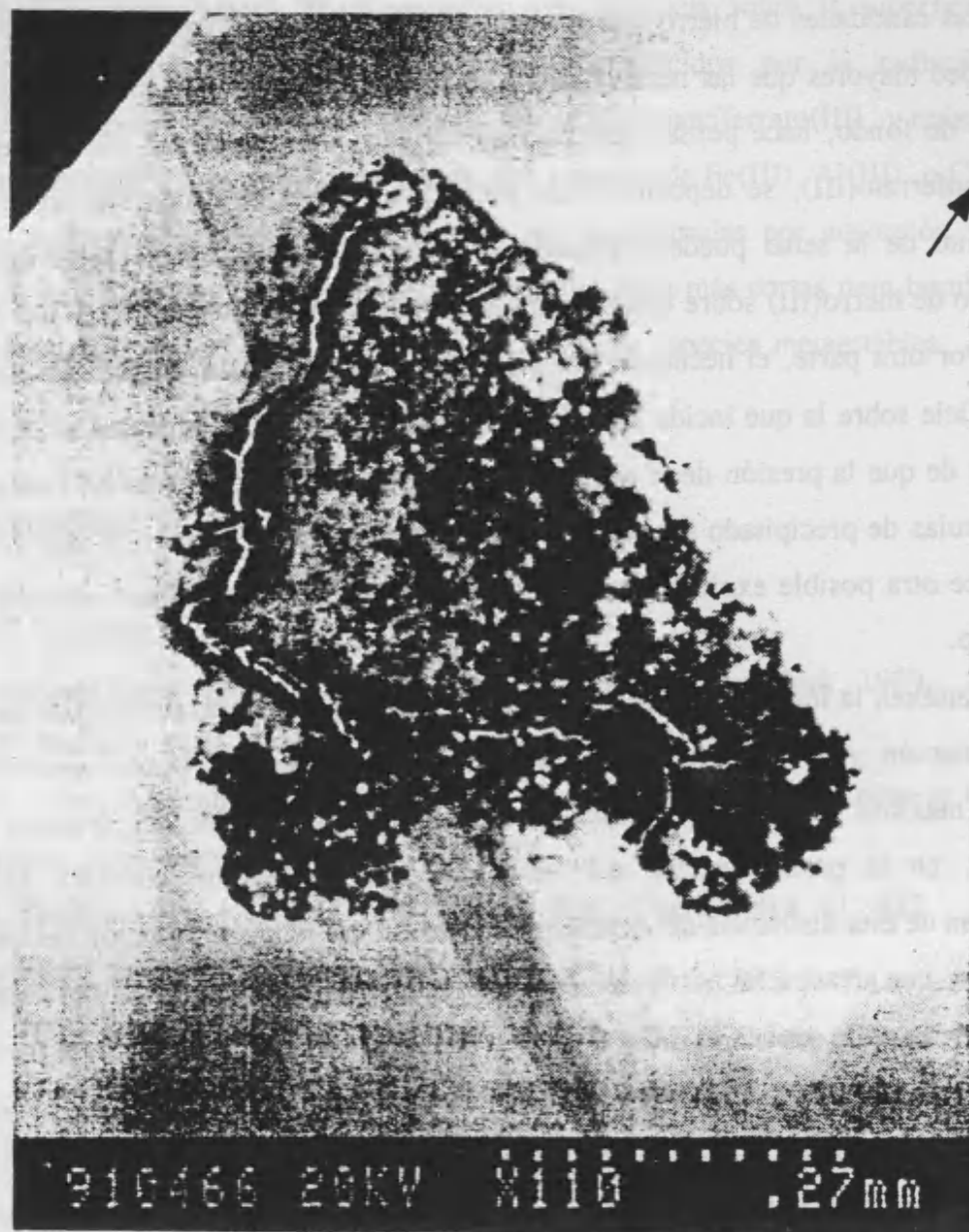


Figura IV.7.- Microfotografía de un precipitado depositado sobre una lámina de cuarzo tras 30 minutos de irradiación del láser de bombeo a 500 mW. La flecha indica la localización de la parte superior de la lámina de cuarzo durante la irradiación. Otras condiciones como en Figura IV.1.

El hecho de que para obtener una mancha visible en la pared de la celda, fueran necesarias cantidades de hierro mucho más elevadas (aproximadamente $34 \mu\text{g}$) y potencias de bombeo mayores que las necesarias para producir una señal de lente térmica mayor que el ruido de fondo, hace pensar que sólo un pequeño porcentaje del hierro presente como hexacianoferrato(III), se depositó como hidróxido de hierro(III) en los experimentos. El incremento de la señal puede explicarse como una consecuencia de la concentración de hidróxido de hierro(III) sobre una pequeña región en el centro del perfil del haz de bombeo.

Por otra parte, el hecho de que el depósito de precipitado se formara solamente en la superficie sobre la que incide la radiación, y no sobre aquella de la que emerge, apoya la hipótesis de que la presión de la radiación contribuye muy eficazmente en la deposición de las partículas de precipitado sobre la pared de la celda. Por el contrario, este mismo hecho contradice otra posible explicación, la de que se produzca fotocatalisis sobre la superficie de cuarzo.

También la forma del depósito apoya la hipótesis del efecto combinado de la presión de la radiación y de la convección térmica. En la figura IV.7 puede apreciarse que la cantidad máxima de material estaba situada en la parte inferior del depósito y, por el contrario, en la parte superior del mismo apenas se depositó material. Una posible explicación de esta disimetría del depósito la encontramos en la contribución del movimiento convectivo, que arrastra las partículas de precipitado hacia la parte inferior del depósito, pero las barre de la parte superior. En la Figura IV.7 puede apreciarse que en la parte inferior de la mancha, el depósito mostraba grietas producidas al secarse, lo que indica mayor espesor de material depositado.

El hexacianoferrato(III) es un agente oxidante ampliamente utilizado en la determinación de muchos compuestos, como por ejemplo catecoles y otros compuestos fenólicos, entre los que cabe señalar a las CAs, en las que nos centramos en esta memoria. El efecto descrito en este apartado no impide el uso del hexacianoferrato(III) en la determinación de estos compuestos mediante espectroscopía de lente térmica, ya que el efecto puede ser retardado o inhibido reduciendo la concentración de etanol, utilizando acetona en lugar de alcohol, o bien añadiendo citrato u otro ligando complejante del Fe(III).

En lo que se refiere a la aplicación cuantitativa del efecto observado para la determinación de hexacianoferrato(III), cabe señalar que no ha sido factible por falta de linealidad y de reproducibilidad en las señales analíticas (Figura IV.6). Sin embargo, el

aprovechamiento de este efecto podría tener interés como base de técnicas de preconcentración, por ejemplo, para precipitar una sustancia sobre la superficie de un electrodo. Los efectos de fotólisis y transporte producidos por la radiación láser probablemente no estén limitados a las disoluciones de hexacianoferrato(III), y quizás podría ser de interés investigar con otros compuestos, por ejemplo de Fe(III), Al(III), o Cr(III), en presencia o ausencia de sustancias que puedan ser concentradas por adsorción sobre las partículas de hidróxido, así como utilizar longitudes de onda más cortas para bombear, con lo que aumentaría la probabilidad de producir fotólisis de especies metaestables.

IV.5.- Bibliografía

1. C.H. Townes; *Laser Focus* 1978, 14, 52.
2. *Analytical Laser Spectroscopy*; N. Omenetto, Wiley, New York, 1979.
3. L.E. Buffet y M.D. Morris; *Appl. Spectrosc.* 1983, 37, 455.
4. E.F. Simó Alfonso, M.A. Rius Revert, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Appl. Spectrosc.* 1990, 44, 1501.
5. M. Terazima, M. Horiguchi y T. Azumi; *Anal. Chem.* 1989, 61, 883.
6. *Photonics Spectra*, Mayo 1993, pág. 87.
7. R. Thurn y W. Kiefer; *Appl. Spectrosc.* 1984, 38, 78.
8. R. Thurn y W. Kiefer; *Appl. Opt.* 1985, 24, 1515.



**V.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE AMINOCROMOS CON
DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA Y MEDIANTE ELT**



V.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE AMINOCROMOS CON DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA Y MEDIANTE ELT

V.1.- Introducción

En el presente capítulo se estudia la separación de los aminocromos derivados de las catecolaminas endógenas noradrenalina, adrenalina y dopamina y de la catecolamina sintética isoprenalina, utilizando fases móviles de SDS, así como su detección utilizando espectroscopía de lente térmica. Los resultados obtenidos se aplican en el Capítulo VIII a la determinación de catecolaminas en muestras de orina. En el estudio se ha incluido la isoprenalina debido a que se utilizará como estándar interno en dicho capítulo.

Los aminocromos son sustancias muy polares que tienen carácter doble iónico (zwitteriónico), es decir presentan al mismo tiempo carga positiva y negativa. Debido a esto, es de esperar una baja retención en sistemas cromatográficos constituidos por una fase móvil hidroorgánica y una columna de fase reversa. Sin embargo, como ya se indicó, en CLM existen un gran número de interacciones posibles entre la fase móvil micelar y la fase estacionaria modificada (electrostáticas, hidrofóbicas y estéricas) que son difíciles de conseguir cuando se emplea una fase móvil hidroorgánica.

La espectroscopía de lente térmica (ELT) como sistema de detección en HPLC es una técnica muy prometedora debido a su gran sensibilidad, sin embargo todavía está poco desarrollada, siendo limitado el número de trabajos referentes a aplicaciones. Presenta algunos problemas que es de esperar se resuelvan en un futuro próximo, permitiendo el desarrollo de aplicaciones analíticas de interés. Los dos principales problemas que presenta la ELT como sistema de detección en HPLC son la pérdida de sensibilidad y el aumento del ruido respecto a las medidas en estático. Estos problemas están presentes siempre que se trate de sistemas en régimen de flujo.

La pérdida de sensibilidad es debida por un lado, al aumento de la conductividad térmica producida por el mezclado, y por otro a la formación incompleta del gradiente térmico. Esto último se origina como consecuencia del menor tiempo de residencia de la muestra en el camino óptico, así como por el aumento de la transferencia de calor producido por la conducción forzada (1-3).

El aumento del ruido (1, 3, 4-6) se produce por la presencia de turbulencias y fluctuaciones en el flujo. Las turbulencias son consecuencia de cambios en la dirección del flujo, producidos por irregularidades en la celda y pueden reducirse mejorando el diseño de ésta (1, 6). Las fluctuaciones en el flujo son menos importantes cuando se utilizan bombas de desplazamiento único de pistón o bombeo neumático.

Buffet y Morris (4) estudiaron la separación de nitroanilinas por HPLC en fase reversa con detección mediante ELT utilizando una configuración bomba-prueba. El uso de frecuencias altas de modulación del haz de bombeo permitió reducir el ruido, debido al mayor número de datos adquiridos por unidad de tiempo, sin embargo, la relación señal/ruido no se modificó apreciablemente, ya que también disminuyó la sensibilidad. Los límites de detección fueron de 20 a 50 ng. Con altas frecuencias de modulación también disminuye la dependencia de la señal con la velocidad de flujo (3). También puede reducirse el ruido utilizando constantes de tiempo grandes en el sistema de detección de la señal (3, 7), aunque con ello también se reduce en gran medida la sensibilidad.

Utilizando una configuración de haz simple, para disminuir el ruido, Pang y Morris (8) propusieron medir la señal de lente térmica en el segundo armónico de la frecuencia de modulación. Aún en estas condiciones, la relación señal ruido fue 2 ó 3 veces inferior a la conseguida con una configuración bomba-prueba, utilizando la misma potencia de bombeo e iguales condiciones cromatográficas.

Para eliminar las interferencias ópticas, se ha propuesto una configuración en la que se utiliza un único láser con el que se generan los haces de bombeo y prueba. Los dos haces se codifican polarizándolos en planos ortogonales (6). El límite de detección para nitroanilina fue de 1 ng. Sepaniak y col. (9), utilizando una configuración de simple haz, y cromatografiando con columnas capilares, consiguieron límites de detección de 30 pg de nitroanilina.

En ocasiones, la causa principal del ruido es consecuencia de la absorbancia de la fase móvil a la longitud de onda de medida. Para resolver este problema, Pang y col. (10) proponen una configuración de doble celda. Para utilizar este sistema es necesario igualar exactamente los caudales que atraviesan la celda de muestra y la de referencia, y alinear ambas de manera que se obtenga una señal nula cuando por ellas circula únicamente fase móvil. De esta manera se compensan también los efectos de las fluctuaciones del flujo.

El ruido puede ser también reducido mediante suavización matemática (4) o utilizando sistemas que adquieren un gran número de datos que son luego filtrados y ajustados a un modelo. Este modelo puede ser utilizado para optimizar la velocidad de flujo y la frecuencia de modulación. Sin embargo, el modelo sólo reproduce bien las señales obtenidas a flujos bajos, ya que se basa en un régimen de circulación laminar (2).

La configuración bomba-prueba de haces cruzados parece ser la que ofrece mejores características para cromatografía líquida con columnas capilares, en la que se requieren celdas de detección muy pequeñas, ya que con esta configuración la sensibilidad no depende del camino óptico. Dovichi y col. (5) utilizando una configuración de haces cruzados, obtuvieron un límite de detección de 5 fmol para la glicina. Los aminoácidos fueron derivatizados previamente con cloruro de dimetilaminoazobencenosulfonilo y separados en una columna capilar C_{18} con una fase móvil metanol/agua. En un trabajo posterior, modificaron las condiciones cromatográficas, longitud y diámetro interno de la columna y composición de la fase móvil, y también las condiciones del sistema de detección, aumentando la potencia del haz de bombeo, y cambiando la longitud de onda de 488 nm a 457.9 nm. Se obtuvieron límites de detección del orden del subfemtomol (11).

Con esta misma configuración, se han detectado 2,4-dinitrofenilhidrazonas con un límite de detección de 120 fmol para el derivado de la acetona. La separación cromatográfica se realizó con columnas capilares C_{18} y fase móvil de acetonitrilo-agua (12). Delorme (13), utilizó una configuración bomba-prueba en la determinación cromatográfica de uranio. Los límites de detección fueron comparables a los obtenidos mediante fluorescencia inducida por láser.

Erskine y Bobbitt (14) utilizaron un espectrómetro de lente térmica diferencial, con una configuración de haces cruzados oblicuos, para la detección de ácidos grasos. Estos mismos autores ensayaron la detección inversa en ELT (15). Para ello emplearon un espectrómetro constituido por un haz de bombeo de Ar^+ y un haz de prueba de He-Ne en una configuración coaxial de doble cubeta. El sistema cromatográfico estaba formado por una columna ODS y una fase móvil 95/5 acetonitrilo/ácido fosfórico 0.3 M a la que se añadió un colorante. La absorbancia de la fase móvil en ausencia de analitos era de 1.3×10^{-2} a la longitud de onda de medida (514.5 nm). El límite de detección fue de 500 ng de ácido graso y el intervalo dinámico lineal fue de 2 órdenes de magnitud.

V.2.- Parte experimental

a) Aparatos

- Se utilizaron dos equipos cromatográficos de Hewlett-Packard de la serie HP-1050, ambos provistos de un inyector automático Rheodyne con un bucle de 20 μ l. Uno de ellos estaba provisto de una bomba isocrática y el otro de una bomba cuaternaria con posibilidad de elución en gradiente. Como fase estacionaria se empleó una columna Spherisorb ODS-1 (5 μ m, 12 cm x 4.6 mm) de Scharlau, precedida de una precolumna Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 3.5 cm x 4.6 mm), también de Scharlau. En la sección V.3.7 se utilizó también una columna ODS-2 (5 μ m, 12 cm x 4.6 mm) de Scharlau, precedida por una precolumna de las mismas características y 3.5 cm de longitud.
- La detección se realizó mediante el espectrómetro de lente térmica y en algunos casos mediante un detector UV-vis Hewlett-Packard HP-1050, utilizando una longitud de onda de 488 nm. Cuando se utilizó como sistema de detección la ELT los datos fueron adquiridos como se explicó en III.2.a, mientras que cuando se utilizó detección espectrofotométrica, los cromatogramas fueron adquiridos por un ordenador PC/AT provisto del programa PEAK-96, de Hewlett Packard. Salvo cuando se indique lo contrario, el caudal de la fase móvil fue de 0.5 ml/min.
- Se utilizó el espectrómetro de lente térmica descrito en III.2.a. La longitud de onda empleada para la detección fue de 488 nm, la potencia de bombeo de 250 mw y la frecuencia de modulación de 4 Hz. Se reemplazó la cubeta anteriormente utilizada por la celda de 8 μ l del detector UV-vis HP-1050. Los datos fueron adquiridos tal como se explica en III.2.a.
- Para obtener los espectros de los aminocromos se utilizó un espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard, modelo 8452A.

b) Reactivos

- Dodecil sulfato sódico (SDS) Merck de pureza 99%. Disolución 0.05 M de $K_3Fe(CN)_6$ preparada a partir del producto sólido de Merck, para análisis.
- Acido cítrico, monohidrógeno fosfato sódico y cloruro sódico Panreac, para análisis. Metanol Panreac, para HPLC. Etanol absoluto, n-propanol, n-butanol y n-pentanol Panreac, para análisis.
- Disolución reguladora de citrato 0.35 M de pH 7.00 preparada a partir de ácido cítrico y NaOH, ajustando potenciométricamente el pH con disolución de NaOH.
- Disoluciones 2×10^{-3} M de noradrenalina, adrenalina, dopamina e isoprenalina preparadas como se indica en III.2.b.

Todas las disoluciones y fases móviles se prepararon con agua ultrapura. Las fases móviles fueron filtradas a través de una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de poro de MSI (Westboro, MA), con ayuda de succión a vacío, con lo que además de eliminar partículas sólidas también se consigue su desgasificación. Las muestras a inyectar en el cromatógrafo se filtraron a través de discos de Nylon de $0.2 \mu\text{m}$ de poro, de la misma casa.

c) Procedimientos

Acondicionamiento del sistema cromatográfico: Para acondicionar el sistema cromatográfico con la fase móvil micelar se debe tener en cuenta que los monómeros de tensioactivo quedan en parte adsorbidos en la fase estacionaria, y que la magnitud de la adsorción viene influenciada por la naturaleza y concentración del modificador orgánico. Por ello, para cambiar de una fase móvil a otra que contenga un modificador distinto, o aún siendo el mismo si su concentración es mayor, debe desorberse completamente el tensioactivo de la fase estacionaria. Esta desorción se realiza con metanol.

Sin embargo, como el SDS es poco soluble en metanol, éste puede cristalizar y por tanto obstruir el sistema cromatográfico. Por ello, previamente deben pasarse 4 volúmenes

de agua, y posteriormente se desorbe el tensioactivo de la fase estacionaria pasando 8 volúmenes de metanol. El caudal al que se bombean el agua y el metanol debe ser bajo, tal como 0.5 ml/min. Con ello, se evitan aumentos bruscos de presión, debidos a la dependencia de la viscosidad de las mezclas metanol/agua con su composición. La viscosidad es máxima para una concentración de metanol del 40%.

Para equilibrar el sistema cromatográfico con una nueva fase móvil, debe seguirse el proceso inverso a la desorción, es decir, estando el sistema en metanol, se elimina éste pasando 2 volúmenes de agua, y posteriormente se bombea la fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min durante al menos 4 horas. Este tiempo de equilibrado del sistema es necesario, no tan sólo para que se establezca la presión, sino también para reproducir el volumen muerto, que va disminuyendo hasta alcanzar un valor constante.

Debido a la variación de la viscosidad de las disoluciones micelares con la temperatura, la presión final alcanzada depende en gran medida de la misma, siendo mayor a temperaturas más bajas. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que para evitar que el SDS y los componentes del tampón cristalicen en la columna, debe desorberse el tensioactivo siempre que vaya a detenerse el flujo por periodos largos de tiempo.

Reacción de derivatización: Las disoluciones de aminocromos se prepararon del modo como se expone a continuación. En aforados de 25 ml y respetando el orden de adición, se introdujeron 2.5 ml de tampón citrato 0.35 M de pH 7, 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.05 M y la disolución de catecolaminas. Se dejó transcurrir un minuto para completar la reacción de oxidación, se añadieron los mililitros necesarios de modificador orgánico para que su proporción fuese igual a la de la fase móvil, y se aforó con agua ultrapura.

Determinación del factor de capacidad, de la eficacia y del factor de selectividad: Para calcular el factor de capacidad se utilizó la expresión:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad [V.1]$$

donde k' y t_r son el factor de capacidad y el tiempo de retención de la sustancia, respectivamente, y t_m es el tiempo muerto. El tiempo muerto fue estimado para cada fase móvil como el correspondiente a la primera variación de la línea base que superase 3 veces

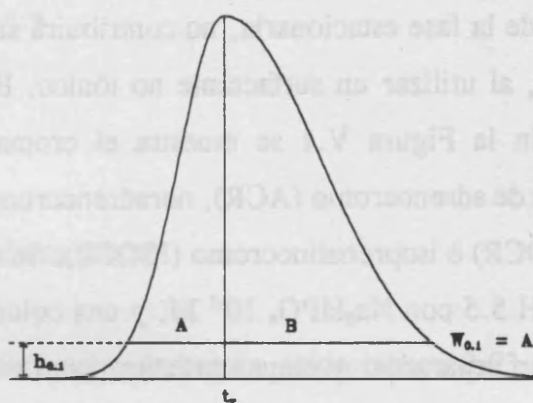
el ruido medio del cromatograma. Para el cálculo de la eficacia, el modelo gaussiano hace uso de la siguiente expresión:

$$N = 4 \left(\frac{t_r}{W_{0.6}} \right)^2 \quad [\text{V.2}]$$

donde $W_{0.6}$ es la anchura del pico al 60% de su altura, que equivale a 2 veces la desviación estándar. En CLM es frecuente obtener picos que se desvíen apreciablemente del modelo gaussiano, por tanto, si se aplica este modelo para describir el pico cromatográfico pueden obtenerse sobreestimaciones, incluso de un 100%, del número de platos teóricos (N). La ecuación desarrollada por Foley y Dorsey (17) tiene en cuenta la asimetría:

$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_r}{W_{0.1}} \right)^2}{\frac{B}{A} + 1.25} \quad [\text{V.3}]$$

donde $W_{0.1}$ es la anchura de pico al 10% de su altura. Los diferentes parámetros se esquematizan en la siguiente figura:



El factor de selectividad entre 2 picos contiguos, representado por $\alpha_{j,i}$, se calculó a partir de la Ecuación I.3.

Determinación de la concentración micelar crítica: Para determinar la cmc en un determinado medio, se prepararon diversas disoluciones reproduciendo la composición de dicho medio, y se varió la concentración de SDS de manera que se pudieran realizar medidas a concentraciones superiores e inferiores a la cmc. Se pesaron 25 gotas de cada disolución. Cada medida se hizo por triplicado. Al representar el peso de las gotas frente al logaritmo de la concentración de SDS se obtienen dos tramos lineales. El segundo tramo es horizontal ya que, una vez superada la cmc la tensión superficial se mantiene prácticamente constante, por lo que el tamaño de las gotas ya no varía con la concentración del tensioactivo. La cmc se estimó como el punto de intersección entre los dos tramos lineales

V.3.- Comportamiento cromatográfico y optimización

V.3.1.- Selección del tensioactivo

Dado el carácter iónico e hidrofílico de los aminocromos, es de esperar que las interacciones electrostáticas con la fase estacionaria primen sobre las hidrofóbicas, por tanto, debe emplearse un surfactante iónico, ya que un surfactante no iónico aunque incrementará el carácter hidrofóbico de la fase estacionaria, no contribuirá sustancialmente a incrementar la retención. En efecto, al utilizar un surfactante no iónico, Brij 35, los aminocromos no resultaron retenidos. En la Figura V.1 se muestra el cromatograma obtenido para una inyección de una mezcla de adrenocromo (ACR), noradrenocromo (NACR), dopaminocromo (DACR), dopacromo (DCR) e isoprenalincromo (ISOCR). Se utilizó una fase móvil de Brij 35 al 2%, regulada a pH 5.5 con Na_2HPO_4 10^{-3} M, y una columna Spherisorb ODS-2. Los aminocromos no resultan separados, y eluyen prácticamente con el volumen muerto.

Por otra parte, no pudieron emplearse tensioactivos catiónicos como bromuro de N-cetiltrimetilamonio (CTAB) y cloruro de N-cetilpiridinio (NCPC), ya que estos precipitan con el hexacianoferrato(III), que es el reactivo oxidante utilizado en la reacción de derivatización. Por tanto, se eligió un tensioactivo aniónico, el dodecil sulfato sódico (SDS).

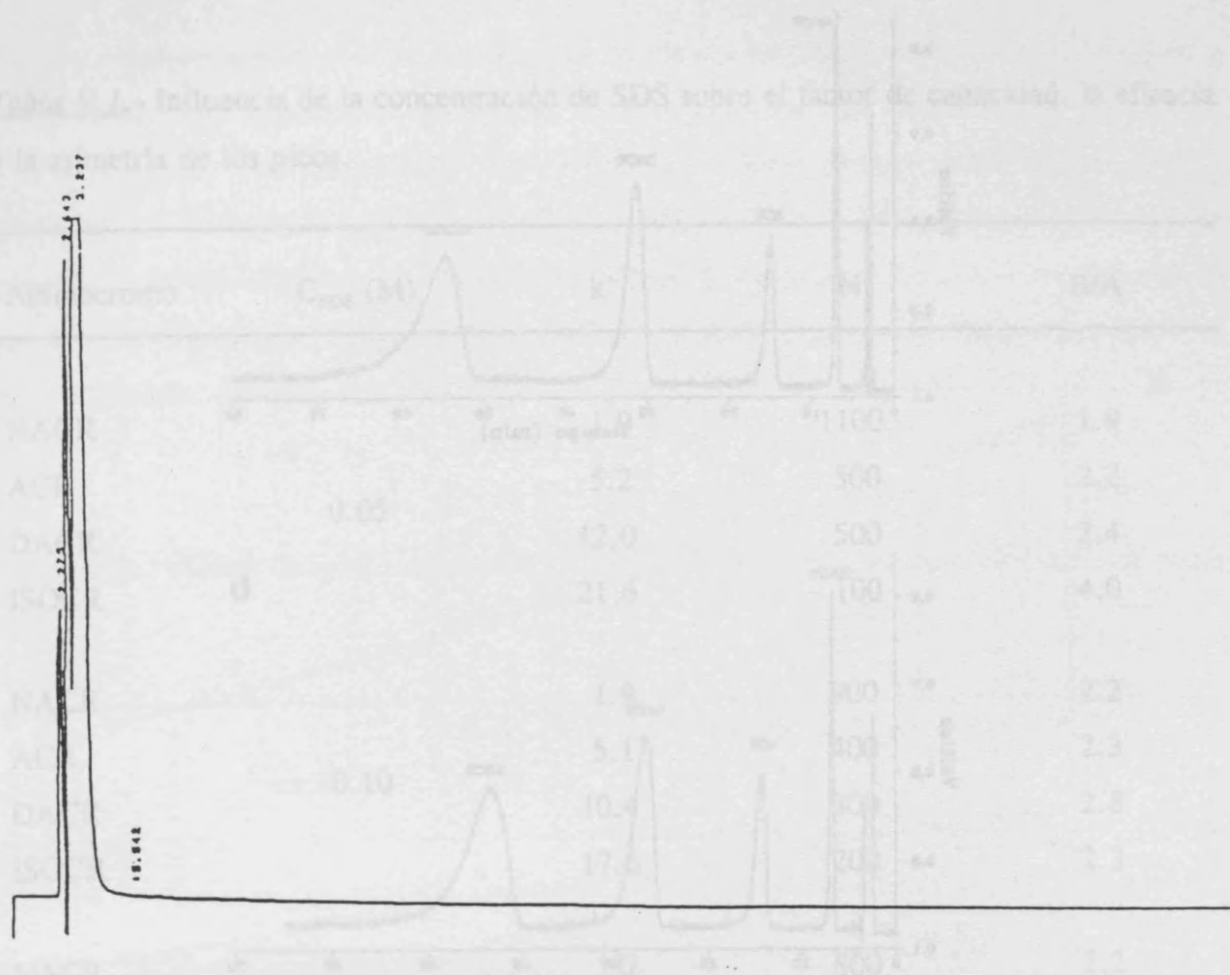


Figura V.1.- Cromatograma obtenido para una mezcla de NACR, ACR, DACR e ISOCR utilizando una fase móvil 2% de Brij 35 regulada a pH 5.5 con Na_2HPO_4 10^{-2} M y una fase estacionaria Spherisorb ODS-2.

V.3.2.- Fases móviles micelares puras

Las fases móviles ensayadas contenían ácido cítrico 0.03 M y SDS en diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.15 M). El pH fue ajustado potenciométricamente a 4.9 con NaOH. Se utilizó detección fototérmica.

En la Figura V.2 se muestran los cromatogramas obtenidos, y en la Tabla V.1 los factores de capacidad, la eficacia y el factor de asimetría de los picos para cada uno de los aminocromos con las fases móviles estudiadas.

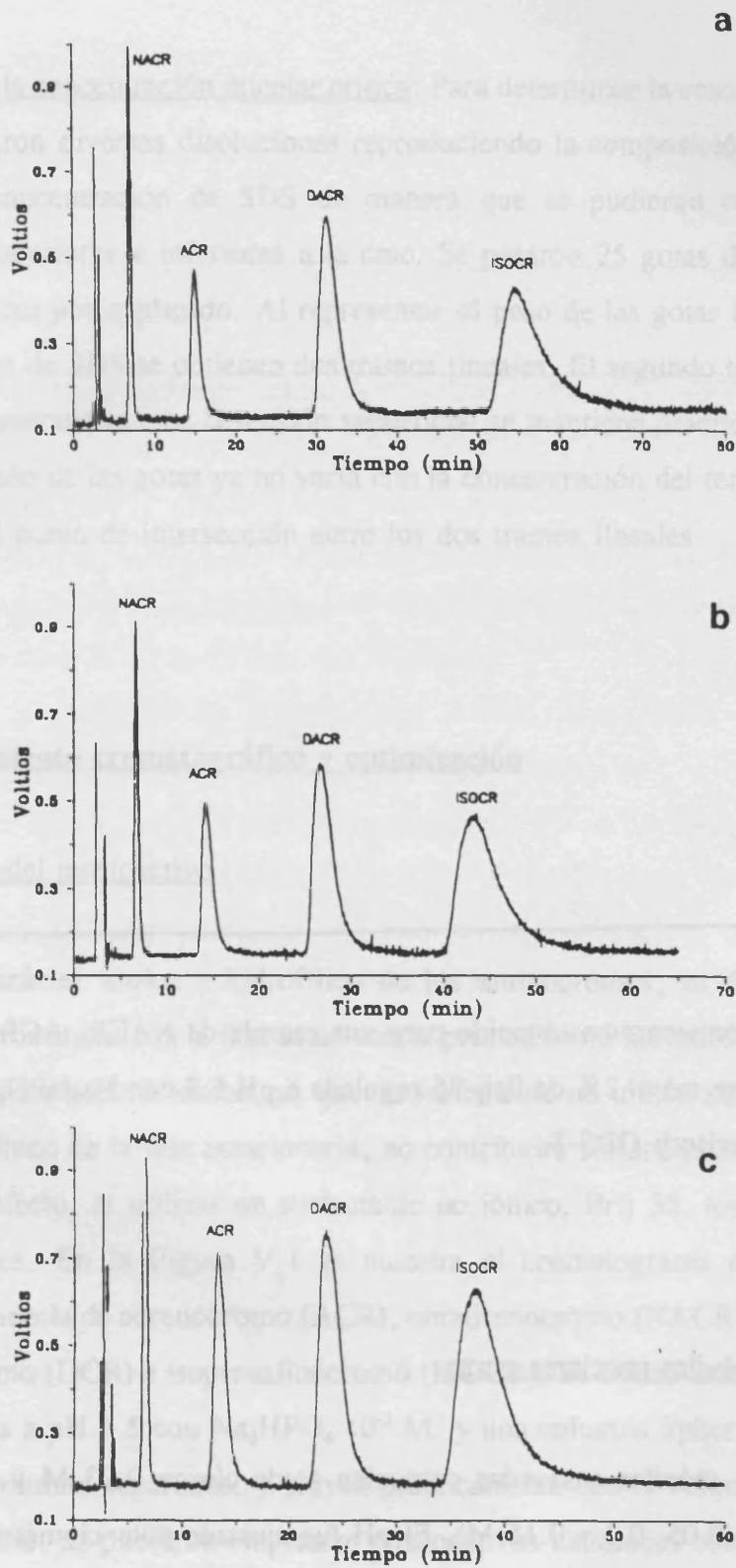


Figura V.2.- Efecto de la concentración de SDS. (a) SDS 0.05 M, (b) SDS 0.1 M, (c) SDS 0.15 M.

Tabla V.1.- Influencia de la concentración de SDS sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos.

Aminocromo	C _{SDS} (M)	k'	N	B/A
NACR	0.05	1.9	1100	1.9
ACR		5.2	500	2.2
DACR		12.0	500	2.4
ISO CR		21.6	100	4.0
NACR	0.10	1.9	900	2.2
ACR		5.1	400	2.3
DACR		10.4	300	2.8
ISO CR		17.6	200	2.3
NACR	0.15	1.7	800	2.2
ACR		4.5	300	2.8
DACR		8.9	300	2.9
ISO CR		14.6	200	2.6

Para cualquier concentración de tensioactivo los factores de capacidad aumentan con la hidrofobicidad del aminocromo. Cuando aumenta la concentración de SDS k' disminuye (Figura V.3). Esta disminución es mayor para los solutos más hidrofóbicos, indicando una mayor asociación de los mismos con las micelas. Sin embargo los factores de capacidad de DACR e ISO CR son excesivamente altos incluso para una concentración de SDS 0.15 M.

En general, se observan picos asimétricos y bajas eficacias para todos los aminocromos, tanto menores cuanto más hidrofóbico es el aminocromo. Al aumentar la concentración de SDS la eficacia disminuye y la asimetría aumenta. Cuando se utilizan tensioactivos iónicos los solutos muy asociados presentan eficacias bajas. Al tener las superficies de la micela y de la fase estacionaria cargas del mismo signo, se establece una

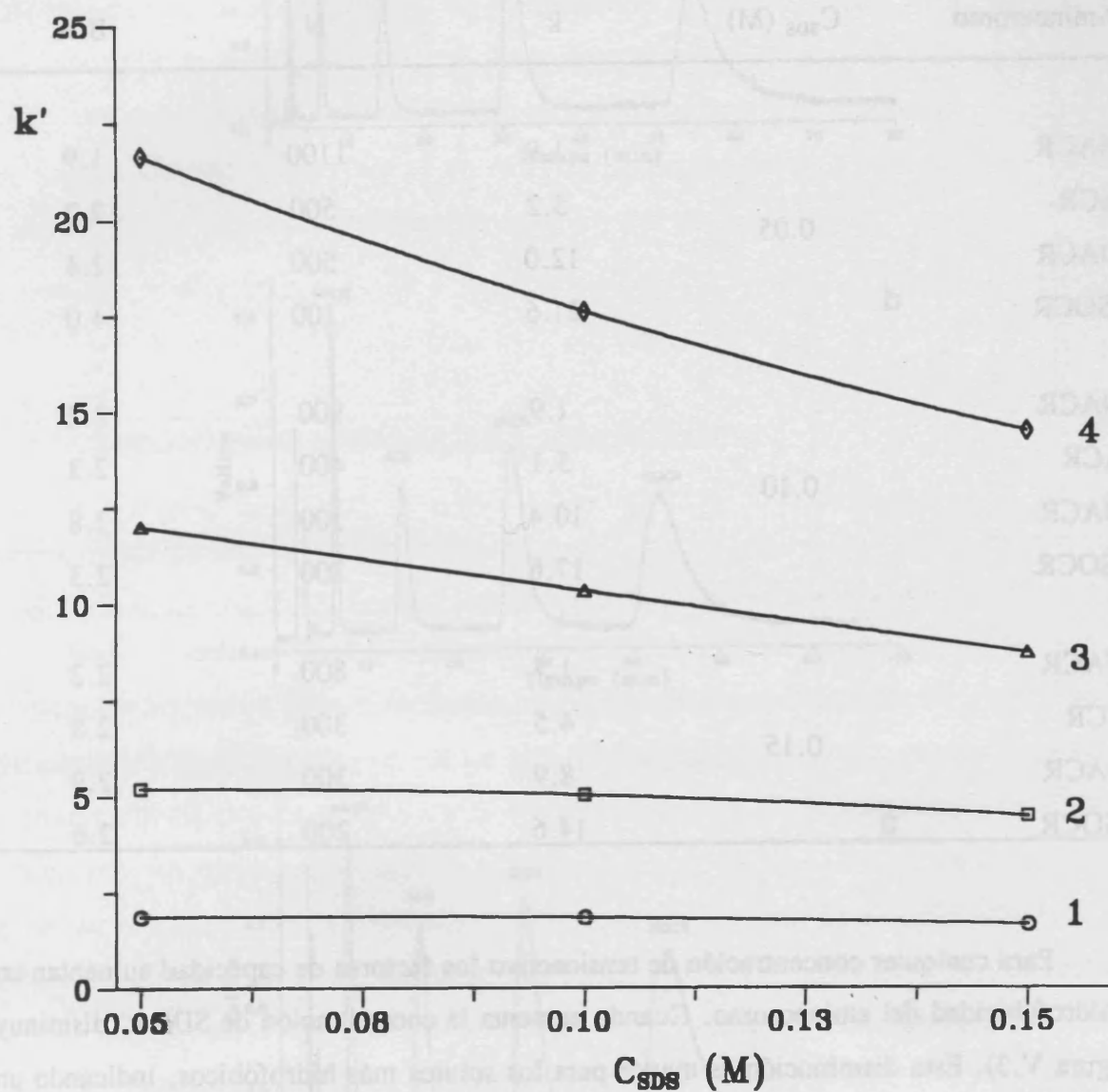


Figura V.3.- Influencia de la concentración de SDS sobre el factor de capacidad. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4), ISOCR.

barrera repulsiva que impide la transferencia de masa a través de la interfase, lo que puede justificar las bajas eficacias obtenidas para los aminocromos más hidrofóbicos.

Los factores de selectividad (Tabla V.2) se encuentran comprendidos entre 1.8 y 2.8, resultando una buena separación entre todos los picos. Sin embargo, como en medio puramente micelar de SDS, las eficacias son bajas, los picos asimétricos y los tiempos de retención de los aminocromos más hidrofóbicos elevados, resulta conveniente la adición de un modificador orgánico a la fase móvil.

Tabla V.2.- Valores de selectividad para los aminocromos con fases móviles micelares puras de SDS.

C_{SDS} (M)	α^a
0.05	$\alpha_{2,1} = 2.8$
	$\alpha_{3,2} = 2.3$
	$\alpha_{4,3} = 1.8$
0.10	$\alpha_{2,1} = 2.7$
	$\alpha_{3,2} = 2.1$
	$\alpha_{4,3} = 1.7$
0.15	$\alpha_{2,1} = 2.7$
	$\alpha_{3,2} = 1.9$
	$\alpha_{4,3} = 1.7$

^a Subíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

V.3.3.- Fases móviles micelares híbridas

Como ya se comentó en I.3, suelen añadirse alcoholes de cadena corta a las fases móviles de tensioactivos iónicos con el objeto de disminuir los factores de capacidad y mejorar las eficacias. Por otra parte, si consideramos la técnica utilizada para la detección, hay que tener presente que en espectroscopía de lente térmica en medio hidroorgánico, la sensibilidad aumenta con la concentración del disolvente orgánico miscible con el agua, y por ello, la adición de un alcohol a la fase móvil producirá un aumento de la sensibilidad. En consecuencia, la utilización de la cromatografía micelar híbrida posee claras ventajas frente a la cromatografía micelar pura, tanto desde el punto de vista de la separación cromatográfica, como de la detección de los aminocromos.

a) - Influencia de la longitud de la cadena del alcohol

Se prepararon 5 fases móviles conteniendo SDS 0.05 M, ácido cítrico 0.03 M y 5 % de alcohol. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH, previamente a la adición del modificador. Los alcoholes empleados fueron metanol, etanol, n-propanol, n-butanol y n-pentanol. La muestra que se inyecta debe contener la misma concentración de alcohol que la fase móvil, ya que de lo contrario la cabeza del cromatograma presenta un ruido de fondo alto, debido a las variaciones en el índice de refracción, pudiendo incluso desaparecer el pico del NACR. Por ello, antes de inyectar la muestra, se adiciona la cantidad necesaria del alcohol correspondiente para igualar su concentración a la de la fase móvil.

En la Figura V.4 se muestran los cromatogramas obtenidos. En la Tabla V.3 se muestran los valores del factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de pico. En la Figura V.5 se representan los factores de capacidad y el número de platos teóricos, ambos frente al número de átomos de carbono del alcohol. Los factores de capacidad disminuyen a medida que aumenta la hidrofobicidad del alcohol. Este efecto es más pronunciado cuando aumenta la hidrofobicidad del soluto, así por ejemplo, para el NACR, al pasar de 5 % de MeOH a 5 % de pentanol la k' disminuye de 1.45 a 0.64 (56%), mientras que para ISO-CR k' disminuye de 12.01 a 1.38 (89%).

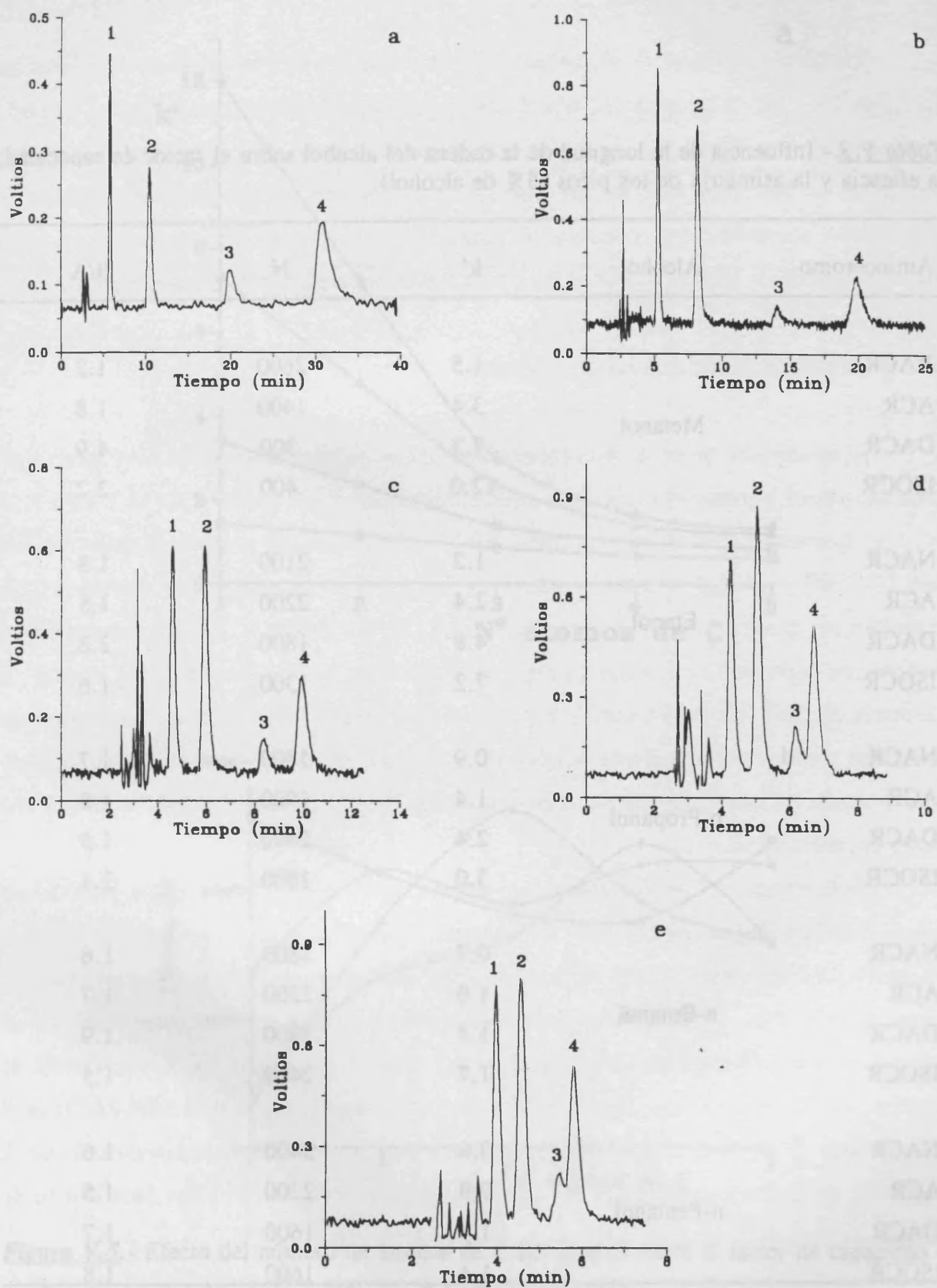


Figura V.4.- Efecto de la longitud de la cadena del alcohol. (a) metanol, (b) etanol, (c) propanol, (d) butanol, (e) pentanol; (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR. Contenido en alcohol, 5%.

Tabla V.3. - Influencia de la longitud de la cadena del alcohol sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos (5% de alcohol).

Aminocromo	Alcohol	k'	N	B/A
NACR	Metanol	1.5	2600	1.2
ACR		3.4	1400	1.8
DACR		7.3	300	4.9
ISOCR		12.0	400	2.2
NACR	Etanol	1.2	2100	1.8
ACR		2.4	2200	1.5
DACR		4.8	1800	2.8
ISOCR		7.2	1300	1.6
NACR	n-Propanol	0.9	1800	1.7
ACR		1.4	1900	1.8
DACR		2.4	2600	1.5
ISOCR		3.0	1600	2.1
NACR	n-Butanol	0.7	1800	1.6
ACR		1.0	2200	1.7
DACR		1.4	1900	1.9
ISOCR		1.7	2400	1.5
NACR	n-Pentanol	0.6	2400	1.6
ACR		0.9	2200	1.5
DACR		1.3	1600	1.7
ISOCR		1.4	1600	1.8

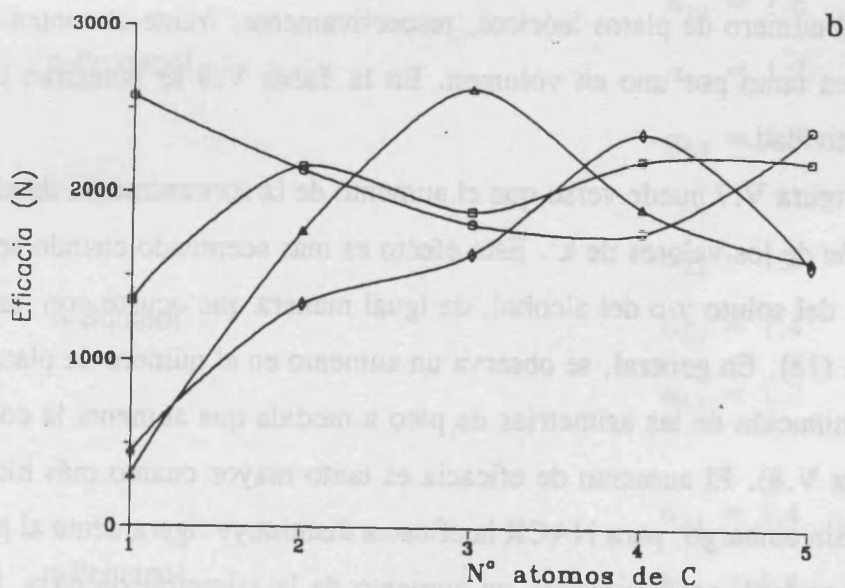
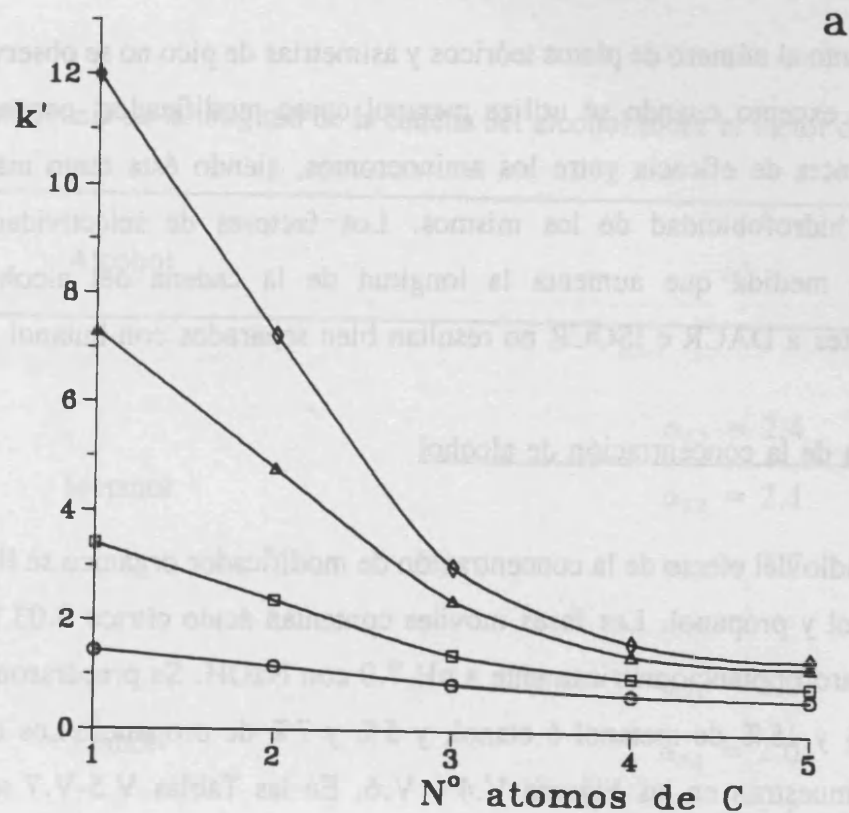


Figura V.5.- Efecto del número de átomos de C del alcohol sobre el factor de capacidad y la eficacia. (o) NACR, (□); ACR, (Δ) DACR, (◇) ISOCR.

En cuanto al número de platos teóricos y asimetrías de pico no se observan diferencias significativas, excepto cuando se utiliza metanol como modificador, con el que hay una notable diferencia de eficacia entre los aminocromos, siendo ésta tanto más baja cuando mayor es la hidrofobicidad de los mismos. Los factores de selectividad (Tabla V.4) disminuyen a medida que aumenta la longitud de la cadena del alcohol. Los picos correspondientes a DACR e ISOCR no resultan bien separados con butanol o pentanol.

b) - Influencia de la concentración de alcohol

El estudio del efecto de la concentración de modificador orgánico se llevó a cabo con metanol, etanol y propanol. Las fases móviles contenían ácido cítrico 0.03 M y SDS 0.05 M, y se ajustaron potenciométricamente a pH 7.0 con NaOH. Se prepararon fases móviles con 5%, 10% y 15% de metanol ó etanol, y 5% y 7% de propanol. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras V.4 y V.6. En las Tablas V.5-V.7 se muestran los factores de capacidad, así como también el número de platos teóricos y los valores de asimetría de pico. En las Figuras V.7 y V.8 se representa la variación de los factores de capacidad y del número de platos teóricos, respectivamente, frente al contenido de alcohol, φ , expresado en tanto por uno en volumen. En la Tabla V.8 se muestran los valores del factor de selectividad.

En la Figura V.7 puede verse que el aumento de la concentración de alcohol produce una disminución de los valores de k' . Este efecto es más acentuado cuando se incrementa la hidrofobicidad del soluto y/o del alcohol, de igual manera que ocurre con las fases móviles hidroorgánicas (18). En general, se observa un aumento en el número de platos teóricos, así como una disminución de las asimetrías de pico a medida que aumenta la concentración de alcohol (Figura V.8). El aumento de eficacia es tanto mayor cuanto más hidrofóbico es el aminocromo. Sin embargo, para NACR la eficacia disminuye ligeramente al pasar de un 5% a un 15% de metanol, produciéndose un aumento de la asimetría de pico. Esto mismo se observa para el ACR al pasar de un 10% a un 15% de etanol.

Los factores de selectividad disminuyen al aumentar la concentración de alcohol (Tabla V.8). Este resultado es típico en cromatografía convencional, mientras que en cromatografía micelar se encuentra en muchos casos un aumento de selectividad al adicionar alcohol a la fase móvil.

Tabla V.4. - Influencia de la longitud de la cadena del alcohol sobre el factor de selectividad.

Alcohol	α^a
	$\alpha_{2,1} = 2.4$
Metanol	$\alpha_{3,2} = 2.1$
	$\alpha_{4,3} = 1.7$
Etanol	$\alpha_{2,1} = 2.0$
	$\alpha_{3,2} = 2.0$
	$\alpha_{4,3} = 1.5$
n-Propanol	$\alpha_{2,1} = 1.6$
	$\alpha_{3,2} = 1.7$
	$\alpha_{4,3} = 1.3$
n-Butanol	$\alpha_{2,1} = 1.5$
	$\alpha_{3,2} = 1.4$
	$\alpha_{4,3} = 1.2$
n-Pentanol	$\alpha_{2,1} = 1.4$
	$\alpha_{3,2} = 1.4$
	$\alpha_{4,3} = 1.1$

^a Subíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4 ISOCR.

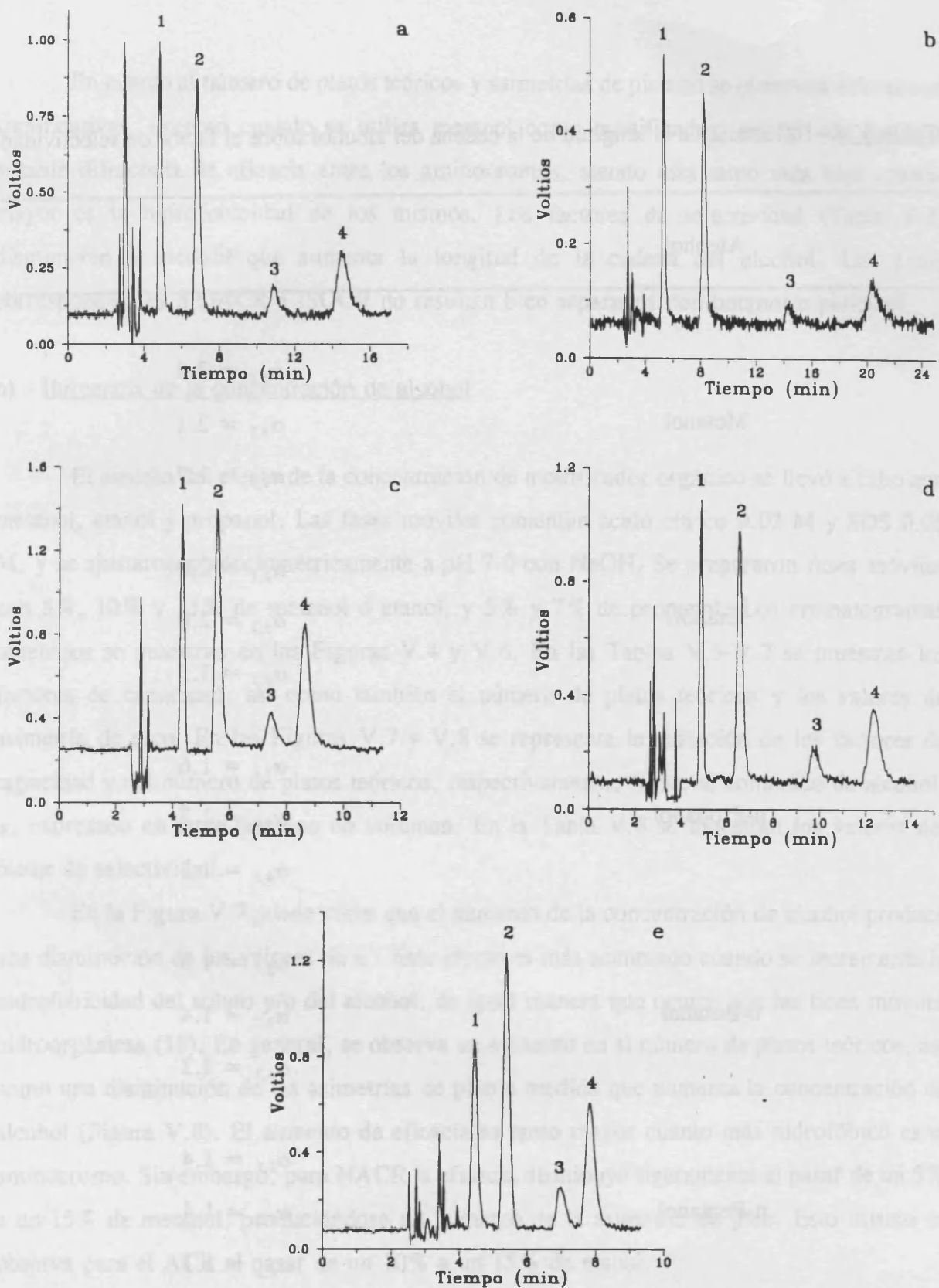


Figura V.6.- Influencia de la concentración de alcohol. (a) 15% metanol, (b) 10% metanol, (c) 15% etanol, (d) 10% etanol, (e) 7% propanol; (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR. Los resultados deben compararse con los expuestos en la Figura V.4.

Tabla V.5.- Influencia de la concentración de metanol sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos.

Aminocromo	% Metanol	k'	N	B/A
NACR	0	1.9	1100	1.9
ACR	0	5.2	500	2.2
DACR	0	12.1	500	2.4
ISO CR	0	21.6	100	4.0
NACR	5	1.5	2600	1.2
ACR	5	3.4	1400	1.8
DACR	5	7.3	300	4.9
ISO CR	5	12.0	400	2.9
NACR	10	1.2	2400	1.4
ACR	10	2.4	2500	1.5
DACR	10	4.9	1100	1.7
ISO CR	10	7.3	1200	1.9
NACR	15	0.86	2200	1.7
ACR	15	1.6	2900	1.2
DACR	15	3.1	1300	2.3
ISO CR	15	4.5	1400	2.0

Tabla V.6.- Influencia de la concentración de etanol sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos.

Aminocromo	% Etanol	k'	N	B/A
NACR	0	1.9	1100	1.90
ACR		5.2	500	2.2
DACR		12.1	500	2.4
ISOCHR		21.6	100	4.0
NACR	5	1.2	2100	1.8
ACR		2.4	2200	1.5
DACR		4.8	1800	2.8
ISOCHR		7.2	1300	1.6
NACR	10	1.0	-	-
ACR		1.6	2800	1.3
DACR		3.0	2200	1.6
ISOCHR		4.00	2100	1.5
NACR	15	0.7	-	-
ACR		1.2	1900	2.0
DACR		2.0	2100	1.3
ISOCHR		2.4	2600	1.3

Figura V.4.- Influencia de la concentración de etanol: (a) 15% etanol, (b) 10% etanol, (c) 5% etanol, (d) 0% etanol. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCHR. Los resultados deben compararse con los expuestos en la Figura V.4.

Tabla V.7.- Influencia de la concentración de propanol sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos.

Aminocromo	% Propanol	k'	N	B/A
NACR	0	1.9	1100	1.9
ACR		5.2	500	2.2
DACR		12.0	500	2.4
ISO CR		21.6	100	4.0
NACR	5	0.9	1800	1.7
ACR		1.4	1900	1.8
DACR		2.4	1600	1.5
ISO CR		3.0	1600	2.1
NACR	7	0.8	2000	2.0
ACR		1.2	3000	1.5
DACR		1.8	2000	1.7
ISO CR		2.1	2327	1.8

Figura V.8.- Efecto de la concentración de alcohol sobre la eficacia, el factor de capacidad y la asimetría de los picos.

(a) NACR, (b) DACR, (c) ISO CR

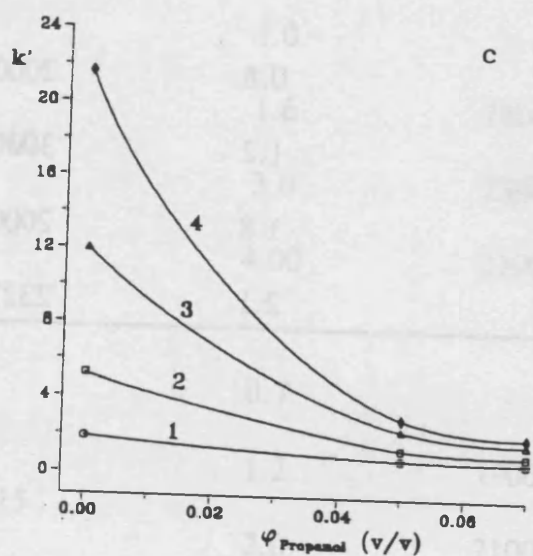
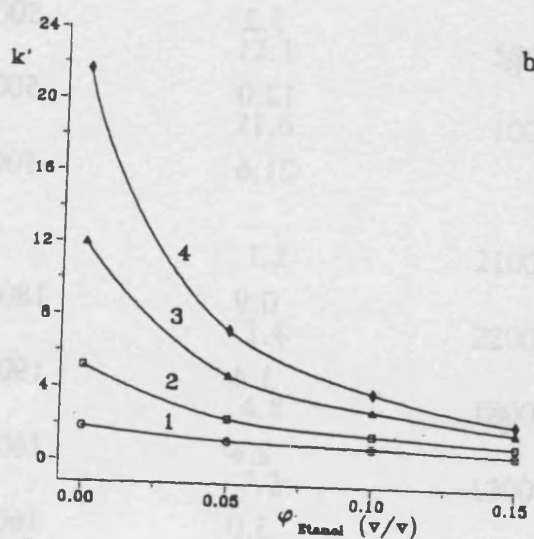
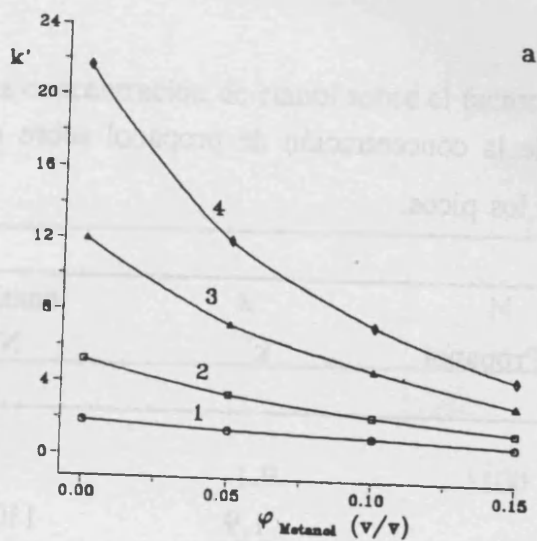


Figura V.7. - Efecto de la concentración de alcohol sobre el factor de capacidad. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

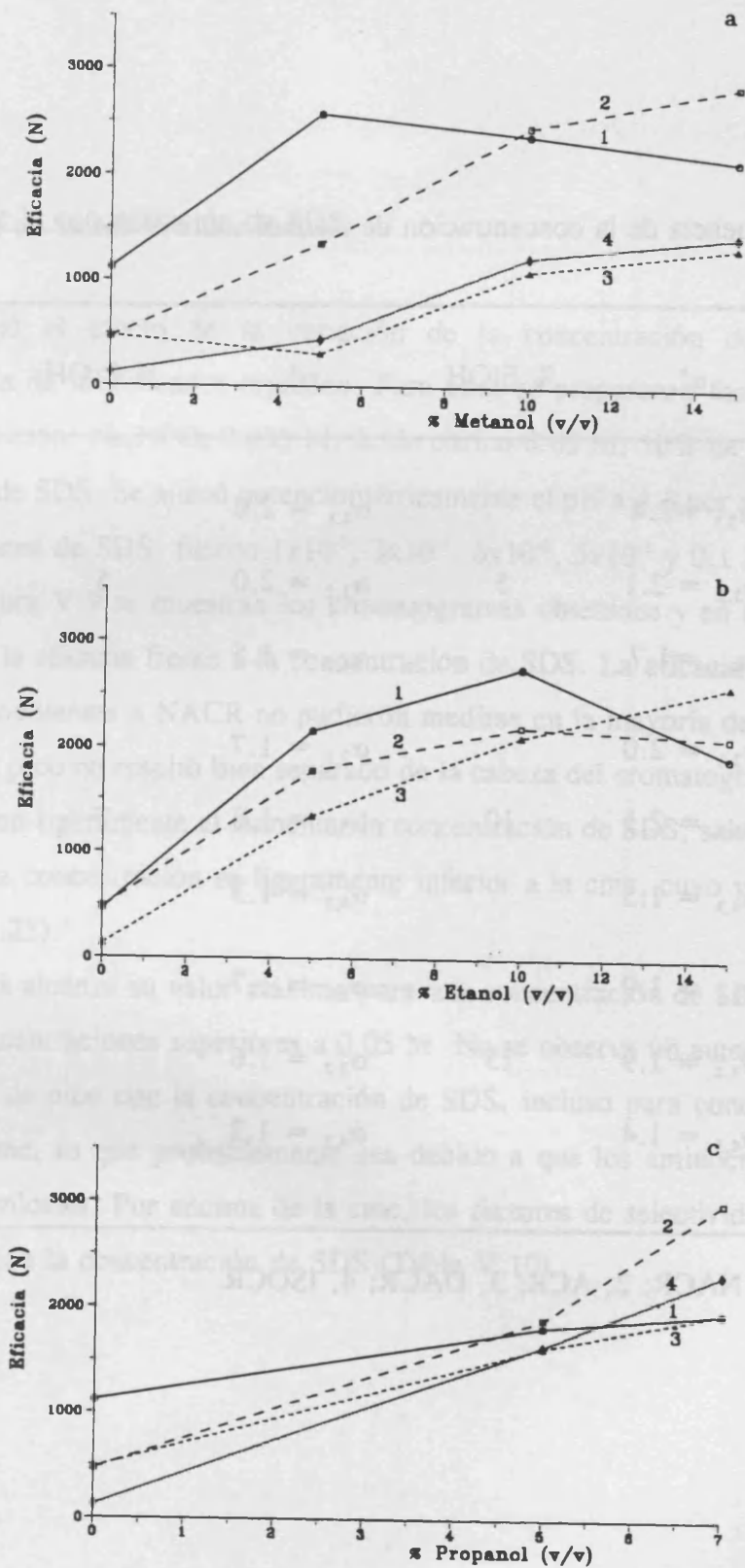


Figura V.8. - Efecto de la concentración de alcohol sobre la eficacia. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

Tabla V.8. - Influencia de la concentración de alcohol sobre el factor de selectividad.

