

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



NUEVAS APORTACIONES AL ANÁLISIS
DE RESÍDUOS DE PLAGUICIDAS Y
ANTIBIÓTICOS EN AGUAS Y ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

Jorge Juan Soto Chinchilla

Granada, 2007

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jorge Juan Soto Chinchilla
D.L.: Gr. 319 - 2007
ISBN: 978-84-338-4244-2

**NUEVAS APORTACIONES AL ANÁLISIS
DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y
ANTIBIÓTICOS EN AGUAS Y ALIMENTOS**

por

Jorge Juan Soto Chinchilla

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias,
Sección Químicas

Fdo. Jorge Juan Soto Chinchilla
Licenciado en Ciencias Químicas

VISADA en Granada, a 8 de enero de 2007

Las Directoras de la Memoria,

Fdo. Prof. Dra. Ana M^a García
Campaña
**Profesora Titular del Dpto. de
Química Analítica de la
Universidad de Granada**

Fdo. Dra. Laura Gámiz Gracia
**Investigadora “Ramón y Cajal”
del Dpto. de Química Analítica
de la Universidad de Granada**

Dña. Ana María García Campaña, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de “NUEVAS APORTACIONES AL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y ANTIBIÓTICOS EN AGUAS Y ALIMENTOS”, ha sido realizado bajo la dirección de la Prof. Dña. Ana M^a García Campaña y de la Investigadora “Ramón y Cajal” Dña. Laura Gámiz Gracia, 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 y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de doctorado “Química”.

Granada, 8 de enero de 2007

Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca para estudios de postgrado en el área “*Medio Ambiente y Sostenibilidad*” de la Fundación “La Caixa”, y a la financiación obtenida en los siguientes proyectos de investigación:

- “*Criterios de calidad para metodologías analíticas de control de contaminantes en alimentos vegetales: aplicación de la detección quimioluminiscente a técnicas de GC y CE*” (Ref.: CAL00-002-C2-1, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, MCyT)
- “*Implantación de nuevas estrategias analíticas, bajo criterios de calidad, para la determinación de residuos de fármacos y presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en leche, derivados lácteos y otros alimentos*” (Ref.: CAL03-096-C2-2, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, MCyT)
- “*Criterios de calidad en el control analítico de contaminantes en alimentos grasos de origen animal: aplicación a la detectores de masas, de fluorescencia inducida por láser y quimioluminiscentes a técnicas cromatográficas y de electroforesis capilar*” (Ref.: CAL03-087-C2-1, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, MCyT)

A mis directoras la profesora Dra. Ana María García Campaña, y a la Dra. Laura Gámiz Gracia, por su continuo apoyo y estímulo así como por su constante interés y dedicación, gracias a las cuales ha sido posible la realización de esta Tesis.

A todos los miembros de mi grupo de investigación y a los miembros del Departamento de Química Analítica, que han contribuido al resultado aquí presentado. Gracias por la gran acogida y el cariño que me habeis mostrado.

A cada uno de mis amigos que me aguantaron, me apoyaron y me alentaron durante estos años, sin ellos nada hubiera sido igual.

A todos y cada uno gracias

A mis padres, Juan Miguel y Gloria,

A mi hermano Daniel

A Laura

INDICE

OBJETO DE LA MEMORIA	21
INTRODUCCIÓN GENERAL	24
1 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO	26
1.1 Detección quimioluminiscente en sistemas en flujo	30
1.2 Consideraciones del acoplamiento FIA-CL	35
2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	39
2.1 Consideraciones del acoplamiento HPLC-CL	42
3 ELECTROFORESIS CAPILAR.....	48
3.1 Componentes básicos de un sistema CE	53
3.1.1 Capilares	55
3.1.2 Sistemas de inyección.....	56
3.1.3 Sistemas de detección.....	57
3.2 Técnicas de preconcentración de la muestra online en CE	62
4 DETECCIÓN EN CE POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	68
4.1 Métodos de ionización	69
4.1.1 Ionización por electrospray (ESI)	71
4.2 Analizadores de masas	77
5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).....	80
6 USO DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS.....	85
6.1 Uso de diseño de experimentos en la optimización de métodos de análisis.....	85
6.2 Diseños factoriales a dos niveles.....	86
6.2.1 Diseño Factorial 2^k	86
6.2.2 Diseños Factoriales Fraccionados a dos niveles: 2^{k-p}	87
6.3 Metodología de superficie de respuesta	89
6.3.1 Diseños centrales compuestos	90
6.3.2 Diseños Draper-Lin	91
6.3.3 Diseños Doehlert.....	93
7 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO	95
7.1 Validación de un método analítico.....	95
7.1.1 Evaluación de la veracidad.....	95
7.1.2 Evaluación de la precisión.....	99
7.1.3 Cálculo de los parámetros de calidad	100

REACTIVOS	106
CAPÍTULO 1 y CAPÍTULO 2	107
CAPÍTULO 3	110
CAPÍTULO 4	113
CAPÍTULO 5	116
INTRODUCCIÓN BLOQUE I: ANÁLISIS DE CARBAMATOS	120
1 ANTECEDENTES.....	121
2 CONCEPTOS GENERALES SOBRE PLAGUICIDAS	123
3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBAMATOS.....	129
3.1 Acción de los carbamatos	129
3.2 Distribución y transporte en el medioambiente	130
3.3 Estructura y propiedades físico-químicas de los carbamatos.....	131
4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBAMATOS	133
4.1 Uso de la quimioluminiscencia en el análisis de carbamatos	135
DETERMINACIÓN DE CARBARIL MEDIANTE FIA-CL EN AGUAS Y PEPINO	138
1 INTRODUCCIÓN	139
1.1 Consideraciones generales sobre el carbaril	140
1.1.1 Efectos toxicológicos.....	140
1.2 Consideraciones preliminares sobre el sistema FIA-CL propuesto	144
2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA DETERMINACIÓN DE METILAMINA	148
2.1 Selección del caudal de portador.....	149
2.2 Selección de las variables, delimitación del dominio experimental y diseño de diagnóstico	149
2.3 Optimización de las variables significativas mediante el uso de un diseño Draper-Lin	152
2.4 Optimización de la reacción de formación del derivado fluorescente	157
2.5 Optimización de los volúmenes de los bucles de inyección y tiempo de giro de ambas válvulas	159
3 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE FOTODESCOMPOSICIÓN DE N-METILCARBAMATOS	163
4 RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO.....	169
5 ESTUDIO DE INTERFERENTES.....	172
6 APLICACIONES ANALÍTICAS.....	174

6.1	Análisis de carbaril en aguas.....	174
6.2	Análisis de carbaril en muestra vegetal (pepino).....	175
6.2.1	<i>Optimización de la etapa de extracción.....</i>	176
6.2.2	<i>Optimización de la etapa de limpieza del extracto (“clean-up”)</i>	176
DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE TOTAL DE N-METIL		
CARBAMATOS MEDIANTE FIA-CL EN AGUAS		
1	INTRODUCCIÓN	184
2	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL MÉTODO.....	185
3	PROPUESTA Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO	190
3.1	Etapa 1. Definición del Límite de Especificidad	197
3.2	Etapa 2. Conversión del SL en señal de especificación (r_{SL}).....	197
3.3	Etapa 3. Cálculo del intervalo de incertidumbre del análisis (u_s) ..	198
3.4	Etapa 4. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del análisis	199
INTRODUCCIÓN BLOQUE II: ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS		
1	ANTECEDENTES.....	206
2	CONCEPTOS GENERALES SOBRE SULFONAMIDAS	207
2.1	Mecanismo de acción.....	215
2.2	Combinaciones con TMP.....	215
2.3	Mecanismos de resistencia	216
2.4	Estructura química y propiedades físico-químicas de las sulfonamidas y del TMP	217
2.5	Características farmacocinéticas	221
3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS	222
3.1	Determinación de sulfonamidas mediante HPLC	222
3.2	Determinación de sulfonamidas mediante CE	227
DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS MEDIANTE HPLC-CL EN LECHE.....		
1	INTRODUCCIÓN	234
2	OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA	235
2.1	Estudios previos del sistema HPLC-PO-CL	236
2.2	Optimización de la fase móvil	236
2.3	Optimización de la reacción PO-CL post-columna	240
2.3.1	<i>Selección del peroxioxalato</i>	243
2.3.2	<i>Optimización de las variables de la reacción post-columna ...</i>	246
2.4	Optimización de la reacción de derivatización	250

2.4.1	<i>Estudio de la reacción de derivatización</i>	250
2.4.2	<i>Tiempo de reacción y concentración de FR</i>	254
2.5	Optimización del bucle de inyección.....	255
3	RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.....	257
4	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS EN LECHE.....	262
5	APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN LECHE CRUDA DE VACA.....	266
DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS MEDIANTE CE-UV/VIS EN CARNE DE CERDO Y AGUA		
1	INTRODUCCIÓN.....	272
2	OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA....	274
2.1	Optimización del pH.....	274
2.2	Optimización de la naturaleza del tampón.....	277
2.3	Optimización de la concentración del tampón de separación.....	279
2.4	Optimización del voltaje, temperatura y tamaño del capilar.....	282
3	DESARROLLO DEL MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN ONLINE.....	284
3.1	Optimización del LVSS.....	284
4	RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.....	287
5	APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE 9 SULFONAMIDAS EN CARNE DE CERDO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS.....	292
5.1	Determinación de sulfonamidas en carne de cerdo.....	292
5.2	Determinación de sulfonamidas en aguas subterráneas.....	298
DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS Y TMP MEDIANTE CE-MS Y CE-MS/MS EN CARNE DE TERNERA Y AGUA		
1	INTRODUCCIÓN.....	302
2	OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA....	304
2.1	Optimización del pH del tampón de separación.....	304
2.2	Optimización de la naturaleza del tampón de separación.....	307
2.3	Optimización de la concentración del tampón de separación.....	309
2.4	Optimización del voltaje de separación y temperatura del capilar.....	310
3	OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CE-MS y CE-MS/MS.....	313
3.1	Elección del modo de ionización por electrospray (ESI +, ESI -).....	313
3.2	Optimización del líquido adicional.....	318
3.3	Diseño de diagnóstico para las variables del electrospray.....	322

3.4 Optimización de las variables significativas del electrospray.....	324
3.5 Optimización de parámetros influyentes en CE-MS y CE-MS/MS	331
4 RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.....	343
5 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE LAS 10 SULFONAMIDAS Y EL TRIMETOPRIM EN CARNE DE TERNERA Y AGUAS SUBTERRÁNEAS.....	348
5.1 Determinación de sulfonamidas y TMP en carne de ternera	348
5.2 Determinación de sulfonamidas en aguas subterráneas	354
CONCLUSIONES	360
CAPÍTULO 1	361
CAPÍTULO 2	362
CAPÍTULO 3	363
CAPÍTULO 4	364
CAPÍTULO 5	365
ANEXO: PUBLICACIONES	367

OBJETO DE LA MEMORIA

OBJETO DE LA MEMORIA

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la puesta a punto de nuevos métodos de análisis sensibles y selectivos para la determinación de residuos de plaguicidas y antibióticos en muestras de aguas y de alimentos vegetales y animales, considerando que en particular, en el caso de los alimentos, la legislación vigente establece unos Límites Máximos de Residuos (LMRs) que no deben ser superados con objeto de garantizar la calidad del producto y permitir su distribución y consumo. En el caso de las aguas es ampliamente conocido el interés que ha suscitado el control del nivel de residuos de plaguicidas que pueden encontrarse como resultado de los tratamientos de cultivos con tales compuestos; sin embargo es relativamente reciente la preocupación por detectar residuos de fármacos, y en concreto de antibióticos en aguas naturales, cuya presencia puede generar cierta resistencia bacteriana o reacciones alérgicas en la población que la consume. Para ello en esta memoria se han utilizado técnicas poco exploradas en estos ámbitos, como son la detección Quimioluminiscente (CL) acoplada al Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y a la Cromatografía Líquida (HPLC) o la Electroforesis Capilar (CE) con detección UV/Vis usando una técnica de preconcentración online en el propio capilar o con detección mediante Espectrometría de Masas (MS). En concreto, el estudio se ha centrado en una familia de plaguicidas ampliamente utilizada, los *carbamatos* y en un grupo de antibióticos de amplio espectro y de uso en medicina y veterinaria, las *sulfonamidas*.

Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Desarrollo de un método FIA-CL para la determinación de carbaril en muestras de vegetales y aguas empleando la reacción de los peroxioxalatos, previa fotodegradación del analito a

Objeto de la Memoria

metilamina y formación con éste de un derivado fluorescente, el cual participa en la reacción CL indirecta y cuya emisión permitirá la cuantificación del carbaril.

2. Puesta a punto de un método FIA-CL semicuantitativo para la determinación del contenido total de carbamatos en muestras de aguas, previa hidrólisis de los analitos a metilamina y formación del derivado fluorescente que participará en la reacción de los peroxioxalatos. Establecimiento de los parámetros que caracterizarán la eficacia del método semicuantitativo propuesto.
3. Desarrollo de un método mediante HPLC-CL para la cuantificación de siete sulfonamidas en leche cruda, empleando la reacción de los peroxioxalatos en modo post-columna, previa formación de los correspondientes derivados fluorescentes con los analitos en estudio.
4. Propuesta de un método para la cuantificación de nueve sulfonamidas mediante CE-UV/Vis, que incluye la preconcentración de los analitos en el propio capilar usando técnicas de apilamiento para mejorar la sensibilidad, con objeto de determinar éstos en carne de cerdo, a niveles inferiores a los LMRs legislados, y en muestras de aguas.
5. Establecimiento de dos métodos analíticos mediante CE-MS y CE-MS/MS para la cuantificación e identificación simultánea de diez sulfonamidas y trimetoprim en carne de ternera y muestras de agua, con objeto de conseguir límites de detección inferiores a los LMRs legislados y de alcanzar los puntos de identificación necesarios para su inequívoca confirmación.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción General

Esta parte de la Memoria está dedicada a ofrecer una visión de las técnicas empleadas a lo largo del desarrollo de la parte experimental. Teniendo en cuenta que el objetivo de la Tesis ha sido el de aportar nuevas metodologías analíticas para la determinación de contaminantes, y que esta aportación ha sido amplia y variada (empleando análisis por inyección en flujo, cromatografía líquida de alta resolución, electroforesis capilar, técnicas de preconcentración, diversos modos de detección, como detección quimioluminiscente, UV/Vis y espectrometría de masas, diseños de experimentos en las optimizaciones, etc.), un desarrollo detallado del fundamento y características de cada una de las técnicas haría esta parte de la Memoria demasiado extensa. Así, por ejemplo, en el caso de la cromatografía líquida de alta resolución, se ha considerado que los fundamentos de esta técnica son lo suficientemente conocidos como para obviar su explicación. Por esta razón, se han incluido únicamente breves introducciones de las técnicas, así como una explicación más detallada de aquellos aspectos que influyen directamente sobre los métodos desarrollados.

1 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Esta técnica dinámica, aparecida a mediados de la década de los setenta y cuya paternidad se disputan varios autores [1,2] recibió el nombre de Análisis por Inyección en Flujo y se ha conocido con las siglas FIA desde su invención.

Esta técnica se clasifica entre las técnicas automáticas de análisis como de flujo no segmentado [3,4,5,6] y proporciona un modo especial de llevar a cabo determinaciones en forma continua en el cual no existen burbujas de aire que separen las diferentes zonas transportadas a lo largo del sistema. Las muestras líquidas (menos comúnmente sólidas o gaseosas) se insertan directamente en el sistema dinámico, a lo largo del cual son transportadas, pudiendo estar sometidas a una o más reacciones químicas o bioquímicas y a etapas de separación y/o preconcentración. La dispersión o dilución del analito –o de su producto de reacción– puede controlarse a través de las características geométricas y dinámicas del sistema. Se utiliza un detector continuo, provisto generalmente de una célula de flujo, para la obtención de las señales transitorias características de la técnica. Ni el equilibrio físico (homogeneización de la porción del fluido) ni el químico (equilibrio de la reacción) se han alcanzado en el momento de la detección; por tanto los métodos desarrollados mediante FIA en esta versión simple son siempre métodos cinéticos de tiempo fijo y, en consecuencia, el tiempo de operación ha de ser muy reproducible ya que las medidas no se realizan

[1] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare, Fed. Proc. 33 (1974) 1439.

[2] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.

[3] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Automatic Method of Analysis", Elsevier, Amsterdam, 1998.

[4] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Flow Injection Analysis: Principles and Applications", Ellis Horwood, Chichester, 1987.

[5] J. Ruzicka, E.H. Hanse, "Flow Injection Analysis" 2ª Ed., Wiley & Sons, Nueva York, 1988.

[6] B. Karlberg, G.E. Pacey, "Flow Injection Analysis: A Practical Guide", Elsevier, Amsterdam, 1989.

en régimen de equilibrio. En resumen, las cuatro características esenciales del FIA son: (1) flujo no segmentado; (2) inserción directa de la muestra; (3) dispersión parcial controlada; (4) tiempo de operación reproducible.

Las unidades básicas de un sistema de FIA, cuya descripción pormenorizada puede encontrarse en cualquiera de las monografías sobre la técnica [3,4,5,6,7,8], son las siguientes:

- Una unidad de impulsión, generalmente una bomba peristáltica
- Una válvula de inyección de baja presión
- Un sistema de transporte (y reacción y/o separación, si se requieren)
- Un detector y una unidad de toma y tratamiento de los datos suministrados por el detector.

La bomba peristáltica se sitúa generalmente al inicio del sistema, aunque también puede establecerse un régimen dinámico por aspiración, en lugar de por impulsión, situando la bomba al final del sistema [4,5,6]; además puede usarse la inyección de reactivos y el uso de muestra como portador (FIA invertido o reverso [4,5,6]).

Las características más destacables de la técnica son su versatilidad, rapidez, precisión y bajo precio del dispositivo instrumental.

La *versatilidad del FIA* posibilita su utilización como simple interfase entre muestra e instrumento [9,10], con intercalación tanto de etapas (bio)químicas [11,12] como de separación y/o preconcentración o de ambas [13,14,15], la implantación de sensores (bio)químicos en flujo

[7] M.D. Luque de Castro, "Principles of Flow Injection", en "Encyclopedia of Analytical Sciences". Academic Press Ltd., 1995, pp. 1299.

[8] M.D. Luque de Castro, "Instrumentation in Flow Injection", en "Encyclopedia of Analytical Sciences". Academic Press Ltd., Londres, 1995, pp. 1306.

[9] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Fresenius J. Anal. Chem. 337 (1990) 662.

[10] F. Cañete, A. Rios, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Analyst, 113 (1988) 739.

[11] E. Mataix, M.D. Luque de Castro, Analyst 123 (1998) 1547.

[12] P. Cañizares, M.D. Luque de Castro, Fresenius J. Anal. Chem. 357 (1997) 777.

[13] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Continuous Separation Techniques in Flow Injection Analysis", en "Selective Sample Handling and Detection in High Performance Liquid Chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1989.

Introducción General

[16,17], su acoplamiento con cromatógrafos, tanto de líquidos [18,19] como de gases [20,21] o con detectores de gran capacidad de discriminación como espectrometría de masas (MS), plasma de acoplamiento por inducción–espectrometría de emisión atómica (ICP–AES), ICP–MS, infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), análisis molecular por emisión en cavidad (MECA), resonancia magnética nuclear (NMR), etc. [22] y su uso para el seguimiento de procesos industriales en general [23,24] y biotecnológicos en particular [25], para llevar a cabo análisis de especiación [26] y como herramienta única para manipular la sensibilidad de un método [27,28].

Su capacidad para adecuarse a la resolución de cualquier tipo de problema de la matriz y/o del analito en la muestra, de la reacción o de la etapa en cuestión para que las características de la especie a medir se ajusten a las del detector, hace que su papel en el desarrollo del proceso analítico pueda oscilar desde protagonista único en la relación entre muestra y resultados, hasta simple interfase entre dos equipos analíticos. El número y variedad en las modalidades a las que ha dado lugar el FIA constituyen una prueba más de su versatilidad. Así, el FIA invertido como forma de ahorro

-
- [14] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, “Non-Chromatographic Continuous Separation Techniques”, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
[15] Z. Fang, “Flow Injection Separation and Preconcentration”, VCH, Alemania, 1993.
[16] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Analyst* 115 (1990) 699.
[17] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, “Flow-Through (Bio)Chemical Sensors”, Elsevier, Amsterdam, 1994.
[18] F. Lázaro, M.D. Luque de Castro y M. Valcárcel, *J. Chromatogr.* 448 (1988) 173.
[19] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Chromatogr.* 600 (1992) 183.
[20] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr.* 633 (1993) 169.
[21] M. Valcárcel, E. Ballesteros, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 68.
[22] M.D. Luque de Castro, M.T. Tena, *Talanta* 42 (1995) 151.
[23] J.S. Cosano, A. Izquierdo, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, C. Aguilar, G. Penelas, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 187.
[24] M.D. Luque de Castro, M.T. Tena, *Talanta* 40 (1993) 21.
[25] M. T. Tena, M.D. Luque de Castro, *Industria Farmacéutica*, marzo-abril (1992) 125.
[26] M.D. Luque de Castro, D.W. Bryce, A. Izquierdo, *Talanta* 42 (1995) 1215.
[27] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Microchem. J.* 45 (1992) 189.
[28] J.M. Bosque Sendra, L. Gámiz Gracia, A.M. García Campaña, *Anal Bioanal Chem* 377 (2003) 863.

de reactivos en el caso de muestra abundante y barata; la modalidad de confluencia de zonas simétrica para minimizar tanto el consumo de muestra como el de reactivos; la de confluencia de zonas asimétrica para facilitar los estudios de especiación y la calibración con un pequeño número de patrones; la posibilidad de detener el flujo cuando el bolo reaccionante se encuentra en el reactor (para favorecer el desarrollo de la reacción sin aumentar la dispersión) o cuando se encuentra en el detector (para llevar a cabo medidas de velocidad de reacción); los sistemas abiertos-cerrados con capacidad para realizar medidas simultáneas de varias especies, métodos cinéticos, etc. [3,4,5,6], son algunos ejemplos más de esta faceta de la técnica que justifica la variedad y amplitud de sus aplicaciones.

La *rapidez* del FIA es una consecuencia inmediata de la ausencia de contaminación entre muestras sucesivamente inyectadas. Las características geométricas de los sistemas (pequeño diámetro de los tubos) favorecen la dispersión radial en detrimento de la axial. La disposición de estos tubos en forma de serpentín o bien tricotados [29] da lugar a la aparición del llamado flujo secundario [30] que potencia la dispersión radial. El resultado de este comportamiento es la eliminación de la etapa de lavado entre muestras sucesivamente inyectadas y la secuencia rápida en la que se pueden introducir las muestras, que hace posible conseguir velocidades de muestreo de hasta 350 muestras h^{-1} [31]. No obstante, una frecuencia de muestreo normal en FIA oscila entre 60 y 100 muestras h^{-1} [32].

La *precisión* que se consigue en los métodos FIA es el resultado de la simplicidad de los sistemas. Estudios exhaustivos sobre este parámetro analítico han permitido establecer como más común, un valor de la desviación estándar relativa de los métodos FIA inferior al 2% [32,33]. La

[29] J.M. Reijn, H. Poppe, Anal. Chem. 56 (1984) 943.

[30] A. Tijssen, Anal. Chim. Acta 114 (1980) 71.

[31] T.J. Cardwell, D. Caridi, I.C. Hamilton, R.W. Cattrall, Anal. Chim. Acta 192 (1987) 129.

[32] J.M. López-Fernández, A. Rios, M. Valcárcel, Analyst 120 (1995) 2393.

[33] J. Marcos, A. Rios, M. Valcárcel, Fresenius J. Anal. Chem. 354 (1996) 140.

Introducción General

robustez de los métodos FIA depende de la complejidad del sistema dinámico (número de canales, existencia de módulos de separación, minicolumnas, etc.), pero, en general, este parámetro presenta valores que permiten la aplicación de los métodos FIA a muestras naturales cuyas características varían ampliamente [32,33,28].

El *bajo precio* de un sistema FIA ha conllevado aspectos positivos y negativos para la técnica. Las bajas presiones de trabajo hacen innecesario el uso de unidades (bombas, válvulas, etc.) de alta presión, lo que reduce enormemente el precio de adquisición de un equipo de este tipo, permitiendo además cambiar la configuración del equipo según las necesidades de análisis sin que los cambios supongan desembolsos apreciables. El aspecto negativo, que ha restringido enormemente el desarrollo de equipos comerciales, es la falta de interés de las industrias del ramo en la comercialización de equipos poco sofisticados, en los que no se justifica un valor añadido que conduzca a un precio alto. Los equipos comerciales existentes en la actualidad están dotados de una sofisticación la mayoría de las veces inútil, con el fin de justificar un precio que permita a las industrias obtener el beneficio previsto.

