

TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN QUÍMICA

COMPARATIVA DE DOS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
USANDO CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOLES



María del Pilar Reche Ramírez

Este Trabajo Fin de Grado presentado por Dña. María del Pilar Reche Ramírez se ha realizado en el grupo de investigación "Calidad en Química Analítica, Alimentaria, Ambiental y Clínica" (FQM-302) del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la tutela de los Dres. Francisco J. Lara Vargas, investigador posdoctoral del Programa Talent Hub y Ana M. García Campaña, catedrática de Universidad.

Granada, 11 de Julio de 2016

ÍNDICE

1.	OBJETO DE LA MEMORIA	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Empleo de benzimidazoles como antihelmínticos y plaguicidas.....	2
2.2	Modo de acción, actividad biológica y toxicidad.....	6
2.3	Legislación sobre el control de residuos de benzimidazoles.....	8
2.4	Antecedentes sobre la determinación de benzimidazoles.....	12
2.5	Generalidades sobre la cromatografía de líquidos y su evolución.....	13
3.	REACTIVOS Y MATERIAL	17
4.	INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	18
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1	OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	19
5.1.1	Cromatografía de líquidos capilar.....	19
5.1.1.1	Condiciones y pruebas preliminares.....	19
5.1.1.2	Evaluación de la naturaleza del disolvente orgánico.....	24
5.1.1.3	Evaluación de la naturaleza de la fase acuosa.....	29
5.1.2	Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución.....	31
5.1.2.1	Condiciones y pruebas preliminares	31
5.1.2.2	Evaluación del flujo de la fase móvil.....	35
5.1.2.3	Evaluación de la temperatura de separación.....	37
5.1.2.4	Identificación de los picos cromatográficos.....	39
5.1.2.5	Rectas de calibrado.....	41
5.2	COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESTUDIADOS.....	45
6.	CONCLUSIONES	46

1. OBJETO DE LA MEMORIA.

Los benzimidazoles son antiparasitarios internos que se usan comúnmente para el control de gusanos endoparásitos del ganado bovino, ovino, caprino, porcino y de las aves, así como desparasitantes para perros y gatos. Son empleados en la agricultura para el control de nematodos parásitos de diversos cultivos y también presentan propiedades fungicidas, por lo que son empleados durante el almacenaje y transporte de fruta y verdura.

Debido a su uso, estas sustancias pueden aparecer como residuos tanto en alimentos de origen animal como en vegetales, pudiendo provocar efectos adversos para la salud. Es por ello que la cantidad máxima de residuo de estos compuestos en alimentos está legislada en la Unión Europea de modo que superar esos límites constituye un delito contra la salud.

Por ello es necesario disponer de métodos analíticos para la determinación sensible y selectiva de estos compuestos en diversas matrices alimentarias. En este sentido, el objeto de este trabajo fin de grado consiste en la evaluación y comparación de dos metodologías analíticas para su control, usando la cromatografía de líquidos capilar y la cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EMPLEO DE BENZIMIDAZOLES COMO ANTIHELMÍNTICOS

Los benzimidazoles son compuestos orgánicos que se componen de un anillo de benceno unido a un anillo de imidazol en las posiciones 4 y 5. Son ligeramente básicos, debido al nitrógeno del imidazol, que los hace capaces de aceptar un protón. Sin embargo, comparándolos con el imidazol, los benzimidazoles se comportan como una base más débil. El anillo de benceno puede ayudar a deslocalizar los electrones del nitrógeno del imidazol a través de una variedad de conformaciones en resonancia [1]. Esta conjugación hace que aumente la estabilidad de los benzimidazoles y disminuya la afinidad protónica del nitrógeno del imidazol. Es bien conocido que el anillo de imidazol presenta propiedades ácidas y básicas, ya que esta molécula puede ser protonada ($pK_a \sim 5-6$) o desprotonada ($pK_a \sim 12$) [2], como se muestra en la figura 1.

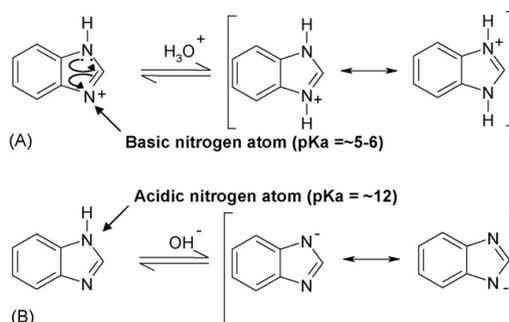


Figura 1. Ionización de la molécula de benzimidazol bajo condiciones ácidas (A) y bajo condiciones básicas (B) [3].

[1]G. Jerez, G. Kaufman, M. Prystai, S. Schenkeveld, K. K. Donkor, *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 1087.

[2]M. T. Davies, P. Mammalis, V. Petrow, B. Sturgeon, *J. Pharm. Pharmacol.*, 3 (1951) 420.

[3]M. Danaher, H. Ruyckb, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M.O'Keeffe, *J. Chromatogr. B*, 845 (2007) 5.

Los benzimidazoles se introdujeron al principio de los años 60. Los primeros compuestos, tiabendazol, parabendazol, oxibendazol y mebendazol, eran muy eficaces contra parásitos adultos y larvas de la mayoría de los nematodos gastrointestinales del ganado. Posteriormente, a finales de los años 70, se introdujeron benzimidazoles de amplio espectro más modernos como el albendazol [4], el fembendazol [5] y el oxfendazol [6], eficaces también contra larvas inhibidas así como contra nematodos pulmonares y cestodos, pero no contra las fasciolas, a excepción del albendazol, eficaz contra las fasciolas adultas.

Por lo que se refiere al espectro de actividad, el triclabendazol [7] es una excepción entre los benzimidazoles pues es eficaz contra adultos y todas las fases de desarrollo de las fasciolas, pero no contra nematodos ni cestodos. Otros benzimidazoles se conocen como pro-benzimidazoles (o pre-benzimidazoles) porque, poco después de ser administrados y ya en el cuerpo del hospedador, se transforman (sobre todo en el hígado) en un benzimidazol que es el que aporta la eficacia antihelmíntica. El febantel [8] se transforma en fembendazol, el netobimín [9] en albendazol, y el tiofanato en un compuesto benzimidazólico no comercializado como tal. Los pro-benzimidazoles suelen ser más solubles en agua y por tanto de más fácil formulación y administración. Los benzimidazoles poseen un grupo sulfóxido y sulfuro introducidos posteriormente que ofrecen un espectro de actividad mucho más amplio y eficaz.

Los benzimidazoles más empleados en el ganado y en mascotas son los que se muestran a continuación en la tabla 1, junto con su estructura y otras características:

[4]V.J. Theodorides, R.J. Gyurik, W.D. Kingsbury, R.C. Parish, *Experientia* 32 (1976) 702.

[5]C. Baeder, H. Bahr, O. Crist, D. Duwel, H. Kellner, R. Kirsch, H. Loewe, E. Schultes, E. Schutz, H. Westen, *Experientia* 30 (1974) 753.

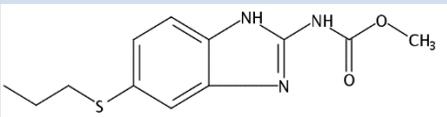
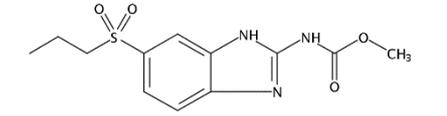
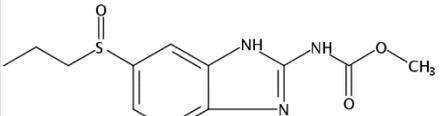
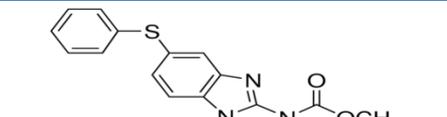
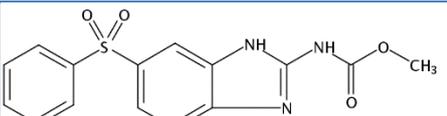
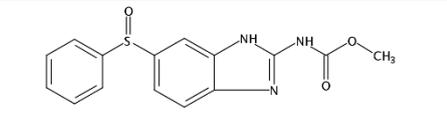
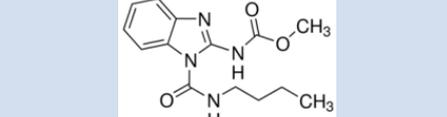
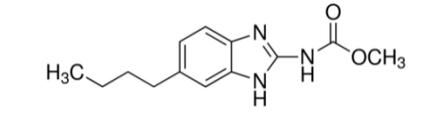
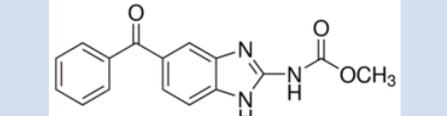
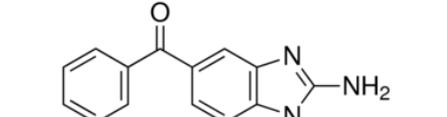
[6]E.A. Averkin, C.C. Beard, C.A. Dvorak, *J. Med. Chem.* 18 (1975) 1164.

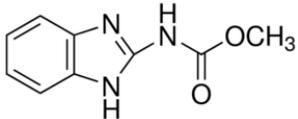
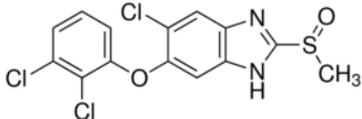
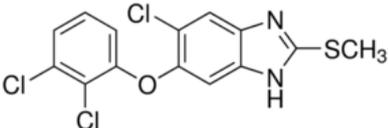
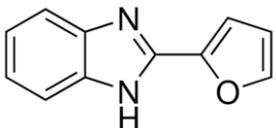
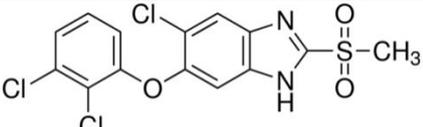
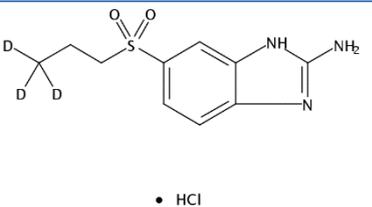
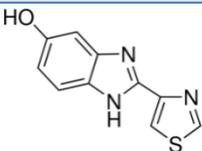
[7]J.C. Boray, P.D. Crowfoot, M.B. Strong, J.R. Allison, M. Von Schellenaum, M. Orelli, G. Sarasin, *Vet. Rec.* 112 (1983) 315.

[8]P. Delatour, J. Euzeby, *Le Point Véter* 15 (1983) 63.

[9]M.M. Nafissi-Varchei, *US patent*, 4, 406 (1983) 893.

Tabla 1. Benzimidazoles comúnmente empleados

NOMBRE	ESTRUCTURA	pKa	Pm (g/mol)
ALBENDAZOL (ABZ):[5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il]-, metilester (9Cl)		10.72	265.33
ALBENDAZOL SULFONA (ABZ-SO ₂): N-[6-(propilsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-il]-, metilester		10.11	297.33
ALBENDAZOL SULFOXIDO (ABZ-SO): N-[6-(propilsulfinil)-1H-benzimidazol-2-il]-, metilester		10.05	281.33
FEBENDAZOL (FBZ): [Metil 5-feniltio)-2-benzimidazolcarbamato]		11.78	299.35
FEBENDAZOL SULFONA (FBZ-SO ₂): N-[6-(fenilsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-il]-, metilester		10.14	331.35
FEBENDAZOL SULFOXIDO (FBZ-SO): N-[6-(fenilsulfonyl)-1H-benzimidazol-2-il]-, metilester		7.8	315.35
BENOMIL (BNM):Metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato		11.78	290.32
PARBENDAZOL (PBZ):Metil (5-butil-1H-benzoimidazol-2-il)carbamato		11.66	247.29
MEBENDAZOL (MBZ): 5-Benzoil-2-benzimidazolcarbamico acido metil ester		10.81	295.29
AMINOMEBENDAZOL (NH ₂ -MBZ): 2-Amino-5-benzoil-1H-benzimidazol		10.59	237.26

NOMBRE	ESTRUCTURA	pKa	Pm (g/mol)
CARBENDAZIM (CBZ): Metil 2-benzimidazolcarbamato		11.62	191.19
TRICLABENDAZOL SULFÓXIDO (TCB-SO): 5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metilsulfonil)-1H-benzimidazol		6.90	375.66
TRICLABENDAZOL (TCB): 5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-benzimidazol		7.91	359.66
FUBERIDAZOL (FBZ): 2-(2-Furanil)-1H-benzimidazol		11.20	184.19
TRICLABENDAZOL SULFONA (TCB-SO2): 5-Hidroxi-2-(4-tiazolil)benzimidazol		6.37	391.66
AMINOALBENDAZOLSULFONA (ABZ-NH2-SO2): 2-Aminoalabendazol sulfona-d3h ácido clorhídrico		9.90	278.77
5-HIDROXITIABENDAZOL (5-OH-TBZ): 2-(4-Tiazolil)-5-benzimidazolol		8.76	217.25

2.2 MODO DE ACCIÓN, ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y TOXICIDAD.

Se han descrito en bibliografía diferentes modos de acción para los benzimidazoles. La inhibición de la formación de microtúbulos en los parásitos se ha identificado como el modo de acción primario. Los benzimidazoles se acoplan a la tubulina, una proteína estructural de los microtúbulos celulares que son orgánulos celulares esenciales en todo tipo de organismos. Los microtúbulos actúan en la secreción de la mayoría de las enzimas digestivas y los benzimidazoles impiden su funcionamiento normal. Como consecuencia se perturba el proceso digestivo de los gusanos que acaban muriendo por ingesta deficiente [10].