% MeOH	α^a	% EtOH	α^a	% PrOH	α^a
	$\alpha_{2,1} = 2.4$		$\alpha_{2,1} = 2.0$		$\alpha_{2,1} = 1.6$
5	$\alpha_{3,2} = 2.1$	5	$\alpha_{3,2} = 2.0$	5	$\alpha_{3,2} = 1.7$
	$\alpha_{4,3} = 1.7$		$\alpha_{4,3} = 1.5$		$\alpha_{4,3} = 1.3$
	$\alpha_{2,1} = 2.0$		$\alpha_{2,1} = 1.7$		$\alpha_{2,1} = 1.5$
10	$\alpha_{3,2} = 2.1$	10	$\alpha_{3,2} = 1.8$	7	$\alpha_{3,2} = 1.6$
	$\alpha_{4,3} = 1.5$		$\alpha_{4,3} = 1.3$		$\alpha_{4,3} = 1.2$
	$\alpha_{2,1} = 1.9$		$\alpha_{2,1} = 1.7$		
15	$\alpha_{3,2} = 1.9$	15	$\alpha_{3,2} = 1.6$		
	$\alpha_{4,3} = 1.4$		$\alpha_{4,3} = 1.2$		

^a Subíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

c) - Influencia de la concentración de SDS

Se estudió el efecto de la variación de la concentración de SDS para una concentración fija de modificador orgánico. Para ello, se prepararon fases móviles con la siguiente composición: Na_2HPO_4 0.035 M, ácido cítrico 0.03 M, 10% de etanol, y diversas concentraciones de SDS. Se ajustó potenciométricamente el pH a 4.8 por adición de NaOH. Las concentraciones de SDS fueron 1×10^{-3} , 3×10^{-3} , 6×10^{-3} , 5×10^{-2} y 0.1 M.

En la Figura V.9 se muestran los cromatogramas obtenidos y en la Figura V.10 se representan k' y la eficacia frente a la concentración de SDS. La eficacia y la asimetría de los picos correspondientes a NACR no pudieron medirse en la mayoría de los casos (Tabla V.9), ya que este pico no resultó bien separado de la cabeza del cromatograma. Los valores de k' disminuyeron ligeramente al aumentar la concentración de SDS, salvo para 1×10^{-3} M. Sin embargo, esta concentración es ligeramente inferior a la cmc, cuyo valor es 1.06×10^{-3} M (ver Figura V.25).

La eficacia alcanza su valor máximo para una concentración de SDS de 6×10^{-3} M y no varía para concentraciones superiores a 0.05 M. No se observa un aumento significativo en las asimetrías de pico con la concentración de SDS, incluso para concentraciones muy superiores a la cmc, lo que probablemente sea debido a que los aminocromos se asocian débilmente a las micelas. Por encima de la cmc, los factores de selectividad prácticamente no se modifican con la concentración de SDS (Tabla V.10).

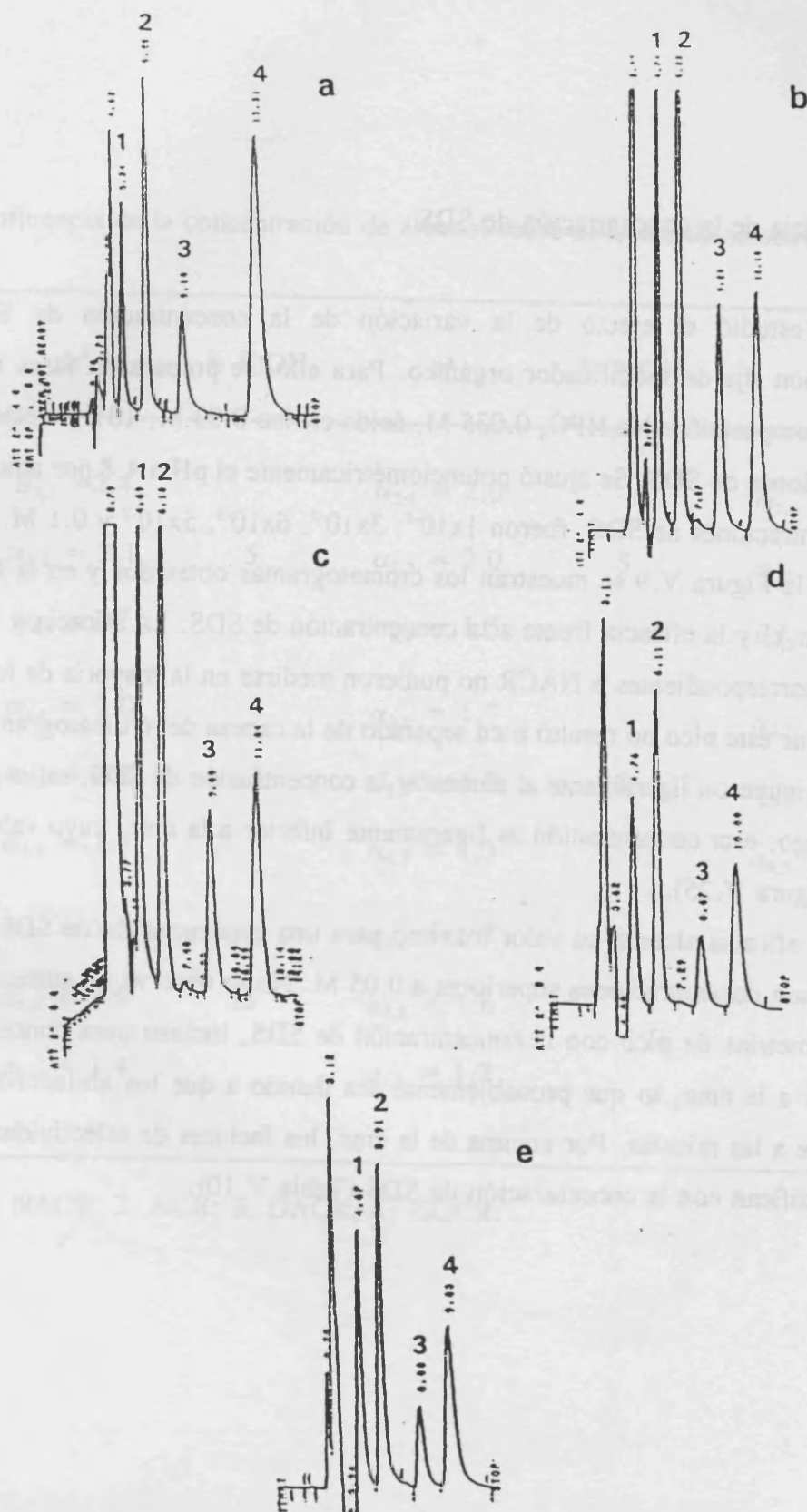


Figura V.9.- Efecto de la concentración de SDS en presencia de un 10% de etanol. Concentración de SDS: (a) 1×10^{-3} M, (b) 3×10^{-3} M, (c) 6×10^{-3} M, (d) 0.05 M, (e) 0.1 M.

Tabla V.9.- Influencia de la concentración de SDS sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos. Fase móvil 10% de EtOH, pH 4.9.

Aminocromo	C _{SDS} (M)	k'	N	B/A
NACR	1x10 ⁻³	0.38	1600	2.0
ACR		0.77	1600	2.2
DACR		1.4	1900	2.0
ISO CR		2.5	1700	2.0
NACR	3x10 ⁻³	0.62	-	-
ACR		1.1	1600	1.8
DACR		2.2	1500	1.8
ISO CR		3.2	1300	1.9
NACR	6x10 ⁻³	0.60	-	-
ACR		1.1	2900	1.6
DACR		2.1	2300	1.7
ISO CR		3.0	2500	1.4
NACR	0.05	0.55	-	-
ACR		0.98	1500	1.5
DACR		1.8	1100	2.0
ISO CR		2.5	1400	1.6
NACR	0.10	0.53	-	-
ACR		0.94	1100	1.8
DACR		1.7	1200	2.0
ISO CR		2.2	1100	1.9

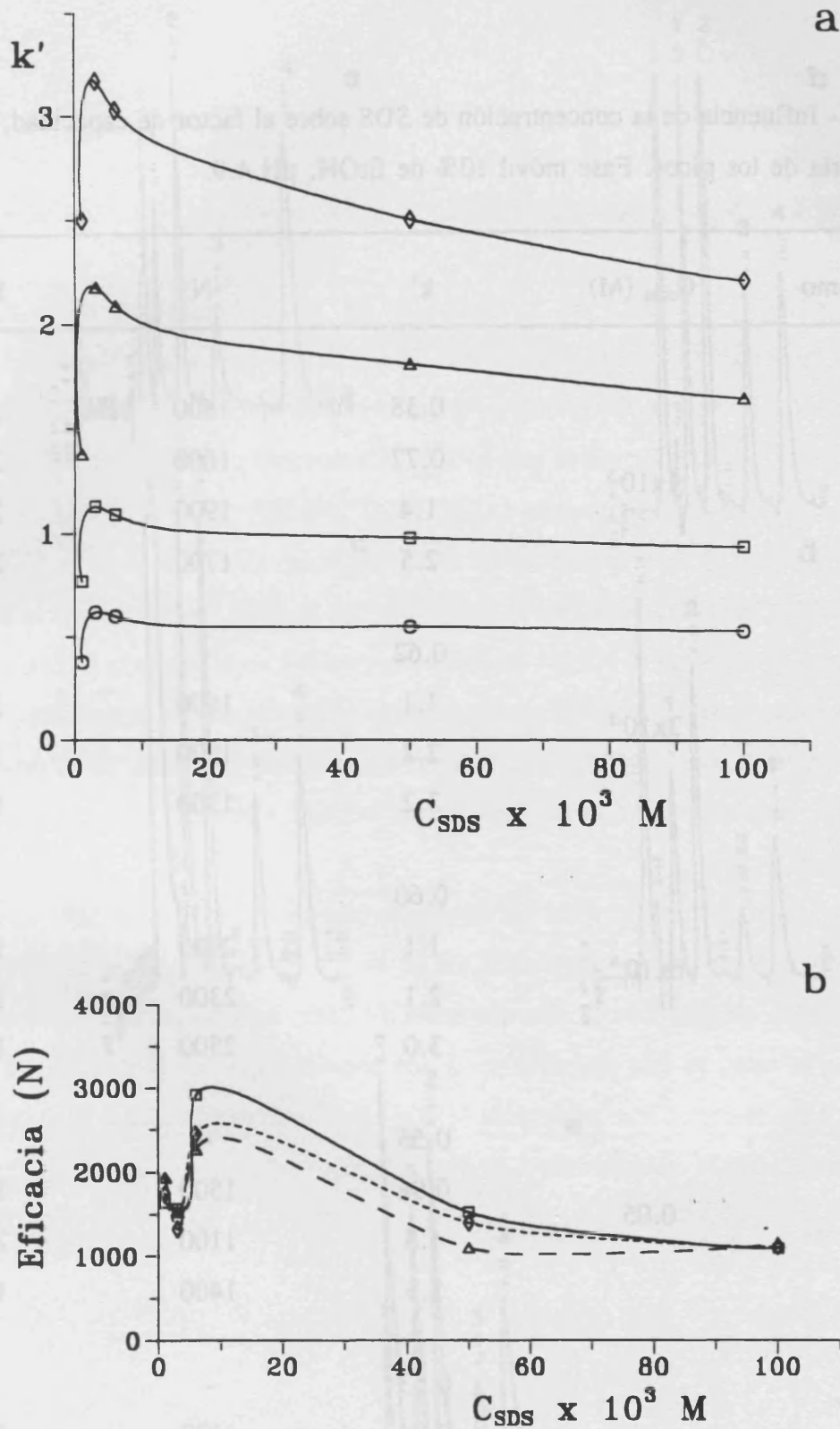


Figura V.10.- Efecto de la concentración de SDS en presencia de un 10% de etanol sobre: (a) el factor de capacidad, y (b) la eficacia de los picos. (\circ) NACR, (\square) ACR, (Δ) DACR, (\diamond) ISOCR.

Tabla V.10.- Influencia de la concentración de SDS sobre los factores de selectividad. Fase móvil 10% EtOH, pH 4.9.

C_{SDS}	α^a
1×10^{-3}	$\alpha_{2,1} = 2.0$ $\alpha_{3,2} = 1.8$ $\alpha_{4,3} = 1.8$
3×10^{-3}	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.5$
6×10^{-3}	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.5$
0.05	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.4$
0.1	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.8$ $\alpha_{4,3} = 1.4$

^aSubíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

V.3.4.- Influencia del pH

Se prepararon fases móviles con la siguiente composición: Na_2HPO_4 0.035 M, ácido cítrico 0.03 M, 10% de etanol y SDS 3×10^{-3} M ó 0.05 M. Para cada concentración de tensioactivo se ajustó el pH a 2.3, 3.5, 4.9 y 7.0 utilizando disoluciones de NaOH ó H_3PO_4 . En las Figuras V.11 y V.12 se muestran los cromatogramas obtenidos. En la Tabla V.11 se muestran los valores del factor de capacidad, el número de platos teóricos y el factor de asimetría. En algunos casos no pudo medirse la eficacia para el NACR, al no estar el pico bien separado de la cabeza del cromatograma.

Como puede verse en la Figura V.13, las variaciones de pH entre 3.5 y 7 no afectan al valor de k' ni a los factores de selectividad (Tabla V.12). Sin embargo, a pH 2.3 se produce un aumento de la retención, que es más importante para los dos aminocromos más hidrofóbicos, DACR e ISOCR, especialmente para DACR, que llega a invertir su orden de elución con el ISOCR. Este incremento en los valores de k' al pH más ácido de 2.3 puede ser debido a la protonación del oxígeno con carga negativa de la forma doble iónica, protonación que tendría lugar en mayor medida para el DACR. En el caso del dopacromo, aunque el valor más alto de k' alcanzado es de 0.48 a pH 2.3 y en SDS 3×10^{-3} M, también podría producirse protonación parcial del grupo carboxilo en estas condiciones, ya que a valores más altos de pH, este aminocromo eluyó siempre cerca del volumen muerto.

Como puede observarse en la Tabla V.11, en general no existen diferencias notables en las asimetrías de los picos al variar el pH y la concentración de tensioactivo. Ahora bien, para pH 7, el más alto ensayado, se aprecia una mayor asimetría de los picos de ACR, DACR e ISOCR a la concentración más alta de tensioactivo. Esta asimetría se manifiesta en los valores de eficacia, que como puede verse en la Figura V.14, son precisamente los más bajos para estas condiciones. También son de resaltar las bajas eficacias obtenidas para NACR y ACR al pH más bajo, 2.3, y con la menor concentración de tensioactivo. Precisamente éstos son los aminocromos más hidrofílicos.

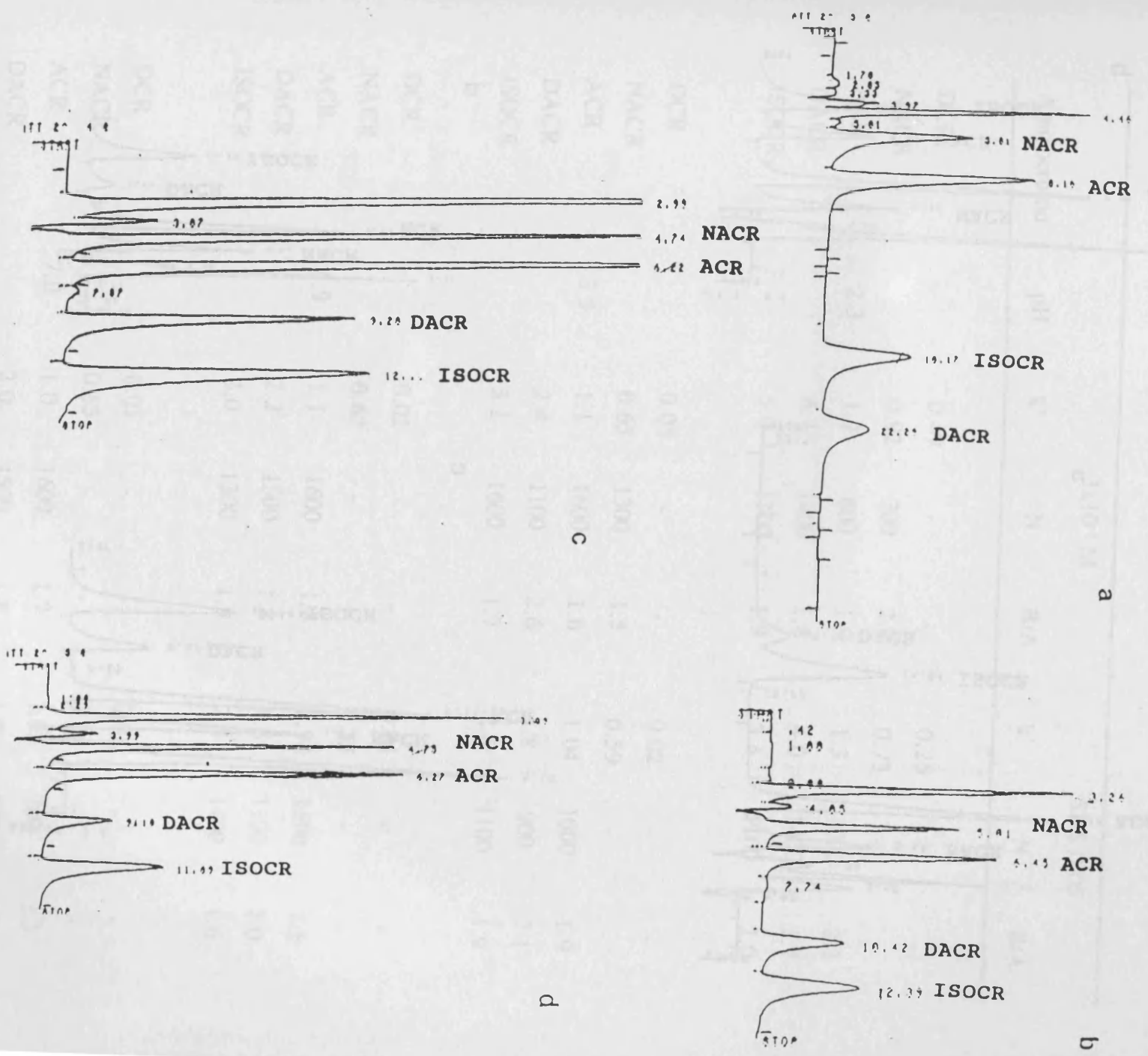


Figura V.11. - Efecto del pH. Fase móvil con SDS 3×10^{-3} M. pHs: (a) 2.3, (b) 3.5, (c) 4.9, (d) 7.0.

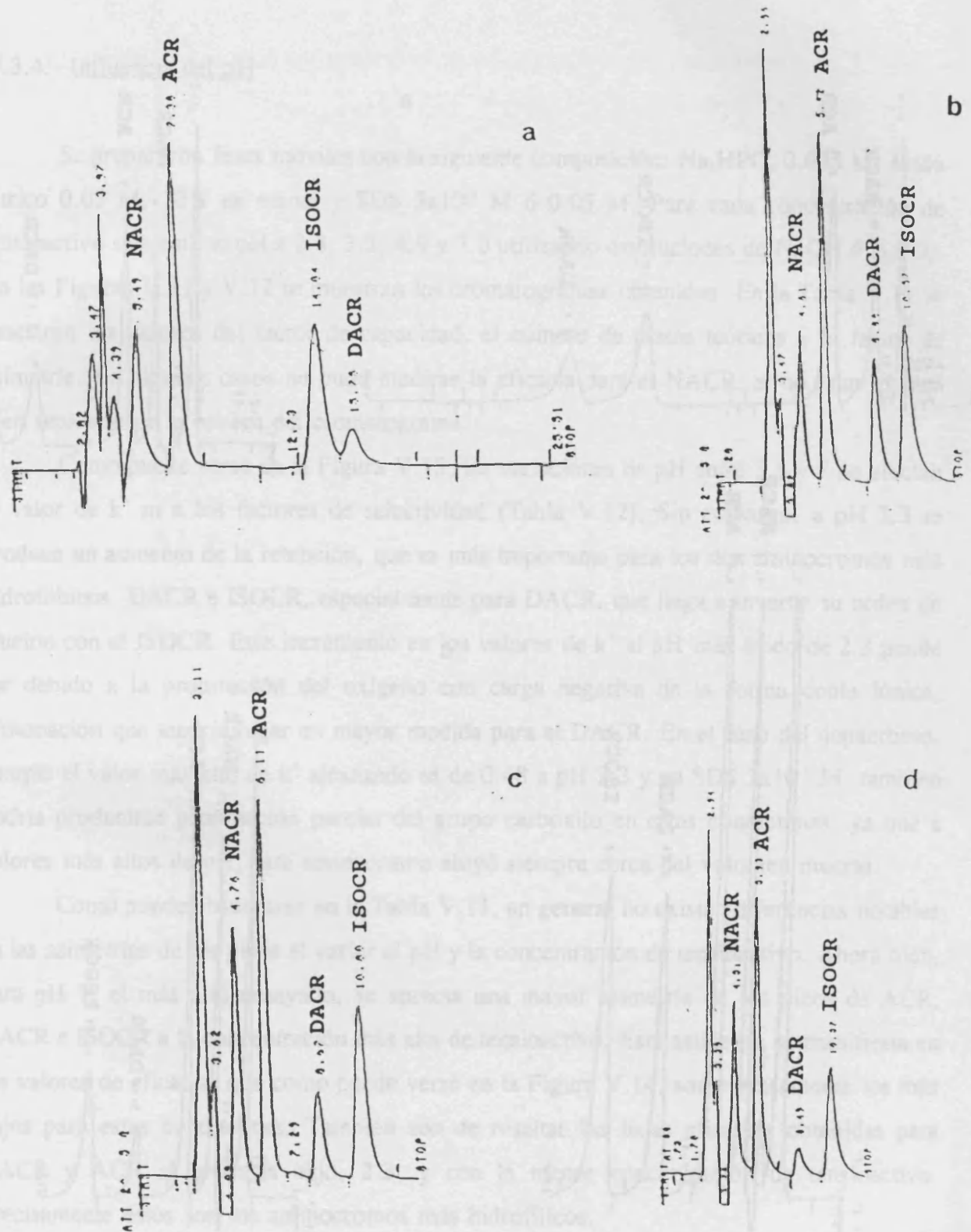


Figura V.12- Efecto del pH. Fase móvil con SDS 0.05 M. pHs: (a) 2.3, (b) 3.5, (c) 4.9, (d) 7.0.

Tabla V.II.- Influencia del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría.

Aminocromo	pH	3×10^{-3} M			SDS 0.05		
		k'	N	B/A	k'	N	B/A
DCR		0.49	-	-	0.25	-	-
NACR		0.92	300	2.7	0.73	-	-
ACR	2.3	1.7	600	1.9	1.3	1000	2.1
DACR		6.4	1400	1.8	4.0	1400	1.7
ISOCR		5.0	1300	1.9	3.4	1100	2.0
DCR		0.08	-	-	0.02	-	-
NACR		0.65	1300	1.5	0.59	-	-
ACR	3.5	1.1	1600	1.6	1.04	1000	1.9
DACR		2.4	1100	2.6	1.8	900	2.1
ISOCR		3.1	1600	1.7	2.6	1100	1.9
DCR		0.02	-	-	0.01	-	-
NACR		0.62	-	-	0.55	-	-
ACR	4.9	1.1	1600	1.8	0.98	1500	1.5
DACR		2.2	1500	1.8	1.8	1100	2.0
ISOCR		3.0	1300	1.9	2.5	1400	1.6
DCR		0.01	-	-	0.01	-	-
NACR		0.55	-	-	0.54	-	-
ACR	7.0	1.0	1600	1.7	1.03	700	2.3
DACR		2.0	1500	1.8	1.9	700	2.5
ISOCR		2.9	1400	1.9	2.6	700	2.4

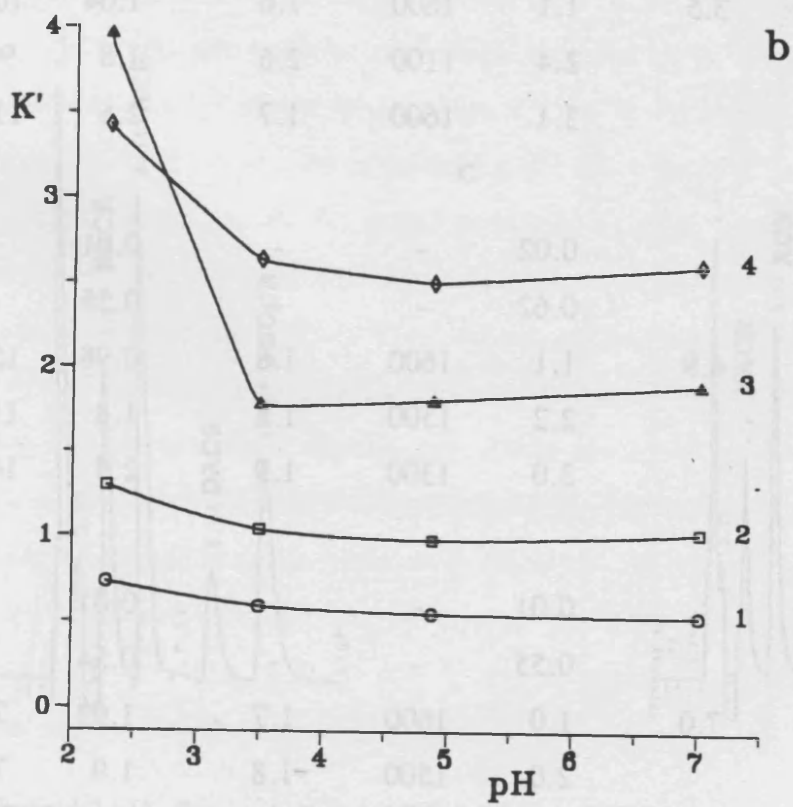
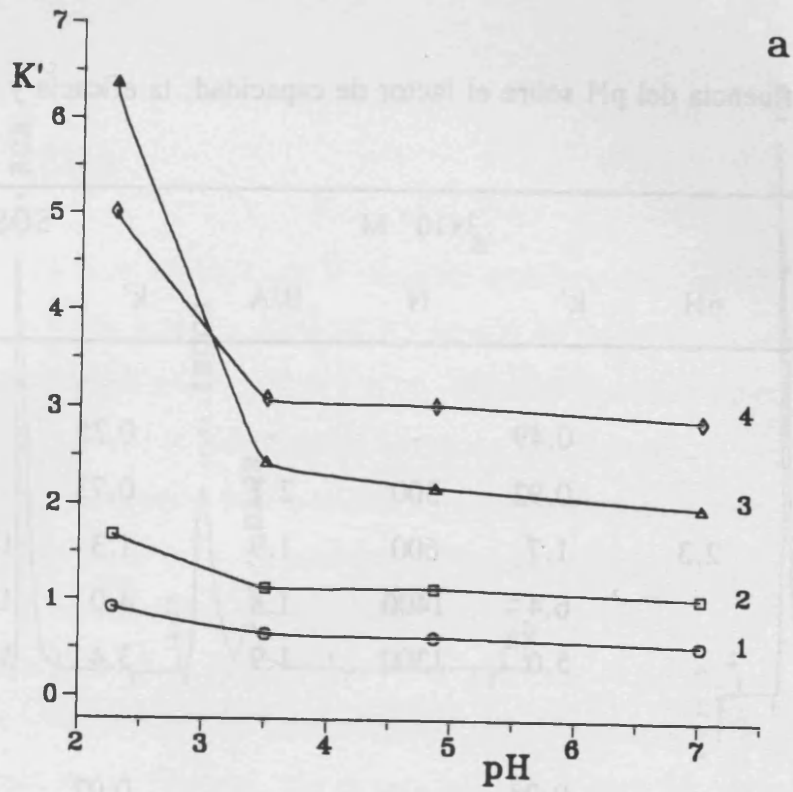


Figura V.13. - Efecto del pH sobre el factor de capacidad. (a) SDS 3×10^{-3} M, (b) SDS 0.05 M. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

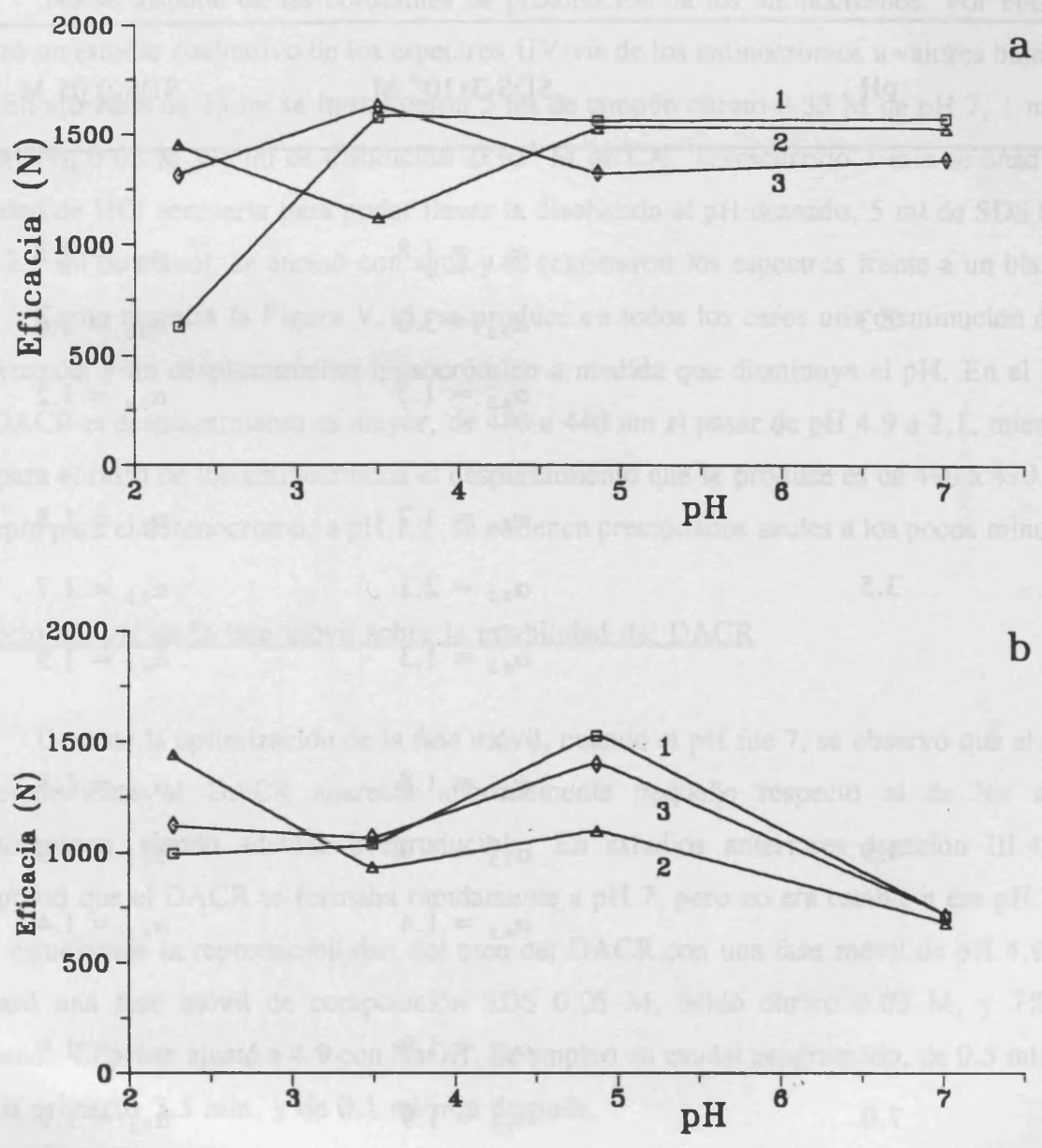


Figura V.14.- Efecto del pH sobre la eficacia. (a) SDS 3x10⁻³ M, (b) SDS 0.05 M. (1) ACR, (2) DACR, (3) ISOCR.



Tabla V.12.- Influencia del pH sobre el factor de selectividad^a.

pH	SDS 3×10^{-3} M	SDS 0.05 M
2.3	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 3.0$ $\alpha_{4,3} = 1.3$	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 2.6$ $\alpha_{3,4} = 1.2$
3.5	$\alpha_{2,1} = 1.7$ $\alpha_{3,2} = 2.2$ $\alpha_{4,3} = 1.3$	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.7$ $\alpha_{4,3} = 1.5$
4.9	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.4$	$\alpha_{2,1} = 1.8$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.4$
7.0	$\alpha_{2,1} = 1.9$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.5$	$\alpha_{2,1} = 1.9$ $\alpha_{3,2} = 1.9$ $\alpha_{4,3} = 1.4$

^aSubíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

Figura V.13.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad. (a) SDS 3×10^{-3} M, (b) SDS 0.05 M. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

- Efecto del pH sobre los espectros UV-vis de los aminocromos

No se dispone de las constantes de protonación de los aminocromos. Por ello, se realizó un estudio cualitativo de los espectros UV-vis de los aminocromos a valores bajos de pH. En aforados de 25 ml se introdujeron 5 ml de tampón citrato 0.35 M de pH 7, 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0.05 M y 1 ml de disolución 2×10^{-3} M de CA. Transcurrido 1 min se añadió la cantidad de HCl necesaria para poder llevar la disolución al pH deseado, 5 ml de SDS 0.25 M y 2.5 ml de etanol, se enrasó con agua y se registraron los espectros frente a un blanco.

Como muestra la Figura V.15, se produce en todos los casos una disminución de la absorbancia y un desplazamiento hipsocrómico a medida que disminuye el pH. En el caso del DACR el desplazamiento es mayor, de 480 a 440 nm al pasar de pH 4.9 a 2.1, mientras que para el resto de los aminocromos el desplazamiento que se produce es de 490 a 470 nm. Excepto para el adrenocromo, a pH 1.1 se obtienen precipitados azules a los pocos minutos.

- Efecto del pH de la fase móvil sobre la estabilidad del DACR

Durante la optimización de la fase móvil, cuando el pH fue 7, se observó que el pico correspondiente al DACR aparecía anormalmente pequeño respecto al de los otros aminocromos, siendo además irreproducible. En estudios anteriores (sección III.4) se comprobó que el DACR se formaba rápidamente a pH 7, pero no era estable a ese pH. Por ello, estudiamos la reproducibilidad del pico del DACR con una fase móvil de pH 4.9. Se preparó una fase móvil de composición SDS 0.05 M, ácido cítrico 0.03 M, y 7% de propanol. El pH se ajustó a 4.9 con NaOH. Se empleó un caudal programado, de 0.5 ml/min en los primeros 3.5 min, y de 0.1 ml/min después.

En la Figura V.16 se muestran los cromatogramas correspondientes a 3 inyecciones de DACR 1×10^{-5} M. Se añadió ácido cítrico después de adicionar el oxidante a pH 7, para que la disolución quedase a pH 4.9. En el caso del cromatograma (a), el ácido cítrico se añadió inmediatamente después del oxidante, mientras que en los casos (b) y (c) se dejaron transcurrir 0.5 y 1 min, respectivamente. Como puede comprobarse, los picos correspondientes a los casos (b) y (c) son idénticos, mientras que el correspondiente al caso (a) es notablemente más pequeño debido a que la oxidación es muy lenta a pH 4.9. En cambio, a pH 7, 0.5 min son suficientes para que se complete la reacción de oxidación.

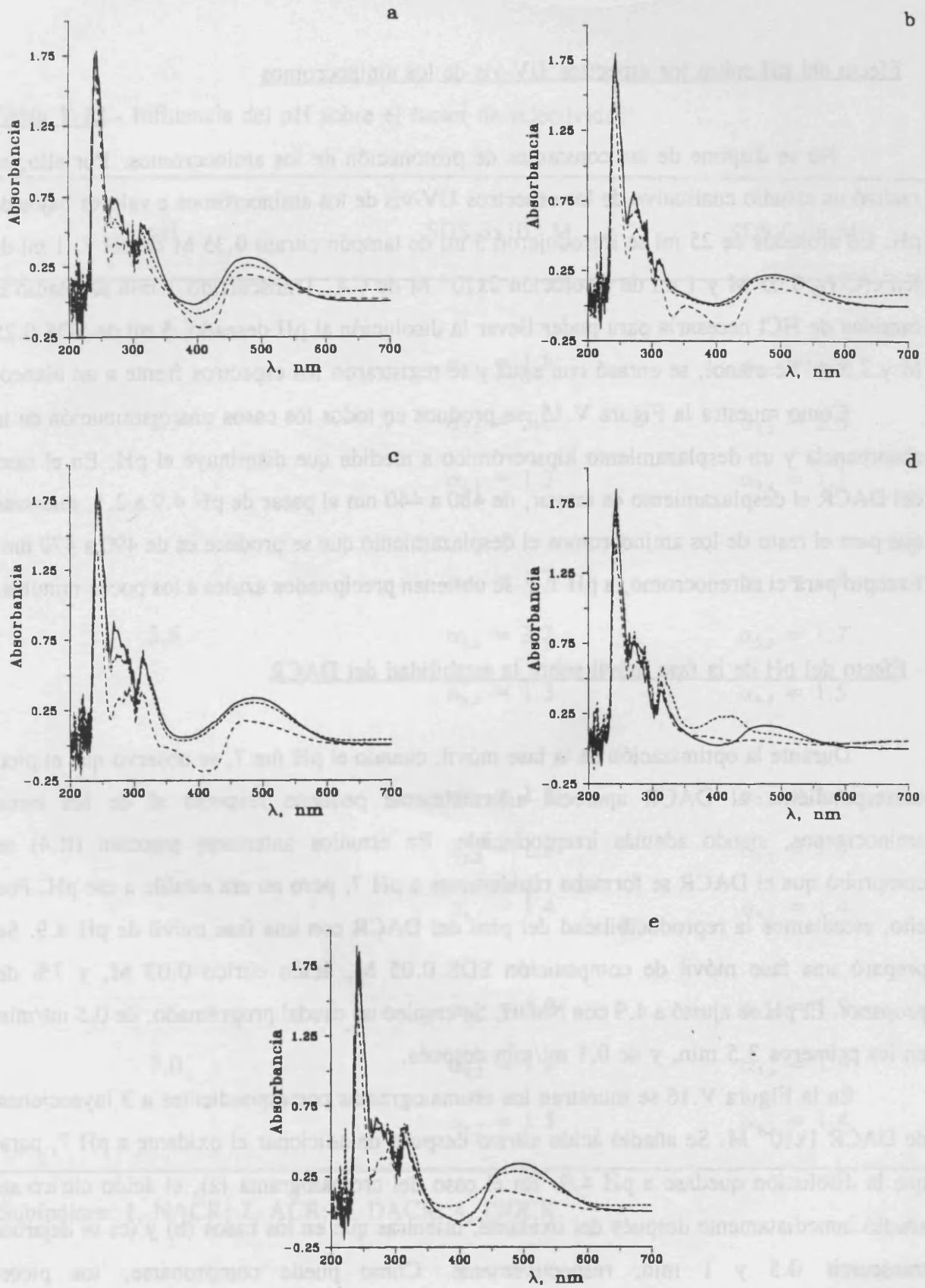


Figura V.15. - Influencia del pH sobre el espectro UV-vis de los aminocromos: (—) pH 4.9, (---) pH 2.1, (...) pH 1.1.

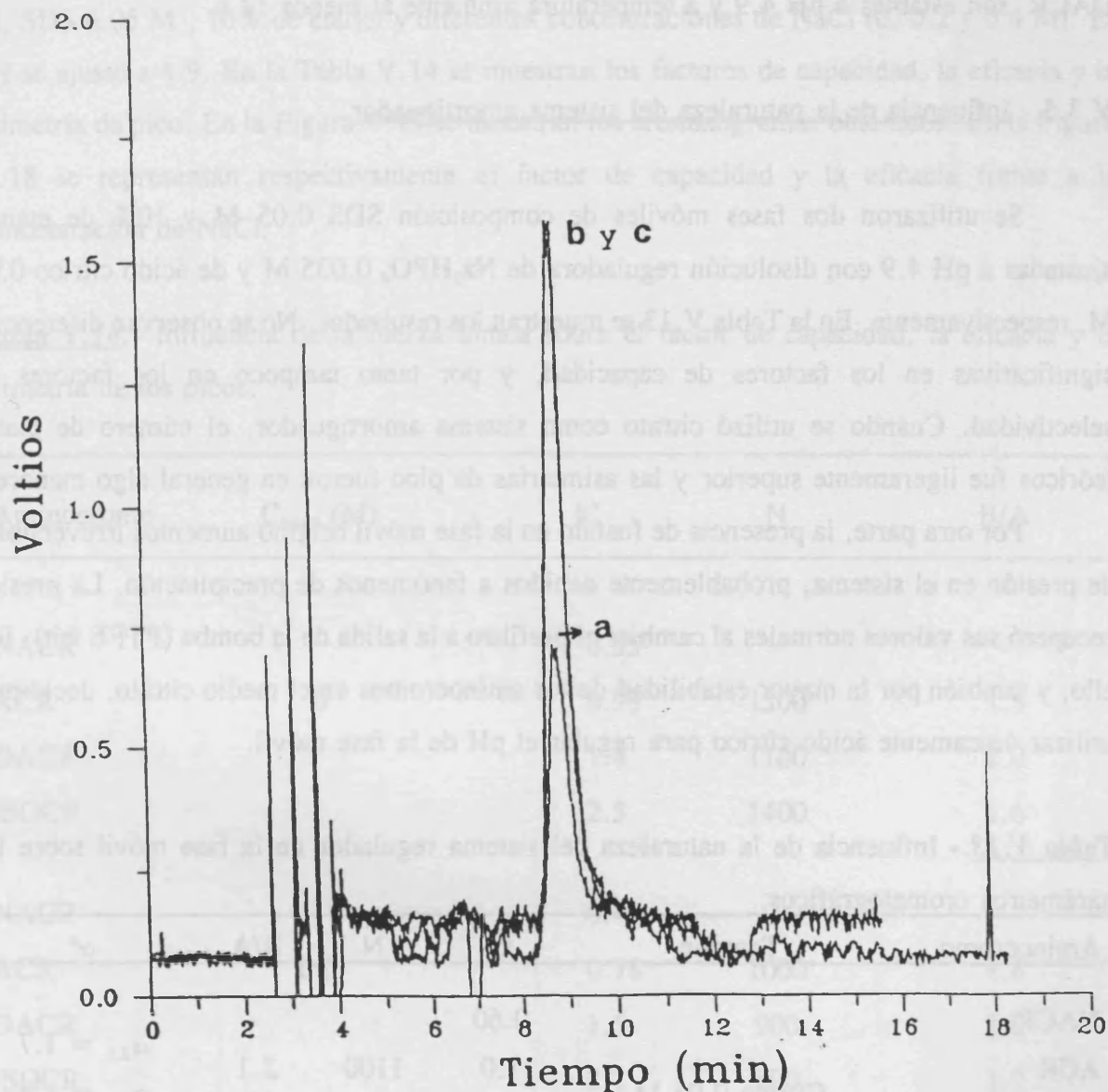


Figura V.16.- Tiempo de oxidación a pH 7. Cromatogramas superpuestos: (a) Oxidación a pH 7 seguida de adición inmediata de ácido cítrico e inyección de la muestra a pH 4.9. (b) Se dejaron transcurrir 30 s antes de adicionar el ácido cítrico. (c) El tiempo de espera fue de 60 s.

Posteriormente se comprobó que utilizando una fase móvil de pH 4.9 el pico del DACR es reproducible, tanto si se disminuye el pH después de la oxidación como si se efectúa la inyección a pH 7 inmediatamente después de la formación del DACR. Las disoluciones de DACR son estables a pH 4.9 y a temperatura ambiente al menos 12 h.

V.3.5.- Influencia de la naturaleza del sistema amortiguador

Se utilizaron dos fases móviles de composición SDS 0.05 M y 10% de etanol, ajustadas a pH 4.9 con disolución reguladora de Na_2HPO_4 0.035 M y de ácido cítrico 0.03 M, respectivamente. En la Tabla V.13 se muestran los resultados. No se observan diferencias significativas en los factores de capacidad, y por tanto tampoco en los factores de selectividad. Cuando se utilizó citrato como sistema amortiguador, el número de platos teóricos fue ligeramente superior y las asimetrías de pico fueron en general algo menores.

Por otra parte, la presencia de fosfato en la fase móvil originó aumentos irreversibles de presión en el sistema, probablemente debidos a fenómenos de precipitación. La presión recuperó sus valores normales al cambiar el prefiltro a la salida de la bomba (PTFE frit). Por ello, y también por la mayor estabilidad de los aminocromos en el medio citrato, decidimos utilizar únicamente ácido cítrico para regular el pH de la fase móvil.

Tabla V.13.- Influencia de la naturaleza del sistema regulador de la fase móvil sobre los parámetros cromatográficos.

Aminocromo	Tampón	k'	N	B/A	α^a
NACR		0.60	-	-	
ACR	Cítrico 0.03 M	1.0	1100	2.1	$\alpha_{2,1} = 1.7$
DACR		1.9	1100	2.0	$\alpha_{3,2} = 1.8$
ISOCR		2.6	1100	1.9	$\alpha_{4,3} = 1.4$
NACR		0.59	-	-	
ACR	Na_2HPO_4 0.0347 M	1.0	1000	2.0	$\alpha_{2,1} = 1.8$
DACR		2.0	800	2.2	$\alpha_{3,2} = 1.9$
ISOCR		2.6	800	2.3	$\alpha_{4,3} = 1.4$

^aSubíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

V.3.6. - Influencia de la fuerza iónica

Se prepararon fases móviles constituidas por: Na_2HPO_4 0.035 M, ácido cítrico 0.03 M, SDS 0.05 M, 10% de etanol y diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.2 y 0.4 M). El pH se ajustó a 4.9. En la Tabla V.14 se muestran los factores de capacidad, la eficacia y la asimetría de pico. En la Figura V.17 se muestran los cromatogramas obtenidos. En la Figura V.18 se representan respectivamente el factor de capacidad y la eficacia frente a la concentración de NaCl.

Tabla V.14.- Influencia de la fuerza iónica sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos.

Aminocromo	C_{NaCl} (M)	k'	N	B/A
NACR		0.55	-	-
ACR	0	0.98	1500	1.5
DACR		1.8	1100	2.0
ISO CR		2.5	1400	1.6
NACR		0.41	-	-
ACR	0.2	0.78	1000	1.8
DACR		1.5	900	2.0
ISO CR		2.1	800	1.7
NACR		0.37	-	-
ACR	0.4	0.71	1100	1.8
DACR		1.4	1000	2.0
ISO CR		2.0	1000	1.7

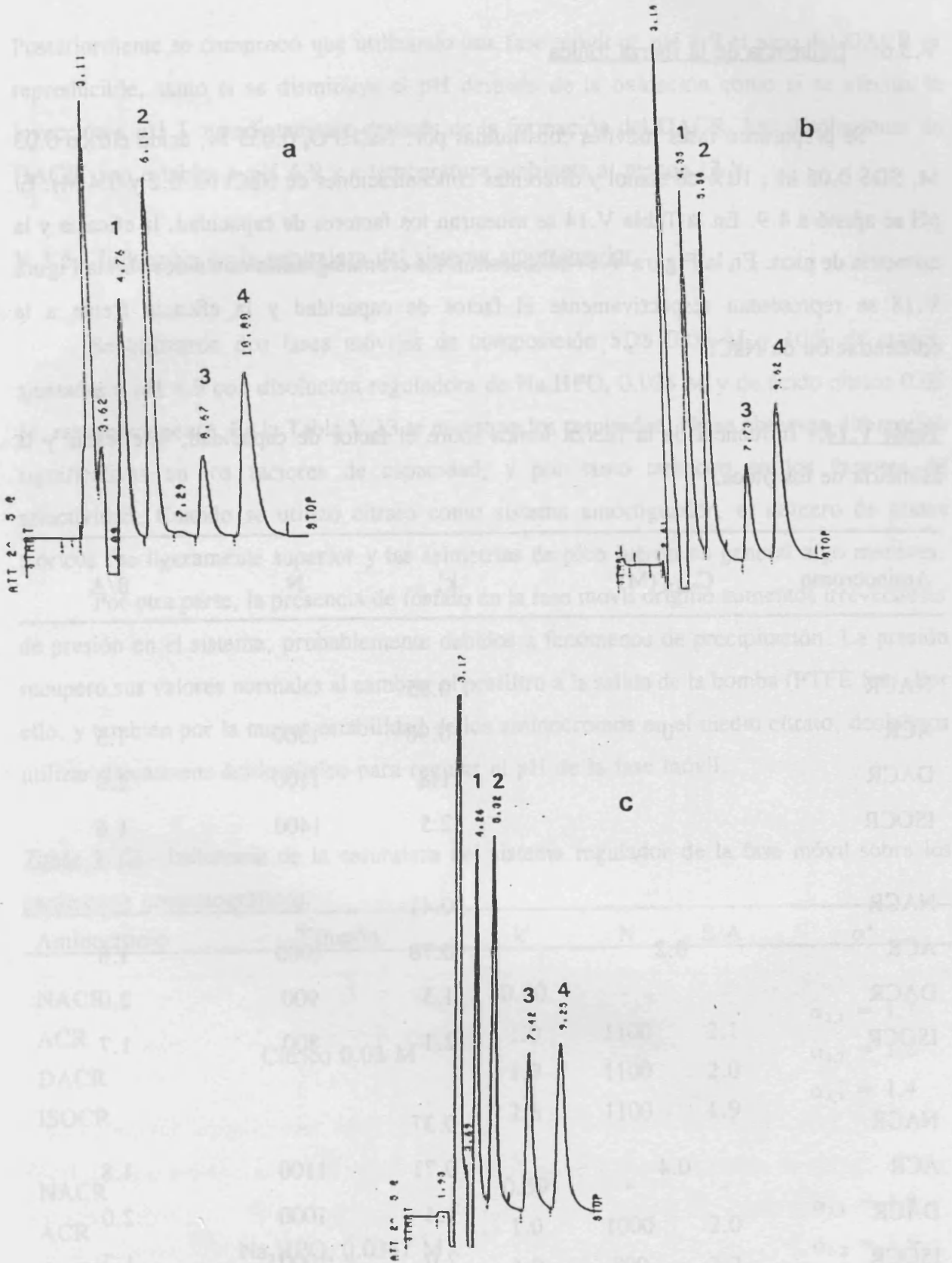


Figura V.17.- Efecto de la fuerza iónica. (a) Sin adición de NaCl, (b) NaCl 0.2 M, (c) NaCl 0.4 M. Solutos: (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

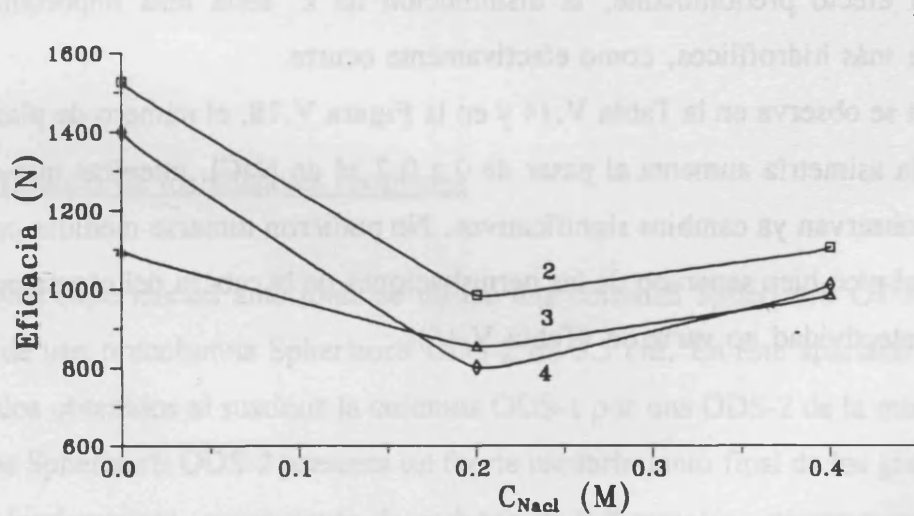
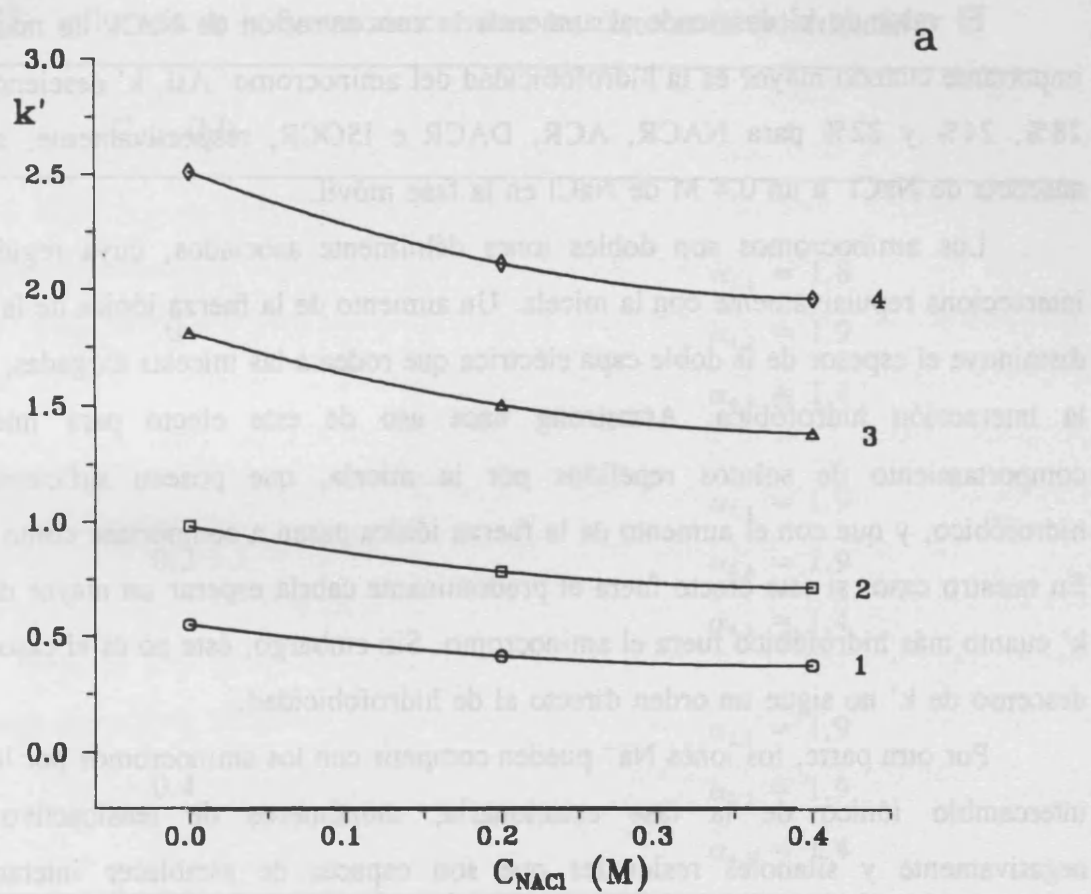


Figura V.18.- Influencia de la fuerza iónica sobre (a) el factor de capacidad y (b) la eficacia de los picos. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

El valor de k' desciende al aumentar la concentración de NaCl, de manera menos importante cuando mayor es la hidrofobicidad del aminocromo. Así, k' desciende un 33%, 28%, 24% y 22% para NACR, ACR, DACR e ISOCR, respectivamente, al pasar de ausencia de NaCl a un 0.4 M de NaCl en la fase móvil.

Los aminocromos son dobles iones débilmente asociados, cuya región aniónica interacciona repulsivamente con la micela. Un aumento de la fuerza iónica de la fase móvil disminuye el espesor de la doble capa eléctrica que rodea a las micelas cargadas, facilitando la interacción hidrofóbica. Armstrong hace uso de este efecto para interpretar el comportamiento de solutos repelidos por la micela, que poseen suficiente carácter hidrofóbico, y que con el aumento de la fuerza iónica pasan a comportarse como asociados. En nuestro caso, si este efecto fuera el predominante cabría esperar un mayor descenso de k' cuanto más hidrofóbico fuera el aminocromo. Sin embargo, éste no es el caso, ya que el descenso de k' no sigue un orden directo al de hidrofobicidad.

Por otra parte, los iones Na^+ pueden competir con los aminocromos por los sitios de intercambio iónico de la fase estacionaria, monómeros de tensioactivo cargados negativamente y silanoles residuales que son capaces de establecer interacciones de intercambio iónico y puentes de hidrógeno con los solutos cargados positivamente (19). Si éste fuera el efecto predominante, la disminución de k' sería más importante para los aminocromos más hidrofílicos, como efectivamente ocurre.

Según se observa en la Tabla V.14 y en la Figura V.18, el número de platos teóricos desciende y la asimetría aumenta al pasar de 0 a 0.2 M de NaCl, mientras que de 0.2 M a 0.4 M no se observan ya cambios significativos. No pudieron tomarse medidas para NACR, por no estar el pico bien separado de las perturbaciones de la cabeza del cromatograma. Los factores de selectividad no variaron (Tabla V.15).

Tabla V.15.- Influencia de la fuerza iónica sobre los factores de selectividad.

C_{NaCl} (M)	α^a
0	$\alpha_{2,1} = 1.8$
	$\alpha_{3,2} = 1.9$
	$\alpha_{4,3} = 1.4$
0.2	$\alpha_{2,1} = 1.9$
	$\alpha_{3,2} = 1.9$
	$\alpha_{4,3} = 1.4$
0.4	$\alpha_{2,1} = 1.9$
	$\alpha_{3,2} = 1.9$
	$\alpha_{4,3} = 1.4$

^aSubíndices: 1, NACR; 2, ACR; 3, DACR; 4, ISOCR.

V.3.7.- Influencia de los silanoles residuales

En las experiencias anteriores se utilizó una columna Spherisorb ODS-1 de 12 cm, precedida de una precolumna Spherisorb ODS-2 de 3.5 cm. En este apartado se comparan los resultados obtenidos al sustituir la columna ODS-1 por una ODS-2 de la misma longitud. La columna Spherisorb ODS-2 presenta un fuerte recubrimiento final de los grupos silanoles residuales (endcapping), y una carga de carbono de 0.8 mmol/g, mientras que la columna ODS-1 presenta un recubrimiento menor, con una carga de carbono de 0.5 mmol/g. Por tanto, el número de silanoles residuales sin alquilar es considerablemente mayor en la columna ODS-1.

En la Figura V.19 se comparan los cromatogramas obtenidos al inyectar los aminocromos en ambas columnas, utilizando como fase móvil ácido cítrico 0.03 M, SDS 0.05 M y un 7% de propanol, a pH 4.9. Los aminocromos resultan bien separados por la columna ODS-1, mientras que con la ODS-2 no se separan y eluyen cerca del volumen muerto. En la Figura V.20 se muestran los cromatogramas obtenidos para ambas fases estacionarias, utilizando una fase móvil de igual composición a la anterior, pero sustituyendo el propanol por un 10% de etanol. Con la columna ODS-2, aparecen dos pares de picos mal resueltos, NACR y ACR por un lado, y DACR e ISOCR por otro, mientras que con la columna ODS-1 todos los pares de picos quedan bien resueltos.

En la Tabla V.16 se muestran los factores de capacidad y los factores de selectividad. Los valores de k' son siempre más bajos cuando se utiliza la columna ODS-2. Se deduce que los aminocromos interaccionan de manera importante con los grupos silanoles residuales. Probablemente, la interacción se produzca a través del nitrógeno protonado, que tiene una gran afinidad por el grupo silanol.

Tabla V.16.- Influencia del recubrimiento final de la fase estacionaria sobre los factores de capacidad y de selectividad. Fase móvil: ácido cítrico 0.03 M, SDS 0.05 M, 10% de etanol, pH 4.9.

Fase estacionaria	Aminocromo	k'	α^a
Spherisorb 5ODS-2	NACR	0.52	$\alpha_{2,1} = 1.3$
	ACR	0.69	
	DACR	1.4	$\alpha_{3,2} = 2.0$
	ISOCR	1.6	$\alpha_{4,3} = 1.1$
Spherisorb 5ODS-1	NACR	0.7	$\alpha_{2,1} = 1.6$
	ACR	1.1	
	DACR	1.9	$\alpha_{3,2} = 1.8$
	ISOCR	2.5	$\alpha_{4,3} = 1.3$

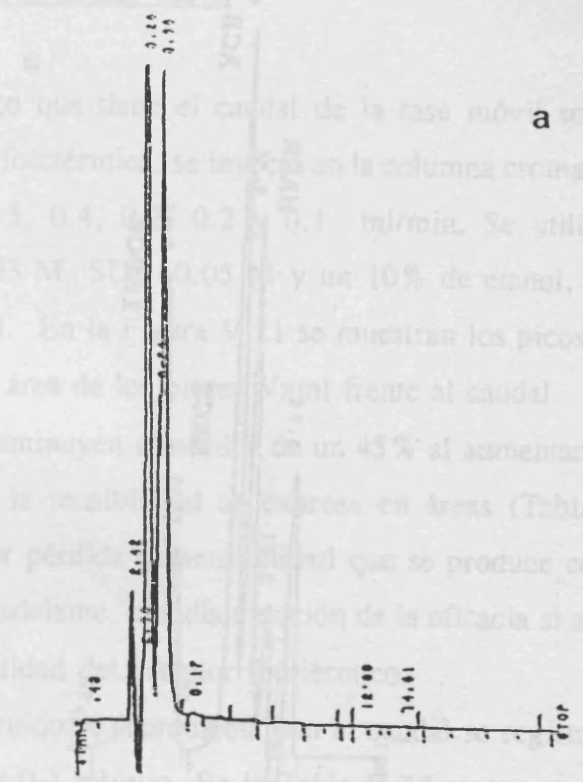
^a Subíndices: 1, NACR; 2, ACR; 2, DACR; 3, ISOCR.

Tabla V.16 - Influencia del caudal de la fase móvil sobre la sensibilidad

Para estudiar el efecto que tiene el caudal de la fase móvil sobre la sensibilidad cuando se utiliza la detección fotométrica se inyecta en la columna cromatográfica $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a un caudal de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml/min. Se utilizó una fase móvil compuesta ácido clorhídrico 0.03 M - SDS 0.05 mg/ml y un 10% de etanol, regulada a pH 4.9 mediante la adición de NaOH. En la figura V.16 se muestran los picos obtenidos, y en la figura V.17 se representa el área de los picos de Vanil frente al caudal.

Las alturas de pico disminuyen un 45% al aumentar el caudal de 0.1 a 0.5 ml/min, sin embargo si la resolución de los picos en área (Tabla V.17), que solo disminuye un 20%. La mayor pérdida de sensibilidad que se produce con las alturas de pico se debe a una pérdida de sensibilidad de la detección al aumentar el caudal, y no a una pérdida de sensibilidad de la columna.

Para comprobar si el ruido que se produce al aumentar el caudal de la fase móvil durante 5 min a 0.5 ml/min y 0.1 ml/min, en la figura V.18 se muestran las desviaciones típicas obtenidas para ambos caudales. Se observa una desviación típica de la línea base ligeramente inferior para 0.1 ml/min.