1.1 Detección quimioluminiscente en sistemas en flujo

En los Capítulos 1 y 2 de esta Memoria, el FIA se ha empleado acoplado a un sistema de detección quimioluminiscente, por lo que se comentarán los aspectos más relevantes de este modo de detección.

La Quimioluminiscencia (CL) es un fenómeno basado en la producción de radiación electromagnética a través de una reacción química en la que se produce una especie intermedia en estado excitado, la cual puede emitir radiación directamente al regresar al estado fundamental (CL directa), o bien transferir su energía a un fluoróforo, el cual retornará al estado fundamental emitiendo radiación característica de su naturaleza (CL sensibilizada). La intensidad de la radiación emitida depende de la

concentración de cualquiera de las especies implicadas en estas reacciones (oxidantes, catalizadores, precursores quimioluminiscentes, fluoróforos, etc.). En este sentido se pone de manifiesto la versatilidad de la técnica con finalidad analítica ya que pueden ser detectadas y/o cuantificadas cualquiera de las sustancias que participan directa o indirectamente en estas reacciones [34,35].

La principal ventaja de esta técnica luminiscente reside fundamentalmente en la simplicidad de la instrumentación requerida (básicamente tubos fotomultiplicadores, PMT, que posean suficiente sensibilidad en la región espectral de interés) y en la sensibilidad, ya que se consiguen límites de detección del orden de los femtomoles, siendo de especial interés en el análisis a niveles traza y ultratrazas de una gran variedad de sustancias biológicas. En la última década esta ventaja ha favorecido la incorporación de reacciones quimioluminiscentes como sistema de detección *online* en sistemas continuos de análisis [36,37] tales como FIA [38], o en técnicas separativas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [39,40], la Electroforesis Capilar (CE) [40,41,42] y la Cromatografía de Gases (GC) [43], combinando la eficacia separativa

[34] T.A. Nieman, en "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", F. Settle (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 541.

[35] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Eds.). Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, New York (2001).

[36] W.R.G. Baeyens, S.G. Schulman, A.C. Calokerinos, Y. Zhao, A.M. García-Campaña, K. Nakashima, D. De Keukeleire, J. Pharm. Biomed. Chrom. 17 (1998) 941.

[37] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, G. Van Der Weken, E. Smet, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 166.

[38] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Worsfold, Luminescence 16 (2001) 1.

[39] N. Kuroda, M. Kai, K. Nakashima, en "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 2001, Capítulo 15.

[40] M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, J. Chromatog. A, 950 (2002) 1.

[41] A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, W.R.G. Baeyens, F. Alés Barrero, J. Chromatog. B 793 (2003) 49.

[42] X. Huang, J. Ren, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 155.

[43] Y. Xinwei, J. Chromatog. A 976 (2002) 3.

Introducción General

con la elevada sensibilidad de la detección. Este hecho ha permitido la separación y determinación de numerosas especies (iones metálicos, aniones inorgánicos, enzimas, nucleótidos, ácidos y aminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, esteroides, lípidos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas y compuestos de interés farmacéutico y toxicológico) implicando la participación de estos analitos en las anteriores reacciones quimioluminiscentes como oxidante, cofactor, catalizador o fluoróforo [35]. Algunos artículos de revisión recientes recogen los aspectos generales de la detección quimioluminiscente y las tendencias actuales [44,45,46,47], así como su aplicación al análisis orgánico [48], de plaguicidas [49] o en el ámbito del análisis farmacéutico y biomédico [50,51,52].

Entre las reacciones quimioluminiscentes en fase líquida cabe destacar las siguientes [53]:

(i) *Quimioluminiscencia directa*: Incluye varios tipos de reacciones, como son:

- Reacciones de oxidación que utilizan como precursor quimioluminiscente el luminol (5-aminofthalhidracida) o sus derivados, como el N-(4-aminobutil)-N-etilisoluminol (ABEI), en medio básico, catalizada por enzimas que contienen grupos hemo o iones metálicos.

[44] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Analisis* 28 (2000) 686.

[45] A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Guardigli, *Trends Biotech.* 22 (2004) 295.

[46] Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 37.

[47] A.M. García-Campaña, F.J. Lara, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 165.

[48] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, J.M. Bosque-Sendra, L. Gámiz Gracia, *Current Organic Chemistry* 6 (2002) 2001.

[49] L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, A. González Casado, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 927.

[50] F. Li, C. Zhang, X. Guo, W. Feng, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 96.

[51] L.J. Kricka, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 279.

[52] A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 826.

[53] K. Nakashima, K. Imai, en "Molecular Luminescence Spectrometry", Parte 3, S.G. Schulman (Ed.), Wiley, New York, 1993, pp. 1.

- Reacciones de oxidación que utilizan como precursores quimioluminiscentes ésteres de acridinio en medio básico, fundamentalmente la lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio).
- Reacciones de oxidación directa, con oxidantes usuales, en medios ácidos o básicos, que generan como producto de la oxidación un derivado excitado que emite radiación luminosa.

(ii) *Quimioluminiscencia sensibilizada*: La más representativa es la que implica la oxidación de peroxioxalatos (PO), fundamentalmente el bis (2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO), bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadeciloxicarbonil)fenil] oxalato (TDPO) y bis (2,4-dinitrofenil) oxalato (DNPO), mediante peróxido de hidrógeno y en presencia de un fluoróforo responsable de la emisión de luz. Esta es la reacción CL empleada en la presente Memoria, y uno de los sistemas quimioluminiscentes no biológicos más frecuentemente utilizados, por lo que se explicará con mayor detalle.

La reacción de los POs supone la oxidación mediante peróxido de hidrógeno de un éster aril oxalato en presencia de un fluoróforo. Parece seguir un mecanismo denominado “luminiscencia de intercambio electrónico iniciada químicamente” (CIEEL, *chemically initiated electron exchange luminescence mechanism*) [54], que implica la formación de un intermediario de alta energía, la 1,2-dioxietanodiona, que forma un complejo de transferencia de carga con un fluoróforo, donando un electrón al intermediario. Este electrón es posteriormente transferido al fluoróforo, que alcanza un estado excitado y al regresar al estado fundamental, produce una emisión característica propia de la naturaleza del fluoróforo (Figura 1). Recientemente la naturaleza del intermediario propuesto ha sido confirmada mediante espectroscopía NMR de ^{13}C [55].

La principal desventaja de este sistema reside en la insolubilidad de estos compuestos en agua y su inestabilidad por hidrólisis, por lo que se

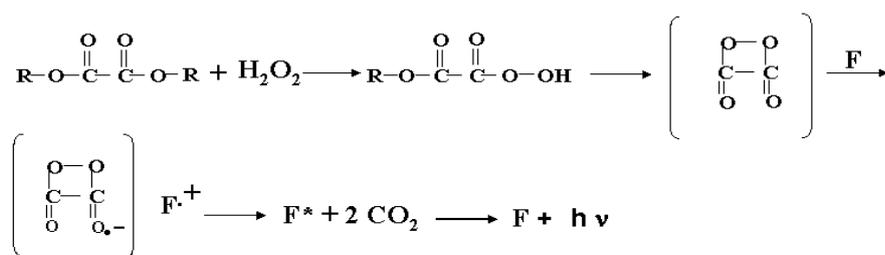
[54] G.B. Schuster, Acc. Chem. Res. 12 (1979) 366.

[55] R. Bos, N.W. Barnett, G.A. Dyson, K.F. Lim, R.A. Russell, S.P. Watson, Anal. Chim. Acta 502 (2004) 141.

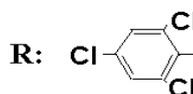
Introducción General

requiere el uso de disolventes orgánicos, tales como acetonitrilo (ACN), dioxano, terbutanol y acetato de etilo. Esta reacción se aplica a la determinación de un gran número de compuestos como peróxido de hidrógeno, sustancias altamente fluorescentes (como hidrocarburos aromáticos policíclicos) o compuestos que no siendo fluorescentes, pueden convertirse en fluorescentes por reacción química con algún agente derivatizante, como cloruro de dansilo, *orto*-ftalaldehido (OPA) o fluoescamina [56,57,58].

Figura 1. Reacción CL del sistema de peroxioxalatos, usando H₂O₂ como oxidante.



F: fluoróforo



TCPO (pH = 5 - 9)

El imidazol ha demostrado ser uno de los catalizadores más eficientes para la reacción de los POs, actuando no sólo como un simple catalizador, sino también reaccionando con el PO para formar un intermediario activo, posiblemente el 1,1'-oxalildiimidazol (ODI), siguiendo

[56] N. Kuroda, K. Nakashima, en "Modern Derivatization Methods for Separation Sciences", T. Toyooka, (Ed.), Wiley, Nueva York, 1999, Capítulo 4.

[57] M. Stigbrand, T. Jonsson, E. Pontén, K. Irgum, en "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 2001, Capítulo 7, pp. 141.

[58] M. Tsunoda, K. Imai, Anal Chim Acta 541 (2005) 13.

el mecanismo propuesto por Irgum y *col.* [57,59]. Así, se ha encontrado que el imidazol aumenta la intensidad de la señal luminiscente hasta 10 veces aproximadamente, en comparación con otros catalizadores básicos empleados [57,60,61]. La cinética y el mecanismo para esta reacción ha sido también estudiado en detalle [62,63], demostrándose que la reacción de los POs es altamente dependiente de la concentración de imidazol [64].

1.2 Consideraciones del acoplamiento FIA-CL

En cuanto al acoplamiento FIA-CL, hay que tener en cuenta algunos aspectos concretos para su aplicación. Así, la reacción CL se inicia en el momento en el que el analito y los reactivos se mezclan en el sistema, por lo que la intensidad de la emisión es dependiente del tiempo de duración de la reacción y de la formación del estado intermedio. Si el analito y los reactivos se mezclan en una celda y la radiación emitida se monitoriza en función del tiempo, se obtendrá una señal transitoria similar a la mostrada en la Figura 2 , donde la intensidad de la señal aumenta hasta alcanzar un máximo, disminuyendo a continuación hasta alcanzar la línea de base.

Aunque la mayoría de las reacciones CL siguen este mismo comportamiento, el tiempo requerido para alcanzar el máximo de intensidad de CL puede variar desde unos pocos segundos hasta varias horas, dependiendo de la reacción y de factores que puedan afectar a la misma, tales como: temperatura, disolventes, fuerza iónica, pH, y presencia de otras especies en el medio que, por lo tanto, deberán estar bajo control.

[59] M. Stigbrand, E. Ponten, K. Irgum, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1766.

[60] K. Imai, A. Nishitani, Y. Tsukamoto, W.H. Wang, S. Kanda, K. Hayakawa, M. Miyazaki. *Biomed. Chromatogr.* 4 (1990) 100.

[61] M. Emteborg, *Theory and Applications of Imidazole-Mediated Peroxyoxalate Chemiluminescence*, Ph.D Thesis, Department of Analytical Chemistry, Umeå University, Sweden, 1997.

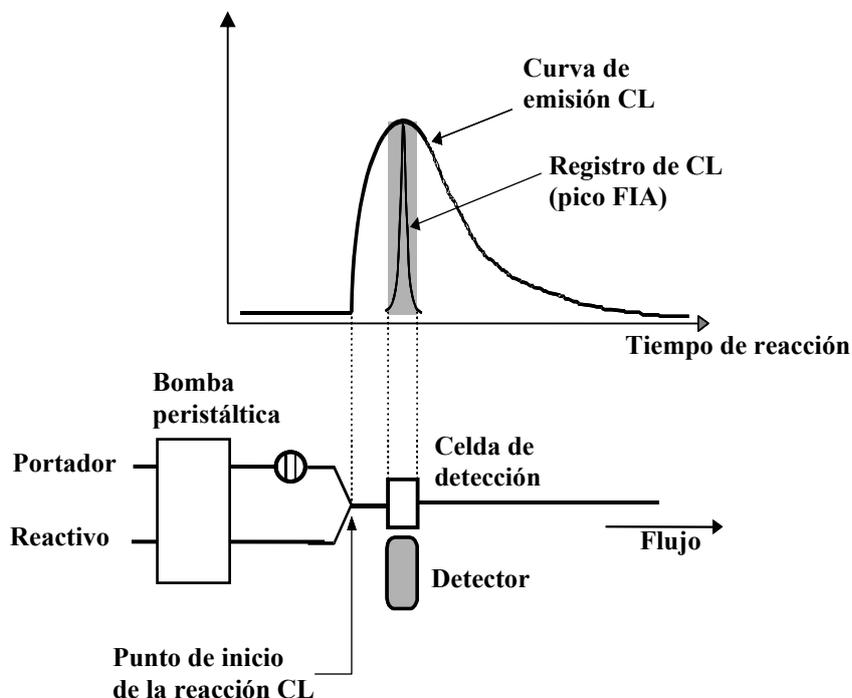
[62] A.G. Hadd, J.W. Birks, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 2657.

[63] M. Orlovic, R.L. Schowen, R.L. Givens, F. Alvarez, B. Matuszewski, N. Parekn. *J. Org. Chem.* 54 (1989) 3606.

[64] N. Hanaoka, R.S. Givens, R.L. Schowen, T. Kuwana, *Anal Chem.* 60 (1988) 2193.

Introducción General

Figura 2. Registro de la señal transitoria CL en un sistema FIA-CL.



En cuanto a los aspectos prácticos que afectan el acoplamiento FIA-CL, hay que tener en cuenta los siguientes [65]:

(i) *Mezcla de los reactivos.* La región del detector debe estar totalmente aislada de luz ambiental, ya que ésta afectaría a la medida de CL. En algunos casos los propios tubos de transporte de muestra y reactivos podrían actuar como una fibra óptica, conduciendo parte de la radiación hasta el detector. Por ello, y siempre que sea posible, la muestra se inyecta en un portador que después confluye con los reactivos CL para iniciar la reacción. Si la reacción es relativamente rápida, la mezcla debe producirse cerca de o

[65] A.C. Calokerinos, L.P. Palilis, en "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Ed.), Marcel Dekker, Nueva York, 2001, Capítulo 12.

en la propia celda de detección, con objeto de medir el máximo de intensidad CL.

(ii) *Tubos de bomba empleados.* Los tubos empleados en FIA usualmente son de PVC, teflón, silicona u otros materiales similares con diámetros internos comprendidos entre 0.1–2.5 mm. Un inconveniente que presentan estos tubos es que muchos de ellos no son adecuados para el transporte de muchos de los disolventes orgánicos requeridos en las reacciones CL, por lo que hay que buscar soluciones alternativas.

(iii) *Celda de detección.* Idealmente, y tal y como se ha comentado, la mezcla de reactivos y analito debe entrar en la celda de flujo en el momento en que se genere un máximo en la intensidad de CL, y salir de la misma cuando la intensidad de la señal comience a declinar. Por otro lado, la zona fotosensible de un detector de luz (PMT) es limitada (en torno a 2 cm²), por lo que el volumen y capacidad de la celda tendrán que adaptarse a esta zona, teniendo en cuenta las limitaciones de construcción de la misma, especialmente en el caso de celdas de vidrio. Las celdas generalmente tienen forma de espiral y se encuentran enfrentadas al detector, lo que favorece la mezcla de los reactivos justo enfrente del PMT.

(iv) *Caudales.* Las limitaciones asociadas al volumen y características de la celda pueden solventarse mediante un control exhaustivo de los caudales empleados en el sistema. Estos caudales controlan el tiempo de residencia de la disolución CL en el sistema y en la celda de detección, y pueden ser controlados por el operador. Así, los caudales serán directamente proporcionales a la velocidad de la reacción: cuanto mayor sea la velocidad de la misma, mayores deben ser los caudales, aunque también aumentará el consumo de los reactivos. Los caudales también afectan a la forma y altura de los picos obtenidos, así como a la frecuencia de las medidas, siendo los más comunes los comprendidos entre 0.5-5.0 ml min⁻¹.

Introducción General

(v) *Volumen de analito inyectado.* Al aumentar el volumen de inyección de muestra o de disolución de patrón, la intensidad de la señal aumentará proporcionalmente. Sin embargo, valores elevados de este volumen provocarán que el portador y los reactivos no difundan bien en el bolo de muestra, obteniéndose como consecuencia picos dobles que no son adecuados para una determinación analítica. Los valores normalmente empleados están comprendidos entre 25-250 μl de muestra o patrón.

En cuanto a la optimización del sistema FIA-CL, el objetivo es ajustar las condiciones experimentales de tal forma que se consiga hacer llegar al detector el máximo de radiación posible cuando la disolución emisora de CL atraviesa la celda de detección. Sin embargo, el efecto de las variables experimentales sobre la intensidad CL no puede ser predicha con exactitud, por lo que deberá optimizarse de forma experimental controlando fundamentalmente los caudales de los diferentes reactivos y la distancia entre el punto de mezcla del analito con los reactivos y el detector. Adicionalmente, se deberá llevar a cabo un estudio exhaustivo del efecto de las concentraciones de cada uno de los reactivos empleados, ya que éstas afectarán también a la sensibilidad del método.

2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

La cromatografía en columna fue desarrollada por el botánico ruso M.S. Tswett durante sus experimentos para la separación de pigmentos de plantas, publicando la primera descripción del método en 1903, y un trabajo más detallado, tanto de la técnica como de las aplicaciones, en 1906. Durante casi 20 años, sin embargo, la cromatografía no fue apenas objeto de interés y tan solo existen algunos artículos hacia 1915. Es al inicio de la década de los 30 cuando renace y no deja de desarrollarse de modo continuo.

La cromatografía líquida, al haber sido la primera técnica cromatográfica descrita, se benefició tanto de los desarrollos teóricos como de los avances instrumentales. A partir de la década de los 70 nace la HPLC que ha jugado desde entonces un papel fundamental en los laboratorios tanto analíticos como de química orgánica y bioquímica. De hecho, esta técnica ha desempeñado una función excepcional en los desarrollos científicos del siglo XX, la evolución de la química de los productos naturales, de la síntesis orgánica y de la bioquímica, que no hubieran podido producirse sin su concurso [66].

En cuanto a la instrumentación requerida, las partes básicas de un sistema HPLC son:

1) *Bomba de alta presión impulsora de disolvente*. La bomba es el sistema encargado de impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria

[66] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, “Técnicas de Separación en Química Analítica”, Editorial Síntesis, Madrid, 2002, Capítulo 14.

Introducción General

aplicando alta presión. Absorbe el disolvente de la botella por una tubería de teflón de varios mm de diámetro y lo desplaza presurizado por todo el sistema a través de un tubo capilar de acero o peek de entre 0.1 y 0.25 mm de diámetro. Normalmente se dispone de dos bombas (cada una de las cuales puede tener más de una línea) para poder hacer cambios en la composición de la fase móvil. Los equipos modernos constan de un sistema de estabilización de presión unido a la bomba formando un solo módulo. La presión necesaria aumenta al disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Dado que la resolución de la columna aumenta al disminuir el tamaño de partícula, la tendencia es a empaquetar columnas de un máximo de 5 μm de tamaño de partícula, lo cual obliga a utilizar sistemas de impulsión capaces de aplicar presiones de varias atmósferas. En cromatografía analítica el flujo normal de trabajo se sitúa entre 0.5 y 1.5 ml min^{-1} .

Existen dos tipos de bomba, la bomba de desplazamiento positivo (de jeringa) y la bomba de pistón con movimiento de vaivén. La bomba de pistón con movimiento de vaivén puede mantener el flujo por tiempo indefinido; por el contrario las bombas de desplazamiento positivo deben ser rellenadas cada vez que se agota el volumen de la jeringa.

2) *Sistema de inyección de muestra.* El inyector es el dispositivo encargado de introducir la muestra en la corriente de fase móvil que fluye desde la bomba hacia la columna. El dispositivo ha de ser capaz de inyectar la muestra en el sistema sin interrupción del flujo y sin alterar significativamente la presión. Actualmente existen en el mercado inyectores manuales y automáticos. El inyector automático puede además disponer de una bandeja de muestras donde se almacenan las muestras hasta el momento de su análisis.

3) *Columna.* Las columnas analíticas de HPLC son cilindros de acero de entre 10 y 25 cm de longitud y 2-5 mm de diámetro interno. La fase

estacionaria se halla en el interior de los cilindros, dividida en partículas de tamaños que oscilan entre 2 y 10 μm . Estas dimensiones se consideran el mejor compromiso entre capacidad, consumo de fase móvil, velocidad de elución y resolución.

Las columnas suelen tener incorporado un filtro a la entrada. Su finalidad es proteger la fase estacionaria de algún tipo de partícula que pueda ser introducido en el sistema. Las muestras biológicas son las principales responsables de la introducción de partículas en las columnas (fibras, agregados proteicos, etc.). A la salida de la columna hay otro filtro para evitar que pequeñas partículas de fase estacionaria puedan ser arrastradas por la fase móvil e introducidas en el detector. Esto es posible si la fase móvil es especialmente agresiva con la fase sólida (por ejemplo, pH básico que disuelve el gel de sílice).

A lo largo de todo el circuito se suelen colocar varios filtros para evitar que se introduzcan en la columna partículas que produzcan variaciones de presión, alteren el análisis y su reproducibilidad y dañen la columna.

4) *Sistema de detección.* A la salida de la columna se encuentra el detector. Los detectores actuales tienen un amplio rango dinámico que, normalmente, permite trabajar en las escalas analítica y preparativa con el mismo aparato. Los detectores actuales tienen sensibilidades que permiten la detección de ng de material y admiten rápidamente el cambio de una fase móvil a otra. Las características exigibles a un detector de HPLC son: baja deriva, bajo ruido, alta sensibilidad, respuesta rápida, amplio intervalo dinámico lineal, bajo volumen muerto, insensibilidad a los cambios de presión, flujo, temperatura y composición del disolvente, sencillez de manejo, y que sea no destructivo.

5) *Sistema de registro y control del equipo.* En los equipos modernos todos estos componentes están comunicados entre sí y comandados desde un

Introducción General

ordenador, el cual controla y sincroniza el funcionamiento de todos los módulos con una aplicación informática específica. El ordenador encargado del control registra y almacena de forma digital toda la información que le llega al detector. Desde principios de la década de los noventa prácticamente todos los equipos de HPLC están totalmente controlados por ordenador. En el caso de disponer de inyector automático con bandeja de muestras el sistema puede estar trabajando de manera autónoma e independiente hasta finalizar todos los análisis programados.

2.1 Consideraciones del acoplamiento HPLC-CL

En el Capítulo 3 de esta Memoria se ha empleado el acoplamiento HPLC-CL, empleando la reacción de los POs, comentada en el apartado anterior. En este apartado se comentarán algunos aspectos a considerar en dicho acoplamiento.

La selectividad es una propiedad deseable en los detectores de HPLC. Usualmente se considera que a mayor selectividad menor ruido y mayor sensibilidad. Los detectores de absorción de luz UV/Vis (los más empleados en HPLC) son poco selectivos, ya que la mayoría de las sustancias absorben luz UV. Los detectores de fluorescencia y electroquímicos son más selectivos que los de absorción UV/Vis, ya que son pocas las sustancias que emiten fluorescencia o poseen un potencial redox significativo. En este contexto, la alta selectividad de la detección CL es de gran utilidad cuando se requiere determinar cantidades traza de compuestos en matrices complejas. El acoplamiento HPLC-CL comenzó a desarrollarse en la década de los 80, proporcionando bajos límites de detección, amplios rangos lineales e instrumentación relativamente sencilla. Este acoplamiento generalmente se realiza en modo post-columna, en el que los analitos eluidos se unen a los reactivos antes del detector. Por lo tanto, se requieren reacciones CL de alta eficiencia.

Aunque la CL permite una detección sensible de los analitos, hay que evitar emisiones CL no deseadas debidas a impurezas en los disolventes y reactivos, que pueden interferir en la detección. Comparada con la detección fluorescente, la detección CL es generalmente más sensible, pero requiere bombas adicionales para la incorporación de los reactivos CL.

A pesar de la variedad de reacciones CL descritas en bibliografía, fundamentalmente se han aplicado en HPLC la reacción de oxidación del luminol y la de los POs, siendo ésta una de las más eficaces y versátiles acoplada con HPLC, empleada casi exclusivamente en modo post-columna [58,67]. Así, como ejemplo, se encuentran aplicaciones recientes en HPLC del sistema luminol para el análisis de peróxidos orgánicos [68], corticosteroides en riñón y orina [69,70], trans-reverastrol en vinos [71], o aplicaciones del sistema de los POs en alcaloides [72], peróxidos orgánicos [73], catecolaminas [74], bisfenol A [75] o quinonas [76].