Otro modo de acción es el del ABZ, que consiste en bloquear la glucosa tomada por los parásitos tanto en su fase larva como adulta, agotando sus reservas de glucógeno y así disminuyendo la formación de ATP [11]. Igualmente se ha comprobado que algunos benzimidazoles inhiben la acción de la enzima ácido fumárico reductasa en el parásito, bloqueando la formación del ácido succínico [12-13] e interrumpiendo el funcionamiento normal del ciclo del ácido carboxílico, el cuál reemplaza al ciclo de Krebs en parásitos anaeróbicos.

En cuanto a su actividad biológica, en la tabla 2 se muestra un resumen en función del tipo de compuesto, parásito al que ataca y animal productor de alimentos en el que se suele aplicar.

[10] E. Lacey, J.H. Gill, *Acta Trop.* 56 (1994) 245.

[11] E.M. Bennett, C. Bryant, *Mol. Biochem. Parasitol.* 10 (1984) 335.

[12] R. Goldsmith, in: R. Goldsmith, D. Heyneman (Eds.), E. Norwalk, CT, 1989, p. 847

[13] R.K. Prichard, *Int. J. Parasitol.* 3 (1973) 409.

Tabla 2. Actividad biológica en animales.

Benzimidazol	Parásito	Animal
ABZ	Nematodos adultos, tenias y lombrices gastrointestinales (GI)	Ovejas
FBZ	Nematodos pulmonares, lombrices GI y tenias	Ovejas
	Lombrices GI, gusanos pulmonares y tenias	Cabras
	Lombrices GI, larva de nematodos GI	Caballos
	Gusanos pulmonares	Cerdos
FEB	Nematodos pulmonares, lombrices GI y tenias	Ovejas
	Lombrices GI y gusanos pulmonares	Cerdos
MBZ	Gusanos pulmonares y tenias	Ovejas
	Lombrices GI, gusanos pulmonares y tenias	Cabras
	Nematodos y lombrices GI	Aves de corral
OXI	Lombriz GI	Ovejas, caballos, cerdos
TBZ	Gusanos pulmonares, lombrices GI	Ovejas
	Lombrices GI, P. equorum	Caballos
TCB	Trematodos	Ovejas

En relación a su toxicidad, respecto a los animales productores de alimentos en los que se emplean, los benzimidazoles tienen mucha más afinidad por la tubulina de las células de los helmintos que por la de las células de los mamíferos [14]. Esto permite que, a la dosis terapéutica, maten a los gusanos sin dañar al hospedador [15]. De ordinario la tolerancia del ganado es buena, incluso en animales jóvenes o debilitados.

Los benzimidazoles no se fijan a los tejidos del hospedador, excretándose rápidamente, lo que permite tiempos de espera o periodos de carencia del suministro de benzimidazoles de entre 1 y 4 semanas en animales productores, en función del compuesto y de la formulación. No obstante, normalmente no están autorizados para el uso en vacas lecheras en producción cuya leche está destinada al consumo humano.

El ABZ, CAM y PAR administrados a hembras preñadas presentan actividad teratogénicas para las crías. Sin embargo, FEB, FBZ, MBZ y OXI no presentan efectos teratogénicos en ovejas cuando son suministrados en la primera fase de gestación [16]. Flubendazol (FLU) produce diarrea en aves domésticas aunque no llega a afectar a los huevos. El tratamiento en terneros con CAM produce edemas pulmonares siendo fatales en algunos casos [17].

2.3 LEGISLACIÓN SOBRE EL CONTROL DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOLES EN ALIMENTOS

La utilización de fármacos veterinarios puede conllevar la presencia de residuos de estos productos en los alimentos derivados, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción.

La presencia de estos residuos en alimentos de origen animal puede presentar efectos adversos para la salud y está legislada, tanto la cantidad máxima de ciertos medicamentos, como las sustancias que no pueden estar

[14] P. Dustin, *Microtubules, second ed.*, Springer, Berlin, 1984.

[15] A. Desai, T. Mitchison, *Ann. Rev. Cell.Dev.Biol.* 13 (1997) 83.

[16] European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA/MRL/196/97-FINAL, 1997

[17] R. Froyman, H. de Keyser, *AvianDis.* 27 (1983) 43.

presentes, con lo cual el superar esos límites constituye un delito contra la salud.

En el Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria [18] se establece el marco jurídico para alimentos destinados a la alimentación animal, indicando la necesidad de una aclaración de las diferentes categorías de productos utilizados en nutrición animal (aditivos, productos farmacéuticos, complementos). En el apartado de contaminantes y residuos se indica la necesidad del establecimiento y control de los límites máximos de residuos permitidos (LMR), indicando que la legislación comunitaria ha establecido normas para la fijación de estos LMRs (Directiva N. 2377/90/EEC concerniente al establecimiento de LMR para medicamentos de uso veterinario en alimentos de origen animal)[19], añadiendo progresivamente anexos relativos a nuevas sustancias a controlar.

Se define el LMR como "la máxima concentración de una sustancia química determinada que puede admitirse en un alimento sin que signifique riesgo para la salud" y más específicamente es "la concentración o nivel máximo permitido de un medicamento o sustancia química en un pienso o alimento desde el momento del sacrificio, recolección, procesado, almacenamiento o venta y consumo por animales o el hombre". Se calcula para cada tejido (matriz) en particular, dividiendo el producto de la IDA (Ingesta Diaria Admisible) y el peso corporal promedio humano (60 kg) por la ingesta diaria estimada para ese tejido en particular y se expresa en mg/kg o microgramos/kg del compuesto por kilo de alimento fresco. Una vez que se establecen los LMRs, es necesario establecer en qué momento a partir de la aplicación de un producto veterinario, tanto el principio activo como sus metabolitos se hayan eliminado hasta encontrarse en un valor inferior al LMR. Este es el fundamento del establecimiento del "periodo de restricción o periodo de retirada". El periodo de retirada de un producto veterinario es el tiempo que debe transcurrir entre la última administración del mismo y el sacrificio o recolección de los productos que se derivan de esos animales tratados destinados al consumo humano.

[18] Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Comisión de las Comunidades Europeas. Bruselas, 12-1-2000. COM (1999) 719 final.

[19]. Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DOCE L 224 de 18 de agosto de 1990. Modificado por el Reglamento 1338/2000/CE de la Comisión, de 20 de octubre de 2000. DOCE L 269 de 21 de octubre de 2000.

Recientemente se dispone de un nuevo documento que sustituye al Reglamento (CE) N° 2377/90 sobre LMR, el Reglamento (UE) n° 37/2010 [20], donde las sustancias farmacológicamente activas se enumeran en un anexo por orden alfabético, estableciéndose dos cuadros distintos: uno para las sustancias prohibidas y otro para las sustancias autorizadas, entre las que se encuentran antihelmínticos como los benzimidazoles. En la tabla 3 se recogen los LMRs para los distintos benzimidazoles legislados en diferentes tejidos para distintas especies animales.

Tabla 3. LMRs de benzimidazoles legislados en tejido animal.

Benzimidazol	Especie animal	LMR (µg/kg)	Tejidos diana
Albendazol	Todos los rumiantes	100	Músculo
		100	Grasa
		1000	Hígado
		500	Riñón
		100	Leche
Fenbendazol	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos, excepto los peces	50	Músculo
		50	Grasa
		500	Hígado
		50	Riñón
		10	Leche
		1300	Huevos

[20] Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE, 20-1-2010, L15/1.

Febantel	Todos los rumiantes, porcinos y équidos	100	Músculo
		100	Grasa
		1000	Hígado
		500	Riñón
	Todos los rumiantes	10	Leche
Mebendazol	Ovinos, caprinos, équidos	60	Músculo
		60	Grasa
		400	Hígado
		60	Riñón
Oxibendazol	Porcinos	100	Músculo
		500	Piel y grasa
		200	Hígado
		100	Riñón
Tiabendazol	Bovinos y caprinos	100	Músculo
		100	Grasa
		100	Hígado
		100	Riñón
Triclabendol	Todos los rumiantes	225	Músculo
		100	Grasa
		250	Hígado
		150	Riñón
		10	Leche

2.4 ANTECEDENTES SOBRE LA DETERMINACIÓN DE BENZIMIDAZOLES

Los residuos de benzimidazoles y sus metabolitos pueden diferir enormemente en sus propiedades físicas y químicas lo que constituye un reto para el desarrollo de metodología analítica multiresiduo. Entre la bibliografía consultada se han encontrado varias propuestas de diferentes técnicas en la determinación de estos compuestos en matrices biológicas y alimentarias, como los bioensayos, los métodos espectrofotométricos directos, la cromatografía en capa fina, los métodos inmunoquímicos, la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos [3].

El inconveniente que presenta la cromatografía de gases es que la mayoría de los benzimidazoles no son volátiles por lo que es necesario realizar una derivatización de los analitos y por ello es mayormente empleada la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [21]. La mayoría de estos métodos emplean columnas de fase inversa (C₈ ó C₁₈) [3] y modo de elución en gradiente, ya que al utilizar el modo isocrático no se conseguía una buena separación de los analitos [22].

En general, los métodos más empleados utilizan HPLC acoplada a detección por fluorescencia (FL) [23,24], ultravioleta (UV) [25,26,27,28] y espectrometría de masas (MS) [29,30,31]. La técnica de electroforesis capilar (CE) acoplada a UV y MS también ha sido evaluada para la separación y determinación de benzimidazoles en diversas matrices [32,33,34,35].

[21] M.T. Lafuente, J.L. Tadeo, J.J. Tuset, *J. Chromatogr.Sci.*25 (1987) 84.

[22] J.A. Bogan, S. Marriner, *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 422.

[23] R. Halko, C. Padron Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, *Chromatographia* 60 (2004) 151.

[24] R. Halko, C. Padron Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, *J. AOAC Int.*, 89 (2006) 1403.

[25] Y. Santaladchaiyakit, S. Srijaranai, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3354.

[26] T. Boontongto, Y. Santaladchaiyakit, R. Burakham, *Chromatographia* (2014) 1557.

[27] Y. Wen, J. Li, F. Yang, W. Zhang, W. Li, C. Liao, L. Chen, *Talanta* 106 (2013) 119.

[28] D. Chen, Y. Tao, Z. Liu, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang, Y. Pan, D. Peng, M. Dai, Z. Yuan, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2928.

[29] X. Xia, Y. Dong, P. Luo, X. Wang, X. Li, S. Ding, J. Shen, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3174.

[30] A. Martínez-Villalba, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 119.

[31] B. Guo, Z. Huang, M. Wang, X. Wang, Y. Zhang, B. Chen, Y. Li, H. Yan, S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4796.

[32] L.C. Soliman, K.K. Donkor, *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 49 (2014) 153.

[33] J. Shen, J. Tong, H. Jiang, Q. Rao, N. Li, L. Guo, S. Ding, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 1009.

[34] X.Z. Hu, M.L. Chen, Q. Gao, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *Talanta* 89 (2012) 335.

[35] J. Domínguez-Álvarez, M. Mateos-Vivas, D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A.* 1278 (2013) 166.

En relación con el tratamiento de muestra, la extracción líquida es la más comúnmente utilizada en el análisis de benzimidazoles en distintas matrices de alimentos y biológicas [3]. En la última década se ha propuesto la microextracción líquido-líquido (DLLME) como alternativa a la extracción líquido-líquido tradicional (LLE) [36]. Este método consiste en el empleo de una mezcla ternaria de disolventes que incluye la muestra acuosa, un disolvente extractante de alta densidad (cloroformo, clorobenceno, etc.) y un disolvente dispersivo que tiene que ser miscible en ambos (metanol, acetonitrilo o acetona) [37]. Este sistema de extracción es medioambientalmente sostenible ya que la cantidad necesaria de disolventes es de apenas unos microlitros, es una técnica barata y el tiempo que requiere es corto [38,39].

2.5 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS Y SU EVOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica que se basa en la separación de los constituyentes de una mezcla para su posterior identificación y a menudo cuantificación. El principio se fundamenta en los equilibrios de reparto de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles: la fase estacionaria, inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la fase móvil, que se desplaza en el seno de la primera. La velocidad de elución de los analitos retenidos en la columna dependerá de la solubilidad de éstos en la fase móvil y de la fuerza de interacción de dicho compuesto con la fase estacionaria, por tanto, ambas fases juegan un papel importante en la separación.

En las separaciones por cromatografía líquida hay diferentes parámetros relacionados con la fase móvil y la fase estacionaria que controlan la separación:

a) La resolución es una medida de la capacidad de separar una mezcla de analitos y lo que se persigue es conseguir la máxima resolución en el mínimo tiempo. Un valor de resolución de 1.5 o superior entre dos picos asegura que los

[36] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R MilaniHosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.

[37] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342.

[38] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382.

[39] M.-I. Leong, M.-R. Fuh, S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1335 (2014) 2.

dos componentes de la muestra estarán bien separados de forma que el área o altura de cada pico pueda ser medida de forma exacta. La resolución cromatográfica es función de tres parámetros, el factor de retención (k), la selectividad (separación de los ápices de los picos) y la eficacia (N) (anchura de los picos).

b) El factor de retención (k) es una medida de la retención de un analito dentro de una columna cromatográfica y se puede calcular como la relación entre el tiempo de retención corregido del analito y el tiempo muerto t_0 (tiempo requerido por un compuesto inerte que no interacciona con la fase estacionaria). La forma más efectiva y conveniente de modificar k es ajustar la fuerza del disolvente de la fase móvil, por ejemplo, en fase inversa se cambia el porcentaje de disolvente orgánico (modificador) de la fase móvil.

c) La selectividad o factor de separación es la capacidad de un sistema cromatográfico de distinguir químicamente entre los componentes de una muestra. Habitualmente es medida como la relación entre los factores de retención de dos picos y pueden ser visualizada como la distancia entre los ápices de los dos picos. Afectan a la selectividad variables como el disolvente orgánico, el pH de la fase móvil, fuerza del disolvente y aditivos o la temperatura.

d) La eficacia de un pico cromatográfico es una medida del ensanchamiento de la banda de analito. El número de platos teóricos (N) es una medida de la dispersión de pico, reflejando el rendimiento de la columna en la separación cromatográfica. Se afecta por el volumen de inyección, los volúmenes muertos y el caudal de fase móvil.