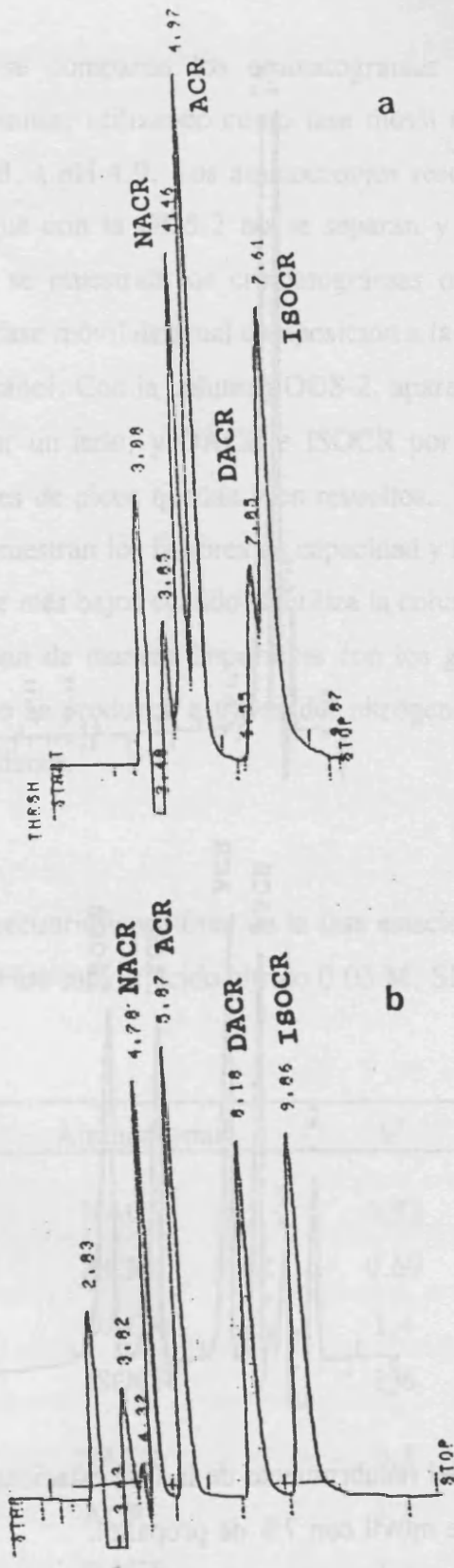


Figura V.20.- Influencia del recubrimiento de la fase estacionaria: (a) Spherisorb ODS-2, (b) Spherisorb ODS-1. Fase móvil con 10% de etanol.

V.3.8.- Influencia del caudal de la fase móvil

Para estudiar el efecto que tiene el caudal de la fase móvil sobre la sensibilidad cuando se utiliza la detección fototérmica, se inyectó en la columna cromatográfica $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 3×10^{-3} M a un caudal de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml/min. Se utilizó una fase móvil conteniendo ácido cítrico 0.03 M, SDS 0.05 M y un 10% de etanol, regulada a pH 4.9 mediante la adición de NaOH. En la Figura V.21 se muestran los picos obtenidos, y en la Figura V.22 se representa el área de los picos $V_{x\text{ml}}$ frente al caudal.

Las alturas de pico disminuyen alrededor de un 45% al aumentar el caudal de 0.1 a 0.5 ml/min, sin embargo si la sensibilidad se expresa en áreas (Tabla V.17), ésta solo disminuye un 20%. La mayor pérdida de sensibilidad que se produce con las alturas debe atribuirse, como se verá más adelante, a la disminución de la eficacia al aumentar el caudal, y no a una pérdida de sensibilidad del detector fototérmico.

Para comprobar si el ruido se incrementa con el caudal se registraron 3 líneas base durante 5 min a 0.5 ml/min y 0.1 ml/min. En la Tabla V.18 se muestran las desviaciones típicas obtenidas para ambos caudales. Se observa una desviación típica de la línea base ligeramente inferior para 0.1 ml/min.

Tabla V.17.- Influencia del caudal sobre la sensibilidad.

Caudal (ml/min)	Area (Vxs)	Area (Vx _{ml})
0.5	5.40	2.70
0.4	6.36	2.54
0.3	10.35	3.10
0.2	15.80	3.16
0.1	34.10	3.41

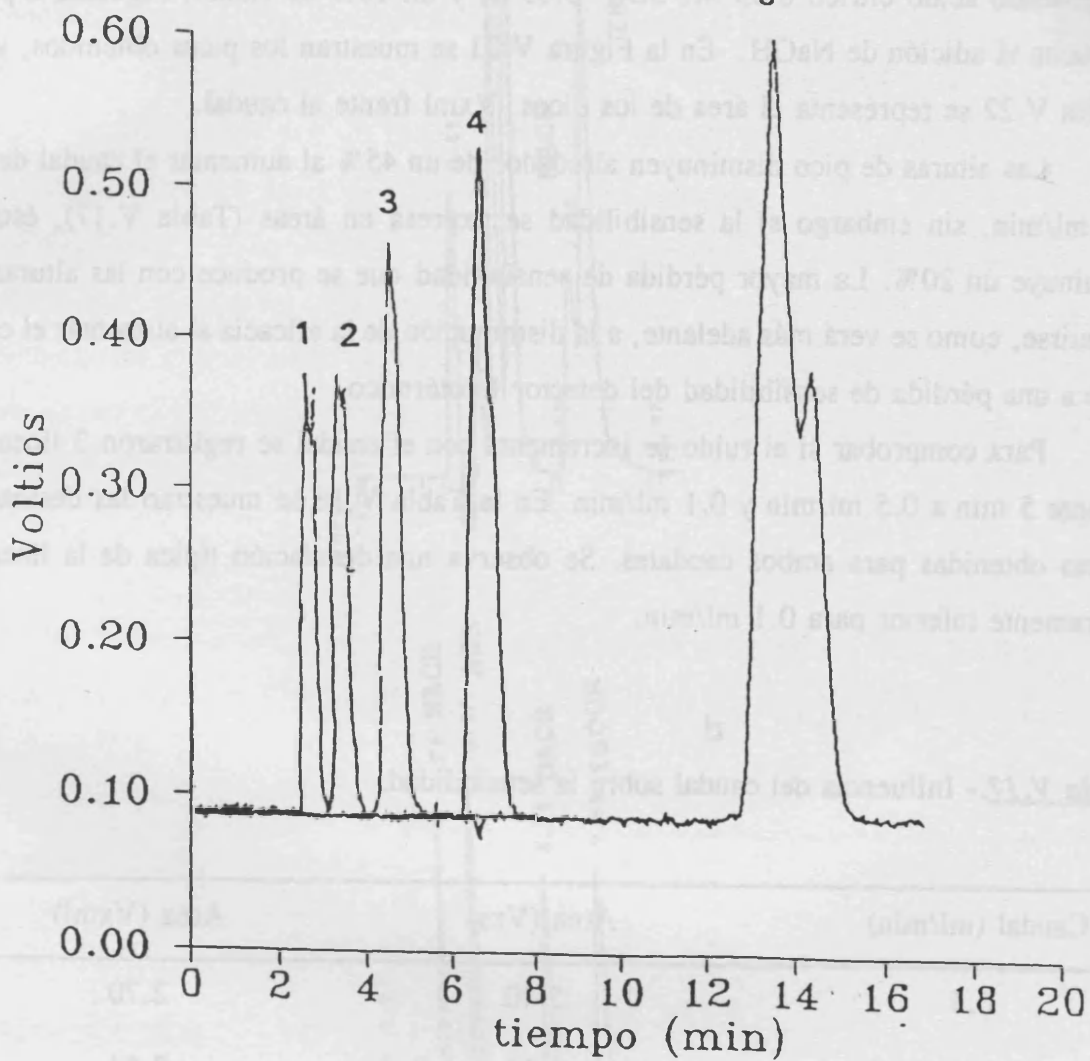


Figura V.21.- Influencia del caudal. Picos obtenidos para flujo (1) 0.5, (2) 0.4, (3) 0.3, (4) 0.2 y (5) 0.1 ml min⁻¹. Inyecciones consecutivas de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \times 10^{-3}$ M.

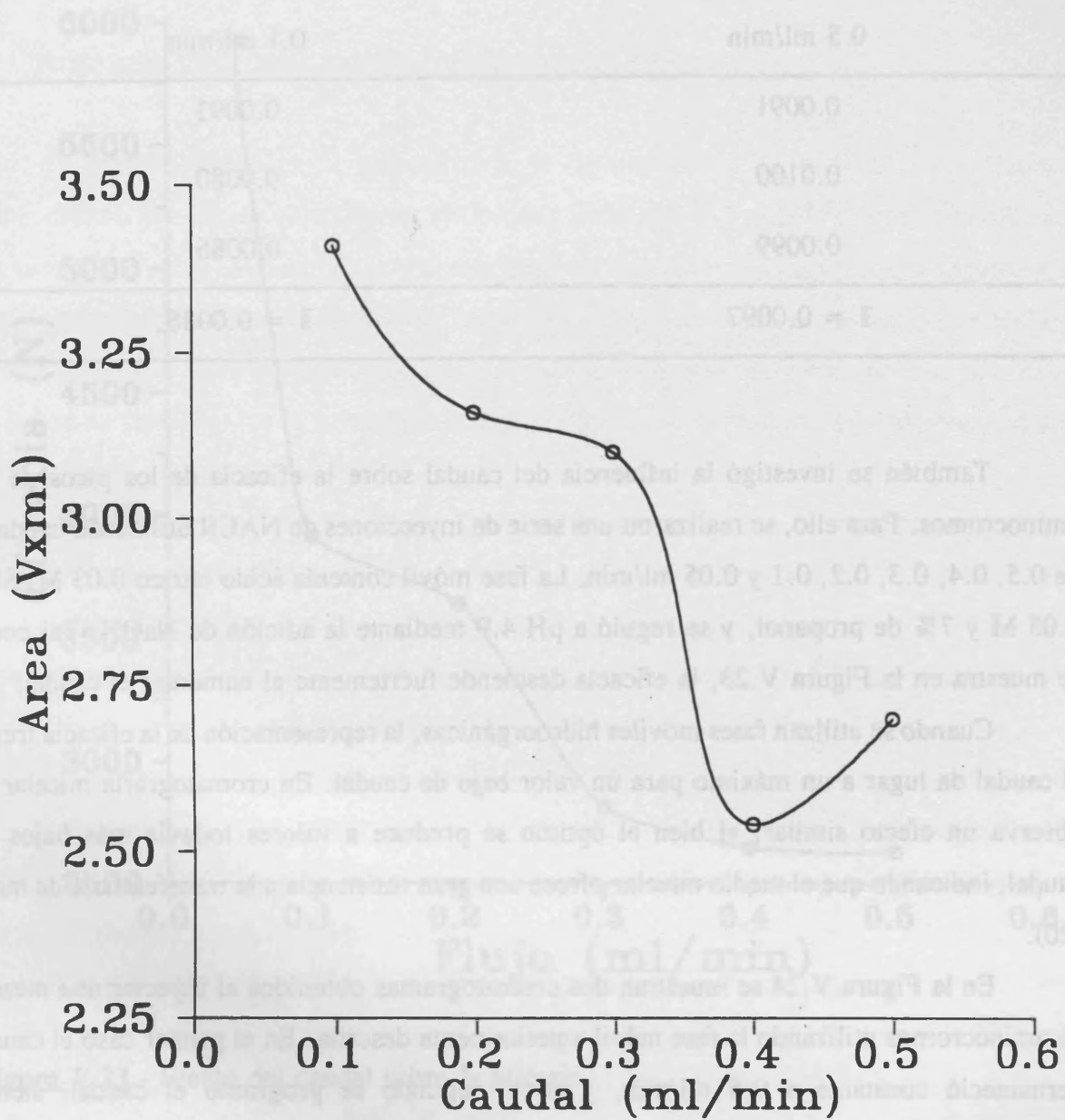


Figura V.22. - Efecto del caudal sobre la sensibilidad de la señal en lente térmica. Obsérvese que la ordenada en el origen no comienza en el cero.

Tabla V.18.- Influencia del caudal sobre el ruido de la línea base.

Desviación típica	
0.5 ml/min	0.1 ml/min
0.0091	0.0093
0.0100	0.0080
0.0099	0.0086
$\bar{s} = 0.0097$	$\bar{s} = 0.0086$

También se investigó la influencia del caudal sobre la eficacia de los picos de los aminocromos. Para ello, se realizaron una serie de inyecciones de NACR utilizando caudales de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 ml/min. La fase móvil contenía ácido cítrico 0.03 M, SDS 0.05 M y 7% de propanol, y se reguló a pH 4.9 mediante la adición de NaOH. Tal como se muestra en la Figura V.23, la eficacia desciende fuertemente al aumentar el caudal.

Cuando se utilizan fases móviles hidroorgánicas, la representación de la eficacia frente al caudal da lugar a un máximo para un valor bajo de caudal. En cromatografía micelar se observa un efecto similar, si bien el óptimo se produce a valores todavía más bajos de caudal, indicando que el medio micelar ofrece una gran resistencia a la transferencia de masa (20).

En la Figura V.24 se muestran dos cromatogramas obtenidos al inyectar una mezcla de aminocromos utilizando la fase móvil anteriormente descrita. En el primer caso el caudal permaneció constante a 0.5 ml/min, y en el segundo se programó el caudal, siendo igualmente 0.5 ml/min durante los primeros 3.5 min, y disminuyendo después a 0.1 ml/min. Al utilizar el caudal programado los tiempos de retención se alargan, sin embargo los picos aparecen mucho mejor definidos, sobre todo los correspondientes a NACR y ACR. Además, el incremento de sensibilidad que se consigue cuando el área se mide en V_{xs} facilita la integración. La mejor definición del pico para flujos bajos se produce porque el programa de tratamiento de datos utilizado sólo es capaz de registrar un punto cada 2 segundos, y por tanto, los picos estrechos quedan definidos por muy pocos puntos si el caudal es alto.

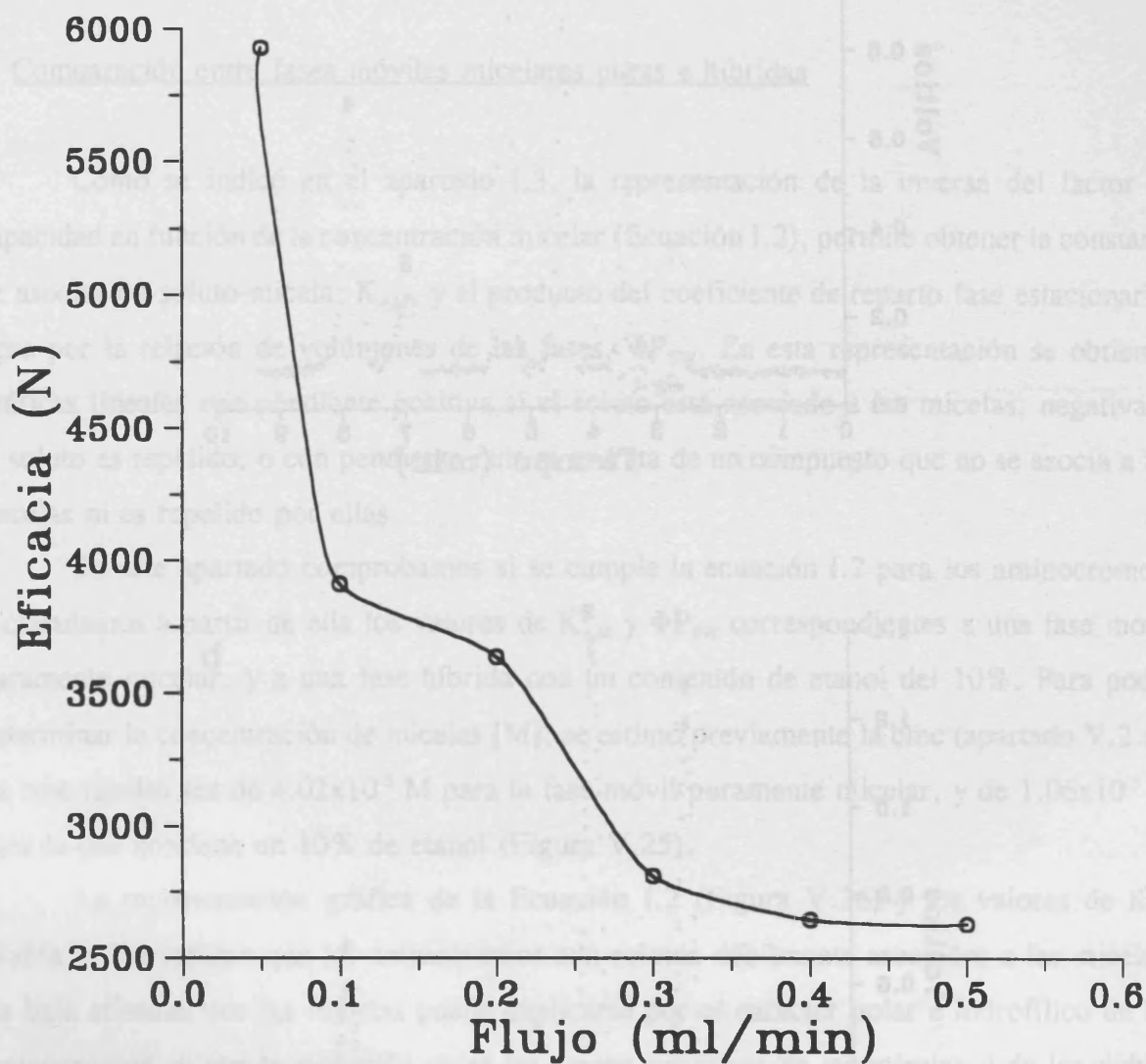


Figura V.23.- Efecto del caudal sobre la eficacia.

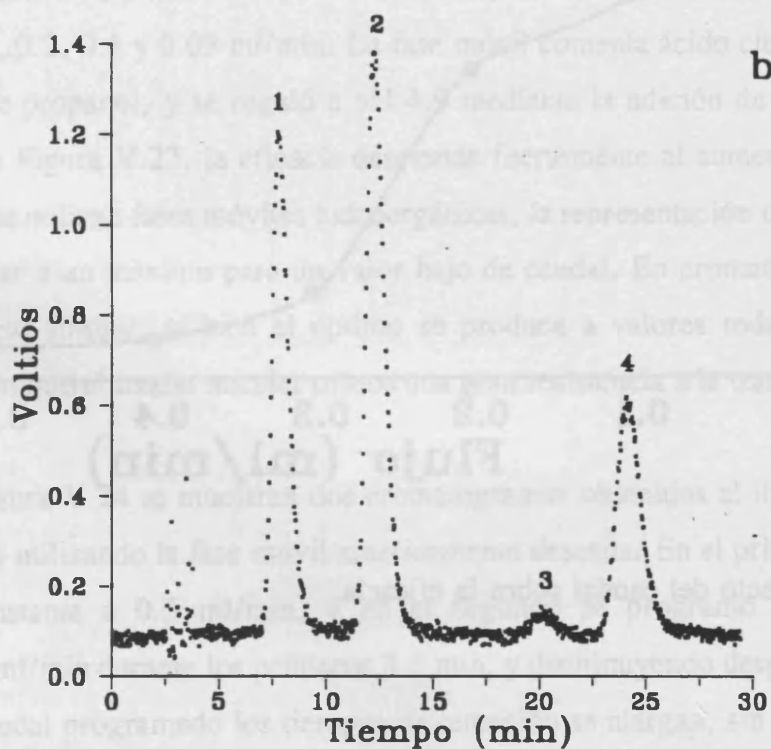
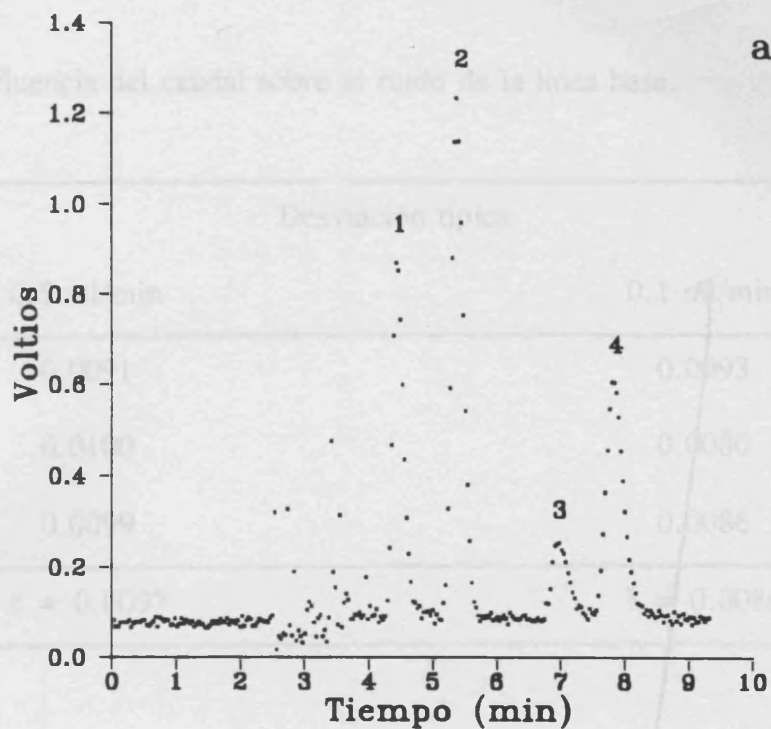


Figura V.24. - Efecto del caudal sobre la definición de los picos. (a) Cromatograma obtenido a 0.5 ml min^{-1} . (b) Cromatograma obtenido utilizando flujo 0.5 ml min^{-1} durante los primeros 3.5 min y 0.1 ml min^{-1} en adelante.

V.4.- Estudios físico-químicos y modelización

V.4.1.- Determinación y estudio comparativo de K_{AM} y ΦP_{SW}

a) Comparación entre fases móviles micelares puras e híbridas

Como se indicó en el apartado I.3, la representación de la inversa del factor de capacidad en función de la concentración micelar (Ecuación I.2), permite obtener la constante de asociación soluto-micela, K_{AM} , y el producto del coeficiente de reparto fase estacionaria-agua por la relación de volúmenes de las fases, ΦP_{SW} . En esta representación se obtienen gráficas lineales con pendiente positiva si el soluto está asociado a las micelas, negativa si el soluto es repelido, o con pendiente nula si se trata de un compuesto que no se asocia a las micelas ni es repelido por ellas.

En este apartado comprobamos si se cumple la ecuación I.2 para los aminocromos, y calculamos a partir de ella los valores de K_{AM} y ΦP_{SW} correspondientes a una fase móvil puramente micelar, y a una fase híbrida con un contenido de etanol del 10%. Para poder determinar la concentración de micelas $[M]$, se estimó previamente la cmc (apartado V.2.c). La cmc resultó ser de 4.02×10^{-3} M para la fase móvil puramente micelar, y de 1.06×10^{-3} M para la que contiene un 10% de etanol (Figura V.25).

La representación gráfica de la Ecuación I.2 (Figura V.26) y los valores de K_{AM} (Tabla V.19) indican que los aminocromos son solutos débilmente asociados a las micelas. La baja afinidad por las micelas puede explicarse por el carácter polar e hidrofílico de los aminocromos, y por la repulsión entre las cargas negativas de las micelas y de los dobles iones. Es de esperar, por tanto, que el reparto de los solutos se produzca principalmente entre la seudofase acuosa de la fase móvil y la fase estacionaria. Por otra parte, los bajos valores obtenidos para ΦP_{SW} (Tabla V.19) indican poca afinidad de los aminocromos por la fase estacionaria.

Tanto K_{AM} como ΦP_{SW} aumentan con la hidrofobicidad del aminocromo, indicando una mayor contribución de las interacciones hidrofóbicas en estos solutos. Los coeficientes de correlación obtenidos al representar la Ecuación I.2 también mejoran al aumentar la hidrofobicidad del aminocromo.

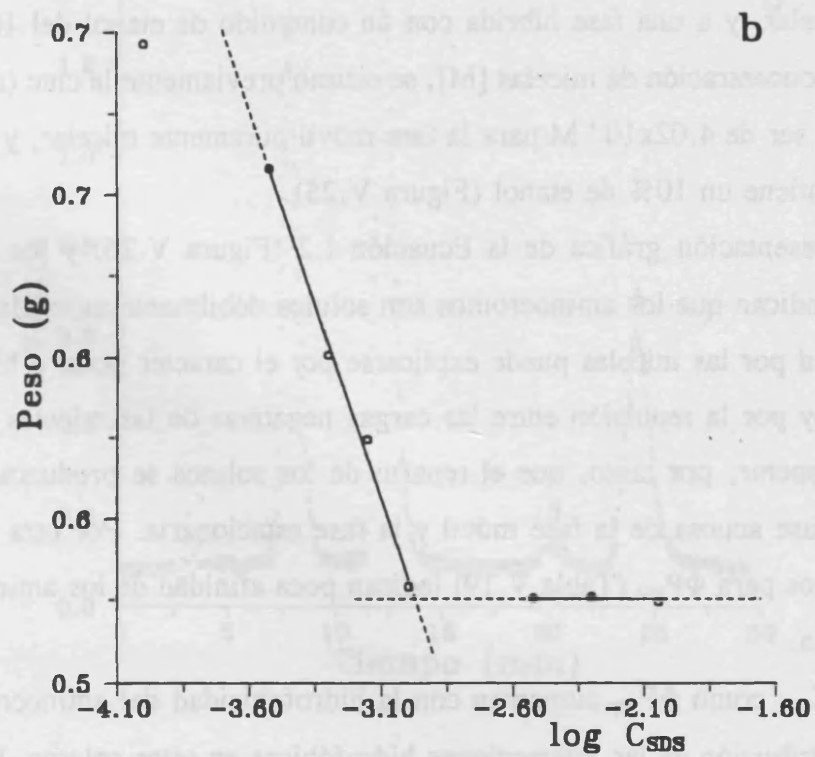
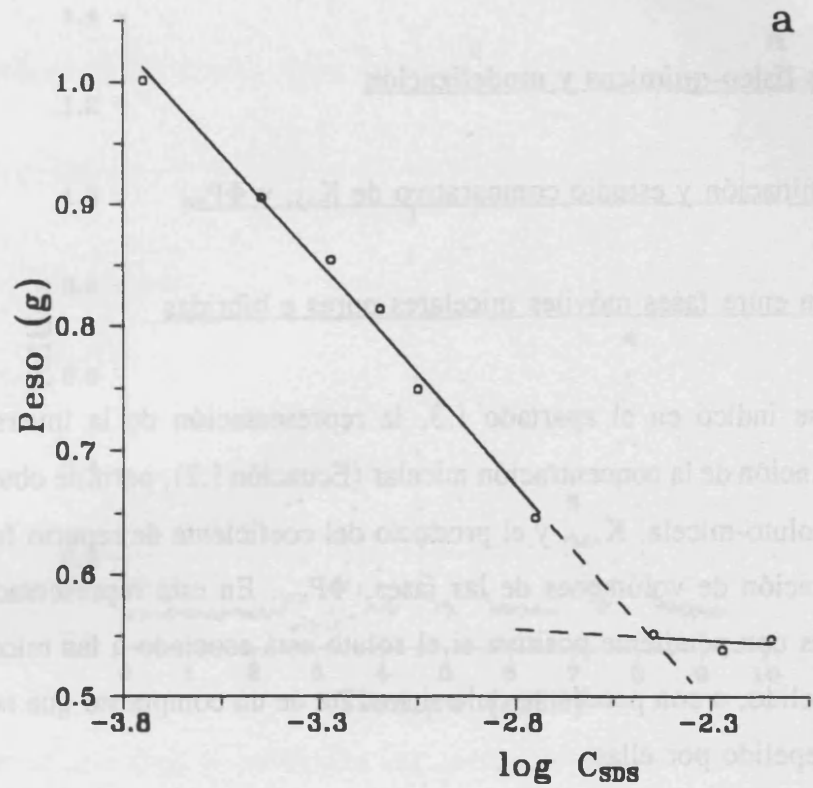


Figura V.25.- Determinación de la cmc: (a) fase móvil micelar pura, (b) fase móvil micelar híbrida con un 10% de etanol.

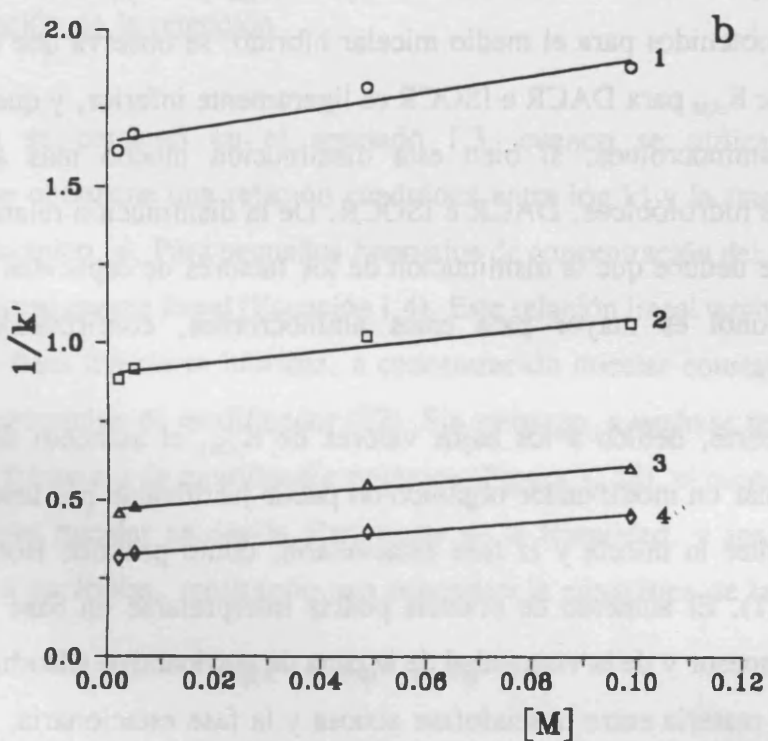
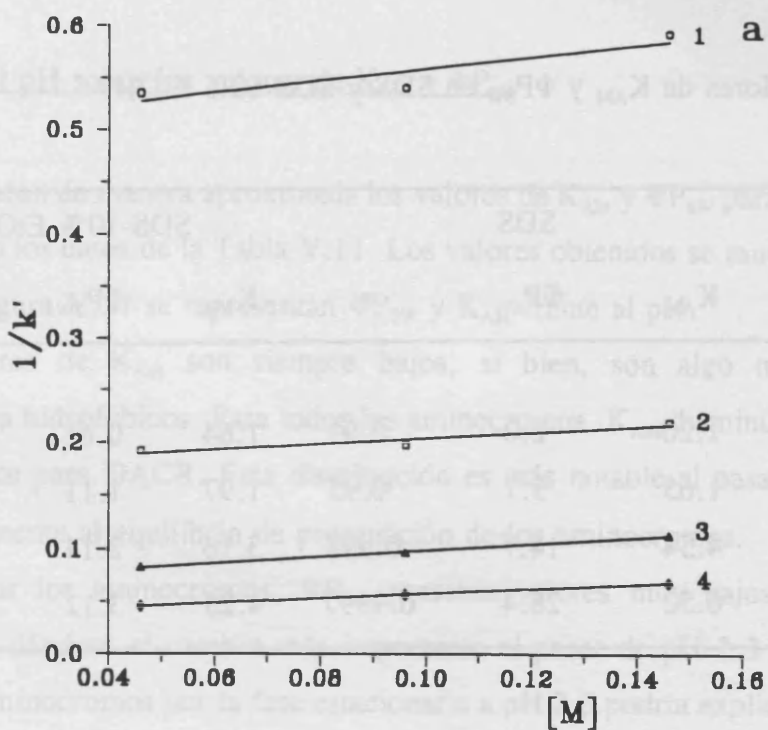


Figura V.26.- Representación de la Ecuación I.2 para los aminocromos en diversas fases móviles tamponadas a pH 4.9: (a) micelar pura, (b) micelar híbrida con 10% de etanol. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

Tabla V.19.- Valores de K_{AM} y ΦP_{sw} en SDS y SDS-10% EtOH.

Aminocromo	SDS			SDS-10% EtOH		
	K_{AM}	ΦP_{sw}	r	K_{AM}	ΦP_{sw}	r
NCR	1.20	2.0	0.91	1.64	0.61	0.96
ACR	1.65	5.7	0.95	1.97	1.11	0.96
DACR	4.54	14.7	0.998	3.16	2.14	0.990
ISOCR	6.52	28.4	0.9997	4.25	3.12	0.991

Si se comparan los valores obtenidos para K_{AM} y ΦP_{sw} en el medio puramente micelar, con los obtenidos para el medio micelar híbrido, se observa que en medio micelar híbrido el valor de K_{AM} para DACR e ISOCR es ligeramente inferior, y que ΦP_{sw} es inferior para todos los aminocromos, si bien esta disminución mucho más acusada para los aminocromos más hidrofóbicos, DACR e ISOCR. De la disminución relativa de los valores de K_{AM} y ΦP_{sw} se deduce que la disminución de los factores de capacidad producida por la presencia de alcohol es mayor para estos aminocromos, confirmando los resultados experimentales.

Por otra parte, debido a los bajos valores de K_{AM} , el aumento de eficacia que se produce al adicionar un modificador orgánico no puede justificarse por una disminución del reparto directo entre la micela y la fase estacionaria, como propone Borgerding para los alquilbencenos (21). El aumento de eficacia podría interpretarse en base a dos hechos: la disminución del espesor y de la viscosidad de la capa de tensioactivo adsorbida, que favorece el intercambio de materia entre la seudofase acuosa y la fase estacionaria, y la disminución de la polaridad de la seudofase acuosa, que incrementa la afinidad por la misma de los aminocromos más hidrofóbicos.

b) - Efecto del pH sobre los valores de K_{AM} y ΦP_{SW}

Se calcularon de manera aproximada los valores de K_{AM} y ΦP_{SW} para diversos valores de pH, utilizando los datos de la Tabla V.11. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla V.20, y en la Figura V.27 se representan ΦP_{SW} y K_{AM} frente al pH.

Los valores de K_{AM} son siempre bajos, si bien, son algo mayores para los aminocromos más hidrofóbicos. Para todos los aminocromos, K_{AM} disminuye al aumentar el pH, especialmente para DACR. Esta disminución es más notable al pasar de pH 2.3 a 3, debido probablemente al equilibrio de protonación de los aminocromos.

Para todos los aminocromos, ΦP_{SW} presenta valores muy bajos y disminuye al aumentar el pH, dándose el cambio más importante al pasar de pH 2.3 a 3.5. La mayor afinidad de los aminocromos por la fase estacionaria a pH 2.3 podría explicarse también por su protonación parcial, que implica la neutralización de su carga negativa.

V.4.2.- Modelización de la retención

Como ya se comentó en el apartado I.3, cuando se utilizan fases móviles hidroorgánicas, se obtiene una relación cuadrática entre $\log k'$ y la fracción en volumen de modificador orgánico, φ . Para pequeños intervalos de concentración del modificador, esta relación es aproximadamente lineal (Ecuación I.4). Esta relación lineal también fue observada por Khaledi para fases micelares híbridas, a concentración micelar constante, para amplios márgenes de concentración de modificador (22). Sin embargo, cuando se representa $\log k'$ de los aminocromos frente a φ de modificador orgánico (Figura V.28), el punto correspondiente a la fase puramente micelar se desvía claramente de la linealidad, y aparecen curvas que pueden ajustarse a parábolas, mostrando una dependencia cuadrática de la forma:

$$\log k' = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad [V.4]$$

donde el término independiente, C , corresponde al logaritmo de k' en una fase móvil puramente micelar (k'_0).

La Ecuación V.4 se ha comprobado para metanol y etanol. En la Tabla V.21 se muestran los coeficientes obtenidos mediante regresión lineal (Ecuación I.3), incluyendo

Tabla V.20.- Influencia del pH sobre los valores de K_{AM} y ΦP_{sw} .

Aminocromo	pH	K_{AM}	ΦP_{sw}
NACR	2.3	5.6	0.9
ACR		6.3	1.7
DACR		13.2	6.5
ISOCR		10.1	5.1
NACR	3.5	2.2	0.7
ACR		1.8	1.1
DACR		7.8	2.5
ISOCR		3.6	3.1
NACR	4.9	2.7	0.6
ACR		3.3	1.1
DACR		4.3	2.2
ISOCR		3.4	3.0
NACR	7.0	0.4	0.6
ACR		0.2	1.0
DACR		1.0	2.0
ISOCR		2.2	2.9

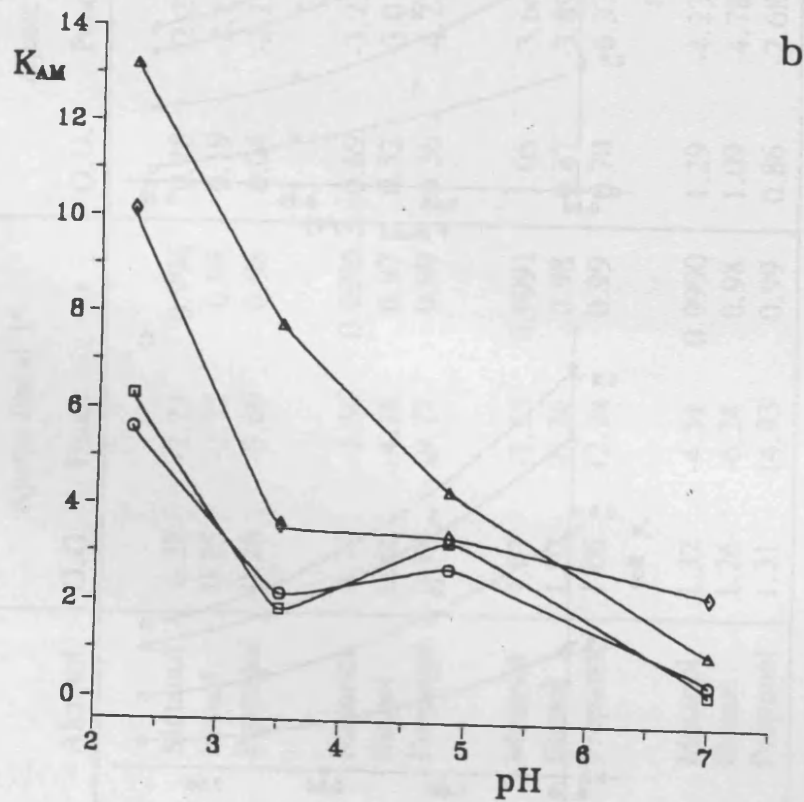
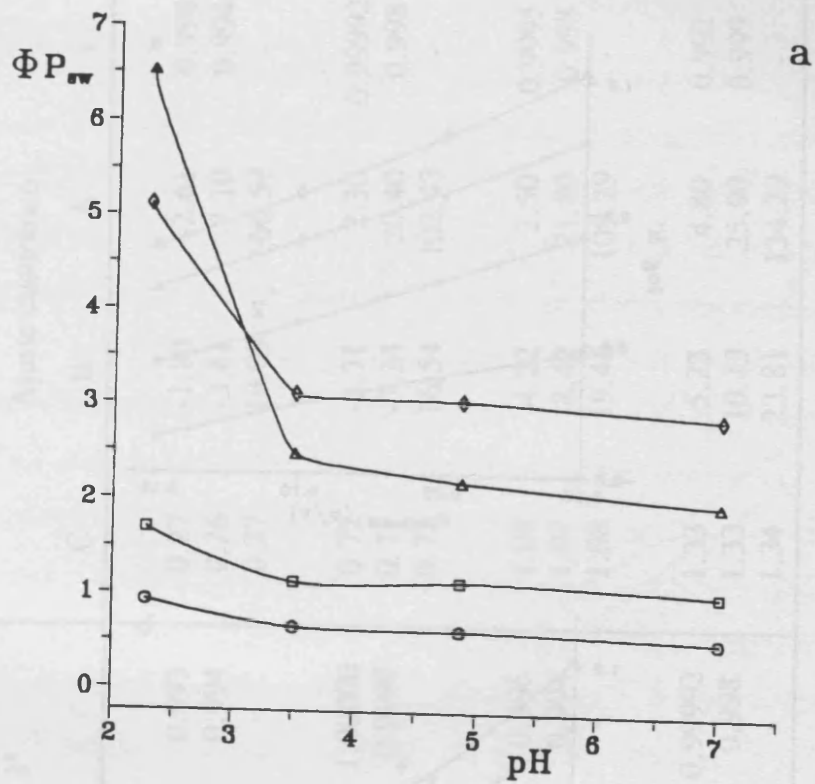


Figura V.27.- Efecto del pH sobre (a) ΦP_{sw} y (b) K_{AM} . (○) NACR, (□), ACR, (Δ) DACR, (◇) ISOCR.

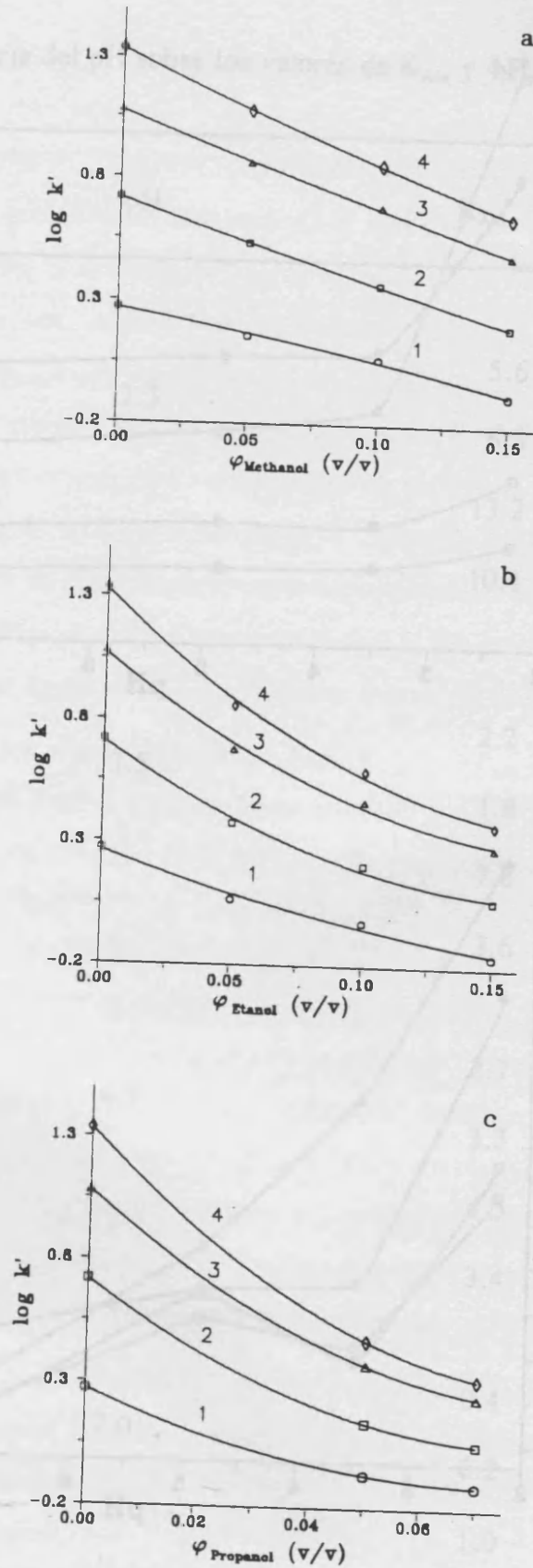


Figura V.28. - Representación de $\log k'$ frente a la concentración de alcohol en tanto por uno.
 (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

Tabla V.21.- Regresión lineal y cuadrática de φ sobre $\log k'$ (Ecuaciones I.3 y V.4).

Compuesto	Alcohol	Ajuste lineal 1 ^a			Ajuste lineal 2 ^b			Ajuste cuadrático			
		O.O.	Pend.	r	O.O.	Pend.	r	C	B	A	r
NACR	Metanol	0.28	-2.21	0.996	0.28	-2.27	0.993	0.27	-1.80	-2.61	0.998
	Etanol	0.25	-2.75	0.98	0.19	-2.23	0.994	0.26	-3.81	7.10	0.994
	Propanol	0.26	-5.69	0.98	0.04	-2.12	-	0.27	10.09	66.57	-
ACR	Metanol	0.71	-3.36	0.9995	0.69	-3.23	1.00000	0.72	-3.71	2.30	0.99992
	Etanol	0.66	-4.18	0.97	0.52	-3.01	0.9990	0.71	-7.24	20.40	0.998
	Propanol	0.70	-9.77	0.99	0.36	-4.27	-	0.72	16.54	102.43	-
DACR	Metanol	1.07	-3.85	0.9991	1.05	-3.66	0.996	1.08	-4.22	2.50	0.9995
	Etanol	1.02	-6.24	0.98	0.87	-3.89	0.994	1.07	-8.42	21.80	0.998
	Propanol	1.06	-12.24	0.99	0.70	-6.37	-	1.08	19.46	109.29	-
ISOCR	Metanol	1.32	-4.51	0.9990	1.29	-4.23	0.99992	1.33	-5.23	4.80	0.992
	Etanol	1.26	-6.24	0.98	1.09	-4.78	0.998	1.33	10.13	25.90	0.999
	Propanol	1.31	-14.93	0.99	0.86	-7.68	-	1.34	23.81	134.29	-

^a Se incluye el punto $\varphi = 0$.

^b No se incluye el punto $\varphi = 0$.

todos los puntos y excluyendo el correspondiente a la fase micelar pura, y los obtenidos mediante regresión cuadrática (Ecuación V.4). La regresión lineal con todos los puntos tan sólo es satisfactoria para metanol.

La pendiente de las rectas de regresión, cambiada de signo, es la fuerza eluyente de Snyder. Puede observarse que la fuerza eluyente aumenta con la hidrofobicidad del alcohol, y para un alcohol determinado con la hidrofobicidad del aminocromo.

En la Tabla V.22 se muestran los valores de k'_0 experimentales y calculados a partir de los ajustes. Los ajustes lineales predicen valores de k'_0 inferiores a los experimentales. Las desviaciones no son superiores al 3% para el metanol y oscilan entre el 6 y el 16% para los otros alcoholes cuando se incluyen todos los puntos y, alcanzan valores del 43% para etanol y del 66% para propanol cuando se excluye el punto $\varphi = 0$. Los ajustes cuadráticos dan errores inferiores al 2%. Curiosamente, si se representa la diferencia entre los logaritmos de los valores de k'_0 experimentales y los calculados mediante ajuste lineal excluyendo el punto $\varphi = 0$, frente al número de átomos de carbono del alcohol se obtiene una relación lineal (Figura V.29).

Tabla V.22.- Diferencias entre valores de k'_0 predichos por regresión lineal y cuadrática y experimentales.

Aminocromo	Alcohol	$k'_{0, \text{exp}}$	Lineal* $k'_{0, \text{cal}}$	Lineal $k'_{0, \text{cal}}$	Parabólico $k'_{0, \text{cal}}$
NACR	Metanol		1.92	1.88	1.86
	Etanol	1.87	1.54	1.76	1.84
	Propanol		1.10	1.82	-
ACR	Metanol		4.95	5.13	5.20
	Etanol	5.21	3.33	4.56	5.13
	Propanol		2.29	5.00	-
DACR	Metanol		11.2	11.8	11.9
	Etanol	12.0	7.42	10.4	11.8
	Propanol		5.00	11.5	-
ISOCR	Metanol		19.5	21.0	21.6
	Etanol	21.6	12.3	18.3	21.2
	Propanol		7.3	20.5	-

* Sin incluir el punto correspondiente a $\varphi = 0$.

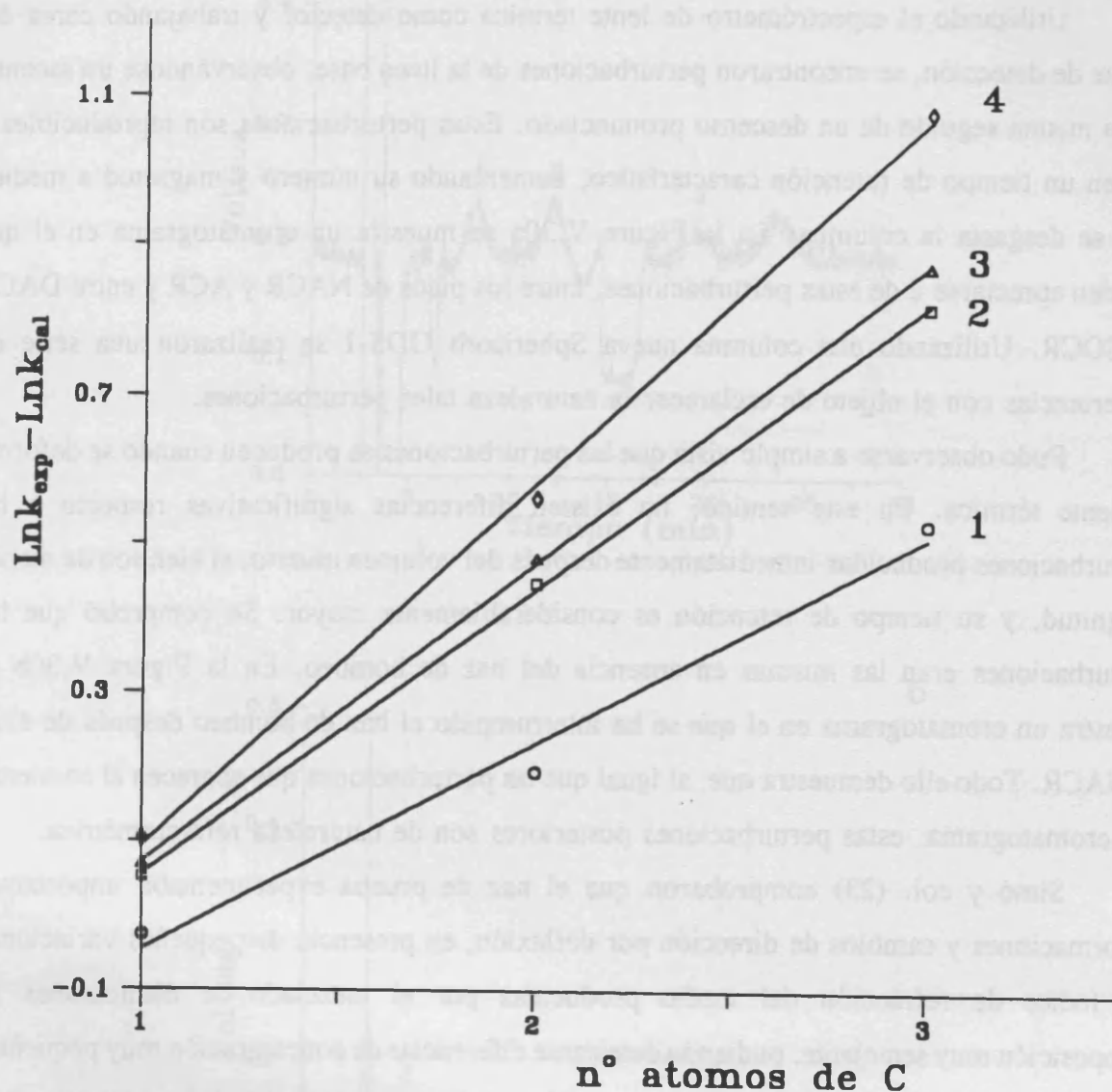


Figura V.29.- Representación de la diferencia entre los logaritmos de k' experimentales y calculados frente al número de átomos de carbono del alcohol.

V.5.- Ruido de Schlieren

Utilizando el espectrómetro de lente térmica como detector y trabajando cerca del límite de detección, se encontraron perturbaciones de la línea base, observándose un ascenso de la misma seguido de un descenso pronunciado. Estas perturbaciones son reproducibles y tienen un tiempo de retención característico, aumentando su número y magnitud a medida que se desgasta la columna. En la Figura V.30a se muestra un cromatograma en el que pueden apreciarse 2 de estas perturbaciones, entre los picos de NACR y ACR y entre DACR e ISOCR. Utilizando una columna nueva Spherisorb ODS-1 se realizaron una serie de experiencias con el objeto de esclarecer la naturaleza tales perturbaciones.

Pudo observarse a simple vista que las perturbaciones se producen cuando se deforma la lente térmica. En este sentido, no existen diferencias significativas respecto a las perturbaciones producidas inmediatamente después del volumen muerto, si bien son de menor magnitud, y su tiempo de retención es considerablemente mayor. Se comprobó que las perturbaciones eran las mismas en ausencia del haz de bombeo. En la Figura V.30b se muestra un cromatograma en el que se ha interrumpido el haz de bombeo después de eluir el NACR. Todo ello demuestra que, al igual que las perturbaciones que aparecen al comienzo del cromatograma, estas perturbaciones posteriores son de naturaleza refractométrica.

Simó y col. (23) comprobaron que el haz de prueba experimentaba importantes deformaciones y cambios de dirección por deflexión, en presencia de pequeñas variaciones del índice de refracción del medio producidas por el mezclado de disoluciones de composición muy semejante, pudiendo detectarse diferencias de concentración muy pequeñas. Las inhomogeneidades en el índice de refracción producen importantes deformaciones en el perfil y dirección de los haces láser. El efecto se conoce como "óptica de Schlieren". Su posible aprovechamiento analítico ha sido estudiado por Wu y Pawliszyn (24).

Se registraron los cromatogramas correspondientes a inyecciones de diferentes fases móviles modificadas, y se compararon con el cromatograma obtenido al inyectar fase móvil sin modificar. Las modificaciones fueron las siguientes: ausencia de SDS, dilución de la fase móvil al 90%, adición de NaClO_4 sólido, adición de LiNO_3 sólido, y adición de una pequeña cantidad de KCl sólido compatible con la disolución de SDS. Asimismo, se registró el cromatograma correspondiente a la inyección de una disolución de la misma composición de

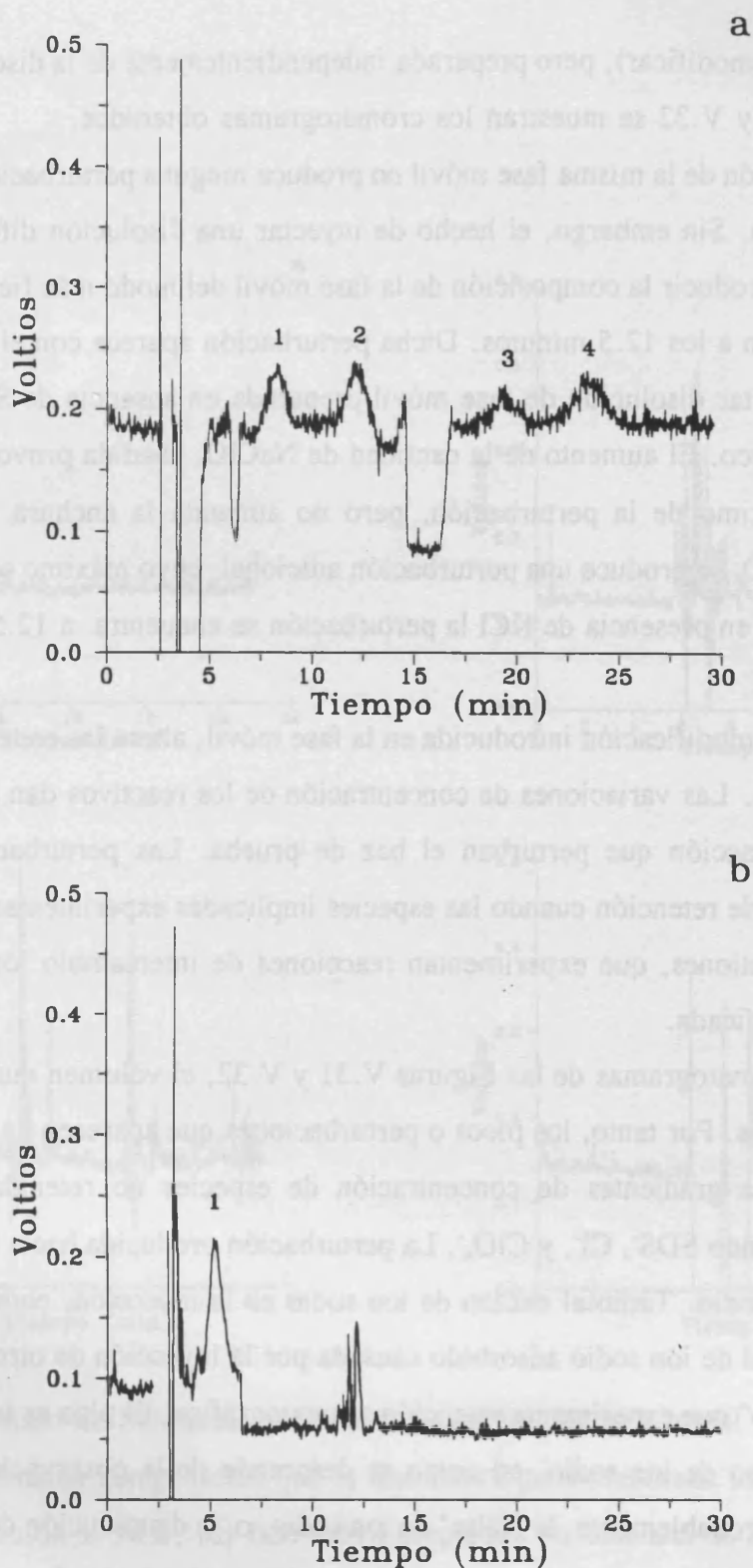


Figura V.30.- Ruido de Schlieren: (a) Columna vieja mostrando dos perturbaciones, a los 6 y a los 15-16 min. (b) Perturbación obtenida en una columna nueva (entre los 12-13 min) habiéndose interrumpido el haz de bombeo tras la elución del NACR. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

la fase móvil (sin modificar), pero preparada independientemente de la disolución madre. En las Figuras V.31 y V.32 se muestran los cromatogramas obtenidos.

La inyección de la misma fase móvil no produce ninguna perturbación de la línea base del cromatograma. Sin embargo, el hecho de inyectar una disolución diferente, pero en la que se intentó reproducir la composición de la fase móvil del modo más fiel posible dió lugar a una perturbación a los 12.5 minutos. Dicha perturbación aparece con el mismo tiempo de retención al inyectar disolución de fase móvil preparada en ausencia de SDS y con adición de perclorato sódico. El aumento de la cantidad de NaClO_4 añadida provoca un aumento de la altura del máximo de la perturbación, pero no aumenta la anchura de la misma. En presencia de LiNO_3 se produce una perturbación adicional, cuyo máximo se encuentra a 25.9 min. Finalmente, en presencia de KCl la perturbación se encuentra a 12.5 min, como en el caso del NaClO_4 .

Cualquier modificación introducida en la fase móvil, altera las concentraciones de los diversos reactivos. Las variaciones de concentración de los reactivos dan lugar a gradientes de índice de refracción que perturban el haz de prueba. Las perturbaciones aparecen a diversos tiempos de retención cuando las especies implicadas experimentan retención, como sucede con los cationes, que experimentan reacciones de intercambio iónico sobre la fase estacionaria modificada.

En los cromatogramas de las Figuras V.31 y V.32, el volumen muerto debe situarse hacia los 6 minutos. Por tanto, los picos o perturbaciones que aparecen en la región 6-8 min deben atribuirse a gradientes de concentración de especies no retenidas o escasamente retenidas, incluyendo SDS^- , Cl^- , y ClO_4^- . La perturbación producida hacia los 12.5 min debe atribuirse al ion sodio. Tanto el exceso de ion sodio en la inyección, como la desorción de una cierta cantidad de ion sodio adsorbido causada por la inyección de otro catión genera un "pico de ion sodio" que experimenta retención cromatográfica. El pico es tanto mayor cuanto mayor es el exceso de ion sodio, tal como se desprende de la observación de las Figuras V.32a y V.32b. Probablemente, la "falta" de ion sodio, o la disminución de la concentración del mismo en un momento dado, también desorbe sodio de la fase estacionaria, y la perturbación experimenta el mismo retraso cromatográfico que la mostrada por el exceso de ion sodio (Figuras V.31c y V.31d.)

Es interesante observar cómo la inyección de LiCl da lugar a una nueva perturbación a un tiempo de 23-25 minutos (Figura V.32c). Es lógico pensar que el Li^+ experimente un

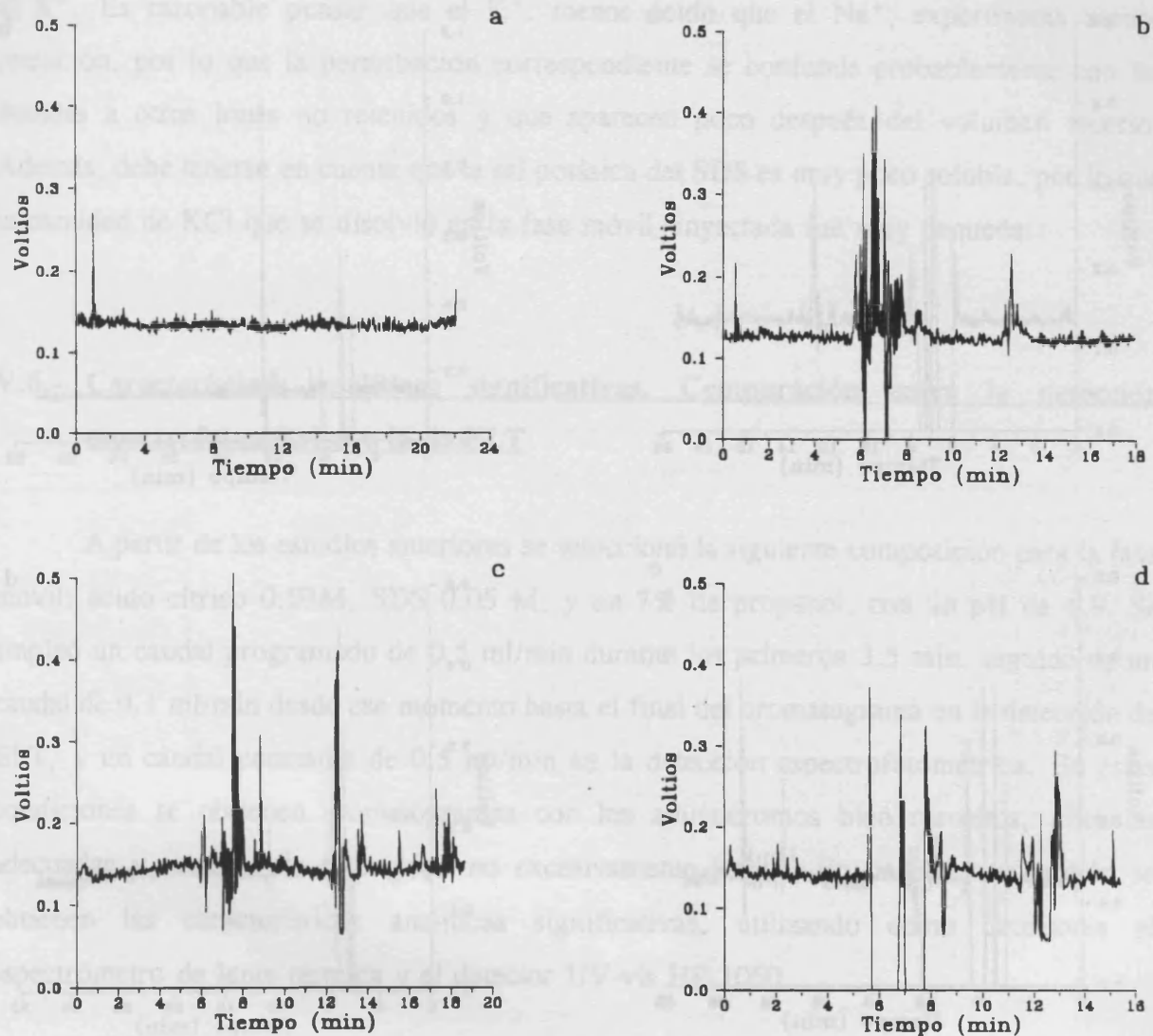


Figura V.31.- Ruido de Schlieren obtenido al inyectar: (a) fase móvil en fase móvil, (b) disolución de la misma composición que la fase móvil pero preparada independientemente, (c) fase móvil diluida al 90%, (d) fase móvil preparada en ausencia de SDS.

la fase móvil (sin modificar), pero preparada independientemente de la dilución de agua. En las Figuras V.31 y V.32 se muestran los cromatogramas obtenidos.