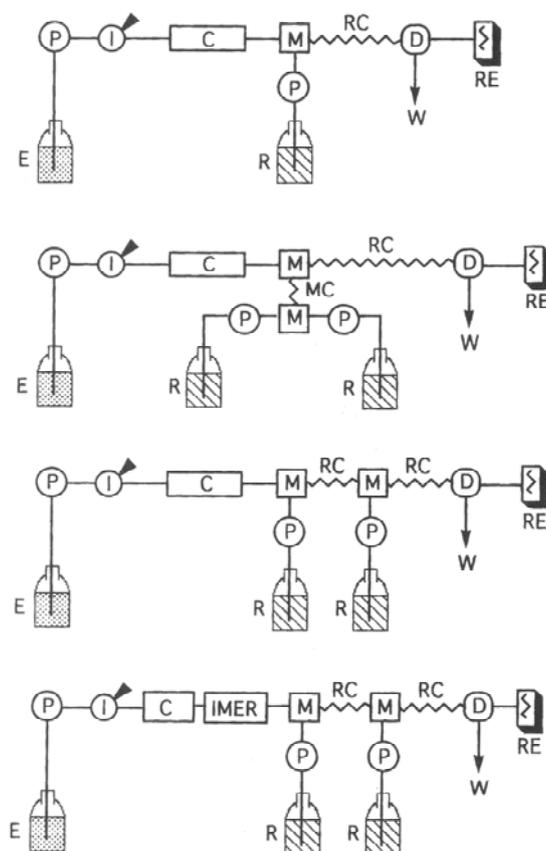
En un reciente artículo de revisión recogido en el anexo de esta Memoria se recogen las aplicaciones del acoplamiento HPLC-CL al análisis de plaguicidas [49], y en el apartado de la Memoria relativo al análisis de carbamatos se comentan en particular las aplicaciones en este ámbito del sistema de POs.

-
- [67] G. Orosz, R.S. Givens, R.L. Schowen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 26 (1996) 1.
[68] S. Baj, A. Chrobok, M. Cieslik, T. Krawczyk, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 327.
[69] Y. Iglesias, C. Fente, C. Franco, A. Cepeda, S. Mayo, S. B. Vazquez, *Analyst* 125 (2000) 2071.
[70] B. Vazquez, X. Feas, M. Lolo, C.A. Fente, C. Franco, A. Cepeda, *Luminescence* 20 (2005) 197.
[71] J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, *Food Chem.* 88 (2004) 613.
[72] J. Cepas, M. Silva, D. Perez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 73.
[73] M. Wada, K. Inoue, A. Ihara, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 189.
[74] M. Tsunoda, *Chromatography* 26 (2005) 95.
[75] Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 49.
[76] S. Ahmed, S. Fujii, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 76.

Introducción General

En cuanto a los diferentes diseños propuestos para el acoplamiento HPLC-CL, algunos de los más comunes son los que se muestran en la Figura 3.

Figura 3. Diversas configuraciones para el acoplamiento HPLC-CL. P: bomba; I: inyector; C: columna; M: confluencia para mezcla; D: detector; RC: reactor; MC: tubo de mezcla; RE: registro; E: eluyente; R: reactivo; W: desecho; IMER: reactor enzimático inmovilizado [39].



En estos sistemas, la resolución de la separación y la sensibilidad de la detección CL son factores críticos. Con objeto de mejorar la eficiencia de la separación, se han propuesto las siguientes aproximaciones en diversas partes del sistema [39]:

- *Sistemas de mezcla.* En las reacciones CL post-columna se requiere una mezcla rápida y eficaz de los reactivos con los eluatos de la columna con objeto de obtener una línea de base estable y alturas de pico reproducibles. En general, se emplean uniones en “T” u otras conexiones para la mezcla de los reactivos post-columna. Así, se han propuesto varios sistemas de mezcla para mejorar la sensibilidad de la reacción CL [77,78,79,80].

- *Tubos de reacción.* En general, las reacciones CL empleadas en HPLC requieren una rápida reacción y recoger la señal cuando se ha alcanzado el máximo de intensidad CL, aunque hay que tener en cuenta que se puede registrar una señal de fondo simultáneamente, por lo que hay que conseguir la máxima relación S/N posible. Por ello, el ajuste de la longitud y diámetro interno del tubo de reacción situado entre el punto de mezcla y el detector es crítico para optimizar el tiempo de la reacción CL.

- *Celdas de flujo y caudales.* Las celdas de detección generalmente empleadas para la detección CL en HPLC tienen forma de espiral, están construidas con Teflón, o en forma de surco en una superficie de acero cubierta de cuarzo y se sitúan enfrente del PMT. Los volúmenes de las celdas empleadas suelen ser de entre 60-120 μ l. Hay que tener en cuenta que las uniones de la celda de detección pueden no ser adecuadas para las altas presiones del sistema HPLC, por lo que hay que prevenir caudales excesivamente altos. Además, la precipitación de sales en la fase móvil o en los reactivos post-columna puede incrementar la presión del sistema o incluso causar atascos en el mismo. Por todo lo anterior, los caudales de fase móvil y reactivos post-columna deben optimizarse cuidadosamente para

[77] R.W. Frei, L. Michel, W. Santi, J. Chromatogr. 126 (1976) 665.

[78] S. Katz, W.W. Pitt Jr., G. Jones Jr., Clin. Chem. 19 (1973) 817.

[79] S. Kobayashi, K. Imai, Anal. Chem. 52 (1980) 1548.

[80] M. Sugiura, S. Kanda, K. Imai, Biomed Chromatogr. 7 (1993) 149.

Introducción General

prevenir daños de la celda y conseguir una adecuada mezcla y una alta eficacia de la reacción.

- *Bombas*. Para obtener un cromatograma estable y reproducible se requieren bombas capaces de dispensar caudales sin pulsos tanto para la fase móvil como para los reactivos CL. Con este propósito, normalmente se emplean bombas de pistón o de jeringa con bajos pulsos o de alta presión que encarecen la instrumentación requerida.

En cuanto a la optimización de las condiciones de la determinación, deben estudiarse varios factores que afectan a la misma, tales como los que se comentan a continuación:

- La elección de los *reactivos CL* tiene una seria influencia para la correcta detección de los analitos. Algunas de las consideraciones que deben tenerse en cuenta en la elección de estos reactivos son: estabilidad, facilidad de preparación, y eficacia de la reacción CL. Aunque en los últimos años se han desarrollado algunos reactivos CL nuevos (como adamantil dioxetano), sólo unos pocos han podido acoplarse a HPLC. En cuanto a la reacción de los POs, los esfuerzos se han focalizado en aumentar su solubilidad en las fases móviles usualmente empleadas en HPLC. Asimismo, se han desarrollado diversos fluoróforos para aumentar la eficiencia cuántica de la reacción PO y que han sido aplicados a la determinación de diversos analitos [81].

- La *temperatura* es otro factor a considerar, ya que fluctuaciones de la misma en el punto de mezcla de los reactivos, tubo de reacción y celda de detección pueden afectar a la velocidad y la emisión de la reacción CL,

[81] K. Imai, Chromatogr. Sci 48 (1990) 359.

afectando por tanto a la sensibilidad y la reproducibilidad, por lo que es preferible trabajar a temperatura constante [82].

- La naturaleza de los *disolventes orgánicos* afecta a la eficacia de la reacción PO. Disolventes orgánicos como el ACN o el metanol (MeOH) comúnmente empleados en HPLC en fase inversa son adecuados para su empleo en la reacción PO. Generalmente, un alto contenido de estos disolventes en la fase móvil empleada proporciona mayor intensidad de CL.

- El *pH* y las *especies iónicas* presentes pueden afectar la reacción CL. Así, en el sistema de los POs, el tampón fosfato puede disminuir la intensidad de la CL, mientras que el borato y el imidazol tienden a incrementar la señal CL. La fuerza iónica también puede afectar a la reacción CL, por lo que la elección de los tampones empleados, su concentración y pH es de gran importancia en estos sistemas.

- En los sistemas que emplean la reacción PO, la *naturaleza del oxalato* afecta significativamente a la reacción CL. Los oxalatos más comúnmente empleados en los acoplamientos HPLC-CL son el TCPO, TDPO y DNPO.

Como comentario final acerca de los acoplamientos FIA-CL y HPLC-CL, y comparando ambos, es obvio que el FIA presenta la desventaja de que no puede separar los diversos componentes de la muestra, y no se puede analizar más de un analito, a no ser que las cinéticas de reacción sean muy diferentes, o se coloque una columna de separación antes de la celda de detección. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la finalidad de cada técnica es diferente. Así, las técnicas separativas tienen el propósito de determinar varios analitos al mismo tiempo en una misma muestra, mientras que el FIA está más orientado a realizar determinaciones rápidas y baratas de un sólo analito en un gran número de muestras.

[82] N. Hanaoka, J. Chromatogr. 503 (1990) 155.

3 ELECTROFORESIS CAPILAR

La CE es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial de especies cargadas en presencia de un campo eléctrico. El proceso de separación consiste básicamente en introducir los extremos de un capilar (generalmente entre 25 y 100 μm de i.d.) lleno de un medio electroforético que suele ser una disolución tampón, en unos viales de entrada y salida que se llenan de la misma disolución, donde se encuentran sumergidos el electrodo positivo y el negativo (ánodo y cátodo, respectivamente en polaridad normal, al revés en polaridad inversa) que, a su vez, están conectados a un generador de alto voltaje. En el vial de muestra, se coloca el objeto del análisis. La separación se produce al migrar los solutos a través del capilar, después de la aplicación de un determinado voltaje. El soluto que migra pasa a través del detector y la señal correspondiente se registra en forma de electroferograma. La alta resistencia eléctrica del capilar permite aplicar voltajes altos (correspondientes a campos de entre 100 y 500 V/cm) con una mínima generación de calor, lo que reduce el tiempo de análisis y aumenta la eficacia. El calor generado es disipado con rapidez debido a la gran relación superficie/volumen del capilar.

El desarrollo de métodos basados en CE para separar diversos analitos en muestras de distinta naturaleza ha aumentado muy rápidamente en la última década [83,84,85,86] y la técnica ha demostrado su potencialidad en aplicaciones muy diferentes. Algunos artículos de revisión

[83] S.F.Y. Li, "Capillary Electrophoresis: Principles, and Practice and Applications", Elsevier, Amsterdam, 1993.

[84] P. Camilleri, "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice", CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[85] J.P. Landers, "Handbook of Capillary Electrophoresis", CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.

[86] D.L. Baker, "Capillary Electrophoresis", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1995.

recogen su aplicación reciente en el ámbito del análisis de fármacos [87], de biopolímeros [88], antibióticos en alimentos, muestras biológicas o medioambientales [89,90,91,92,93], plaguicidas [91,94,95,93], péptidos y proteínas [96], toxinas [93], compuestos de interés forense [97], etc.

De forma básica, y sin entrar en las diferentes metodologías posibles, se puede decir que la migración de las especies químicas dentro del capilar se rige por dos fenómenos, que tienen lugar simultáneamente: electromigración y electroósmosis [98].

La *electromigración* consiste en el movimiento neto de las especies que forman la muestra a través de la disolución tampón dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico, es decir, afecta de forma individual a cada uno de los analitos que se encuentran en dicho capilar y el resultado es la aparición de la llamada movilidad electroforética, directamente proporcional a la relación carga/tamaño de los analitos. El fenómeno de electromigración viene caracterizado por tres factores:

a) Velocidad electroforética (V_e), que es directamente proporcional al campo eléctrico (es decir, cuanto mayor sea el voltaje aplicado (V), mayor

-
- [87] L. Geiser, J.L. Vetheuy, *Electrophoresis* 28 (2007) 45.
[88] S. Hu, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2833.
[89] H.Y. Huang, Y.C. Shih, Y.C. Chen, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 317.
[90] M. Hernández, F. Borull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.
[91] E. Jiménez-Lozano, D. Roy, D. Barrón, J. Barbosa, *Electrophoresis* 25 (2004) 65.
[92] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 26 (2005) 1550.
[93] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 793.
[94] Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 133.
[95] J. Hernández-Borges, S. Frías-García, A. Cifuentes, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 947.
[96] A.M. García-Campaña, H. Fabre, M. Taverna, *Electrophoresis* 28 (2007) 208.
[97] C. Cruces-Blanco, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Trends Anal. Chem.* (2007) en prensa.
[98] C. Cruces-Blanco, "Electroforesis Capilar", Ed. Universidad de Almería, 1998.

Introducción General

es la velocidad con la que se mueven las especies cargadas) e inversamente proporcional a la longitud total del capilar (L) [99,100,101]:

$$V_e = \frac{\mu_e \cdot V}{L}$$

b) Movilidad electroforética (μ_e), que depende de una serie de factores relacionados con el medio electroforético, como la viscosidad (η) y, sobre todo de la relación carga (q)/tamaño de los analitos presentes en la muestra.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

donde r = radio del analito

c) Tiempo de migración: es el tiempo que tarda un analito en moverse a través del capilar desde el punto de inyección hasta el detector y será tanto menor cuanto mayor sea el voltaje aplicado.

La *electroósmosis* es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida), dando como resultado un movimiento, tanto de las especies neutras como del conjunto de la disolución tampón, que se conoce con el nombre de movilidad electroosmótica. Este fenómeno da lugar a un perfil plano del flujo, eliminándose así una de las causas del ensanchamiento del flujo cuando éste se genera externamente, como sucede en HPLC, donde el perfil del flujo es parabólico, constituyendo una causa de ensanchamiento de las bandas y pérdida de eficacia. Cuando el ensanchamiento de bandas es controlado exclusivamente por difusión, se obtienen picos que generalmente superan los 105 platos teóricos.

[99] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298.

[100] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, J. High Resolut. Chromatogr. Comm. 4 (1981) 230.

[101] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, Science 222 (1983) 266.

De la existencia del llamado flujo electroosmótico (EOF) se derivan una velocidad electroosmótica y una movilidad electroosmótica, de expresiones similares a las obtenidas por electromigración.

Al existir los dos fenómenos de migración, la velocidad, la movilidad y el tiempo de migración reales de cada especie van a ser la suma de las dos contribuciones. En capilares de sílice huecos, el movimiento de los analitos está influenciado por la naturaleza del medio electroforético. Debido a que para que tenga lugar la separación en CE se aplica un campo eléctrico a la disolución que contiene la muestra, el medio electroforético tiene que ser tal que conduzca bien la corriente eléctrica. El más empleado es una disolución tampón, generalmente de tipo inorgánico, puesto que presentan una baja conductividad y el efecto térmico se minimiza, pudiendo trabajar con voltajes elevados y conseguir adecuadas resoluciones.

El tipo de tampón elegido es de vital importancia ya que determina el comportamiento de los analitos, que se afectan enormemente por propiedades tales como el pH, fuerza iónica y composición del mismo.

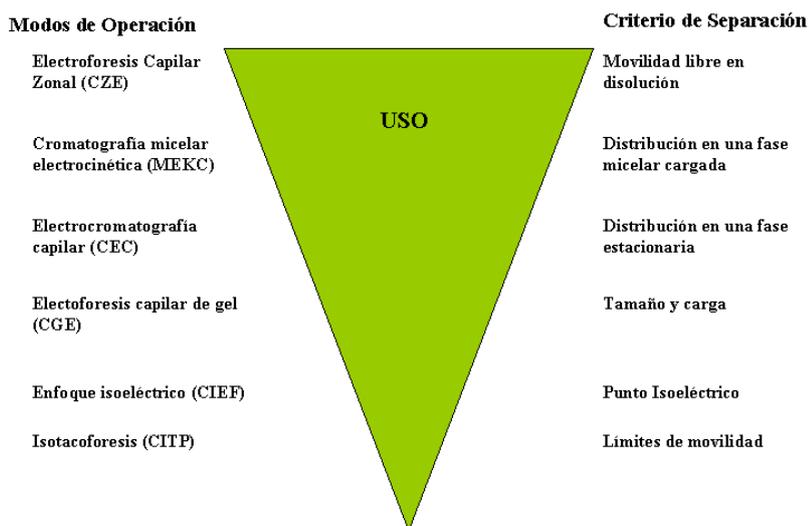
Junto con la naturaleza del medio electroforético, otra variable que va a afectar en gran medida a la magnitud y dirección del EOF y, por tanto, a la calidad de las separaciones, es la composición del capilar. El capilar es la parte más importante de un equipo de CE ya que, gracias a su empleo, se pueden aplicar voltajes elevados, consiguiendo una buena disipación del calor generado y, por tanto, minimizándose el calentamiento o el efecto Joule.

Una de las características más destacables de la CE es su gran versatilidad para afrontar una gran variedad de análisis. Esta versatilidad se fundamenta en gran parte en los diversos modos de operación que la técnica ofrece. Estos modos son en su mayoría fácilmente accesibles cambiando la composición del tampón de separación o algunas condiciones de separación. Los modos de operación más comunes de la técnica y su criterio de

Introducción General

separación se muestran en la Figura 4, ordenados según su aplicación en Química Analítica.

Figura 4. Modos de operación en CE.



La modalidad más simple en CE se conoce con el nombre de *electroforesis capilar en zona (CZE)* y es la que ha sido la empleada en esta Memoria. El mecanismo de separación en CZE se basa en las diferencias en la relación carga/tamaño de las distintas especies que componen la muestra, aunque sólo es útil para separar especies cargadas. Esas diferencias implican distintas velocidades electroforéticas y, por tanto, distintas velocidades de migración de las especies iónicas en el medio electroforético que se encuentra en el capilar de separación.

El EOF es el responsable del movimiento de los solutos a través del capilar desde el ánodo hasta el cátodo y su valor a pH por encima de 7 es superior al flujo electroforético independientemente del tipo de ión y de la relación carga/tamaño que presente. El flujo electroforético establece las diferencias de movilidad, eluyendo primero los cationes (los dos flujos tienen el mismo sentido), luego todas las especies neutras juntas (sólo se

moverían con el flujo electrosmótico) y, por último, los aniones (puesto que el flujo electroforético tiene el sentido opuesto al EOF).

3.1 Componentes básicos de un sistema CE

Una de las principales ventajas de la CE es que necesita una instrumentación muy sencilla. En la Figura 5 se puede ver un esquema de los componentes básicos de un equipo de CE (a), así como un ejemplo de equipo comercial (b) y otro de equipo fabricado en nuestro laboratorio (c), en el que se pueden ver cada una de las partes. Normalmente los componentes básicos son [98]:

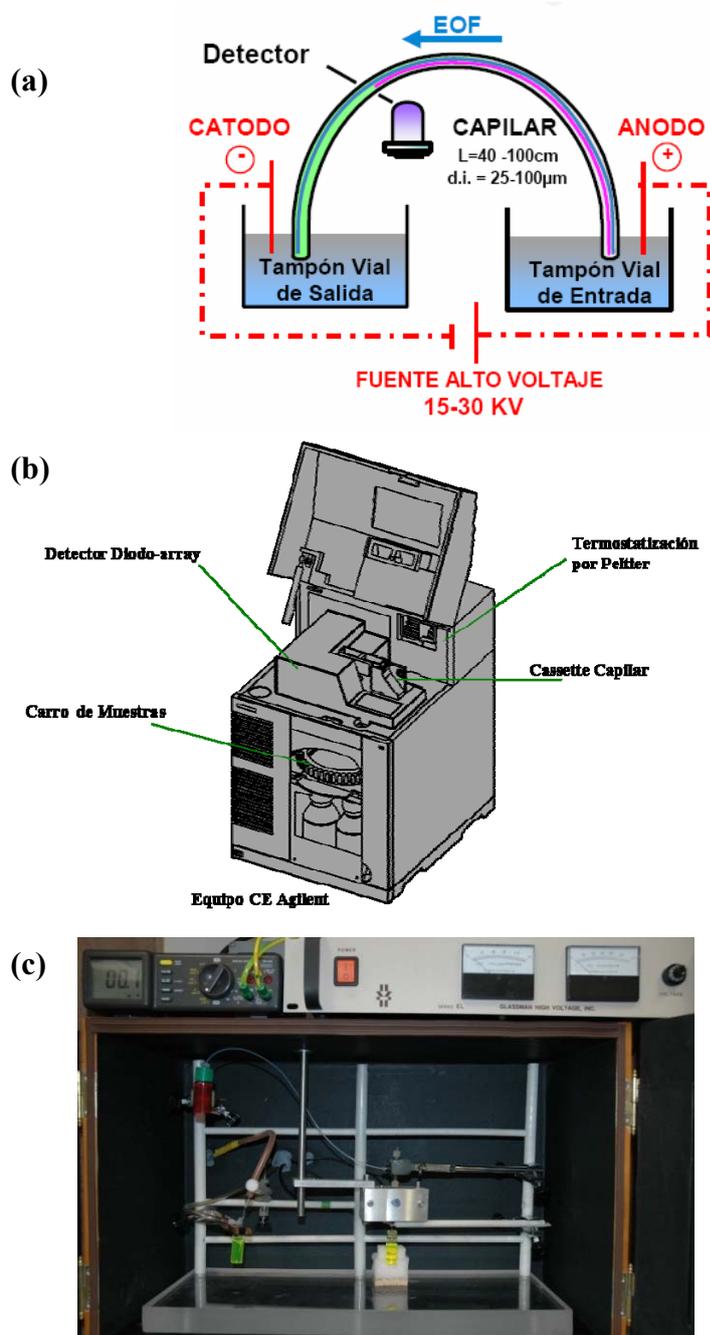
- Fuente de alto voltaje
- Electroodos
- Viales de entrada, de salida y de muestra
- Capilar
- Sistema de inyección de muestra
- Sistema de detección
- Sistema de registro

Este conjunto básico de componentes puede ser ampliado con otros, tales como: sistemas de termostatación de la muestra y del capilar, muestreadores automáticos, colectores de fracciones o diferente software, siendo éstos los que marcan las diferencias entre unos instrumentos y otros [102].

[102] R.P. Oda, T.C. Spelsberg, J.P. Landers, LC-GC 12 (1994) 50.

Introducción General

Figura 5. (a) Componentes básicos de un equipo de CE; (b) ejemplo de equipo comercial; (c) equipo fabricado en laboratorio.



A continuación se van a describir con más detalle algunos aspectos instrumentales característicos de la técnica.

3.1.1 Capilares

Idealmente, los capilares deben disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV/Vis, ya que facilitarán la detección *online*, flexibles, robustos y de precio económico. El principal problema en el uso de capilares en este tipo de separaciones radica en la fabricación de los mismos con diámetros tan pequeños empleando materiales que presenten buenas propiedades térmicas, químicas y físicas. Generalmente, estos materiales son el teflón, pirex o la sílice fundida, siendo este último el más empleado por presentar una buena transparencia a la luz UV y una alta conductividad térmica, aunque su inconveniente es su fragilidad, que queda subsanada mediante el recubrimiento con polímeros de poliimida, eliminando una pequeña sección del mismo para hacer viable la detección (ventana de detección).

Algunos capilares se derivatizan, funcionalizando las paredes internas con polímeros como el polivinilalcohol (PVA). Este recubrimiento reduce la adsorción de compuestos catiónicos. Además, se suprime el EOF, con lo que se mejora la reproducibilidad de los tiempos de migración. No obstante, estos capilares presentan la desventaja de una menor estabilidad frente al pH con lo que el intervalo de pH útil se reduce respecto a un capilar convencional.

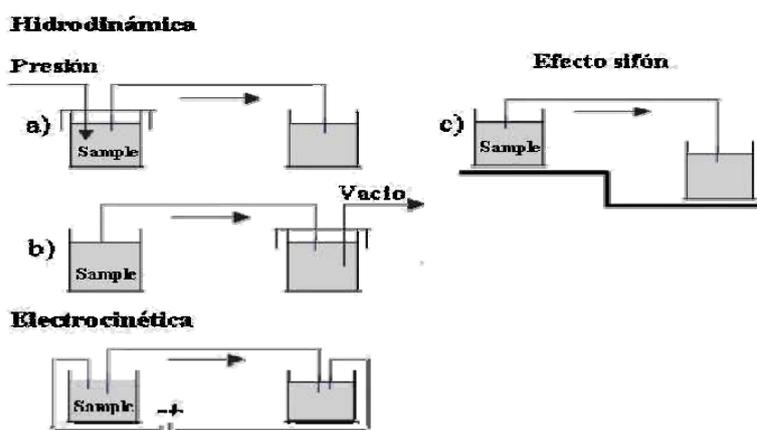
Además del recubrimiento, el diámetro interno, externo y la longitud total del capilar son otros parámetros a optimizar para conseguir una buena resolución. En general, el diámetro interno no debe ser muy grande para que se disipe bien el calor generado dentro del capilar, al igual que le ocurre al diámetro externo, siendo los más habituales los que presentan i.d. entre 10 y 100 μm y externos de 190-375 μm . En cuanto a la longitud total del capilar, ésta se encuentra relacionada con la resolución y el tiempo de análisis, y suele oscilar entre 40 y 100 cm.