La HPLC es una técnica fundamental en la mayoría de los laboratorios de ensayo y específicamente en los de calidad y seguridad alimentaria. Su continuo desarrollo ha conseguido una mejora en los métodos de análisis establecidos con anterioridad. Así, en los últimos años, para incrementar la eficacia de la separación, la sensibilidad de la detección y disminuir los tiempos de análisis de las columnas convencionales de HPLC, se ha reducido el diámetro interno de las columnas así como el tamaño de partícula del material

de empaquetamiento. Los importantes avances que han tenido lugar en las tecnologías de fabricación de columnas, han permitido el desarrollo de columnas micro y capilares que respecto a las convencionales de diámetro interno de 4.6 mm ofrecen diversas ventajas [40,41]. Debido al diámetro interno reducido, los caudales de fase móvil utilizados con micro-columnas son muy pequeños, lo que produce una disminución considerable del consumo de reactivos y disolventes, y por ello de los desechos generados y del impacto medioambiental. Por otra parte, el pequeño volumen en el que se eluyen los analitos proporciona mayor sensibilidad y mejoras de hasta 20 órdenes de magnitud en la respuesta del detector [42]. En comparación con los sistemas convencionales de HPLC, este tipo de técnicas mejoran la detección y permiten obtener eficacias de separación elevadas. Por ello, las micro-columnas han sido muy utilizadas para aumentar la sensibilidad de la detección y la resolución cuando el volumen de muestra disponible para la inyección es limitado o los compuestos a determinar se encuentran presentes a bajas concentraciones en las distintas muestras.

La tabla 4 muestra una comparativa de las distintas técnicas de cromatografía líquida en función del diámetro interno de la columna y del tamaño de partícula.

Tabla 4. Diferentes técnicas de cromatografía de líquidos

Nombre	Diámetro interno de la columna	Velocidad de flujo	Tamaño de partícula (μm)	Longitud (cm)
HPLC analítico	3.2-4.6 mm	0.5-2.0 mL/min	3-10	15-25
HPLCmicrobore	1.5-3.2 mm	100-500 $\mu\text{L}/\text{min}$	3-8	15-25
Micro-LC	0.5-1.5 mm	10-100 $\mu\text{L}/\text{min}$	3-5	5-15
HPLC-capilar	150-500 μm	1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$	3-5	5-15
Nano-HPLC	10-150 μm	10-1000 nL/min	3-5	5-15
UHPLC	2.1-4.6 mm	0.1-1.0 mL/min	1.6-1.8	5-10

[40] J. Hernandez-Borges, Z. Aturki, A. Rocco, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1589.

[41] P. Molander, T.E. Gundersen, C. Haas, T. Greibrokk, R. Blomhoff, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 59

[42] A. Braithwaite, F.J. Smith en "Chromatographic Methods", 5 Ed, *Kluwer Academic Publishers* (1996) p. 1

La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC), se basa en el empleo de columnas cromatográficas rellenas con partículas de fase estacionaria de tamaño inferior a 2 μm a diferencia de las columnas convencionales usadas en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que emplean tamaños de partícula de entre 3 y 5 μm . La ventaja con respecto a la cromatografía de líquidos capilar es la disminución de los tiempos de análisis, lo cual es una gran ventaja en análisis rutinario.

El uso de tamaños de partícula en la fase estacionaria inferiores a 2 μm ha obligado a desarrollar bombas que puedan ejercer la presión suficiente para trabajar a caudales adecuados, soportando presiones superiores a 10000 psi, inyectores capaces de inyectar cantidades cada vez menores y de soportar presiones mucho mayores, y detectores mucho más rápidos que sean capaces de proporcionar suficientes puntos por pico cromatográfico y con celdas de detección mucho más pequeñas para evitar el ensanchamiento de pico[43]. Esta reducción del tamaño de partícula, reduce significativamente la altura equivalente de plato teórico, lo que posibilita la mejora en la eficacia del proceso cromatográfico, ya que permite trabajar a altos flujos de la fase móvil sin pérdida de la calidad en la separación cromatográfica, lo que conlleva una reducción del tiempo de análisis, llegándose a determinar más de 100 compuestos en menos de diez minutos. La UHPLC puede acoplarse con detectores de UV-Vis, de fluorescencia o espectrometría de masas (MS) siempre que la adquisición de la señal sea lo suficientemente rápida como para ser compatible con una separación en un tiempo de análisis muy corto.

[43] F.M.E. Swartz. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 28 (2010) 1253.

3. REACTIVOS Y MATERIAL

Todos los reactivos empleados son de grado analítico y los disolventes de grado HPLC. El acetonitrilo (MeCN), el metanol (MeOH) y el etanol (EtOH) se adquirieron en VWR Chemicals-Prolabo BDH. El ácido fórmico y el acetato amónico se adquirieron en EMSURE, ACS, Reag. PhEur. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo ha sido agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Se partieron de disoluciones madre de cada uno de los 21 benzimidazoles en estudio, preparadas en metanol, a las concentraciones que se indican en la siguiente lista. Se prepararon 5 mL de una disolución intermedia que contenía los 21 analitos. Para ello se tomaron los volúmenes de las disoluciones madre que se indican a continuación, con objeto de conseguir una concentración final de 10 ppm para cada analito, enrasando con agua hasta el volumen final.

1. Albendazol (500 ppm): 0.1 mL
2. Febantel (1000 ppm): 0.05 mL
3. Benomilo (500 ppm): 0.1 mL
4. Parbendazol (500 ppm): 0.1 mL
5. Mebendazol (250 ppm): 0.2 mL
6. Carbendazín (250 ppm): 0.2 mL
7. Triclabendazol-sulfóxido (1000 ppm): 0.05 mL
8. Triclabendazol (1000 ppm): 0.05 mL
9. Albendazolsulfoxido (1000 ppm): 0.05 mL
10. Fuberidazol (1000 ppm): 0.05 mL
11. Amino albendazolsulfona (1000 ppm): 0.05 mL
12. Albendazolsulfona(500 ppm): 0.1 mL
13. Amino mebendazol (1000 ppm): 0.05 mL
14. 5-Hidroximebendazol (500 ppm): 0.1 mL
15. Oxibendazol (250 ppm): 0.2 mL
16. Tiabendazol (1000 ppm): 0.05 mL
17. 5-Hidroxitiabendazol (1000 ppm): 0.05 mL

18. Triclabendazol (1000 ppm): 0.05 mL
19. Febendazol (250 ppm): 0.2 mL
20. Febendazolsulfona (250 ppm): 0.2 mL
21. Febendazolsulfóxido(oxfendazol) (1000 ppm): 0.05 mL

A continuación, se preparó una disolución de trabajo con una concentración de 2 ppm en cada uno de los analitos, diluyendo la disolución anterior con agua, y conservándola a 4°C en vial de vidrio topacio para evitar la exposición de la luz.

4. INSTRUMENTACION Y SOFTWARE

Para evaluar la HPLC capilar se utilizó un cromatógrafo de líquidos capilar de la marca Agilent Technologies, modelo 1200, equipado con una bomba capilar (máximo caudal: 20 μ L/min), desgasificador automático y automuestreador (bucle de 8 μ L), horno de columnas y detector de batería de diodos (DAD). La columna empleada fue una Zorbax XDB-C18 (Agilent Tehnologies) de fase inversa (150 mm x 0.5 mm, 5 μ m tamaño de partícula). La adquisición de datos y el procesado de los mismos se llevó a cabo con el programa Agilent ChemStation (Rev. A.10.02, Agilent Technologies, Alemania).

El equipo de cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC) fue de la marca Jasco, modelo X-LC. Este sistema soporta presiones de hasta 100 MPa, y permite trabajar con un caudal o flujo de fase móvil comprendido en el rango de 0.001 a 2.000 mL/min. El detector acoplado era de UV-Vis, marca Jasco, modelo X-LCTM 3080 DG. La columna empleada fue ZorbaxC18 Eclipse Plus (Agilent Tehnologies) de fase inversa (50 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m tamaño de partícula). Los cromatogramas obtenidos se registraron y procesaron con el programa ChromNAV-JASCO.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objeto de este trabajo ha sido la evaluación de dos técnicas cromatográficas, alternativas a la HPLC analítica, que se han empleado en la separación de una mezcla de benzimidazoles comúnmente usados en medicina veterinaria. Estas técnicas son la HPLC capilar y la UHPLC, ambas acopladas a la detección UV, considerando la capacidad de absorción de estos compuestos. Para ello ha sido necesaria la optimización de ciertos parámetros que afectaban a la separación cromatográfica y que se discuten a continuación.

5.1 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Con objeto de conseguir una buena resolución entre los picos correspondientes a los analitos en estudio, a la vez que un método analítico robusto, se procedió a la optimización de todas las variables que influyen en el sistema cromatográfico. Como criterio para seleccionar los valores óptimos de las variables estudiadas se consideró la resolución entre los picos correspondientes a cada analito, así como la selectividad de la separación para cada una de las condiciones experimentales establecidas y la intensidad de la señal. Así mismo, también se consideró el tiempo de análisis con objeto de llevar a cabo la separación en el menor tiempo posible.

5.1.1 Cromatografía de líquidos capilar

5.1.1.1 Condiciones y pruebas preliminares

Para establecer unas condiciones de partida se seleccionó como modo de trabajo la elución por gradiente, donde las características de la fase móvil se van modificando a medida que transcurre la separación con objeto de conseguir una mejor resolución de los analitos.

Comenzamos a estudiar el gradiente, empleando como fase móvil una mezcla de parte acuosa (A: agua) y orgánica (B: acetonitrilo). El gradiente

inicialmente considerado y la velocidad de flujo se muestran en la tabla 5, la temperatura de trabajo fue a 20°C:

Tabla 5. Gradiente inicial (velocidad de flujo: 7µL/min)

Tiempo (min)	%B
0.00	5.0
14.00	40.0
17.00	70.0
19.00	95.0
20.00	95.0
24.00	5.0
35.00	5.0

Las longitudes de onda a las que se registró inicialmente la absorbancia de los compuestos fueron 210 y 290 nm, pero decidimos establecer 290 nm como la longitud de onda óptima ya que a 210 nm la fase orgánica presentaba mayor absorción y por tanto una interferencia en el cromatograma. En la figura 3 se muestra el espectro de absorbancia obtenido tras el análisis de la disolución patrón de los 21 benzimidazoles estudiados, el espectro corresponde con el pico obtenido en el minuto 20.

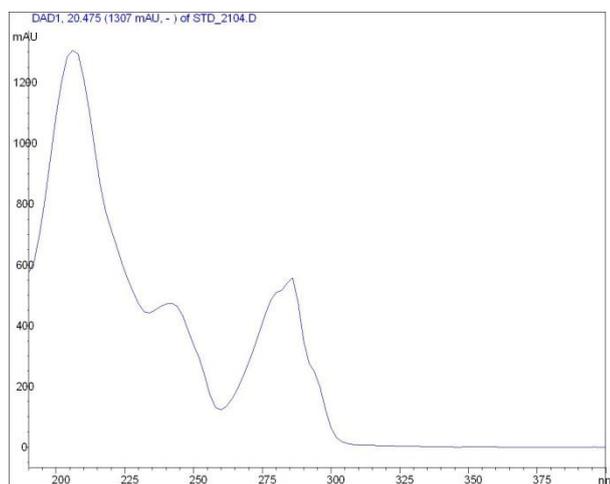


Figura 3. Espectro de absorbancia obtenido al tomar el pico a 20 min de la disolución de trabajo conteniendo los benzimidazoles (2 ppm de cada compuesto).

Bajo estas condiciones de gradiente procedimos a la inyección de la disolución de trabajo de 2 ppm de cada analito, obteniendo el cromatograma que se muestra en la figura 4.

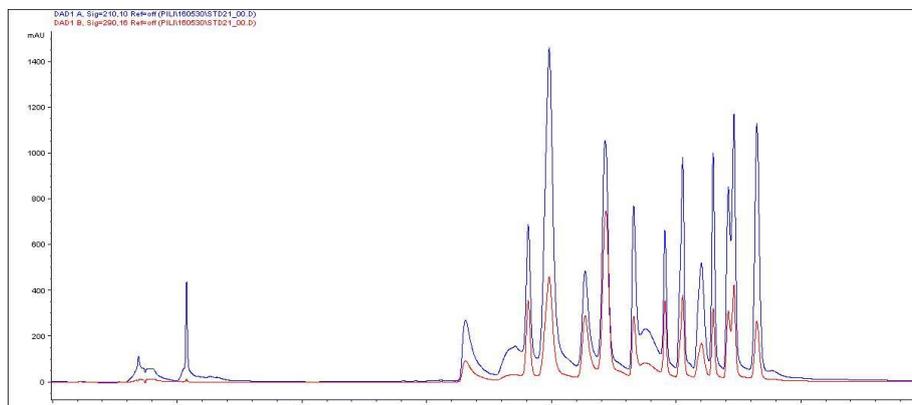


Figura 4. Cromatograma de la disolución patrón de los benzimidazoles considerados (2 ppm). Rojo: señal registrada a 290 nm; Azul: señal registrada a 210 nm

Como se observa, se consiguen separar sólo 14 analitos de los 21 en estudio. El tiempo en el que comienzan a eluir los analitos de la columna es a los 16 minutos, lo que implica un tiempo de análisis muy largo, además de terminar de eluir en la etapa de lavado de la columna. Por tanto, comenzamos a variar el gradiente para conseguir que los analitos eluyan antes y no salgan en la etapa de lavado.