La inyección de la muestra fase móvil no produce ninguna perturbación de la línea base del cromatograma. Sin embargo, el hecho de inyectar una dilución diferente, pero en la que se mantuvo constante la concentración de la fase móvil, sí produce un ruido que

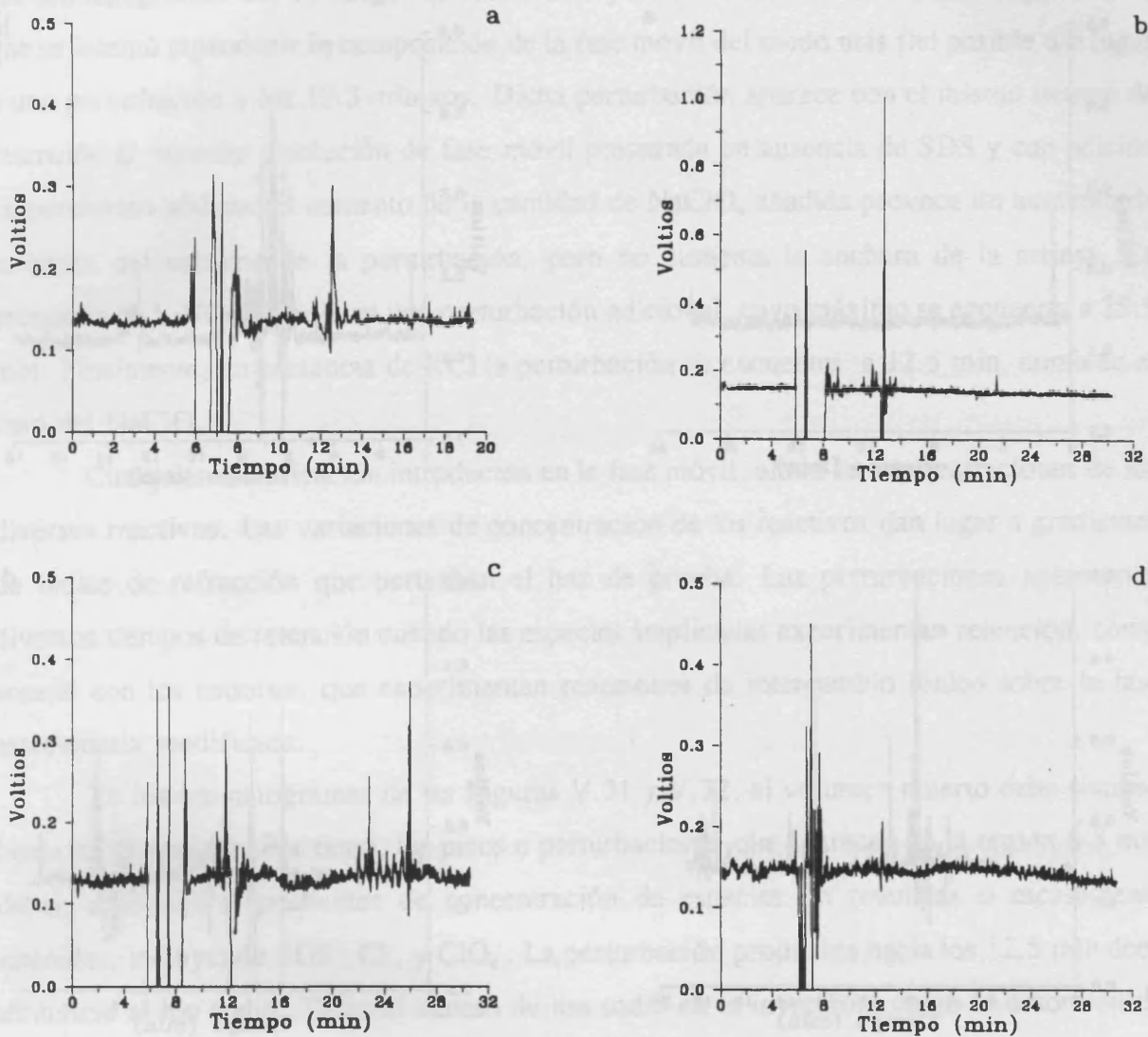


Figura V.32.- Ruido de Schlieren obtenido al inyectar: (a) fase móvil + NaClO_4 sólido, (b) fase móvil + NaClO_4 sólido en mayor concentración, (c) fase móvil + LiNO_3 sólido, (d) fase móvil + KCl sólido.

debe ser un momento dado, cuando se inyecta una muestra, y el ruido que se produce en el momento de la inyección es el que se muestra en los cromatogramas (Figuras V.31c y V.32d).

En la Figura V.32c se muestra cómo la inyección de LiCl da lugar a una mayor perturbación a un tiempo de 23-25 minutos (Figura V.32c). Es lógico pensar que al LiCl experimenta un

tiempo de retención mas largo a causa de su mayor acidez. El pico del sodio sigue presente, probablemente a causa de la desorción de Na^+ causada por el Li^+ . Lo mismo sucede cuando se adiciona K^+ (Figura V.32d). Sin embargo, en este último caso no aparece un pico debido al K^+ . Es razonable pensar que el K^+ , menos ácido que el Na^+ , experimenta menor retención, por lo que la perturbación correspondiente se confunde probablemente con las debidas a otros iones no retenidos y que aparecen poco después del volumen muerto. Además, debe tenerse en cuenta que la sal potásica del SDS es muy poco soluble, por lo que la cantidad de KCl que se disolvió en la fase móvil inyectada fué muy pequeña.

V.6.- Características analíticas significativas. Comparación entre la detección espectrofotométrica y la de ELT

A partir de los estudios anteriores se seleccionó la siguiente composición para la fase móvil: ácido cítrico 0.03M, SDS 0.05 M, y un 7% de propanol, con un pH de 4.9. Se empleó un caudal programado de 0.5 ml/min durante los primeros 3.5 min, seguido de un caudal de 0.1 ml/min desde ese momento hasta el final del cromatograma en la detección de ELT, y un caudal constante de 0.5 ml/min en la detección espectrofotométrica. En estas condiciones se obtienen cromatogramas con los aminocromos bien resueltos, eficacias adecuadas y tiempos de retención no excesivamente largos. En la presente sección se obtienen las características analíticas significativas, utilizando como detectores el espectrómetro de lente térmica y el detector UV-vis HP-1050.

a) - Curvas de calibrado

Los aminocromos se formaron introduciendo en aforados de 25 ml los reactivos siguientes: 2.5 ml de tampón citrato 0.35 M de pH 7, 1 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 M, y entre 0 y 5 ml de disolución de catecolaminas de diversas concentraciones. Se dejó transcurrir 1 min para completar la reacción de oxidación, se añadieron 6 gotas de ácido cítrico 4 M y 1.75 ml de propanol, aforándose con agua. La concentración de las disoluciones de catecolaminas varió entre 1×10^{-7} M y 5×10^{-6} M cuando se utilizó la detección fototérmica, y entre 1.5×10^{-6} M y 8×10^{-6} M cuando se utilizó la detección espectrofotométrica.

Las curvas de calibrado obtenidas mediante espectroscopía de lente térmica se muestran en las Figuras V.33 y V.34. Los calibrados son siempre lineales, tanto si se representa el área del pico en Vxs, como si se representa la altura de pico en V frente a la concentración en todo el intervalo de concentraciones estudiado (1×10^{-7} - 5×10^{-6} M). Las curvas de calibrado obtenidas con el detector espectrofotométrico también fueron lineales. En las Tablas V.23 y V.24 se muestran los parámetros de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados, así como los coeficientes de correlación. Tanto en áreas como en alturas, las pendientes resultan similares, aunque son algo más bajas para DACR e ISO CR.

Tabla V.23.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas mediante detección por espectrometría de lente térmica^a.

Aminocromo	Áreas		Alturas	
	O.Origen (Vxs)	Pendiente (Vxsxlmol ⁻¹)	O.Origen (V)	Pendiente (Vxlmol ⁻¹)
NACR	-1.508	1.657×10^7	-0.007	3.084×10^5
ACR	-2.062	1.904×10^7	-0.014	3.132×10^5
DACR	-1.192	9.438×10^6	0.002	1.501×10^5
ISO CR	-2.087	1.342×10^7	0.003	1.593×10^5

^a Valores de r superiores a 0.9995 en todos los casos.

Tabla V.24.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas mediante detección espectrofotométrica^a.

Aminocromo	Áreas		Alturas	
	O.Origen	Pendiente	O.Origen	Pendiente
NACR	-0.474	4.306×10^6	0.027	3.703×10^5
ACR	-0.128	5.251×10^6	0.545	3.772×10^5
DACR	0.097	3.171×10^6	0.003	1.261×10^5
ISO CR	-0.237	4.196×10^6	- 0.007	1.663×10^5

^a Valores de r superiores a 0.9991 en todos los casos.

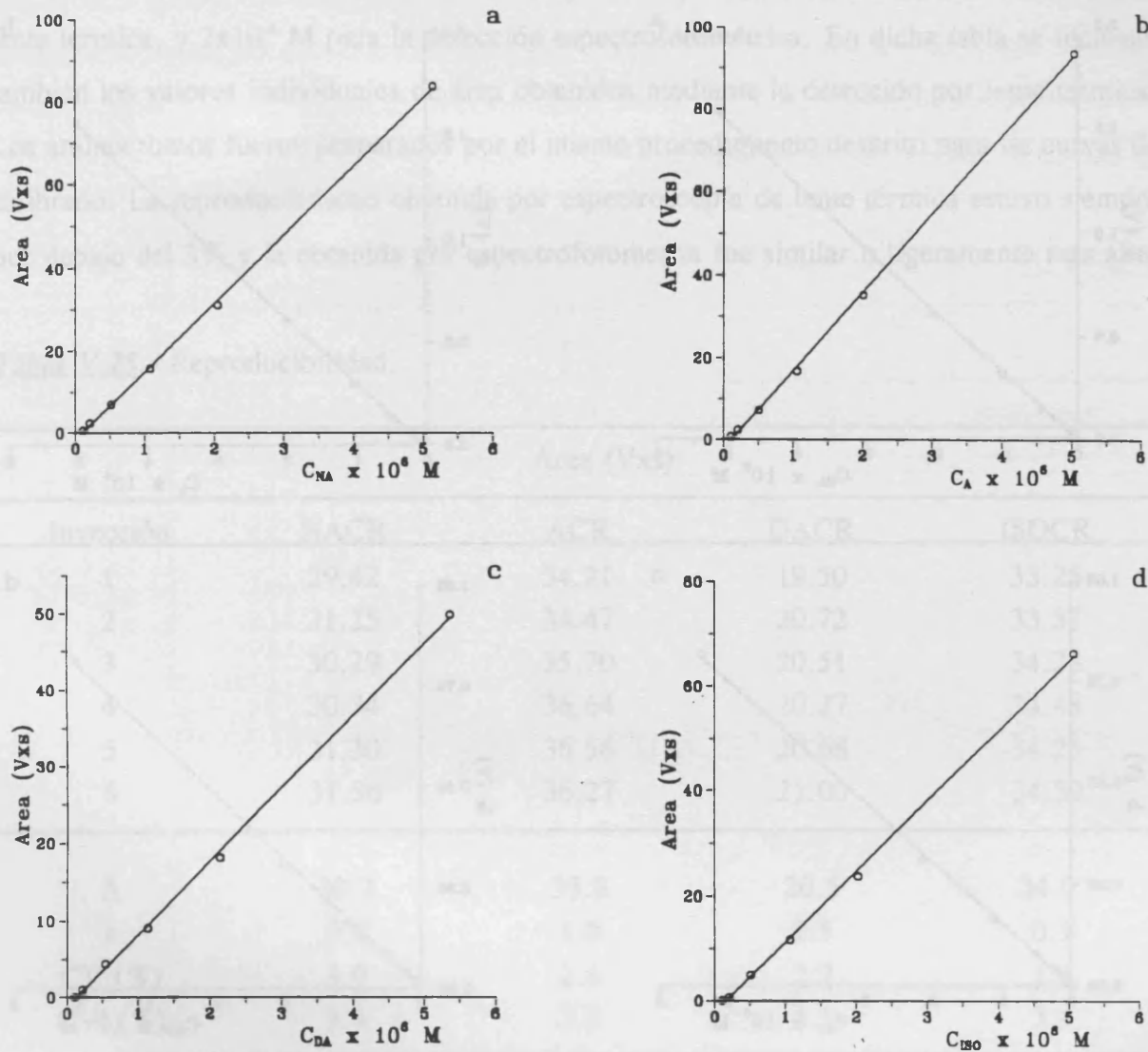


Figura V.33.- Curvas de calibrado en unidades de área. (a) NACR, (b) ACR, (c) DACR, (d) ISOCR.

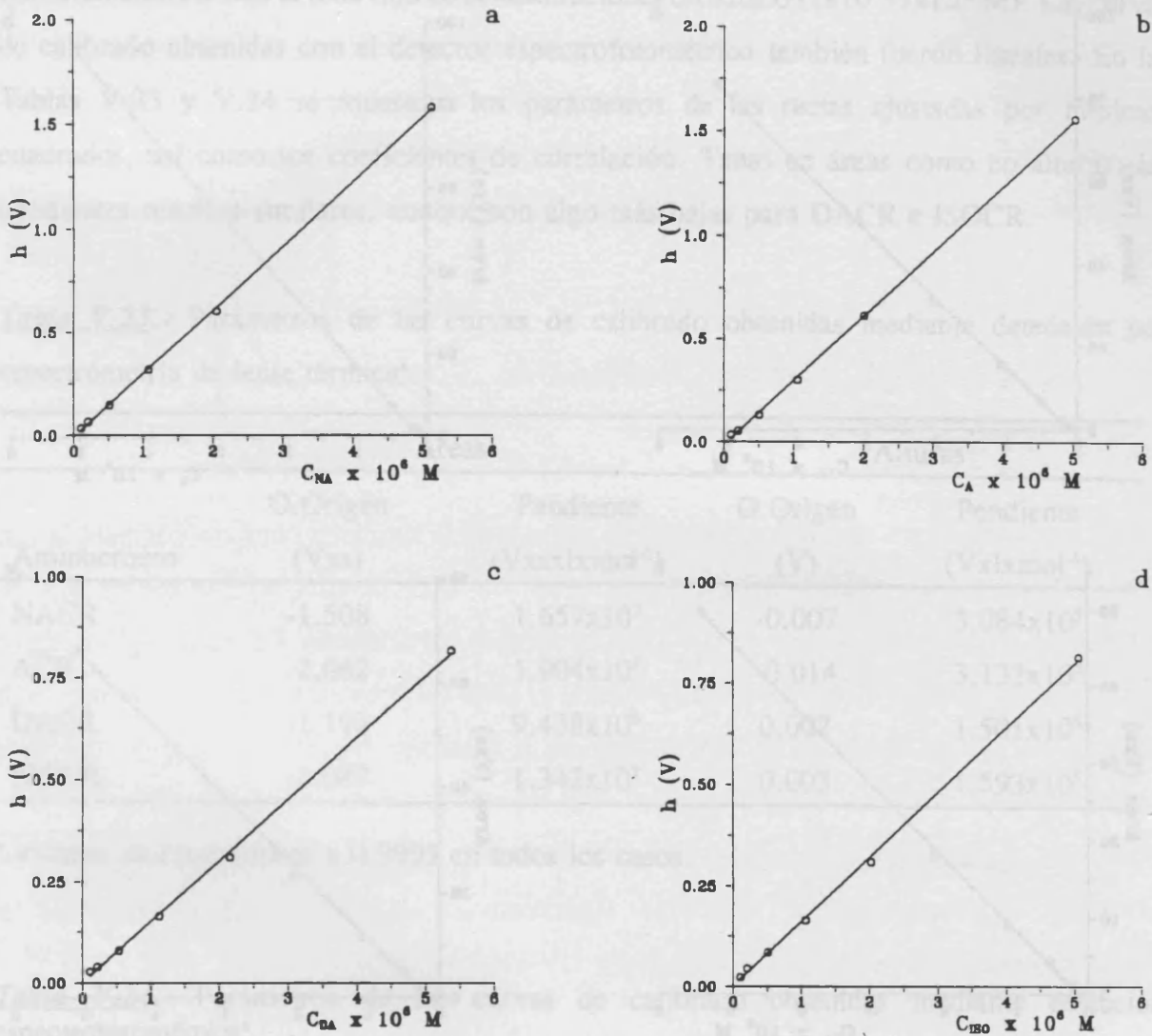


Figura V.34.- Curvas de calibrado en unidades de altura. (a) NACR, (b) ACR, (c) DACR, (d) ISOCR.

NACR	0.3474	4.306×10^7	0.007	3.795×10^8
ACR	0.3123	5.251×10^7	0.045	3.172×10^8
DACR	0.1997	3.171×10^7	0.002	1.261×10^8
ISOCR	0.2237	4.196×10^7	0.007	1.653×10^8

* Valores de r superiores a 0.9991 en todos los casos.

b)- Reproducibilidad

En la Tabla V.25 se muestran los coeficientes de variación obtenidos al inyectar 6 disoluciones independientes de aminocromos en concentración 2×10^{-6} M para la detección por lente térmica, y 2×10^{-6} M para la detección espectrofotométrica. En dicha tabla se incluyen también los valores individuales de área obtenidos mediante la detección por lente térmica. Los aminocromos fueron preparados por el mismo procedimiento descrito para las curvas de calibrado. La reproducibilidad obtenida por espectroscopía de lente térmica estuvo siempre por debajo del 3% y la obtenida por espectrofotometría fue similar o ligeramente más alta.

Tabla V.25.- Reproducibilidad.

Inyección	Area (Vxs)			
	NACR	ACR	DACR	ISOCR
1	29.42	34.21	19.50	33.26
2	31.25	34.47	20.72	33.37
3	30.29	35.70	20.51	34.28
4	30.34	36.64	20.27	34.48
5	31.30	36.56	20.68	34.25
6	31.56	36.27	21.00	34.39
\bar{A}	30.7	35.6	20.5	34.0
s	0.8	1.0	0.5	0.5
CV (%)	3.0	2.6	2.7	1.6
CV ^a (%)	3.4	2.2	4.1	3.4

^a Coeficiente de variación obtenido mediante detección espectrofotométrica

c) - Límites de detección

Los límites de detección se calcularon para una relación señal/ruido de 3. Para ello, se obtuvo el área de los picos correspondientes a una concentración de 1×10^{-7} M para la detección fototérmica y de 2×10^{-7} M para la espectrofotométrica (supuestamente cercanas al

límite de detección) para cada aminocromo en una serie de 10 cromatogramas. En la Figura V.35 se muestra uno de dichos cromatogramas. En la Tabla V.26 se muestran los valores individuales de las áreas y su desviación estándar para la detección fototérmica, y el límite de detección calculado para ambos tipos de detección. Los límites de detección obtenidos mediante detección por lente térmica son unas seis veces menores que los obtenidos mediante detección espectrofotométrica, y son lo suficientemente bajos para permitir la determinación de catecolaminas en fluidos biológicos.

Tabla V.26.- Límites de detección.

Inyección	Area (Vxs)			
	NACR	ACR	DACR	ISOCR
1	1.16	0.92	0.17	1.06
2	0.97	1.13	0.39	1.14
3	1.23	1.22	0.31	1.16
4	1.20	1.27	0.46	0.95
5	1.14	1.05	0.27	1.04
6	1.17	1.09	0.33	1.07
7	1.32	1.08	0.42	0.79
8	1.29	1.21	0.25	0.82
9	1.39	0.78	0.23	0.86
10	1.28	1.30	0.43	1.17
s	0.117	0.161	0.097	0.142
LOD (ng/ml)	3.6	4.6	4.7	6.9
LOD ^a (ng/ml)	22	28	29	41

^a Límites de detección obtenidos mediante detección espectrofotométrica

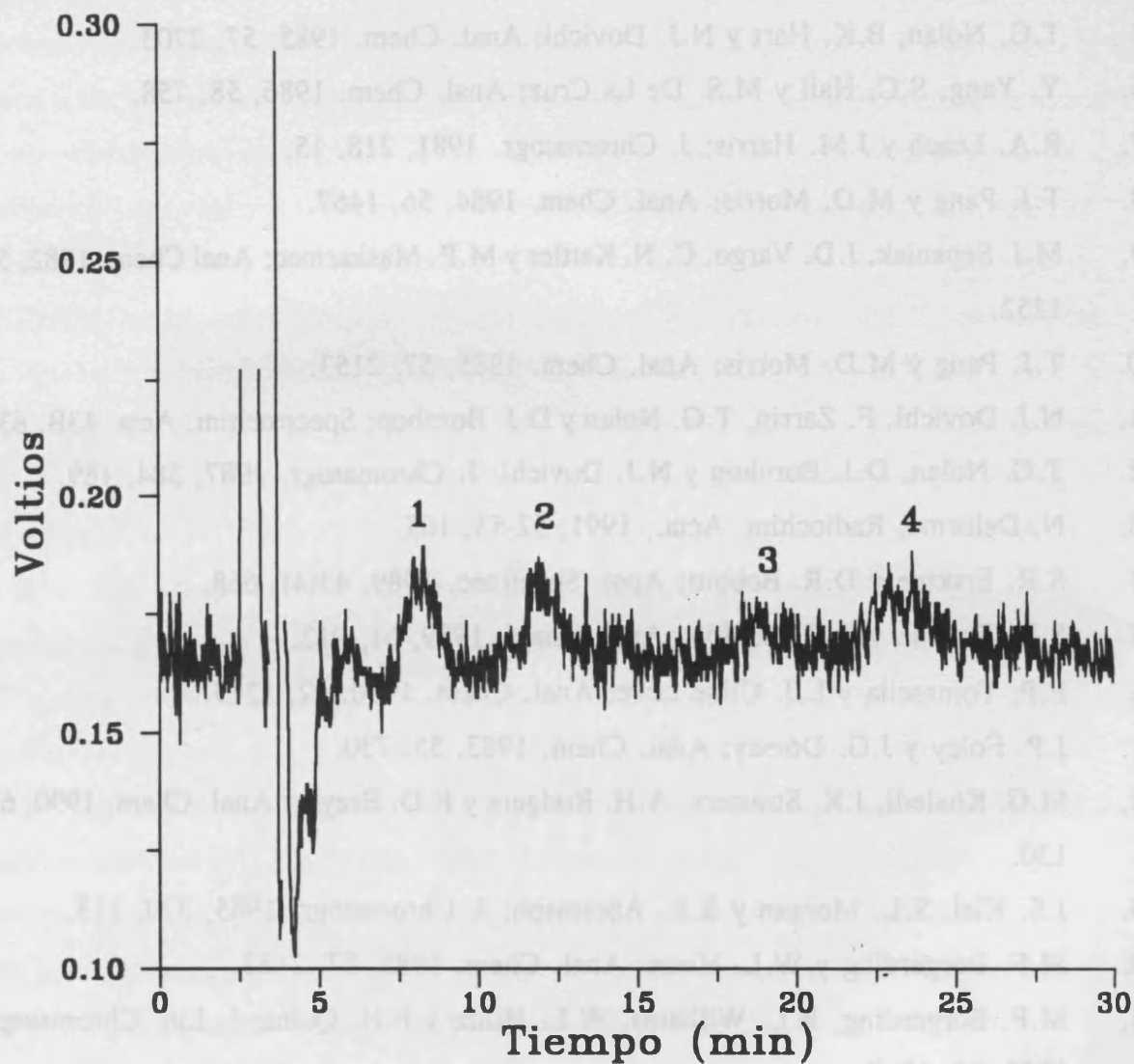


Figura V.35.- Cromatograma utilizado en el cálculo del límite de detección en ELT. Concentración de aminocromo 1×10^{-7} M. (1) NACR, (2) ACR, (3) DACR, (4) ISOCR.

V.7.- Bibliografía

1. N.J. Dovichi y J.M. Harris; Anal. Chem. 1981, 53, 689.
2. W.A. Weimer y N.J. Dovichi; Anal. Chem. 1985, 57, 2436.
3. J. Georges y J.M. Mermet; Analyst 1989, 114, 541.
4. C.E. Buffet y M.D. Morris; Anal. Chem. 1982, 54, 1824.
5. T.G. Nolan, B.K. Hart y N.J. Dovichi; Anal. Chem. 1985, 57, 2703.
6. Y. Yang, S.C. Hall y M.S. De La Cruz; Anal. Chem. 1986, 58, 758.
7. R.A. Leach y J.M. Harris; J. Chromatogr. 1981, 218, 15.
8. T.J. Pang y M.D. Morris; Anal. Chem. 1984, 56, 1467.
9. M.J. Sepaniak, J.D. Vargo, C. N. Kettler y M.P. Maskarinec; Anal Chem. 1982, 56, 1252.
10. T.J. Pang y M.D. Morris; Anal. Chem. 1985, 57, 2153.
11. N.J. Dovichi, F. Zarrin, T.G. Nolan y D.J. Bornhop; Spectrochim. Acta. 43B, 639.
12. T.G. Nolan, D.J. Bornhop y N.J. Dovichi; J. Chromatogr. 1987, 384, 189.
13. N. Delorme; Radiochim. Acta., 1991, 52-53, 105.
14. S.R. Erskine y D.R. Bobbitt; Appl. Spectrosc. 1989, 43(4), 668.
15. S.R. Erskine y D.R. Bobbitt, Anal. Chem. 1989, 61, 912.
16. F.P. Tomasella y L.J. Cline Love; Anal. Chem. 1990, 62, 1315.
17. J.P. Foley y J.G. Dorsey; Anal. Chem. 1983, 55, 730.
18. M.G. Khaledi, J.K. Strasters, A.H. Rodgers y E.D. Breyer; Anal. Chem. 1990, 62, 130.
19. J.S. Kiel, S.L. Morgan y R.K. Abramson; J. Chromatogr. 1985, 320, 313.
20. M.F. Borgerding y W.L. Hinze; Anal. Chem. 1985, 57, 2183. -
23. M.F. Borgerding, R.L. Williams, W.L. Hinze y F.H. Quina; J. Liq. Chromatogr. 1989, 12, 1367.
22. M.G. Khaledi, E. Peuler y J. Ngeh-Ngwainbi; Anal. Chem. 1987, 59, 2738.
23. E.F. Simó Alfonso, Martín Biosca Y., García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; Termochim. Acta 1993, 219, 53.
24. J. Wu y J. Pawliszyn; Anal. Chem. 1992, 64, 2934.

VI.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE CATECOLAMINAS

VI.- CROMATOGRAFIA MICELAR DE CATECOLAMINAS

VI.1.- Introducción

En la determinación por cromatografía líquida de las CAs se han utilizado los siguientes mecanismos de retención: Intercambio iónico (1-3), fase reversa (4-6) y fase reversa con pares iónicos (7-9). La cromatografía de intercambio iónico presenta más inconvenientes que la cromatografía de fase reversa, ya que las columnas son menos estables, y las separaciones menos eficaces y reproducibles que en fase reversa, además de la limitación que supone el número restringido de empaquetamientos disponibles. La cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa se ha hecho muy popular debido a la estabilidad de las columnas, a su capacidad para separar gran cantidad de compuestos, y a su rapidez y eficacia. Molnár y Horváth (10) demostraron en 1976 la aplicabilidad de esta técnica al análisis de CAs, logrando separar una mezcla de A, NA, DA y metabolitos.

Como se deduce a partir de los valores de los logaritmos de las constantes de protonación de A, NA y DA (entre 8.6 y 8.9), a los pHs empleados normalmente con fase reversa, las CAs se encontrarán en forma protonada y por lo tanto su retención es débil. Krstulovich (11) demostró que esto es aún más evidente en el caso de la NA. Un aumento de la fuerza iónica del eluyente por adición de citrato mejora la forma de los picos, ya que facilita el equilibrio protónico sin afectar a la retención.

Las CAs tienen carácter básico y, por tanto, la retención puede aumentarse incrementando el pH del eluyente, sin embargo trabajar en medio alcalino no es aconsejable por las siguientes razones: Las CAs son inestables en dicho medio y los soportes de sílice, que son los normalmente utilizados, son atacados. Por estas razones la cromatografía en fase reversa suele utilizarse con derivatización precolumna de las CAs.

En cromatografía de fase reversa la retención de solutos cargados puede alterarse mediante la adición de surfactantes iónicos a la fase móvil. Esta técnica combina las características favorables de la fase reversa, como son alta resolución y estabilidad de la columna, con las del intercambio iónico. La cromatografía de pares iónicos mejora la separación, ya que permite que se establezcan interacciones de intercambio iónico de los solutos de carga opuesta al tensioactivo utilizado, con la fase estacionaria modificada por la adsorción de tensioactivo.

Wang y col. (12) determinan CAs en orina utilizando una columna HSHP (Hisep shielded hydrophobic phase) y una fase móvil de citrato sódico 0.03 M de pH 4.2 que contiene entre 0.004 y 0.007 M de SDS . Aunque los autores no indiquen explícitamente que se trate de cromatografía micelar, cabe señalar que la concentración de tensioactivo utilizada es ligeramente superior a la cmc, si bien la concentración de micelas es baja.

Omori y col (13) separan NA, A, DA e ISO, utilizando una columna de intercambio catiónico TSK SP-2SW, y una fase móvil que contiene SDS 0.03 M regulada con fosfato 0.05 M a pH 4.6. Utilizando este sistema cromatográfico las CAs eluyen en orden inverso al de hidrofobicidad. Estas dos últimas referencias (12) y (13) son las únicas que hemos encontrado sobre CLM de CAs.

En este capítulo se estudia la elución de las CAs utilizando fases móviles micelares de SDS puras e híbridas. En una primera parte se utilizaron fases móviles sin tamponar, posteriormente se estudió el efecto del pH, y en la última parte se utilizaron fases móviles tamponadas a pH 3. El estudio cromatográfico se realizó para L-dopa (D), 2-metildopa (MD), NA, A, adrenalona (AO), DA e ISO. La estructura de estos compuestos se muestra en la Tabla I.1.

Las CAs poseen un grupo amino, y algunas de ellas (D y MD) poseen también un grupo ácido carboxílico. A los valores de pH utilizados en las fases móviles, el grupo amino se encontrará siempre protonado, mientras que el grupo ácido carboxílico puede encontrarse en forma protonada o desprotonada, dependiendo del pH de la fase móvil. En consecuencia, al utilizar fases móviles micelares de SDS, dependiendo de la composición y del pH de las fases móviles, estos compuestos pueden mostrar comportamientos muy diferentes.

VI.2.- Parte experimental

a) Aparatos

Se emplearon los mismos cromatógrafos que los descritos en V.2.c. Como fase estacionaria se utilizó una columna Spherisorb ODS-2. La longitud de onda de la detección fué de 280 nm y el volumen de inyección de 20 μ l.

b) Reactivos

- Además de las disoluciones de CAs mencionadas en III.2.b, se prepararon en ácido acético 0.1 M, disoluciones de concentración 2×10^{-3} M de AO (pura) y MD (para uso bioquímico), ambas de Fluka.
- Trietilamina de Fluka, purísima.

Para preparar las fases móviles se emplearon los mismos reactivos que en V.2.b, y posteriormente se filtraron como se indica en dicha sección.

c) Procedimientos

El volumen muerto se estimó inyectando agua y midiendo la primera perturbación significativa de la línea base del cromatograma. Los parámetros cromatográficos (factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico) y las cmc se calcularon como se indica en V.2.c. Las disoluciones de CAs a inyectar se prepararon diluyendo con fase móvil.

VI.3.- Comportamiento cromatográfico y optimización**VI.3.1 - Elución de CAs con fases móviles de SDS sin tamponar**

Se estudió el efecto que ejerce la concentración de SDS y la presencia de propanol como modificador sobre el comportamiento cromatográfico de las CAs. En las Tablas VI.1 a VI.7 se muestra la composición de las fases móviles ensayadas, así como los correspondientes valores de los factores de capacidad, eficacia y asimetría de los picos, para cada una de las CAs.

a) Fase móvil micelar no modificada- Influencia de la concentración de SDS

Como puede observarse en la Figura VI.1, las CAs, a excepción de D y MD, presentan factores de capacidad altos, especialmente para las concentraciones bajas de tensioactivo, y para las CAs más hidrofóbicas. La retención desciende notablemente al aumentar la concentración de tensioactivo. Por otra parte, el poder eluyente del tensioactivo es prácticamente la misma para todas las CAs, así por ejemplo, k' disminuye entre el 80% para la noradrenalina y el 82% para la dopamina al variar la concentración de SDS entre 0.035 y 0.15 M.

Los altos valores de los factores de capacidad y la elevada fuerza eluyente del tensioactivo, indican que las CAs tienen gran afinidad tanto por la fase estacionaria como por la seudofase micelar en la fase móvil. De hecho, los valores de K_{AM} y ΦP_{sw} son elevados, como puede verse en las Tablas VI.26 y VI.27.

El D y el MD eluyen siempre cerca del volumen muerto. Ello es debido a que estas CAs poseen un grupo ácido carboxílico que se encuentra desprotonado al pH de la fase móvil (≈ 6.9), y por consiguiente, son repelidas electrostáticamente tanto por los monómeros de SDS adsorbidos en la fase estacionaria como por las micelas. Sin embargo, estas dos CAs se comportan como solutos ligeramente asociados a la micela, como lo indica el hecho de que la retención disminuye al aumentar la concentración de SDS. Esta asociación debe atribuirse al efecto de las fuerzas hidrofóbicas.

Las eficacias (Figura VI.1b) alcanzan su máximo valor para una concentración de SDS de 0.05 M, excepto para la DA que presenta la máxima eficacia para la menor concentración de SDS. Por otra parte, las aminas primarias, DA y NA, presentan valores de eficacia mayores y asimetrías de pico menores que las secundarias. Especialmente, la AO, presenta eficacias muy bajas y asimetrías de pico muy altas para todas las concentraciones de tensioactivo estudiadas.

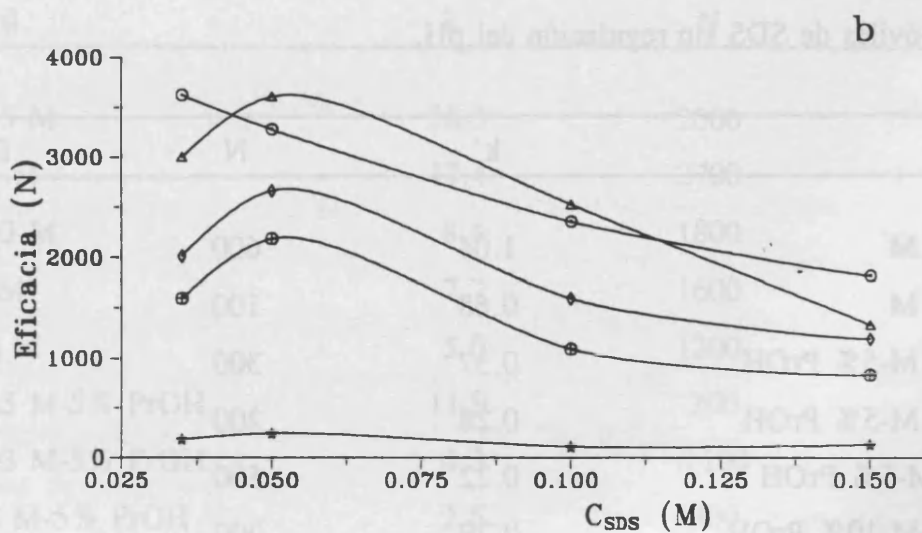
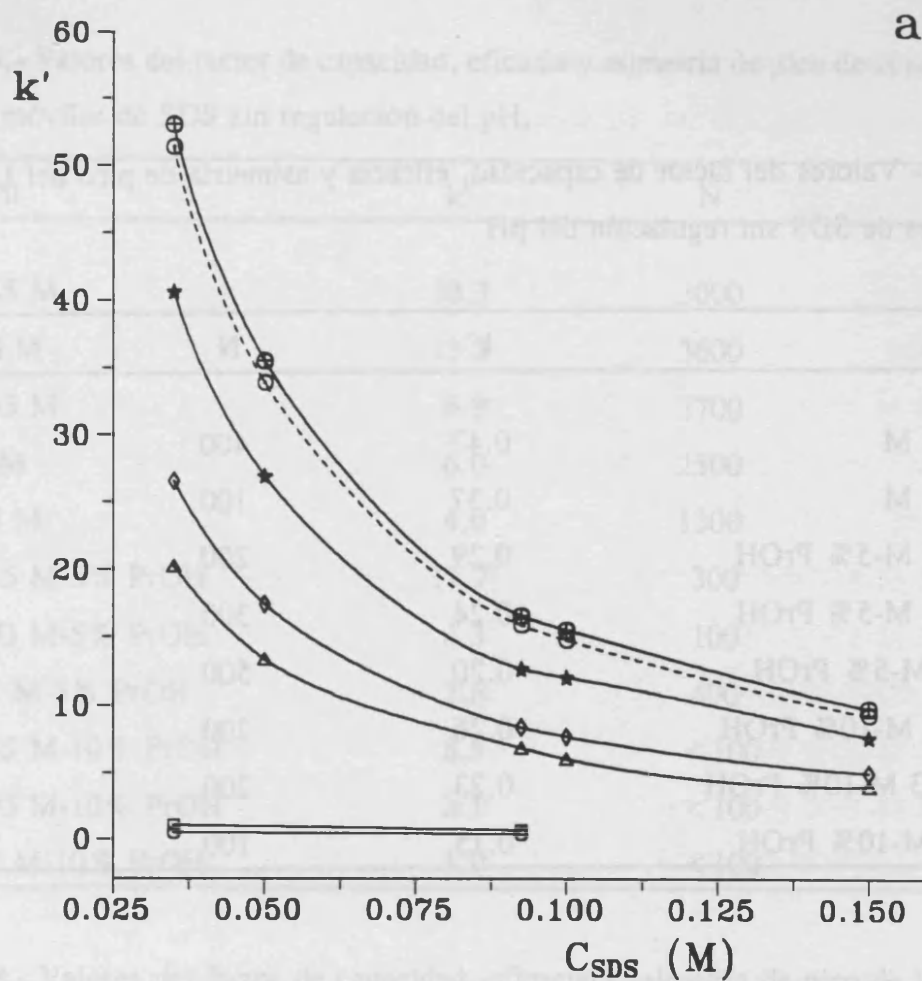


Figura VI.1.- Efecto de la concentración de SDS sobre el factor de capacidad (a) y la eficacia (b) para fases móviles micelares puras sin tamponar. (○) D, (□) MD, (△) NA, (◇) A, (★) AO, (⊙) DA, (⊕) ISO.

Tabla VI.1.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico del L-dopa para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	0.47	400	2.8
SDS 0.093 M	0.37	100	4.3
SDS 0.035 M-5% PrOH	0.29	200	2.7
SDS 0.093 M-5% PrOH	0.24	300	3.2
SDS 0.15 M-5% PrOH	0.20	500	2.2
SDS 0.035 M-10% PrOH	0.26	200	3.0
SDS 0.0923 M-10% PrOH	0.23	200	3.7
SDS 0.15 M-10% PrOH	0.15	100	3.6

Tabla VI.2.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico del 2-metildopa para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	1.04	600	2.0
SDS 0.093 M	0.68	100	3.5
SDS 0.035 M-5% PrOH	0.37	300	2.7
SDS 0.093 M-5% PrOH	0.28	200	3.3
SDS 0.15 M-5% PrOH	0.22	500	2.0
SDS 0.035 M-10% PrOH	0.29	200	3.0
SDS 0.093 M-10% PrOH	0.24	200	3.4
SDS 0.15 M-10% PrOH	0.16	100	4.0

Tabla VI.3.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la noradrenalina para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	20.3	3000	1.7
SDS 0.05 M	13.3	3600	1.1
SDS 0.093 M	6.9	2700	1.4
SDS 0.1 M	6.0	2500	1.4
SDS 0.15 M	4.0	1300	1.7
SDS 0.035 M-5% PrOH	11.7	300	6.7
SDS 0.093 M-5% PrOH	4.3	100	6.5
SDS 0.15 M-5% PrOH	2.6	400	3.2
SDS 0.035 M-10% PrOH	8.5	< 100	9.1
SDS 0.093 M-10% PrOH	3.1	< 100	10.0
SDS 0.15 M-10% PrOH	1.9	< 100	11.9

Tabla VI.4.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la adrenalina para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	26.5	2000	2.1
SDS 0.05 M	17.4	2700	1.4
SDS 0.093 M	8.4	1800	1.6
SDS 0.1 M	7.7	1600	1.6
SDS 0.15 M	5.0	1200	1.7
SDS 0.035 M-5% PrOH	11.9	200	7.5
SDS 0.093 M-5% PrOH	4.3	< 100	7.9
SDS 0.15 M-5% PrOH	2.6	300	3.5
SDS 0.035 M-10% PrOH	8.2	< 100	11.5
SDS 0.093 M-10% PrOH	3.1	< 100	12.5
SDS 0.15 M-10% PrOH	1.9	~ 0	13.5

Tabla VI.5.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la adrenalona para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	40.6	200	6.2
SDS 0.05 M	26.9	200	4.3
SDS 0.093 M	12.7	100	7.2
SDS 0.1 M	12.1	100	7.2
SDS 0.15 M	7.7	100	4.8
SDS 0.035 M-5% PrOH	22.5	< 100	7.5
SDS 0.093 M-5% PrOH	7.4	~ 0	10.3
SDS 0.15 M-5% PrOH	3.9	~ 0	11.5
SDS 0.035 M-10% PrOH	13.0	200	8.4
SDS 0.093 M-10% PrOH	5.9	~ 0	8.0
SDS 0.15 M-10% PrOH	3.1	~ 0	17.4

Tabla VI.6.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la dopamina para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	51.4	3600	1.3
SDS 0.05 M	33.9	3300	1.3
SDS 0.093 M	15.9	2500	1.4
SDS 0.1 M	14.8	2400	1.4
SDS 0.15 M	9.3	1800	1.5
SDS 0.035 M-5% PrOH	20.6	1700	2.6
SDS 0.093 M-5% PrOH	7.1	800	3.0
SDS 0.15 M-5% PrOH	4.1	1200	1.9
SDS 0.035 M-10% PrOH	12.5	900	3.9
SDS 0.093 M-10% PrOH	4.8	100	6.8
SDS 0.15 M-10% PrOH	2.9	< 100	9.4

Tabla VI.7.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la isoprenalina para fases móviles de SDS sin regulación del pH.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.035 M	53.1	1600	2.1
SDS 0.05 M	35.5	2200	1.6
SDS 0.093 M	16.6	1300	1.9
SDS 0.1 M	15.5	1100	2.0
SDS 0.15 M	9.8	800	2.0
SDS 0.035 M-5% PrOH	19.0	300	6.9
SDS 0.093 M-5% PrOH	6.8	< 100	9.5
SDS 0.15 M-5% PrOH	3.8	200	3.6
SDS 0.035 M-10% PrOH	11.4	100	11.7
SDS 0.093 M-10% PrOH	4.4	< 100	12.9
SDS 0.15 M-10% PrOH	2.6	< 100	12.1

b) - Fase móvil micelar híbrida

- Influencia de la concentración de SDS

Cuando se utilizan fases móviles micelares modificadas con propanol, un aumento de la concentración de SDS produce una disminución importante de los factores de capacidad. Las variaciones son prácticamente iguales para todas las CAs (Figura VI.2).

La presencia de propanol atenúa ligeramente el poder eluyente del tensioactivo, ya que en presencia de propanol las disminuciones relativas de los factores de capacidad al aumentar la concentración de SDS son menores que en medio micelar puro. Estas disminuciones relativas son prácticamente las mismas para las dos concentraciones de propanol utilizadas, en torno a un 80% para todas las CAs, cuando la concentración de SDS varía entre 0.035 y 0.15 M. Con fases móviles micelares híbridas, todas las CAs presentan siempre eficacias muy bajas y asimetrías de pico muy altas, excepto en algunos casos para

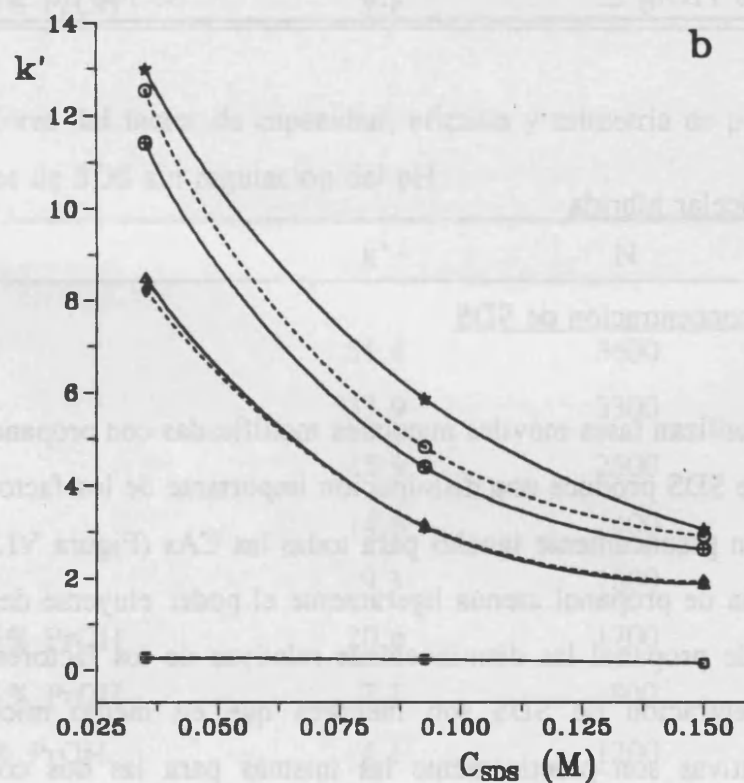
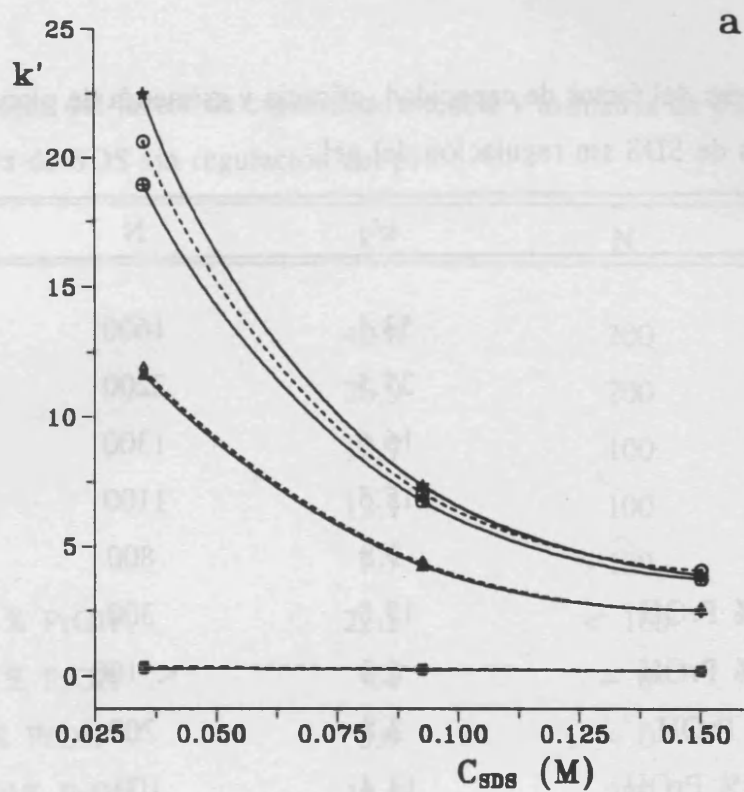


Figura VI.2.- Efecto de la concentración de SDS sobre los factores de capacidad para fases móviles micelares híbridas sin tamponar. (a) 5% de propanol, (b) 10% de propanol. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

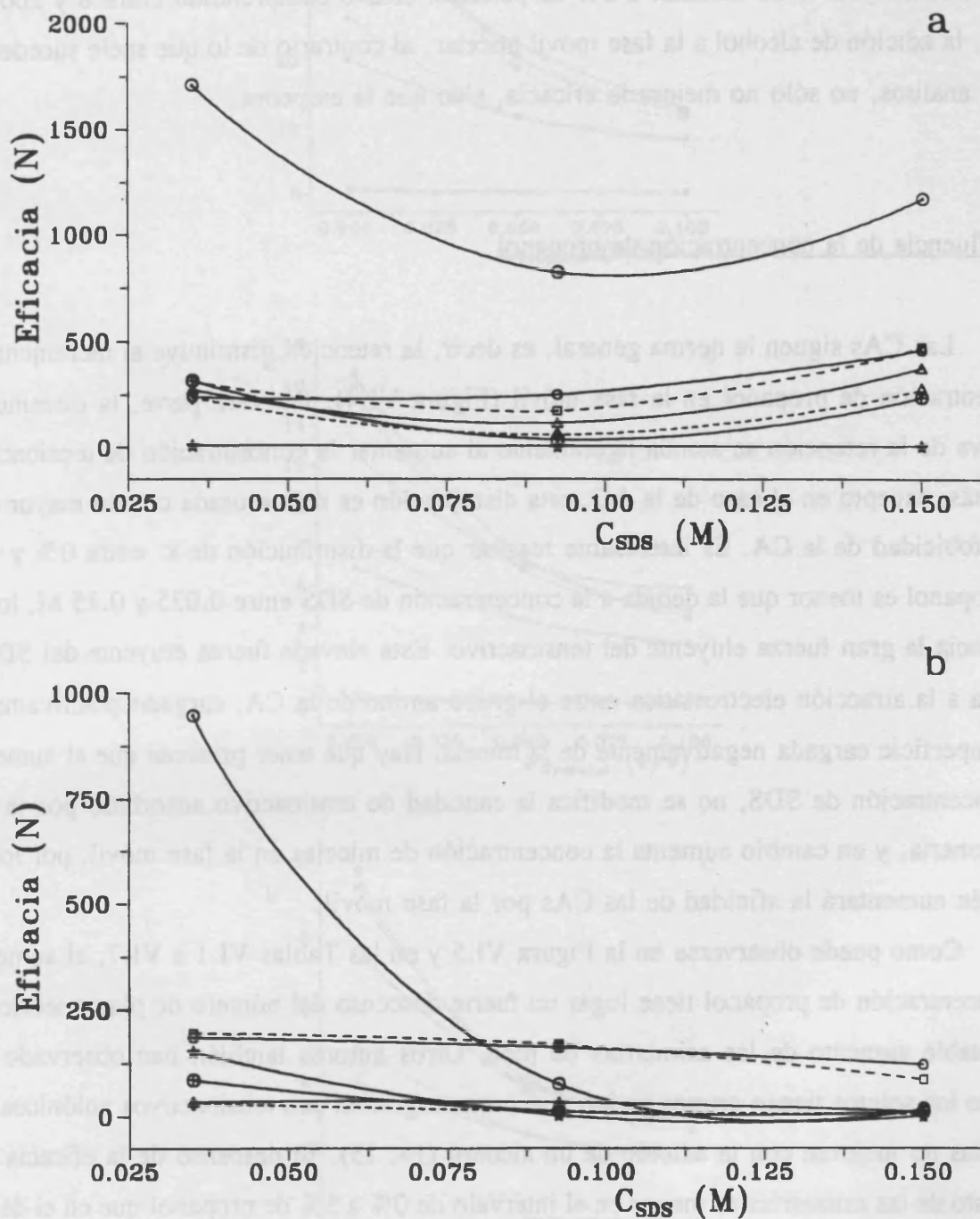


Figura VI.3.- Efecto de la concentración de SDS sobre la eficacia para fases móviles micelares híbridas sin tamponar. (a) 5% de propanol, (b) 10% de propanol. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

la DA (Figura VI.3). Comprobamos que la adición de otros alcoholes de cadena corta también empeora la eficacia. El número de platos teóricos obtenidos con fases móviles de SDS 0.05 M y 15% de metanol ó 3% de pentanol estuvo comprendido entre 6 y 200. Por tanto, la adición de alcohol a la fase móvil micelar, al contrario de lo que suele suceder con otros analitos, no sólo no mejora la eficacia, sino que la empeora.

- Influencia de la concentración de propanol

Las CAs siguen la norma general, es decir, la retención disminuye al incrementar la concentración de propanol en la fase móvil (Figura VI.4). Por otra parte, la disminución relativa de la retención se atenúa ligeramente al aumentar la concentración de tensioactivo. Además, excepto en el caso de la AO, esta disminución es más acusada cuanto mayor es la hidrofobicidad de la CA. Es interesante resaltar que la disminución de k' entre 0% y 10% de propanol es menor que la debida a la concentración de SDS entre 0.035 y 0.15 M, lo que evidencia la gran fuerza eluyente del tensioactivo. Esta elevada fuerza eluyente del SDS es debida a la atracción electrostática entre el grupo amino de la CA, cargado positivamente, y la superficie cargada negativamente de la micela. Hay que tener presente que al aumentar la concentración de SDS, no se modifica la cantidad de tensioactivo adsorbido por la fase estacionaria, y en cambio aumenta la concentración de micelas en la fase móvil, por lo que también aumentará la afinidad de las CAs por la fase móvil.

Como puede observarse en la Figura VI.5 y en las Tablas VI.1 a VI.7, al aumentar la concentración de propanol tiene lugar un fuerte descenso del número de platos teóricos y un notable aumento de las asimetrías de pico. Otros autores también han observado que cuando los solutos tienen grupos amino y se cromatografían con tensioactivos aniónicos, las eficacias no mejoran con la adición de un alcohol (14, 15). El descenso de la eficacia y el aumento de las asimetrías es mayor en el intervalo de 0% a 5% de propanol que en el de 5% a 10%. Al incrementarse la proporción de propanol, la DA muestra una pérdida de eficacia menor que el resto de las CAs. En las Figuras VI.6 y VI.7 se muestran las modificaciones que la presencia de propanol ejerce sobre la forma de los picos de DA y AO, respectivamente.

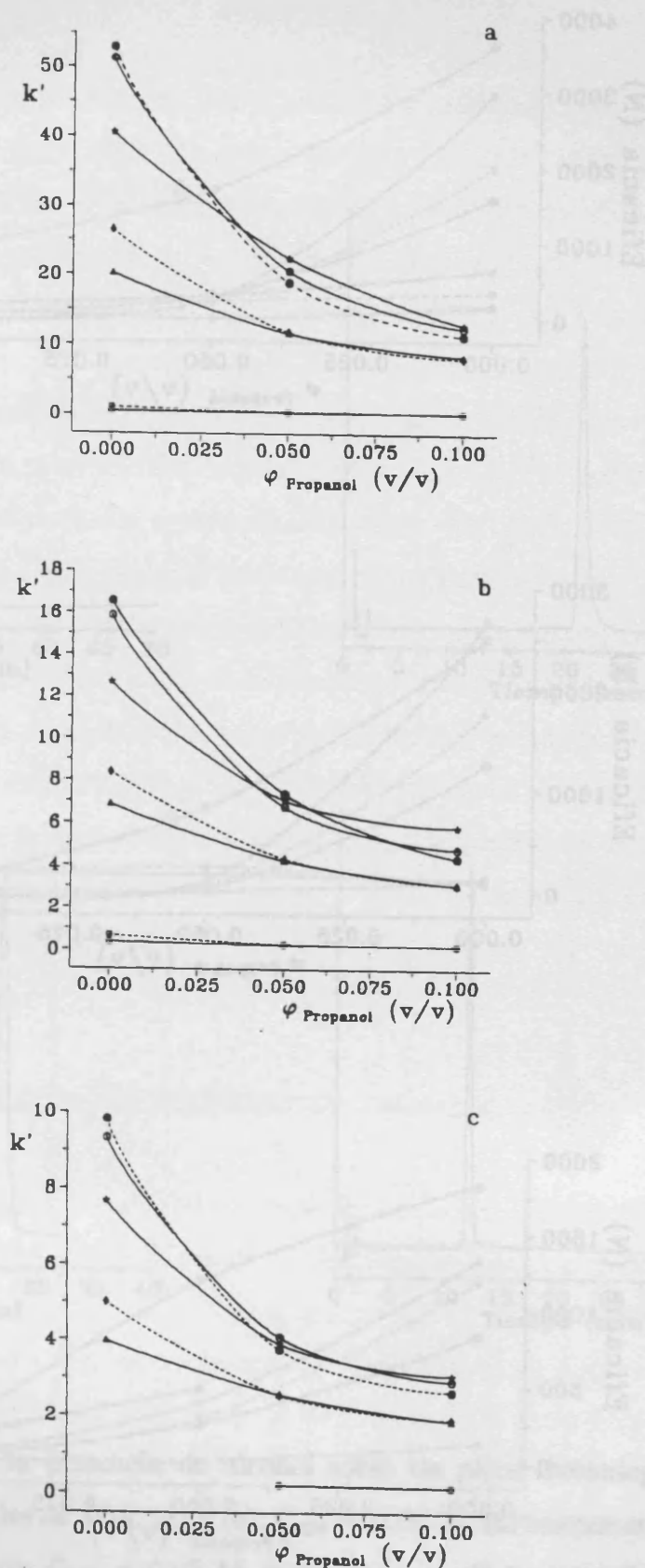


Figura VI.4.- Efecto de la concentración de propanol sobre el factor de capacidad para fases móviles micelares híbridas sin tamponar. (a) SDS 0.035 M, (b) SDS 0.093 M, (c) SDS 0.15 M. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

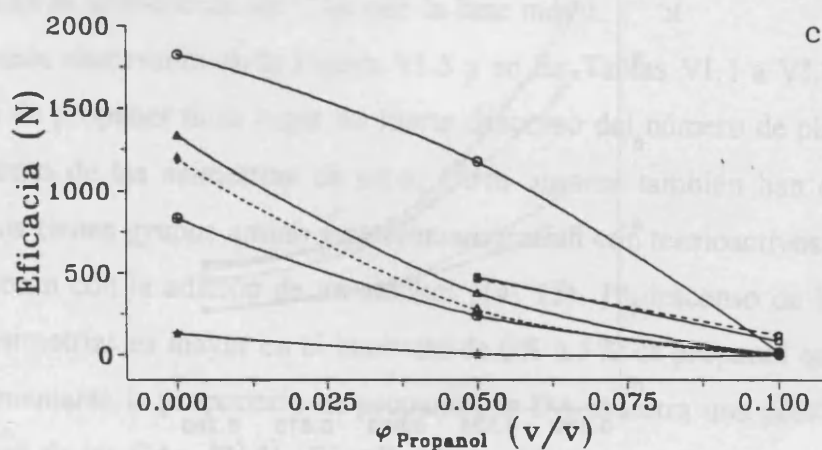
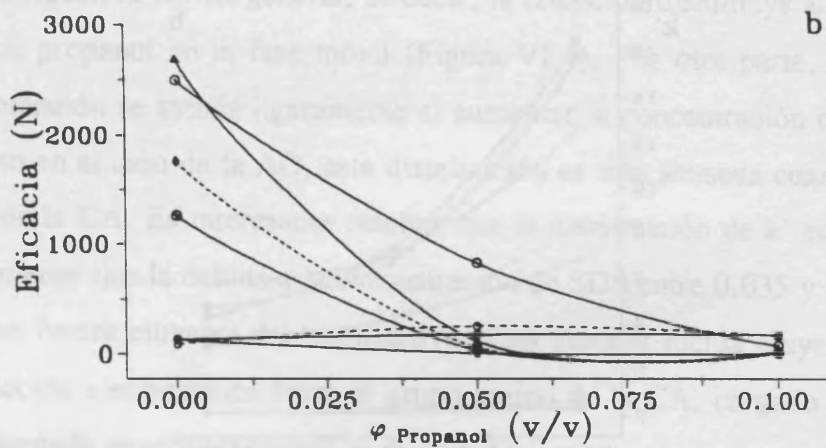
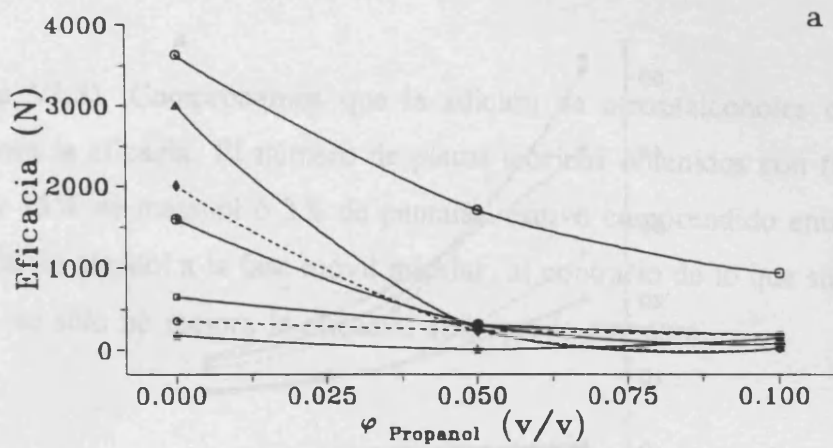


Figura VI.5.- Efecto de la concentración de propanol sobre la eficacia para fases móviles micelares híbridas sin tamponar. (a) SDS 0.035 M, (b) SDS 0.093 M, (c) SDS 0.15 M. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

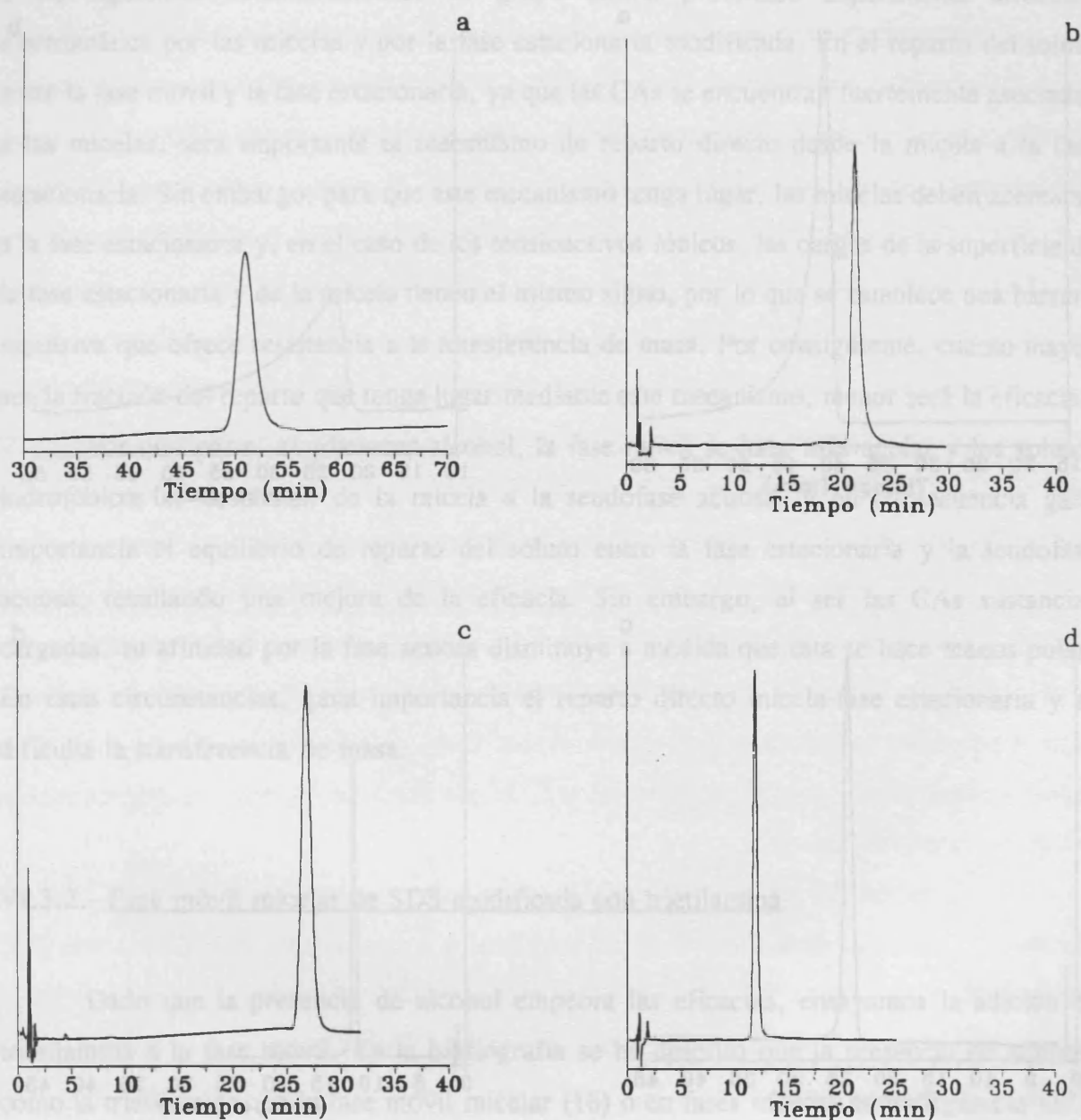


Figura VI.6.- Efecto de la presencia de alcohol sobre los picos cromatográficos de la dopamina con fases móviles de SDS: (a) y (b): $C_{SDS} = 0.035$ M, sin tamponar; (a) 0% y (b) 5% de propanol. (c) y (d): $C_{SDS} = 0.05$ M, tamponada a pH 3; (a) 0% y (b) 5% de propanol.