Introducción General

3.1.2 Sistemas de inyección

Las cantidades de muestra inyectadas en CE son muy pequeñas (del orden de los nl), debido a las reducidas dimensiones del capilar. Las pequeñas cantidades inyectadas son una ventaja de la técnica cuando se dispone de poca muestra. Sin embargo, resulta un inconveniente en cuanto a la sensibilidad. Los pequeños volúmenes de muestras inyectados requieren un sistema de inyección diferente a los que se usan en los métodos cromatográficos basados principalmente en jeringas o bucles de inyección. Los dos métodos de inyección más habituales en CE son la inyección electrocinética y la hidrodinámica. Estos métodos de inyección y sus variantes han sido esquematizados en la Figura 6.

Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de inyección en CE.



- *Inyección hidrodinámica.* Es el modo de inyección más extensamente utilizado y se puede realizar por aplicación de una presión en el vial de entrada, realizando el vacío en el vial de salida o por efecto sifón, al elevar el vial de muestra respecto al vial de tampón situado en el extremo contrario al de inyección. Instrumentalmente, la aplicación de presión en el vial de entrada es la solución más sencilla, la que adoptan la mayoría de equipos y ha sido la empleada en esta Memoria. Este tipo de inyección presenta la

ventaja de que la cantidad de cada analito inyectada es independiente de la movilidad electroforética del mismo.

La presión y el tiempo que ésta se aplica (tiempo de inyección) son los dos parámetros que controla el analista para variar el volumen de inyección (vol) que puede ser calculado según la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$vol = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L}$$

El volumen inyectado es función de la presión aplicada (ΔP), el tiempo de inyección (t), la viscosidad de la disolución (η) y características del capilar como su longitud (L) o el diámetro interno (d). Valores de inyección próximos a 250 mbar s⁻¹ son habituales en CE. Con este sistema de inyección, la precisión del área de pico es del orden del 2% (medida como coeficiente de variación).

- *Inyección electrocinética*. En este modo de inyección el vial de muestra reemplaza al vial de entrada y a continuación se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, que suele ser de 3 a 5 veces inferior al utilizado en la separación, durante un tiempo determinado. Los diferentes solutos se introducen en el capilar por el efecto conjunto de su migración electroforética y del EOF, por lo que cada analito será inyectado en distinta cantidad en función de su movilidad electroforética.

3.1.3 Sistemas de detección

La detección es uno de los mayores retos de la técnica de CE, ya que el reducido diámetro interno de los capilares, la pequeña cantidad de muestra inyectada y el hecho de que la detección se realiza en el mismo capilar obliga al uso de detectores sensibles y de respuesta rápida. En la Tabla 1 se muestran algunas de las técnicas de detección utilizadas en CE, incluyendo algunas ventajas e inconvenientes.

Introducción General

Tabla 1. Sistemas de detección en CE.

Técnica	Comentarios
UV/Vis	<ul style="list-style-type: none">- Universal- Amplia información espectral con DAD
Fluorescencia	<ul style="list-style-type: none">- Muy sensible- Se requiere fluoróforo o derivatización
Fluorescencia inducida por láser	<ul style="list-style-type: none">- Altamente sensible- Longitudes de onda disponibles limitadas
Fosforescencia	<ul style="list-style-type: none">- Muy sensible- En disolución requiere la transferencia de energía triplete-triplete desde el analito a un aceptor (fosforescencia sensibilizada) o la presencia de medios micelares y átomo pesado- No disponible comercialmente
Quimioluminiscencia	<ul style="list-style-type: none">- Altamente sensible- Requiere reacción CL <i>online</i> compatible con las condiciones de separación en CE- No disponible comercialmente
Potenciometría	<ul style="list-style-type: none">- Se requiere un electrodo selectivo de iones- Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje- Sensible siempre que no haya iones interferentes
Amperometría	<ul style="list-style-type: none">- Altamente sensible y específico- Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje
Espectrometría de masas	<ul style="list-style-type: none">- Sensible. Proporciona información estructural

El detector UV/Vis con batería de diodos (DAD) como elemento

fotosensible es el detector más usado debido a su universalidad, bajo coste, rapidez de medida y la gran cantidad de información espectral que genera, aunque también presenta el inconveniente de una no muy elevada sensibilidad.

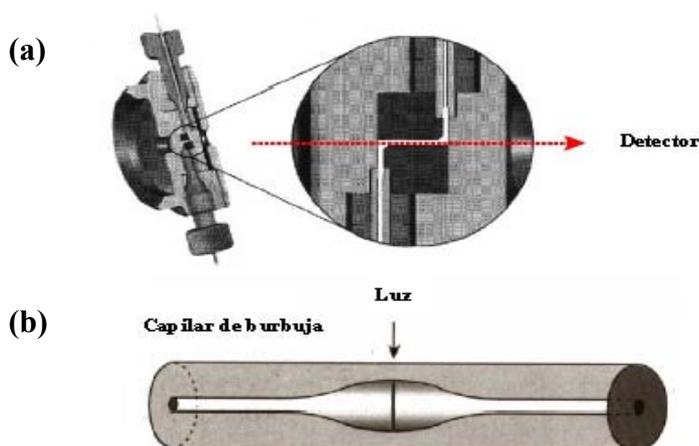
Un aspecto de la detección muy importante en el análisis cuantitativo es el hecho de que el área de pico en CE es función del tiempo de residencia del analito en el detector. Por tanto, es habitual relacionar la concentración del analito con el área corregida por el tiempo de migración. Con esto se consigue compensar las variaciones de área de pico que se producen debido a la irreproducibilidad en los tiempos de migración. A continuación se comentan los dos sistemas de detección empleados en esta Memoria: detección UV/Vis y espectrometría de masas.

- *Detección UV-Vis.* Este detector destaca por su universalidad, ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm en el cual trabajan la mayoría de detectores. Además, en el caso de CE este tipo de detectores también pueden ser aplicados a compuestos no absorbentes haciendo uso de una detección indirecta. La detección se realiza en el capilar, eliminando parte del recubrimiento de poliimida del mismo. La dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia del pequeño camino óptico que el capilar ofrece. Esto hace que el detector tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y para minimizar la luz dispersa que llega al monocromador. La utilización de un detector DAD en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas, como son: visualización del espectro UV/Vis en todo momento del análisis, obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, identificación de compuestos y determinación de la pureza de pico.

Introducción General

Existen algunos métodos que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico, que se muestran en la Figura 7, consistentes en el uso de iluminación axial en lugar de perpendicular, utilizando una celda de flujo de alta detección o el uso de capilares con camino óptico extendido (capilares de burbuja), en los que el diámetro interno está aumentado de 3 a 5 veces en el punto de detección, sin que esto implique un aumento en la difusión del analito.

Figura 7. Celda de flujo de alta detección (a) y capilar de burbuja (b).



- *Detección por Espectrometría de Masas.* La Espectrometría de Masas (MS) acoplada como sistema de detección a la CE constituye una poderosa alternativa en la que se combina la rapidez del análisis, la elevada resolución y el bajo consumo de muestra que presenta la CE, con la selectividad del análisis y la información estructural proporcionada por la MS. Esta combinación proporciona una segunda dimensión a la separación, ya que los analitos no sólo quedan separados por su relación carga/tamaño (como es el caso de la CZE) sino además en función de su relación masa/carga (m/z). A pesar de los avances y del incremento de aplicaciones que se han producido

en la última década, aún son escasas las aplicaciones de CE-MS en análisis cuantitativo [103,104,105,106,107].

Dada la importancia y complejidad de este acoplamiento, se comentará en detalle en un apartado posterior.

-
- [103] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3837.
[104] J. Ohnesorge, C. Sanger-van de Griend, H. Watzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 2360.
[105] J. Ohnesorge, C. Neusüß, H. Watzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 3973.
[106] P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann, *Electrophoresis* 26 (2005) 1209.
[107] C. Simó, A. Cifuentes, en “Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis”, M.L. Marina, A. Rios, M. Valcárcel (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, Capítulo 9.

Introducción General

3.2 Técnicas de preconcentración de la muestra *online* en CE

Además de aumentar el camino óptico, también se pueden emplear otros métodos para mejorar la sensibilidad y disminuir los límites de detección, tales como la preconcentración de la muestra en el mismo capilar, combinada con el análisis por CE, con objeto de aumentar la cantidad de analito que se introduce dentro del capilar de separación, consiguiéndose así una mejor sensibilidad. Se han publicado numerosas revisiones acerca de las distintas técnicas de apilamiento (“*stacking*”) para muestras [108,109,110,111,112,113,114,115]. Estas técnicas básicamente consisten en provocar el movimiento de los iones de la muestra a través de un límite de concentración que separa la región que contiene la muestra del resto del capilar, que contiene el tampón electroforético. Así, se produce la acumulación *online* de analitos diluidos a partir de una gran zona de muestra inyectada, en una zona mucho más estrecha que resulta con una mayor concentración de los analitos. El principio básico de la preconcentración aplicado al caso de aniones en una muestra se ilustra en la Figura 8: la región que contiene los iones de la muestra es una disolución de baja conductividad mientras que la zona que contiene el electrolito es una disolución de alta conductividad (Figura 8A). Si disoluciones de alta y baja conductividad se encuentran presentes en el interior del capilar bajo la aplicación de un voltaje, la zona de baja conductividad experimentará un mayor campo eléctrico comparado con la zona del electrolito tampón. Los iones de la muestra se moverán más rápido en la zona de baja conductividad que en la de alta conductividad. El cambio brusco en el movimiento de

[108] Z.K. Shihabi, J. Chromatog. A 902 (2000) 107.

[109] J. Quirino, S. Terabe, J. Chromatog. A 902 (2000) 119.

[110] T. Hirokawa, N. Ikuta, T. Yoshiyama, J. Chromatog. A 894 (2000) 3.

[111] M. Urbánek, L. Krivánková, P. Boček, Electrophoresis 24 (2003) 466.

[112] R.L. Chien, Electrophoresis 24 (2003) 486.

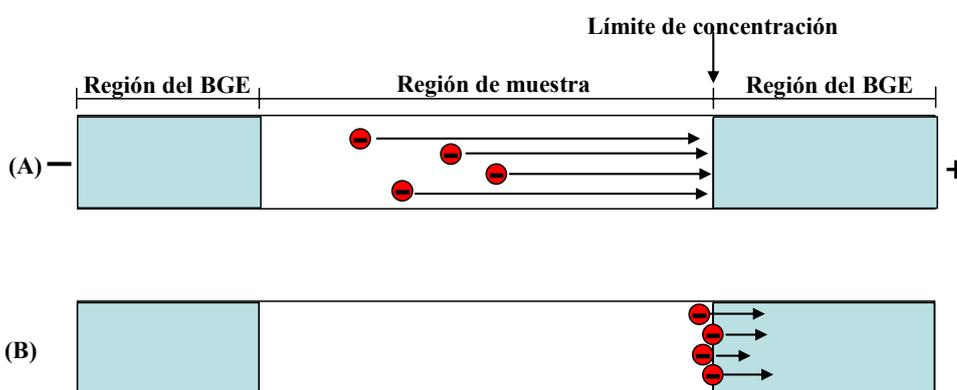
[113] B.M. Simonet, M. Valcárcel, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 605.

[114] G. Hempel, Electrophoresis 21 (2003) 691.

[115] Z. Malá, L. Krivánková, P. Gebauer, P. Bocek, Electrophoresis, 28 (2007) 243.

iones de la muestra a través del límite de concentración consigue un apilamiento de la muestra, proporcionando zonas dentro del capilar con mayores concentraciones de analito que la original (Figura 8B). En este caso se asume que el EOF es cero.

Figura 8. Modelo general de preconcentración *online* de analitos para aniones (BGE, *electrolito tampón*)



Estos métodos de preconcentración de muestra *online* pueden realizarse tanto usando el modo de inyección hidrodinámica (por gravedad o por presión), como electrocinética, siendo el primer modo el más utilizado. En este caso es posible distinguir entre:

- *Modo normal de apilamiento de muestra (normal stacking mode, NSM)*. Es el más simple de los procedimientos de preconcentración *online* y consiste en disolver la muestra en un disolvente de baja conductividad, inyectando posteriormente la disolución resultante hidrodinámicamente. La preconcentración comienza en la interfase entre la zona de baja conductividad y el electrolito tampón debido al cambio brusco en la velocidad electroforética. Con este modo es posible conseguir factores de concentración aproximadamente de 10, mejorando los límites de detección en aproximadamente un orden de magnitud. Normalmente los factores de

Introducción General

concentración se obtienen dividiendo la altura de pico obtenida al aplicar la preconcentración *online* por la altura de pico obtenida mediante inyección normal. La limitación que presenta esta modalidad es la reducida longitud de la zona de muestra que puede ser inyectada en el capilar sin pérdida de eficiencia o resolución en la separación. Esto se debe al ensanchamiento de las zonas en las que se produce el apilamiento o agrupación debido a la mezcla de las zonas de baja y alta conductividad en esta región límite y al flujo laminar generado dentro del capilar como resultado del desequilibrio de la velocidad del EOF local y en el resto del capilar.

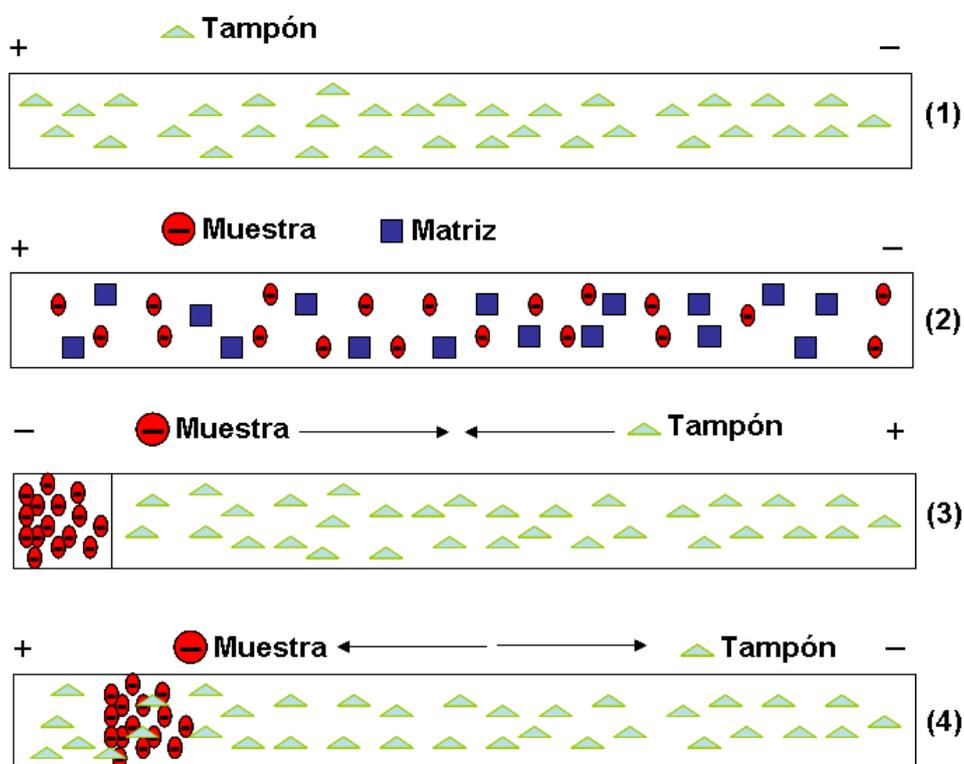
- *Apilamiento de muestra de gran volumen (large volume sample stacking, LVSS)*. En esta modalidad el volumen de muestra introducido es mayor que el óptimo usado en NSM, y la matriz de la muestra debe ser propulsada hacia fuera del capilar con objeto de preservar la eficacia de la separación. Esta expulsión debe llevarse a cabo mediante presión externa o mediante el EOF, el sentido siempre será opuesto al del movimiento de los solutos cargados y la velocidad de expulsión debe de ser menor que la velocidad electroforética de éstos. Una limitación de esta modalidad es que sólo pueden concentrarse a la vez analitos cargados positiva o negativamente. Es posible conseguir factores de concentración mayores de 100, mejorándose los límites de detección en más de 2 órdenes de magnitud. Esta modalidad puede llevarse a cabo invirtiendo o no la polaridad.

LVSS con cambio de polaridad. En esta modalidad la muestra se disuelve en un disolvente de baja conductividad y se inyecta la disolución resultante hidrodinámicamente durante un periodo de tiempo prolongado. La Figura 9 muestra un esquema de este proceso para el caso de LVSS con cambio de polaridad para aniones. El cambio de polaridad se realiza con objeto de controlar el EOF y se lleva a cabo en sistemas de CZE que requieren alto EOF para llevar los analitos separados hasta el detector. La polaridad del voltaje durante el apilamiento de la muestra se selecciona en función de la carga de los iones de la muestra, siendo inversa a la polaridad

usada para la separación y la detección. Como se muestra en la Figura 9, en el caso de separación de aniones en una muestra se usa un electrodo positivo en el vial de salida. En el caso de muestras con cationes, se usa un aditivo en el tampón electroforético (por ejemplo un surfactante catiónico) para invertir el EOF y el electrodo negativo se ubica en el vial de salida. En ambos casos, cuando se observa que la corriente alcanza el 90-99 % de la corriente real (corriente obtenida cuando el capilar se llena sólo con el tampón electroforético), la polaridad se invierte de modo que el sentido del EOF es hacia el detector.

Introducción General

Figura 9. LVSS con cambio de polaridad para aniones. (1) Situación inicial, capilar lleno de tampón de separación; (2) inyección de la muestra preparada en disolvente de baja conductividad; (3) aplicación de voltaje a polaridad negativa para focalizar zonas y eliminar la matriz de la muestra; los aniones se focalizan completamente y la mayoría de la matriz se elimina, parándose el voltaje; (4) aplicación de voltaje a polaridad positiva para la separación y detección de las zonas focalizadas.



LVSS sin cambio de polaridad. En algunos instrumentos en los que no es posible llevar a cabo la inversión de la polaridad, se puede llevar a cabo esta modalidad, en la que la magnitud y sentido del EOF debe manipularse adecuadamente con objeto de llevar a cabo la preconcentración por LVSS sin cambio en la polaridad. Para aniones, el EOF debe ser reducido o debería ser menor que la velocidad electroforética de la muestra.

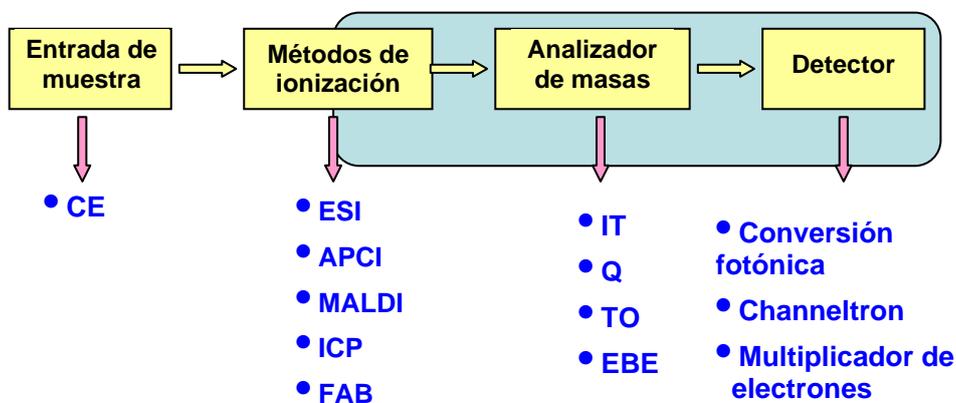
Por ejemplo, es posible usar un aditivo (surfactante catiónico, etc.) que se añade a un tampón neutro o de bajo pH. Para cationes, además de reducir el EOF, el sentido de éste debe invertirse. Esto puede conseguirse usando un tampón de bajo pH que contenga una baja concentración de surfactante catiónico o usando capilares recubiertos especialmente.

Las etapas para el LVSS sin cambio de polaridad para aniones serían: (A) Situación inicial, inyección de la muestra preparada en disolvente de baja conductividad y aplicación de voltaje a polaridad negativa para focalizar zonas y eliminar la matriz de la muestra; (B) los aniones se focalizan completamente y la mayoría de la matriz se elimina, el voltaje se retiene hasta que la velocidad del EOF es menor que la velocidad electroforética de los aniones; (C) separación y posterior detección de zonas focalizadas.

4 DETECCIÓN EN CE POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja en fase líquida, como es la CE, con un espectrómetro de masas, en el que las sustancias a analizar deben encontrarse en fase gaseosa es necesario una interfase adecuada que haga ambas técnicas compatibles. Además, este acoplamiento debe solucionar un segundo inconveniente como es el cierre del circuito eléctrico aplicado en cualquier sistema de CE. En la Figura 10 se muestra un esquema general del acoplamiento CE-MS en el que se observa la entrada de muestra a través de un equipo de CE, las diferentes fuentes de ionización posibles, los analizadores de que se disponen actualmente y los tipos de detectores [116,117].

Figura 10. Esquema global del acoplamiento CE-MS.



En este sentido, los principales avances instrumentales acaecidos en los últimos años, además de los sofisticados analizadores de masas, se han centrado en el desarrollo de métodos de ionización y procedimientos

[116] J. Hernández Borges, C. Simó, A. Cifuentes, *Cromatografía y Técnicas Afines* 24 (2003) 45.

[117] I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi. "Quantitative Applications of Mass Spectrometry", John Wiley & Sons, Chichester, 2006, Capítulo 1.

metodológicos para el acoplamiento directo de ambas técnicas [118,119,120,121,122].

4.1 Métodos de ionización

Entre los métodos de ionización desarrollados para facilitar la transferencia de los analitos de la fase líquida obtenida en CE a la fase gaseosa requerida en MS se han usado el ICP, fundamentalmente usado para átomos metálicos y algunos no metálicos, la de flujo continuo y bombardeo con átomos rápidos [123] (*Continuous Flow-Fast Atom Bombardement*, CF-FAB), la ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), la ionización química a presión atmosférica [124] (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), o la de ionización-desorción por láser asistida por una matriz [125,126] (*Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI), usada fundamentalmente en acoplamientos CE-MS *offline* recogiendo las fracciones procedentes de la columna capilar. Estos desarrollos han favorecido la aplicación de CE-MS como una alternativa real a HPLC-MS para el análisis de compuestos polares y cargados. La naturaleza de los compuestos analizados es cada vez más variada, desde iones inorgánicos a pequeñas moléculas o biomoléculas de elevada masa molecular [127], incluyendo aminoácidos, péptidos y proteínas

[118] K.B. Tomer, L.J. Deterding, C.E. Parker, en “High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques and Applications”, M.G. Khaleli (Ed.), John Wiley & Sons, New York 1998.

[119] E. Gelpi, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 241.

[120] A. Brocke, G. Nicholson, E. Bayer, *Electrophoresis* 22 (2001)1251.

[121] K.B. Tomer, *Chem. Rev.* 101 (2001) 297.

[122] C.W. Klampfl, *Electrophoresis* 27 (2006) 3.

[123] M.A. Moseley, L.J. Deterding, K.B. Tomer, J.B. Jorgenson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3 (1989) 87.

[124] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1889.

[125] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4785.

[126] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, E. Moskovets, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 17.

[127] J. Hernández-Borges, C. Neusüß, A. Cifuentes, M. Pelzing, *Electrophoresis* 25 (2004) 2257.

Introducción General

[128,129,130], ácidos nucleicos [131], carbohidratos [132], fármacos [133,134,135,136,], plaguicidas [116,137,138,139,140,141,142], antibióticos [143,144,145,146], metabolitos y biomarcadores para diagnóstico clínico [147,148,149], aplicaciones en análisis de alimentos [93,150], en proteómica [151], en análisis clínico y forense [152], etc.