Con esta finalidad se comenzó a variar el porcentaje de disolvente orgánico (acetonitrilo:B) en la fase móvil, aumentando progresivamente desde el 5 al 40 %. En las figuras 5-9 se muestra el efecto de esta variación en los cromatogramas obtenidos.

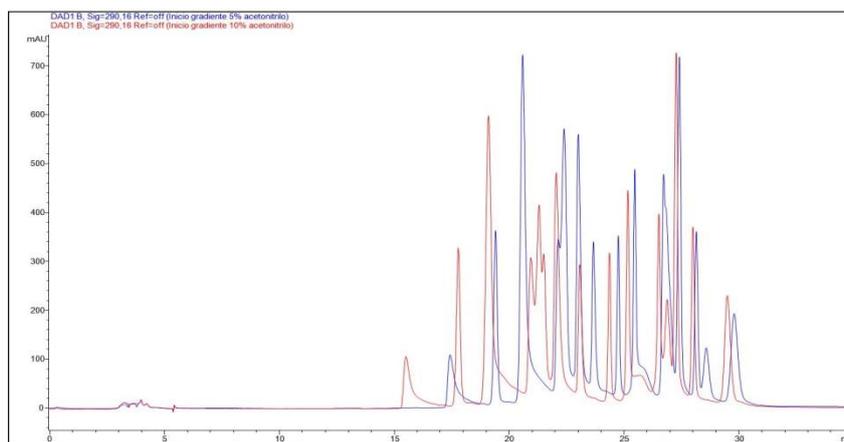


Figura 5. Cromatogramas de la disolución de trabajo de los benzimidazoles estudiados al variar el porcentaje inicial de B (acetonitrilo) en la fase móvil: (Azul) B = 5%; (Rojo) B = 10%.

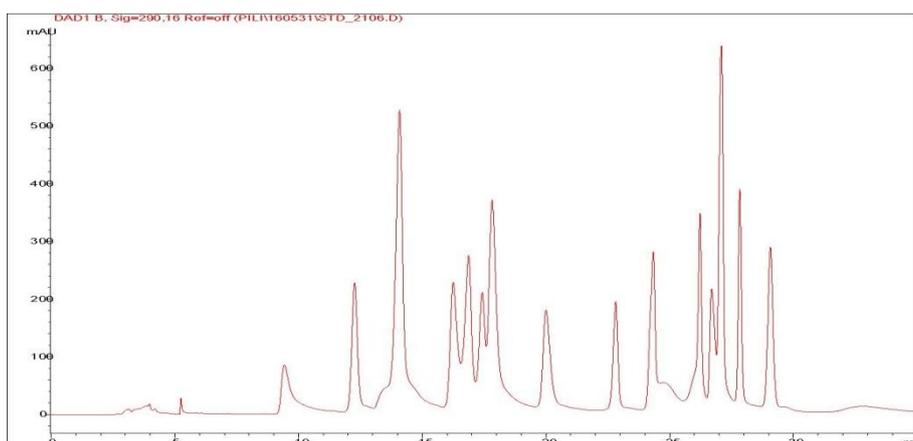


Figura 6. B = 20%.

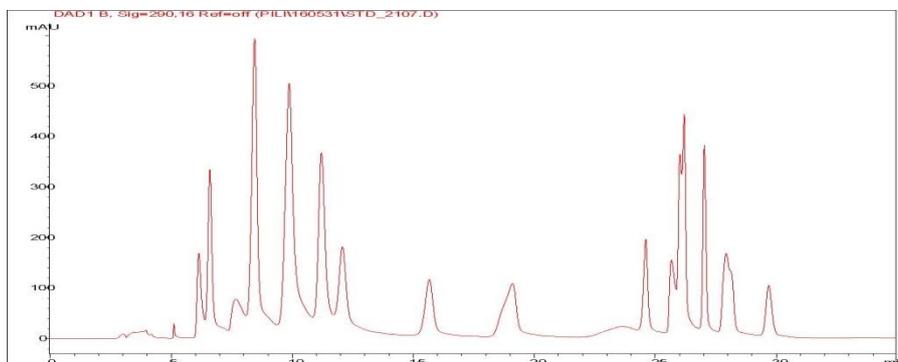


Figura 7. B = 30%.

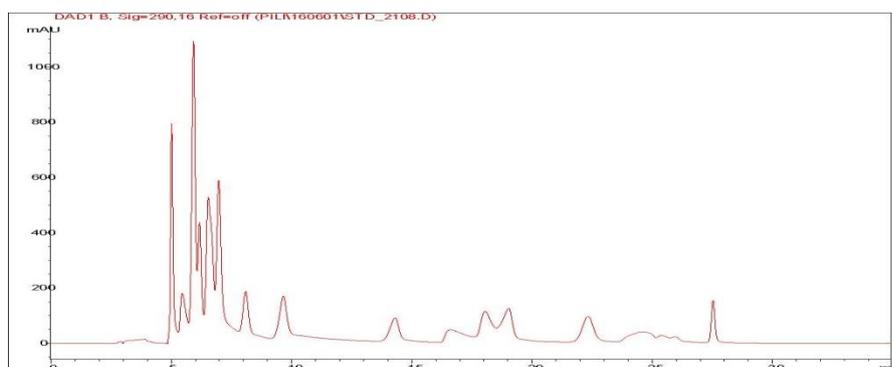


Figura 8. B = 40%.

Como se puede observar, al ir aumentando el porcentaje de disolvente orgánico (acetonitrilo, B) en la fase móvil al inicio del gradiente de elución los analitos salen antes de la columna, la resolución entre picos mejora y los tiempos de análisis comienzan a acortarse.

En la figura 8 se observa que al aumentar este porcentaje demasiado (40%), la retención de los analitos en la columna es insuficiente y varios analitos eluyen casi simultáneamente a partir del minuto 5, produciéndose un solapamiento en los picos. Por tanto, evaluando los diferentes resultados de este estudio decidimos fijar el valor del % de acetonitrilo en la fase móvil al comienzo del gradiente en un 30 % (B).

Posteriormente comenzamos a estudiar el tiempo que debe permanecer al 95% el disolvente orgánico de la fase móvil (B) para conseguir que los analitos no eluyan en la etapa de lavado de la columna. Para ello aumentamos el tiempo inicial de 2 min considerado en el gradiente inicial, a 4 min y a 10 min. En la figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos al utilizar 4 min y 10 min, respectivamente.

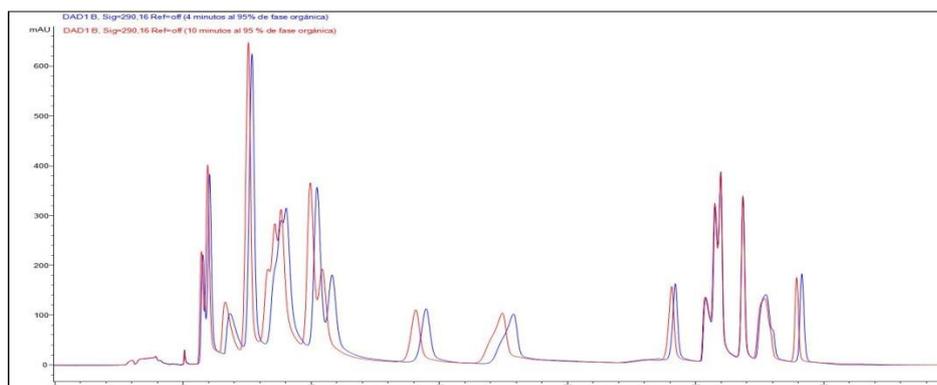


Figura 9. Cromatogramas obtenidos al usar un tiempo de 4 min (azul) y 10 min (rojo) en el gradiente de elución de los analitos al 95% de acetonitrilo (B).

Como se observa en la figura 9, manteniendo el % de B al 95 % 10 minutos se consigue que los analitos no salgan en la etapa de lavado de la columna. Por tanto, establecemos como gradiente definitivo el que se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Gradiente seleccionado para la separación de los benzimidazoles estudiados (velocidad de flujo 7 μ L/min)

Tiempo (minutos)	%B
0.00	30.0
14.00	40.0
17.00	70.0
19.00	95.0
29.00	95.0
31.00	30.0
42.00	30.0

5.1.1.2 Evaluación de la naturaleza del disolvente orgánico en la fase móvil.

El metanol, al igual que el acetonitrilo, es ampliamente empleado como disolvente orgánico de la fase móvil en HPLC. Por tanto, considerando el gradiente anteriormente establecido se evaluó el uso de metanol en la fase móvil y se compararon los resultados con los obtenidos cuando se empleó acetonitrilo, tanto observando los cromatogramas (figuras 10 y 11) como considerando la resolución entre picos (tablas 7 y 8). En general, usando

metanol se observó un aumento de la resolución entre picos aunque se retrasó considerablemente la elución de éstos, aumentando el tiempo de análisis.

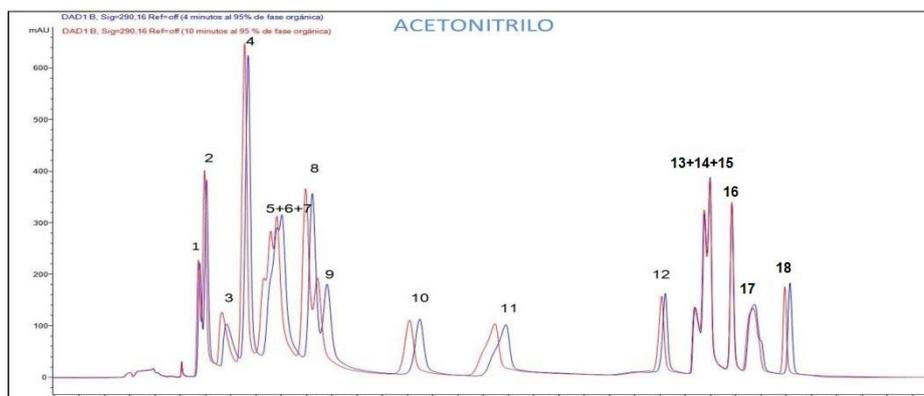


Figura 10. Cromatograma obtenido usando acetonitrilo (B) como disolvente orgánico de la fase móvil

Tabla 7. Resoluciones entre los picos (fase móvil= B: acetonitrilo; A: agua)

Analito	Tiempo retención(min)	Resolución
1	5.5	-
2	5.7	0.73
3	6.2	1.38
4	7.1	2.17
5	7.6	1.2
6	8.0	-
7	8.3	-
8	9.4	1.62
9	13.2	5.33
10	16.6	4.02
11	23.8	9.97
13	25.2	2.69
14	25.6	0.92
15	25.9	0.77
16	26.8	3.21
17	27.8	1.62
18	29.1	2.22

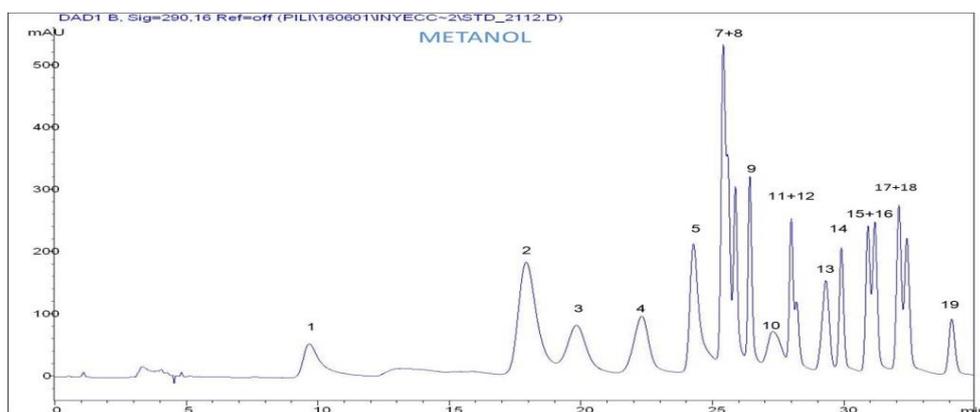


Figura 11. Cromatograma obtenido usando metanol (B) como disolvente orgánico de la fase móvil

Tabla 8. Resoluciones entre los picos obtenidos (fase móvil= B: metanol; A: agua).

Analito	Tiempo retención (min)	Resolución
1	14.4	-
2	15.3	0.5
3	21.13	3.24
4	23.3	2.53
5	23.7	0.74
6	25.3	3.69
7	26.1	2.19
8	26.7	2.19
9	27.6	-
10	28.1	-
11	28.4	0.77
13	29.5	2.44
14	30.0	1.14
15	31.0	2.85
16	31.3	0.90
17	32.2	2.14
18	32.6	0.92
19	34.3	4.17

Igualmente se evaluó el etanol como disolvente orgánico de la fase móvil, ya que presenta características similares al metanol y tiene un impacto medioambiental menor. Como se muestra en la figura 12 y en la tabla 8, el resultado no fue muy satisfactorio ya que se resolvieron menos compuestos.