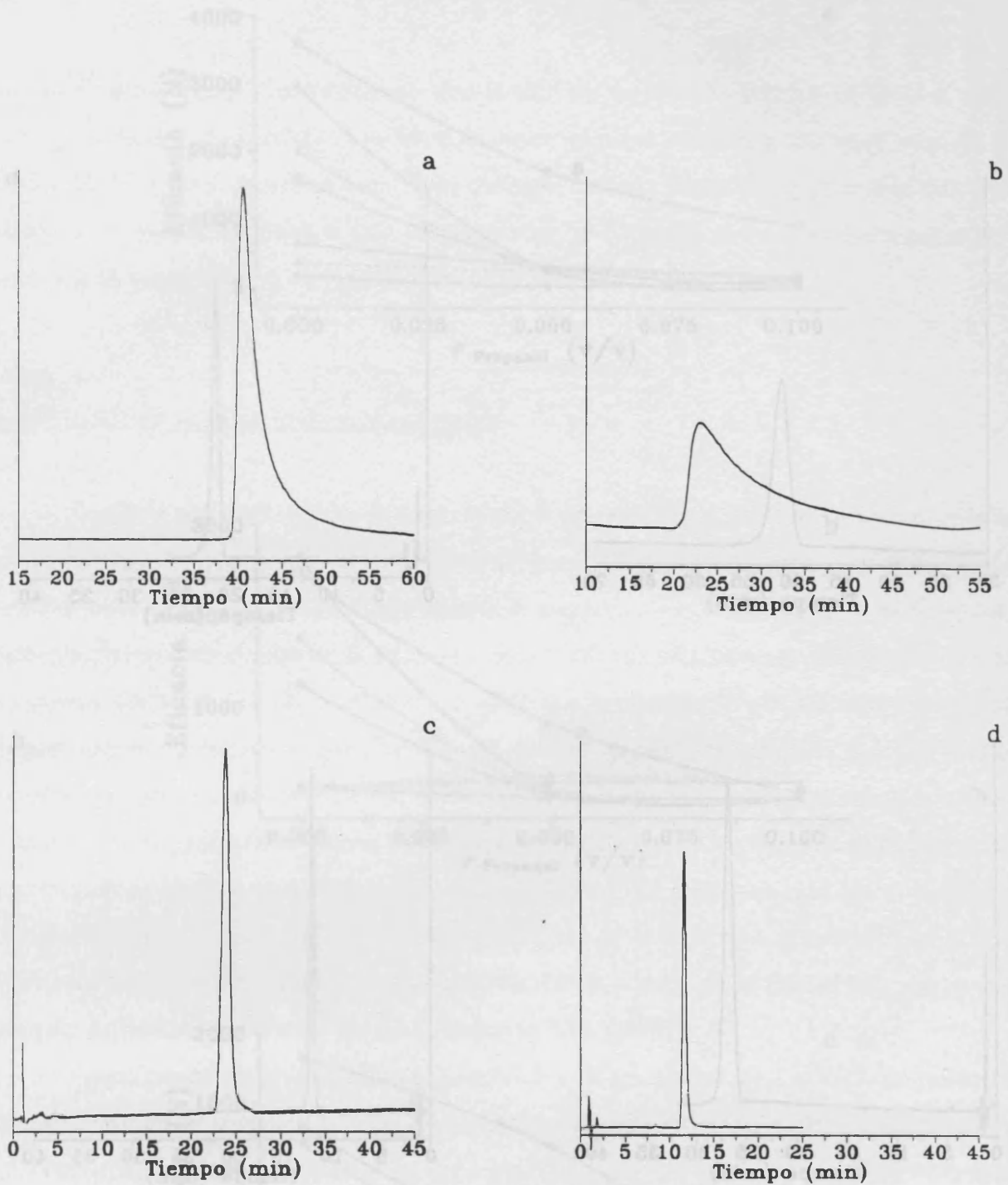


Figura VI.7.- Efecto de la presencia de alcohol sobre los picos cromatográficos de la adrenalona con fases móviles de SDS: (a) y (b): $C_{\text{SDS}} = 0.035 \text{ M}$, sin tamponar; (a) 0% y (b) 5% de propanol. (c) y (d): $C_{\text{SDS}} = 0.05 \text{ M}$, tamponada a pH 3; (c) 0% y (d) 5% de propanol.

La pérdida de eficacia producida por la presencia de alcohol puede explicarse en base a las siguientes consideraciones: El grupo amino protonado experimenta atracción electrostática por las micelas y por la fase estacionaria modificada. En el reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, ya que las CAs se encuentran fuertemente asociadas a las micelas, será importante el mecanismo de reparto directo desde la micela a la fase estacionaria. Sin embargo, para que este mecanismo tenga lugar, las micelas deben acercarse a la fase estacionaria y, en el caso de los tensioactivos iónicos, las cargas de la superficie de la fase estacionaria y de la micela tienen el mismo signo, por lo que se establece una barrera repulsiva que ofrece resistencia a la transferencia de masa. Por consiguiente, cuanto mayor sea la fracción del reparto que tenga lugar mediante este mecanismo, menor será la eficacia.

Por otra parte, al adicionar alcohol, la fase móvil se hace más apolar y los solutos hidrofóbicos se desplazan de la micela a la seudofase acuosa, y en consecuencia gana importancia el equilibrio de reparto del soluto entre la fase estacionaria y la seudofase acuosa, resultando una mejora de la eficacia. Sin embargo, al ser las CAs sustancias cargadas, su afinidad por la fase acuosa disminuye a medida que ésta se hace menos polar. En estas circunstancias, gana importancia el reparto directo micela-fase estacionaria y se dificulta la transferencia de masa.

VI.3.2.- Fase móvil micelar de SDS modificada con trietilamina

Dado que la presencia de alcohol empeora las eficacias, ensayamos la adición de trietilamina a la fase móvil. En la bibliografía se ha descrito que la presencia de aminas, como la trietilamina, en la fase móvil micelar (16) o en fases móviles hidroorgánicas (17), mejora en gran medida las eficacias cromatográficas de compuestos que contienen grupos amino, al bloquear los grupos silanol libres de la fase estacionaria. Otro efecto que produce la presencia de aminas en la fase móvil es el de disminuir la retención de los solutos.

Utilizamos una fase móvil micelar de SDS 0.1 M con un 1% (v/v) de trietilamina, tamponada a pH 6 con fosfato, y comprobamos que ninguna de las CAs era eluída después de 2 h. Por tanto, para el caso de las CAs, la presencia de trietilamina implica un aumento muy considerable de la retención. No hemos encontrado una explicación satisfactoria.

VI.3.3.- Influencia del pH

En este apartado se estudia el efecto del pH de la fase móvil micelar sin modificador sobre los distintos parámetros cromatográficos. Para ello, se prepararon diferentes fases móviles a partir de una disolución de SDS 0.1 M y Na_2HPO_4 0.01 M cuyos valores de pH se ajustaron mediante la adición de H_3PO_4 . Los valores de pH ensayados fueron: 2.0, 2.3, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 4.0, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6 y 7.0. En las Tablas VI.8 a VI.14 se muestran los factores de capacidad, el número de platos teóricos y las asimetrías de pico. En la Figura VI.8 se representan el factor de capacidad y la eficacia frente al pH.

La variación del pH produce importantes modificaciones en la retención de D y MD, debido a que estos compuestos poseen un grupo carboxilato que puede protonarse. Así, para estas dos CAs, la representación del factor de capacidad frente al pH tiene forma sigmoideal (Figura VI.8a), el factor de capacidad experimentó un aumento brusco al disminuir el pH de 5 a 3, y para pHs superiores a 6, ambas CAs eluyeron prácticamente con el volumen muerto. En cambio, la retención de las otras CAs no se vió afectada significativamente por el pH, pudiendo atribuirse los ligeros aumentos de los factores de capacidad que tuvieron lugar a pequeñas variaciones de la fuerza iónica. Cabe señalar que la AO dió lugar a un rápido aumento de k' para pHs superiores a 6, lo que puede atribuirse a la desprotonación del grupo funcional ceto-enol.

La variación del pH produce también importantes cambios en las eficacias y en los factores de asimetría. Para valores de pH inferiores a 4 se obtienen las eficacias más altas y las asimetrías más bajas. Para valores de pH superiores a 4, en general el número de platos teóricos desciende, y la asimetría aumenta bruscamente. En la Figura VI.9 se muestra cómo cambia la forma de los picos de la NA con el pH. Las CAs A, AO, DA e ISO siguen la misma tendencia. Esta disminución de eficacia puede estar relacionada con la desprotonación de los grupos silanol de la fase estacionaria, que para fases móviles hidroorgánicas de acetonitrilo-agua se produce a pHs próximos a 5.5 (17). Kiel y col. (17), al cromatografiar aminas utilizando fases móviles de acetonitrilo-agua y columnas de sílice alquilada, observaron también un incremento en las asimetrías de los picos al aumentar el pH.

En el caso de D y MD, y para el intervalo de pH en torno al logaritmo de la constante de protonación (apartado VI.4.4), se obtienen picos muy deformados (Figura VI.10). Las deformaciones son diferentes a las habituales, obteniéndose factores de asimetría

inferiores a 1 entre pH 3.7 y 5.0. Este efecto es más acusado para el D, que presenta un pico doble a pH 4.2 y un factor de asimetría de 0.3 a pH 4.6.

En vista de los resultados, se consideró que un pH = 3 era el más conveniente para cromatografiar CAs. Este valor de pH es suficientemente alto para que la fase estacionaria no resulte dañada, las eficacias son altas, y además D y MD se encuentran protonados y presentan una retención adecuada. En las experiencias posteriores se utilizó fosfato como sistema amortiguador y se ajustó potenciométricamente el pH de la fase móvil a 3.0.

Tabla VI.8.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos del L-dopa.

pH	k'	N	B/A
2.0	9.5	2100	1.2
2.3	9.5	1900	1.1
2.7	9.3	2000	1.1
3.0	8.7	2100	1.1
3.3	7.0	2100	1.0
3.5	6.8	2100	1.2
3.7	5.4	2100	1.0
4.0	3.6	3900	0.7
4.2	2.3	-	-
4.6	1.9	600	0.3
5.0	1.2	1000	0.8
5.4	0.84	600	1.7
5.8	0.65	800	1.4
6.2	0.56	400	1.8
6.6	0.52	400	2.4
7.0	0.55	400	2.1

Tabla VI.9.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos del 2-metildopa.

pH	k'	N	B/A
2.0	14.4	2000	1.2
2.3	14.3	1800	1.1
2.7	15.0	2000	1.1
3.0	14.8	2100	1.0
3.3	13.2	2100	1.2
3.5	13.0	2200	1.1
3.7	11.2	2000	1.2
4.0	7.6	2100	1.0
4.2	7.1	1500	1.1
4.6	4.4	1500	0.9
5.0	2.8	1300	0.6
5.4	1.7	700	1.5
5.8	0.90	700	1.4
6.2	0.68	200	3.4
6.6	0.64	500	1.9
7.0	0.65	300	2.0

Tabla VI.10.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos de la noradrenalina.

pH	k'	N	B/A
2.0	6.4	2800	1.1
2.3	6.4	2600	1.0
2.7	6.9	2600	1.1
3.0	7.0	2500	1.2
3.3	7.1	2700	1.0
3.5	7.0	2500	1.3
3.7	7.4	2600	1.3
4.0	7.0	2500	1.3
4.2	7.1	2300	1.4
4.6	7.2	1600	1.5
5.0	7.2	1000	1.9
5.4	7.4	300	3.1
5.8	7.3	200	4.1
6.2	8.0	~ 0	11.9
6.6	7.1	< 100	7.7
7.0	7.2	< 100	10.0

Tabla VI.11.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos de la adrenalina.

pH	k'	N	B/A
2.0	8.0	2200	1.1
2.3	8.0	1900	1.2
2.7	8.5	2000	1.2
3.0	8.6	2100	1.1
3.3	8.7	2000	1.2
3.5	8.7	2000	1.3
3.7	8.7	2100	1.1
4.0	8.6	2100	1.3
4.2	8.7	1800	1.4
4.6	8.9	1500	1.5
5.0	8.9	1000	1.8
5.4	9.2	300	2.8
5.8	9.1	200	3.7
6.2	9.4	~ 0	14.4
6.6	9.0	< 100	9.0
7.0	9.1	< 100	9.5

Tabla VI.12.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos de la adrenalona.

pH	k'	N	B/A
2.0	11.2	2100	1.2
2.3	12.0	1900	1.3
2.7	12.8	1700	1.4
3.0	12.9	1900	1.3
3.3	13.1	1900	1.3
3.5	13.0	1900	1.3
3.7	13.0	1700	1.4
4.0	12.9	1500	1.5
4.2	13.1	1300	1.6
4.6	13.5	500	2.5
5.0	13.5	200	3.8
5.4	13.9	< 100	7.5
5.8	13.7	< 100	9.2
6.2	14.9	~ 0	18.0
6.6	14.5	~ 0	14.6
7.0	17.2	~ 0	8.3

Tabla VI.13.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos de la dopamina.

pH	k'	N	B/A
2.0	13.2	2400	1.1
2.3	13.1	2400	1.2
2.7	14.1	2400	1.2
3.0	14.3	2400	1.1
3.3	14.4	2400	1.2
3.5	14.4	2500	1.1
3.7	14.4	2500	1.1
4.0	14.2	2500	1.2
4.2	14.4	2400	1.2
4.6	14.7	2300	1.2
5.0	14.6	2000	1.3
5.4	14.9	1500	1.5
5.8	15.0	1000	1.9
6.2	15.0	200	4.9
6.6	14.7	300	3.8
7.0	14.7	300	3.9

Tabla VI.14.- Efecto del pH sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos de la isoprenalina.

pH	k'	N	B/A
2.0	13.4	1800	1.2
2.3	13.2	1700	1.2
2.7	14.1	1600	1.3
3.0	14.3	1600	1.3
3.3	14.5	1700	1.3
3.5	14.9	1900	1.2
3.7	14.6	1800	1.2
4.0	14.5	1700	1.3
4.2	14.6	1700	1.3
4.6	15.1	1400	1.4
5.0	14.9	1000	1.7
5.4	15.4	400	2.4
5.8	15.2	200	3.5
6.2	15.6	< 100	10.2
6.6	15.4	< 100	6.6
7.0	14.3	< 100	7.7

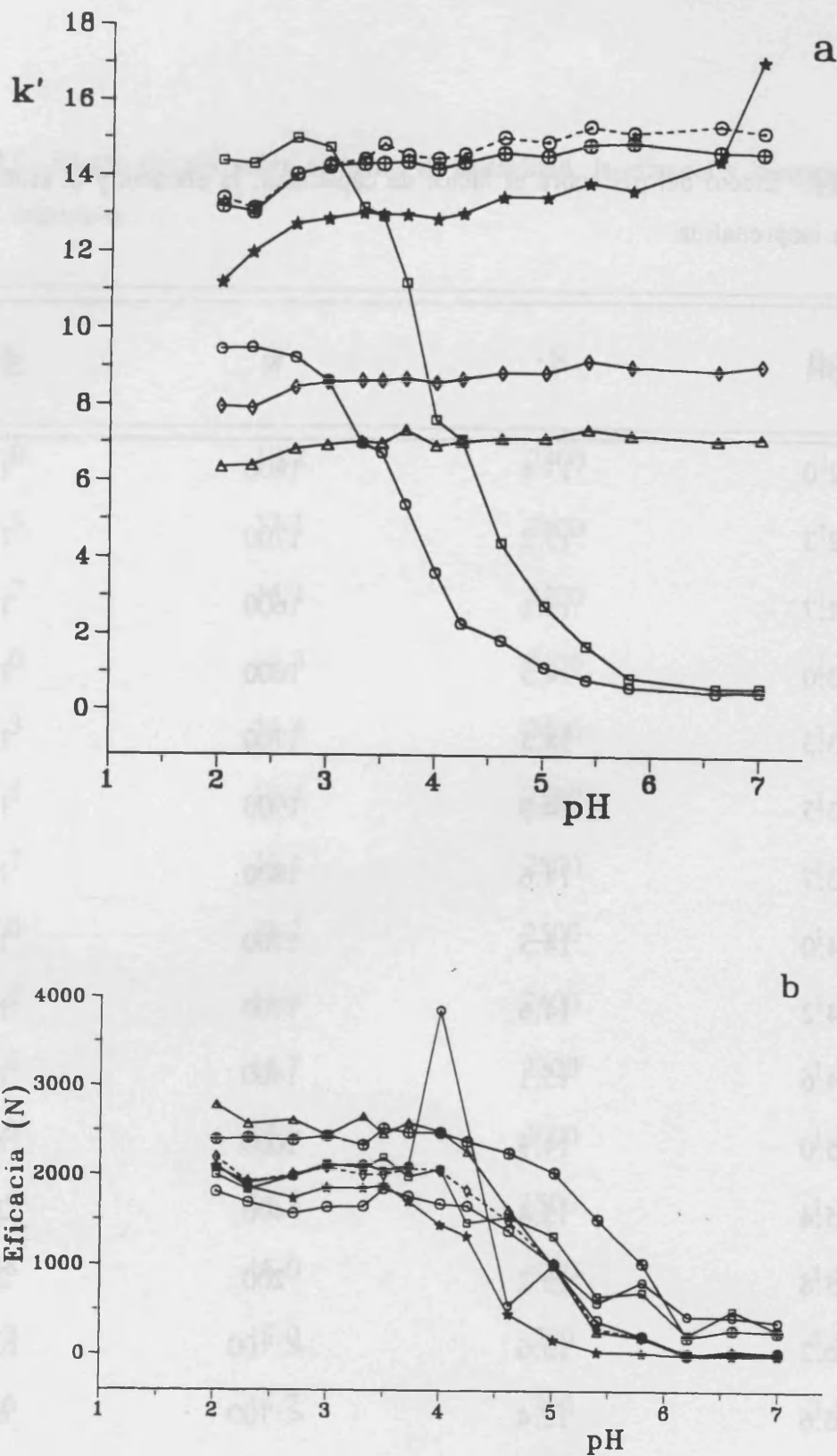


Figura VI.8. - Efecto del pH sobre los factores de capacidad (a) y la eficacia (b) para fases móviles micelares puras. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

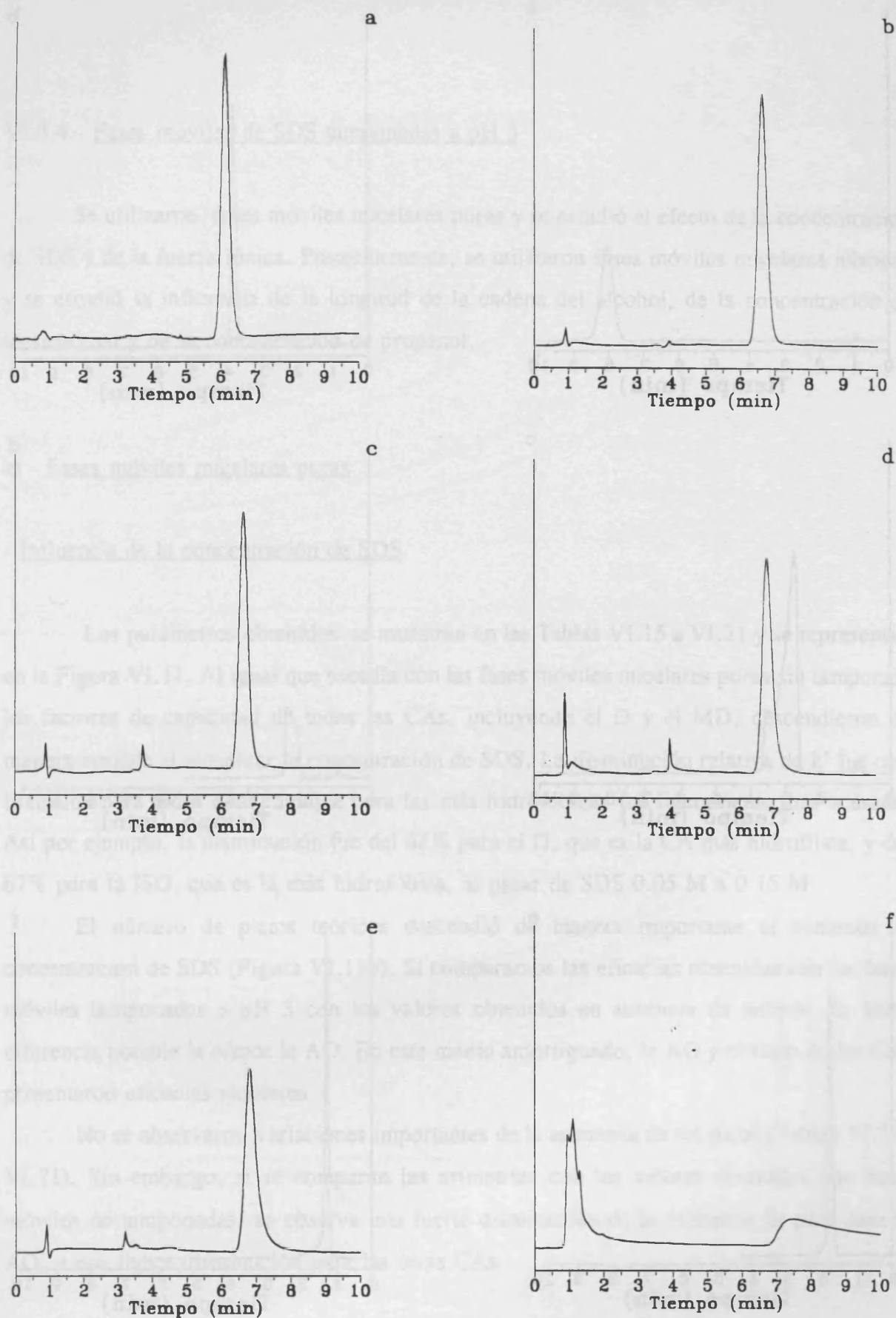


Figura VI.9. - Efecto del pH sobre los picos cromatográficos de la noradrenalina con fases móviles de SDS 0.05 M; pH: (a) 2.0, (b) 3.0, (c) 4.0, (d) 4.6, (e) 5.0, (f) 6.2.

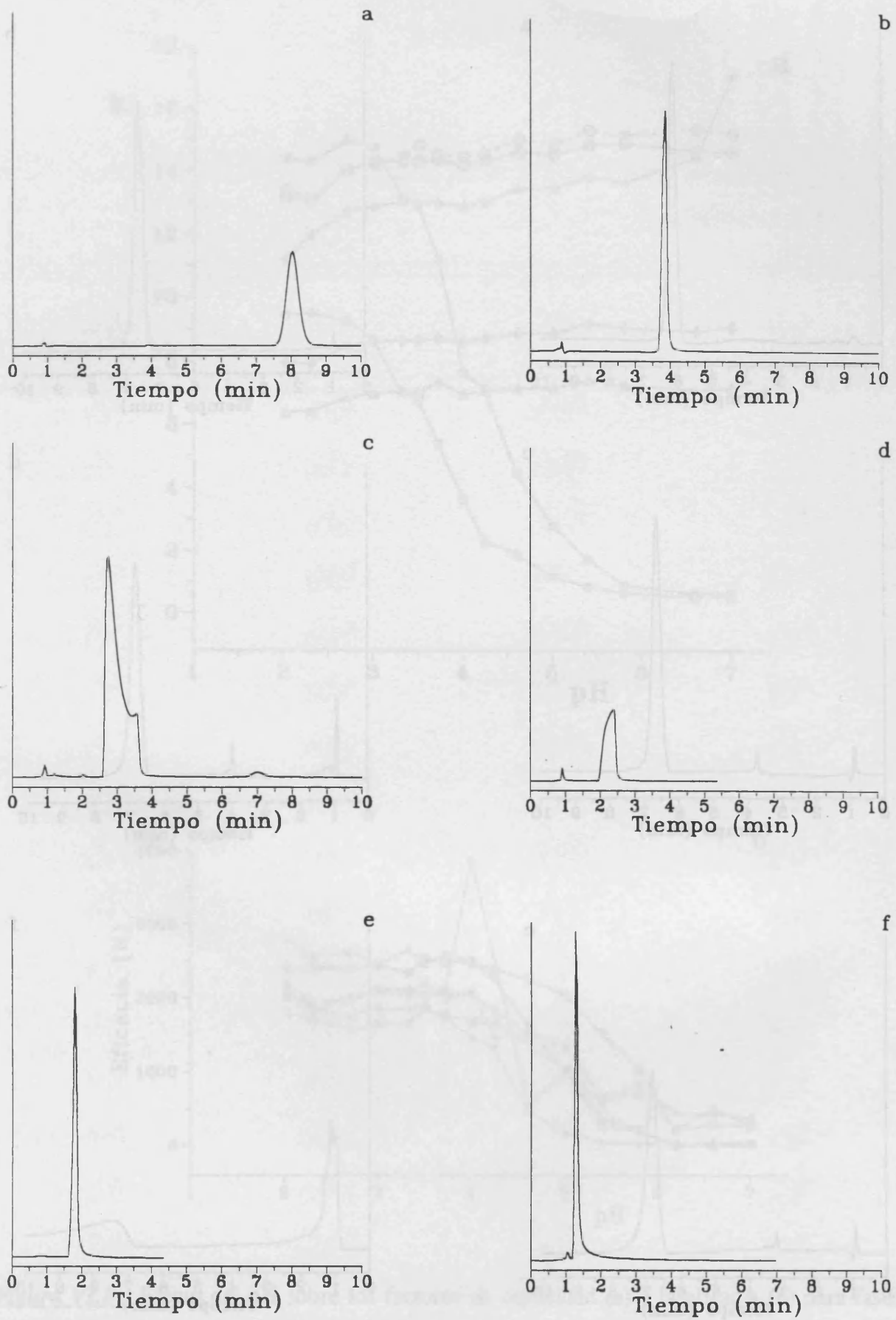


Figura VI.10. - Efecto del pH sobre los picos cromatográficos del L-dopa con fases móviles de SDS 0.05 M; pH: (a) 3.0, (b) 4.0, (c) 4.2, (d) 4.6, (e) 5.0, (f) 6.6.

VI.3.4.- Fases móviles de SDS tamponadas a pH 3

Se utilizaron fases móviles micelares puras y se estudió el efecto de la concentración de SDS y de la fuerza iónica. Posteriormente, se utilizaron fases móviles micelares híbridas y se estudió la influencia de la longitud de la cadena del alcohol, de la concentración de tensioactivo y de la concentración de propanol.

a) - Fases móviles micelares puras

- Influencia de la concentración de SDS

Los parámetros obtenidos se muestran en las Tablas VI.15 a VI.21 y se representan en la Figura VI.11. Al igual que sucedía con las fases móviles micelares puras sin tamponar, los factores de capacidad de todas las CAs, incluyendo el D y el MD, descendieron de manera notable al aumentar la concentración de SDS. La disminución relativa de k' fue casi la misma para todas ellas, aunque para las más hidrofóbicas fue ligeramente más acusada. Así por ejemplo, la disminución fue del 62% para el D, que es la CA más hidrofílica, y del 67% para la ISO, que es la más hidrofóbica, al pasar de SDS 0.05 M a 0.15 M.

El número de platos teóricos descendió de manera importante al aumentar la concentración de SDS (Figura VI.11b). Si comparamos las eficacias obtenidas con las fases móviles tamponadas a pH 3 con los valores obtenidos en ausencia de tampón, la única diferencia notable la ofrece la AO. En este medio amortiguado, la AO y el resto de las CAs presentaron eficacias similares.

No se observaron variaciones importantes de la asimetría de los picos (Tablas VI.15-VI.21). Sin embargo, si se comparan las asimetrías con los valores obtenidos con fases móviles no tamponadas, se observa una fuerte disminución de la asimetría de pico para la AO, y una ligera disminución para las otras CAs.

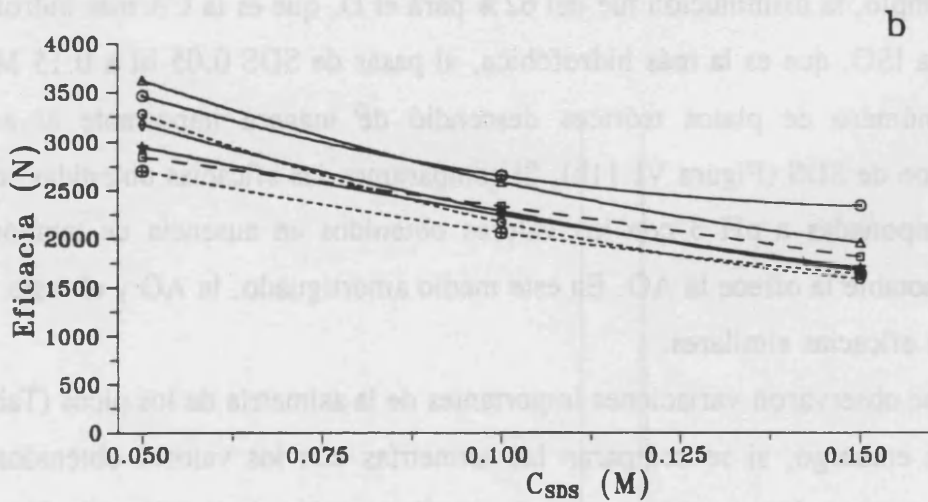
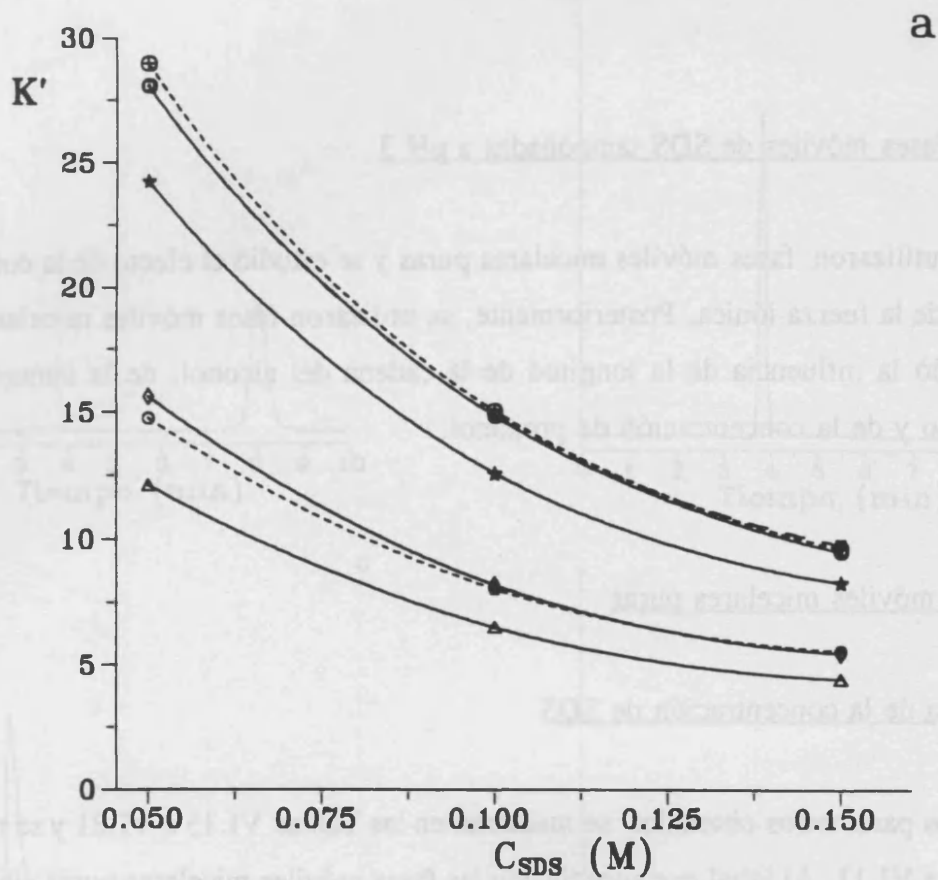


Figura VI.11. - Efecto de la concentración de SDS sobre los factores de capacidad (a) y sobre la eficacia (b) utilizando fases móviles micelares puras tamponadas a pH 3. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

Tabla VI.15.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico del L-dopa para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	14.8	3300	1.1
SDS 0.10 M	8.0	2200	1.1
SDS 0.15 M	5.6	1600	1.2
SDS 0.05 M-5% PrOH	3.4	3000	1.0
SDS 0.10 M-5% PrOH	2.2	2000	1.1
SDS 0.05 M-10% PrOH	1.2	1100	1.6
SDS 0.10 M-10% PrOH	1.3	1600	1.2
SDS 0.15 M-10% PrOH	0.9	1100	1.4

Tabla VI.16.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico del 2-metildopa para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	28.1	2800	1.3
SDS 0.10 M	14.9	2300	1.1
SDS 0.15 M	9.8	1800	1.1
SDS 0.05 M-5% PrOH	6.4	2900	1.2
SDS 0.10 M-5% PrOH	4.5	2400	1.0
SDS 0.05 M-10% PrOH	2.4	900	1.4
SDS 0.10 M-10% PrOH	2.2	1800	1.2
SDS 0.15 M-10% PrOH	1.6	1300	1.4

Tabla VI.17.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la noradrenalina para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	12.1	3600	1.2
SDS 0.10 M	6.5	2600	1.2
SDS 0.15 M	4.4	2000	1.3
SDS 0.05 M-5% PrOH	5.5	4000	1.2
SDS 0.10 M-5% PrOH	3.1	2700	1.3
SDS 0.05 M-10% PrOH	3.8	3800	1.0
SDS 0.10 M-10% PrOH	2.3	1900	1.7
SDS 0.15 M-10% PrOH	1.6	1900	1.3

Tabla VI.18.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la adrenalina para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	15.6	3200	1.2
SDS 0.10 M	8.2	2300	1.1
SDS 0.15 M	5.5	1700	1.2
SDS 0.05 M-5% PrOH	5.9	3400	1.3
SDS 0.10 M-5% PrOH	3.2	2600	1.1
SDS 0.05 M-10% PrOH	3.7	3000	1.5
SDS 0.10 M-10% PrOH	2.2	2100	1.5
SDS 0.15 M-10% PrOH	1.7	2000	1.4

Tabla VI.19.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la adrenalona para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	24.3	3000	1.2
SDS 0.10 M	12.6	2200	1.2
SDS 0.15 M	8.3	1700	1.3
SDS 0.05 M-5% PrOH	9.6	2900	1.4
SDS 0.10 M-5% PrOH	4.3	2800	1.2
SDS 0.05 M-10% PrOH	6.2	3300	1.3
SDS 0.10 M-10% PrOH	3.6	2300	1.4
SDS 0.15 M-10% PrOH	2.5	1600	1.5

Tabla VI.20.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la dopamina para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	28.1	3500	1.3
SDS 0.10 M	14.9	2700	1.2
SDS 0.15 M	9.5	2300	1.1
SDS 0.05 M-5% PrOH	9.9	3800	1.2
SDS 0.10 M-5% PrOH	5.5	2900	1.2
SDS 0.05 M-10% PrOH	6.6	4000	1.4
SDS 0.10 M-10% PrOH	3.7	3100	1.1
SDS 0.15 M-10% PrOH	2.5	2200	1.2

Tabla VI.21.- Valores del factor de capacidad, eficacia y asimetría de pico de la isoprenalina para fases móviles de SDS reguladas a pH 3.

Fase móvil	k'	N	B/A
SDS 0.05 M	29.0	2700	1.3
SDS 0.10 M	15.1	2100	1.1
SDS 0.15 M	9.7	1600	1.1
SDS 0.05 M-5% PrOH	9.1	2900	1.2
SDS 0.10 M-5% PrOH	4.9	2400	1.1
SDS 0.05 M-10% PrOH	5.4	3100	1.2
SDS 0.10 M-10% PrOH	3.2	2000	1.3
SDS 0.15 M-10% PrOH	2.6	1700	1.7

- Influencia de la fuerza iónica

Se prepararon fases móviles conteniendo SDS 0.05 M, Na_2HPO_4 0.01 M y diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.15 y 0.25 M). En la Tabla VI.22 se muestran los valores obtenidos para los parámetros cromatográficos. En la Figura VI.12 se representan los factores de capacidad y la eficacia frente a la concentración de NaCl.

Un aumento de la concentración de NaCl produjo, en general, una disminución de los factores de capacidad (Figura VI.12a). Para D y MD, la disminución relativa de la retención, entre 0 y 0.15 M de NaCl, fue mayor que para el resto de las CAs, lo que puede ser debido a que el aumento de la fuerza iónica reduce el valor de la constante de protonación del grupo carboxilato. Para las otras CAs, el factor de capacidad disminuyó de manera más importante cuanto menor fue la hidrofobicidad del soluto. Así, la disminución de k' al variar la concentración de NaCl en la fase móvil de 0 a 0.25 M, está comprendida entre el 52% para la NA, que es la CA menos hidrofóbica, y el 27% para la ISO, que es la más hidrofóbica. La eficacia disminuyó al aumentar concentración de NaCl (Figura VI.12b). No se observaron variaciones importantes de las asimetrías de pico.

Tabla VI.22.- Efecto de la fuerza iónica sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos a pH 3. $C_{\text{SDS}} = 0.05 \text{ M}$.

CA	$C_{\text{NaCl}} \text{ (M)}$	k'	N	B/A
L-Dopa	0	14.8	3300	1.1
	0.15	5.1	2400	1.0
	0.25	5.5	2000	1.0
2-Metildopa	0	28.1	2800	1.3
	0.15	12.8	2400	1.2
	0.25	13.3	2300	1.2
Noradrenalina	0	12.1	3600	1.2
	0.15	7.2	2800	1.4
	0.25	5.8	2600	1.2
Adrenalina	0	15.6	3200	1.2
	0.15	10.6	2300	1.4
	0.25	8.9	2100	1.3
Adrenalona	0	24.3	2900	1.2
	0.15	19.7	1500	1.8
	0.25	18.0	1300	1.8
Dopamina	0	28.1	3500	1.2
	0.15	21.0	3100	1.3
	0.25	19.2	3000	1.3
Isoprenalina	0	29.0	2700	1.3
	0.15	22.9	1800	1.5
	0.25	21.1	1700	1.5

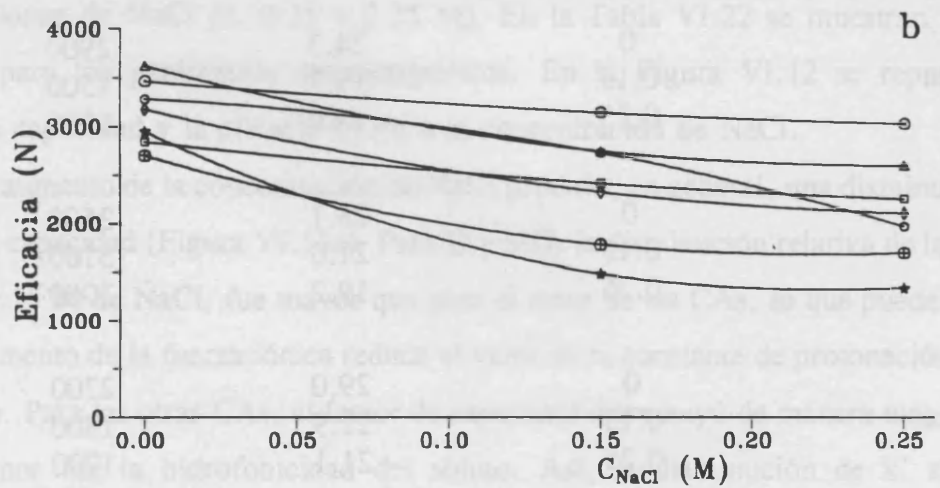
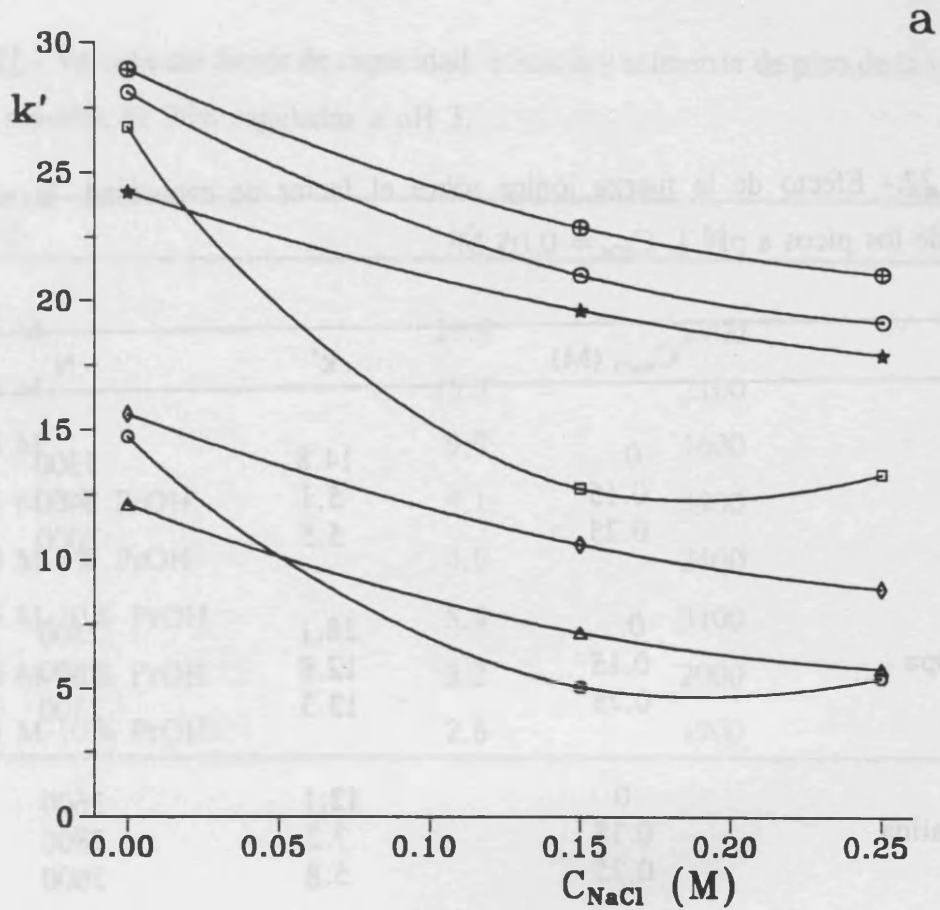


Figura VI.12.- Efecto de la fuerza iónica sobre los factores de capacidad (a) y sobre la eficacia (b). Símbolos igual que en la Figura VI.1.

b) - Fases móviles micelares híbridas

- Influencia de la longitud de la cadena del alcohol

Se prepararon fases móviles conteniendo: SDS 0.05 M, Na_2HPO_4 0.01 M y 5% del alcohol correspondiente. Los alcoholes utilizados fueron metanol, etanol, n-propanol, n-butanol y n-pentanol. Los factores de capacidad, el número de platos teóricos y el factor de asimetría de los picos se muestran en la Tabla VI.23. En la Figura VI.13 se representan los factores de capacidad y el número de platos teóricos frente al número de átomos de carbono de la cadena del alcohol.

Al aumentar la hidrofobicidad del alcohol, la fuerza eluyente de la fase móvil se incrementó de manera notable para todas las CAs (Figura VI.13a). El cambio fue especialmente importante para D y MD, con una disminución de k' del orden del 95% al pasar de metanol a pentanol. Para las otras CAs, la disminución de k' siguió el orden de hidrofocidad creciente.

Al contrario de lo que sucedía con las fases micelares sin tamponar, la adición de alcohol a pH 3 provocó, en general, un aumento de eficacia. Las eficacias aumentaron ligeramente al incrementarse el número de átomos de carbono de la cadena del alcohol entre metanol y butanol, y fueron menores para pentanol (Figura VI.13b). En el caso de NA y AO el máximo de eficacia se obtuvo con propanol. Por otra parte, como puede apreciarse en la Figura VI.14, el D presentó un pico doble con la fase móvil de butanol, por lo que no pudo medirse la eficacia para esta fase móvil.

- Influencia de la concentración de SDS

Los factores de capacidad disminuyeron de manera notable al aumentar la concentración de tensioactivo, si bien, el poder eluyente del tensioactivo se vió ligeramente atenuado por la presencia de modificador (Tablas VI.15-VI.21 y Figura VI.15a). La disminución fue más importante para las CAs más hidrofóbicas. Para D y MD la retención fue siempre pequeña y el poder eluyente del tensioactivo fue menor que para el resto de las CAs. Este comportamiento puede ser debido a que en presencia de 10% de propanol y a pH 3 el grupo carboxilo de ambas CAs se encuentre parcialmente desprotonado, y en

Tabla VI.23.- Efecto de la longitud de la cadena del alcohol sobre el factor de capacidad, la eficacia y la asimetría de los picos a pH 3. $C_{SDS} = 0.05$ M, 5% de alcohol.

CA	Alcohol	k'	N	B/A
L-Dopa	Metanol	8.1	2800	1.2
	Etanol	5.0	2800	1.1
	Propanol	3.4	3000	1.0
	Butanol	1.5	-	-
	Pentanol	0.46	1200	1.4
2-Metildopa	Metanol	16.3	3000	1.2
	Etanol	10.8	2900	1.2
	Propanol	6.4	2900	1.2
	Butanol	1.5	5800	1.3
	Pentanol	0.68	900	1.4
Noradrenalina	Metanol	9.4	3600	1.2
	Etanol	8.1	3700	1.3
	Propanol	5.5	4000	1.2
	Butanol	3.6	3700	1.2
	Pentanol	2.0	2300	1.3
Adrenalina	Metanol	11.5	2900	1.2
	Etanol	9.5	3200	1.2
	Propanol	5.9	3400	1.3
	Butanol	3.6	3600	1.2
	Pentanol	2.0	2100	1.3
Adrenalona	Metanol	18.1	2200	1.5
	Etanol	15.1	2400	1.5
	Propanol	9.6	2900	1.4
	Butanol	5.7	2400	1.4
	Pentanol	3.3	1800	1.5
Dopamina	Metanol	19.8	3400	1.2
	Etanol	16.5	3600	1.2
	Propanol	9.9	3800	1.2
	Butanol	5.2	4100	1.3
	Pentanol	2.6	2600	1.3
Isoprenalina	Metanol	20.0	2400	1.2
	Etanol	16.0	2800	1.2
	Propanol	9.1	2900	1.2
	Butanol	4.9	3200	1.4
	Pentanol	2.9	2100	1.3

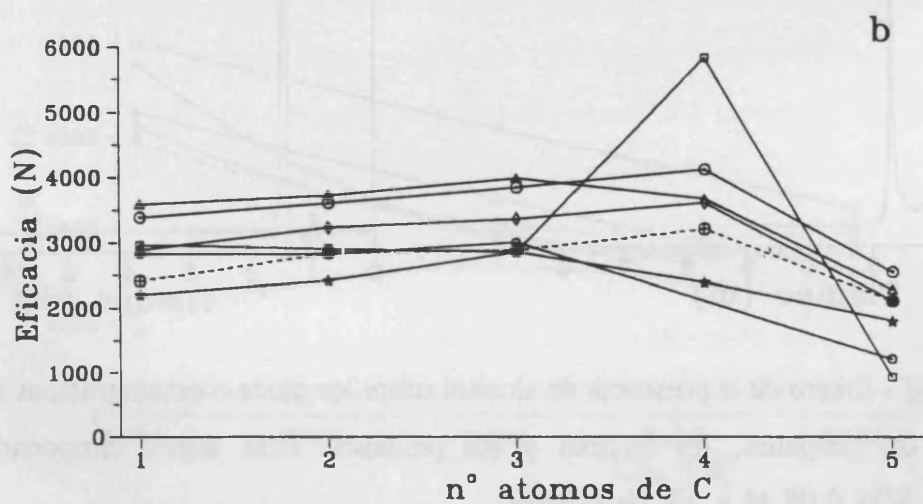
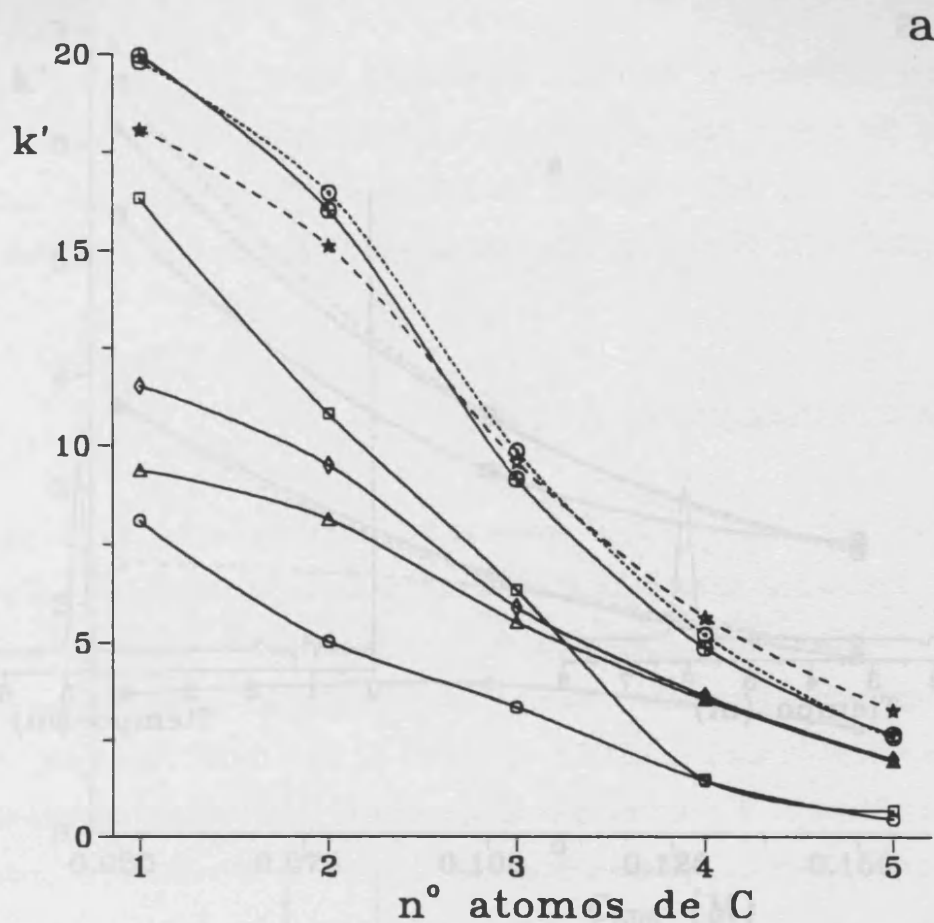


Figura VI.13.- Efecto de la longitud de la cadena del alcohol sobre los factores de capacidad (a) y la eficacia (b) utilizando fases móviles micelares tamponadas a pH 3. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

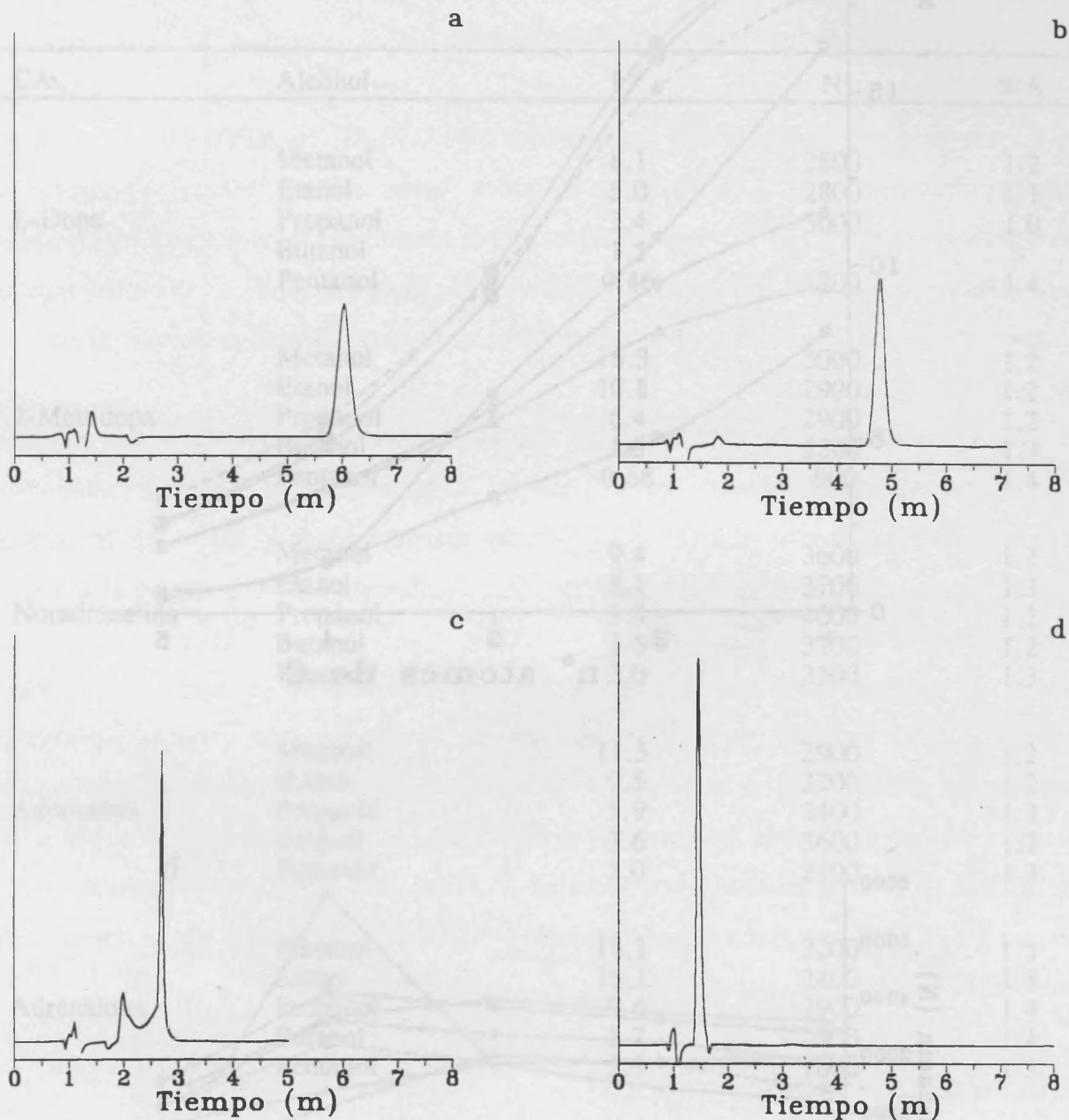


Figura VI.14. - Efecto de la presencia de alcohol sobre los picos cromatográficos del L-dopa: (a) etanol, (b) propanol, (c) butanol y (d) pentanol. Fase móvil tamponada a pH 3 conteniendo SDS 0.05 M y 5% de alcohol.

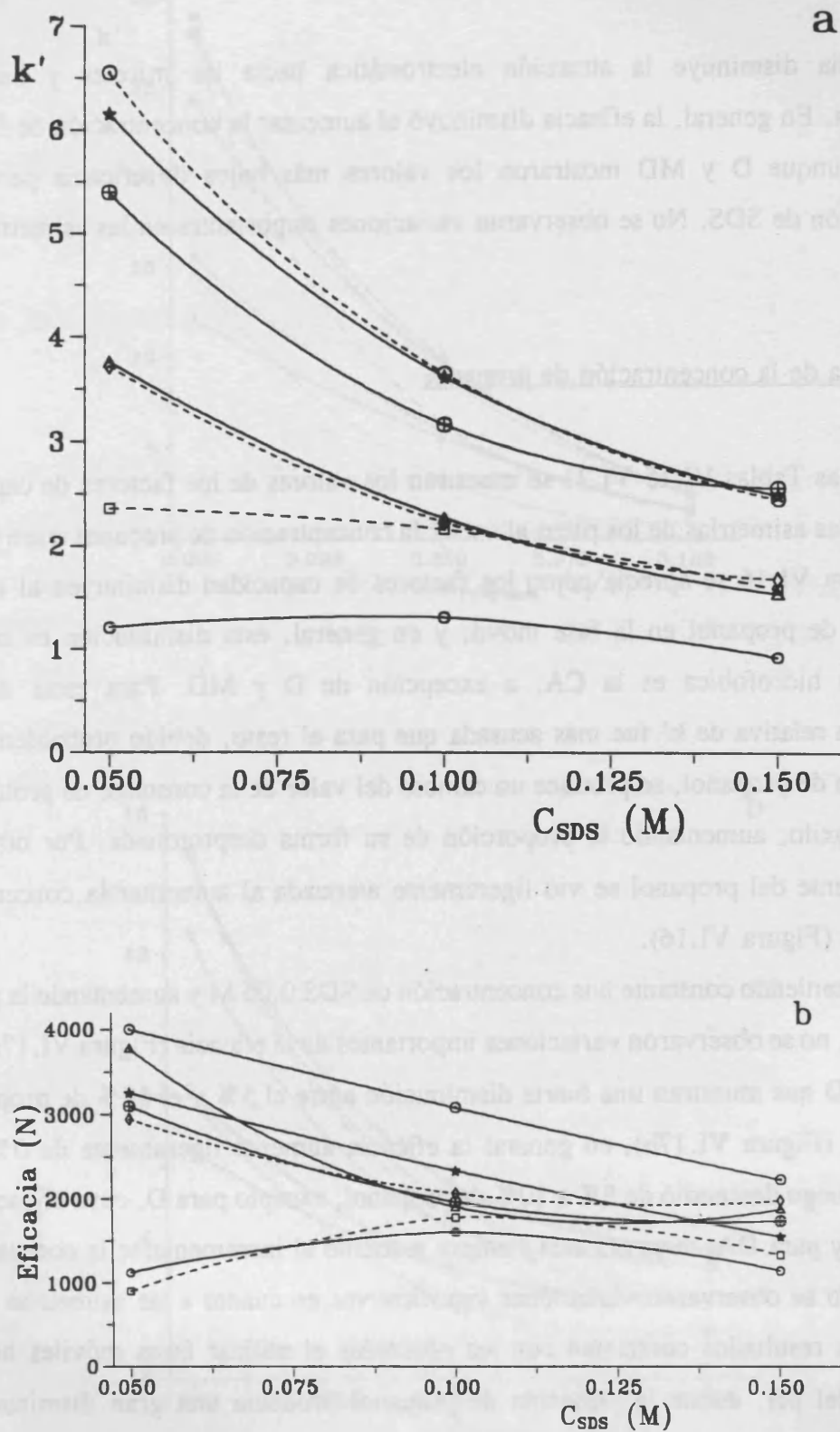


Figura VI.15.- Efecto de la concentración de SDS sobre los factores de capacidad (a) y la eficacia (b) utilizando fases móviles micelares, tamponadas a pH 3, con un 10% de propanol. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

consecuencia disminuye la atracción electrostática hacia las micelas y hacia la fase estacionaria. En general, la eficacia disminuyó al aumentar la concentración de SDS (Figura VI.15b), aunque D y MD mostraron los valores más bajos de eficacia para la menor concentración de SDS. No se observaron variaciones importantes en las asimetrías de pico.

- Influencia de la concentración de propanol

En las Tablas VI.15-VI.21 se muestran los valores de los factores de capacidad, las eficacias y las asimetrías de los picos al variar la concentración de propanol entre 0% y 10%. En la Figura VI.16 se aprecia cómo los factores de capacidad disminuyen al aumentar la proporción de propanol en la fase móvil, y en general, esta disminución es tanto mayor cuanto más hidrofóbica es la CA, a excepción de D y MD. Para estas dos CAs la disminución relativa de k' fue más acusada que para el resto, debido probablemente a que en presencia de propanol, se produce un cambio del valor de la constante de protonación del grupo carboxilo, aumentando la proporción de su forma desprotonada. Por otra parte, la fuerza eluyente del propanol se vio ligeramente atenuada al aumentar la concentración de tensioactivo (Figura VI.16).

Manteniendo constante una concentración de SDS 0.05 M y aumentando la proporción de propanol, no se observaron variaciones importantes de la eficacia (Figura VI.17a), excepto para D y MD que muestran una fuerte disminución entre el 5% y el 10% de propanol. Para SDS 0.1 M (Figura VI.17b), en general la eficacia aumentó ligeramente de 0% a 5% de propanol y luego descendió de 5% a 10% de propanol, excepto para D, cuya eficacia siempre disminuyó, y para DA, cuya eficacia siempre aumentó al incrementarse la concentración de propanol. No se observaron variaciones significativas en cuanto a las asimetrías de pico.

Estos resultados contrastan con los obtenidos al utilizar fases móviles híbridas sin regulación del pH, donde la presencia de propanol producía una gran disminución de la eficacia y un gran aumento de las asimetrías de pico, lo que hacía inviable en la práctica el uso de modificador para aumentar la fuerza eluyente de la fase móvil. A pH 3 puede utilizarse modificador para aumentar el poder eluyente de la fase móvil, si bien, en ningún caso se obtienen mejoras muy importantes de la eficacia.

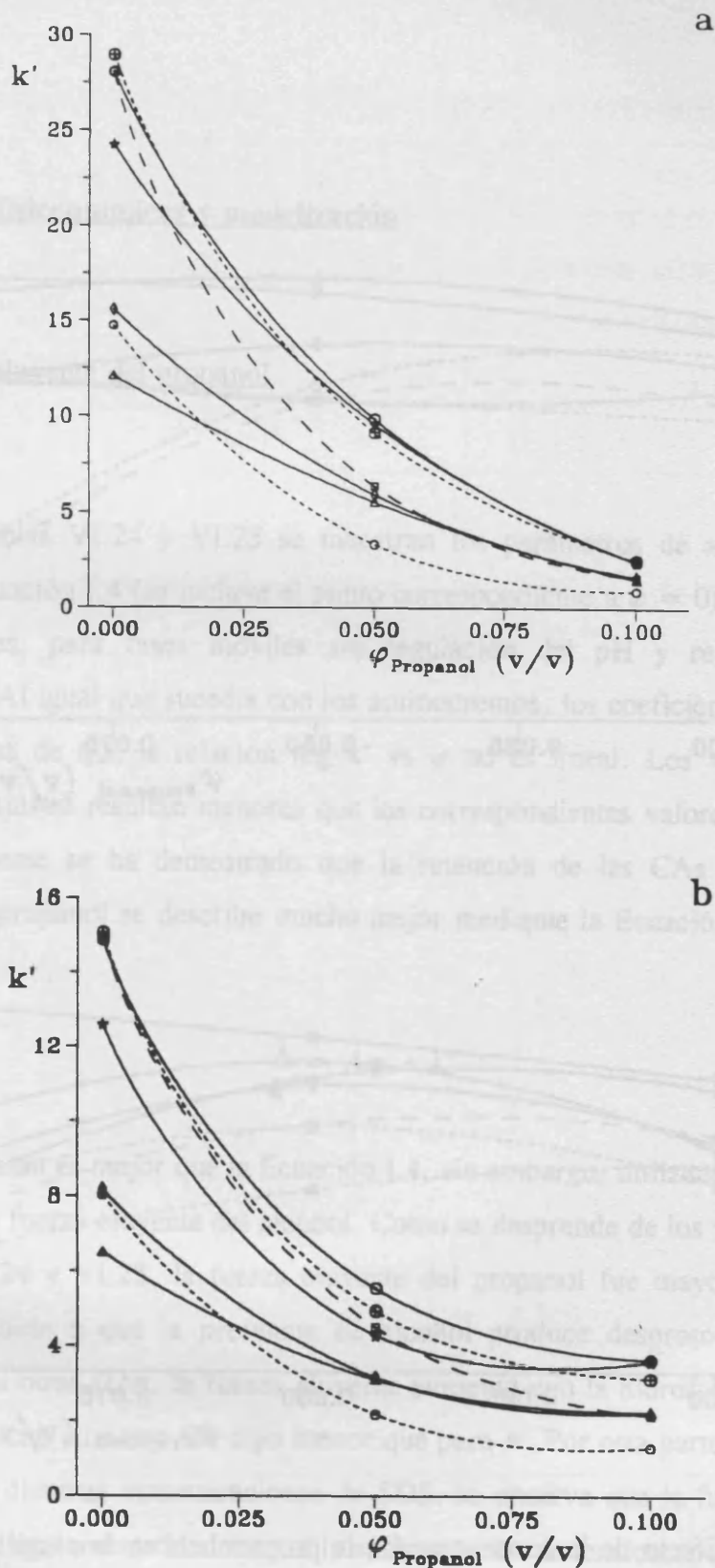


Figura VI.16.- Efecto de la concentración de propanol sobre los factores de capacidad utilizando fases móviles tamponadas a pH 3. (a) SDS 0.05 M, (b) SDS 0.1 M. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

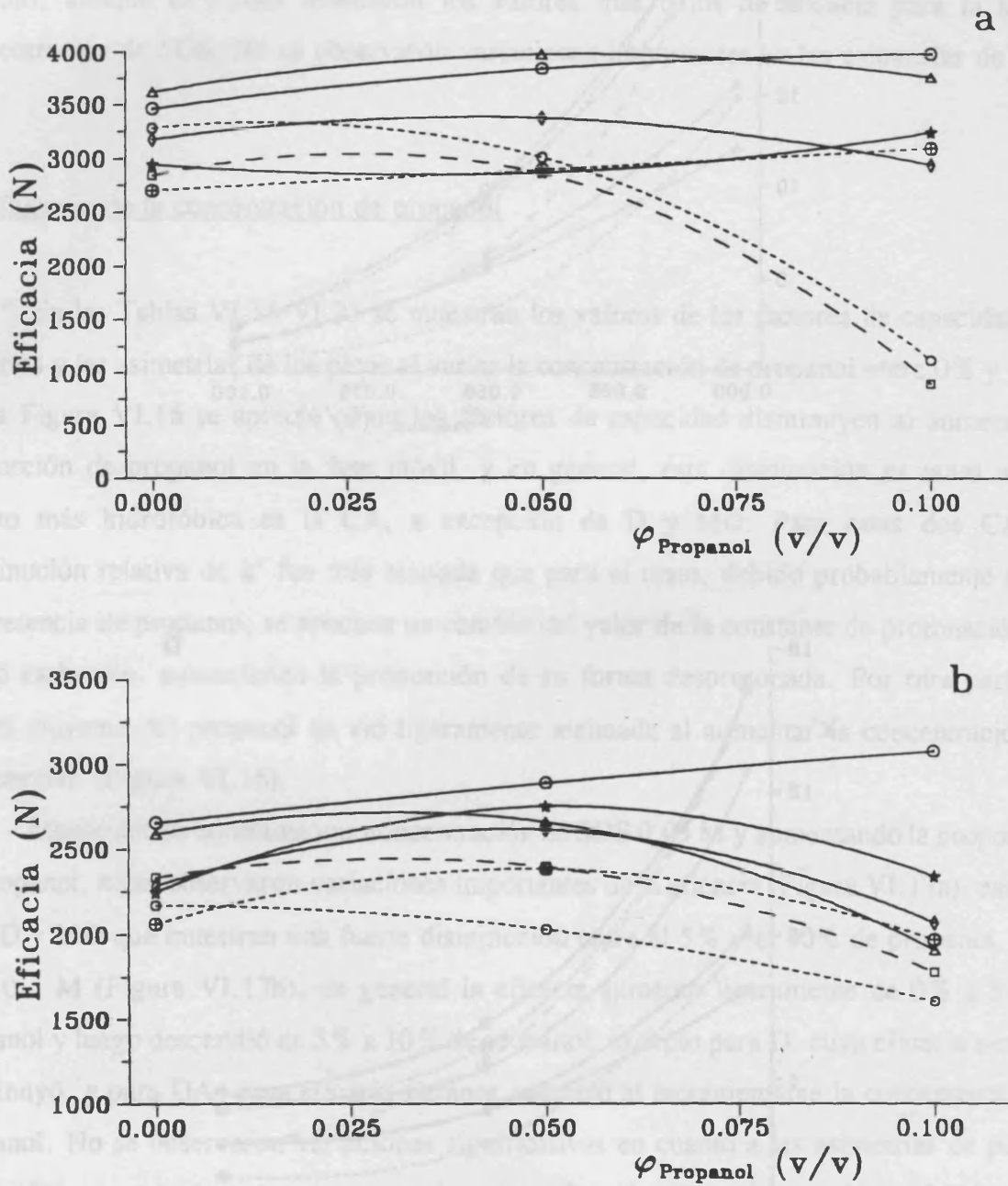


Figura VI.17.- Efecto de la concentración de propanol sobre la eficacia utilizando fases móviles tamponadas a pH 3. (a) SDS 0.05 M, (b) SDS 0.1 M. Símbolos igual que en la Figura VI.1.