El método de ionización más utilizado en la actualidad es la ESI ya que además de permitir la transferencia directa de los compuestos desde el capilar de separación hasta el espectrómetro de masas, permite un análisis eficaz de compuestos polares lábiles y/o compuestos con una elevada masa

-
- [128] M. Moini, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 466.
[129] H. Hanno, *Electrophoresis* 26 (2005) 1254.
[130] M.R.N. Monton, S. Terabe. *Anal. Sci.* 21 (2005) 5.
[131] A.V. Willems, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, J.F. Van Bocxlaer, *Electrophoresis* 26 (2005) 1221.
[132] C. Campa, A. Coslovi, A. Flamigni, M. Rosi, *Electrophoresis* 27 (2006) 2027.
[133] L. Geiser, S. Rudaz, J.L. Vetheuy, *Electrophoresis* 24 (2003) 3049.
[134] U.L. Peri-Okonny, E. Kennidler, R. John Stubbs, N.A. Guzman, *Electrophoresis* 24 (2003) 139.
[135] C.W. Huck, G. Stecher, H. Scherz, G. Bonn, *Electrophoresis* 26 (2005) 1319.
[136] W.F. Smyth, *Electrophoresis* 27 (2006) 2051.
[137] R. Rodríguez, J. Manes, Y. Picó, *Anal. Chem.* 75 (2003) 452.
[138] V. Andreu, Y. Picó, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 772.
[139] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 25 (2004) 2065.
[140] H. Safarpour, R. Asiaie, S. Katz, *J. Chromatog. A* 1036 (2004) 217.
[141] S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida, *J. Chromatog. A* 1051 (2004) 297.
[142] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 948.
[143] J. McCourt, G. Bordin, A. Rosa Rodríguez, *J. Chromatog. A* 990 (2003) 259.
[144] B. Santos, A. Lista, B.M. Simonet, B.M., A. Rios, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 26 (2005) 1567.
[145] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, J.M. Bosque Sendra, L.E. García-Ayuso, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7665.
[146] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 27 (2006) 2240.
[147] P. Senk, L. Kozak, F. Foret, *Electrophoresis* 25 (2004) 1447.
[148] K. Walter, C. Neusüß, M. Pelzing, *Mass Spectrometry Reviews* 24 (2005) 959.
[149] A.C. Servais, J. Crommen, M. Fillet, *Electrophoresis* 27 (2006) 2616.
[150] C. Simó, C. Barbas, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 26 (2005) 1306.
[151] D.C. Simpson, R.D. Smith, *Electrophoresis* 26 (2005) 1291.
[152] F.W. Franklin, P. Brooks, *Electrophoresis* 25 (2004) 1413.

molecular, siendo sensible, fácil de implementar y mostrando un extenso intervalo de aplicaciones. Este método de ionización es el que más se aproxima a las características ideales para el acoplamiento CE-MS [153], que pueden enumerarse como: a) sensible, preciso y de respuesta lineal; b) que mantenga la eficacia de la separación y la resolución; c) que mantenga la corriente eléctrica a través del capilar de separación; d) compatible con las sustancias que eluyen del capilar; y e) que proporcione una ionización eficaz a partir de los flujos tan pequeños que provienen del capilar de separación (nl min^{-1}). No obstante, existen ciertas dificultades que deben superarse, como la incompatibilidad de algunas sustancias que pueden usarse en los electrolitos tampón en CE. Considerando que es el modo más utilizado y que es el aplicado en esta Memoria, nos centraremos en la descripción de este modo de ionización y en las interfases para su acoplamiento a CE-MS.

4.1.1 Ionización por electrospray (ESI)

El ESI es una técnica de ionización suave en la cual los iones de la muestra procedentes de la disolución a la salida del capilar de separación son transferidos desde una fase condensada a fase gaseosa. Su aplicación en MS fue desarrollada principalmente por Yamashita y Fenn [154,155], obteniendo este último el Premio Nobel de Química por estos avances en el año 2002. Para la generación del electrospray se establece inicialmente una diferencia de potencial entre el final del capilar de separación y la entrada al espectrómetro de masas, aproximadamente de entre $\pm 2\text{-}6$ kV. La muestra procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se transforma en una nube de gotas cargadas y dispersas que son sometidas a un gradiente de potencial antes de llegar al espectrómetro de masas. El

[153] J.C. Servers, R.D. Smith, en "Electrospray Ionization Mass Spectrometry", R.B. Cole (Ed.), John Wiley & Sons, Nueva York 1997.

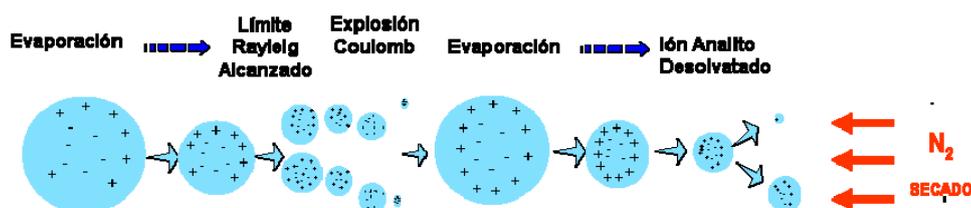
[154] M. Yamashita, J.B. Fenn, J. Phys. Chem. 88 (1984) 4451.

[155] M. Yamashita, J.B. Fenn, J. Phys. Chem. 88 (1984) 4671.

Introducción General

disolvente se va evaporando de las microgotas formadas, lo que se favorece mediante la aplicación de un flujo de gas “de secado” (nitrógeno caliente) en la cámara de ionización y estas van aumentando su densidad de carga eléctrica, de modo que los iones de la misma polaridad son atraídos hacia la superficie de la microgota debido al campo eléctrico aplicado entre la salida del capilar y la entrada al equipo MS. Al mismo tiempo, las microgotas se van dividiendo en otras aún más pequeñas debido a las repulsiones electrostáticas que se producen entre ellas (explosiones de Coulomb). Así, los iones pasan a la fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas debido al voltaje aplicado. Si este potencial es positivo, entrarán al equipo MS los iones negativos presentes en la disolución que sale del capilar. Por el contrario, si se aplica un potencial negativo, entrarán al sistema los iones positivos. Al final del proceso se obtienen iones mono- o multicargados, que son transferidos al sistema óptico del espectrómetro de masas, zona en la que los iones son transportados al analizador de masas y posteriormente al detector. Esquemáticamente el proceso se representa en la Figura 11

Figura 11. Proceso de ionización por ESI.



El hecho de que sea posible la producción de iones multicargados ha potenciado el éxito de esta técnica en el ámbito de los acoplamientos de las técnicas separativas en fase líquida con la MS. Un incremento en el número de cargas en una molécula disminuiría el valor de su relación m/z , que es el parámetro utilizado para el análisis en MS. Así, mediante la detección de

iones multicargados se pueden detectar compuestos con pesos moleculares muy altos empleando analizadores de masas que trabajan con un intervalo limitado de valores m/z .

La ionización puede realizarse en modo positivo (ESI +) o en modo negativo (ESI-). En el primer caso se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, siendo n el número de protones cargados positivamente en la molécula. Igualmente pueden formarse aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En modo ESI- se produce normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar iones $[M-nH]^{n-}$.

En este tipo de acoplamiento se plantean diversos problemas para compatibilizar ambas técnicas. Estos se pueden concretar en los siguientes apartados [156]:

- i) Incompatibilidad del flujo procedente del capilar de separación (de hasta 100 nl min^{-1}) con el flujo necesario para la formación de un electrospray estable ($1\text{-}200 \text{ }\mu\text{l min}^{-1}$). Existen diferentes metodologías para compatibilizar ambos flujos, una de ellas implica el uso de un flujo adicional y otra el uso de interfases micro- o nano-ESI en las que se pueden usar los flujos extremadamente bajos característicos de CE.
- ii) Necesidad de mantener el circuito eléctrico que se requiere para llevar a cabo la separación en CE y que se establece entre los extremos del capilar al aplicar la diferencia de potencial.
- iii) Compatibilidad de los diferentes modos de CE con el espectrómetro de masas, ya que en función de éstos podría ser necesario el empleo de sustancias poco compatibles con ESI (tales como iones borato, fosfato, surfactantes, ciclodextrinas, etc.) los cuales, por su limitada volatilidad contribuirían de forma significativa al incremento del ruido de fondo en

[156] C. Simó, A. Cifuentes, en "Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección", A. Fernández Gutierrez, A. Segura Carretero (Eds.), Editorial Universidad de Granada, 2006, Capítulo 12.

Introducción General

la detección por MS, empeorando la sensibilidad y llegando incluso a contaminar u obstruir el detector.

Estas dificultades han sido solventadas mediante el desarrollo de diferentes interfases que tienen como objetivo la formación de un electrospray estable y el mantenimiento de la corriente eléctrica en el interior del capilar. Así, es posible distinguir entre: interfase coaxial con flujo adicional, interfase sin flujo adicional e interfase de unión líquida. Las características fundamentales de cada una de ellas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de interfases en el acoplamiento CE-MS. Características fundamentales [156].

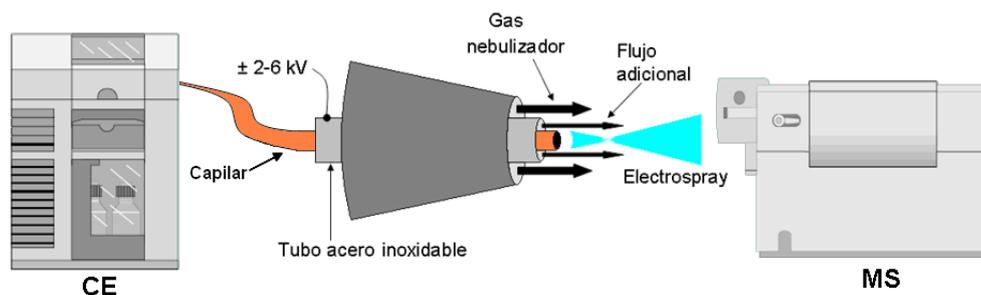
TIPO DE INTERFASE	CONTACTO ELÉCTRICO CON CE	SPRAY	VENTAJAS	LIMITACIONES
Sin flujo adicional	Recubrimiento conductor. Electrodo en el capilar de separación	Del capilar de separación (0-100 nl min ⁻¹ , nano-ESI)	Alta sensibilidad	Menos estable (recubrimiento inestable, obstrucción, etc.). Dependiente del EOF
Con flujo adicional	Líquido adicional	Líquido adicional (1-6 µl min ⁻¹)	Disponible comercialmente. Spray estable. Independiente del EOF (electrolito CE)	Baja sensibilidad
Unión líquida	Depósito con electrolito de separación entre el capilar de separación y el de transferencia	Del capilar de transferencia (nano-ESI)	Alta sensibilidad. Independiente del EOF. Más estable que ESI sin flujo adicional	Ensanchamiento de los picos. Menos estable que ESI con flujo adicional (Obstrucción del capilar de transferencia, etc.)

Desde su primera aplicación [157], la interfase coaxial con flujo adicional es la más utilizada para llevar a cabo el acoplamiento CE-MS, siendo la aplicada en los métodos CE-MS desarrollados en esta Memoria. Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos: el capilar de

[157] R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth, Anal. Chem. 60 (1988) 1948.

separación, que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional (“*sheath liquid*”) y un tercer tubo por el cual se introduce el gas nebulizador, normalmente nitrógeno, que favorece la formación del electrospray. Estos tres tubos concéntricos están situados en la cámara de nebulización, la cual se encuentra a una temperatura generalmente comprendida entre 100 y 350 °C. En la Figura 12 se muestra un esquema de esta interfase CE-ESI-MS. El flujo adicional que se hace pasar por el tubo metálico que rodea el capilar cierra el circuito eléctrico necesario durante la separación por CE, al establecer el contacto eléctrico entre el electrodo situado en el vial de entrada, el capilar y el tubo de acero inoxidable que hace de electrodo de salida. Este tubo metálico sirve además para definir la diferencia de potencial entre la salida del capilar y el electrodo que se encuentra a la entrada del espectrómetro de masas. Con el flujo adicional además se consigue aumentar el flujo necesario para que la interfase ESI funcione de modo adecuado originando un electrospray estable, ya que aumenta el flujo con el que típicamente se trabaja en la separación por CE, obteniéndose flujos del orden de los ml min^{-1} .

Figura 12. Esquema de la interfase ESI con flujo adicional.



Esta interfase es robusta, disponible comercialmente y de fácil uso aunque muestra ciertas limitaciones, fundamentalmente basadas en la disminución de sensibilidad debido a la dilución de la muestra por el líquido

Introducción General

adicional. Para conseguir un óptimo acoplamiento CE-MS con este tipo de interfase que permita una satisfactoria cuantificación, es necesario considerar ciertos aspectos experimentales y variables a optimizar [105,156]:

- i) El capilar debe sobresalir con respecto al tubo concéntrico que lo rodea un tercio aproximadamente de su diámetro externo (por ejemplo, para un capilar de 360 μm de diámetro externo deberá sobresalir 120 μm).
- ii) El flujo adicional debe ser suficientemente conductor como para cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar de separación, pero con fuerza iónica no demasiado elevada para evitar descargas en la fuente de ionización. Además, concentraciones relativamente altas de tampón o flujo adicional pueden empeorar la detección por MS, ya que se produciría fundamentalmente la ionización en fase gaseosa de estas especies, desplazando a los compuesto de interés o incluso originando la obstrucción de la interfase o del tubo de entrada al espectrómetro de masas.
- iii) El flujo adicional debe contener un porcentaje alto de disolvente orgánico (usualmente valores iguales o superiores al 50 %) y una pequeña cantidad de ácido o base para mejorar la ionización de las sustancias en estudio, en función de que se trabaje con ESI+ o ESI-. La optimización de este flujo adicional implica la elección de la cantidad y tipo de disolvente orgánico, pH y contenido salino. Normalmente se utilizan como disolventes orgánicos isopropanol o MeOH, en proporción 1:1 con agua. Es preferible el uso de isopropanol que de MeOH debido a su mayor eficacia en la ionización y sobre todo a la menor cantidad de impurezas. Un mayor contenido en disolvente orgánico puede incrementar la sensibilidad pero podría reducir la estabilidad del spray debido a la baja conductividad. Además, una baja cantidad de ácido volátil (normalmente ácido fórmico o ácido acético) ayuda a estabilizar el spray así como la corriente CE y además incrementa la eficacia de la ionización en modo

positivo. Para el modo negativo se suele añadir una pequeña concentración de amoníaco.

- iv) Los flujos de líquido adicional y de gas nebulizador deben mantenerse en valores suficientemente bajos como para permitir un electrospray estable, evitando la generación del efecto de succión o excesiva dilución de los analitos, pero no excesivamente bajos como para producir inestabilidad del spray o ensanchamiento de picos.
- v) La presión del gas nebulizador tiene una importante influencia sobre la resolución y el tiempo de migración debido al efecto de succión. Así, deberían aplicarse valores bajos para conseguir condiciones estables, por ejemplo, previniendo la entrada de aire en el capilar durante el proceso de inyección y para evitar la pérdida de resolución. Esto es de gran interés cuando se utilizan disolventes no acuosos de baja viscosidad (por ejemplo ACN) o capilares cortos y anchos. De otro modo, una alta presión del gas nebulizador puede influenciar positiva o negativamente en la formación del spray y en los perfiles de flujo en la cámara de spray, lo que potencialmente modifica la sensibilidad. De este modo, esta variable debe ser cuidadosamente optimizada con objeto de conseguir resultados reproducibles y de adecuada sensibilidad.
- vi) Otros parámetros como el flujo del gas de secado, la temperatura o el potencial ESI pueden ser igualmente optimizados aunque parecen ejercer una influencia menor sobre la estabilidad y sensibilidad.

4.2 Analizadores de masas

Una vez que se ha llevado a cabo la transferencia de los iones procedentes del capilar desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones se dirigen hacia el analizador de masas, que permite la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con alto grado de sensibilidad y selectividad, proporcionando información sobre la masa molecular. Existe una amplia variedad de equipos de MS que pueden ser utilizados en los

Introducción General

acoplamientos CE-MS: los cuadrupolos (Q), las trampas de iones (IT), los sectores magnéticos (EBE), los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) o analizadores más complejos formados por combinación de los anteriores (q-TOF, IT-TOF o triple cuadrupolo (QqQ)). En la Tabla 3 se muestra una clasificación de estos analizadores en función de sus características [156].

Tabla 3. Comparación de los analizadores de masas usados en CE-MS.

Analizador	Rapidez de barrido	Sensibilidad Full scan (SIM)	Resolución	MS/MS	Cuantificación	Precio
Q	-	- (+)	0	-	+	Bajo
QqQ	-	- (+)	+	+	++	Alto
IT	+	+	+	++	+	Medio
TOF	++	+	++	(+)	+	Alto

El analizador IT (empleado en esta Memoria) es actualmente uno de los más usados en los acoplamientos CE-MS, debido a su coste y fundamentalmente a la velocidad de barrido y a la posibilidad de realizar fragmentaciones sucesivas de los iones seleccionados, dando lugar a espectros MS^n , aunque la sensibilidad y la resolución no es la mejor. Este analizador consiste básicamente en un electrodo anular y dos electrodos laterales que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones, siendo los tres electrodos de geometría hiperbólica. Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro del analizador se puede llevar a cabo, en función del objetivo del análisis, tanto el análisis de las masas como el aislamiento de un ión precursor y la posterior fragmentación de este ión. Para llevar a cabo la determinación de todas las especies que entran o se forman en la trampa, se somete a los iones confinados a una rampa lineal de RF, de modo que son progresivamente expulsados como resultado de desestabilizaciones de la órbita que mantienen dentro de la trampa. Una vez que estos iones pasan al detector, la señal se procesa y da lugar a un

Introducción General

espectro de masas. El espectro de masas constituye la representación gráfica de la abundancia relativa de los iones producidos en función de su relación m/z . Debido a que el flujo procedente del capilar de separación es continuo, se están continuamente registrando espectros de masas a intervalos de tiempo definidos. El conjunto de espectros de masas es lo que conforma el electroferograma de la separación.

5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida se está convirtiendo en el sistema ideal para la preparación de muestra antes de su análisis por HPLC, GC, cromatografía en capa fina (TLC), radioinmunoensayo (RIA), NMR, y otras técnicas instrumentales analíticas. Sus principales objetivos son la limpieza de la muestra (“*clean-up*”), la concentración del analito en ésta y la posibilidad de cambio de disolvente (por ejemplo, de acuoso a orgánico).

Se basa en el mismo principio de retención selectiva que la cromatografía líquida, es decir, en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). De esta manera, al hacer pasar la muestra a través de una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc.), algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente, si los analitos de interés han quedado retenidos, éstos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de disolvente. La forma habitual de trabajo es la extracción, donde la fase sólida (sorbente) está colocada en un cartucho de vidrio o de polietileno (similar al cuerpo de una jeringa). Hay una gran variedad de cartuchos que se diferencian en el tipo de fase, la capacidad y la cantidad de fase que contienen, que deben seleccionarse en función del tipo de analito, de su concentración y del disolvente en que se encuentre.

La SPE ofrece muchos beneficios y ventajas sobre las técnicas tradicionales de preparación de muestra, entre ellos [158]:

- Altas recuperaciones de los analitos
- Posibilidad de eliminación de interferencias
- Posibilidad de concentración de los analitos

[158] E.M. Thurman, M.S. Mills, “Solid Phase Extraction: Principles and Practice” John Wiley & Sons, Nueva York, 1998.

- Capacidad de extraer analitos de amplio rango de polaridad simultáneamente
- Fácil automatización
- Compatibilidad con instrumentos de análisis
- Reducción del consumo de disolventes orgánicos.

Los pasos de la SPE se consiguen en cuatro etapas:

A. Acondicionamiento. Debe prepararse la fase antes de aplicar la muestra para obtener una interacción reproducible. Esto se consigue solvatando la fase. Se pasa un volumen de disolvente adecuado a través de la fase, seguido de un volumen de líquido similar a la matriz de la muestra.

B. Retención. Una vez aplicada la muestra, el analito y otros componentes de la matriz quedan retenidos en la fase debido a una o varias interacciones químicas. Otros componentes de la matriz pueden pasar a través de la fase sin ser retenidos.

C. Lavado. Esta fase debe conseguir que se eluyan los componentes de la matriz no deseados que hayan quedado retenidos en la fase durante la etapa de retención.

D. Elución. Debe elegirse un disolvente de elución capaz de romper solamente la interacción entre el analito y la fase, obteniendo así una elución selectiva del analito.

Esta técnica se ha utilizado ampliamente en los últimos años en la preparación de muestras en análisis de alimentos [159] y en análisis clínico y farmacéutico [160]. Los tipos de sorbentes empleados en la SPE para los

[159] P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, J. Chromatog. A 975 (2002) 47.

[160] H. Kataoka, Trenes Anal. Chem. 22 (2003) 232.

Introducción General

distintos tipos de analitos y muestras son [161]: apolares, polares, intercambiadores iónicos, de exclusión molecular, de afinidad.

Los *sorbentes apolares* son adecuados para la preconcentración (y limpieza) de compuestos orgánicos presentes en muestras líquidas polares. Los más utilizados son las alquil-sílices (octadecil, C₁₈; octal, C₈; etil, C₂; fenil y ciclohexil), donde los grupos alquilo están enlazados covalentemente a grupos silanol en la superficie de la sílice. Todos estos sorbentes están disponibles comercialmente. Cuando la muestra pasa a través de este tipo de sorbentes, los analitos orgánicos interactúan con la fase ligada (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) quedando retenidos en ella. Posteriormente los analitos son eluidos mediante el empleo de un pequeño volumen (1-10 mL) de disolvente orgánico (MeOH, ACN, acetato de etilo, etc.). Los más utilizados son las C₁₈ debido a su capacidad para retener tanto analitos apolares como moderadamente polares.

Los *sorbentes polares* son los más utilizados en la purificación de extractos orgánicos. El más utilizado ha sido el gel de sílice (SiO₂.H₂O). Los sitios activos de adsorción (polares) son los grupos silanol superficiales, los cuales son débilmente ácidos y por tanto interactúan más fuertemente con analitos básicos. Otros adsorbentes más comunes son la Alúmina (Al₂O₃.H₂O), que se encuentra comercialmente en sus formas ácida, neutra y básica, y el fluorisil (coprecipitado de sílice y óxido de magnesio). En esta metodología el disolvente compite con los analitos (y/o compuestos interferentes) por los sitios activos de adsorción del sorbente. Es decir, la elución se describe como un desplazamiento del soluto por la acción del disolvente. De este modo, cuanto más polar es el disolvente, mayor poder de elución presenta. Así, mediante una adecuada selección de disolventes empleados es posible la eliminación de compuestos interferentes del

[161] C. Cámara (Ed.), P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal. "Toma y Tratamiento de Muestras", Ed. Síntesis, Madrid, 2002.

sorbente para después, utilizando un disolvente más polar, eluir los analitos o viceversa. Dentro de los sorbentes polares se incluyen alquil-sílices con grupos polares como OH, NH₂ y CN, las cuales se obtiene de acuerdo a reacciones de modificación de grupos silanol. En este caso, cuando la muestra pasa a través del sorbente, sólo los analitos con grupos funcionales polares (aminas, hidrófilos y heteroátomos) son retenidos a través de interacciones por puentes de hidrógeno o atracciones bipolares. Posteriormente mediante el empleo de un disolvente más apolar (acetona, ACN, MeOH, agua o combinaciones de ellos), éstos son fácilmente eluidos. En general, los analitos deben estar disueltos en un disolvente bastante apolar para así maximizar las interacciones con el sorbente.

Los *intercambiadores iónicos* son sorbentes empleados en la preconcentración de compuestos orgánicos iónicos o al menos fácilmente ionizables. La preconcentración se realiza a un pH al que el analito se encuentra totalmente en su forma iónica para así poder interactuar y ser retenido por el sorbente. Posteriormente, los analitos son eluidos con un pequeño volumen de una disolución reguladora apropiada a un pH en el que la retención esté totalmente desfavorecida.

Actualmente existe una amplia gama de sorbentes basados en el uso de óxidos inorgánicos, compuestos de baja especificidad (químicamente enlazados, polímeros porosos, etc.) y materiales selectivos para compuestos o grupos funcionales (intercambio iónico, modos mixtos, macrociclos, materiales de acceso restringido, inmunosorbentes o polímeros impresos molecularmente) que han facilitado las aplicaciones en este ámbito [162] y que se encuentran disponibles comercialmente. Así, en la presente memoria, además de C₁₈ y Alúmina, se han usado cartuchos Oasis® HLB (Waters), relleno polimérico con balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa, humectable en agua, adecuado para la extracción en fase sólida de todo tipo

[162] C.F. Poole, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 362.