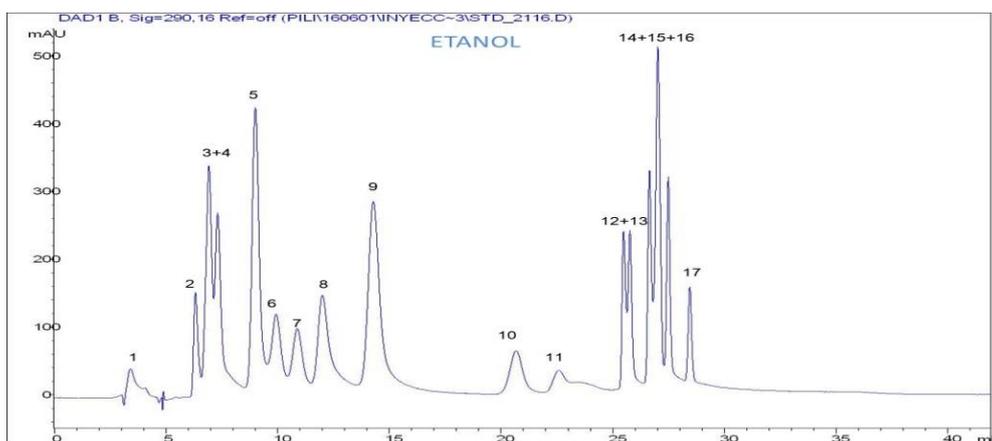


Figura 12. Cromatograma obtenido usando etanol (B) como disolvente orgánico de la fase móvil

Tabla 8. Resoluciones entre los picos obtenidos
(fase móvil= B: etanol; A: agua)

Analito	Tiempo retención (min)	Resolución
1	6.3	-
2	6.9	1.31
3	7.3	0.69
4	8.9	2.91
5	9.9	1.21
6	10.8	1.00
7	11.9	1.21
8	14.2	2.5
9	20.6	6.55
10	22.5	1.92
11	23.2	-
13	25.4	-
14	25.7	0.79
15	26.6	2.67
16	27.0	1.08
17	27.4	1.41
18	28.4	3.33

Finalmente se optó por evaluar el empleo de una mezcla acetonitrilo:metanol, 50:50 (v/v) como condiciones intermedias a las estudiadas anteriormente, combinando las fuerzas de elución de ambos disolventes orgánicos. Los resultados obtenidos mejoraron los alcanzados utilizando individualmente acetonitrilo o metanol, como se observa en la figura 13.

El acetonitrilo presenta mayor fuerza eluotrópica que el metanol, de ahí que al emplearse la combinación de ambos, se consigue separar los analitos. La resolución entre picos se muestra en la tabla 9. A partir de este estudio decidimos establecer como disolvente orgánico de la fase acuosa una mezcla acetonitrilo:metanol, 50:50 (v/v).

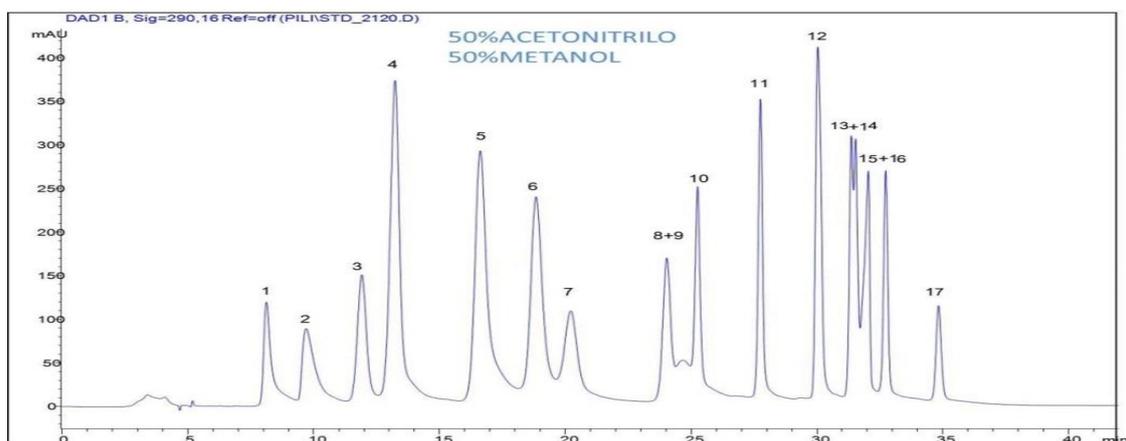


Figura 13. Cromatograma obtenido usando como fase móvil: (A) agua; (B) acetonitrilo:metanol 50:50 (v/v)

Tabla 9. Resoluciones entre los picos (fase móvil= B: etanol; A: agua)

Analito	Tiempo retención (min)	Resolución
1	6.6	-
2	7.8	1.82
3	8.8	1.43
4	10.5	2.60
5	11.9	1.72
6	14.1	2.09
7	16.2	1.98
8	21.2	4.59
9	23.1	1.80
10	24.4	-
11	25.8	12.84
12	27.0	1.14
13	29.5	6.57
14	30.8	3.51
15	31.0	0.55
16	32.6	3.77
17	34.3	3.47

5.1.1.3 Evaluación de la naturaleza de la fase acuosa

Con objeto de comprobar si la modificación del pH de la parte acuosa (A) de la fase móvil tenía alguna influencia en la separación de los benzimidazoles en estudio, se estudió el efecto de la presencia de ácido fórmico o tampón acetato amónico en la porción acuosa, en comparación con el efecto del empleo de agua.

En primer lugar, se preparó una disolución acuosa con un 0.1% de ácido fórmico. En la figura 14 se muestra el cromatograma obtenido, observándose un empeoramiento en la separación respecto al uso de agua en (A). Debido al carácter ácido de la fase móvil, los analitos con carga se eluyeron rápidamente y los picos se solaparon, empeorando la resolución considerablemente respecto al uso de agua en (A).

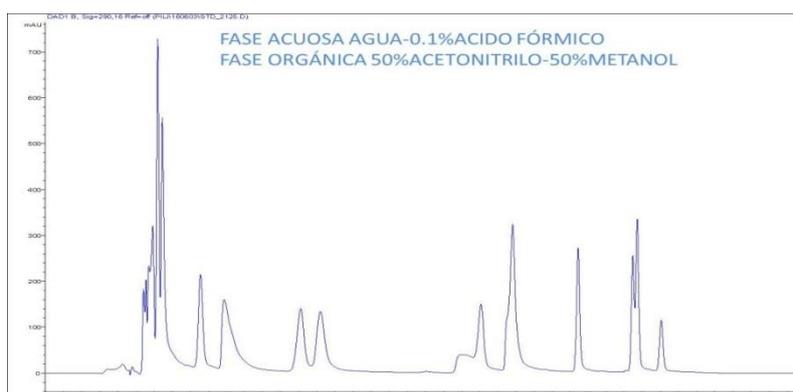


Figura 14. Cromatograma obtenido con fase móvil: (A) fase acuosa 0.1 % ácido fórmico; (B) acetonitrilo:metanol 50:50 (v/v)

Por otro lado, se estudió la influencia del uso de una disolución tampón acuosa 50 mM de acetato amónico en A. Como se muestra en la figura 15, la separación fue muy satisfactoria, obteniéndose una buena eficiencia cromatográfica y picos bien resueltos (tabla 10).

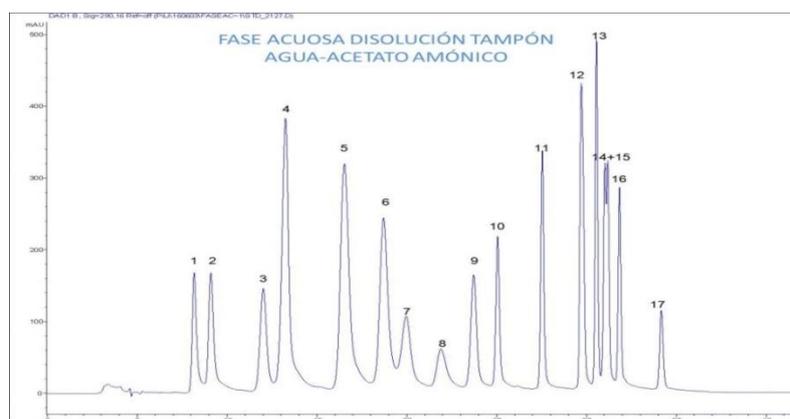


Figura 15. Cromatograma obtenido con fase móvil: (A) disolución tampón de acetato amónico 50 mM; (B) acetonitrilo:metanol 50:50 (v/v).

Tabla 10. Resoluciones entre los picos usando fase móvil: (A) disolución tampón de acetato amónico 50 mM; (B) acetonitrilo:metanol 50:50 (v/v)

Analito	Tiempo retención (min)	Resolución
1	8.1	-
2	9.0	2.10
3	12.0	5.22
4	13.2	1.92
5	16.5	4.34
6	18.7	2.65
7	19.9	1.56
8	21.8	2.19
9	23.7	2.42
10	25.0	2.86
11	27.5	7.51
12	29.7	6.14
13	30.5	2.55
14	31.0	1.89
15	31.2	0.58
16	31.8	2.26
17	34.1	7.48

Por ello, esta fase móvil junto con el gradiente anteriormente seleccionado fueron consideradas como las condiciones óptimas para la separación de los benzimidazoles en estudio mediante HPLC capilar, pudiendo ser empleadas para trabajos posteriores de aplicación.

5.1.2 Cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución

5.1.2.1 Condiciones y pruebas preliminares

Para evaluar la aplicación de esta técnica en la separación de los benzimidazoles considerados decidimos inyectar en el sistema UHPLC la misma disolución de trabajo conteniendo los 21 benzimidazoles en estudio, a una concentración de 2 ppm y emplear la misma fase móvil ya optimizada en el estudio anterior usando HPLC capilar, pero readaptando el tiempo de análisis y el gradiente, ya que esta técnica es mucho más rápida. El resultado se muestra en la figura 16, donde aparece el cromatograma obtenido a las condiciones iniciales junto con el gradiente aplicado (tabla 11). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.4 mL/min y la temperatura de columna de 20°C. En todas las figuras del estudio se decidió registrar un cromatograma de un blanco (agua MilliQ) ya que se observaron algunos picos interferentes presentes en el sistema (cromatograma representado en rojo en las figuras del estudio).

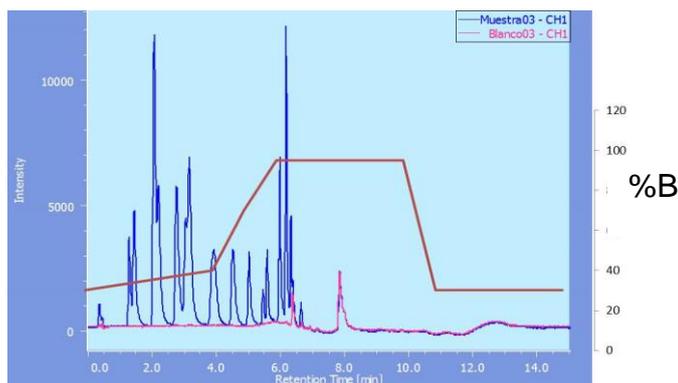


Figura 16. Cromatograma obtenido con fase móvil: (A) disolución tampón de acetato amónico 50 mM, (B) acetonitrilo:metanol 50:50 (v/v)

Tabla 11. Gradiente inicial (velocidad de flujo: 0.4 mL/min)

Tiempo (min)	%B
0	30
4	40
6	95
10	95
12	30
15	30

Como se puede apreciar, se ha reducido considerablemente el tiempo de análisis pero el gradiente aplicado origina una elución rápida de los analitos y por tanto se produce solapamiento entre ellos y pérdida de resolución.

Para evitar esto comenzamos a realizar cambios en el gradiente siguiendo las mismas pautas que llevamos a cabo en el estudio anterior. En las figuras 17,18 y 19 se muestran los diferentes cromatogramas obtenidos al variar el porcentaje inicial de disolvente orgánico (B = acetonitrilo:metanol; 50:50 (v/v)) estudiando los valores de 10%, 15% y 20%, respectivamente.