VI.4.- Estudios fisicoquímicos y modelización

VI.4.1.- Fuerza eluyente del propanol

En las Tablas VI.24 y VI.25 se muestran los parámetros de ajuste obtenidos al representar la Ecuación I.4 (se incluye el punto correspondiente a $\varphi = 0$), así como los $\log k'_0$ experimentales, para fases móviles sin regulación del pH y regulados a pH 3, respectivamente. Al igual que sucedía con los aminocromos, los coeficientes de correlación son bajos, a causa de que la relación $\log k'$ vs φ no es lineal. Los valores de $\log k'_0$ obtenidos de los ajustes resultan menores que los correspondientes valores experimentales.

Recientemente se ha demostrado que la retención de las CAs en función de la concentración de propanol se describe mucho mejor mediante la Ecuación VI.1 (18):

$$\frac{1}{k'} = A\varphi + C \quad \text{[VI.1]}$$

Esta expresión es mejor que la Ecuación I.4, sin embargo, utilizando la Ecuación I.4 puede evaluarse la fuerza eluyente del alcohol. Como se desprende de los valores mostrados en las Tablas VI.24 y VI.25, la fuerza eluyente del propanol fue mayor para D y MD, probablemente debido a que la presencia de alcohol produce desprotonación del grupo carboxilo. Para las otras CAs, la fuerza eluyente aumentó con la hidrofobicidad de la CA, aunque para AO dicho aumento fue algo menor que para A. Por otra parte, al comparar los valores de S para distintas concentraciones de SDS, se observa que la fuerza eluyente del propanol se atenúa ligeramente al aumentar la concentración de tensioactivo. Las variaciones de la fuerza eluyente concuerdan con las observadas en apartados anteriores.

Tabla VI.24.- Fuerza eluyente (S) y predicción de valores de $\log k'_0$ en presencia de propanol. Fases móviles sin regulación del pH.

CA	C_{SDS} (M)	$\log k'_{0,exp}$	S	$\log k'_{0,cal}$	r
Noradrenalina	0.035	1.3	3.8	1.3	0.99
	0.093	0.84	3.4	0.82	0.992
	0.15	0.60	3.3	0.59	0.994
Adrenalina	0.035	1.4	5.1	1.4	0.98
	0.093	0.92	4.3	0.90	0.98
	0.15	0.70	4.2	0.67	0.97
Adrenalona	0.035	1.6	5.0	1.6	0.9998
	0.093	1.1	3.4	1.1	0.97
	0.15	0.89	3.5	0.85	0.96
Dopamina	0.035	1.7	6.1	1.7	0.99
	0.093	1.2	5.2	1.2	0.98
	0.15	0.97	5.1	0.97	0.9998
Isoprenalina	0.035	1.7	6.7	1.7	0.98
	0.093	1.2	5.8	1.2	0.98
	0.15	0.99	5.7	0.99	0.9998

Tabla VI.25.- Fuerza eluyente (S) y predicción de $\log k'_{0}$ en presencia de propanol a pH 3.

CA	C_{SDS} (M)	$\log k'_{0,exp}$	S	$\log k'_{0,cal}$	r
L-Dopa	0.05	1.2	10.9	1.1	0.994
	0.10	0.90	7.9	0.85	0.97
2-Metildopa	0.05	1.5	10.8	1.4	0.993
	0.10	1.2	8.0	1.1	0.99
Noradrenalina	0.05	1.1	5.1	1.1	0.98
	0.10	0.81	4.6	0.78	0.98
Adrenalina	0.05	1.2	6.2	1.2	0.98
	0.10	0.91	5.6	0.87	0.97
Adrenalona	0.05	1.4	6.0	1.4	0.98
	0.10	1.1	5.4	1.0	0.92
Dopamina	0.05	1.5	6.3	1.4	0.97
	0.10	1.2	6.1	1.1	0.97
Isoprenalina	0.05	1.5	7.3	1.4	0.98
	0.10	1.2	6.8	1.1	0.97

VI.4.2.- Determinación de K_{AM} y ΦP_{SW}

Utilizando la Ecuación I.2 se obtuvieron los valores de K_{AM} y ΦP_{SW} para diversos medios micelares (Tablas VI.26 y VI.27). Las cmc se estimaron como se indica en el apartado V.2.c y se muestran en la Tabla VI.28.

La utilización de fases móviles micelares puras reguladas a pH 3 permitió el cálculo de K_{AM} y ΦP_{SW} para D y MD, ya que en dicho medio resultaron adecuadamente retenidas. A este pH, tanto K_{AM} como ΦP_{SW} aumentaron con la hidrofobicidad de la CA. La introducción de un 10% de propanol hizo disminuir el valor de ambos coeficientes de reparto. La disminución fue mayor para D y MD, probablemente debido a que la presencia de propanol favorece la desprotonación del grupo carboxilo.

A pH 7, D y MD presentaron valores muy bajos de K_{AM} y ΦP_{SW} . A este pH ambas CAs poseen desprotonado el grupo carboxilo, por lo que experimentarán repulsión electrostática por las micelas y la fase estacionaria. Sin embargo, se siguen comportando como compuestos débilmente asociados a las micelas a causa de la atracción hidrofóbica. Para el resto de las CAs, al igual que ocurría a pH 3, los valores más altos de K_{AM} y ΦP_{SW} correspondieron a las CAs más hidrofóbicas. Para la AO se obtuvo un valor nulo de la ordenada en el origen, indicando un valor elevado de K_{AM} y ΦP_{SW} , probablemente relacionado con una tautomerización ceto-enólica a este pH. La ISO a pH 7 posee unos valores de K_{AM} y ΦP_{SW} anormalmente bajos, ya que es la CA más hidrofóbica. Sin embargo, si se consideran los valores de las constantes de protonación, a este pH es importante la forma de ión doble, lo que daría lugar a una disminución de la afinidad por las micelas y la fase estacionaria.

Cuando se utilizaron fases móviles micelares puras y sin regulación del pH, se obtuvieron ordenadas en el origen prácticamente nulas o negativas para todas las CAs, lo que impidió el cálculo de K_{AM} y ΦP_{SW} . Al adicionar un 5% de propanol, las ordenadas en el origen siguieron siendo nulas, excepto para la NA, que es la CA más hidrofílica. Para 10% de propanol, únicamente la AO dió lugar a una ordenada en el origen nula.

Un valor negativo de la ordenada en el origen no tiene significado físico. En la bibliografía se han descrito unos pocos casos en los que la ordenada en el origen es negativa. Arunyanart y col. (19) obtuvieron un valor negativo para el perileno con SDS y una columna C_{18} . Khaledhi y col. (20) informaron de ordenadas en el origen negativas para etilbenceno

y hexilbenceno usando fases micelares de SDS y CTAB y columnas C_8 y C_{18} , y consideraron como posible causa el error de medida. Posteriormente Hinze y col. (21) obtuvieron ordenadas en el origen negativas para el butilbenceno y sus homólogos de mayor peso molecular, con fases móviles micelares de tensioactivos no iónicos. Estos autores no encontraron evidencia de que las ordenadas en el origen negativas pudieran ser debidas a errores técnicos, tanto de procedimiento como instrumentales, sin embargo, observaron que las ordenadas en el origen negativas podían tomarse aproximadamente como de valor cero al tener en cuenta la desviación típica.

Por el contrario, una ordenada en el origen nula tiene significado físico, indica que P_{sw} es muy grande. Los compuestos descritos en la bibliografía que muestran este comportamiento son muy apolares, insolubles en agua y manifiestan una fuerte atracción de carácter hidrofóbico por las micelas.

Para las CAs, en los casos en que se ha obtenido una ordenada en el origen negativa (Tabla VI.29), los valores son inferiores a la desviación típica de la misma, por lo que pueden considerarse nulas, lo cual implica un valor muy alto de P_{sw} . Además, como puede deducirse de los valores de la pendiente, los valores de K_{AM} deben ser también muy altos. Por tanto, las CAs presentan una gran afinidad tanto por las micelas como por la fase estacionaria. Esta afinidad no puede justificarse únicamente por interacciones hidrofóbicas, sino por la fuerte atracción electrostática entre el grupo amino protonado y la superficie cargada negativamente de la micela o de la fase estacionaria.

Tabla VI.26. - Valores de K_{AM} en diversos medios micelares.

CA	Sin tampón			pH 3		pH 7
	0	5	10	% de PrOH ^a		
	0	5	10	0	10	0
L-dopa	-	-	-	60	4	1
Metildopa	-	-	-	130	7	1
Noradrenalina	- ^a	310	440	80	50	90
Adrenalina	- ^a	- ^a	210	120	30	110
Adrenalona	- ^a	- ^a	- ^a	170	50	- ^a
Dopamina	- ^a	- ^a	230	210	90	400
Isoprenalina	- ^a	- ^a	260	290	20	70

^a No se pudo obtener por ser la ordenada en el origen menor que el error del ajuste

Tabla VI.27.- Valores de ΦP_{sw} en diversos medios micelares.

CA	Sin tampón		pH 3		pH 7
	5	10	% de PrOH		
			0	10	0
L-dopa	-	-	60	1	< 1
Metildopa	-	-	200	3	< 1
Noradrenalina	120	120	60	10	70
Adrenalina	- ^a	60	100	10	100
Adrenalona	- ^a	- ^a	210	20	- ^a
Dopamina	- ^a	100	310	40	600
Isoprenalina	- ^a	100	420	10	130

^a No se pudo obtener, por ser la ordenada en el origen menor que el error del ajuste

Tabla VI.28.- Concentración micelar crítica en diferentes medios micelares.

Medio micelar	cmc (M)
SDS	8.0×10^{-3}
SDS-5% PrOH	6.2×10^{-3}
SDS-10% PrOH	5.0×10^{-3}
SDS, 0.01 M Na ₂ HPO ₄ (pH = 3)	4.7×10^{-3}
SDS, 0.01 M Na ₂ HPO ₄ (pH = 3)-10% PrOH	1.9×10^{-3}
SDS, 0.01 M Na ₂ HPO ₄ (pH = 7)	4.4×10^{-3}

Tabla VI.29. - Resultados del análisis de regresión de la Ecuación I.2 cuando la ordenada en el origen fue muy próxima a cero.

Medio	Cat.	Pendiente	s ^a	o.origen	s ^a	r
SDS	NA	1.8	0.003	0.001	0.003	0.9995
	A	1.4	0.008	-0.0007	0.0007	0.99995
	AO	0.92	0.01	-0.0005	0.001	0.9996
	DA	0.77	0.008	-0.0019	0.0007	0.9998
	ISO	0.73	0.01	-0.0014	0.0008	0.9997
SDS-5% PrOH	A	2.7	0.08	0.004	0.007	0.9996
	AO	1.8	0.1	-0.01	0.01	0.997
	DA	1.7	0.05	-0.003	0.005	0.9995
	ISO	1.9	0.1	-0.005	0.01	0.998
SDS-10% PrOH	AO	2.2	0.3	0.002	0.03	0.990
SDS, 0.01 M Na ₂ HPO ₄ (pH = 7)	AO	0.72	0.007	0.0005	0.0008	0.99995

^a s = desviación típica de la ordenada en el origen.

VI.4.3.- Ecuaciones de retención para fases móviles de SDS en presencia de propanol

Khaledi y col. (22) señalaron que la Ecuación I.4 puede utilizarse para describir la retención de los solutos en fases móviles micelares híbridas. Nosotros (18) comprobamos que esta ecuación sólo se cumple cuando se usa metanol como modificador, lo que es debido a su baja fuerza eluyente. Por otra parte, hemos comprobado que la retención de los solutos en fases móviles micelares híbridas puede describirse más adecuadamente mediante la ecuación:

$$\frac{1}{k'} = A\mu + B\varphi + C\mu\varphi + D \quad [\text{VI.2}]$$

donde μ es la concentración de tensioactivo y φ la fracción en volumen de modificador orgánico.

Se calcularon los parámetros de la ecuación anterior para fases móviles sin tamponar y tamponadas a pH 3. Para ello se utilizó un diseño experimental de cuatro fases móviles (Figura VI.18). La concentración de SDS varió entre 0.035 M y 0.15 M para las fases móviles sin regulación del pH, y entre 0.05 M y 0.15 M para las reguladas a pH 3, y φ varió entre 0 y 0.1 en ambos casos. En la Tabla VI.30 se muestran los parámetros de ajuste para las diferentes CAs, y en las Tablas VI.31 y VI.32 se comparan, para las fases móviles que no se utilizaron en el ajuste, los valores de k' predichos mediante la ecuación anterior con los obtenidos experimentalmente.

La Ecuación VI.2 predice correctamente la retención de NA, A, AO, DA e ISO, tanto cuando se utilizan fases móviles sin regulación del pH, como a pH 3 (Tablas VI.31 y VI.32). Sin embargo, al predecir el comportamiento de D y MD se cometen errores importantes. Estos errores pueden ser debidos a que el valor del pH de la fase móvil está próximo al logaritmo de la constante de protonación de estos compuestos, y por tanto la variación de la proporción de alcohol influirá en los equilibrios ácido-base, lo cual se reflejará en su retención. La ecuación propuesta no tiene en cuenta las variaciones debidas a los equilibrios ácido-base .

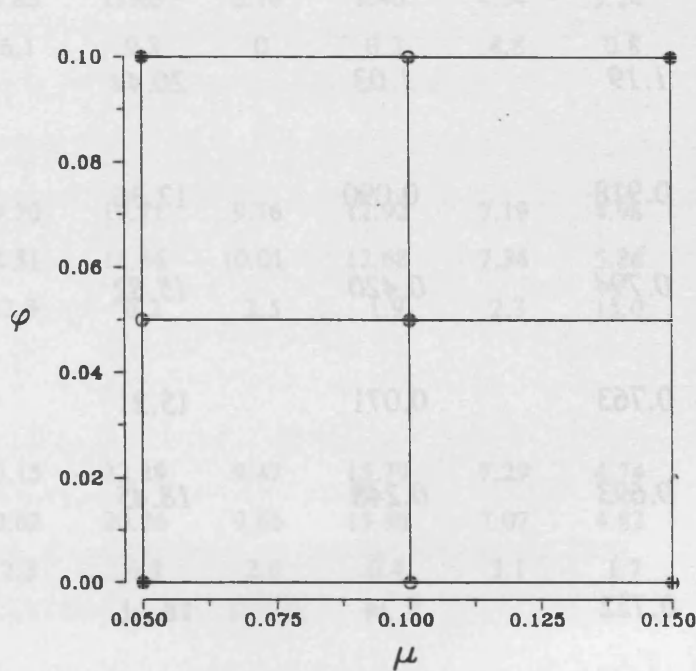
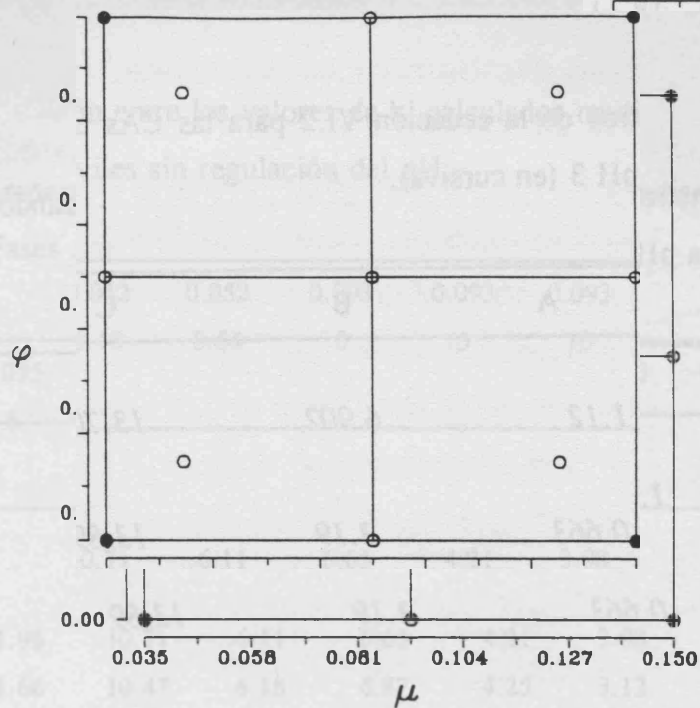


Figura VI.18.- Diagramas de diseño experimental. (●) Composición de las fases móviles utilizadas para obtener la Ecuación VI.2. (○) Composición de las fases móviles utilizadas para comprobar la bondad del modelo de ajuste. (a) Fases móviles sin regulación del pH. (b) Fases móviles tamponadas a pH 3.

Tabla VI.30.- Parámetros de la ecuación VI.2 para las CAs utilizando fases móviles sin regulación del pH y a pH 3 (en cursiva).

CA	A	B	C	D
L-Dopa	<i>1.12</i>	<i>6.902</i>	<i>13.70</i>	<i>0.012</i>
2-Metildopa	<i>0.663</i>	<i>3.19</i>	<i>13.89</i>	<i>0.002</i>
Noradrenalina	1.76	0.037	18.47	-0.012
	<i>1.43</i>	<i>0.656</i>	<i>23.59</i>	<i>0.011</i>
Adrenalina	1.41	0.114	20.67	-0.016
	<i>1.19</i>	<i>1.03</i>	<i>20.44</i>	<i>0.004</i>
Adrenalona	0.918	0.090	12.36	-0.008
	<i>0.794</i>	<i>0.420</i>	<i>15.82</i>	<i>0.001</i>
Dopamina	0.763	0.071	15.21	-0.007
	<i>0.693</i>	<i>0.248</i>	<i>18.45</i>	<i>0.001</i>
Isoprenalina	0.722	5.34	18.11	-0.006
	<i>0.690</i>	<i>0.832</i>	<i>13.49</i>	<i>0.000</i>

Tabla VI.31.- Comparación entre los valores de k' calculados mediante la ecuación VI.2 y experimentales. Fases móviles sin regulación del pH.

SDS, M	0.035	0.052	0.052	0.093	0.093	0.093	0.133	0.133	0.15
% Propanol	5	1.46	8.54	0	5	10	1.46	8.54	5
Catec.									
NA									
$k'_{\text{teórico}}$	11.98	10.71	6.11	6.65	4.21	3.08	3.87	2.30	2.55
$k'_{\text{experimental}}$	11.66	10.47	6.18	6.87	4.25	3.12	3.78	2.23	2.56
error, %	2.7	2.3	1.1	3.2	1.0	1.3	2.4	3.1	0.3
A									
$k'_{\text{teórico}}$	12.58	12.71	6.16	8.43	4.55	3.11	4.59	2.38	2.78
$k'_{\text{experimental}}$	11.85	11.63	6.16	8.40	4.34	3.14	4.13	2.20	2.55
error, %	6.1	9.3	0	0.3	4.8	0.8	11.1	8.1	8.9
AO									
$k'_{\text{teórico}}$	19.70	19.71	9.76	12.92	7.19	4.98	7.13	3.80	4.40
$k'_{\text{experimental}}$	22.51	18.56	10.01	12.68	7.36	5.86	6.42	3.99	3.91
error, %	12.5	6.2	2.5	1.9	2.3	15.0	11.1	4.7	12.5
DA									
$k'_{\text{teórico}}$	20.15	22.29	9.47	15.79	7.29	4.74	8.00	3.66	4.45
$k'_{\text{experimental}}$	20.62	20.86	9.66	15.86	7.07	4.82	7.14	3.41	4.08
error, %	2.3	6.9	2.0	0.4	3.1	1.7	11.2	7.3	9.0
ISO									
$k'_{\text{teórico}}$	18.79	21.98	8.65	16.57	6.81	4.29	7.95	3.33	4.16
$k'_{\text{experimental}}$	18.95	20.22	8.84	16.56	6.75	4.40	6.97	3.23	3.75
error, %	0.8	8.7	2.1	0.1	1.0	2.5	14.1	3.2	11.0

Tabla VI.32.- Comparación entre los valores de k' calculados mediante la ecuación VI.2 y experimentales. Fases móviles reguladas a pH 3.

SDS, M	0.05	0.10	0.10	0.10
% Propanol	5	0	5	10
Catec.				
D				
$k'_{\text{teórico}}$	2.24	8.09	1.86	1.05
$k'_{\text{experimental}}$	3.35	8.03	2.19	1.31
error, %	33.2	0.7	15.1	19.7
MD				
$k'_{\text{teórico}}$	4.35	14.54	3.36	1.90
$k'_{\text{experimental}}$	6.35	14.88	4.50	2.16
error, %	31.4	2.3	25.3	12.0
NA				
$k'_{\text{teórico}}$	5.74	6.49	3.28	2.20
$k'_{\text{experimental}}$	5.53	6.50	3.12	2.27
error, %	3.8	0.2	5.2	3.3
A				
$k'_{\text{teórico}}$	6.01	8.11	3.61	2.32
$k'_{\text{experimental}}$	5.91	8.18	3.18	2.23
error, %	1.7	0.8	13.6	4.2
AO				
$k'_{\text{teórico}}$	9.83	12.36	5.52	3.56
$k'_{\text{experimental}}$	9.59	12.60	4.29	3.62
error, %	2.5	1.9	28.8	1.8
DA				
$k'_{\text{teórico}}$	10.62	14.23	5.72	3.58
$k'_{\text{experimental}}$	9.85	14.86	5.53	3.65
error, %	7.8	4.2	3.4	2.0
ISO				
$k'_{\text{teórico}}$	9.10	14.49	5.62	3.48
$k'_{\text{experimental}}$	9.14	15.06	4.94	3.16
error, %	0.4	3.8	13.7	10.2

VI.4.4.- Evaluación cromatográfica de las constantes de protonación de D y MD

Los medios micelares producen desplazamientos de los logaritmos de las constantes de protonación (23-25). Khaleidi (26) propuso un método para calcular las constantes de protonación en medio micelar utilizando las constantes de asociación soluto-micela de las formas básica y ácida del soluto. Así, para un ácido monoprótico, con una constante de protonación en medio acuoso, K_{aq} , se puede calcular la constante de protonación en un determinado medio micelar, K_m , a partir de la expresión (26):

$$K_m = K_{aq} \frac{1 + K_{HAM}[M]}{1 + K_{AM^-}[M]} \quad [VI.3]$$

donde K_{AM^-} y K_{AHM} son las constantes de asociación soluto-micela de las especies básica y ácida, respectivamente y, $[M]$ es la concentración de SDS menos la cmc. El sentido del desplazamiento dependerá de la magnitud relativa de K_{AM^-} y K_{AHM} . El valor del desplazamiento será positivo cuando $K_{AHM} > K_{AM^-}$. La determinación de K_m mediante la Ecuación VI.3 tiene el inconveniente de que K_{AM^-} y K_{AHM} se obtienen a dos valores de pH donde predominan la forma ácida o básica del soluto.

También puede obtenerse K_m sin conocer previamente la constante de protonación en medio acuoso, mediante el tratamiento de las curvas sigmoidales obtenidas al representar el factor de capacidad frente al pH. Para ello, consideremos un sistema monoprótico con una constante de protonación K :

$$K = \frac{[HA]}{[A^-][H^+]} \quad [VI.4]$$

Para $pH \ll \log K$ predominará la especie protonada, HA, y la Ecuación I.2 puede escribirse en función de la forma ácida:

$$\frac{1}{k'_1} = \frac{K_{HAM}[M]}{\Phi(P_{SW})_{HA}} + \frac{1}{\Phi(P_{SW})_{HA}} \quad [VI.5]$$

donde k'_1 , K_{HAM} y $(P_{SW})_{HA}$ son respectivamente el factor de capacidad, la constante de asociación soluto-micela y el coeficiente de reparto entre la fase estacionaria y la seudofase acuosa de la especie HA. Reordenando:

$$k_1' = \frac{\Phi(P_{SW})_{HA}}{1 + K_{HAM}} \quad [\text{VI.6}]$$

Del mismo modo, para $\text{pH} \gg \log K$, donde predomina la especie básica, se tendrá:

$$k_0' = \frac{\Phi(P_{SW})_{A^-}}{1 + K_{AM^-}[M]} \quad [\text{VI.7}]$$

donde k_0' , K_{AM^-} y $(P_{SW})_{A^-}$ son respectivamente el factor de capacidad, la constante de asociación soluto-micela y el coeficiente de reparto entre la fase estacionaria y la seudofase acuosa de la especie A^- . Para un pH próximo a $\log K$, donde predominan ambas especies, el factor de capacidad vendrá dado por:

$$k' = k_0'\delta_0 + k_1'\delta_1 \quad [\text{VI.8}]$$

donde δ_0 y δ_1 son las fracciones molares de las especies A^- y HA , respectivamente. Teniendo en cuenta que:

$$\delta_0 = \frac{1}{1 + Kh} \quad \text{y} \quad \delta_1 = \frac{Kh}{1 + Kh} \quad [\text{VI.9}]$$

se obtiene:

$$k' = \frac{k_0' + k_1'Kh}{1 + Kh} \quad [\text{VI.10}]$$

de donde se deduce:

$$\log K = \text{pH} + \log \frac{k_0' - k'}{k' - k_1'} \quad [\text{VI.11}]$$

Para calcular los valores de $\log K$ para D y MD en un medio SDS 0.05 M mediante la Ecuación VI.3, se tomaron como valores de K_{AM^-} y K_{HAM} los obtenidos respectivamente a pH 7 y a pH 3 (Tabla VI.26). Por su parte, el cálculo de $\log K$ mediante la Ecuación VI.11 se realizó tomando como valores de k_1' y k_0' los obtenidos a pH 2 y 7, respectivamente, y hallando la media aritmética de los valores de $\log K$ obtenidos para los distintos pH s en la zona de máxima variación de k' (pH entre 3 y 5.8). Los valores de \log

K obtenidos para el D utilizando las Ecuaciones VI.3 y VI.11 fueron de 3.1 y 3.8 ± 0.1 , respectivamente. Para el MD, se obtuvieron los valores 3.3 y 4.2 ± 0.1 , respectivamente.

Las constantes de protonación en medio micelar resultaron ser mayores que las correspondientes constantes en medio acuoso (2.3 para D y 2.2 para MD, apartado I.1). Este es el sentido del desplazamiento que cabía esperar, ya que para ambas CAs K_{HAM} es mayor que K_{AM^-} . Por otra parte, se observa que el aumento de la constante de protonación al pasar del medio acuoso al micelar, es mayor para el MD que para el D. Esto es debido a que el MD es más hidrofóbico, y por consiguiente posee un valor más elevado de K_{HAM} .

VI.5. - Predicción de la mejor separación cromatográfica de las CAs endógenas

A partir de las ecuaciones de retención para fases móviles de SDS-propanol, reguladas a pH 3, mostradas en la Tabla VI.30, se puede predecir la concentración de SDS y de propanol que permita la mejor separación de las cuatro CAs endógenas D, NA, A y DA. Para ello, se tomó como criterio de optimización el producto normalizado de las resoluciones:

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{S_{i,i+1}}{\left(\sum \frac{S_{i,i+1}}{n-1} \right)^{n-1}}$$

donde $S_{i,i+1}$ es el factor de separación de dos solutos:

$$S_{i,i+1} = \frac{t_{i+1} - t_i}{t_{i+1} + t_i}$$

Para conocer la posición y la forma de los máximos de resolución se trazó el topograma correspondiente a la superficie de resolución para la separación de D, NA, A y DA (Figura VI.19).

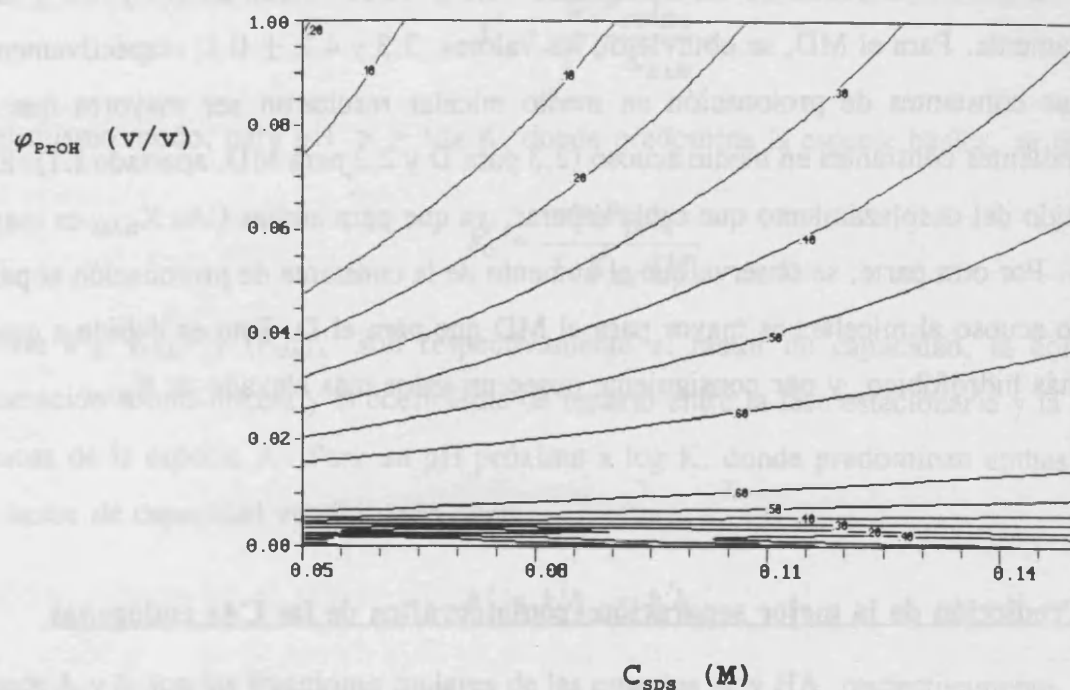


Figura VI.19.- Predicción de la resolución de una mezcla de D, NA, A y DA utilizando fases móviles de SDS-propanol a pH 3. Las curvas unen puntos con el mismo valor de r .

El máximo de resolución se obtiene para una fase móvil de composición 0.05 M SDS-1% de propanol. Utilizando esta fase móvil las cuatro CAs resultan bien separadas, pero los factores de capacidad son elevados (k' entre 7.35 y 21.1). Sin embargo, como puede predecirse a partir de la Figura VI.19, si se incrementan las concentraciones de tensioactivo (hasta 0.15 M) y ligeramente la de modificador no se pierde apenas resolución, pero disminuyen considerablemente los factores de capacidad. Los cromatogramas simulados correspondientes a estas dos fases móviles se muestran en la Figura VI.20.

En la Figura VI.21 se muestra un cromatograma real, obtenido en las mismas condiciones que el cromatograma teórico de la Figura VI.20b. Los picos de NA, A y DA aparecen a los tiempos de retención y con la forma predicha. Tan sólo el pico del D se retrasa ligeramente respecto a la posición predicha. Como se ha comentado anteriormente, ello puede ser debido a que la predicción no tiene en cuenta la posible modificación de los equilibrios de protonación originados por la presencia del modificador (apartado VI.4.3 y Tabla VI.32).

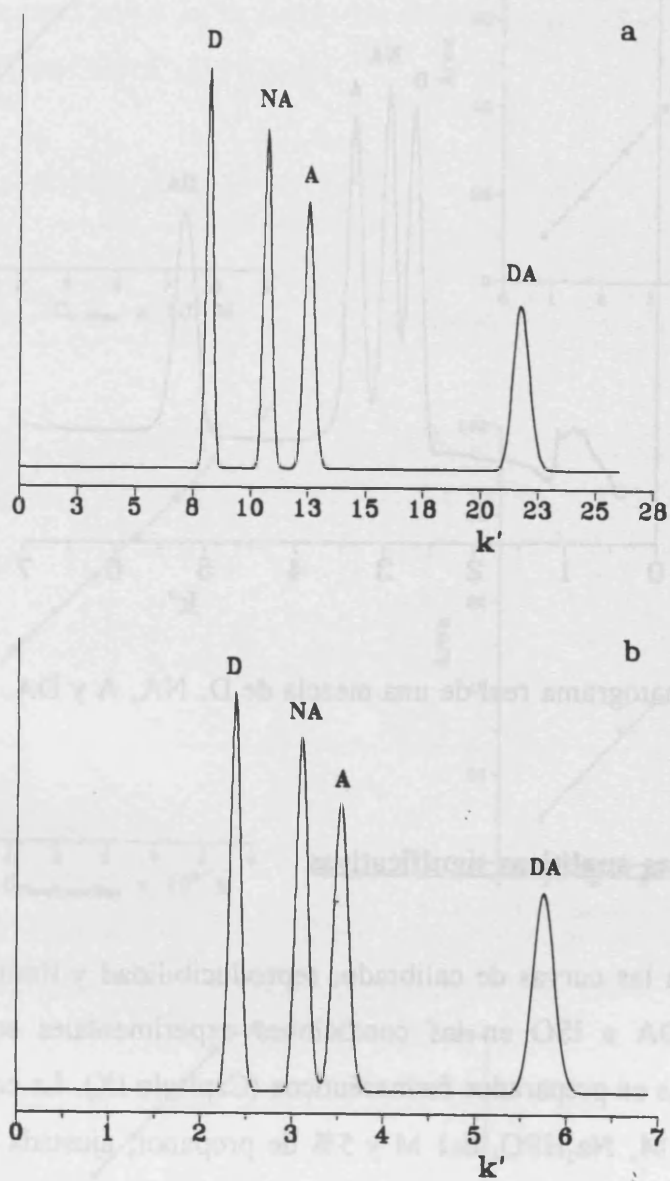


Figura VI.20.- Cromatogramas simulados de una mezcla de D, NA, A y DA. (a) 0.05M SDS-1% PrOH, (b) 0.15 M SDS-2.4% PrOH.

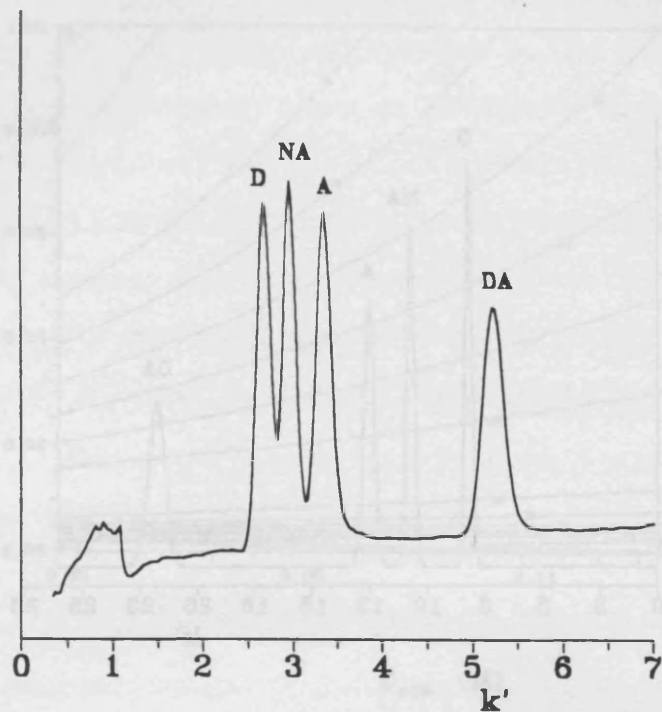


Figura VI.21.- Cromatograma real de una mezcla de D, NA, A y DA utilizando

Figura VI.21.- Cromatograma real de una mezcla de D, NA, A y DA. Fase móvil: 0.15 M SDS-2.4 % PrOH

VI.6.- Características analíticas significativas

Se obtuvieron las curvas de calibrado, reproducibilidad y límites de detección para D, MD, NA, A, DA e ISO en las condiciones experimentales seleccionadas para la determinación de CAs en preparados farmacéuticos (Capítulo IX). La composición de la fase móvil fue: SDS 0.1 M, Na_2HPO_4 0.1 M y 5% de propanol, ajustada a pH 3.00. En estas condiciones se obtiene una rápida elución de todas las CAs, los factores de capacidad se encuentran entre 2.2 y 5.5, y las eficacias son adecuadas.

VI.6.1.- Curvas de calibrado

Las disoluciones de CAs que se utilizaron para obtener las curvas de calibrado se prepararon introduciendo en aforados de 25 ml de 0.1 a 1 ml de disolución de CA 2×10^{-3} M y aforando con fase móvil. Las curvas de calibrado, expresadas en áreas y alturas, se muestran en las Figuras VI.22 y VI.23 respectivamente. Los calibrados son siempre lineales

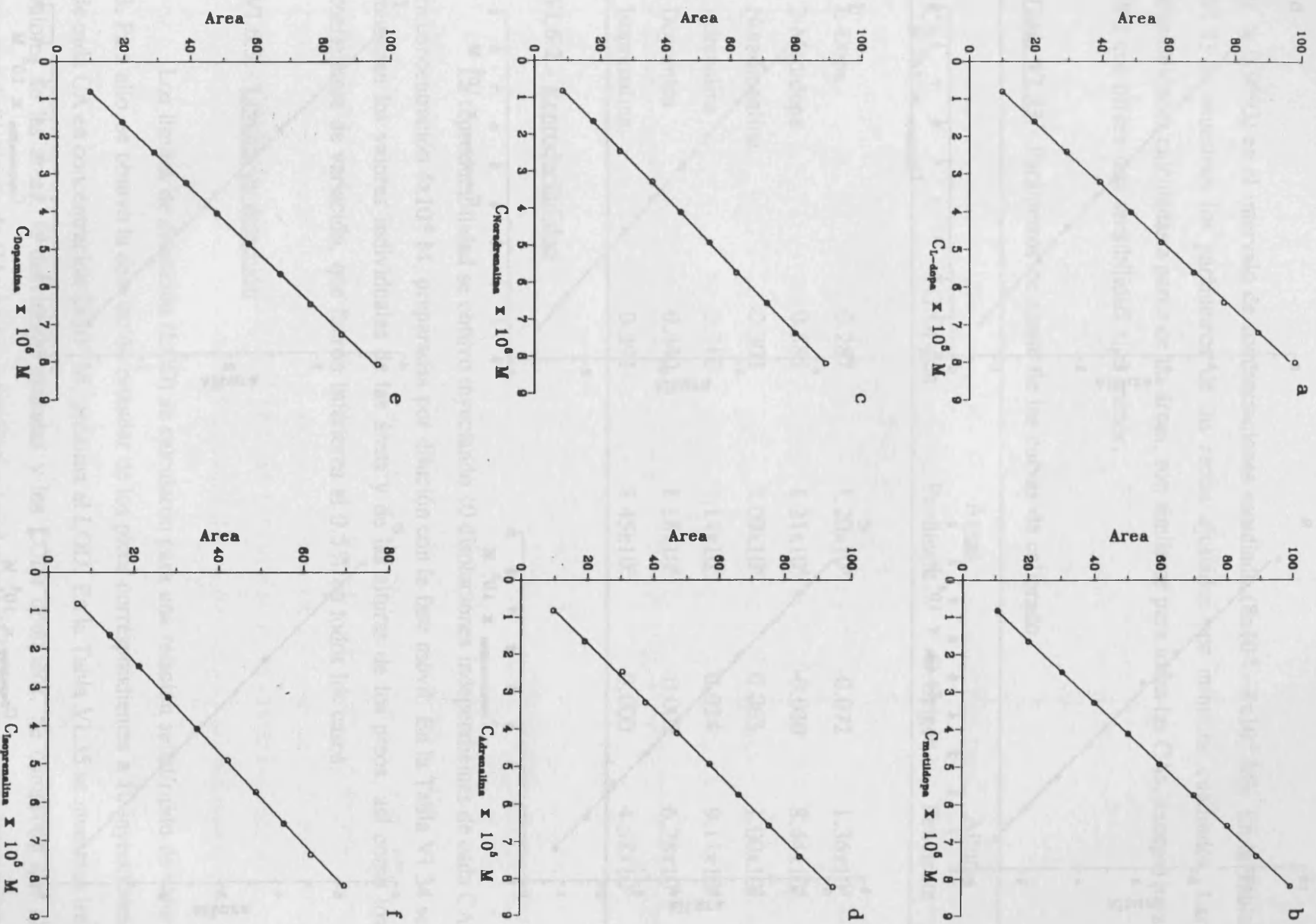


Figura VI.22.- Curvas de calibrado en áreas.

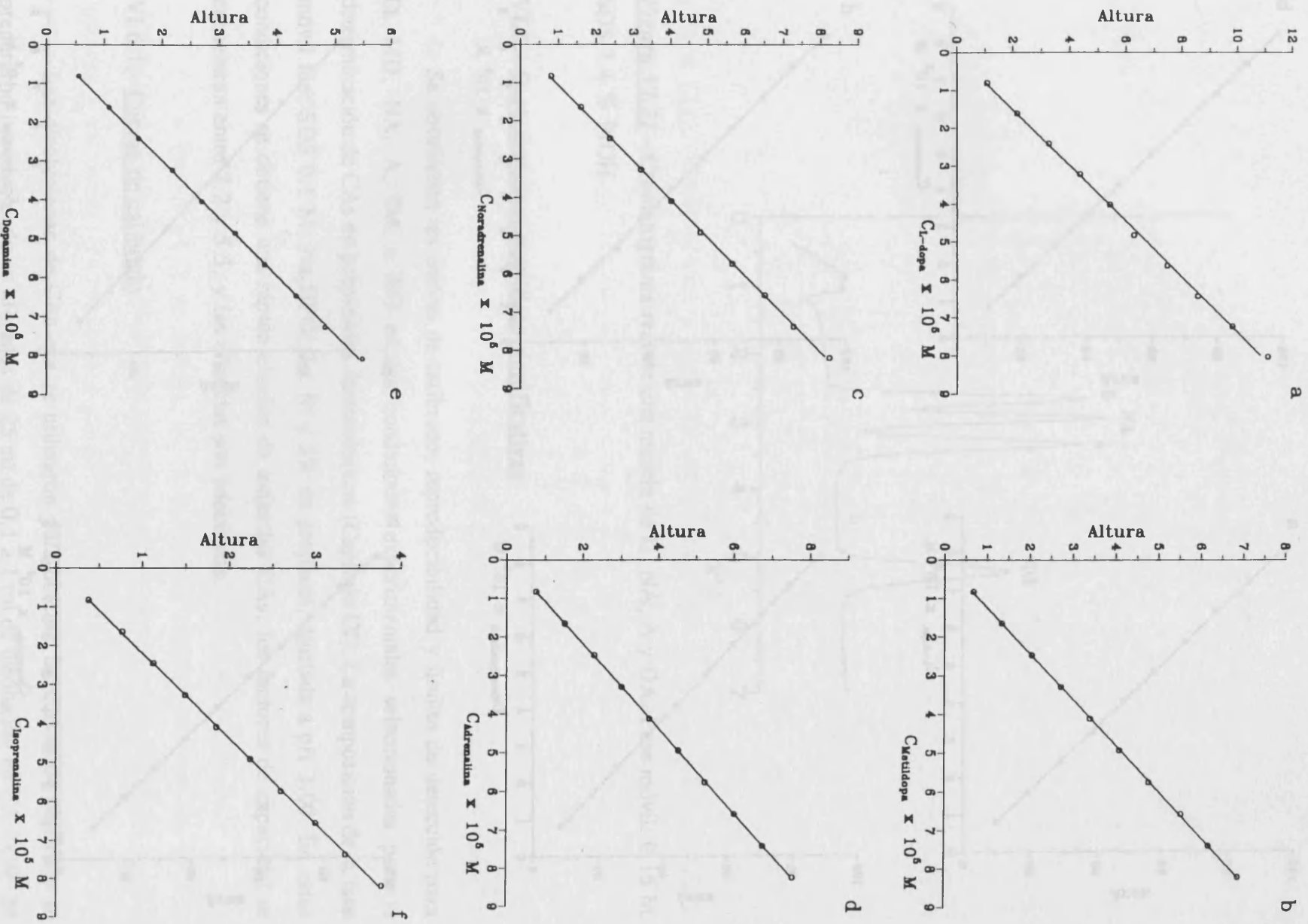


Figura VI.23.- Curvas de calibrado en alturas.

($r > 0.9993$) en el intervalo de concentraciones estudiado (8×10^{-6} - 8×10^{-5} M). En la Tabla VI.33 se muestran los parámetros de las rectas ajustadas por mínimos cuadrados. Las sensibilidades calculadas a partir de las áreas, son similares para todas las CAs, excepto para ISO que ofrece una sensibilidad algo menor.

Tabla VI.33.- Parámetros de ajuste de las curvas de calibrado.

CA	Áreas		Alturas	
	O. Origen	Pendiente	O. Origen	Pendiente
L-Dopa	0.287	1.20×10^6	-0.072	1.36×10^5
2-Metildopa	0.585	1.21×10^6	-0.030	8.44×10^4
Noradrenalina	-0.303	1.09×10^6	0.063	1.00×10^5
Adrenalina	0.710	1.14×10^6	0.024	9.11×10^4
Dopamina	0.440	1.18×10^6	-0.002	6.78×10^4
Isoprenalina	0.392	8.45×10^5	0.000	4.58×10^4

VI.6.2.- Reproducibilidad

La reproducibilidad se obtuvo inyectando 10 disoluciones independientes de cada CA en concentración 4×10^{-5} M, preparadas por dilución con la fase móvil. En la Tabla VI.34 se muestran los valores individuales de las áreas y de las alturas de los picos, así como los coeficientes de variación, que fueron inferiores al 0.5% en todos los casos.

VI.6.3.- Límites de detección

Los límites de detección (LOD) se calcularon para una relación señal/ruido de valor 3. Para ello, se obtuvo la desviación estándar de los picos correspondientes a 10 inyecciones de cada CA en concentración 2×10^{-7} M, próxima al LOD. En la Tabla VI.35 se muestran los valores de las áreas, la desviación estándar y los LODs obtenidos. Se comprobó que al inyectar disoluciones de CAs en concentraciones iguales a los LODs, no se obtuvieron picos cromatográficos distinguibles a simple vista del ruido de fondo. En la Figura VI.24 se muestran los picos obtenidos al inyectar disoluciones 1×10^{-7} M de cada CA.

Tabla VI.34.-Reproducibilidad.

Inyección	D	MD	Area /altura		DA	ISO
			NA	A		
1	48.267	50.629	44.264	47.473	47.681	34.623
	5.491	3.454	4.097	3.770	2.719	1.875
2	48.394	50.285	44.267	47.310	47.651	34.670
	5.488	3.451	4.096	3.760	2.715	1.878
3	48.373	50.229	44.323	47.431	47.741	34.637
	5.476	3.442	4.092	3.768	2.708	1.880
4	48.403	50.282	44.316	47.482	47.835	34.677
	5.467	3.458	4.099	3.774	2.718	1.881
5	48.477	50.312	44.393	47.290	48.023	34.746
	5.481	3.459	4.099	3.776	2.722	1.883
6	48.573	50.269	44.344	47.471	47.911	34.688
	5.473	3.457	4.105	3.776	2.724	1.886
7	48.509	50.532	44.446	47.422	47.967	34.800
	5.474	3.468	4.107	3.774	2.725	1.890
8	48.567	50.596	44.405	47.492	47.792	34.791
	5.492	3.473	4.105	3.773	2.730	1.884
9	48.615	50.559	44.587	47.552	47.979	34.774
	5.514	3.470	4.111	3.773	2.736	1.893
10	48.588	50.508	44.586	47.470	47.965	34.794
	5.514	3.454	4.118	3.781	2.756	1.900
\bar{x}	48.5	50.4	44.4	47.4	47.9	34.7
	5.49	3.459	4.102	3.773	2.73	1.885
s	0.11	0.16	0.12	0.081	0.13	0.07
	0.016	0.009	0.008	0.005	0.013	0.008
CV (%)	0.2	0.3	0.26	0.2	0.3	0.2
	0.3	0.3	0.19	0.15	0.5	0.4

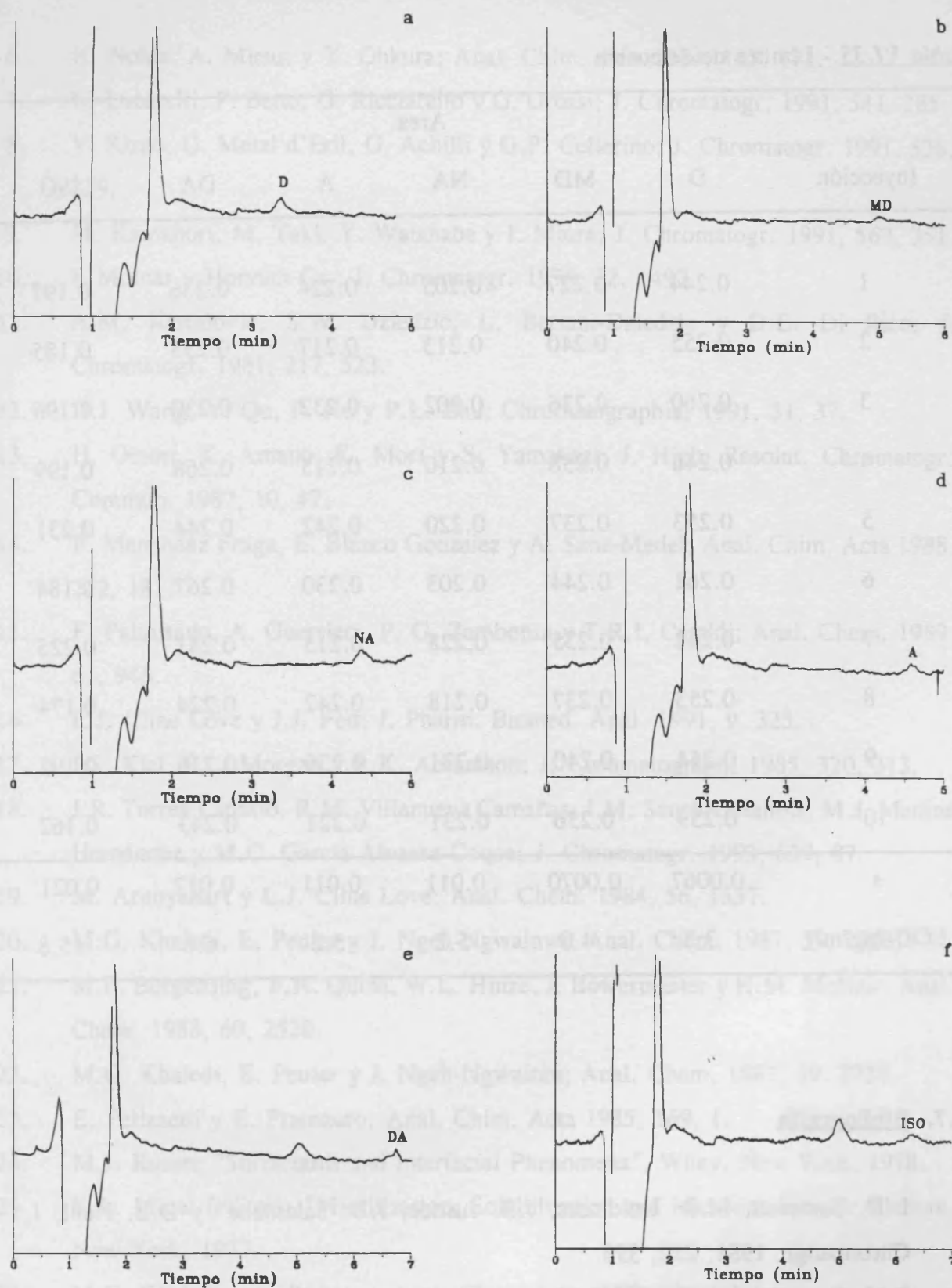


Figura VI.24.- Cromatogramas de las catecolaminas a concentración 1×10^{-7} M. (a) D, (b) MD, (c) NA, (d) A, (e) DA, (f) ISO.

Tabla VI.35. - Límites de detección.

Inyección	Area					
	D	MD	NA	A	DA	ISO
1	0.244	0.227	0.205	0.224	0.236	0.197
2	0.255	0.240	0.213	0.217	0.253	0.185
3	0.260	0.236	0.202	0.232	0.230	0.196
4	0.246	0.258	0.210	0.215	0.268	0.199
5	0.253	0.237	0.220	0.242	0.244	0.231
6	0.261	0.244	0.203	0.230	0.267	0.184
7	0.242	0.235	0.228	0.215	0.241	0.225
8	0.253	0.237	0.218	0.242	0.224	0.174
9	0.254	0.240	0.231	0.239	0.216	0.192
10	0.259	0.236	0.231	0.221	0.243	0.162
s	0.0067	0.0070	0.011	0.011	0.017	0.021
LOD (ng/ml)	3.3	4.0	5.2	5.2	6.6	15.8

VI.7.- Bibliografía

1. L.D. Saraswat, M.R. Holdiness, J.B. Justice, J.D. Salamone y D.B. Neill; *J. Chromatogr.* 1981, 222, 353.
2. P.M. Froehlich y T.D. Cunningham; *Anal. Chim. Acta.* 1978, 97, 357.
3. T. Seki, Y. Yanagihara y K. Noguchi; *J. Chromatogr.* 1990, 515, 435.
4. H.J. Weicker; *Sports. Med.* 1988, 9, 68.
5. T.P. Davis; *J. Chromatogr.* 1979, 162, 293.

6. H. Nohta, A. Mitsui y Y. Ohkura; *Anal. Chim. Acta* 1984, 165, 171.
7. C. Lucarelli, P. Betto, G. Ricciarello y G. Grossi; *J. Chromatogr.* 1991, 541, 285.
8. V. Rizzo, G. Melzi d'Eril, G. Achilli y G.P. Cellerino; *J. Chromatogr.* 1991, 536, 229.
9. M. Kamahori, M. Taki, Y. Watanabe y J. Miura; *J. Chromatogr.* 1991, 567, 351.
10. I. Molnár y Horváth Cs.; *J. Chromatogr.* 1976, 22, 1497.
11. A.M. Krstulovic, S.W. Dziedzic, L. Bertani-Dziedzic y D.E. Di Rico; *J. Chromatogr.* 1981, 217, 523.
12. D.J. Wang, Y. Qu, P. Hu y P.L. Zhu; *Chromatographia*; 1991, 31, 37.
13. H. Omori, K. Amano, K. Mori y S. Yamakazi; *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* 1987, 10, 47.
14. P. Menendez Fraga, E. Blanco Gonzalez y A. Sanz-Medel; *Anal. Chim. Acta* 1988, 212, 181.
15. F. Palmisano, A. Guerrieri, P. G. Zambonin y T.R.I. Cataldi; *Anal. Chem.* 1989, 61, 946.
16. L.J. Cline Love y J.J. Fett; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9, 323.
17. J.S. Kiel, S.L. Morgan y R.K. Abramson; *J. Chromatograph.* 1985, 320, 313.
18. J.R. Torres Lapasió, R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, M.J. Medina Hernández y M.C. García Alvarez-Coque; *J. Chromatogr.* 1993, 639, 87.
19. M. Arunyanart y L.J. Cline Love; *Anal. Chem.* 1984, 56, 1557.
20. M.G. Khaledi, E. Peuler y J. Ngeh-Ngwainwi; *Anal. Chem.* 1987, 59, 2738.
21. M.F. Borgerding, F.H. Quina, W.L. Hinze, J. Bowermaster y H.M. McNair; *Anal. Chem.* 1988, 60, 2520.
22. M.G. Khaledi, E. Peuler y J. Ngeh-Ngwainbi; *Anal. Chem.* 1987, 59, 2738.
23. E. Pelizzetti y E. Pramauro; *Anal. Chim. Acta* 1985, 169, 1.
24. M.J. Rosan; "Surfactants and interfacial Phenomena", Wiley, New York, 1978.
25. K.L. Mittal (editor); "Micellization, Solubilization and Microemulsions"; Plenum, New York, 1977.
26. M.G. Khaledi y A. Rodgers; *Anal. Chim. Acta* 1990, 239, 121.

**VII.- DETERMINACION DE LA SUMA DE CATECOLAMINAS
NO CONJUGADAS EN ORINA MEDIANTE ELT**

VII.- DETERMINACION DE LA SUMA DE CATECOLAMINAS NO CONJUGADAS EN ORINA MEDIANTE ELT

VII.1.- Introducción

Las CAs son metabolizadas en los organismos vivos dando lugar a ácido vanililmandélico, metanefrina, normetanefrina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, 3-metoxi-4-hidroxifenilacético, y ácido homovanílico, entre otros metabolitos presentes en la orina. También se eliminan en la orina pequeñas cantidades de DA, NA, A y D, bien en forma no conjugada o conjugada con los ácidos glucurónico y sulfúrico (1). Las CAs no conjugadas representan generalmente del 2 al 4% de las CAs totales excretadas por el organismo (2). El contenido en CAs no conjugadas posee mayor valor diagnóstico, ya que el intervalo de concentraciones de las CAs totales es más amplio y, por otra parte, las CAs provenientes de la dieta, que aparecen en forma conjugada, pueden interferir en la interpretación de los resultados (2).

Las concentraciones de CAs no conjugadas son afectadas por factores físicos y síquicos, y también por algunas enfermedades. Así por ejemplo, el estrés, la fatiga, la hipertensión esencial, y la presencia de ciertos tumores productores de CAs como el feocromocitoma incrementan el contenido de CAs libres. También, la acción farmacológica de algunos compuestos como fenotiacina y nitroglicerina pueden provocar un aumento del nivel de CAs. Por el contrario, otros compuestos como α -metildopa e inhibidores de la MAO pueden disminuir el mismo (2).

El nivel de CAs no conjugadas en plasma puede además ser afectado por otras variables, en ocasiones difíciles de controlar, como pueden ser la postura del paciente durante la toma de muestra y el procedimiento utilizado para tomarla (3). Por ello, en análisis clínico se suele determinar el contenido de CAs en orina y no en plasma. Las concentraciones de CAs no conjugadas en orina son mucho más altas que en plasma. En plasma los valores están comprendidos en el intervalo de 0.1 a 0.8 ng/ml. En orina, utilizando las unidades en las que se suelen expresar los resultados ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$), los valores normales son: < 3 para DA, < 0.47 para NA y < 0.11 para A (4).

Nohta y col. (5) determinaron el contenido de CAs libres en orina procedente de 15 personas no patológicas, hombres y mujeres de entre 21 y 56 años, mediante HPLC con derivatización postcolumna (oxidación coulombimétrica seguida de reacción fluorogénica con 1,2-difeniletildiamina). A partir de los datos obtenidos por estos autores se puede calcular el contenido total de CAs no conjugadas, que oscila entre 2.2 y 4.3 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$, siendo el valor medio de $2.8 \pm 0.7 \mu\text{mol}/24\text{ h}$. A partir de los datos hallados por Wisser y Knoll (6), el valor medio del contenido normal de CAs libres en orina resulta ser de 2.0 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$.

Para tener una idea del valor que la concentración de CAs en orina puede alcanzar en determinados estados patológicos, en la Tabla VII.1 se muestran los resultados de los análisis de una muestra procedente de un sujeto con hipertensión esencial, antes y después de ser sometido a un tratamiento con α -metildopa (7).

Tabla VII.1.- Concentración de CAs no conjugadas de un sujeto con hipertensión esencial sometido a tratamiento.

Días bajo tratamiento	C_{CA} (nmol/día)		
	Noradrenalina	Adrenalina	Dopamina
	222	2682	5169
4	163	736	3243
5	174	48	2451
6	203	43	2057

Además de la determinación cromatográfica de CAs con detección electroquímica, con frecuencia se utilizan también reacciones fluorogénicas, como el popular método del trihidroxiindol (THI) (8,9), el acoplamiento oxidativo con glicilglicina (10), 2-cianoacetamida (11) o con derivados de etilendiamina (12), derivatización del grupo amino con fluorescamina (13), o-ftaldehido (OPA) (14) o con cloruro de dansilo (7).

La mayoría de estas reacciones requieren calentamiento, son lentas y dan lugar a grandes diferencias de sensibilidad entre los derivados formados. Así, por ejemplo, la sensibilidad del derivado THI para la DA es unas 800 veces más pequeña que para los derivados de A y NA. La A, por ser una amina secundaria, no forma derivados fluorescentes con fluorescamina ni con OPA (15). Por consiguiente, es interesante desarrollar un procedimiento capaz de determinar sin ambigüedad la suma de las concentraciones de las cuatro CAs endógenas en fluidos fisiológicos.

En este apartado proponemos un procedimiento de determinación del contenido global de CAs no conjugadas en orina. El procedimiento se basa en la oxidación de las CAs a los correspondientes aminocromos de color rojo y evaluación de los mismos, mediante espectroscopía de lente térmica. Los espectros de absorción de los aminocromos muestran una banda ancha hacia 490 nm, sin embargo, la sensibilidad es insuficiente para evaluar espectrofotométricamente el contenido de CAs en muestras fisiológicas, ya que las absorptividades molares están entre 2500 y $3400 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$ (16). Los aminocromos absorben las líneas de emisión más intensas del láser de ión Ar^+ , 488 y 514.5 nm, por lo que es posible combinar la alta sensibilidad que ofrece la técnica con una sencilla reacción de oxidación de los analitos para determinar los mismos en fluidos fisiológicos.

En el Capítulo III de esta memoria se han expuesto una serie de estudios acerca de como influyen las variables experimentales en la reacción de derivatización a aminocromos y en la detección de los mismos mediante ELT. Los aminocromos poseen valores de absorptividad molar y sensibilidades en ELT similares, por ello parece posible el uso de la ELT para determinar la suma de CAs no conjugadas en fluidos biológicos utilizando una de ellas como estándar de calibración. En este capítulo se propone el uso de la DA como patrón.

El procedimiento que se propone hace uso del método de adición estándar utilizando DA como patrón, y se aplica a muestras de orina procedentes de sujetos no patológicos, así como a muestras de orina con contenidos anormalmente altos de CAs. El resultado de los análisis, expresado como "índice de dopamina", puede tener valor diagnóstico.