Introducción General

de compuestos. Su composición consiste en una proporción equilibrada de dos polímeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica). Proporciona una capacidad de retención superior en fase reversa, con una capacidad especial para optimizar la retención de los analitos polares.

6 USO DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS

6.1 Uso de diseño de experimentos en la optimización de métodos de análisis

La optimización de un método analítico puede llevarse a cabo de dos modos diferentes: el modo tradicional univariante, o utilizando una metodología multivariante mediante la aplicación de diseños experimentales. Esto último hace posible resolver circunstancias que no son explicadas adecuadamente por los métodos tradicionales, como aquellas en las que la respuesta analítica es una función multimodal, o cuando los efectos de las variables no son aditivos, sino que hay interacción entre ellos. En este sentido, la aplicación de la quimiometría permite, mediante el uso de la estadística, diseñar y/o seleccionar experimentos y procedimientos de medida, proporcionando el máximo de información química relevante mediante el análisis de los datos obtenidos [163].

Un diseño de experimentos se puede definir como una prueba o serie de pruebas en las cuales se introducen cambios deliberados en las variables a estudiar (factores), de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta del sistema [164]. Por tanto, el diseño experimental implica:

- Comprender el problema y definir claramente el objetivo.
- Identificar aquellos factores que pueden influir en el resultado de un experimento y el dominio experimental de interés.
- Elección del conjunto de experimentos a realizar, de modo que se minimicen los efectos de los factores no controlados.
- Utilización del análisis estadístico para estudiar los efectos de los diferentes factores implicados.

[163] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: A Textbook", Elsevier, Ámsterdam, 1988.

[164] D.C. Montgomery, "Diseño y Análisis de Experimentos", Ed. Iberoamericana, México D.F., 1991.

Introducción General

En el diseño de experimentos es frecuente realizar la experimentación en varias etapas. En una primera etapa se suelen emplear los *diseños de diagnóstico* (o diseños de “*screening*”), que tienen como objetivo diferenciar las variables (factores) que afectan significativamente a la respuesta. Estos diseños se caracterizan por requerir un número relativamente pequeño de experiencias para estudiar un número elevado de factores, y los más comunes son los diseños factoriales fraccionados. En una segunda etapa, se emplean los *diseños de optimización*, en los que se pretende conocer el valor de los factores que proporcionan la mejor respuesta posible, evaluando la superficie de respuesta. Entre los diseños más empleados se encuentran el diseño central compuesto y el diseño Doehlert.

La matriz de experiencias es la tabla que reúne las características de cada experiencia individual en relación con los diferentes niveles que toman cada uno de los factores en estudio. Se elabora utilizando valores sin dimensiones, generalmente codificados como ± 1 y 0, siendo 0 el valor central del diseño y +1 y -1 las modificaciones equiespaciadas de ese valor.

La validez del modelo escogido ajustado debe comprobarse a través de un test de “fallo de ajuste” (“*Lack-of-Fit*”) que detecta si la desviación de los puntos con respecto a los valores predichos por el polinomio calculado a partir de los datos obtenidos en el diseño es debida sólo a errores aleatorios (error experimental) o a un error sistemático (modelo no correcto). Se concluye que el modelo es correcto cuando el test es no significativo ($P > 0.05$).

6.2 Diseños factoriales a dos niveles

6.2.1 Diseño Factorial 2^k

Es un tipo de diseño factorial en el que todos los k factores se estudian a dos niveles (+1 y -1). Se considera de gran importancia, ya que:

- Permite estudiar un alto número de factores con relativamente pocas unidades experimentales.
- Es fácil de fraccionar en bloques para conseguir mayor homogeneidad en los puntos experimentales del dominio ensayado.
- Facilita la construcción de diseños factoriales fraccionados a dos niveles, que reducen aun más el número de unidades experimentales requeridas.
- Cuando se necesita un análisis más completo se pueden aumentar de modo sencillo, para formar diseños compuestos.

Es adecuado para la estimación de los efectos de los factores, tanto de primer orden como de las interacciones entre éstos; sin embargo, falla cuando existen efectos adicionales que son significativos (por ejemplo, los de segundo orden) [165].

Al estar basado en los modelos de primer orden, representa generalmente planos inclinados en lugar de superficies de respuesta conteniendo un máximo [166].

6.2.2 Diseños Factoriales Fraccionados a dos niveles: 2^{k-p}

El número de experimentos que requiere un diseño factorial 2^k completo aumenta geométricamente al crecer k . Cuando k es grande la información deseada se puede obtener, casi siempre, realizando sólo una fracción del diseño factorial completo [167]. El hecho de que se puedan estimar todos los efectos, no implica que todos sean significativos. Existe cierta jerarquización, ya que la importancia de los efectos principales tiende a ser mayor que la de las interacciones de dos factores, que a su vez tiende a ser mayor que la de las interacciones de tres factores, y así sucesivamente.

Un uso importante de los diseños factoriales fraccionados se da en los diseños de diagnóstico o “*screening*” [167], donde el objetivo del diseño es

[165] P. W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 63.

[166] A. Delacroix, C. Porte, Analisis 24 (1996) 22.

[167] P. W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 26.

Introducción General

el estudio de aquellas variables que pueden producir cambios significativos en la respuesta seleccionada. El éxito de su utilización se basa en tres ideas clave [164]:

- *La dispersión.* Cuando existen varias variables, es probable que el sistema esté influido básicamente por algunos de los efectos principales e interacciones de orden inferior.
- *La proyección.* Los diseños factoriales fraccionados pueden proyectarse en diseños más poderosos (más grandes), en el subconjunto de factores significativos.
- *La experimentación secuencial.* Es posible combinar los experimentos de dos o más diseños factoriales fraccionados para conformar de manera secuencial un diseño más grande y estimar los efectos de los factores y las interacciones de interés.

Un ejemplo particular de éstos, son los *diseños saturados a dos niveles*, en los que sólo se pueden evaluar los efectos principales, estando confundidas las interacciones de segundo orden y superiores con los efectos principales. En estos diseños, se requiere un número de ensayos (N) igual al número de variables a estudiar más uno ($N = k + 1$).

Si tenemos en cuenta el número de variables, k , y el número de experimentos, $N = k + 1$, podemos comprobar que sólo tenemos grados de libertad para estimar el valor medio y los k efectos principales. Por esta razón, cada efecto principal está confundido con efectos de segundo orden y un número mayor de efectos superiores. Mediante la eliminación en el modelo de aquellos efectos que no parecen ser significativos, la variación adscrita a esos efectos aparecerá reflejada en los residuales. Se requiere además la adición de experimentos en el punto central ya que, en caso contrario el diseño no permite la estimación del error experimental.

6.3 Metodología de superficie de respuesta

En la metodología de superficies de respuesta (RSM) [168] se representa gráficamente la respuesta (R) de un sistema en función de uno o más factores (variables) significativos. La RSM reúne a un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para la optimización de problemas en los que la respuesta obtenida es función de varias variables, siendo el objetivo optimizar esta respuesta. El modelado de estas superficies de respuesta se realiza empleando un modelo empírico basado en modelos polinomiales completos de segundo orden. Como ejemplo, el modelo de segundo orden para dos variables es:

$$R = a + bX + cY + dX^2 + eY^2 + fXY$$

donde a es el término independiente; b y c representan los coeficientes de los términos lineales; d y e los coeficientes de los términos cuadráticos y f es el coeficiente del término de la interacción.

Estos modelos tienen como mayor ventaja su versatilidad a la hora de describir la gran variedad de superficies de respuesta que se pueden ajustar dentro del dominio impuesto por los factores, ya que no sólo explican el efecto de cada factor sobre la respuesta del sistema, sino que además revelan la existencia de interacciones entre factores cuando éstas están presentes en un sistema.

En la mayoría de los problemas de RSM se desconoce la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes. Por ello, el primer paso en la RSM consiste en establecer una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta se describe adecuadamente por una función lineal de las variables, se podrá emplear

[168] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, "Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building", Wiley, Nueva York, 1978.

Introducción General

como función de aproximación un modelo de primer orden, mientras que si existe curvatura en el modelo, deberá emplearse un modelo de segundo orden.

Es improbable que un modelo polinomial sea una aproximación razonable de la relación funcional real sobre todo el dominio de las variables independientes; sin embargo, funcionan muy bien en regiones relativamente pequeñas de estas variables.

Una vez ajustada la superficie de repuesta al modelo, y tras comprobar que no existe fallo de ajuste, se procede a la localización del punto estacionario igualando a cero las derivadas parciales del polinomio con respecto a cada uno de los factores. El punto estacionario, que generalmente será un máximo, un mínimo o un punto de silla, se determinará mediante análisis canónico.

En la RSM los modelos más comúnmente empleados son los modelos de segundo orden, que deben tener por lo menos tres niveles de cada factor y, si es posible, cumplir con las premisas de ortogonalidad y rotabilidad. A continuación se comentarán algunos aspectos de los diseños empleados en esta Memoria.

6.3.1 Diseños centrales compuestos

Uno de los modos más importantes de diseños para ajustar modelos de segundo orden consiste en los diseños centrales compuestos (CCD) [169]. Los CCD son relativamente eficientes cuando el número de factores es pequeño, entendiendo por eficiencia la obtención de los parámetros del modelo con el menor número de experimentos posibles. En cualquier caso, es conveniente realizar algún experimento adicional de los estrictamente necesarios para establecer los parámetros del modelo. De esta forma se dispone de grados de libertad suficientes para estimar el fallo de ajuste del modelo propuesto.

[169] R.G. Brereton, "Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems", Ellis Horwoods Limited, Chichester, 1990.

Estos diseños constan de 3 partes:

- a) Un experimento factorial completo a 2 niveles para k factores si $k < 5$ o 2^{k-1} si $k > 5$
- b) $2k$ puntos experimentales que se sitúan a una distancia α desde el centro del diseño
- c) c puntos centrales

Por tanto en estos diseños, el nº de experiencias será: $N = 2^k + 2k + c$
ó $N = 2^{k-1} + 2k + c$

Así, en un estudio de tres factores, 8 de los puntos en un diseño central compuesto forman un cubo que corresponde a un diseño factorial completo 2^3 . La parte correspondiente a la estrella consiste en un grupo adicional de puntos, situados a igual distancia del centro del cubo en radios que pasan a través del punto central de cada cara del cubo. La distancia desde el centro del cubo a uno de esos puntos se denomina "distancia axial (α)" de la estrella. La elección de un valor de α adecuado permite que el diseño cumpla con los criterios de ortogonalidad y/o rotabilidad. Cuando $\alpha = \pm 1$ se obtiene una variante del CCD ortogonal y/o rotatable denominada CCD centrado en las caras. En este caso, el diseño sólo requiere tres niveles para cada factor, siendo de gran utilidad en la práctica donde a menudo es difícil modificar niveles para ajustarse a los criterios de ortogonalidad y/o rotabilidad.

La yuxtaposición de un diseño factorial a dos niveles con un diseño de estrella permite estimar todos los parámetros en un modelo polinomial completo de segundo orden, mientras que los diseños factoriales completos a dos niveles sólo permiten la estimación de los parámetros de segundo orden.

6.3.2 Diseños Draper-Lin

Cuando el número de variables a estudiar es elevado, el número de experiencias a realizar en el diseño se incrementa considerablemente, especialmente si se desean realizar estudios a más de dos niveles. En este

Introducción General

sentido, se han desarrollado diferentes aproximaciones para conseguir la máxima información posible, con el menor número de experiencias, incrementándose así la eficacia del diseño. Los diseños compuestos se emplean con mucha frecuencia debido a su alta eficacia, aunque ésta decrece al aumentar el número de variables. Para solventar este problema, se han propuesto distintas estrategias para reducir el número de puntos del diseño factorial que constituye su “esqueleto factorial”, obteniéndose de este modo los llamados “diseños compuestos reducidos”. Así, Draper y Lin [170,171] proponen buscar los puntos necesarios del “esqueleto factorial” mediante la eliminación de columnas a partir de un diseño Plackett-Burman a dos niveles [172,173]. Estos diseños muestran una eficacia muy alta, y se pueden ampliar fácilmente sin más que añadir puntos centrales, según los grados de libertad requeridos para la evaluación del modelo.

La aproximación de Draper-Lin se basa en los siguientes pasos:

- (i) cálculo del mínimo número de puntos, m , requeridos para el “esqueleto factorial” ($m = p-2k$)
- (ii) selección del diseño Plackett-Burman a dos niveles, cuyo número de puntos es igual o mayor a m
- (iii) selección de k columnas del diseño Plackett-Burman original y eliminación del resto
- (iv) en caso de que queden columnas duplicadas, eliminar una de cada duplicado
- (v) establecimiento del “esqueleto factorial” con el resto de las filas
- (vi) adición de las correspondientes experiencias para los puntos estrella y centrales seleccionados, obteniéndose el diseño Draper-Lin pequeño compuesto definitivo.

[170] N.R. Draper, *Technometrics* 27 (1985) 173.

[171] N.R. Draper, D.K.J. Lin, *Technometrics* 32 (1990) 187.

[172] R.L. Plackett, J.P. Burman, *Biometrika* 33 (1946) 305.

[173] K. Jones, *Int. Lab.* 11 (1986) 32.

A pesar de su alta eficacia, este tipo de diseños, que se encuentra ya incluido en algunos paquetes informáticos [174], no se ha empleado apenas en la optimización de métodos analíticos.

6.3.3 Diseños Doehlert

Una alternativa muy útil para el diseño de experimentos para modelos de segundo orden es el diseño de estructura uniforme propuesto por Doehlert en 1970 [175]. Este tipo de diseños son fáciles de aplicar y ofrecen las ventajas de requerir pocas experiencias, alta eficacia y además se pueden mover a través del dominio experimental [176]. A pesar de estas atractivas características pasaron varios años hasta que los investigadores los empezaran a utilizar. En Química Analítica, la primera aplicación de una matriz Doehlert se realizó en la optimización de una separación mediante HPLC [177]. Desde entonces se ha incrementado el número de artículos publicados empleando estos diseños tanto para determinaciones espectrofotométricas, cromatográficas o electroanalíticas [176].

El diseño Doehlert describe dominios experimentales esféricos haciendo énfasis en la uniformidad del espacio ocupado. Aunque esta matriz no es ni ortogonal ni rotatable, esto no supone una desventaja a la hora de una utilización efectiva. Para dos variables, el diseño Doehlert consiste en un punto central y otros seis puntos que forman un hexágono regular y están, por tanto, formando un círculo. Para tres variables, la matriz y sus dimensiones dependerán de la forma geométrica seleccionada [178]. En la Tabla 4 se muestra la matriz del diseño para 3 variables. Así, puede comprobarse que en los diseños Doehlert el número de niveles no es el

[174] Statgraphics Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville (USA), 2000.

[175] D.H. Doehlert, *Appl. Statist.* 19 (1970) 231.

[176] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061.

[177] Y. Hu, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 485 (1989) 311.

[178] A.M. García-Campaña, L. Cuadros Rodríguez, A. Lupiañez González, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 237.

Introducción General

mismo para todas las variables; por ejemplo, en el caso de un diseño para tres variables, una variable es estudiada a siete niveles, otra a cinco y otra es estudiada a tres. Esta propiedad permite una libre elección de qué factores van a ser estudiados en mayor o menor detalle. Aunque se pueden emplear diferentes criterios para asignar el número de niveles a cada factor, una regla general es seleccionar la variable con mayor efecto como el factor con más niveles para así obtener más información del sistema. El número de experimentos requeridos (N) viene dado por: $N = k^2 + k + C_0$, donde k es el número de variables y C_0 es el número de puntos centrales.

Una ventaja de este tipo de diseños es la posibilidad de secuenciación [179], ya que los experimentos pueden ser reutilizados cuando los límites del dominio experimental no han sido correctamente elegidos en un principio, siendo posible realizar experimentos adicionales para conseguir ampliar o reducir el dominio objeto de estudio.

Tabla 4. Matriz del diseño (niveles codificados) para 3 variables A, B y C

Exp.	A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0.5	0.866	0
4	0.5	0.289	0.817
5	-1	0	0
6	-0.5	-0.866	0
7	-0.5	-0.289	-0.817
8	0.5	-0.866	0
9	0.5	-0.289	-0.817
10	-0.5	0.866	0
11	0	0.577	-0.817
12	-0.5	0.289	0.817
13	0	-0.577	0.817

[179] J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros Rodríguez, M.F. Molina, Anal. Proc. 32 (1995) 375.

7 CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO

7.1 Validación de un método analítico

La validación de un método o procedimiento analítico, consiste en demostrar experimentalmente y formalmente su capacidad para la obtención de información analítica que sea útil para los requerimientos de un problema analítico específico. Este concepto de validación está enmarcado dentro de un contexto y definido para un problema analítico particular pero no necesariamente para otros.

La validación implica en primer lugar la verificación de la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud se define por la Norma ISO 5725 como *el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y un valor de referencia aceptado* [180]. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la veracidad y la precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la mejor precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios.

Para completar la validación de un método de análisis es necesario establecer otros parámetros de calidad del mismo, dentro de los cuales podemos incluir: rango lineal, linealidad, sensibilidad, selectividad, límites de detección y cuantificación.

7.1.1 Evaluación de la veracidad

La veracidad se define como *el grado de concordancia entre la media aritmética de un conjunto de resultados y el valor aceptado o de referencia* [180]. La evaluación de la veracidad consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor

[180] Norma ISO 5725, Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). International Organization for Standardization, Ginebra, 1994.

Introducción General

verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado. Ya que es imposible conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia. Este último puede ser obtenido mediante dos estrategias: empleando un estudio interlaboratorio o un estudio intralaboratorio.

Dentro de un laboratorio están disponibles dos alternativas para demostrar la veracidad de un método analítico: el uso de materiales de referencia y la comparación con métodos de referencia.

Antes de realizar las experiencias necesarias para demostrar la veracidad del método de análisis desarrollado es necesario evaluar si los constituyentes de las muestras sobre las que se aplicará el nuevo método de análisis generan errores sistemáticos constantes o proporcionales sobre la respuesta analítica. Estos efectos pueden comprobarse mediante comparación de las rectas de calibrado realizadas con patrones y presencia de la matriz.

La presencia de interferentes puede causar un error sistemático constante, manifestándose con valores no significativamente distintos de las pendientes de los calibrados con patrones y en presencia de la matriz, pero originando señales más altas (error por exceso) o más bajas (error por defecto) que las esperadas. El error sistemático debido a las interferencias puede corregirse restando a las medidas la media del blanco de matriz (con errores positivos), o bien tomando como ordenada en el origen el valor del blanco (con errores negativos).

El efecto matriz puede causar un error sistemático proporcional, manifestándose éste con un cambio de las pendientes de los calibrados con patrones o en presencia de matriz. Las dos soluciones posibles para reducir el efecto matriz son:

- 1) Preparar la serie de disoluciones patrón imitando la composición de la muestra, lo que se conoce como calibración externa y

2) Preparar la recta de calibrado de forma que todos los patrones contengan matriz en la misma cantidad. Este procedimiento se denomina método de adición de patrón. Se aplica cuando la matriz es compleja y no puede ser imitada artificialmente.

Ninguna de ambas soluciones ofrece garantías totales de que el error sistemático por efecto matriz se haya eliminado por completo, lo que obliga a validar la veracidad de los métodos analíticos mediante el uso de materiales de referencia y/o la comparación con métodos de referencia.

En la presente Memoria se han empleado dos metodologías diferentes para la estimación de la veracidad:

1. *Ensayos de recuperación*. En este caso, un material natural o sintético debe estar disponible de tal forma que tenga una matriz que sea similar o idéntica a la de la muestra y en el cual el analito no este presente; seguidamente cantidades conocidas del analito son añadidas a este blanco de matriz. La incertidumbre asociada al valor asignado está limitado exclusivamente al error que pueda cometerse en la adición de la cantidad de analito al material. El porcentaje de recuperación %R, se calcula dividiendo la cantidad neta encontrada con la cantidad añadida de analito al blanco de muestra, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_{encontrada}}{C_{añadida}} \cdot 100$$

Esta forma de validación de la veracidad es la aceptada en la Decisión 2002/657/EC [181], relativa a la validación de los métodos analíticos de control de residuos de fármacos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados, cuando no existen materiales de referencia certificados disponibles.

[181] Commission Decision 2002/657/EEC, Off. J. Eur. Comm. L 221 (2002) 23.

Introducción General

2. *Empleo de métodos de referencia.* Una alternativa al uso de materiales de referencia para la validación de la veracidad de un método analítico es el uso de un método de referencia del cual se conoce que puede aplicarse al mismo tipo de muestras y además está suficientemente evaluado, por ejemplo un método oficial o uno que ha sido previamente validado. El contenido de analito debe ser apropiado para los requerimientos de cada método. El procedimiento estadístico usado para determinar la veracidad es la comparación de 2 medias independientes (test de la *t de Student*).

Para iniciar el protocolo estadístico se evalúa si las varianzas de los dos métodos (s_1^2 y s_2^2) difieren o no significativamente. Se emplea la prueba F de Snedecor. Este test compara un valor del estadístico F, calculado como:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ (donde } s_1^2 > s_2^2 \text{)}$$

con un valor tabulado para n_1-1 y n_2-1 grados de libertad, a un nivel de significación del 5%, siendo n_1 y n_2 el número de medidas experimentales de cada uno de los métodos.

Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

que se compara con un valor de t-tabulada para (n_1+n_2-2) grados de libertad, siendo \bar{x}_1 y \bar{x}_2 las medias para cada método y s_p la desviación estándar ponderada calculada según la siguiente ecuación:

$$s_p = \frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Si existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

En este caso el *número de grados de libertad* se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\left[\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1} \right]} - 2$$

7.1.2 Evaluación de la precisión

La precisión mide el *grado de concordancia entre resultados independientes de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas* [180]. Matemáticamente la precisión se expresa por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). La desviación estándar relativa de la concentración, RSD(c), se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$RSD(c) = 100 \cdot s_c / c$$

donde s_c es la desviación estándar para cada una de las concentraciones, que puede obtenerse mediante la regresión lineal a partir del calibrado con datos replicados [182], y c el valor de la concentración considerada.

Asimismo, la precisión se puede expresar como RSD de la señal obtenida a partir de de una serie de medidas replicadas a una determinada concentración de analito.

La precisión se puede calcular en condiciones de *repetibilidad*, esto es, medidas realizadas en las mismas condiciones experimentales, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo, o de *reproducibilidad* donde las medidas se

Introducción General

realizan con el mismo método pero en diferentes laboratorios, con diferentes operadores, equipos, y distintos intervalos de tiempo. Puede estimarse también la precisión en situación intermedia, es decir, variaciones dentro de un mismo laboratorio, por ejemplo, medidas realizadas en diferentes días. A este parámetro se le denomina, *precisión intermedia*.

7.1.3 Cálculo de los parámetros de calidad

Generalmente, las metodologías empleadas en el cálculo de los parámetros de calidad requieren experimentos adicionales y específicos para cada parámetro. En esta Memoria estos parámetros se estimarán también a partir de los datos obtenidos en la experiencia de calibrado [182]. Los parámetros a evaluar serán:

- Linealidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Selectividad

Para ello, es necesario obtener la recta de calibrado a partir de una serie de réplicas de distintos patrones (se recomiendan tres réplicas para al menos cinco valores de concentración equi-espaciados sobre el intervalo de aplicación del método). Siempre que el método analítico lo permita, estos patrones deben de incluir al "blanco" como otro valor más (concentración de analito "cero"), ya que su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que las demás medidas.

Linealidad (Lin). La linealidad mide el grado de ajuste de los valores de señal medidos sobre la recta de calibrado. Habitualmente la linealidad se suele deducir a través de la desviación estándar de los residuales ($s_{R,c}$) o de los coeficientes de correlación (r) y de determinación (R^2).

[182] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, Anal. Lett. 26 (1993) 1243.

Límites de detección y cuantificación (LD y LQ). La capacidad de detección, límite de detección o concentración mínima detectable se define por la Norma ISO 11843 [183] para una probabilidad de falso positivo, α , como *la verdadera concentración neta de analito en el material a analizar la cual permite, con una probabilidad $1-\beta$ la correcta conclusión de que la concentración en el material analizado es diferente de la del blanco*. Se asocia con la menor concentración de analito en una muestra que puede ser separado del ruido de fondo, siendo posible su detección.