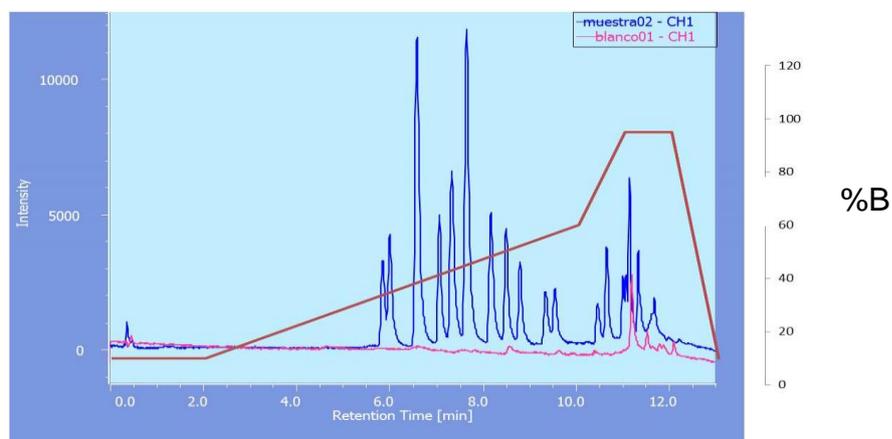


Figura 17. Cromatogramas de la disolución de trabajo de los benzimidazoles estudiados al variar el porcentaje inicial de B (acetonitrilo) en la fase móvil (10%)

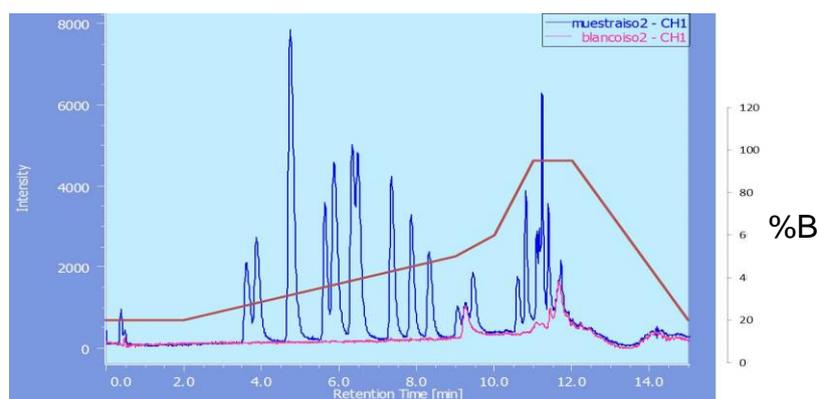


Figura 18. B: 15%

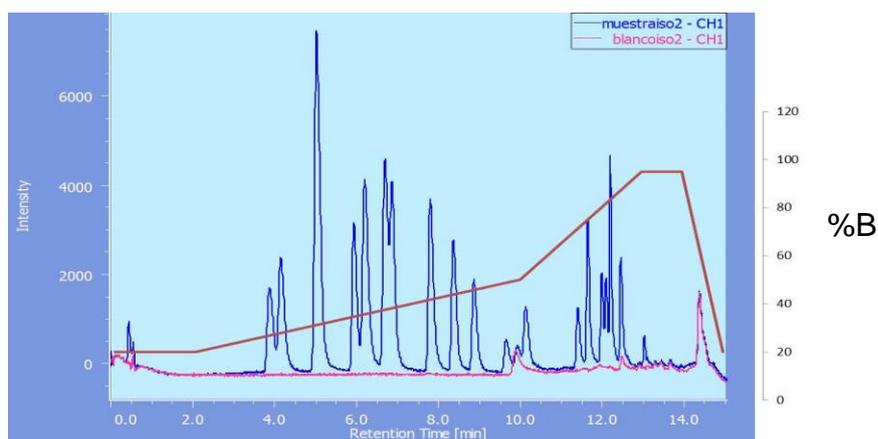


Figura 19. B: 20%

Tal y como se observa, al ir aumentando paulatinamente el porcentaje inicial de B en la fase móvil, los analitos salen con anterioridad y con mejor resolución, pero el último grupo de analitos se mantienen solapados. Para ello vamos a suavizar el porcentaje de gradiente, en detrimento del aumentar el tiempo de análisis. A medida que se suavizaba el gradiente se mejoraba la resolución del último grupo de analitos. En las figuras 20-23 se muestran los cromatogramas obtenidos junto con el perfil del gradiente utilizado, observándose como a medida que aumenta más lentamente el porcentaje de B en la fase móvil se incrementa el tiempo de análisis a la vez se produce una mejora de la resolución de los picos.

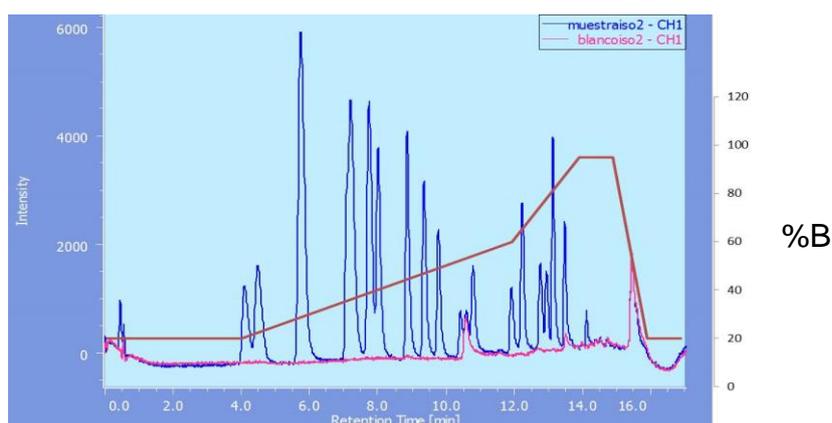


Figura 20. Cromatograma obtenido con gradiente 1 (tiempo de análisis: 18 min)

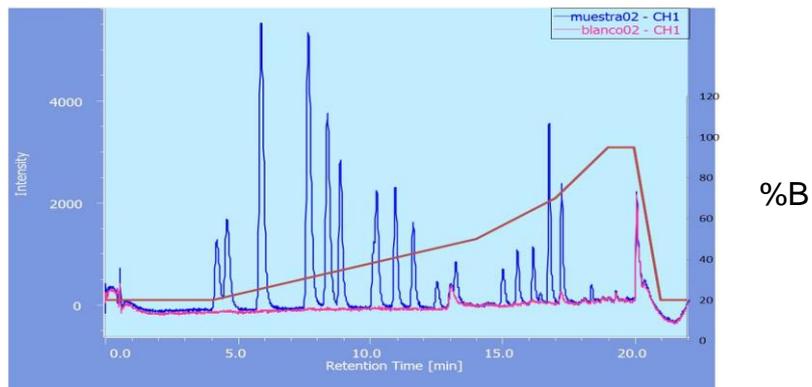


Figura 21. Cromatograma obtenido con gradiente 2 (tiempo de análisis: 22 min)

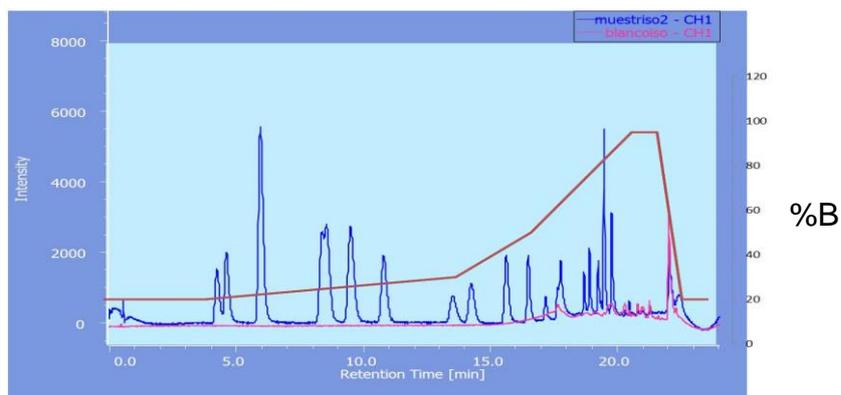


Figura 22. Cromatograma obtenido con gradiente 3 (tiempo de análisis: 25 min).

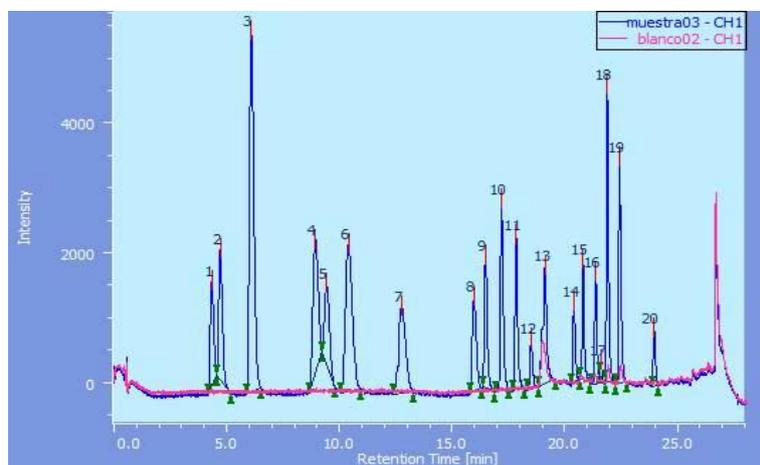


Figura 23. Cromatograma obtenido con gradiente 4 (tiempo de análisis: 28.5 min).

Finalmente se decidió seleccionar como óptimo el gradiente 4 (figura 23) al obtener la mejor resolución entre picos. La tabla 12 muestra el gradiente optimizado.

Tabla 12. Gradiente óptimo seleccionado (velocidad de flujo: 0.4 mL/min)

Tiempo (min)	% B
0	20
5	20
13	22.5
24	80
25.5-26.5	95
27.5	20
28.5	20

5.1.2.2 Evaluación del flujo de la fase móvil

Con objeto de evaluar el caudal de fase móvil empleado durante la separación, se consideró su modificación respecto al caudal fijado al inicio del trabajo (0.4 mL/min), considerando el gradiente optimizado. En este estudio se probaron valores de 0.3, 0.4 y 0.5 mL/min.

Al aumentar el caudal de la fase móvil, disminuye el tiempo de análisis porque los analitos son eluidos más pronto de la columna, al mismo tiempo que se observa un aumento de la presión, lo cual va en perjuicio de la vida del equipo. Igualmente, una elución demasiado rápida de los analitos puede implicar una pérdida de resolución entre picos. Cabe señalar que en este estudio se prestó especial atención a la variación de presión del sistema durante el análisis.

Con objeto de confirmar la repetibilidad entre análisis consecutivos bajo las mismas condiciones de separación, se comprobó que la presión del sistema al inicio y al final del análisis fuera la misma, lo que es un primer síntoma de un buen reequilibrio de la columna a las condiciones iniciales de separación.

Los resultados del estudio se muestran en las figuras 24-26.

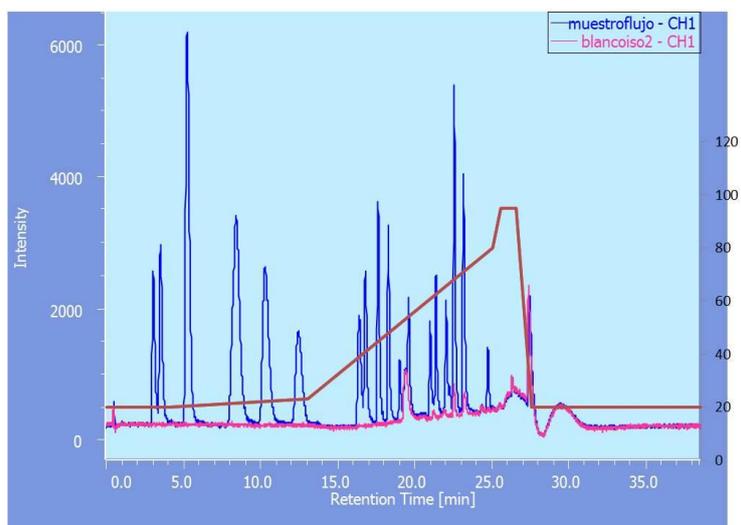


Figura 24. Cromatograma obtenido empleando un flujo de 0.3 mL/min.

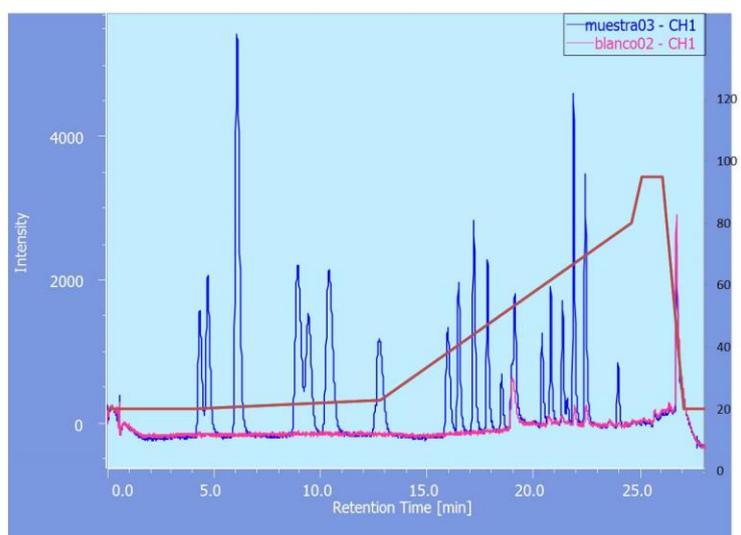


Figura 25. Cromatograma obtenido empleando un flujo de 0.4 mL/min.

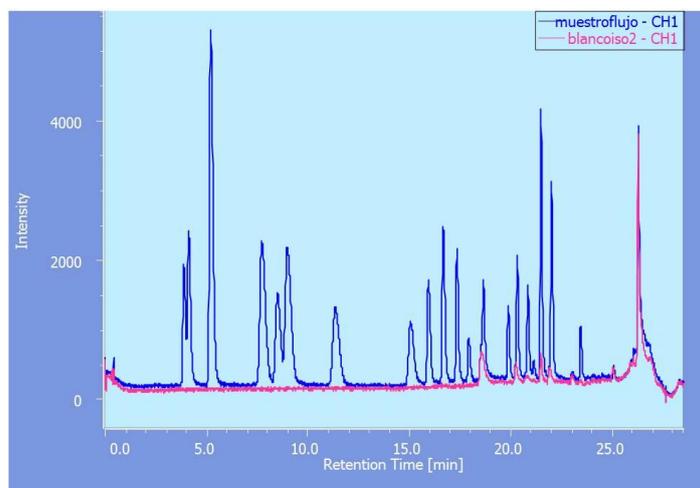


Figura 26. Cromatograma obtenido empleando un flujo de 0.5 mL/min

Observando los resultados, no se pudo seleccionar el valor óptimo de flujo aunque se descartó el valor de 0.3 mL/min. A 0.5 mL/min (figura 26), los picos 3,4 y 5 se separan, pero el 1 y 2 se solapan; mientras que a 0.4 mL/min (figura 25), los picos 3,4, y 5 se solapan y los picos 1 y 2 se separan. Teniendo en cuenta que no es significativa la mejora en resolución usando estos dos valores, se decidió llevar a cabo el estudio del siguiente parámetro a optimizar, la variación de la temperatura de la columna, tanto a 0.4 mL/min como a 0.5 mL/min de flujo, con objeto de seleccionar la situación óptima para una mejor separación de los compuestos.