VII.2.- Parte experimental

a) Aparatos

- Espectrómetro de ELT (Sección III.2.a). La longitud de onda fue 514.5 nm, la potencia de bombeo 100 mW y la frecuencia de modulación 4 Hz. Los datos fueron adquiridos como se indica en III.2.a.
- Espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard, modelo 8452A.

b) Reactivos

- Etanol absoluto, ácido acético glacial y ácido clorhídrico de Panreac, para análisis.
- Disoluciones 2×10^{-3} M de D, NA, A y DA preparadas como se indica en III.2.b. Para el estudio de recuperación de CAs se utilizaron disoluciones de CAs puras y mezclas de CAs. Para simular una muestra de un sujeto patológico se utilizaron las siguientes concentraciones: 1.7×10^{-7} M A, 1.3×10^{-6} M NA, 8.0×10^{-6} M DA y 1.6×10^{-7} D, y la disolución resultante se denominó "mezcla A". Para simular una muestra de un sujeto normal se diluyó la mezcla A a la quinta parte (mezcla B).
- Disolución acuosa de $K_3Fe(CN)_6$ 0.0125 M preparada a partir del producto sólido, Merck, para análisis.
- Disoluciones reguladoras de citrato de diversas concentraciones, preparadas a partir de ácido cítrico (Panreac, para análisis) y NaOH, ajustando potenciométricamente el pH con disolución de NaOH.
- Disolución tampón Tris 0.25 M de pH 8.5, preparada a partir tris-(hidroximetil)-aminometano, conteniendo 1.5% de dihidrogeno-etilendiamino-tetraacetato sódico (Na_2H_2EDTA). El pH se ajustó potenciométricamente con disolución de NaOH.

- Oxido de aluminio, tipo 504C, ácido, actividad I según escala Brockmann, de Fluka para cromatografía. Se utilizó una columna de un centímetro de diámetro interno, cuyo extremo inferior estaba tapado con una placa de vidrio sinterizado y lana de vidrio. La altura de la fase sólida fue de 2 cm. Para preparar la columna se suspendió la alúmina en agua destilada, se agitó y se dejó decantar durante 2 min, eliminándose el líquido sobrenadante. Esta operación se repitió tres veces. A continuación se lavó dos veces con disolución amortiguadora de Tris. Por último, se suspendió la alúmina en la disolución amortiguadora de Tris y se introdujo en la columna. La columna, se conservó siempre con la disolución de Tris.
- Columnas de extracción en fase sólida (EFS) Bond-Elut SCX, acondicionadas previamente pasando metanol y ácido clorhídrico 0.1 M. Columnas de EFS C2, C8 y C18 de Analytichem International (Harbor City, CA, USA), previamente acondicionadas con metanol y disolución amortiguadora de citrato 0.42 M de pH 6.5.
- El agua utilizada en la preparación de todas las disoluciones fue desionizada de grado nanopuro (desionizador Barnstead, Sybron Corp., MA, USA).

c) Procedimientos

Toma, almacenamiento y pretratamiento de la muestra: La determinación de CAs libres en orina se llevó a cabo sobre una alícuota tomada de la orina total excretada durante 24 h. La orina se recogió en una botella de vidrio color topacio que contenía 10 ml de HCl 6 M, se guardó en el frigorífico para evitar la oxidación de las CAs y se midió el volumen total excretado durante las 24 h.

El pretratamiento que se describe a continuación debe realizarse durante las 5 h posteriores al término de la toma de muestra. Alternativamente, las muestras deben congelarse a una temperatura lo más baja posible, con el fin de minimizar los errores debidos a la hidrólisis de las CAs conjugadas. En este trabajo, todas las experiencias se realizaron durante las tres horas siguientes después de finalizada la toma de muestra.

El pretratamiento incluye centrifugación, filtración de la muestra en medio ácido, y separación de las CAs libres de la matriz de la orina. En el medio ácido en que se mantiene

la muestra tiene lugar la formación de un precipitado rojo, constituido posiblemente por cristales de ácido úrico sobre los que se adsorbe el pigmento uroeritrina (2), el cual se elimina mediante centrifugación. Se filtran unos 40 ml del líquido sobrenadante a través de una placa de vidrio sinterizado del n° 4. De este modo se eliminan la mayor parte de las proteínas y materia orgánica en suspensión. A continuación se separan las CAs libres mediante EFS.

Eliminación de urocromos con columnas de sílice alquilada: Para llevar a cabo este estudio las columnas se acondicionaron con metanol y con tampón citrato 0.42 M, de pH 6.5. A continuación a 0.5 ml de las mezclas A o B, se adicionaron 0.5 ml de tampón citrato 0.42 M, y se pasaron por la columna, se lavó con 0.5 ml de la misma disolución amortiguadora y el eluato se recogió en un tubo de ensayo que contenía 1.5 ml de disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 8×10^{-4} M. Transcurridos 3 min se tomaron 2 ml, se diluyeron con 2 ml de etanol y se midió la señal de ELT. Las experiencias se realizaron por quintuplicado. Con el fin de disponer de valores de referencia, simultáneamente se midió la señal analítica de cinco disoluciones de las mezclas A o B preparadas según este mismo procedimiento, pero eliminando el paso por la columna. También se midió la señal analítica del blanco, constituido por una disolución de las mismas características de las anteriores, preparada en ausencia de CAs.

Separación de las CAs no conjugadas mediante EFS con columnas de alúmina: Se tomaron 25 ml de muestra centrifugada y filtrada, se añadieron 10 ml de la disolución reguladora de Tris y se pasaron por la columna de alúmina con ayuda de vacío. Se lavó con 10 ml de la misma disolución amortiguadora y seguidamente con 10 ml de H_2O destilada. A continuación se eluyeron las CAs con disolución de HAc 0.2 M y se recogieron los primeros 20 ml. En este medio y a bajas temperaturas, entre 0 y 4 °C, las disoluciones de CAs son estables. La columna se regeneró pasando 50 ml de agua destilada y 30 ml de tampón Tris.

Cuantificación de las CAs en los eluatos. Método de adición estándar: Para determinar el contenido de CAs se aplicó el método de adición estándar en la forma siguiente: Se ajustó el pH del eluato a 6-6.5 potenciométricamente con disolución de NaOH y se aforó a 25 ml con agua. A continuación se prepararon una serie de disoluciones en tubos de ensayo que contenían 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-3} M, 1 ml de tampón citrato 0.7 M de pH 6.5, la cantidad

de agua necesaria para que el volumen final fuera 5 ml, 1 ml del eluato de CAs y volúmenes crecientes de estándar de dopamina 8×10^{-6} M (de 0 a 2 ml). Transcurridos 3 min, se transfirió a la celda de medida 1 ml de la disolución final, se añadió 1 ml de etanol, y se midió la señal de ELT. La adición de etanol tiene como finalidad el incrementar la sensibilidad de la señal (en un factor de 5) y puede ser omitida.

Se preparó un blanco de reactivos por mezcla de 1 ml de tampón citrato 0.7 M de pH 6.5, 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-3} M y 3 ml de agua. Las señales analíticas se corrigieron restando la señal del blanco de reactivos, y los valores corregidos se representaron frente a la concentración de DA. El contenido de CAs no conjugadas en las muestras se calculó teniendo en cuenta que el factor de dilución es 10. Cuando se requiera, la disolución del blanco se diluye con etanol de la misma forma que las muestras.

VII.3.- Resultados y discusión

VII.3.1.- Optimización de las condiciones experimentales

Dada la extrema sensibilidad de la ELT, los límites de detección, así como el intervalo dinámico vienen determinados por la señal analítica del blanco. Así pues, la selección de la concentración de hexacianoferrato(III) se hizo atendiendo a este aspecto, y teniendo en cuenta que la oxidación de las CAs debe ser rápida y cuantitativa en un amplio margen de concentraciones. Con una concentración de hexacianoferrato(III) 2×10^{-4} M se cumplen ambos requisitos.

Como se vió en el Capítulo III, la velocidad de oxidación de las CAs y la estabilidad de los aminocromos formados dependen en gran medida de la concentración de los mismos y del pH. Un aumento en la concentración de aminocromos supone una menor estabilidad. A las concentraciones utilizadas en ELT los aminocromos son mucho más estables que a las concentraciones usuales en espectrofotometría.

Por otra parte, un aumento de pH conduce a un incremento de la velocidad de oxidación, y a una disminución de la estabilidad de los aminocromos formados. Con una concentración de $K_3Fe(CN)_6$ de 2×10^{-4} M, en medio acuoso y a pH 6, los aminocromos son muy estables, sin embargo la oxidación es lenta y los tiempos de formación son variables

dependiendo de la CA de que se trate. Así por ejemplo, para que la oxidación sea completa es necesario un tiempo de reacción de 3 min para A y de 10 min para NA y L-dopa. A pH 6.5 en medio acuoso, la oxidación de las cuatro CAs se completa en 3 min y los aminocromos formados son también estables (las señales de ELT no variaron al menos durante 30 min). A pH 7 la oxidación de las cuatro CAs es prácticamente instantánea, sin embargo la señal de ELT del dopacromo, a diferencia del resto de los aminocromos que son estables, disminuyó un 16% en medio acuoso y un 20% en agua/etanol 50/50 (v/v) al cabo de 26 min. Seleccionamos un pH de 6.5 para llevar a cabo la oxidación.

El sistema amortiguador utilizado es también de gran importancia, así por ejemplo, el empleo de citrato conduce a una mayor estabilidad que el de fosfato. Por otra parte, no puede utilizarse el acetato, ya que en ausencia de complejantes del Fe(III), la señal de ELT experimenta un aumento continuo debido a la formación de un depósito de precipitado, localizado sobre la pared de la cubeta donde incide el haz de láser. Como se vió en el capítulo IV, dicho precipitado, constituido posiblemente por hidróxido de Fe(III), es originado y proyectado sobre la pared de la cubeta por la radiación láser.

La presencia de etanol incrementa la sensibilidad. En medio agua/etanol 50/50 (v/v) las señales de ELT son 5 veces superiores a las obtenidas en medio acuoso. Sin embargo, cuando la proporción de etanol es del 75% se forma un precipitado. La presencia de etanol reduce la velocidad de oxidación de las CAs (incluso a pH 7), y disminuye la estabilidad de los aminocromos formados. Por tanto, en el procedimiento que se propone, la oxidación de las CAs se lleva a cabo en medio acuoso a pH 6.5, y después de un tiempo de reacción de 3 min, se adiciona el etanol e inmediatamente se mide la señal analítica. La adición de etanol puede ser omitida dependiendo de la concentración de CAs.

VII.3.2.- Eliminación de urocromos

Las muestras de orina presentan una amplia e intensa banda de absorción entre 240 y 380 nm. Esta absorción es debida a los denominados urocromos. Como se aprecia en la Figura VII.1, la absorbancia es pequeña a la longitud de onda de la línea del láser utilizada en las medidas, la de 514 nm, sin embargo, es lo suficientemente elevada para producir la saturación del detector de ELT. En consecuencia, la presencia de urocromos hace inviable la determinación directa de CAs en orina mediante esta técnica.

Para eliminar los urocromos, Benedict (17) utilizó una columna de intercambio catiónico de sílice con grupos de ácido bencenosulfónico enlazados (SCX), seguida de otra columna de sílice alquilada con grupos metilo (C_1). Al pasar la muestra en medio ácido a través de ambas columnas, la primera de ellas retiene los urocromos catiónicos, mientras que los urocromos hidrofóbicos quedan retenidos en la segunda. Nosotros estudiamos la eliminación de urocromos utilizando columnas de intercambio catiónico SCX, de sílice alquilada C_2 , C_8 y C_{18} , y combinaciones de ellas. Para ello, se utilizaron muestras de orina en la forma como se indica en los procedimientos.

El uso de columnas EFS de intercambio catiónico SCX en HCl 0.1 M no fue efectivo. Por el contrario, como se muestra en la Figura VII.1, la absorbancia de las muestras a 514.5 nm, después de pasarlas a través de columnas de sílice alquilada fue despreciable.

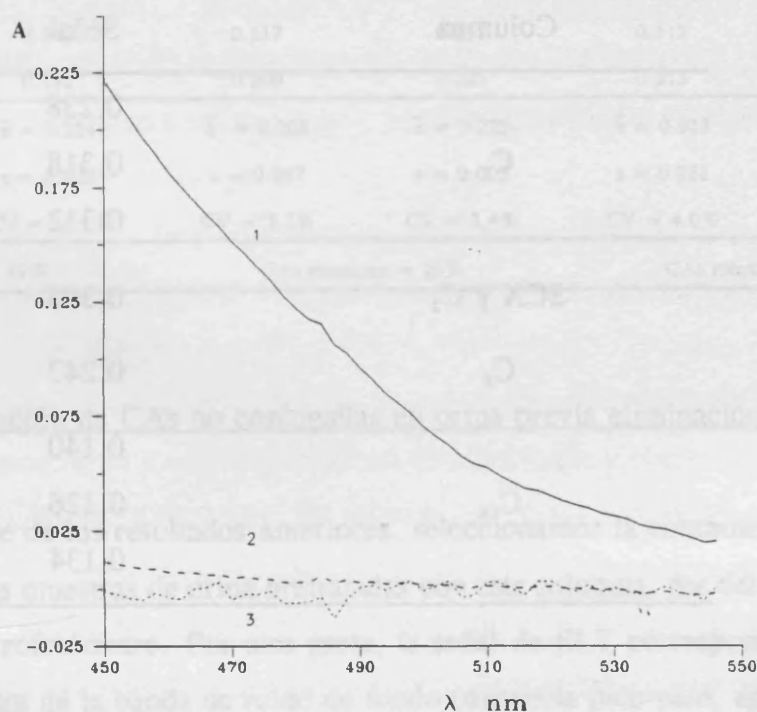


Figura VII.1.- Espectros de absorción de las muestras de orina: (1) 1 ml de tampón citrato 0.07 M de pH 6.5 + 1 ml de orina; (2 y 3) misma disolución eluida a través de una columna C_2 (2) o C_8 (3).

Comprobamos si la intensidad de la señal de ELT de los eluatos obtenidos con columnas de sílice alquilada, era suficientemente baja para permitir la determinación de CAs. Los resultados se muestran en la Tabla VII.2. Se deduce que a mayor longitud de la cadena del grupo alquilo, la eliminación de urocromos es más efectiva. Por otra parte, utilizar las columnas de intercambio catiónico en combinación con las de sílice alquilada no supuso una mejora apreciable de los resultados. También comprobamos que la eliminación de urocromos era reproducible. A partir de 10 muestras de orina, utilizando las columnas C_2 , el valor medio de la señal analítica obtenida fue de 0.411, la desviación estándar de 0.008 y el coeficiente de variación del 2.1%.

Tabla VII.2.- Señal de lente térmica del blanco utilizando columnas EFS.

Columna	Señal
	0.238
C_2	0.318
	0.312
SCX y C_2	0.300
C_8	0.247
	0.140
C_{18}	0.126
	0.134

VII.3.3.- Recuperación de CAs con columnas de sílice alquilada

Estudiamos la recuperación de CAs cuando se utilizan columnas de sílice alquilada, incluyendo la reproducibilidad de la misma a dos concentraciones distintas. Los resultados obtenidos con las columnas C_{18} y C_2 se muestran en la Tabla VII.3. Se observa que los coeficientes de variación cuando se realiza la EFS no son superiores a los obtenidos para las

referencias, de ello se deduce que la retención de CAs por ambas columnas es reproducible. Además, también puede apreciarse que la retención de CAs se incrementa al aumentar la longitud de la cadena alquílica. Por otra parte, cuando se utilizó la disolución más concentrada de CAs los resultados que se obtuvieron fueron similares.

Tabla VII.3.- Retención de CAs por columnas EFS.

C ₁₈ Mezcla B		C ₂ Mezcla B		C ₂ Mezcla A	
Señal de los eluatos (V)	Señal de referencia (V)	Señal de los eluatos (V)	Señal de referencia (V)	Señal de los eluatos (V)	Señal de referencia (V)
0.178	0.235	0.212	0.232	0.542	0.720
0.167	0.249	0.204	0.225	0.549	0.695
0.157	0.203	0.206	0.225	0.500	0.584
0.173	0.242	0.217	0.217	0.513	0.689
0.173	0.193	0.200	0.225	0.513	0.654
$\bar{x} = 0.170$	$\bar{x} = 0.224$	$\bar{x} = 0.208$	$\bar{x} = 0.225$	$\bar{x} = 0.523$	$\bar{x} = 0.668$
$s = 0.008$	$s = 0.025$	$s = 0.007$	$s = 0.005$	$s = 0.021$	$s = 0.053$
CV = 4.7%	CV = 11.1%	CV = 3.2%	CV = 2.4%	CV = 4.0%	CV = 7.9%
CAs retenidas = 59%		CAs retenidas = 25%		CAs retenidas = 29%	

VII.3.4.- Determinación de CAs no conjugadas en orina previa eliminación de urocromos

Sobre la base de los resultados anteriores, seleccionamos la columna C₂. A 514 nm, la absorbancia de las muestras de orina pretratadas con esta columna, fue del orden del ruido de fondo del espectrofotómetro. Por otra parte, la señal de ELT correspondiente fue igual a 23 veces la anchura de la banda de ruido de fondo (distancia pico-pico, aproximadamente 6s). A pesar de ello el intervalo dinámico fue superior a dos órdenes de magnitud. Además, la eliminación de urocromos y la retención de CAs en este tipo de columnas fue reproducible en un amplio intervalo de concentraciones.

La determinación de CAs en una muestra real de orina se llevó a cabo por aplicación del método de adición estándar. Los resultados obtenidos se representan en la Figura VII.2.

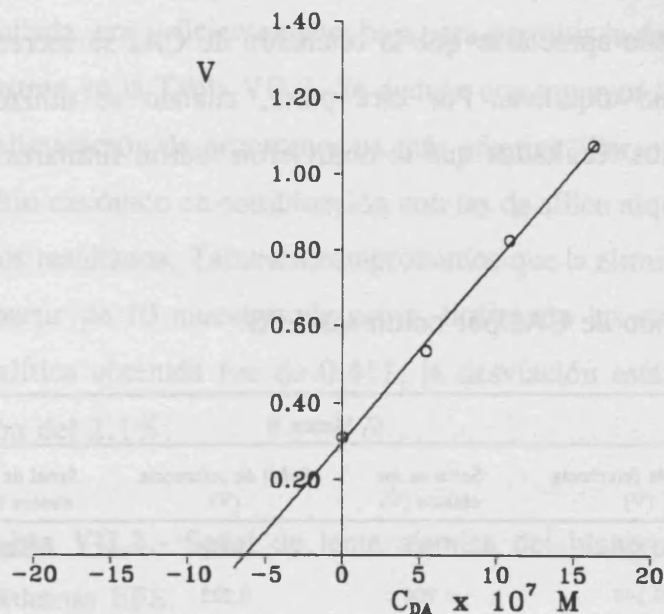


Figura VII.2.- Determinación de CAs no conjugadas en orina previa eliminación de urocromos. Método de adición estándar.

Los puntos experimentales se ajustaron a una recta de ecuación:

$$V_c = 0.30 + 4.8 \times 10^5 \times C \quad r = 0.9990$$

donde C viene dado en mol l^{-1} , y:

$$V_c = V - V_{bo} - V_{br}$$

siendo V la señal analítica medida, V_{bo} la señal del blanco de orina y V_{br} la señal del blanco de reactivos.

Teniendo en cuenta que el factor de dilución fue de 1/40 y que la retención de CAs es del 25%, se deduce que la concentración de CAs no conjugadas obtenida en la muestra de orina es de $3.3 \times 10^{-5} \text{ M}$. Este resultado es 10 veces superior a los valores normales esperados, y en consecuencia, el método que se propone no es adecuado. Los urocromos no son la única interferencia y, por tanto, aunque su eliminación es efectiva, no es suficiente. Posiblemente otras especies, de las muchas presentes en la muestra, son oxidadas por el hexacianoferrato(III) dando lugar a compuestos que absorben a 514 nm. En base a este resultado decidimos separar las CAs libres de la matriz de la muestra en lugar de eliminar los urocromos.

VII.3.5.- Separación de CAs urinarias con alúmina

De los diferentes métodos que se han empleado para la separación de CAs de los fluidos biológicos, el de adsorción con alúmina es con mucho el más utilizado, ya que debido a la selectividad de la alúmina hacia los grupos catecol se obtienen blancos muy limpios (15). Estudiamos la señal analítica de los blancos y la recuperación de las CAs utilizando columnas de alúmina. Los procedimientos se han descrito en un el apartado VII.2.

- Señal analítica de los blancos

Se prepararon los siguientes blancos:

- Blanco del eluato de orina: En tubos de ensayo se introducen 2 ml de agua ultrapura, 1 ml de tampón citrato 0.7 M de pH 6.5 y 1 ml de la disolución del eluato de orina.
- Blanco de reactivos 1: Se adicionó 1 ml de disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 2×10^{-3} M a tubos de ensayo que contenían 1 ml de agua, 1 ml de tampón citrato 0.7 M de pH 6 y 1 ml de tampón acetato 0.2 M de pH 6.
- Blanco de reactivos 2: Este blanco es de composición igual al anterior, si bien no contiene hexacianoferrato(III). Se sustituyó la disolución de $K_3Fe(CN)_6$ por agua.

En los tres casos la disolución final del blanco se obtuvo tomando 2 ml de cada una de las disoluciones anteriores y adicionando 2 ml de etanol. En la Tabla VII.4 se muestran las señales correspondientes a cada tipo de blanco. De cada disolución se realizaron dos medidas. Las diferentes series corresponden a distintas sesiones de trabajo. En la misma tabla se muestran también los valores medios.

A partir de los datos obtenidos se deduce que las señales de los blancos de los eluatos son reproducibles y prácticamente iguales a las del blanco de reactivos 1, y éstas a su vez, iguales a las del blanco de reactivos 2. También comprobamos que estas señales eran prácticamente coincidentes con la señal correspondiente a la mezcla etanol/agua 50/50 (v/v). Por tanto, en el procedimiento que se propone para determinar CAs libres en orina, los valores de las señales obtenidas deben corregirse restando el valor correspondiente a uno cualquiera de los blancos. Nosotros medimos la señal correspondiente al denominado blanco de reactivos 1, por ser el que puede fluctuar más.

Tabla VII.4. - Señal de lente térmica de los blancos (valores medios en negrilla).

Serie	Blanco del eluato (V)	Blanco de reactivos 1 (V)	Blanco de reactivos 2 (V)
1	0.120	0.121	0.119
	0.132	0.143	0.132
	0.126	0.132	0.125
2	0.161		
	0.167		
	0.164		
3	0.164	0.159	0.178
	0.169	0.163	0.171
	0.167	0.161	0.175
4	0.145		
	0.141		
	0.143		
5	0.151	0.139	0.151
	0.149	0.129	0.148
	0.150	0.134	0.150
6	0.128	0.137	
	0.131	0.130	
	0.130	0.134	

- Recuperación de CAs con la columna de alúmina

Se realizaron series de cinco ensayos independientes con disoluciones de A, NA, DA y D 1.6×10^{-6} M, adaptando el procedimiento descrito para la separación y cuantificación de las CAs (VII.2). Pasamos por la columna de alúmina 25 ml de disolución de la CA correspondiente, y eluímos con volúmenes variables de disolución de HAc 0.2 M. Con el fin de poder evaluar los resultados, preparamos disoluciones de referencia de las diferentes CAs de igual composición a la que debería obtenerse a partir de los eluatos si la recuperación fuera del 100%.

Utilizando 10 ó 20 ml de HAc 0.2 M para la elución, la recuperación para todas las CAs estuvo comprendida dentro del intervalo $100 \pm 3\%$. Sin embargo, con 5 ml de eluyente la recuperación no fué cuantitativa, (60% para DA). Se seleccionó un volumen de 20 ml de HAc 0.2 M para eluir las CAs. En la Tabla VII.5 se muestran los valores de las señales analíticas individuales, valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación, obtenidos para la DA, cuando se eluyó con 20 ml de HAc 0.2 M. La recuperación fue del 98% , con una reproducibilidad del 3.5%.

Tabla VII.5.- Recuperación de dopamina 1.6×10^{-6} M con la columna de alúmina.

Señal de los eluatos (V)	Señal de la disolución de referencia (V)
0.469	0.467
0.458	0.478
0.443	0.479
0.488	0.463
0.468	0.483
$\bar{x} = 0.465$	$\bar{x} = 0.474$
$s = 0.016$	$s = 0.009$
$CV = 3.5\%$	$CV = 1.8\%$

VII.3.6.- Características analíticas

Se obtuvo la sensibilidad de la señal de ELT para las cuatro CAs de interés. Estos datos son esenciales para establecer el procedimiento de determinación conjunta de la suma de CAs que se pretende. En las condiciones seleccionadas, y en medio agua-etanol 50/50, los calibrados de las cuatro CAs fueron lineales hasta al menos 4×10^{-7} M. Para concentraciones de DA superiores a $1 \mu\text{g/ml}$ se observó saturación del detector. Las ecuaciones de las rectas obtenidas mediante ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales fueron:

Adrenalina	$V = 6.5 \times 10^5 \times C + 0.16$	$r = 0.997$
Noradrenalina	$V = 4.5 \times 10^5 \times C + 0.16$	$r = 0.993$
Dopamina	$V = 5.5 \times 10^5 \times C + 0.16$	$r = 0.997$
L-Dopa	$V = 3.1 \times 10^5 \times C + 0.15$	$r = 0.94$

donde C viene expresado en mol l⁻¹.

La sensibilidad fue similar para todas las CAs. Es importante señalar que la sensibilidad absoluta puede variar de un día a otro, dependiendo principalmente de la alineación óptica del instrumento, la cual es difícil de reproducir. De hecho, hemos observado diferencias en la sensibilidad en experiencias realizadas en días diferentes, sin embargo, sus valores relativos se mantuvieron prácticamente constantes. Utilizando DA como referencia, las sensibilidades relativas fueron de 1.18, 0.82, 0.56 y 1 para A, NA, D y DA, respectivamente.

Utilizando series de 10 replicados de disoluciones 1×10^{-6} M, la reproducibilidad estuvo comprendida entre el 2% y el 3% para todas las CAs. Los límites de detección, calculados siguiendo el criterio 3s, a partir de diez medidas de la disolución del blanco de reactivos, fueron de 1 a 2 ng/ml, excepto para D, cuyo límite de detección fue de 4 ng/ml.

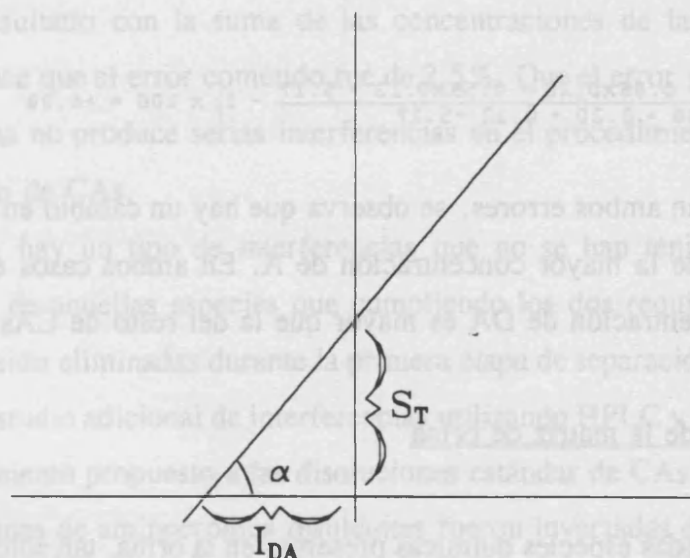
VII.3.7.- Uso de la Dopamina como patrón. Errores sistemáticos esperados

La ELT puede ser utilizada para determinar la suma de las concentraciones de CAs no conjugadas en orina aplicando un método de adición estándar. Para ello, es necesario seleccionar una sustancia como patrón. Se ha seleccionado a la DA por dos razones: Por una parte, la DA es la CA predominante en la orina, lo que reduce el error sistemático y, por otra, el valor de la sensibilidad para la DA, que es intermedio respecto al resto de CAs, da lugar a una compensación parcial de los errores positivos y negativos.

Podemos definir el índice de dopamina, I_{DA} , como el valor hallado de la suma de concentraciones molares de CAs no conjugadas aplicando el procedimiento de adición estándar propuesto:

$$I_{DA} = \frac{S_T}{P_{DA}} \quad \text{[VII.1]}$$

donde S_T es la señal medida, que corresponde a la suma de CAs presentes en la muestra, y P_{DA} es la pendiente de la recta de adición estándar ($P_{DA} = \text{tg } \alpha$). El significado de estos parámetros se ilustra en el siguiente esquema:



El error relativo que cabe esperar cuando se determina la suma de CAs no conjugadas en orina vendrá dado por la siguiente expresión:

$$e = \frac{I_{DA} - C_T}{C_T} = \frac{S_T}{P_{DA} C_T} - 1 \quad [\text{VII.2}]$$

donde C_T es la suma de las concentraciones molares de las CAs no conjugadas presentes en la muestra. Teniendo en cuenta que $S_T = \sum S_i = \sum P_i C_i$, resulta:

$$e = \frac{1}{C_T} \sum \left(\frac{P_i C_i}{P_{DA}} \right) - 1 \quad [\text{VII.3}]$$

Sustituyendo los valores de las sensibilidades relativas P_i/P_{DA} y teniendo en cuenta las concentraciones que se dan como normales en la bibliografía (6) (0.036, 0.26, 0.12 y $1.60 \mu\text{mol l}^{-1}$ para A, NA, D y DA, respectivamente), el error que cabe esperar cuando se analizan muestras de orina procedentes de sujetos normales vendrá dado por :

$$e(\%) = \left(\frac{1.18 \times 0.036 + 0.86 \times 0.26 + 0.56 \times 0.12 + 1.60}{0.036 + 0.26 + 0.12 + 1.60} - 1 \right) \times 100 = -4.6\% \quad [\text{VII.4}]$$

Del mismo modo, el error que cabe esperar, para la muestra de orina de un sujeto con hipertensión esencial, en la que las concentraciones de CAs son mucho más elevadas (7), viene dado por:

$$e(\%) = \left(\frac{1.18 \times 2.68 + 0.86 \times 0.20 + 0.56 \times 0.12 + 5.17}{2.68 + 0.20 + 0.12 + 5.17} - 1 \right) \times 100 = +4.8\% \quad [\text{VII.5}]$$

Si se comparan ambos errores, se observa que hay un cambio en el signo del mismo como consecuencia de la mayor concentración de A. En ambos casos el error es pequeño debido a que la concentración de DA es mayor que la del resto de CAs.

VII.3.8.- Influencia de la matriz de orina

Entre las variadas especies químicas presentes en la orina, tan sólo aquellas retenidas en la alúmina a pH 8.5 (tampón Tris) y que se oxidan con hexacianoferrato(III) dando lugar a compuestos coloreados que absorban a 514.5 nm, interferirán en el método que se propone. Para estudiar la influencia de la matriz de orina, idealmente deberían utilizarse muestras reales con un contenido de CAs conocido. Ante las dificultades que conlleva el disponer de este tipo de muestras optamos por tomar una muestra de orina real, eliminar las CAs mediante adsorción sobre alúmina, y añadir a la matriz cantidades conocidas de CAs, dentro del intervalo normal de concentraciones en las que se encuentran en este tipo de muestras. Seguidamente determinamos la concentración de CAs según el procedimiento propuesto y la comparamos con la la concentración de CAs añadida. A continuación describimos detalladamente este procedimiento:

Se tomaron tres alícuotas de una muestra de orina de un sujeto normal previamente centrifugada en medio ácido y filtrada. A cada alícuota se añadió 10 ml de disolución reguladora de Tris 0.25 M con AEDT 1.5%, se pasó por la columna de alúmina previamente acondicionada y se recogió el eluato. A cada eluato se adicionó 1 ml de cada una de las siguientes disoluciones: DA 4.0×10^{-5} M, A 9.0×10^{-7} M, D 3.0×10^{-6} M y NA 6.5×10^{-6} M, y se determinó el contenido de CAs, como índice de dopamina, según el procedimiento propuesto.

Los puntos experimentales de cada una de las series de adición estándar se ajustaron a una recta, y los coeficientes de correlación fueron superiores a 0.999 en todos los casos. Los valores medios de las pendientes y de las ordenadas en el origen fueron $2.27 \times 10^5 \text{ V l mol}^{-1}$ y 0.047 V , respectivamente. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que el factor de dilución es de 10, se deduce un contenido de CAs en las muestras de $2.07 \times 10^{-6} \text{ M}$. Al comparar este resultado con la suma de las concentraciones de las CAs añadidas de $2.02 \times 10^{-6} \text{ M}$, se deduce que el error cometido fue de 2.5%. Que el error sea pequeño sugiere que la matriz de orina no produce serias interferencias en el procedimiento que se propone para la determinación de CAs.

Sin embargo, hay un tipo de interferencias que no se han tenido en cuenta en el estudio realizado, la de aquellas especies que cumpliendo los dos requisitos anteriormente expuestos, hubieran sido eliminadas durante la primera etapa de separación con alúmina. Por ello, realizamos un estudio adicional de interferencias utilizando HPLC y detección por ELT. Se aplicó el procedimiento propuesto a las disoluciones estándar de CAs y a las muestras de orina, y las disoluciones de aminocromos resultantes fueron inyectadas en el cromatógrafo.

La composición de la fase móvil fue: Na_2HPO_4 $3.47 \times 10^{-2} \text{ M}$, ácido cítrico $3 \times 10^{-2} \text{ M}$, dodecilsulfato sódico $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ y etanol al 10% (v/v). El pH de la misma fue de 4.9 y el caudal 0.1 ml/min . Los cromatogramas mostraron solamente tres picos bien separados que correspondían a los aminocromos de NA, A y DA. Como la fase estacionaria utilizada retiene compuestos con carácter doblemente iónico (zwitteriones), como es el caso de los aminocromos de A, NA y DA, catiónicos y no iónicos, podemos concluir que este tipo de compuestos, en el caso de que estuvieran presentes en los extractos de alúmina, no interfieren en el procedimiento que se propone. En consecuencia, las posibles interferencias quedarían restringidas a especies aniónicas, que eluirían junto al volumen muerto como ocurre en el caso del dopacromo.

VII.3.9.- Análisis de muestras de orina

Aplicamos el procedimiento propuesto a muestras de orina procedentes de tres sujetos no patológicos. Las representaciones gráficas de los puntos experimentales se muestran en la Figura VII.3. Los coeficientes de correlación lineal fueron, en todos los casos, superiores

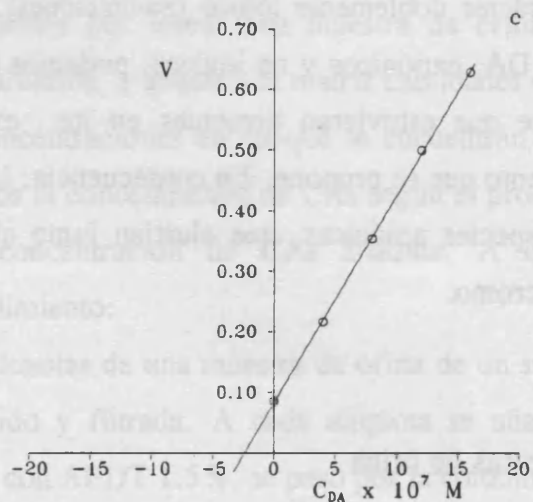
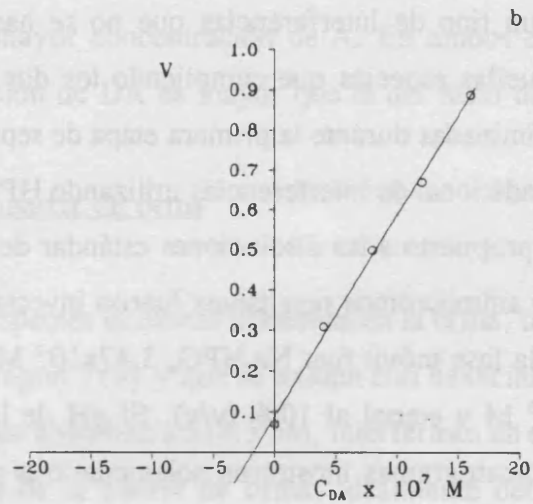
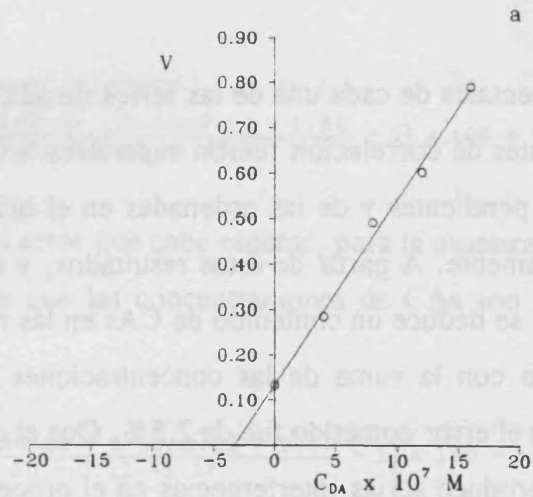


Figura VII.3.- Determinación de CAs no conjugadas en orina. (a), (b) y (c) corresponden respectivamente a las muestras (1), (2) y (3) de la Tabla VII.6.

a 0.997. En la Tabla VII.6 se indican el volumen de orina excretado en 24 h, las ecuaciones de las rectas obtenidas mediante ajuste por mínimos cuadrados y los índices de dopamina obtenidos teniendo en cuenta que el factor de dilución fue 1/10. En este tipo de determinaciones es usual expresar el resultado como $\mu\text{mol}/24\text{ h}$, por lo que se incluyen estos valores en la misma tabla. Los resultados obtenidos están dentro del intervalo normal de CAs libres eliminadas en orina.

Tabla VII.6.- Índices de dopamina de muestras de orina.

Muestra	Diuresis	Curvas de adición estándar		Índice de dopamina ^a	
		Pendiente (V l mol^{-1})	O. Origen (mV)	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/día}$
1 ^b	1375	$(4.1 \pm 0.1) \times 10^5$	98 ± 1	2.40 ± 0.04	3.30
2	1435	5.0×10^5	88	1.8	2.53
3	1050	5.0×10^5	155	3.1	3.26
4	1050	3.8×10^5	88	11.6	15.95

^a Suma de las concentraciones de las CAs no conjugadas utilizando la dopamina como patrón.

^b Media y desviación estándar de 3 determinaciones de la misma muestra

Análisis de muestras con un contenido elevado de CAs

Comprobamos si el método es aplicable a muestras con un contenido de CAs muy superior al normal. Esta circunstancia debería afectar principalmente al proceso de separación, ya que podría ocurrir que a este nivel de concentraciones, la adsorción de CAs sobre alúmina no fuera cuantitativa. Para llevar a cabo este estudio se determinaron las CAs en una muestra de orina (muestra 3 de la Tabla VII.6) antes y después de adicionarle

cantidades conocidas de las mismas, simulando en el segundo caso los contenidos de muestras de sujetos con hipertensión esencial (7) (muestra 4 de la Tabla VII.6). Se tomaron 20 ml de muestra, previamente acidificada y filtrada, y se añadieron 2 ml de A 3.0×10^{-5} M y 3 ml de DA 5.0×10^{-5} M. Se siguió el procedimiento propuesto para obtener el índice de dopamina, con la única diferencia de que el eluato que contenía las CAs se diluyó cinco veces, por lo que el factor de dilución fue 1/ 50.

A partir de la ecuación de la recta ajustada, y teniendo en cuenta el factor de dilución, se obtiene una concentración de CAs de $11.6 \mu\text{mol/l}$. Si comparamos el resultado obtenido con el contenido esperado de $10.9 \mu\text{mol/l}$, deducido a partir del resultado del análisis de la muestra 3 y de las concentraciones de CAs adicionadas, se deduce que el error fue del 6.4% por exceso.

Reproducibilidad

El estudio de la reproducibilidad del método se llevó a cabo determinando por triplicado las CAs presentes en una misma muestra de orina (muestra 1 de la Tabla VII.6). Para ello se tomaron tres alícuotas de 25 ml de muestra previamente centrifugada y filtrada, y se procedió según el método propuesto con cada una de ellas. Los resultados se muestran en las Tablas VII.7 y VII.8. El valor de la concentración de CAs obtenido fue de $(2.40 \pm 0.04) \times 10^{-6}$ M, con un coeficiente de variación del 1.9%.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el método es más reproducible que la mayoría de los métodos propuestos para el análisis de CAs. Este resultado viene sustentado por la menor importancia de las fuentes de error aleatorio y sistemático que afectan a los métodos de absorción molecular, incluyendo las técnicas fototérmicas, cuando se comparan con la amperometría, y especialmente, con la fluorimetría.

Tabla VII.7. - Reproducibilidad del procedimiento de adición estándar: Medidas duplicadas y medias de las mismas.

V_{dopamina} (ml)	Alicuota 1	Alicuota 2	Alicuota 3
0	0.258	0.253	0.259
	0.259	0.270	0.265
	0.259	0.262	0.262
0.5	0.401	0.401	0.435
	0.419	0.415	0.395
	0.410	0.408	0.415
1	0.623	0.602	0.600
	0.723	0.618	0.621
	0.729	0.610	0.611
1.5	0.735	0.716	0.772
	0.723	0.752	0.746
	0.729	0.734	0.759
2	0.920	0.904	0.931
	0.916	0.916	0.932
	0.918	0.910	0.932
Blanco	0.159		
	0.163		
	0.161		

Tabla VII.8.- Reproducibilidad del procedimiento de adición estándar: Parámetros de ajuste e índices de dopamina.

Análisis	Recta ajustada	r	I _{DA} (M)
1	$4.09 \times 10^5 \times C + 0.098$	0.997	2.40×10^{-6}
2	$4.06 \times 10^5 \times C + 0.099$	0.998	2.44×10^{-6}
3	$4.20 \times 10^5 \times C + 0.099$	0.9994	2.44×10^{-6}

- Influencia del tiempo de almacenamiento de la muestra

La eliminación de las CAs en orina no es homogénea y depende del estado físico concreto del sujeto en el momento de la toma de muestra. Por ello, la determinación de CAs se lleva a cabo sobre una alícuota tomada de la orina total excretada durante 24 h. Por otra parte, las muestras se almacenan en medio ácido para evitar la oxidación de las CAs, pero las temperaturas de almacenamiento recomendadas son variables. Así, en Clinical Laboratory de Merck (18) se recomienda guardar las muestras en frigorífico, mientras que otros autores (1) recomiendan congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si los análisis se llevan a cabo antes de transcurridos siete días, y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ si el tiempo es de varios meses.

Nosotros observamos que guardando las muestras en frigorífico, el contenido de CAs libres aumentaba con el tiempo. Se determinaron las CAs de una muestra acidificada con HCl que se guardó en frigorífico ($0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 6 días. Los resultados se compararon con los obtenidos separando las CAs libres de la misma muestra durante las primeras 4 horas después de finalizada la toma de muestra. Se encontró que el contenido de CAs libres en la muestra conservada durante 6 días fue un 54% superior al obtenido en el segundo caso. Este resultado es debido, a la posible hidrólisis de las CAs conjugadas, que es tanto más rápida cuanto mayor es la temperatura. Hay que tener presente que la determinación de las CAs totales (no

conjugadas + conjugadas) implica la liberación previa de las CAs conjugadas mediante hidrólisis en medio ácido a ebullición.

Puesto que los eluatos de las CAs en medio acético son estables, a la vista de los resultados obtenidos, se recomienda que la separación de las CAs se realice inmediatamente después de finalizada la toma de muestra, o bien, cuando ello no sea posible, que las muestras acidificadas se congelen a la temperatura más baja posible.

VII.4.- Bibliografía

1. A.M. Krstulovic; J. Chromatogr. 1982, 229, 1.
2. J.B. Henry; Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio, Salvat, Barcelona, 9ª edición, 1992.
3. A.M. Krstulovic; J. Chromatogr. 1981, 217, 523.
4. Z. Yi y P.R. Brown; Biomed. Chromatogr. 1991, 5, 101.
5. H. Nohta, E. Yamaguchi y Y. Ohkura; J. Chromatogr. 1989, 493, 15.
6. H. Wisser y E. Knoll; Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1973, 11, 3.
7. H. Tsuchiya, M. Tatsumi, N. Takagi, T. Koike, H. Yamaguchi y T. Hayashi; Anal. Biochem. 1986, 155, 28.
8. R.A. Heacock; Chem. Rev. 1959, 59, 181.
9. J. Rüter, U.P. Kurz y B. Neidhart; J. Liq. Chromatogr. 1985, 8, 2475.
10. T. Seki; J. Chromatogr. 1990, 515, 435.
11. S. Honda, M. Takahashi, Y. Araki y K. Kakehi; J. Chromatogr. 1983, 274, 45.
12. F.A.J. van der Hoorn, F. Boomsa, A.J. Man in't Veld y M.A.D.H. Schalekamp; J. Chromatogr. 1991, 563, 348.
13. K. Imai, M. Tsukamoto y Z. Tamura; J. Chromatogr. 1977, 137, 357.
14. P.M. Froehlich y T.D. Cunningham; Anal. Chim. Acta 1978, 97, 357.
15. Y. Yui y C. Kawai; J. Chromatogr. 1981, 206, 586.
16. G.M. Ridder y D.W. Margerum; Anal. Chem. 1977, 49, 2090.
17. C.R. Benedict; J. Chromatogr. 1987, 385, 369.
18. E. Merck; Clinical Laboratory, Darmstadt, 1970.

**VIII.- DETERMINACION DE CATECOLAMINAS NO
CONJUGADAS EN ORINA MEDIANTE CLM CON
DETECCION POR ELT**

VIII.- DETERMINACION DE CATECOLAMINAS NO CONJUGADAS EN ORINA MEDIANTE CLM CON DETECCION POR ELT

VIII.1.- Objeto

En el presente capítulo se utilizan los resultados de los estudios descritos en el Capítulo V para desarrollar y proponer un método de determinación de CAs no conjugadas en orina mediante cromatografía líquida micelar con detección por ELT.

VIII.2.- Parte experimental

a) Aparatos

- Cromatógrafo Hewlett-Packard de la serie HP-1050 provisto de inyector automático Rheodyne con un bucle de 20 μ l y de bomba cuaternaria con posibilidad de elución en gradiente. Como fase estacionaria se empleó una columna Spherisorb ODS-1 (5 μ m, 12 cm x 4.6 mm) de Scharlau, precedida de una precolumna Spherisorb ODS-2 (5 μ m, 3.5 cm x 4.6 mm), también de Scharlau. Las fases estacionarias se equilibraron como se explica en V.2.c.
- Se utilizó el espectrómetro de lente térmica descrito en III.2.a. La longitud de onda de bombeo fue de 488 nm, la potencia 250 mW y la frecuencia de modulación 4 Hz. Se reemplazó la cubeta más usual de 3 ml, por la celda estándar de 8 μ l del detector UV-vis HP-1050 para HPLC. La celda, sostenida por su correspondiente carcasa de acero, se alineó en el camino óptico de los haces. Los datos fueron adquiridos como se indica en III.2.a
- Estación para extracción a vacío Vac Elut SPS 24 (Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA).

b) Reactivos

- Disolución 0.05 M de $K_3Fe(CN)_6$ preparada a partir del producto sólido Merck, para análisis, y dodecil sulfato sódico (SDS) Merck del 99%.
- n-Propanol, ácido acético glacial y ácido perclórico Panreac, para análisis.
- Oxido de aluminio, tipo 504C, ácido, actividad I según escala Brockmann Fluka, para cromatografía.
- Disoluciones 2×10^{-3} M de NA, A, DA e ISO y disolución reguladora Tris-EDTA, preparadas como se indica en III.2.b y en VII.2.b, respectivamente.
- Disoluciones reguladoras de citrato de diversas concentraciones y pH 7.0 preparadas a partir de ácido cítrico (Panreac, para análisis) y NaOH, ajustando potenciométricamente el pH con disolución de NaOH.

Se utilizó agua desionizada ultrapura (desionizador Barnstead, Sybron Corp., Taunton, MA). Las fases móviles fueron filtradas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ de MSI, y las muestras a inyectar en el cromatógrafo se filtraron a través de discos de Nylon de $0.2 \mu\text{m}$ de poro de MSI.

c) Procedimientos

Extracción y elución de las CAs: Se utilizó el procedimiento de toma y pretratamiento de muestras de orina indicado en VII.2.c. Las CAs se separaron de la matriz de la orina mediante extracción en fase sólida sobre alúmina. Las columnas de alúmina se prepararon mediante el procedimiento expuesto en VII.2.c. En el presente capítulo se revisa el proceso de elución de las CAs, con el fin de utilizar volúmenes menores de eluyente y preconcentrar la muestra. El procedimiento utilizado para la extracción y la elución de las CAs fue el siguiente: a 25 ml de disolución de CAs o de orina centrifugada y filtrada se le añadieron 10

ml del tampón Tris-EDTA y 2 ml de disolución de ISO 5×10^{-6} M si se utiliza estándar interno. La mezcla se pasó a través de la columna de alúmina utilizando vacío, la columna se lavó con 10 ml de tampón Tris-EDTA y con 10 ml de agua y las CAs fueron eluidas con una disolución ácida. Para optimizar la elución se ensayaron diferentes volúmenes y concentraciones de ácido acético y HClO_4 . En el procedimiento que se recomienda la elución se realiza con 10 ml de HClO_4 0.5 M, de los cuales se recogen los 5 primeros mililitros. La columna se regeneró lavándola con 20 ml de la misma disolución de ácido utilizada para la elución, 80 ml de agua y 60 ml de la disolución reguladora de Tris-EDTA.

Derivatización a aminocromos y separación cromatográfica: En las experiencias que se realizaron para la optimización de la elución se utilizó el siguiente procedimiento de derivatización: se añadió al eluato el volumen necesario de tampón citrato 1 M de pH 7 para que su concentración final fuera 0.07 M, y se ajustó el pH potenciométricamente a 7 por adición de NaOH. Posteriormente se pasó el eluato a un aforado de 10 o de 25 ml (según se tratara de CAs a baja o a alta concentración). Se añadió el volumen necesario de disolución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 M para que su concentración final fuese de 2×10^{-3} M. Se dejó transcurrir 1 min para completar la reacción de oxidación, y se añadió la cantidad necesaria de propanol hasta igualar la concentración del mismo con la de la fase móvil, se aforó con agua y se inyectó en el cromatógrafo.

El procedimiento que se utilizó para el análisis de las muestras de orina fue el siguiente: En tubos de ensayo se introdujeron, en el orden que se indica, 2 ml de eluato, 0.2 ml de tampón citrato 1 M de pH 7, y el número necesario de gotas de NaOH 0.5 M para que el pH fuera de 7 (medido potenciométricamente). Se añadieron 0.1 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.05 M, y transcurrido 1 min, 0.2 ml de propanol, y se inyectó en el cromatógrafo.

La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil que contenía SDS 0.05 M, ácido cítrico 0.03 M y 7% de propanol. El pH se ajustó a 4.9 previamente a la adición de propanol. Se utilizó un caudal de 0.5 ml/min durante los primeros 3.5 min, seguido de un caudal de 0.1 ml/min desde ese momento hasta el final del cromatograma. En estas condiciones se obtienen cromatogramas con los aminocromos bien resueltos, eficacias adecuadas y tiempos de retención no excesivamente largos.

VIII.3.- Resultados y discusión

VIII.3.1.- Selección del estándar interno

El estándar interno más comunmente utilizado en el análisis de CAs en fluidos biológicos, sobre todo cuando se emplea detección electroquímica, es la 1,2-dihidroxibencilamina. Sin embargo, aunque esta sustancia se comporta del mismo modo que las CAs frente a la extracción con alúmina, no puede ser derivatizada a aminocromo, por lo que se decidió utilizar como estándar interno una CA de origen sintético. De las CAs sintéticas que se encuentran accesibles comercialmente, las más económicas son la isoprenalina o isoproterenol y el 2-metildopa. El 2-metildopa tiene la desventaja de poseer un grupo carboxilato, que hace que el aminocromo correspondiente eluya junto al volumen muerto al pH al que se lleva a cabo la separación cromatográfica. Por tanto, se seleccionó la isoprenalina para ser utilizada como patrón interno. Además, por su estructura cabía pensar que se comportaría de igual manera que NA, A y DA frente a la extracción y a la derivatización, y que eluiría cerca de las otras CAs.

En la bibliografía aparecen numerosas referencias que hacen uso de ISO como estándar interno para la determinación de CAs en fluidos biológicos, tanto con detección electroquímica (1-6) como fluorimétrica, utilizando para la derivatización los métodos de la 1,2-difeniletildiamina (7-11) y de la glicilglicina (12).

VIII.3.2.- Optimización de la extracción

El objetivo de este estudio fue seleccionar las condiciones experimentales adecuadas para que la extracción de las CAs fuera lo más cuantitativa y reproducible posible, y a la vez, para que el volumen de eluyente empleado fuera el menor posible, con el fin de preconcentrar en lugar de diluir la muestra. Se estudiaron la naturaleza y concentración del eluyente, el tiempo de extracción y el pH máximo de la etapa de neutralización previa a la derivatización. Se utilizaron dos disoluciones de CAs. La primera de ellas contenía ISO 1.25×10^{-6} M, NA y A 3×10^{-7} M y DA 2×10^{-6} M. Las concentraciones de NA y DA en esta disolución son semejantes a las que se encuentran normalmente en orina, y la concentración

de A es unas cinco veces mayor. La segunda disolución contenía concentraciones 10 veces mayores de cada CA. Las señales obtenidas se compararon con las obtenidas a partir de disoluciones de referencia preparadas de igual forma que las anteriores, pero sin la etapa de extracción sobre alúmina.

a) Elución con HAc y con HClO₄

Elución con HAc 0.2 M: En la Tabla VIII.1 se muestran las señales que se obtuvieron al eluir las CAs con 7 ml de HAc 0.2 M, así como las señales de referencia y las recuperaciones correspondientes. La recuperación media para las disoluciones diluídas y concentradas fue del 68% y del 66%, respectivamente. Se comprobó que para las disoluciones concentradas, pasando 15 ml de disolución de HAc por la columna, la elución de las CAs no era completa.

Elución con HClO₄: En la Tabla VIII.2 se muestran las recuperaciones que se obtuvieron al eluir las CAs con distintos volúmenes y concentraciones de HClO₄. Cuando se emplea HClO₄ 0.1 M las recuperaciones son bajas (30-40%). La recuperación es más alta cuando se utiliza HClO₄ 0.25 M, sin embargo la recuperación disminuye al aumentar la concentración de CAs. Si se utilizan 5 ml de HClO₄ 0.5 M, se obtienen recuperaciones en torno al 80%, tanto para CAs concentradas como para diluídas. La cuantitatividad de la extracción no mejora si se utilizan volúmenes mayores de eluyente (7 ml). En base a estos resultados se eligió como eluyente 5 ml de HClO₄ 0.5 M.

En la Tabla VIII.3 se muestran los valores obtenidos para la recuperación individual de cada CA, y su relación respecto a la recuperación del patrón interno, ISO, para los dos niveles de concentración ensayados. La recuperación respecto al patrón interno es prácticamente la unidad para las tres CAs estudiadas, indicando que la ISO se comporta de igual modo que las otras CAs, tanto en el proceso de extracción como en los de derivatización y medida de la señal, siendo por tanto adecuada como estándar interno.



Tabla VIII.1.- Recuperación de CAs eluyendo con HAc 0.2 M^a.

	NA		A		DA		ISO	
	A	h	A	h	A	h	A	h
Ref. (dil)	7.35	0.098	7.06	0.121	37.63	0.393	24.29	0.230
Ref. (dil)	7.35	0.099	7.96	0.119	37.49	0.389	24.08	0.229
Señal media	7.35	0.0985	7.51	0.120	37.56	0.391	24.19	0.230
Eluato 1 (dil)	5.54	0.074	5.39	0.093	24.72	0.262	16.22	0.162
Recup., %	75.4	75.1	71.8	77.5	65.8	68.5	67.05	70.4
Eluato 2 (dil)	4.59	0.064	-	0.053	22.98	0.240	16.99	0.160
Recup., %	62.5	65.0	-	63.3	61.2	61.4	70.2	69.6
Ref. (con)	31.89	0.400	40.98	0.507	153.10	1.512	124.12	1.060
Ref. (con)	31.30	0.411	42.95	0.509	160.71	1.583	126.33	1.073
Señal media	31.60	0.405	41.97	0.508	156.91	1.547	125.23	1.066
Eluato 1 (con)	22.28	0.277	23.48	0.298	103.21	1.071	72.82	0.688
Recup., %	70.5	68.3	55.95	58.7	65.8	69.2	46.4	64.5
Eluato 2 (con)	24.27	0.277	28.51	0.307	100.36	1.024	77.50	0.700
Recup., %	76.8	68.3	67.9	60.4	64.0	66.2	49.4	65.6
Eluato 3 (con)	20.78	0.271	22.64	0.291	99.91	1.011	77.24	0.703
Recup., %	65.8	66.8	63.5	57.3	63.7	65.3	49.23	65.9

* Símbolos: A = señal en áreas, h = señal en alturas, dil = baja concentración, con = alta concentración, Recup., % = recuperaciones en % (cursiva).

Tabla VIII.2.- Recuperación de CAs eluyendo con HClO₄^a.

	NA		A		DA		ISO	
	A	h	A	h	A	h	A	h
Ref (d)	7.33	0.100	10.54	0.124	37.23	0.359	25.42	0.232
0.1 M (dil), 7 ml	2.76	0.045	2.76	0.055	15.28	0.154	9.04	0.094
Recup., %	37.7	45.2	26.2	44.4	41.0	42.9	35.6	40.5
0.25M (dil), 7ml	5.88	0.088	9.29	0.123	31.15	0.311	21.87	0.198
Recup., %	80.2	88.3	88.1	99.2	83.7	86.6	86.0	85.3
0.5 M (dil), 5 ml	6.07	0.089	9.26	0.108	32.03	0.298	20.59	0.187
Recup., %	82.8	89.0	87.9	87.1	86.0	83.0	81.0	86.6
Ref 1 (con)	81.67	0.995	109.48	1.176	366.13	3.282	291.32	2.326
Ref 2 (con)	79.36	0.987	106.49	1.194	354.55	3.213	295.54	2.332
Señal media	80.52	0.991	107.99	1.185	360.34	3.248	293.43	2.329
0.25M(con), 7ml	58.60	0.697	76.90	0.827	283.33	2.677	218.17	1.777
Recup., %	72.8	70.3	71.2	69.8	78.6	82.4	74.4	76.3
0.25M(con), 5ml	50.92	0.695	69.76	0.818	252.46	2.350	200.36	1.710
Recup., %	63.2	70.1	64.6	69.0	70.1	72.3	68.3	73.4
0.25M(con), 5ml	49.64	0.607	69.41	0.771	- ^b	- ^b	197.09	1.675
Recup., %	61.6	61.3	64.3	65.1	-	-	67.2	71.9
0.5 M(con), 7 ml	57.97	0.674	66.41	0.774	266.94	2.517	203.81	1.647
Recup., %	72.0	68.0	61.5	65.3	74.1	77.5	69.5	70.7
0.5 M(con), 5 ml	56.94	0.697	78.09	0.863	- ^b	- ^b	220.87	1.852
Recup., %	70.7	70.3	72.3	72.8	-	-	75.3	79.5
0.5 M(con), 5 ml	63.84	0.755	81.75	0.835	282.40	2.668	235.81	1.879
Recup., %	79.3	76.2	75.7	70.5	78.4	82.1	80.4	80.7

^a Símbolos: A = señal en áreas, h = señal en alturas, dil = baja concentración, con = alta concentración, Recup., % = recuperaciones en % (cursiva).

^b No medible por saturación del detector de ELT.

Tabla VIII.3a.- Recuperación respecto del estándar interno en áreas^a.

Catecolamina	Diluidas		Concentradas	
	R	R/R _i	R	R/R _i
Noradrenalina	82.8	1.02	75.0 ± 6.1	0.96 ± 0.05
Adrenalina	87.9	1.09	74.0 ± 2.4	0.95 ± 0.03
Dopamina	86.0	1.06	78.4	1.01

^a R = recuperación de la catecolamina, R_i = recuperación de la isoprenalina. Cuando corresponda, media y desviaciones estándar de duplicados.

Tabla VIII.3b.- Recuperación respecto del estándar interno en alturas^a.

Catecolamina	Diluidas		Concentradas	
	R	R/R _i	R	R/R _i
Noradrenalina	89.0	1.03	73.3 ± 4.2	0.92 ± 0.03
Adrenalina	87.1	1.01	71.7 ± 1.6	0.90 ± 0.01
Dopamina	83.0	0.96	82.1	1.02

^a R = recuperación de la catecolamina, R_i = recuperación de la isoprenalina. Cuando corresponda, media y desviaciones estándar de duplicados.

b) - Influencia del tiempo de extracción

No se observaron diferencias en la recuperación utilizando tiempos de extracción entre 8 y 30 minutos. Aunque las CAs son inestables al pH básico utilizado para la adsorción sobre alúmina, la presencia de EDTA las estabiliza, al enmascarar los cationes metálicos que catalizan la reacción de oxidación.

c) Influencia del pH de la reacción de neutralización

Se comprobó que si durante la etapa de neutralización del eluato, previa a la reacción de derivatización, el pH de la disolución de CAs superaba el valor 7, las recuperaciones resultaban bajas e irreproducibles. Este hecho se atribuyó a que en medio básico las CAs experimentan un proceso rápido e irreversible de degradación, cuya velocidad depende de la naturaleza de la CA implicada. La ISO experimenta un proceso de degradación difícil de reproducir, y más rápido que las otras CAs y, en consecuencia, su uso como estándar interno no corrige este efecto.

VIII.3.3.- Curvas de calibrado

Haciendo uso de los procedimientos expuestos en VIII.2.c. se obtuvieron curvas de calibrado sin y con corrección por el método del estándar interno, y utilizando o no extracción previa. Los resultados se muestran en las Tablas VIII.4 y VIII.5 para áreas y alturas, respectivamente. Los calibrados de la serie 4 se realizaron a partir de una matriz de orina, obtenida mediante separación de las CAs por extracción con alúmina, a la que posteriormente se añadieron volúmenes crecientes de disolución de CAs.

Los coeficientes de correlación fueron siempre superiores a 0.99. La sensibilidad fue ligeramente inferior para DA que para NA y A, lo que está de acuerdo con lo obtenido en V.6. La aplicación del ensayo t de Student a las ordenadas en el origen reveló que todas las rectas de calibrado pasaban por el origen de coordenadas. Las rectas de calibrado pertenecientes a series diferentes no coinciden, ya que se realizaron en días diferentes y el instrumento no se encontraba en las mismas condiciones de alineamiento óptico.

Tabla VIII.4.- Calibrados en áreas.

Serie n ^o	Sustancia	Pendiente x 10 ⁶ (V x s x mol ⁻¹ l)	O. Origen (V x s)	r
	NA	16.6	-1.5	0.9998
	A	19.3	-2.1	0.9997
1	DA	9.4	-1.2	0.9996
	ISO	13.4	-2.1	0.9995
	NA	15.9	-1.4	0.99993
2	A	19.6	-2.3	0.99990
	DA	7.8	0.7	0.997
	NA	3.5	-0.5	0.9990
2 ^a	A	4.3	-0.7	0.9990
	DA	1.9	-0.2	0.998
	NA	36.1	0.7	0.9992
3 ^b	A	43.5	-0.9	0.998
	DA	35.5	-2.0	0.998
	NA	3.2	-0.1	0.9994
3 ^{a,b}	A	3.2	-0.1	0.997
	DA	3.0	-0.7	0.9993
	NA	43.1	-2.6	0.9990
4 ^b	A	45.7	-1.1	0.9991
	DA	32.1	-4.8	0.9991
	NA	3.0	-0.2	0.997
4 ^{a,b}	A	3.8	-0.1	0.997
	DA	2.6	-0.9	0.9990

^a Con estándar interno.

^b Con extracción. Serie número 4 con matriz de orina.

Tabla VIII.5.- Calibrados en alturas.

Serie n ^o	Sustancia	Pendiente x 10 ⁵ (V x mol ⁻¹ l)	O. Origen (V)	r
1	NA	3.08	-0.007	0.9998
	A	3.13	-0.01	0.9998
	DA	1.50	0.002	0.9995
	ISO	1.59	0.003	0.9995
2	NA	2.10	-0.001	0.99992
	A	2.25	-0.01	0.99995
	DA	0.73	0.02	0.998
2 ^a	NA	40.2	-0.21	0.9990
	A	42.2	-0.3	0.9990
	DA	15.0	0.1	0.997
3 ^b	NA	7.5	0.02	0.9990
	A	8.5	-0.003	0.995
	DA	5.2	-0.005	0.995
3 ^{a,b}	NA	39.8	-0.08	0.998
	A	40.3	-0.01	0.998
	DA	26.4	-0.36	0.9990
4 ^b	NA	8.6	-0.04	0.9990
	A	9.6	-0.01	0.9991
	DA	4.5	-0.02	0.9991
4 ^{a,b}	NA	33.3	-0.09	0.9990
	A	46.2	-0.08	0.997
	DA	20.4	-0.31	0.9992

^a Con estándar interno.

^b Con extracción. Serie número 4 con matriz de orina.

VIII.4.- Análisis de muestras de orina

Aplicando los procedimientos expuestos se determinó el contenido de NA, A y DA no conjugadas en tres muestras procedentes de donantes voluntarios no patológicos. Se utilizaron los calibrados de las series 3^{a,b} (Tablas VIII.4 y VIII.5) que se realizaron el mismo día que las determinaciones. En las Tablas VIII.6-VIII.8 se muestran respectivamente las cantidades halladas de NA, A e ISO. Todos los valores estuvieron comprendidos dentro de los valores normales eliminados en orina.