En esta memoria el límite de detección se calculará utilizando la recomendación IUPAC [184], como se indica en la siguiente ecuación:

$$LD = \Delta_{\alpha,\beta} \cdot s_{c0}$$

donde $\Delta_{\alpha,\beta}$ es el valor de la distribución de t no central, que tiene en cuenta tanto los grados de libertad como la posibilidad de cometer errores tipo I o error α (probabilidad de falsos positivos) o de tipo II o error β (probabilidad de falsos negativos), y viene dado por $\Delta_{\alpha,\beta} = t_{gl, \alpha} + t_{gl, \beta}$, si se considera igual probabilidad de error tipo I y tipo II ($\alpha = \beta = 5\%$), por lo que $\Delta_{\alpha,\beta} = 2 \cdot t_{gl, \alpha}$, siendo t, el valor de la t de Student de 1 cola.

El límite de cuantificación o determinación (LQ) es una medida de la capacidad de cuantificación inherente de un proceso de medida químico, es decir, el mínimo (verdadero) valor cuantificable. Se calcularía sustituyendo en la ecuación anterior el valor 3 por 10:

$$LQ = 10 \cdot s_{c0}$$

En cuanto al cálculo de s_{c0} (desviación estándar del valor de concentración cero o blanco), se ha realizado de los siguientes modos:

i) Cuando se pueden realizar medidas del blanco, el cálculo vendrá dado por:

[183] Norma ISO 11843, Capability of detection, Ginebra, Part 1, 1997 y Part 2, 2000.

[184] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemical, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC 2002.

Introducción General

$$s_{c0} = s_{R,0}/b$$

donde $s_{R,0}$ es la desviación estándar de las respuestas obtenidas para concentración cero. Este cálculo se ha empleado en el Capítulo 1 de la Memoria.

- ii) Otra posibilidad cuando se pueden realizar medidas del blanco es emplear el valor de la s_{c0} calculada a partir de la regresión lineal aplicada a los valores de la recta de calibrado [182], que incluye los valores medidos de la señal del "blanco", dada por la expresión:

$$s_{c0} = \sqrt{\left(\frac{s_{R,c}}{b}\right)^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + RSD_b^2 \cdot c_m^2}$$

donde: $s_{R,c}$ es la desviación estándar de regresión, b es la pendiente, n es el número total de puntos del calibrado, m es el número de réplicas para cada concentración del calibrado, RSD_b es la desviación estándar relativa de la pendiente y c_m la concentración media de todas las empleadas en el calibrado.

Este cálculo se ha empleado en el Capítulo 1 de la Memoria.

- iii) Cuando no es posible medir el blanco, es posible realizar el cálculo de s_{c0} a partir de una extrapolación de la desviación estándar a concentración "cero", aplicando los valores de la regresión lineal únicamente los valores de concentraciones bajos de la misma, próximos al valor esperado para el límite de detección, con objeto de realizar la extrapolación de forma más exacta [185], a partir de la ecuación anterior, considerando que el calibrado no incluye medidas a concentración cero.

Este cálculo se ha empleado en el Capítulo 3 de la Memoria.

[185] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, G. Van der Weken, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, *Biomed. Chromatog.* 12 (1998) 177.

iv) Otra alternativa cuando no es posible medir el blanco, es a partir del cálculo de la relación señal/ruido (S/N).

Este cálculo se ha empleado en los Capítulos 4 y 5 de la Memoria.

Selectividad. La selectividad y/o especificidad es uno de los parámetros básicos que caracterizan la calidad de un método analítico. Sin embargo, mientras que todas estas últimas son fácilmente definibles en términos cuantitativos, la selectividad (o la especificidad) han sido usados con diferentes interpretaciones y con imprecisas definiciones cuantitativas. En la práctica analítica se suele representar la selectividad a través de la cuantificación de la interferencia producida por una especie química concreta en la determinación de un analito en un procedimiento dado, de modo que se establece un nivel máximo de interferente que no produce interferencia.

La estrategia a seguir para decidir si una sustancia produce interferencia en la determinación de un analito será el medir la señal analítica correspondiente a la concentración de analito en estudio en presencia de una determinada concentración del posible interferente. Si el valor obtenido de señal no está incluido en el intervalo de confianza para la señal, establecido mediante la desviación estándar de la respuesta analítica, deducida a partir del calibrado, suponemos que ha producido un error sistemático superior al error aleatorio del método analítico asociado a ese nivel de concentración, y, por tanto, concluimos que es interferente; en cambio, si la señal se incluye en el intervalo de confianza calculado, concluimos que no hay interferencia [186].

Así, el intervalo de confianza en torno a la respuesta analítica para el nivel de concentración de analito considerado, usando la desviación estándar de la respuesta analítica, s_R , se establece como:

[186] A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, C. Jiménez Linares, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, Anal. Lett. 28 (1995) 369.

Introducción General

$$R \pm k \cdot s_R ; (k = 2, 3, 6 \text{ ó } t_{2\alpha})$$

calculando s_R a través de la expresión:

$$s_R = \sqrt{s_{R,c}^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + s_b^2 \cdot (c - c_m)^2}$$

donde c es la concentración de analito considerada y c_m la concentración media de los puntos del calibrado.

No serán consideradas interferentes aquellas concentraciones de sustancias extrañas en estudio que en presencia del nivel de concentración de analito considerada proporcionen una respuesta analítica R_x dentro del intervalo:

$$R_x \in R \pm k \cdot s_R$$

REACTIVOS

CAPÍTULO 1 y CAPÍTULO 2

Reactivos

Patrones

- Carbaril 99.5 %, suministrado por Dr. Ehrenstorfer
- Promecarb, Aldicarb y Carbofuran todos del 99.9 % suministrados por Chemservice
- Deltametrin, Fenvalerato, Acrinatrin, Clorpirifos y Clorpirifos Metil todos del 99 % suministrados por Riedel de Häen, y empleados en el estudio de interferentes

Reactivos para la reacción quimioluminiscente

- Bis(2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO), suministrado por Sigma-Aldrich
- Dodecil sulfato sódico (SDS), suministrado por Panreac
- Imidazol (1,3-diazo,2,4-ciclopentadieno), suministrado por Sigma-Aldrich
- Peróxido de hidrógeno (30% p/v), suministrado por Panreac
- Dihidrógeno fosfato sódico, suministrado por Panreac
- *Orto*-ftalaldehido (OPA), suministrado por Sigma-Aldrich
- N-Acetilcisteina (NAC), suministrada por Panreac
- Borato sódico, suministrado por Sigma-Aldrich
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), suministrado por Sigma-Aldrich

Otros reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q plus Ibérica)
- Sulfato sódico anhidro, suministrado por Panreac
- Hidróxido sódico, suministrado por Panreac

Reactivos, equipos y software

Disolventes orgánicos

- Metanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, todos ellos suministrados por Panreac, de grado HPLC

Cartuchos usados en la extracción en fase sólida

- C18, 500 mg, 3 ml, suministrados por Supelco
- SAX (*strong anion exchange*), 500 mg, 3 ml, suministrados por Supelco
- Alumina suministrada por Merck, cartuchos de 1.5 g fabricados en el laboratorio

Instrumentación

Las medidas de intensidad de quimioluminiscencia se han llevado a cabo usando un detector quimioluminiscente Jasco CL 1525, equipado con una célula de teflón en espiral.

Para construir el sistema FIA mostrado en la Figura 13, se usaron 2 bombas peristálticas Gilson Minipulse-3, dos válvulas manuales de inyección Rheodyne 5020, tubos de bomba de PVC y conectores y tubería de PTFE de 0.5 mm de diámetro interno.

Figura 13. Sistema FIA-CL.



Instrumentación auxiliar

- Granatario Sartorius CP-323-S
- Balanza analítica de precisión AND GR-120
- Micropipetas de volumen variable entre 5 y 1000 μl Transferpette Brand
- pH-metro Crison micro-pH 2000
- Rotavapor Büchi RE-121 con baño termostatzado
- Baño ultrasónico Selecta ultrasons
- Bomba de vacío Büchi B-169
- Sistema de extracción en fase sólida Supelco Visiprep DL
- Batidora Taurus Bapi 600 plus inox
- Material de vidrio, como pipetas graduadas y aforadas de distintos volúmenes, tubos con tapón de rosca, matraces aforados de distintos volúmenes, vasos diversos, matraz de fondo redondo de 100 ml
- Büchner y kitasatos
- Papel de filtro Millipore, de 0.45 μm de tamaño de poro
- Jeringas de 1 ml BD Plastipak
- Lámpara germicida de descarga de mercurio a baja presión, potencia de 8w y $\lambda = 250 \text{ nm}$

Software

La adquisición de señales se realizó con el correspondiente paquete informático (Biocrom 2000), trabajando bajo Windows 95.

El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con los programas Statgraphics Plus 5.0 y hojas de cálculo diseñadas en Excel 2003.

Para determinar los parámetros de calidad de los métodos propuestos se usó el programa informático ALAMIN [187].

[187] A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés-Barrero, M. Róman-Ceba, J.L. Sierra Fernández, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 381.

CAPÍTULO 3

Reactivos

Patrones

- Sulfapiridina (SPD), Sulfametazina (SMZ), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfadoxin (SDX), Sulfametoxazol (SMX) y Sulfadimetoxina (SDM), calidad Vetranal, suministrados por Riedel-de-Haën
- Sulfadiazina (SDZ), suministrados por Sigma–Aldrich

Reactivos para la reacción quimioluminiscente

- Bis(2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO), suministrado por Sigma-Aldrich
- Bis(2,4-dinitrofenil) oxalato (DNPO), suministrado por Wako
- Bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadeciloxycarbonil) fenil] oxalato (TDPO), suministrado por Wako
- Imidazol (1,3-diazo,2,4-ciclopentadieno), suministrado por Sigma-Aldrich
- Peróxido de hidrógeno (30% p/v), suministrado por Panreac
- Fluorescamina, suministrada por Sigma-Aldrich
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), suministrado por Merck

Disolventes orgánicos

- Metanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, cloroformo y hexano, todos ellos suministrados por Panreac, de grado HPLC

Otros reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q plus Ibérica)
- Hidróxido sódico, suministrado por Panreac
- Citrato trisódico 5 ½ hidratado, suministrado por Panreac
- Ácido cítrico, suministrado por Panreac

- Dihidrógeno fosfato sódico, suministrado por Panreac
- Hidrógeno fosfato disódico, suministrado por Panreac

Instrumentación

Para la realización de todas las medidas se empleó un equipo de cromatografía líquida modular (Figura 14) consistente en una bomba cuaternaria de alta presión (Jasco PU-2089) acoplada a un detector UV/Vis multicanal (Jasco UV-2077) seguido de un detector de quimioluminiscencia (Jasco CL-1525). La columna usada en la separación fue una Luna C18 ($5\mu\text{m}$, 100 \AA , $150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, Phenomenex), que llevaba acoplada una precolumna con un cartucho de 4 mm del mismo relleno. Las inyecciones se realizaron con un válvula manual Rheodyne 7725i con un bucle de $100\ \mu\text{l}$. Para introducir los reactivos de la reacción post-columna se usaron dos bombas de alta presión (Modelos PU-2085 y PU-2080, Jasco).

Figura 14. Sistema HPLC-CL.



Reactivos, equipos y software

Instrumentación auxiliar

- Granatario Sartorius CP-323-S
- Balanza analítica de precisión AND GR-120
- Micropipetas de volumen variable entre 5 y 1000 μ l Transferpette Brand
- pH-metro Crison micro-pH 2000
- Rotavapor Büchi RE-121 con baño termostatzado
- Baño ultrasónico Selecta ultrasons
- Bomba de vacío Büchi B-169
- Sistema de extracción en fase sólida Supelco Visiprep DL
- Material de vidrio, como pipetas graduadas y aforadas de distintos volúmenes, tubos con tapón de rosca, matraces aforados de distintos volúmenes, vasos diversos, matraz de fondo redondo de 100 ml
- Büchner y kitsatos
- Papel de filtro Millipore, de 0.45 μ m de tamaño de poro
- Jeringas de 1 ml BD Plastipak
- Filtros de Nylon 13 mm, 0.22 μ m de tamaño de poro, suministrados por Millipore
- Agitador Vortex-Genie 2, de Scientific Industries

Software

La adquisición de datos se realizó con el programa Jasco-Borwin v.1.5.

El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con los programas Statgraphics Plus 5.0 y hojas de cálculo diseñadas en Excel 2003.

CAPÍTULO 4

Reactivos

Patrones

- Sulfapiridina (SPD), Sulfametazina (SMZ), Sulfamerazina (SMR), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfametoxazol (SMX) y Sulfametizol (SMI), calidad Vetranal, suministrados por Riedel-de-Haën
- Sulfameter (SMT) y Sulfadiazina (SDZ), suministrados por Sigma–Aldrich

Disolventes orgánicos

- Metanol, acetonitrilo, todos ellos suministrados por Panreac, de grado HPLC

Cartuchos usados en la extracción en fase sólida

- Oasis® HLB, 60 mg, 3 cc, suministrados por Waters
- Alumina N, 500 mg, 3 cc, cartuchos fabricados en el laboratorio, Sulpelco

Otros reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q plus Ibérica)
- Hidróxido sódico, suministrado por Panreac
- Citrato trisódico 5 ½ hidratado, suministrado por Panreac
- Ácido cítrico, suministrado por Panreac
- Dihidrógeno fosfato sódico, suministrado por Panreac
- Hidrógeno fosfato disódico, suministrado por Panreac
- Borato sódico, suministrado por Panreac
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), suministrado por Merck
- Imidazol (1,3-diazo,2,4-ciclopentadieno), suministrado por Sigma–Aldrich

Reactivos, equipos y software

- Acetato amónico, suministrado por Panreac
- Ácido acético, suministrado por Panreac

Instrumentación

Para la realización de las medidas se empleó un equipo de electroforesis HP^{3D} CE (Agilent Technologies) equipado con un detector DAD UV/Vis, que se muestra en la Figura 15. Los capilares usados para realizar la separación fueron de sílice fundida de 64.5 cm × 75 µm i.d. (distancia efectiva 56 cm) con un paso óptico de 200 µm (capilar burbuja de Agilent Technologies).

Figura 15. Equipo de Electroforesis capilar con detección UV/Vis.



Instrumentación auxiliar

- Granatario Sartorius CP-323-S
- Balanza analítica de precisión AND GR-120

Reactivos, equipos y software

- Micropipetas de volumen variable entre 5 y 1000 μ l Transferpette Brand
- pH-metro Crison micro-pH 2000
- Rotavapor Büchi RE-121 con baño termostatzado y bomba de vacío
- Baño ultrasónico Selecta ultrasons
- Sistema de extracción en fase sólida Supelco Visiprep DL
- Bomba de vacío Büchi B-169
- Material de vidrio, como pipetas graduadas y aforadas de distintos volúmenes, tubos con tapón de rosca, matraces aforados de distintos volúmenes, vasos diversos, matraz de fondo redondo de 100 ml
- Jeringas de 1 ml BD Plastipak
- Filtros de Nylon, 13 mm, 0.22 μ m de tamaño de poro, suministrados por Millipore.
- Agitador Vortex-Genie 2 de Scientific Industries

Software

Los electroferogramas fueron adquiridos usando el software provisto por HP ChemStation versión A.09.01.

El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con los programas Statgraphics Plus 5.0 y hojas de cálculo diseñadas en Excel 2003.

CAPÍTULO 5

Reactivos

Patrones

- Sulfapiridina (SPD), Sulfadoxin (SDX), Sulfametazina (SMZ), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfamerazina (SMR), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfametoxazol (SMX) y Sulfametizol (SMI), calidad Vetranal, suministrados por Riedel-de-Haën
- Sulfameter (SMT), Sulfadiazina (SDZ), Trimetoprim (TMP) y Lomefloxacin (LOM), suministrados por Sigma-Aldrich

Disolventes orgánicos

- Metanol, acetonitrilo, isopropanol, todos ellos suministrados por Panreac, de grado HPLC

Cartuchos usados en la extracción en fase sólida

- Oasis® HLB, 60 mg, 3 cc, suministrados por Waters

Otros reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q plus Ibérica)
- Hidróxido sódico, suministrado por Panreac
- Acetato amónico, suministrado por Panreac
- Ácido acético, suministrado por Panreac
- Ácido fórmico, suministrado por Merck
- Formiato amónico, suministrado por Merck
- Bicarbonato amónico, suministrado por Fluka

Instrumentación

Las medidas se llevaron a cabo con un equipo de electroforesis HP^{3D} CE equipado con un detector DAD-UV/Vis, acoplado mediante una interfase coaxial de Agilent a un espectrómetro de masas Agilent 1100 series LC/MSD SL (Agilent Technologies), equipado con una trampa de iones (Figura 16). El líquido adicional necesario para cerrar el circuito eléctrico fue suministrado mediante una bomba de alta presión (modelo PU-2085 Jasco). Los capilares usados para realizar la separación fueron de sílice fundida de 96 cm × 50 μm i.d.

Figura 16. Equipo CE-MS.



Reactivos, equipos y software

Instrumentación auxiliar

- Granatario Sartorius CP-323-S
- Balanza analítica de precisión AND GR-120
- Micropipetas de volumen variable entre 5 y 1000 μ l Transferpette Brand
- pH-metro Crison micro-pH 2000
- Rotavapor Büchi RE-121 con baño termostatzado
- Baño ultrasónico Selecta ultrasons
- Sistema de extracción en fase sólida Supelco Visiprep DL
- Bomba de vacío Büchi B-169
- Material de vidrio, como pipetas graduadas y aforadas de distintos volúmenes, tubos con tapón de rosca, matraces aforados de distintos volúmenes, vasos diversos, matraz de fondo redondo de 100 ml
- Jeringas de 1 ml BD Plastipak
- Filtros Nylon 13 mm, 0.22 μ m de tamaño de poro, Nylon suministrados por Millipore.
- Agitador Vortex-Genie 2, de Scientific Industries

Software

Los electroferogramas UV/Vis fueron adquiridos usando el software provisto por la HP ChemStation versión A.09.01.

El espectrómetro de masas se controló mediante el programa Esquiro software 4.1, de Bruker Daltonics, mientras que los datos producidos fueron tratados con el programa LC/MSD Trap software 4.1, Agilent.

El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con los programas Statgraphics Plus 5.0 y hojas de cálculo diseñadas en Excel 2003.

INTRODUCCIÓN BLOQUE I

ANÁLISIS DE CARBAMATOS

1 ANTECEDENTES

El análisis de microcontaminantes orgánicos en muestras medioambientales y de alimentos es uno de los retos más importantes que actualmente tiene planteados la Química Analítica. Así, la elevada toxicidad de numerosos compuestos obliga a disponer de métodos analíticos fiables y suficientemente sensibles que permitan su control en diversos tipos de muestras existiendo una fuerte demanda social para controlar todo tipo de contaminantes. Por otro lado, sólo es posible establecer legislaciones restrictivas sobre niveles de contaminantes cuando existan métodos adecuados para su análisis a niveles de trazas y ultratrazas.

Entre todos los contaminantes orgánicos, son los plaguicidas los que han recibido mayor atención. Su demostrada toxicidad y elevado uso en todo el planeta, así como las posibilidades de contaminación directa en productos de consumo humano, como alimentos o aguas, son las causas de su carácter prioritario como contaminantes a controlar [188]. Sin duda, cada vez es mayor la inquietud de la sociedad por la calidad toxicológica de los alimentos y más concretamente por los niveles de residuos de compuestos tóxicos en los mismos. Los residuos de plaguicidas afectan tanto a la economía como a la salud pública, ya que su presencia, además de constituir una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales, constituye un riesgo para la salud de los consumidores. De este modo, el tema se ha convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios que más interés despierta entre los consumidores de todo el mundo y actualmente recibe un gran esfuerzo investigador en todos los campos.

Muchos de los plaguicidas son contaminantes orgánicos persistentes, encontrándose entre los compuestos más peligrosos producidos. Por esta razón, el uso de muchos de sus derivados ha sido prohibido en todo el

[188] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.

Introducción Bloque I

mundo. Sin embargo, en medio siglo de producción, la industria química mundial ha generado una elevada cantidad de estos compuestos que se han difundido por todo el planeta, contaminando prácticamente a todos los seres vivos hasta en las tierras más remotas. Probablemente, la consecuencia de mayor alcance derivada del uso de los plaguicidas es su contribución a la contaminación y degradación del ambiente debido a su acumulación en los ecosistemas acuático y terrestre pasando, a través de la cadena alimentaria, a las especies animales y, por último, al hombre.

De este modo, la elevada toxicidad de los plaguicidas y su uso en cultivos que pueden ser consumidos por animales obliga a disponer de métodos analíticos fiables y suficientemente sensibles que permitan su control tanto en el medioambiente como en alimentos.

2 CONCEPTOS GENERALES SOBRE PLAGUICIDAS

El término "Plaguicida" incluye cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas (entendiendo como tales cereales en bruto, remolacha azucarera y semilla de algodón que no se consideran alimentos) o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos [189,190]. Así, se incluyen las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte. El término no incluye normalmente a los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos veterinarios.

Según datos de la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), dos tercios de la Humanidad están subalimentados, lo que implica que el aumento de la producción agrícola sea una necesidad primordial, para lo cual es necesario incrementar tanto las áreas de cultivo como el rendimiento de las explotaciones. Las pérdidas causadas por las plagas son muy elevadas por lo que se pone de manifiesto la necesidad del empleo de los plaguicidas. Considerando en primer lugar, el elevado número y variedad de parásitos existentes en la naturaleza, y en segundo lugar, la capacidad de algunas especies para desarrollar resistencias a determinados

[189] Carbamate Pesticides: A General Introduction, Environmental Health Criteria, World Health Organization, Ginebra, 1986, Capítulo 7.

[190] Pesticides, Veterinary and Other Residues in Food, ed. Watson, D., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004.

Introducción Bloque I

compuestos químicos, se hace necesaria la aplicación de nuevos principios activos para combatirlos.

El uso de los plaguicidas es relativamente reciente, señalándose su introducción a principios del siglo pasado con el descubrimiento de la acción plaguicida de algunos compuestos como el azufre, los arseniatos y el sulfato de cobre, entre otros. A partir de 1922 el desarrollo se hace más rápido y tiene su punto de partida en la utilización de aceites insecticidas en Holanda, descubriéndose también en este periodo la acción insecticida del pelitre y la rotenona. Sin embargo, es a partir del descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT, realizado por Müller en 1940, cuando se suceden con rapidez los descubrimientos de nuevos plaguicidas.

Esto ha permitido un aumento en los rendimientos agropecuarios así como en el bienestar humano, pero a la vez, su uso indiscriminado ha provocado en ocasiones un grave problema de contaminación en aguas, suelos, vegetales y aire, entre otros. De aquí el interés que en la actualidad presenta el desarrollo de métodos de análisis de estos compuestos por parte de los investigadores, así como el descubrimiento de nuevas sustancias con acción plaguicida.

Los plaguicidas se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios. Una primera clasificación se puede realizar atendiendo al tipo de parásitos a los que se dirige principalmente su acción [189]:

- 1.- *Insecticidas*: luchan contra insectos.
- 2.- *Acaricidas*: combaten la araña roja y los ácaros.
- 3.- *Antibióticos* de uso agrícola: luchan contra las bacteriosis propias de los cultivos.
- 4.- *Herbicidas*: luchan contra las malas hierbas, ya sea de un modo general o selectivo, es decir, dejando indemne el cultivo y destruyendo todas o buena parte de las hierbas adventicias (malas hierbas).
- 5.- *Fungicidas*: actúan contra los hongos causantes de enfermedades en los cultivos.

6.- *Rodenticidas*: se emplean contra las ratas, ratones y topillos.

7.- *Nematicidas*: son usados contra los nematodos.

8.- *Desinfectantes* del suelo: su acción se extiende a nematodos, insectos, hongos y malas hierbas que se encuentran en los suelos destinados a cultivo.

Por otra parte, la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han establecido varios parámetros relacionados con aspectos tóxicos para salvaguardar la salud de los consumidores. Algunos de estos parámetros han sido fijados por las principales agencias de control, y sus definiciones se recogen a continuación [191]:

Residuo de plaguicida

Por "Residuo de plaguicida" se entiende cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica, considerando tanto los residuos de procedencias desconocidas o inevitables (por ejemplo, ambientales), como los derivados de usos conocidos de la sustancia química.

Buenas prácticas agrícolas en el uso de plaguicidas (BPA)

Como BPA se entienden los usos inocuos autorizados a nivel nacional, en las condiciones existentes, de los plaguicidas necesarios para un control eficaz y fiable de las plagas. Comprende una gama de niveles de aplicaciones de plaguicidas hasta la concentración de uso autorizado más elevada, de forma que quede la concentración mínima posible del residuo. Los usos inocuos autorizados se determinan a nivel nacional y prevén usos

[191] Ministerio de trabajo y asuntos sociales. <http://www.mtas.es/insht>

Introducción Bloque I

registrados o recomendados en el país que tiene en cuenta las consideraciones de salud pública y profesional, y la seguridad del medio ambiente. Las condiciones existentes comprenden cualquier fase de la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos para consumo humano y piensos.