5.1.2.3 Evaluación de la temperatura de separación

El aumento de temperatura de la columna en la separación cromatográfica permite trabajar a flujos mayores, mejorando el poder de elución de la fase móvil al alterar la viscosidad y además, puede cambiar la selectividad y mejorar la resolución en la separación de algunos compuestos. También reduce la pérdida de eficacia en los picos al trabajar con presiones elevadas.

Como hemos indicado anteriormente, estudiamos la variación de la temperatura a flujos de 0.4 y 0.5 mL/min. Se probaron las temperaturas de 30°C y 40 °C, considerando que en las experiencias previas hemos empleado una temperatura de columna de 20°C.

En la figura 27, se muestra el cromatograma obtenido al realizar el análisis a 30°C y un flujo 0.5 mL/min. Como se observa, los picos 1 y 2 que salían algo solapados a una temperatura de 20°C, ahora tienen mejor resolución. En la figura 28 se realizó el mismo análisis a una temperatura de 30°C y un flujo de 0.4 mL/min pero el resultado no fue satisfactorio, ya que los picos 3,4 y 5 se solapaban aún más.

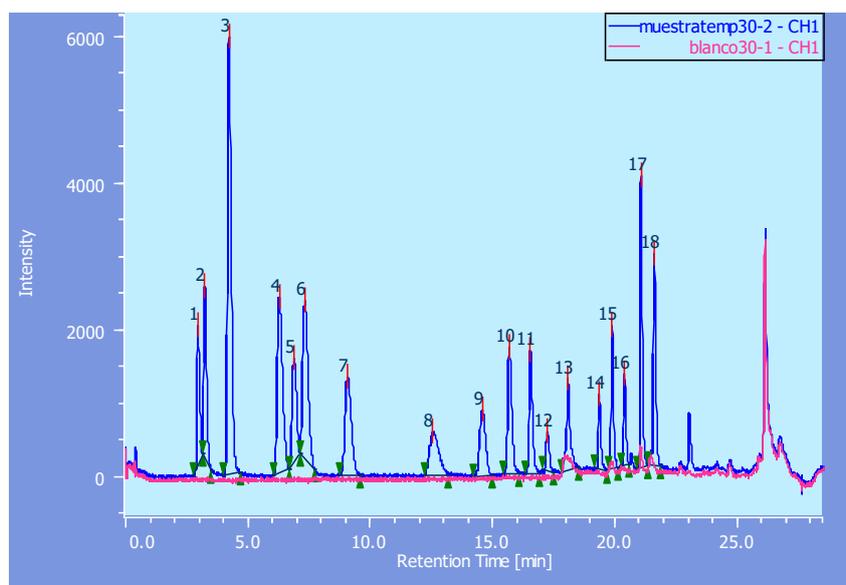


Figura 27. Cromatograma obtenido con flujo de 0.5 mL/min y temperatura de la columna de 30°C

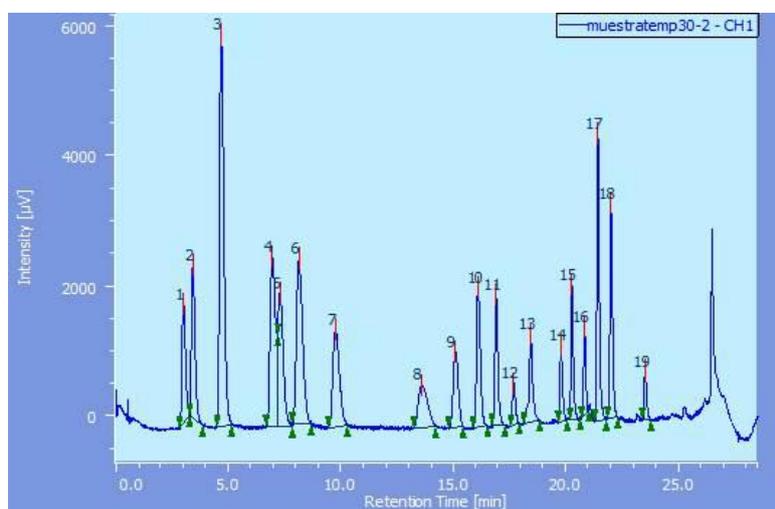


Figura 28. Cromatograma obtenido con flujo de 0.4 mL/min y temperatura de la columna de 30°C.

Por tanto, tras realizar ésta prueba, decidimos establecer como flujo de fase móvil óptimo el de 0.5 mL/min.

El siguiente paso fue aumentar la temperatura de la columna a 40 °C usando el flujo de fase móvil óptimo. En la figura 29 se muestra el cromatograma obtenido.

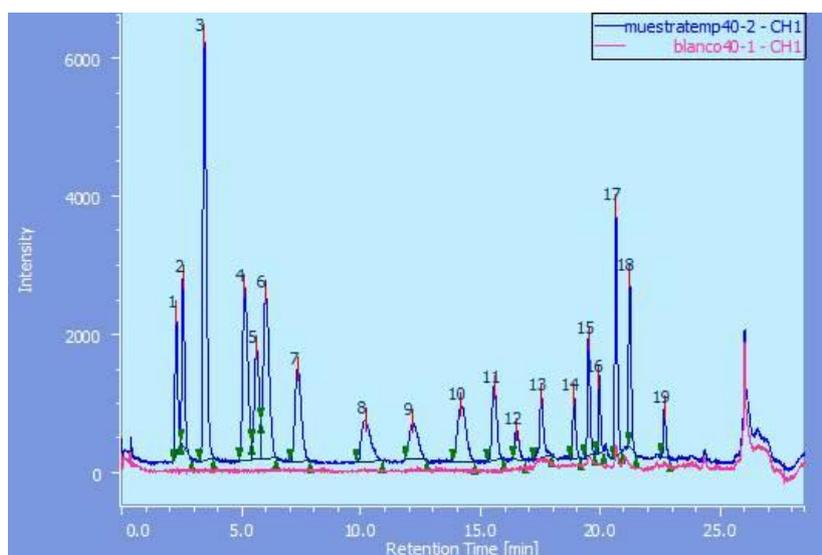


Figura 29. Cromatograma obtenido a flujo de 0.5 mL/min y temperatura de la columna de 40°C.

En este caso los picos 9, 10 y 11 se vuelven menos estrechos y no se consigue resolver mucho más los picos 1 y 2, no mejorándose la resolución y eficacia obtenida con 30°C. Por ellos se decide seleccionar un flujo de fase móvil de 0.5 mL/min y una temperatura de columna de 30°C (Figura 27).

5.1.2.4 Identificación de los picos cromatográficos

Para la identificación de cada pico del cromatograma respecto a cada uno de los benzimidazoles presentes en la disolución de trabajo inyectada (2 ppm de cada analito), se trabajó con las condiciones de separación optimizadas: 30°C de temperatura de columna, un flujo de fase móvil de 0.5 mL/min, una composición de fase móvil de (A) tampón agua:acetato amónico y (B) mezcla acetonitrilo:metanol (50:50) (v/v), trabajando en el modo gradiente indicado en la tabla 12. Para ello se llevó a cabo la inyección de disoluciones patrón individuales de cada compuesto en estudio con una concentración de 3 ppm. Los tiempos de elución obtenidos para cada analito se compararon con los tiempos de elución obtenidos en el estudio de la mezcla, ya que eran reproducibles. El resultado de la identificación se muestra en la Figura 30, donde se indican las abreviaturas de cada compuesto en cada pico.

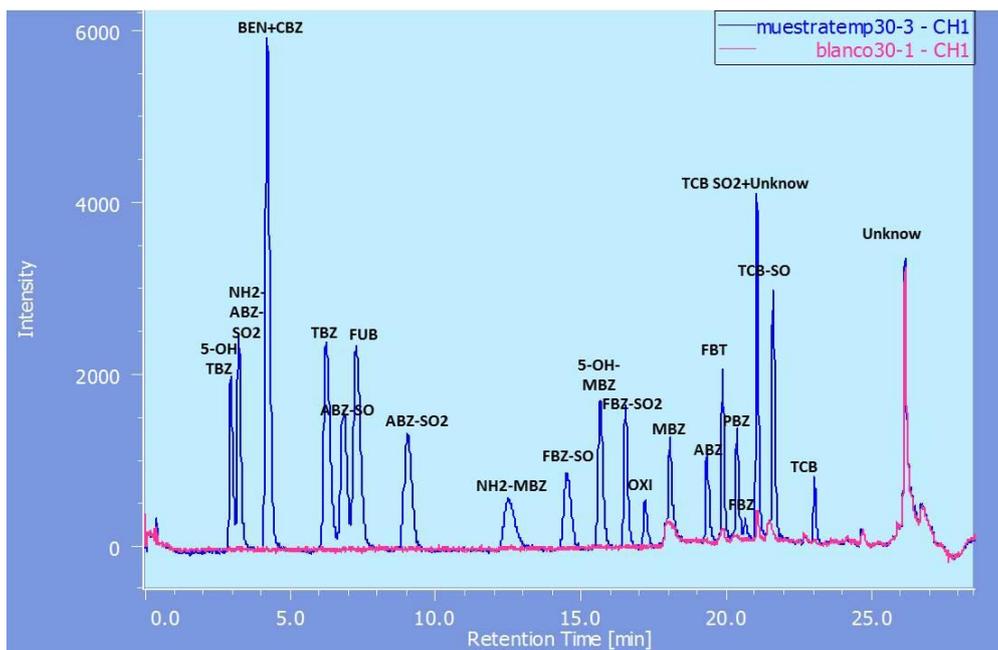


Figura 30. Cromatograma obtenido en las condiciones óptimas de trabajo en el que se muestra identificado cada uno de los benzimidazoles en estudio.

Como se puede comprobar el benomilo y el carbendazín (BEN+CBZ) se encuentran solapados y ha sido imposible su resolución en la optimización de variables. Esto es debido a que el benomilo es un producto de degradación del carbendazín y su conversión se produce rápidamente en disoluciones tanto acuosas como orgánicas, estando permitida su cuantificación como suma de ambos en la legislación de residuos en alimentos [44].

Igualmente analizando el cromatograma se seleccionaron finalmente 18 analitos de los 21 inicialmente incluidos. Procedimos a eliminar de la mezcla en estudio el NH₂-ABZ-SO₂ porque se encontraba solapado con el 5-OH-TBZ, presentando una resolución menor a 1,5. No obstante dejamos en el estudio 2 metabolitos más del ABZ. También se eliminó del método de cuantificación el FUB con objeto de evitar el solapamiento con el ABZ-SO. Por último, eliminamos el PBZ, por la misma razón, ya que solapa con el FBZ.

Para todos los demás compuestos, las resoluciones fueron aceptables, siendo posible su detección y cuantificación a estas condiciones y pudiendo establecerse para ello las correspondientes rectas de calibrado.

[44] R. P. Singh, L.D. Brindle, T.R. B. Jones, J. M. Miller, M. Chiba, *Can. J. Appl. Mass Spectrom.* 40, (1995)36.

5.1.2.5 Rectas de calibrado

Para comprobar el rango lineal del método cromatográfico propuesto para la determinación de residuos de benzimidazoles, se establecieron rectas de calibrado para cada analito, preparando disoluciones patrón mezcla de todos ellos a los siguientes niveles de concentración: 0.5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 8ppm. Cada disolución se inyectó dos veces. En la figura 31 se muestra el cromatograma obtenido a un nivel de concentración de 8 ppm para cada analito.

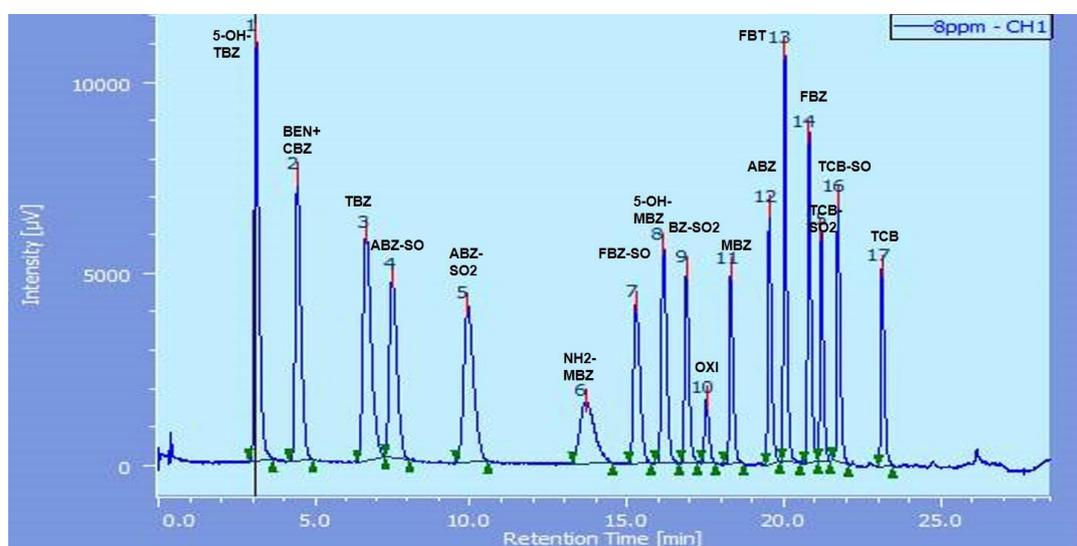


Figura 31. Cromatograma correspondiente al nivel de concentración de 8 ppm del rango lineal establecido.

Los parámetros estadísticos calculados mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la tabla 13. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se calcularon considerando una relación señal/ruido (S/R) de 3 veces para determinar los LDs y de 10 veces para establecer los LQs.

Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico como señal analítica, en función de la concentración de cada analito. La representación gráfica de las rectas de calibrado de cada uno de los benzimidazoles estudiados se muestran en la figura 31.

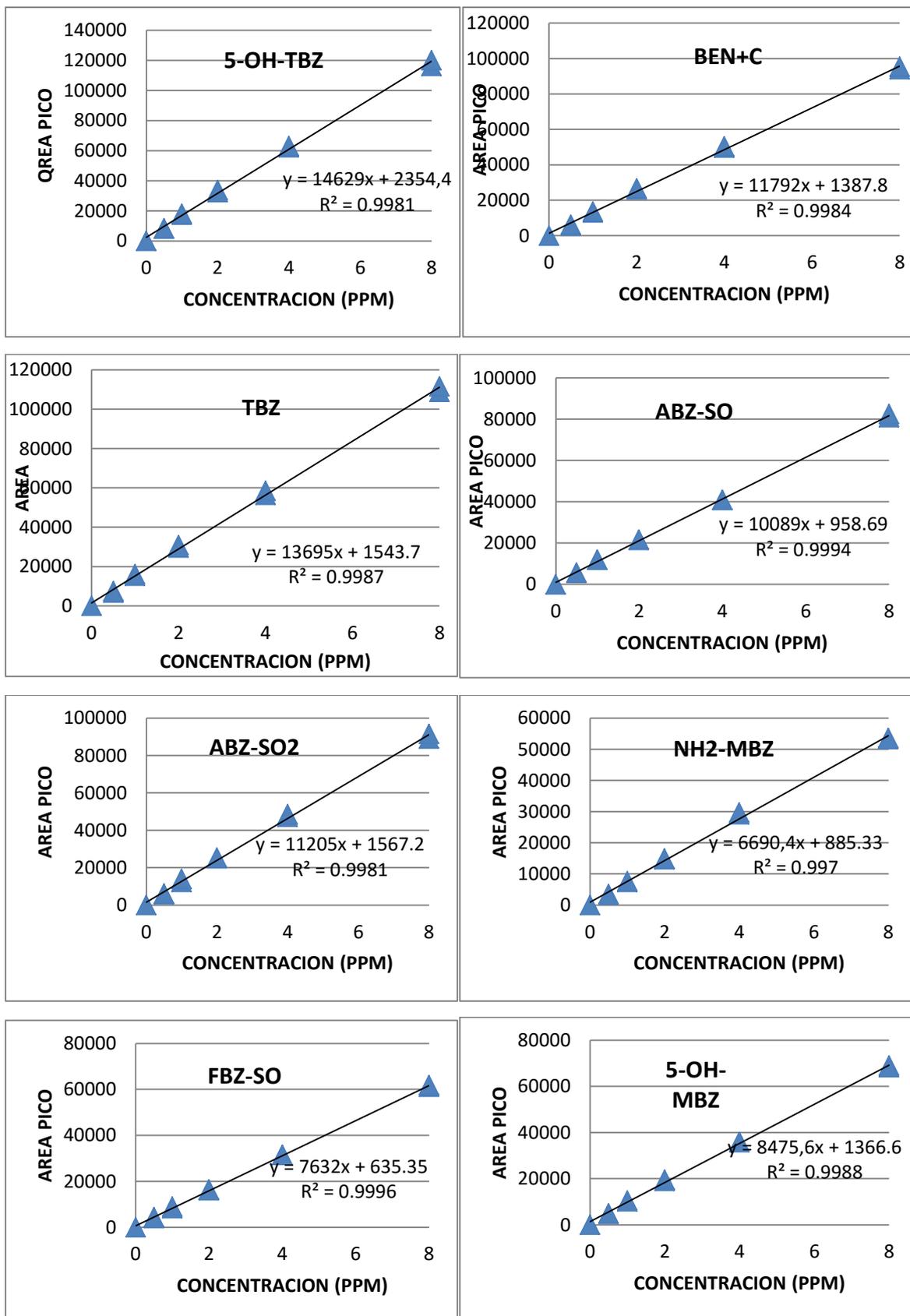
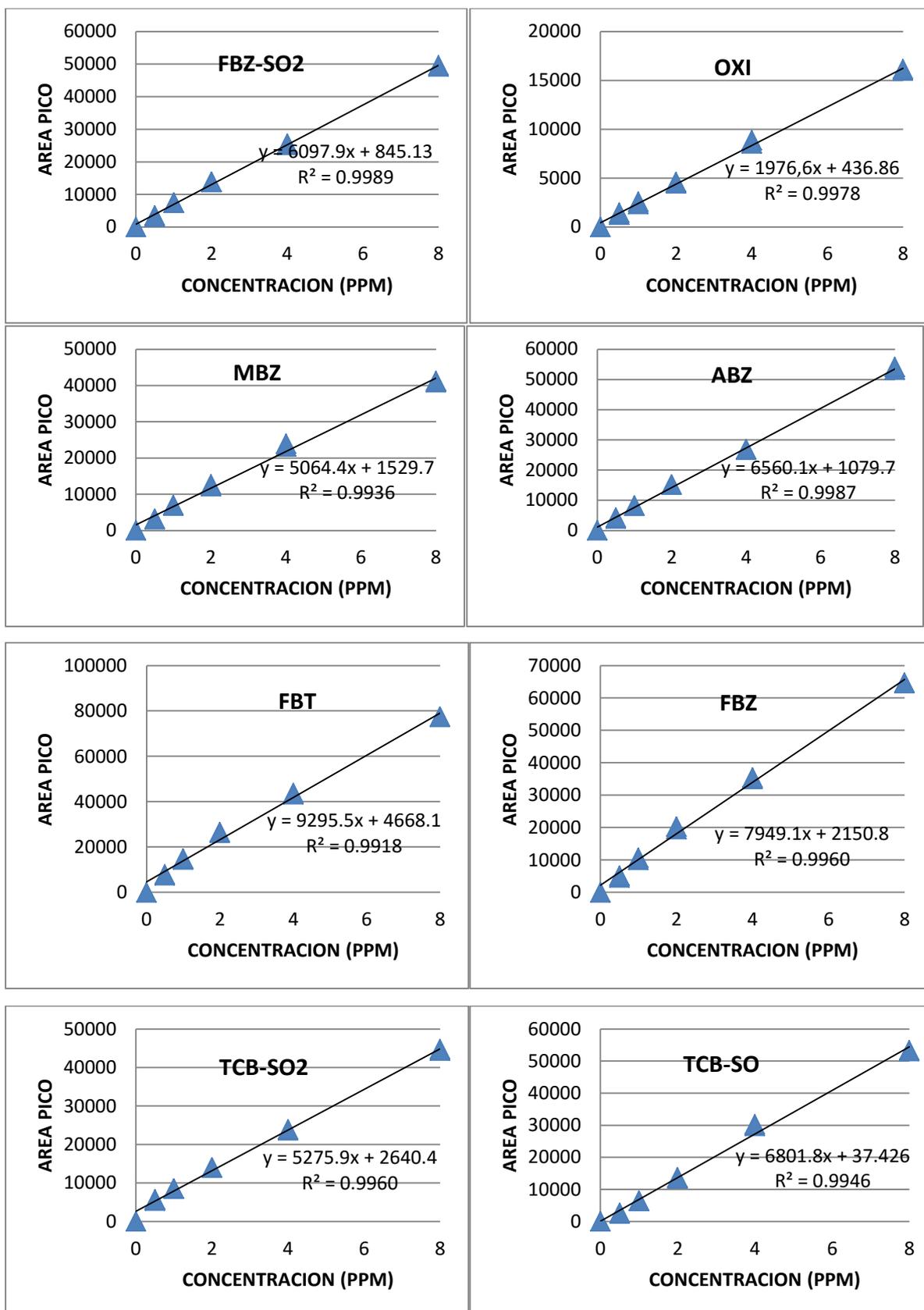
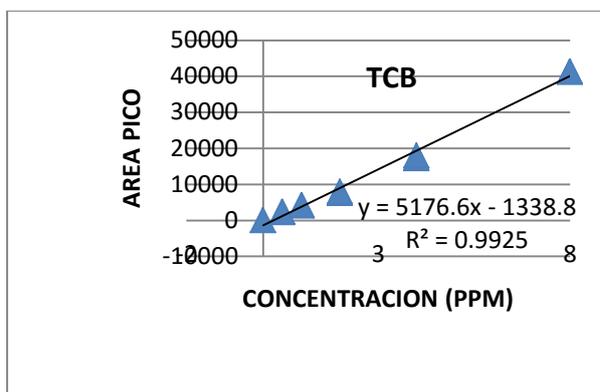


Figura 31. Rectas de calibrado de los compuestos estudiados.



Continuación figura 31. Rectas de calibrado de los compuestos estudiados.



Continuación figura 31. Rectas de calibrado de los compuestos estudiados.

Tabla 13. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto

Analito	Rango lineal (ppm)	Ecuación de la recta	R ² (%)	LD(ppm)	LQ(ppm)
5-OH-TBZ	0.37-8	y = 14629x + 2354	0.998	0.11	0.37
BEN+CBZ	0.34-8	y = 11792x + 1387	0.998	0.10	0.34
TBZ	0.46-8	y = 13695x + 1543	0.998	0.14	0.46
ABZ-SO	0.45-8	y = 10089x + 958.6	0.999	0.13	0.45
ABZ-SO2	0.38-8	y = 11205x + 1567	0.998	0.11	0.38
NH2-MBZ	1.32-8	y = 6690x + 885.3	0.997	0.39	1.32
FBZ-SO	0.59-8	y = 7632x + 635.3	0.999	0.18	0.59
5-OH-MBZ	0.26-8	y = 8475x + 1366	0.998	0.08	0.26
FBZ-SO2	0.43-8	y = 6097x + 845.1	0.998	0.13	0.43
OXI	1.16-8	y = 1976x + 436.8	0.997	0.35	1.16
MBZ	0.42-8	y = 5064x + 1529	0.993	0.13	0.42
ABZ	0.35-8	y = 6560x + 1079	0.998	0.10	0.35
FBT	0.12-8	y = 9295x + 4668	0.991	0.03	0.12
FBZ	0.18-8	y = 7949x + 2150	0.996	0.05	0.18
TCB-SO2	0.13-8	y = 5275x + 2640	0.996	0.04	0.13
TCB-SO	0.26-8	y = 6801x + 37.42	0.994	0.08	0.26
TCB	0.30-8	y = 5176x - 1338	0.992	0.09	0.30

5.2 Comparativa de los métodos cromatográficos estudiados

En la tabla 14 se resumen las condiciones cromatográficas optimizadas para cada uno de los métodos propuestos para la determinación conjunta de benzimidazoles, usando tanto HPLC capilar como UHPLC.

Tabla 14. Resumen del procedimiento cromatográfico propuesto para ambas técnicas

	HPLC capilar	UHPLC
Compuestos estudiados	Tabla 1	Tabla 1
Columna	C18, Zorbax XDB (5 μ m, 150x0.5 mm)	C18, Zorbax Eclipse plus (1.8 μ m, 50 x 2.1mm)
Temperatura de la columna	20°C	30°C
Volumen de inyección	8 μ L	5 μ L
Composición de la fase móvil	A: Agua/50mM acetato amónico B: Acetonitrilo/metanol 50:50(v/v)	A: Agua/50mM acetato amónico B: Acetonitrilo/metanol 50:50 (v/v)
Gradiente	0 min-30%B, 14 min-40%B, 17min-70%B, 19 min-95%B, 29 min-95%B, 31min-30%B, 42 min-30%B.	0 min-20%B, 5min-20%B, 13min-22.5%B, 24min-80%B, 25.5min-95%B, 26.5min-95%B, 27.5min-20%B, 28.5min-20%B.
Tiempo de análisis	42 min	28.5 min
Caudal de la fase móvil	7 μ L/min	0.5 mL/min
Longitud de onda	290 nm	290 nm

Ambas técnicas cromatográficas constituyen una interesante alternativa a la HPLC analítica ya que HPLC capilar es una técnica miniaturizada en la que se emplean muy bajos flujos de fase móvil, al utilizar columnas de diámetro interno reducido e incluso de inferior longitud, obteniéndose muy buenas eficacias aunque los tamaños de partícula son similares a las columnas cromatográficas convencionales (5 μm). Sin embargo en UHPLC hemos usado una columna de tamaño de partícula inferior a 2 μm y de menor longitud (5 cm vs. 15 cm usados en HPLC capilar) lo que implica un tiempo de análisis inferior con excelentes resoluciones.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se ha planteado el estudio de una familia de compuestos de interés en seguridad alimentaria, los benzimidazoles. Estos compuestos son antiparasitarios y antifúngicos usados en medicina veterinaria y en agricultura, pudiendo encontrarse como residuos en alimentos y su contenido no debe sobrepasar el establecido en la legislación.
- ✓ Para llevar el control de estos residuos, se ha planteado la puesta a punto de dos metodologías cromatográficas usando técnicas avanzadas como la HPLC capilar y la UHPLC, ambas acopladas a la detección UV.
- ✓ Se han optimizado todas las variables que afectan a la separación cromatográfica usando ambas técnicas, tales como la composición de la fase móvil, el gradiente, la temperatura de la columna y el flujo de fase móvil con objeto de conseguir la mejor resolución y eficacia en el menor tiempo posible.
- ✓ Se han establecido las rectas de calibrado con patrones y los parámetros de calidad del método que emplea UHPLC-UV ya que ofrece tiempos de análisis más cortos, por lo que sería más recomendable su aplicación como técnica de rutina en comparación con HPLC capilar, realizando previamente un estudio del tratamiento de muestra adecuado para la extracción de estos contaminantes de matrices reales.