En la Figura VIII.1 se muestra el cromatograma correspondiente a una de las muestras de orina analizadas, a la que se añadió ISO. El cromatograma muestra únicamente y bien separados los picos correspondientes a los aminocromos derivados de las CAs endógenas NA, A y DA y del estándar interno. En la zona de 12-13 min aparece una región de ruido de Schlieren.

A partir de los resultados, se comprueba que el uso de ISO como estándar interno produce una ligera mejora en la precisión. Además la utilización del estándar interno asegura que no han ocurrido errores experimentales graves durante el proceso de extracción o la reacción de derivatización posterior. Un requisito que debe cumplirse para la utilización de este estándar es que el sujeto del que se analiza la muestra no esté sometido a tratamiento terapéutico con ISO.

Se intentó también el análisis mediante la inyección directa de orina derivatizada, evitando la etapa de extracción en alúmina, sin embargo este procedimiento se desechó ya que la sensibilidad disminuyó, el ruido de fondo aumentó notablemente, aparecieron algunos picos correspondientes a sustancias endógenas y la reproducibilidad fue mala, sobre todo para NA y DA, debido probablemente a una oxidación incompleta de estas CAs, o a la descomposición de los aminocromos.

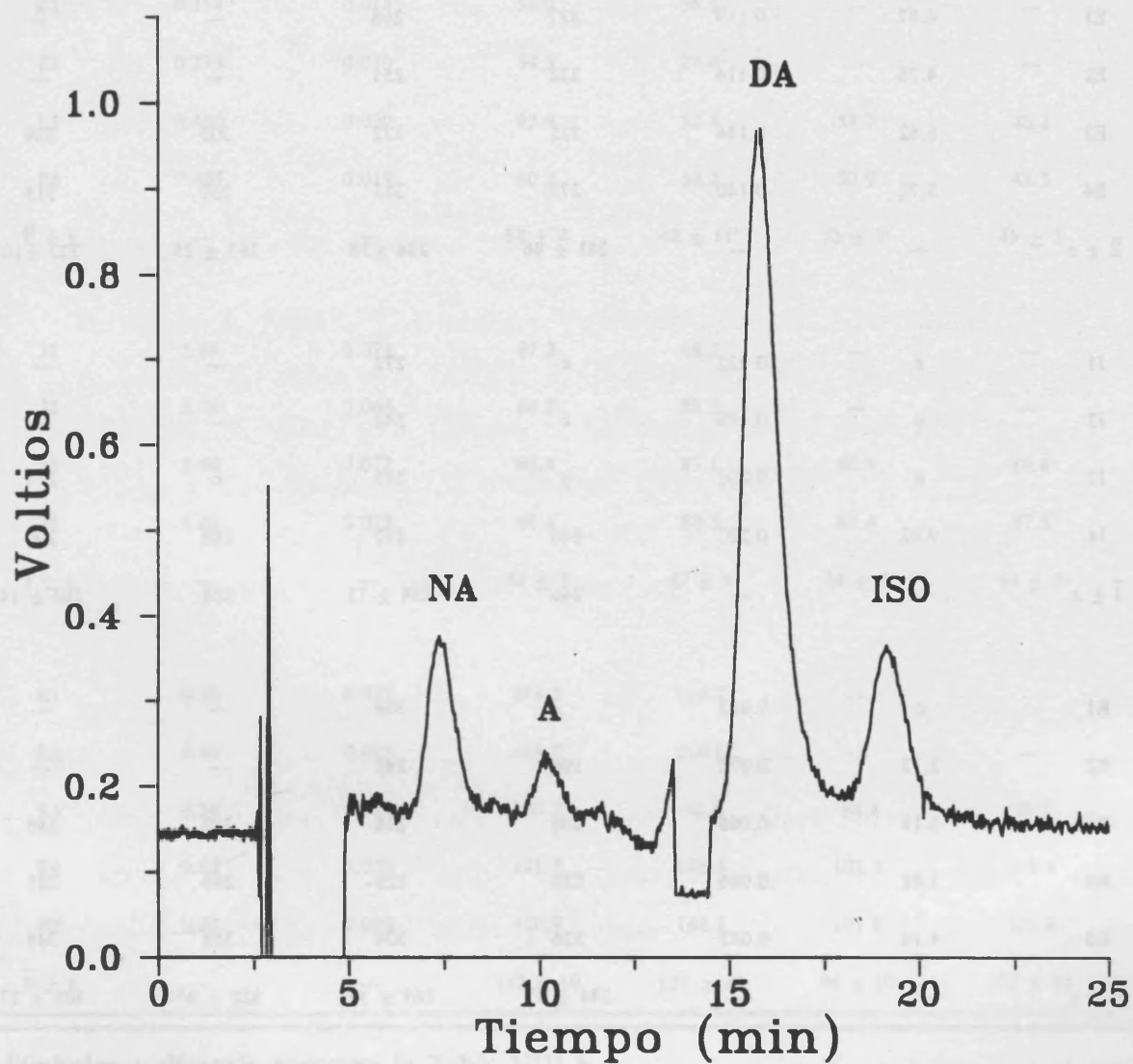


Figura VIII.1.- Cromatograma de una muestra real de orina mostrando los picos de las CAs endógenas y del estándar interno. En la zona 12-13 min se aprecia un pico de ruido de Schlieren.

Tabla VIII.6.- Determinación de NA.

Muestra ^a	Area (Vxs)	Altura (V)	Area (nmol/24h)	Altura (nmol/24h)	Area corr. ^b (nmol/24h)	Altura corr. ^b (nmol/24h)
E1	4.87	0.119	227	268	---	---
E2	4.78	0.114	222	255	---	---
E3	6.62	0.144	321	332	305	329
E4	5.72	0.140	273	322	269	315
$\bar{E} \pm s$	---	---	261 \pm 46	294 \pm 38	287 \pm 25	322 \pm 10
J1	c	0.222	c	272	---	---
J2	c	0.199	c	242	---	---
J3	c	0.205	c	249	c	270
J4	9.62	0.207	246	252	288	290
$\bar{J} \pm s$	---	---	246	254 \pm 13	288	280 \pm 14
R1	c	0.083	c	304	---	---
R2	2.73	0.078	194	282	---	---
R3	3.18	0.066	236	228	302	286
R4	3.01	0.066	220	228	296	281
R5	4.14	0.083	326	304	368	348
$\bar{R} \pm s$	---	---	244 \pm 57	269 \pm 39	322 \pm 40	305 \pm 37

^a Los símbolos E, J y R seguidos de un número identifican alícuotas distintas tomadas de tres donantes. Las diuresis fueron E = 1943 ml/24 h, J = 990 ml 24 h y R = 3370 ml/24 h; E, J y R son los valores promedios de los resultados anteriores, acompañados de su desviación estándar.

^b Con aplicación del método del estándar interno.

^c No pudo medirse por solapamiento del pico con una región de gradientes de concentración (banda Schlieren del ion sodio)

Tabla VIII.7.- Determinación de A.

Muestra ^a	Area (Vxs)	Altura (V)	Area (nmol/24h)	Altura (nmol/24h)	Area corr. ^b (nmol/24h)	Altura corr. ^b (nmol/24h)
E1	0.314	0.013	56.0	36.5	---	---
E2	0.275	0.010	54.3	29.6	---	---
E3	0.480	0.020	63.4	52.5	53.7	46.2
E4	0.407	0.019	60.2	50.2	50.9	43.3
$\bar{E} \pm s$	---	---	58 ± 4	42 ± 11^c	52 ± 2^c	45 ± 2
J1	2.89	0.073	87.2	88.3	---	---
J2	2.76	0.068	84.2	82.5	---	---
J3	2.68	0.072	82.4	87.1	80.9	89.8
J4	2.60	0.073	80.6	88.3	87.4	97.5
$\bar{J} \pm s$	---	---	84 ± 3	87 ± 3	84 ± 5	94 ± 5
R1	0.55	0.027	115.3	118.7	---	---
R2	0.40	0.025	103.8	110.8	---	---
R3	0.36	0.020	100.7	91.0	84.8	76.7
R4	0.63	0.033	121.7	142.3	102.5	116.9
R5	0.62	0.033	120.9	142.3	101.8	121.6
$\bar{R} \pm s$	---	---	112 ± 10	121 ± 22	96 ± 10	105 ± 25

^a Símbolos y diuresis como en la Tabla VIII.6.

Tabla VIII.8.- Determinación de DA

Muestra ^a	Area (Vxs)	Altura (V)	Area (nmol/24h)	Altura (nmol/24h)	Area corr. ^b (nmol/24h)	Altura corr. ^b (nmol/24h)
E1	20.87	0.313	1253	1183	---	---
E2	20.58	0.314	1237	1187	---	---
E3	23.59	0.359	1402	1355	1378	1361
E4	23.65	0.367	1405	1384	1369	1358
$\bar{E} \pm s$	---	---	1324 \pm 92 ^c	1277 \pm 107 ^d	1374 \pm 6 ^e	1360 \pm 2 ^d
J1	71.11	0.992	2040	1891	---	---
J2	58.94	0.907	1700	1729	---	---
J3	58.13	0.868	1678	1656	1679	1732
J4	60.74	0.868	1750	1656	1955	1850
$\bar{J} \pm s$	---	---	1792 \pm 168	1733 \pm 111	1817 \pm 195	1791 \pm 83
R1	11.71	0.188	1303	1245	---	---
R2	11.82	0.187	1313	1239	---	---
R3	9.38	0.154	1082	1026	1393	1231
R4	8.97	0.146	1043	974	1375	1134
R5	13.66	0.222	1488	1464	1686	1595
$\bar{R} \pm s$	---	---	1246 \pm 183	1190 \pm 196	1485 \pm 175	1320 \pm 243

^a Símbolos y diuresis como en la Tabla VIII.6.

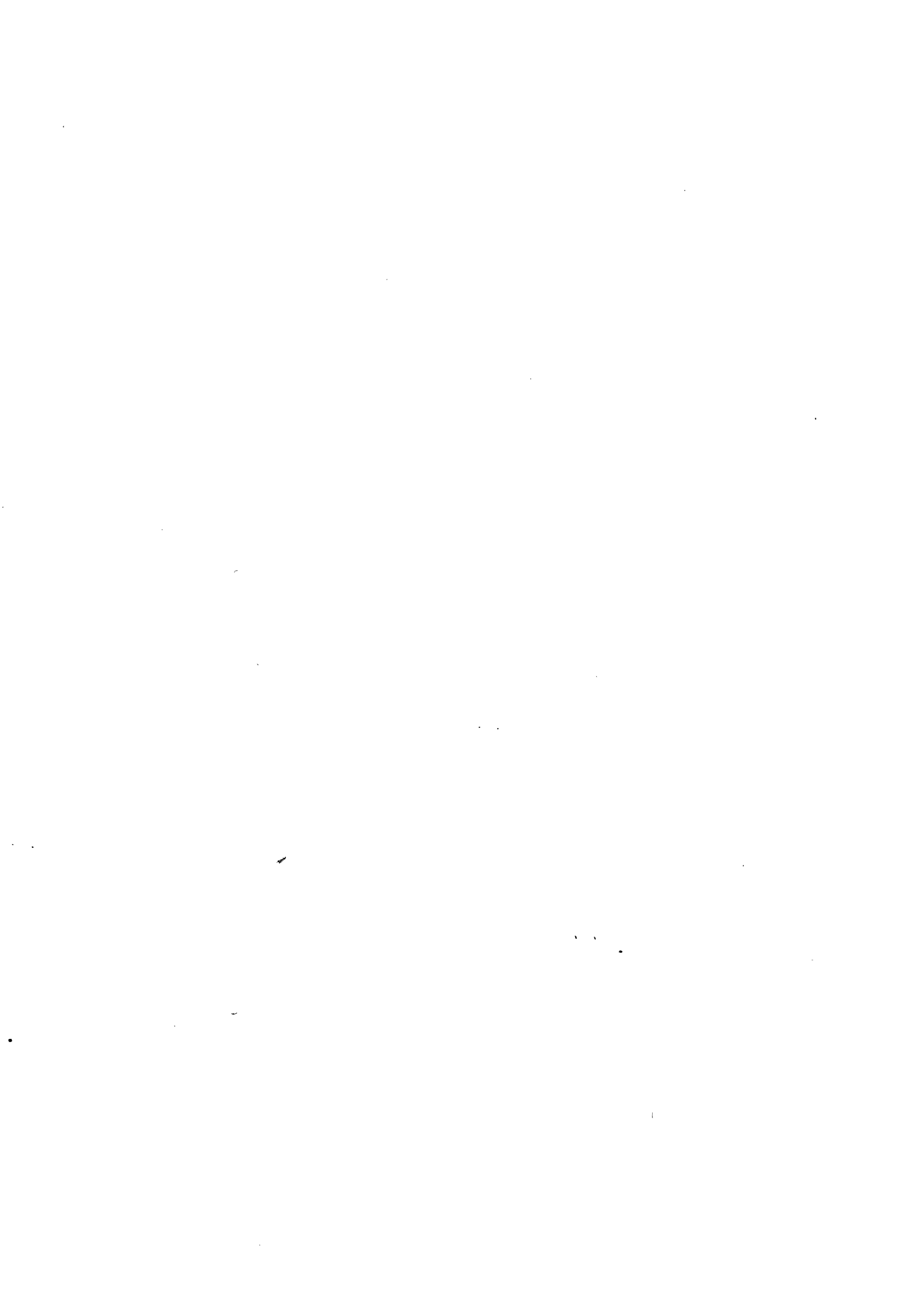
E, J y R son los valores promedio de los resultados anteriores, acompañados de desviación estándar.

^b Con aplicación del método del estándar interno.

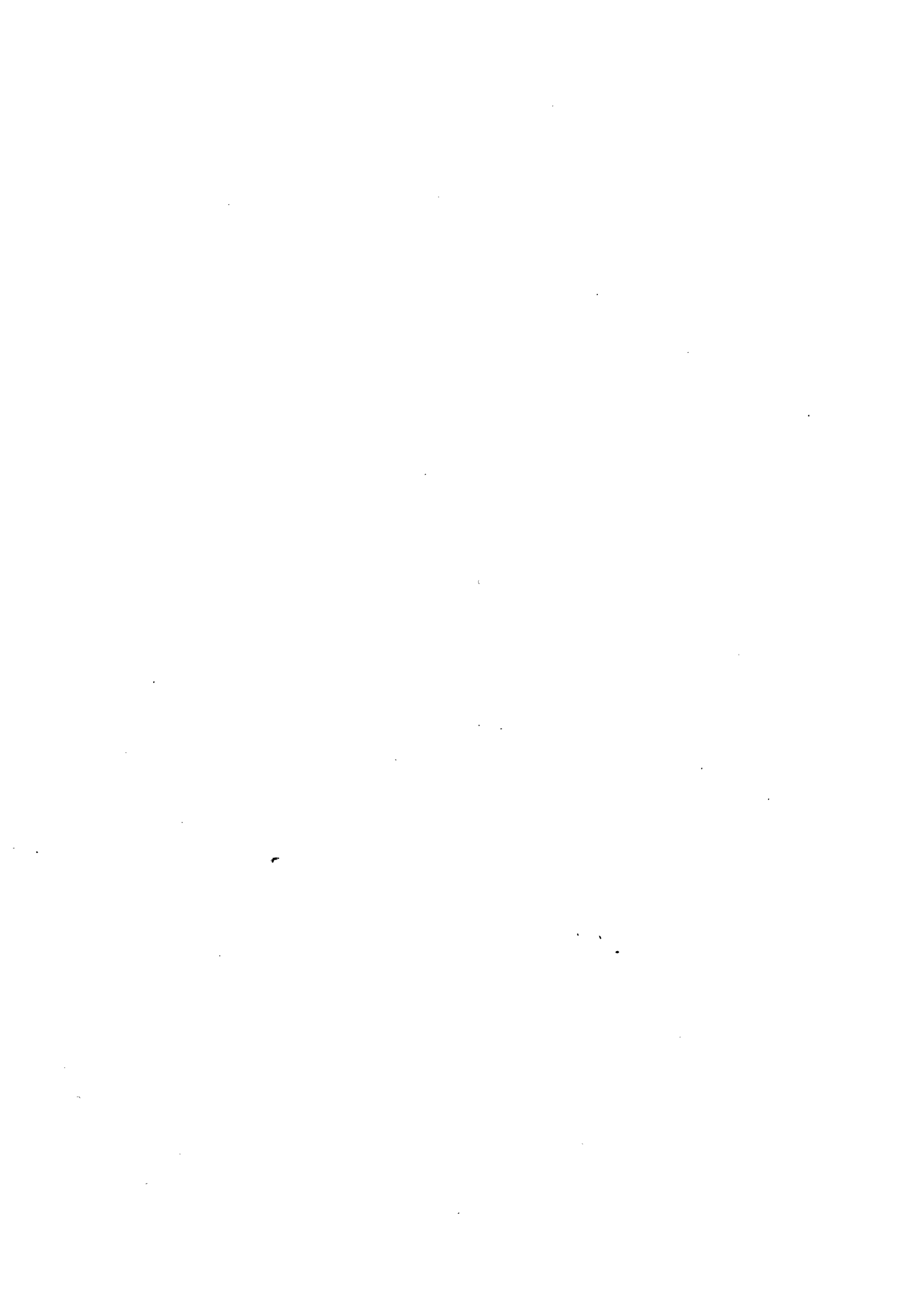
^c No pudo medirse por solapamiento del pico con una región de gradientes de concentración (banda Schlieren del ion sodio).

VIII.5.- Bibliografía

1. L. Zhang, X. Niu, R. Xu, Y. Lu y Y. Yu; *Yaoxue-Xuebao* 1987, 22, 591.
2. P. Wester, J. Gottfries y B. Winblad; *J. Chromatogr.* 1987, 59, 275.
3. M.G. Hadfield, C. Milio y N. Narasimhachari; *J. Chromatogr.* 1986, 369, 449.
4. G. Eisenhofer; *J. Chromatogr.* 1986, 50, 328.
5. C. Julien, C. Rodriguez, G. Cuisinaud, N. Bernard y J. Sassard; *J. Chromatogr.* 1985, 344, 51.
6. G.E. Hardee, J.W. Lai, S.D. Semrad y C.M. Trim; *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1982, 5, 279.
7. Y. Umegae, H. Nohta, M. Lee y Y. Ohkura; *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 2293.
8. H. Nohta, M. Lee, T. Watanabe, H. Nagaoka y Y. Ohkura; *Bunsei Kagaku* 1989, 38, 562.
9. H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae y Y. Ohkura; *Biomed. Chromatogr.* 1987, 2, 9.
10. A. Mitsui, H. Nohta y Y. Ohkura; *J. Chromatogr.* 1985, 344, 61.
11. H. Nohta, A. Mitsui y Y. Ohkura; *J. Chromatogr.* 1986, 380, 229.
12. T. Seki y Y. Yamaguchi; *J. Chromatogr.* 1984, 287, 407.



***IX.- ANALISIS DE PREPARADOS FARMACEUTICOS QUE
CONTIENEN CATECOLAMINAS MEDIANTE CLM CON
DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA***



IX.- ANALISIS DE PREPARADOS FARMACEUTICOS QUE CONTIENEN CATECOLAMINAS MEDIANTE CLM CON DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA

IX.1.- Introducción

Las CAs se utilizan como fármacos adrenérgicos, que activan ciertos complejos moleculares sensibles a las mismas, llamados adrenoceptores, generando respuestas celulares específicas, similares a las que se consiguen por estimulación de los nervios postganglionares simpáticos o de la médula suprarrenal (1).

La A aumenta la frecuencia cardíaca. A dosis bajas produce vasodilatación y aumenta el flujo sanguíneo, además de reducir la presión diastólica, por lo que produce taquicardia. A dosis elevadas produce aumento de la presión arterial. La A se utiliza como tratamiento profiláctico y sintomático en estados de shock, como los producidos por el síndrome de Stokes-Adams, y en paradas cardíacas de otro origen, como accidentes anestésicos, de inmersión o por electrocución, en casos de shock anafiláctico y en reacciones anafilácticas agudas afines, como urticaria, picor, inflamación de párpados, labios y lengua, edema de glotis y broncodilatación aguda. Por su acción vasoconstrictora local y anticongestiva, se utiliza para controlar o prevenir hemorragias locales en piel y mucosas. En el iris produce contracción del músculo radial, por lo que se emplea como midriático, para facilitar la exploración de la retina. También se emplea para tratar el glaucoma de ángulo ancho y el asma bronquial, y para inhibir las contracciones uterinas en casos de útero grávido (1).

La ISO es un adrenérgico potente que produce una estimulación cardíaca y una vasodilatación intensas. Su principal aplicación clínica es la dilatación bronquial, utilizable en casos de broncoespasmo, lo que la hace útil en el tratamiento de casos de asma bronquial. También inhibe las contracciones uterinas en el útero grávido, y reduce el tono y la motilidad del tracto gastrointestinal (1).

La DA se utiliza en la corrección de los desequilibrios hemodinámicos que se presentan como síntomas en los shocks producidos por infarto de miocardio, trauma,

septicemia endotóxica, cirugía a corazón abierto, fallos renales y descompensación cardíaca crónica en fallos cardíacos congestivos (2).

El D se utiliza como tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad se debe a la pérdida de actividad dopaminérgica, pero como la DA no atraviesa la barrera hematoencefálica, se recurre a su precursor inmediato, el D. El D difunde en las neuronas y se convierte en DA por acción del enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD) (1). Por su parte, el MD se emplea para combatir la hipertensión arterial. Es un modificador de la transmisión noradrenérgica que inhibe la acción del enzima dopa-descarboxilasa. Reduce la presión arterial al disminuir la resistencia periférica, la frecuencia cardíaca y el gasto cardíaco. Se utiliza en casos de hipertensión leve o moderada, sola o asociada a diuréticos y otros hipotensores.

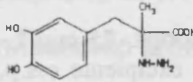
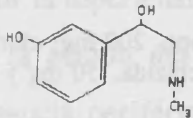
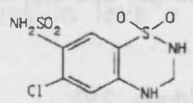
En este capítulo aplicamos la cromatografía líquida micelar a la determinación de CAs en diversos preparados farmacéuticos comercializados en el mercado español. En la Tabla IX.1 se muestran los preparados analizados, su composición, forma de presentación, y fabricante. Entre los preparados farmacéuticos del mercado no encontramos ninguno en el que estuviesen presentes dos o más CAs simultáneamente.

En las condiciones seleccionadas para llevar a cabo la determinación de las CAs fue posible determinar también algunos de los otros fármacos presentes en las muestras, como carbidopa (CD), fenilefrina (FEF) e hidroclorotiazida (HCT). El carbidopa es un inhibidor del enzima dopa-descarboxilasa, la fenilefrina es un vasoconstrictor que se aplica con fines descongestivos de las vías nasales, y la hidroclorotiazida es un diurético. La estructura de estas sustancias, así como los correspondientes factores de capacidad se muestran en la Tabla IX.2.

Tabla IX.1.- Composición y presentación de los preparados farmacéuticos.

Preparado farmacéutico	Composición	Presentación	Laboratorio
Sinemet	Carbidopa, 25 mg; L-dopa, 250 mg y excipiente c.s.p.	Comprimidos	Merck Sharp & Dohme
Madopar	L-Dopa, 200 mg; clorhidrato de benserazida, 50 mg y excipiente	Comprimidos	Roche
Aldomet	Metildopa, 250 mg; excipiente	Comprimidos	Merck Sharp & Dohme
Hydromet	Metildopa, 250; hidrocloreotiazida, 15 mg; excipiente	Comprimidos	Merck Sharp & Dohme
Picten	Metildopa, 0.07 g; triamtereno, 0.025 g; hidrocloreotiazida, 0.04 g; reserpina 0.0002 g; lactosa, sulfito y otros excipientes c.s.	Comprimidos recubiertos	Laboratorios Miquel S.A.
Adrenalina Llorente	Clorhidrato de adrenalina, 1 mg; excipiente	Jeringa precargada, 1 ml	Instituto Llorente S.A.
Dopamina Fides	Clorhidrato de dopamina, 200 mg; bisulfito sódico, 50 mg; agua para inyecciones c.s.p.	Ampollas, 10 ml	Laboratorios Fides S.A.
Aleudrina	Sulfato de isoprenalina, 0.2 mg; excipiente	Ampollas, 1 ml	Boehringer-Ingelheim
Frenal compositum	Sulfato de isoprenalina, 0.1 mg; cromoglicato disódico, 20 mg; lactosa y excipiente c.s.	Cápsulas	Sigma-tau España S.A.
Aldo-Asma aerosol	Clorhidrato de isoprenalina, 2.5 mg; ácido ascórbico, 1mg; clorhidrato de fenilefrina, 1 mg; etanol, 394.8 mg; excipiente c.s.p. (propelente), 1 ml	Frasco inhalador, 10 ml	Aldo-Unión S.A.

Tabla IX.2.- Estructura y factor de capacidad de otros fármacos determinados juntamente con una CA.

Fármaco		k'
Carbidopa		3.49
Fenilefrina		6.05
Hidroclorotiazida		0.48

IX.2.- Parte experimental

a) Aparatos

Se utilizó el mismo equipo cromatográfico Hewlett-Packard HP 1050, provisto de automuestreador, descrito en V.2.a. Se utilizó una columna Spherisorb ODS-2 y un caudal de 1 ml/min. El volumen de inyección fue 20 μ l, y la longitud de onda de la detección 280 nm.

b) Reactivos

- n-Propanol y monohidrógeno fosfato sódico de Panreac, para análisis.
- SDS de Merck de pureza 99%.
- Disoluciones de D, MD, A, DA e ISO, preparadas como se indica en III.2.c.

- Disoluciones 2×10^{-3} M, preparadas en ácido acético 0.1 M de los siguientes fármacos:
 - * Carbidopa, de Merck, Sharp & Dohme.
 - * Fenilefrina, de Aldo-Unión.
 - * Hidroclorotiazida, de Galloso Wellcome.

- Fase móvil de composición: SDS 0.1 M, Na_2HPO_4 0.01 M y 5 % de propanol. El pH se ajustó a 3.0 previamente a la adición de propanol.

Todas las disoluciones y fases móviles se prepararon con agua ultrapura. Las fases móviles y las muestras a inyectar se filtraron como se indica en V.2.b.

c) Procedimientos

Para analizar los preparados farmacéuticos que se presentaban en forma de comprimido, se pesaron 5 comprimidos y después de molidos en mortero y homogeneizados, se tomó una cantidad adecuada que se disolvió en 50 ml de fase móvil con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Las disoluciones se filtraron a través de una placa de vidrio sinterizado, y se diluyeron con agua. Cuando se trató de ampollas o jeringas precargadas, su contenido se diluyó directamente en agua.

Para el análisis del preparado Frenal Compositum, se tomaron 10 cápsulas y se disolvieron en 100 ml de fase móvil, directamente y sin abrir, con ayuda de un baño de ultrasonidos. Para analizar el aerosol de Aldo-Asma, se introdujo el frasco inhalador en posición invertida en un vaso de precipitados de 250 ml parcialmente lleno de agua, y se presionó repetidamente hasta que el frasco perdió presión. Posteriormente se perforó el frasco y se introdujo en el vaso de precipitados para vaciar en él todo su contenido, finalmente se llevó a volumen con agua en un matraz volumétrico.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, tomando las medidas en áreas o en alturas.

IX.3.- Resultados

- Características analíticas

Las características analíticas correspondientes a las CAs se muestran en el apartado VI.6. Para obtener las características analíticas de carbidopa, fenilefrina e hidroclorotiazida, se siguió el mismo procedimiento y se emplearon las mismas condiciones cromatográficas que para las CAs. Las curvas de calibrado obtenidas (Figura IX.1 y Tabla IX.3), fueron lineales en todo el margen de concentraciones estudiado: 4×10^{-6} - 4×10^{-5} M para carbidopa y fenilefrina, y 1×10^{-6} - 2×10^{-5} M para hidroclorotiazida. La sensibilidad para carbidopa fue similar a la obtenida para las CAs, mientras que para fenilefrina fue algo menor y para hidroclorotiazida unas 3 veces mayor. Los coeficientes de variación para concentraciones 4×10^{-5} M de carbidopa y fenilefrina y 9×10^{-6} M de hidroclorotiazida, fueron inferiores al 0.5% (Tabla IX.4).

Tabla IX.3.- Curvas de calibrado.

Fármaco	O.Origen	Áreas		O.Origen	Alturas	
		Pendiente	r		Pendiente	r
Carbidopa	-1.14	1.21×10^6	0.9998	-0.028	7.91×10^4	0.99993
Fenilefrina	-0.21	5.93×10^5	0.99990	-0.008	2.88×10^4	0.9997
Hidroclorotiazida	0.44	3.58×10^6	0.99994	-0.027	6.18×10^5	0.99993

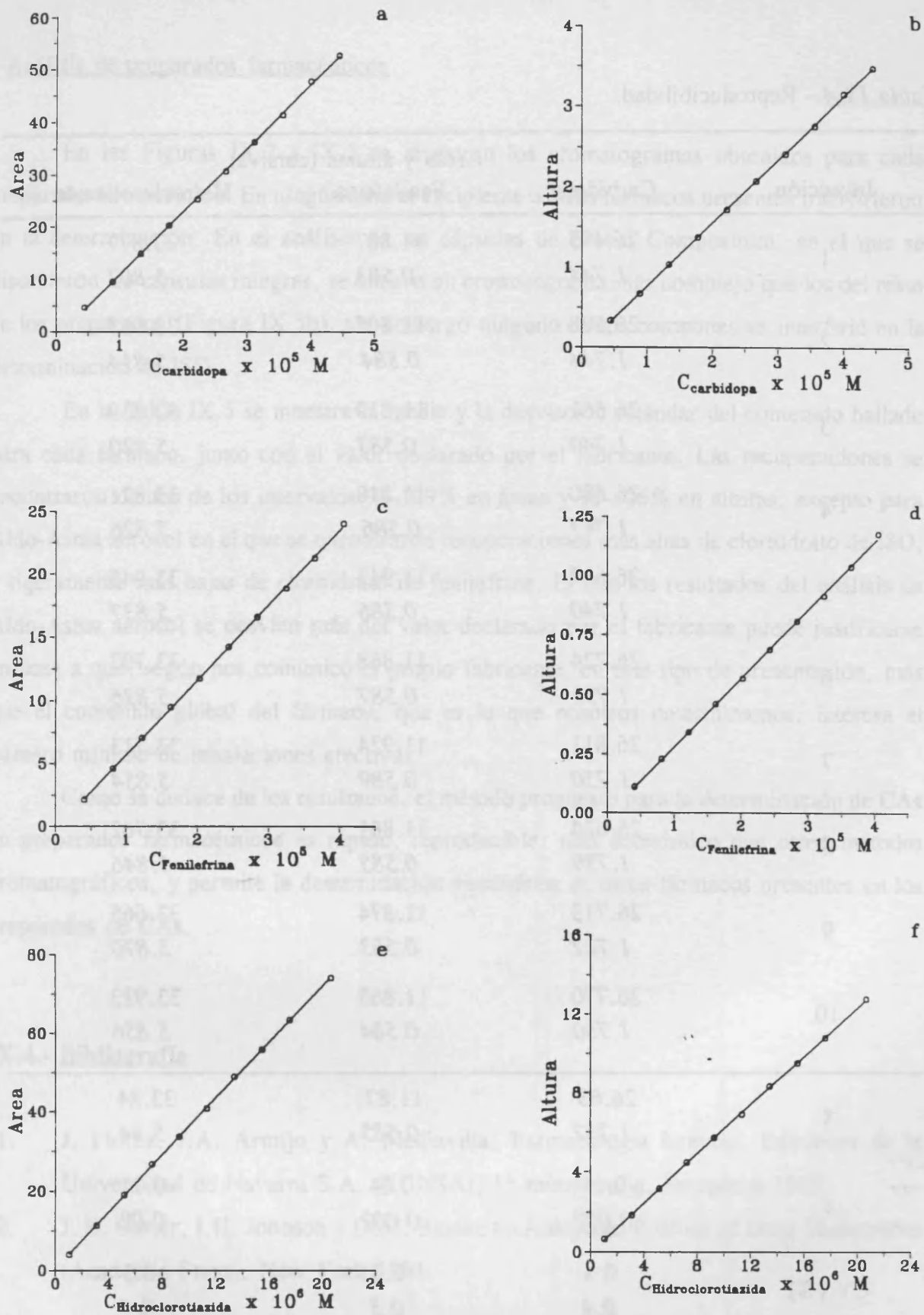


Figura IX.1.- Curvas de calibrado de carbidopa, fenilefrina e hidroclorotiazida.

Tabla IX.4.- Reproducibilidad.

Inyección	Áreas y alturas (cursiva)		
	Carbidopa	Fenilefrina	Hidroclorotiazida
1	26.495	11.887	33.877
	<i>1.744</i>	<i>0.583</i>	<i>5.807</i>
2	26.508	11.865	33.957
	<i>1.744</i>	<i>0.584</i>	<i>5.814</i>
3	26.561	11.819	33.839
	<i>1.740</i>	<i>0.583</i>	<i>5.820</i>
4	26.680	11.818	33.871
	<i>1.747</i>	<i>0.586</i>	<i>5.826</i>
5	26.617	11.943	33.945
	<i>1.740</i>	<i>0.586</i>	<i>5.837</i>
6	26.724	11.868	33.702
	<i>1.731</i>	<i>0.587</i>	<i>5.836</i>
7	26.811	11.924	33.713
	<i>1.730</i>	<i>0.589</i>	<i>5.854</i>
8	26.624	11.861	33.762
	<i>1.739</i>	<i>0.585</i>	<i>5.846</i>
9	26.713	11.874	33.665
	<i>1.727</i>	<i>0.583</i>	<i>5.870</i>
10	26.770	11.865	33.923
	<i>1.730</i>	<i>0.584</i>	<i>5.856</i>
\bar{x}	26.65	11.87	33.84
	<i>1.737</i>	<i>0.585</i>	<i>5.84</i>
s	0.11	0.04	0.11
	<i>0.007</i>	<i>0.002</i>	<i>0.02</i>
CV (%)	0.4	0.3	0.3
	<i>0.4</i>	<i>0.3</i>	<i>0.4</i>

- Análisis de preparados farmacéuticos

En las Figuras IX.2 a IX.5 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada preparado farmacéutico. En ningún caso el excipiente u otros fármacos presentes interfirieron en la determinación. En el análisis de las cápsulas de Frenal Compositum, en el que se disolvieron las cápsulas íntegras, se obtuvo un cromatograma más complejo que los del resto de los preparados (Figura IX.5b), sin embargo ninguno de los componentes interfirió en la determinación de ISO.

En la Tabla IX.5 se muestra la media y la desviación estándar del contenido hallado para cada fármaco, junto con el valor declarado por el fabricante. Las recuperaciones se encontraron dentro de los intervalos 99-109% en áreas y 95-106% en alturas, excepto para Aldo-Asma aerosol en el que se encontraron recuperaciones más altas de clorhidrato de ISO, y ligeramente más bajas de clorhidrato de fenilefrina. El que los resultados del análisis de Aldo-Asma aerosol se desvíen más del valor declarado por el fabricante puede justificarse en base a que, según nos comunicó el propio fabricante, en este tipo de presentación, más que el contenido global del fármaco, que es lo que nosotros determinamos, interesa el número mínimo de inhalaciones efectivas.

Como se deduce de los resultados, el método propuesto para la determinación de CAs en preparados farmacéuticos es rápido, reproducible, más económico que otros métodos cromatográficos, y permite la determinación simultánea de otros fármacos presentes en los preparados de CAs.

IX.4.- Bibliografía

1. J. Florez, J.A. Armijo y A. Mediavilla; Farmacología humana. Ediciones de la Universidad de Navarra S.A. (EUNSA), 1ª reimpresión, Pamplona 1989.
2. J. E. Carter, J.H. Johnson y D.M. Baaske en Analytical Profiles of Drug Substances (Academic Press), New York 1991.

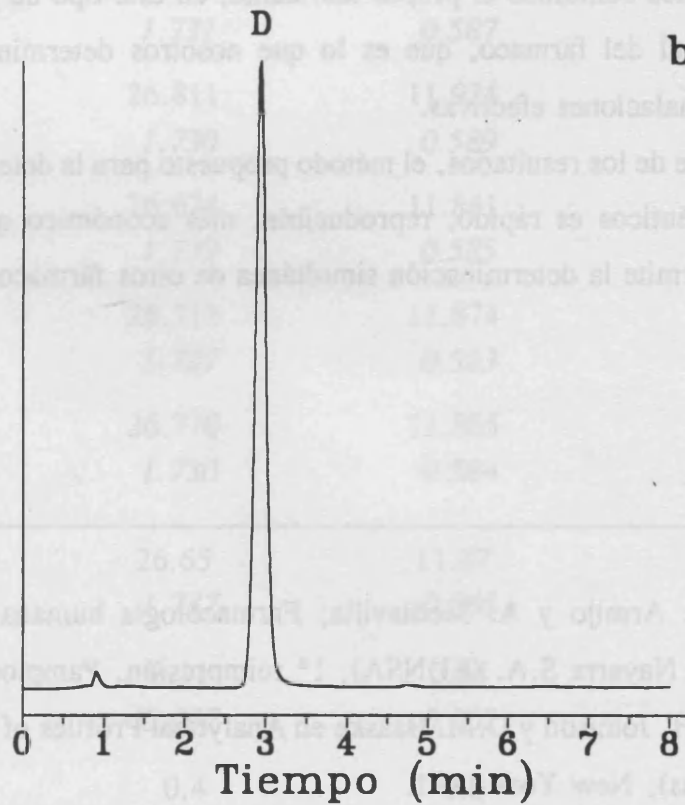
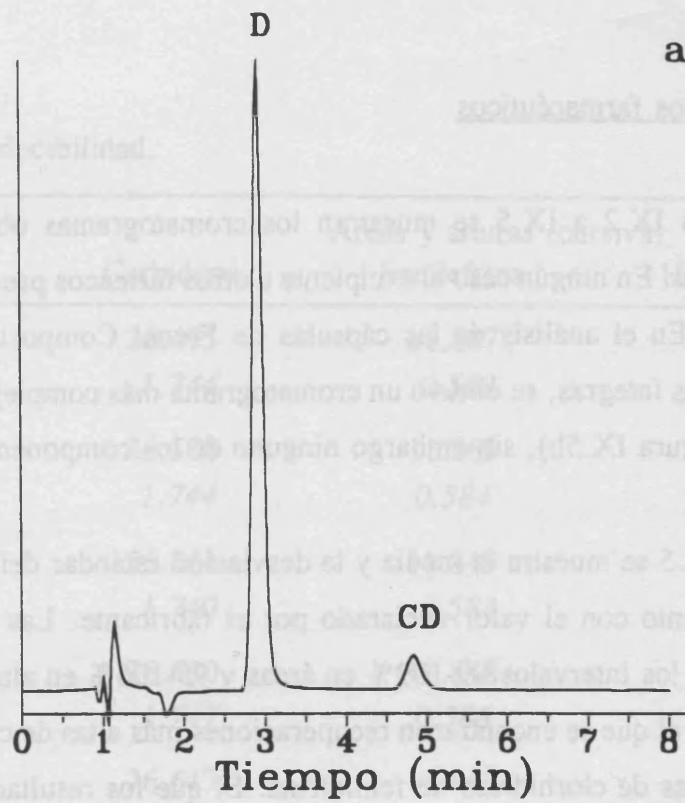


Figura IX.2.- Cromatogramas de preparados farmacéuticos que contienen L-dopa. (a) Sinemet, (b) Madopar. D, L-dopa; CD, carbidopa.

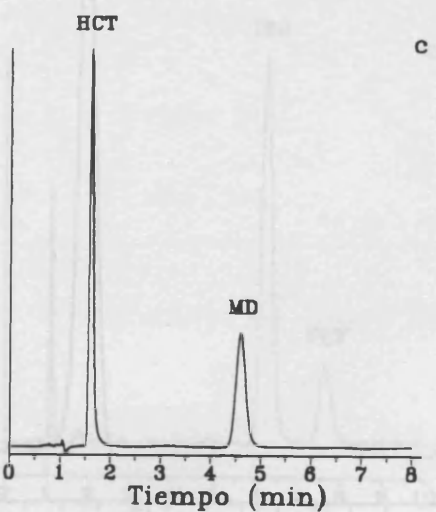
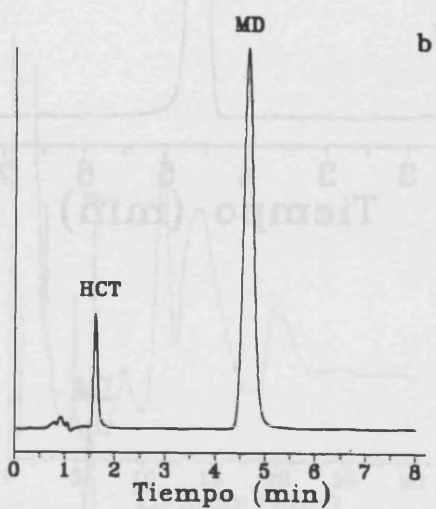
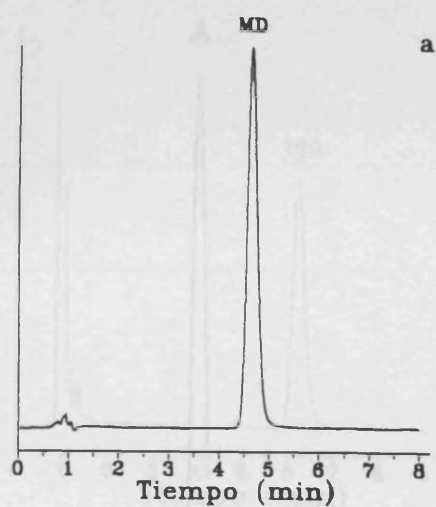


Figura IX.3.- Cromatogramas de preparados farmacéuticos que contienen metildopa. (a) Aldomet, (b) Hydromet, (c) Picten. MD, 2-metildopa; HCT, hidroclorotiazida.

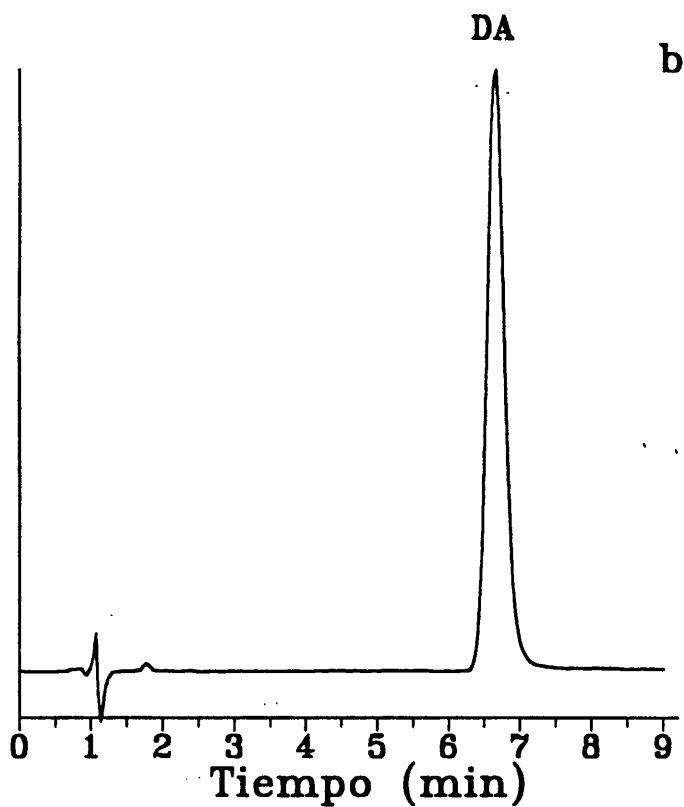
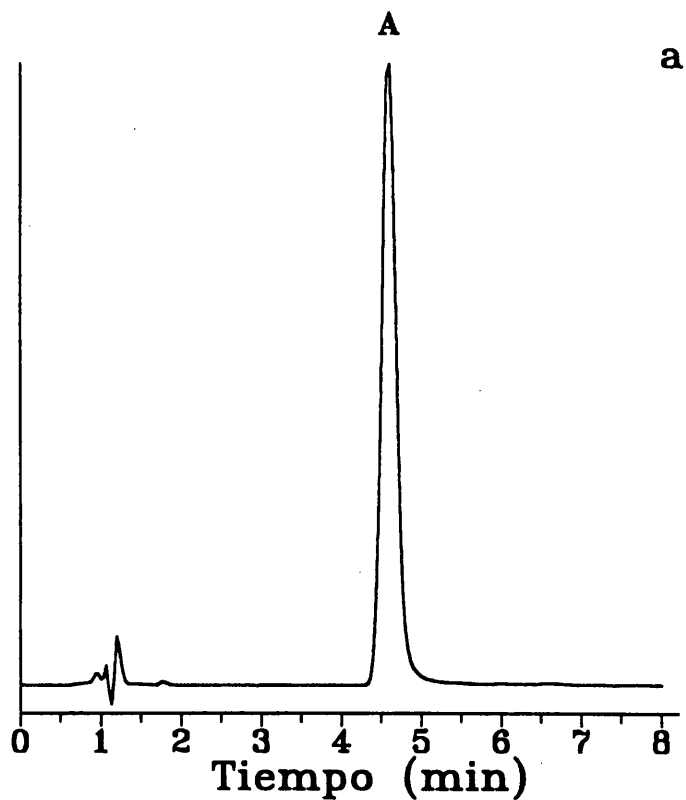


Figura IX.4.- Cromatogramas de preparados farmacéuticos conteniendo A y DA. (a) Adrenalina Llorente, (b) Dopamina Fides. Picos: A, adrenalina; DA, dopamina.

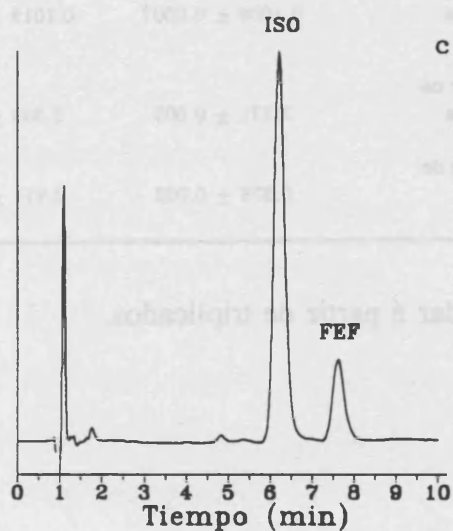
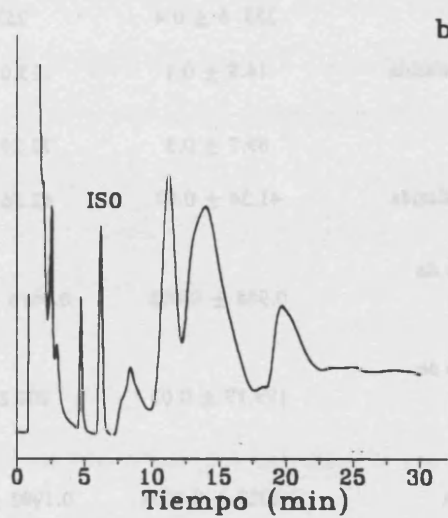
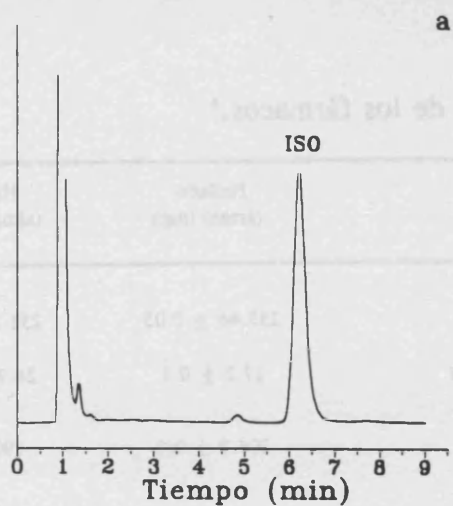


Figura IX.5.- Cromatogramas de fármacos conteniendo ISO. (a) Aleudrina, (b) Frenal compositum, (c) Aldo-asma aerosol. FEF, fenilefrina.

Tabla IX.5.- Recuperaciones de los fármacos.^a

Preparado	Fármaco	Hallado (áreas) (mg)	Hallado (alturas) (mg)	Declarado (mg)
Sinemet	L-Dopa	255.46 ± 0.05	251.2 ± 0.3	250
	Carbidopa	27.2 ± 0.1	24.9 ± 0.1	25
Madopar	L-Dopa	204.9 ± 0.6	190 ± 3	200
Aldomet	Metildopa	255.3 ± 0.4	251.1 ± 0.8	250
	Metildopa	253.6 ± 0.4	257 ± 1	250
Hydromet	Hidroclorotiazida	14.9 ± 0.1	15.0 ± 0.1	15
	Metildopa	69.7 ± 0.5	72.29 ± 0.08	70
Picten	Hidroclorotiazida	41.34 ± 0.07	42.56 ± 0.04	40
	Clorhidrato de adrenalina	0.988 ± 0.002	0.9616 ± 0.0003	1
Adrenalina LLorente	Clorhidrato de dopamina	199.19 ± 0.03	201.2 ± 0.4	200
Aleudrina	Sulfato de isoprenalina	0.2020 ± 0.0005	0.1992 ± 0.0002	0.2
Frenal compositum	Sulfato de isoprenalina	0.1004 ± 0.0007	0.1019 ± 0.0008	0.1
Aldo-Asma	Clorhidrato de isoprenalina	3.171 ± 0.003	3.303 ± 0.002	2.5
	Clorhidrato de fenilefrina	0.878 ± 0.002	0.911 ± 0.004	1

^a Medias y desviaciones estándar a partir de triplicados.

Figura IX.4 - Cromatogramas de preparados farmacéuticos: (a) Adrenalina LLorente, (b) Dopamina Fides, Picten, A, adrenalina; DA, dopamina.

X.- CONCLUSIONES

X.- CONCLUSIONES

Estudios previos:

- * Las CAs pueden ser oxidadas a los correspondientes aminocromos de color rojo. Los aminocromos pueden ser detectados mediante técnicas absorciométricas ($\lambda = 488$ nm para D, NA y A y 475 nm para DA), como la espectrofotometría o la ELT.
- * Con NH_4VO_3 la oxidación de las CAs es incompleta, mientras que el hexacianoferrato(III) de potasio da lugar a oxidación cuantitativa con una relación molar oxidante:CA de 5. Con concentraciones de hexacianoferrato(III) 2.5×10^{-3} M (detección espectrofotométrica) o 2×10^{-4} M (detección ELT) los calibrados son lineales para un amplio intervalo de concentraciones, y las señales analíticas de los blancos de reactivos no se modifican.
- * Tanto la velocidad de oxidación de las CAs, como la estabilidad de los aminocromos formados dependen fuertemente del pH del medio. En general un incremento de pH entre 4.8 y 7 supone un aumento de las velocidades de oxidación y de descomposición. A pH 7 la oxidación de D, NA, A y DA es prácticamente instantánea.
- * La estabilidad de los aminocromos es mayor a concentraciones bajas que altas. A las concentraciones utilizadas en ELT los aminocromos son mucho más estables que a las concentraciones usuales en espectrofotometría.
- * La presencia de etanol en el medio exalta la señal neta de ELT de los aminocromos, pero también disminuye la velocidad de oxidación de las CAs y aumenta la velocidad de descomposición de los aminocromos.
- * Los límites de detección en ELT son del orden de 1 a 4 ng/ml. En comparación con la espectrofotometría, estos límites de detección son 15 veces inferiores en medio acuoso, y 50 veces en medio agua-etanol (50/50). Los coeficientes de variación son

del 1.2% en espectrofotometría y del 2.6% en ELT, para concentraciones de 8×10^{-5} M y de 1×10^{-5} M, respectivamente.

Efectos asociados:

- * Las disoluciones de hexacianoferrato(III) en medio agua/etanol son fotolizadas por la radiación procedente del láser de bombeo, dando lugar a pequeñas partículas de hidróxido de hierro(III). Estas partículas, bajo los efectos combinados de la presión de la radiación y de la convección térmica son depositadas sobre la pared posterior de la celda. Las partículas de hidróxido de hierro absorben la radiación de 514.5 nm del laser de Ar^+ dando lugar a un incremento continuo de la señal de lente térmica. Este efecto no impide el uso del hexacianoferrato(III) como reactivo oxidante para la determinación de muchos compuestos mediante ELT, ya que puede ser retardado o inhibido reduciendo la concentración de etanol, utilizando acetona en lugar de alcohol, o bien añadiendo citrato u otro ligando complejante del Fe(III). No es posible aplicar el efecto a la determinación de hexacianoferrato(III) por falta de reproducibilidad.

Separación de aminocromos mediante CLM:

- * La CLM con fases móviles de dodecil sulfato sódico, y sílice alquilada como fase estacionaria, permite la separación de los aminocromos. Surfactantes no iónicos o catiónicos no son adecuados.
- * Todos los aminocromos son compuestos polares que tienen carácter doble iónico (zwitteriónico) y se comportan como compuestos débilmente asociados a las micelas y con baja afinidad por la fase estacionaria. Por ello, el reparto de los aminocromos se produce principalmente entre la seudofase acuosa de la fase móvil y la fase estacionaria.
- * Los aminocromos más hidrofóbicos presentan valores mayores de las constantes de asociación soluto-micela y de los coeficientes de reparto seudofase acuosa-fase estacionaria (K_{AM} y $\Phi_{P_{sw}}$). Al disminuir el pH de la fase móvil de 3 a 2 aumenta la

afinidad de los aminocromos por las micelas y por la fase estacionaria, debido probablemente a los equilibrios de protonación de los aminocromos.

- * No es aconsejable el uso de fases móviles micelares puras de SDS, ya que aunque se obtienen picos bien separados, los tiempos de retención de los aminocromos más hidrofóbicos son elevados y las eficacias son bajas. Cuando se utilizan fases móviles micelares híbridas, que contienen un alcohol como modificador, los factores de capacidad disminuyen y mejoran las eficacias. Estas variaciones son tanto más notables cuanto mayor es la hidrofobicidad del alcohol y/o del aminocromo, y cuanto mayor es la concentración de alcohol. La fuerza eluyente de Snyder aumenta con la hidrofobicidad del alcohol, y para un alcohol determinado con la hidrofobicidad del aminocromo.
- * Con fases móviles híbridas, al aumentar la concentración de SDS, los factores de capacidad descienden ligeramente y las eficacias empeoran. Las variaciones de pH entre 7 y 3.5 no afectan a la retención, pero a pH 2.3 se produce un aumento brusco de la retención para todos los aminocromos. Se propone amortiguar el pH de la fase móvil a 4.9. Como sistema amortiguador se propone el uso de citrato, ya que la presencia de fosfato produce reacciones de precipitación, y además en medio citrato los aminocromos son más estables.
- * En la separación cromatográfica de los aminocromos juegan un papel importante las interacciones con los grupos silanol residuales de la fase estacionaria. Con una columna ODS-1 se consigue una buena resolución de los picos de NACR, ACR, DACR e ISOCR, mientras que con una columna ODS-2, que presenta un recubrimiento mayor de los grupos silanol residuales, con fases móviles de igual composición no es posible.
- * El caudal afecta al ruido, a la sensibilidad y a las eficacias. Así, un aumento del caudal supone un ligero incremento del ruido y una pérdida de sensibilidad, especialmente si se miden alturas de picos, debido a la fuerte disminución que experimenta la eficacia al aumentar el caudal.

- * Para la determinación de CAs mediante CLM de aminocromos, se propone la oxidación con hexacianoferrato(III), seguida de separación con una columna ODS-1, utilizando como fase móvil una disolución de SDS 0.05 M en medio citrato 0.03 M de pH 4.9 con un 7% de propanol, y un caudal de 0.5 ml/min durante los primeros 3.5 min, y de 0.1 ml/min hasta el final del cromatograma. En estas condiciones se obtienen picos bien resueltos y eficacias y tiempos de retención adecuados.
- * Cuando se utiliza detección ELT, los cromatogramas muestran perturbaciones en la línea base, que no solapan con los picos de los aminocromos (NACR, ACR, DACR e ISOCR). Estas perturbaciones, que son de naturaleza refractométrica, están producidas por gradientes de concentración de especies no retenidas y retenidas (ion sodio) y se manifiestan como ruido de Schlieren.
- * Los calibrados son lineales, tanto en áreas como en alturas, con los dos detectores utilizados (espectrofotométrico y ELT). Los coeficientes de variación son en general inferiores al 3%. Los límites de detección son unas seis veces menores utilizando ELT. En consecuencia, la detección por ELT posibilita la aplicación del método a la determinación de CAs en fluidos biológicos.

Separación de CAs mediante CLM:

- * Al contrario de lo que sucede con los aminocromos, en cromatografía líquida con fases móviles micelares de SDS, las CAs presentan una gran afinidad por las micelas y por la fase estacionaria, como lo demuestran los elevados valores de K_{AM} y de ΦP_{sw} , y el elevado poder eluyente del tensioactivo. Tanto las constantes de asociación soluto-micela como el coeficiente de reparto seudofase acuosa-fase estacionaria aumentan con la hidrofobicidad de la CA. Esta gran afinidad por las micelas y por la fase estacionaria, no puede justificarse únicamente por interacciones hidrofóbicas, sino por la fuerte atracción de carácter electrostático entre el grupo amino protonado y la superficie cargada negativamente de la micela o de la fase estacionaria. Tanto K_{AM} como ΦP_{sw} aumentan con la hidrofobicidad de la CA. La introducción de un 10% de propanol hace disminuir el valor de ambos coeficientes de reparto.

- * El pH de la fase móvil es la variable que más afecta al comportamiento cromatográfico de D y MD, ya que estas CAs poseen además del grupo amino un grupo carboxilo, y por consiguiente, dependiendo del pH se encontrarán bien en forma catiónica o doble iónica (zwitteriónica). A valores de pH superiores a 6, el D y el MD eluyen junto al volumen muerto. Las variaciones del pH no modifican de modo relevante la retención de las otras CAs, pero producen importantes cambios en las eficacias de todas las CAs. Para valores de pH superiores a 4, en general, el número de platos teóricos desciende notablemente. Se propone un $\text{pH} = 3$ como valor óptimo, ya que a este pH las eficacias son altas, el D y el MD se encuentran protonados y presentan una retención adecuada, y además es posible utilizar un modificador orgánico para aumentar la fuerza eluyente de la fase móvil sin perder eficacia.
- * Con fases micelares no tamponadas, la presencia de alcohol, si bien disminuye la retención de las CAs como es habitual, produce por el contrario pérdida de eficacia. Sin embargo, en fases móviles de SDS tamponadas a pH 3, las eficacias aumentan ligeramente con la presencia de alcohol.
- * La fuerza eluyente del tensioactivo se ve ligeramente atenuada por la presencia de modificador, y también la fuerza eluyente del propanol se ve ligeramente atenuada al aumentar la concentración de tensioactivo. La fuerza eluyente del propanol es mayor para D y MD, probablemente debido a que la presencia de alcohol produce desprotonación del carboxilo. Para el resto de las CAs, la fuerza eluyente aumenta con la hidrofobicidad de la CA.
- * Tanto para los CAs como para los aminocromos se ha comprobado que la relación $\log k'$ frente a la fracción de modificador orgánico no es lineal, y el punto correspondiente a la fase puramente micelar se desvía claramente de la linealidad. Los valores de $\log k'_0$ obtenidos del ajuste lineal resultan menores que los experimentales. En el caso de los aminocromos, el ajuste cuadrático ofrece buenos resultados.

- * La retención de las CAs, que no poseen grupo carboxilo, en función de la concentración de propanol y de tensioactivo, se describe bien mediante la ecuación:

$$\frac{1}{k'} = A\varphi + B\mu + C\mu\varphi + D$$

En el caso de D y MD, el uso de esta ecuación puede originar errores importantes, debido posiblemente a que el valor del pH de la fase móvil está próximo al logaritmo de las correspondientes constantes de protonación, y la ecuación propuesta no tiene en cuenta las variaciones debidas a los equilibrios ácido-base.

- * A partir de la ecuación propuesta, y tomando como criterio de optimización el producto normalizado de las resoluciones, se obtuvo la composición de la fase móvil óptima para la separación rápida de las CAs endógenas. El cromatograma experimental coincide con el predicho, tan sólo el pico del D se desvía ligeramente. Por consiguiente, si se utilizase un detector suficientemente sensible, la CLM permitiría la determinación de CAs en fluidos biológicos sin derivatización previa. Dicho detector podría basarse en la ELT con bombeo UV.
- * Se han determinado cromatográficamente las constantes de protonación en medio micelar para D y MD. Las diferencias respecto a medio acuoso están de acuerdo con los valores de las constantes de asociación soluto-micela.

Determinación de la suma CAs no conjugadas en orina:

- * Se ha desarrollado un método de adición estándar para determinar el contenido global de CAs no conjugadas en orina (oxidación, a pH 6.5 en medio citrato, y evaluación de la suma de aminocromos mediante ELT). Con la utilización de DA como patrón, los errores sistemáticos asociados son bajos (del -4.6 % para muestras con contenidos normales, al +4.8 % para muestras con contenidos anormalmente altos) y no afectan al valor diagnóstico del método. Ello es debido a que en las muestras de orina la DA es la CA predominante y, a que todos los aminocromos poseen sensibilidades similares en ELT, presentando el DACR un valor intermedio. El método ha sido

aplicado a muestras de orina procedentes de sujetos no patológicos, y a muestras con un contenido de CAs muy superior al normal, con buenos resultados.

- * La presencia de urocromos hace inviable la determinación directa de CAs en orina mediante ELT. Para la eliminación de los urocromos, el uso de columnas de intercambio catiónico SCX en HCl 0.1 M no es efectivo. Por el contrario, usando columnas de sílice alquilada y muestras centrifugadas, filtradas a su pH natural y amortiguadas a pH 6.5 con tampón citrato, la eliminación es efectiva. Sin embargo, los resultados que se obtienen con muestras de sujetos no patológicos son unas 10 veces superiores a los valores normales, y en consecuencia, este método no es adecuado. Los urocromos no son la única interferencia, sino que posiblemente otras especies, de las muchas presentes en la muestra, son oxidadas por el hexacianoferrato(III) dando lugar a compuestos que absorben a 514 nm. Las interferencias se eliminan muy eficazmente mediante separación de las CAs libres de la matriz de orina por adsorción sobre alúmina a pH 8.5 (tampón Tris), y elución con ácido.
- * De los resultados obtenidos se puede concluir que el método es rápido, ya que la preparación de la muestra se realiza en unos 15 min, con un equipo de extracción en fase sólida adecuado se pueden tratar varias muestras al mismo tiempo, y las medidas de ELT se realizan en segundos. Los límites de detección son inferiores a los requeridos y la reproducibilidad es satisfactoria.

Determinación de CAs en orina mediante CLM:

- * El procedimiento de determinación individual de CAs no conjugadas en orina mediante extracción en fase sólida con alúmina, derivatización a aminocromos, separación de los mismos mediante CLM y detección por ELT ha sido aplicado a muestras reales con buenos resultados.



- * El uso de la ISO como estándar interno produce una ligera mejora en la precisión de los resultados. Además, la utilización del estándar interno asegura que no han ocurrido errores experimentales graves en el proceso de extracción o en la reacción de derivatización.
- * Teniendo en cuenta el factor de preconcentración de 4, y los límites de detección (3.6-4.7 ng/ml), la detección mediante ELT es adecuada para análisis de orina. Por el contrario la detección espectrofotométrica no es adecuada. Respecto al sistema de detección electroquímico, que es el más usado en la determinación cromatográfica de CAs, el método que se propone es menos sensible pero más selectivo. Con detección electroquímica, se hace necesario un pretratamiento más complejo de la muestra.

Determinación de CAs en preparados farmacéuticos mediante CLM:

- * Con una columna ODS-2 y una fase móvil constituida por SDS 0.1 M, Na_2HPO_4 0.1 M y 5% de propanol, ajustada a pH 3.0, se obtiene una elución rápida de todas las CAs, los factores de capacidad se encuentran entre 2.2 y 5.5, y las eficacias son adecuadas. Utilizando detección espectrofotométrica a 280 nm, los calibrados en áreas y en alturas son lineales en el intervalo de concentraciones estudiado (8×10^{-6} - 8×10^{-5} M). Las sensibilidades calculadas a partir de las áreas, son similares para todas las CAs. Los coeficientes de variación fueron inferiores al 0.5%. Los límites de detección obtenidos están entre 5.2 y 15.8 ng/ml. En estas condiciones es posible el análisis rápido, reproducible y económico de CAs en preparados farmacéuticos. El método permite también la determinación de otros fármacos presentes en los preparados farmacéuticos de CAs.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D. JOSE MARIA SANCHIS MALLOLS la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Valencia, a 12 de Noviembre de 1993

El Secretario,

El Presidente