Límite máximo para residuos de plaguicida (LMR)

El LMR es la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg kg^{-1}), recomendada por la *Comisión del Codex Alimentarius*, para que se permita legalmente su uso en la superficie o la parte interna de productos alimenticios para consumo humano y de piensos. Los LMRs se basan en datos de BPA y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMRs sean toxicológicamente aceptables.

Los LMRs del Codex, que se destinan principalmente para ser aplicados a productos que circulan en el comercio internacional, se obtienen basándose en estimaciones hechas por la JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*), después de:

- a) la evaluación toxicológica del plaguicida y su residuo
- b) el examen de datos de residuos obtenidos en ensayos y usos supervisados, en particular usos que se ajustan a las BPA nacionales. En el examen se incluyen datos de ensayos supervisados realizados a la concentración de uso más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país. Para tener en cuenta las variaciones introducidas en los requisitos nacionales de control de plagas, en los LMRs del Codex se consideran los niveles más elevados observados en tales ensayos supervisados, que se estima representan las prácticas efectivas de control de plagas.

El examen de las diversas estimaciones y determinaciones, tanto a nivel nacional como internacional, de la ingesta de residuos a través de la alimentación, teniendo en cuenta la ingesta diaria admisible (IDA), debería

indicar que los alimentos que se ajustan a los LMRs del Codex son inocuos para el consumo humano. La legislación sobre los LMRs deriva de cuatro Directivas fundamentales, 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE. Recientemente, estas directivas se han sustituido por una legislación única a escala comunitaria (Reglamento CE nº 396/2005) relativa a los LMR de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal [Diario Oficial L 70 de 16.3.2005]. El reglamento reúne en un solo texto y armoniza los límites aplicables a los diferentes productos destinados a la alimentación humana y animal, y fija un límite máximo de 0.01 mg kg⁻¹ aplicable por defecto. El texto elimina las diferencias en los LMRs nacionales de los diferentes países de los Estados miembros, facilitando el funcionamiento del mercado interior, así como con terceros países.

Ingestión diaria tolerable provisional (IDTP)

Representa la ingestión humana tolerable de un plaguicida utilizado anteriormente en la agricultura que puede aparecer como contaminante de un alimento, el agua potable y el medio ambiente [192].

Ingestión diaria admisible (IDA)

La IDA de una sustancia química es la dosis diaria que, ingerida durante todo el período vital, parece no entrañar riesgos apreciables para la salud del consumidor, sobre la base de todos los hechos conocidos en el momento de la evaluación de la sustancia química por la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas [193]. Se expresa en miligramos de sustancia química por kilogramo de peso corporal.

[192] Informe de la JMPR de 1995, documento de la serie FAO: Producción y protección vegetal, nº 127, p 5.

[193] Informe de 1975 de la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas, Estudios FAO: Producción y protección vegetal nº 1, ó OMS: Serie de Informes Técnicos, nº 592.

Introducción Bloque I

Ingestión diaria admisible temporal (IDAT)

Por IDAT se entiende la dosis de ingestión diaria admisible establecida para un período limitado especificado, con objeto de poder obtener más datos bioquímicos, toxicológicos o de otra índole que se necesiten para estimar una dosis de ingestión diaria admisible. (Nota: Cuando la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas estima una IDAT suele aplicar un factor de seguridad más amplio que el utilizado al estimar una IDA).

Medida de la toxicidad de un plaguicida

La toxicidad de los plaguicidas puede expresarse de un modo cuantitativo para animales de experimentación de distintas formas. Así, se denomina dosis letal media, representada como DL_{50} , al número de mg de ingrediente activo, por kg de peso corporal, necesario para producir la muerte del 50% de una gran población de animales de prueba.

Según se realice la administración del producto puede distinguirse entre:

- DL_{50} oral aguda: se determina administrando una sola vez una dieta, con una determinada cantidad de tóxico en estudio, a varios grupos iguales de animales.
- DL_{50} oral crónica: se determina mediante la observación de los efectos producidos en los distintos grupos de animales de experimentación tras la administración en la dieta diaria de cantidades distintas del producto para cada uno de los lotes durante un tiempo determinado. Se expresa como $mg\ kg^{-1}$ de plaguicida presente en la dieta alimenticia, durante el tiempo que se especifique, que producen efectos señalados.
- DL_{50} dérmica: valora las posibilidades de intoxicación por absorción del plaguicida a través de la piel y representa la cantidad de sustancia necesaria para producir la muerte del 50% de los animales de un lote de investigación, cuando se ha procedido a la fijación del tóxico

sobre su piel mediante pincelación del mismo en estado puro o en disolución de la concentración que se indique.

3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBAMATOS

3.1 Acción de los carbamatos

Los carbamatos constituyen una familia de compuestos que provienen originalmente de la extracción del haba de calabar, que crece en el oeste de África. Los extractos de esta planta contienen fisostigmina, un éster de metilcarbamato [194].

Su uso como plaguicidas comenzó en la década de los 50, y aproximadamente en la actualidad se encuentran unos 25 compuestos que se emplean como plaguicidas o fármacos, encontrándose entre los plaguicidas más populares tanto para uso doméstico como para uso agrícola. Se emplean comúnmente como insecticidas, debido a su efecto neurotóxico como inhibidores reversibles de la enzima colinesterasa, siendo mortales a dosis elevadas. Sus características principales son alta toxicidad, estabilidad baja y nula acumulación en tejidos finos orgánicos. Afectan a los mamíferos a través de la piel, vía respiratoria y vía digestiva.

Según su modo de acción, los carbamatos se pueden clasificar en dos grupos principales [194]:

- (i) Inhibidores de la enzima colinesterasa, entre ellos monometilcarbamatos y dimetilcarbamatos, que se emplean fundamentalmente como insecticidas (tanto de contacto como sistémicos), pero también como miticidas, rodenticidas y nematocidas. Asimismo, se emplean en el tratamiento del glaucoma y la miastenia.
- (ii) Inhibidores de la enzima colinesterasa por carbamitación del sitio esteárico de la enzima, e inhibidores de la acetilcolinesterasa ya que

[194] G. Cecchine, B.A. Golomb, L.H. Hilborne, D.M. Spektor, C.R. Anthony, "A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illnesses, Vol 8: Pesticides", The Rand Corporation, 2000, New York, Capítulo 7.

Introducción Bloque I

impiden su desesterificación, como los metilcarbamatos y dimetilcarbamatos. Entre ellos, algunos inhiben selectivamente a la acetilcolinesterasa (que se encuentra en las células rojas sanguíneas y tejido nervioso), a la butirilcolinesterasa (que se encuentra en el plasma) o a ambas.

En general, los síntomas producidos por la exposición del organismo a la acción de los carbamatos incluyen fatiga, dolor en las articulaciones y muscular, efectos sobre el sueño, dolor de cabeza, afecciones cutáneas, efectos cognitivos y neurológicos.

3.2 Distribución y transporte en el medioambiente

En general, la presión de vapor de los carbamatos es baja. Sin embargo, pueden evaporarse o sublimar lentamente a temperatura ambiente, lo que puede dar lugar a la volatilización de los carbamatos contenidos en el agua o el suelo. De todos modos, la distribución por vía aérea es minoritaria, mientras que el agua es una importante ruta de distribución para los carbamatos muy solubles en ésta. La absorción de luz característica de los carbamatos contribuye a su rápida descomposición (por fotodegradación o fotodescomposición) en medio acuoso. Por tanto, el riesgo de contaminación a largo plazo por parte de los carbamatos es pequeño.

Los carbamatos con propiedades insecticidas se emplean fundamentalmente en tratamientos agrícolas, por lo que pueden alcanzar el suelo, mientras que los nematocidas y herbicidas se aplican directamente sobre éste. Hay varios factores que pueden influenciar la biodegradación de los carbamatos en el suelo, como su volatilidad, el tipo de suelo, la humedad de éste, adsorción, pH, temperatura, y fotodescomposición. Ya que los distintos carbamatos presentan a su vez propiedades diferentes, cada uno de ellos deberá ser evaluado individualmente, sin poder extrapolar los resultados de unos a otros. Así, mientras algunos carbamatos se descomponen con facilidad, otros pueden ser fuertemente adsorbidos en el

suelo o pasar fácilmente del suelo al agua, y en este proceso el tipo de suelo y la solubilidad del carbamato juegan un papel muy importante. Más aún, hay que tener en cuenta que todo lo anterior no sólo es aplicable al carbamato, sino también a sus productos de degradación o metabolitos.

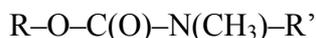
Las condiciones medioambientales que favorecen el crecimiento de microorganismos también favorecen la degradación de los carbamatos. El primer paso en la degradación metabólica de los carbamatos en suelo es su hidrólisis, y los productos de esta hidrólisis serán posteriormente metabolizados en el sistema suelo-planta por la acción de microorganismos, plantas y animales o por ruptura en el agua o suelo. Así, los microorganismos del suelo son capaces de metabolizar (hidrolizar) carbamatos y pueden adaptarse fácilmente a la metabolización de diversos tipos de carbamatos. Sin embargo, los carbamatos y sus metabolitos pueden, a dosis elevadas, afectar a la microflora y causar cambios que pueden afectar a la productividad del suelo.

Aunque los carbamatos no son muy estables en medios acuosos, y no persisten durante mucho tiempo en el ambiente, pueden producirse efectos bioacumulativos en peces, debido a que el metabolismo en estos animales es muy lento. Algunos carbamatos se metabolizan rápidamente sin efectos acumulativos, mientras que otros son altamente tóxicos para invertebrados y peces [189].

Por todo esto, con objeto de evaluar el efecto de los carbamatos en el medioambiente, hay que referirse a cada carbamato en concreto.

3.3 Estructura y propiedades físico-químicas de los carbamatos

Los carbamatos tienen la estructura común:



donde R puede ser un alcohol, una oxima o un fenol, y R' puede ser un hidrógeno o un grupo metilo. Asimismo, pueden presentar diversas acciones según los sustituyentes que presenten:

Introducción Bloque I

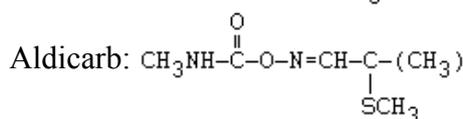
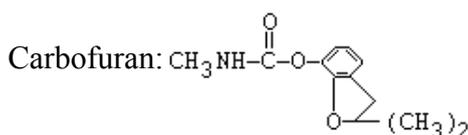
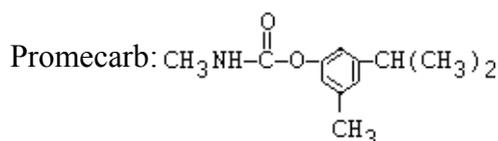
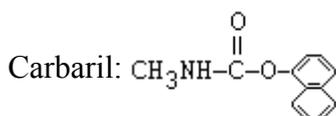
- *Metilcarbamatos*, de acción insecticida
- *Carbamatos*, de acción fungicida
- *Ditiocarbamatos*, de acción fungicida
- *Tiocarbamatos*, de acción herbicida
- *Fenilcarbamatos*, de acción herbicida

En general, los ésteres simples o derivados N-sustituídos del ácido carbámico, son compuestos inestables, especialmente bajo condiciones alcalinas. Las sales y ésteres del ácido carbámico son más estables que el ácido. Este incremento de la estabilidad es la base de la síntesis de muchos derivados que actúan como plaguicidas.

Los ésteres de carbamato son sólidos cristalinos de baja presión de vapor, con solubilidades variables, pero normalmente bajas, en disoluciones acuosas. Son moderadamente solubles en disolventes como benceno, tolueno, xileno, cloroformo, diclorometano, y 1,2-dicloroetano. En general, son escasamente solubles en disolvente no polares, pero muy solubles en disolventes polares orgánicos como metanol, etanol, acetona, dimetilformamida, etc.

Los derivados de los carbamatos con acción herbicida son más estables a la hidrólisis alcalina que los metilcarbamatos, con acción insecticida. Por ejemplo, la vida media del carbaril es de 15 min a pH 10, y de 10 días a pH 7 [189].

La estructura química de los cuatro carbamatos estudiados en esta Memoria, se muestran a continuación:



4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBAMATOS

El análisis de residuos de plaguicidas consta generalmente de los siguientes pasos: muestreo de la matriz a analizar, extracción del residuo de plaguicida, eliminación de las sustancias interferentes de la matriz, e identificación y cuantificación del contaminante. Las muestras deben ser altamente representativas, teniendo en cuenta que el modo en que el material a analizar es muestreado, almacenado y manipulado puede tener gran influencia en el resultado final.

Existen publicados diversos métodos para la determinación de carbamatos, dependiendo de las propiedades físicas y químicas de los compuestos de interés [195,196,197,198,199,200]. En cualquier caso, los métodos analíticos actuales no pueden garantizar la ausencia absoluta de ningún plaguicida en los alimentos o en el agua, pero han mejorado lo suficiente como para detectar bajas cantidades de éstos, del orden de las $\mu\text{g kg}^{-1}$ en productos vegetales y alimentos derivados de animales y del orden de los $\mu\text{g l}^{-1}$ en aguas.

Dentro de las técnicas más utilizadas para la determinación de carbamatos se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección UV/Vis, fluorescencia y espectrometría de masas. La cromatografía de gases ha sido menos empleada debido a la inestabilidad térmica de muchos carbamatos [201,202,203]. La aplicación de estas

-
- [195] B. Mayer-Helm, L. Hofbauer, J. Mueller, *Rapid Commun Mass Sp* 20(4) (2005) 529.
[196] K. Fytianos, K. Pitarakis, E. Bobola, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 86(1-2) (2006) 131.
[197] P. Morrica, P. Fidente, S. Seccia, *Biomed Chromatogr.* 19(1) (2005) 107.
[198] I. Borkovcova, E. Janouskova, I. Rehurkova, J. Ruprich, *Central European Journal of Public Health* 12(4) (2004) 220.
[199] J. Haib, I. Hofer, J. Renaud, *J. Chromatogr. A* 1020(2) (2003) 173.
[200] W. Yuan Sheng, L. Hian Kee Li, F. Sam, *Anal. Chem.* 72(7) (2000) 1441.
[201] E. Petropoulou, A. Tsarboboulos, P. Siskos, A. Panayotis. *Anal. Bioanal. Chem.* 385(8) (2006) 1444.

Introducción Bloque I

técnicas al análisis de carbamatos han sido objeto de un artículo de revisión [204].

El método más usual para la determinación de N-metilcarbamatos (NMCs) en muestras medioambientales y alimenticias, está basado en la detección fluorimétrica, previa separación en HPLC, llevando a cabo una hidrólisis básica a elevadas temperaturas de los mismos en modo post-columna, para producir metilamina (MA), formando posteriormente un derivado fluorescente de ésta con *orto*-ftalaldehído (OPA), en disolución de mercaptoetanol y borato sódico. Este método ha sido aceptado como protocolo oficial para el análisis de carbamatos en agua [205]. El proceso de formación de un derivado de la amina con OPA y su determinación posterior mediante fluorescencia se ha acoplado a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) y aplicado a la determinación de diversas sustancias que contienen aminas secundarias o amidas en fármacos [206,207], aunque no se han proporcionado límites de detección, ya que el propósito de estos artículos era la descripción de métodos quimiométricos para la optimización y evaluación del sistema FIA empleado. Sin embargo, no hemos encontrado aplicaciones de esta reacción de formación del derivado fluorescente acoplada a FIA para el análisis de carbamatos que actúan como plaguicidas, aunque si se ha publicado un método basado en el acoplamiento FIA con detección fluorescente que ha sido utilizado para la determinación de carbamatos que muestran fluorescencia nativa (benomil y

[202] E. Petropoulou, A. Tsaropoulos, P Siskos, A. Panayotis, J. Chromatogr. A 1108(1) (2006) 99.

[203] Q. Wang, A. Lemley, J. Agric. Food Chem. 50(8) (2002) 2331.

[204] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, J. Chromatogr. A 882 (2000) 175.

[205] EPA Method 531.1., Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatisation (1995) Revision 3.1.

[206] C. Vannecke, E. Van Gyseghem, M.S. Bloomfield, T. Coomber, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta 446 (2001) 413.

[207] C. Vannecke, M.S. Bloomfield, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta 455 (2002) 117.

carbendazim), aplicándose al análisis de éstos en aguas, con límites de detección de 3.0 y 7.5 ng ml⁻¹ para el carbendazim y el benomil, respectivamente [208]. Sin embargo, este método presenta el inconveniente de la falta de selectividad.

4.1 Uso de la quimioluminiscencia en el análisis de carbamatos

La quimioluminiscencia (CL) constituye una técnica de detección escasamente aplicada en el análisis de residuos de plaguicidas. Como parte de esta Memoria, se ha llevado a cabo una extensa revisión bibliográfica de su empleo para la determinación de plaguicidas en función de los distintos tipos de reacciones CL empleadas en fase líquida y considerando los diferentes acoplamientos a sistemas en flujo y técnicas separativas y las matrices analizadas. Esta revisión ha dado lugar a la publicación de un artículo [209] que se presenta como Anexo.

Entre los diferentes sistemas CL empleados con fines analíticos en el control de residuos de plaguicidas, la reacción de los peroxioxalatos (PO) es una de las más eficaces. Esta reacción ha sido empleada para la determinación simultánea de residuos de algunos NMCs (carbaril, carbofuran y propoxur) mediante el acoplamiento HPLC-CL [210]. El método se basa en la hidrólisis pre-columna de los mismos y derivatización de los compuestos fenólicos obtenidos con cloruro de dansilo para formar el correspondiente derivado fluorescente que participa como fluoróforo en la reacción de los POs usando TCPO. El método se ha aplicado a la determinación de estos plaguicidas en muestras de zumo, con límites de detección en el rango de los µg l⁻¹. De un modo similar, los mismos autores han propuesto la determinación de dos fenilcarbamatos (profan y

[208] J.F. García Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, Anal. Chim. Acta 493 (2003) 35.

[209] L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 927.

[210] E. Orejuela, M. Silva, J. Chromatog. A 1007 (2003) 197.

Introducción Bloque I

clorprofan) mediante HPLC, previa hidrólisis de los analitos, cuyos productos de degradación (anilina y 3-cloroanilina) reaccionan con cloruro de dansilo para formar el correspondiente fluoróforo, participando en la reacción CL post-columna usando TCPO [211]. El método se ha aplicado a la determinación de estos plaguicidas en patatas.

En esta parte de la Memoria se proponen dos métodos de análisis para la determinación de carbamatos, basados en el acoplamiento FIA-CL empleando la reacción de los POs. Uno de ellos se aplica a la cuantificación de carbaril en alimentos vegetales y agua, y el otro en la determinación semicuantitativa del índice total de residuos de carbamatos en aguas.

[211] E. Orejuela, M. Silva, Anal. Lett. 37 (2004) 2531.

DETERMINACIÓN DE CARBARIL MEDIANTE FIA-CL EN AGUAS Y PEPINO

1 INTRODUCCIÓN

Considerando la necesidad de disponer de métodos analíticos sensibles para la evaluación de la contaminación de residuos de estos plaguicidas en alimentos vegetales y muestras ambientales y teniendo en cuenta la potencialidad que ofrece la detección CL y los escasos antecedentes de su aplicación, el objetivo principal de esta parte de la Memoria es la puesta a punto de un procedimiento analítico simple, rápido y sensible para la determinación de uno de los carbamatos más comúnmente empleados, el carbaril.

Para ello, se ha utilizado el análisis por inyección en flujo (FIA) acoplado a un detector CL, usando uno de los sistemas CL más eficaces aún poco explorado en este ámbito, la reacción de oxidación de los peroxioxalatos (POs). Del mismo modo que el derivado MA-OPA se ha empleado en detección fluorimétrica, consideramos su utilización como fluoróforo en el sistema CL de POs, siendo así posible la determinación CL de carbaril. De esta manera se pretende poner de manifiesto la utilidad de esta detección en el análisis de estos residuos en alimentos vegetales y agua.

Así, el estudio que se propone implica los siguientes pasos:

- Conversión previa del carbaril a MA
- Obtención de un derivado fluorescente por reacción offline de la MA con OPA (MA-OPA)
- Selección de la configuración FIA-CL más adecuada para la aplicación de la reacción CL de los POs como sistema de detección
- Estudio del sistema CL que empleará 2,4,6-triclorofeniloxalato (TCPO) como precursor CL, peróxido de hidrógeno como agente oxidante e imidazol como catalizador, participando el derivado MA-OPA como fluoróforo, al que el intermediario de la reacción en estado excitado cederá su energía, que posteriormente será emitida en forma de emisión luminosa al regresar el fluoróforo del estado excitado al estado fundamental. Esta

energía, de longitud de onda característica del agente fluorogénico empleado (OPA) será proporcional a la concentración de MA y a su vez proporcional a la concentración de carbaril inicial, siendo posible la propuesta del correspondiente método analítico.

1.1 Consideraciones generales sobre el carbaril

El carbaril es un insecticida de amplio espectro que controla más de 100 clases de insectos sobre cítricos, fruta, algodón, bosques, césped, nueces, árboles de sombra, ornamentales y otras plantas, a la vez que sobre carne de ave, ganado y mascotas. El carbaril produce efecto ya sea ingerido por la plaga vía estómago o absorbido a través del contacto directo.

1.1.1 Efectos toxicológicos

A continuación se enumeran algunos términos relativos a la toxicidad del carbaril.

Toxicidad aguda: El carbaril es muy tóxico a altas ingestas. Así, puede producir efectos adversos en seres humanos por el contacto con la piel, la inhalación o la ingestión. Los síntomas de la toxicidad aguda son los característicos de otros carbamatos. El contacto directo y continuado con la piel o los ojos con niveles regulares de este pesticida puede causar quemaduras. La inhalación o la ingestión de cantidades muy grandes pueden ser tóxicas en los sistemas nerviosos y respiratorios que como resultado producen náuseas, calambres de estómago, diarrea y salivación excesiva. Otros síntomas en dosis altas incluyen sudoración, visión borrosa, falta de coordinación y convulsiones. Los trabajadores tienen el potencial más grande para la exposición al plaguicida a través de la inhalación o a través

de la piel, mientras que el riesgo más alto de exposición del público en general es a través de la ingestión de comida contaminada [212].

Toxicidad crónica: Aunque podría causar irritación de piel y ojos, el carbaril no parece ser un riesgo crónico importante para la salud en o por debajo de los niveles regulados.

Efectos reproductores y teratogénicos: No se observó ningún efecto reproductor o fetal durante un estudio a largo plazo de ratas que se alimentaron con dosis elevadas de carbaril [213]. Los resultados para los efectos teratogénicos atribuibles a la exposición crónica son mínimos en las pruebas con animales. Los defectos congénitos en conejo y vástagos de cobaya ocurrieron solamente en niveles de dosis que eran muy tóxicos para la madre. En 1980 un estudio epidemiológico en un pueblo de Nueva Jersey no descubrió pruebas de posibles defectos congénitos debidos al excesivo rociado con carbaril para el control de polilla. Hay solamente pruebas limitadas de que el carbaril cause defectos congénitos en seres humanos. La EPA ha concluido que el carbaril no produce un riesgo teratogénico a los humanos si se usa apropiadamente [214].

Efectos mutagénicos: Numerosos estudios indican que el carbaril supone un leve riesgo [213,215]. Sin embargo, el carbaril puede reaccionar con nitritos bajo ciertas condiciones para dar el N-nitrosocarbaril. Se ha demostrado que el N-nitrosocarbaril es muy mutagénico en niveles bajos en sistemas de prueba de laboratorio. Ésta puede ser una preocupación para los

[212] R.L. Baron, "Carbamate Insecticides en Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 3, Classes of Pesticides", W.J. Hayyes, Jr. y E.R. Lawes, Jr. (Ed.) Academic Press, Inc. New York 1991.

[213] National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Carbaryl. February 4, (1992).

[214] ACGIH. Documentation of Threshold Limit Values and Biological Indices. American Conference of Governmental and Industrial Hygienists, Inc., Cincinnati, OH. (1991).

[215] D. Siebert, G. Eisenbrand, Mutat. Res. 22 (1974) 121.

humanos porque hay una posibilidad de que el carbaril, un plaguicida, y nitrito, una sustancia que se encuentra en los aditivos de los alimentos y en la saliva humana, puedan reaccionar en el estómago humano para formar el N-nitrosocarbaril. Asimismo, el carbaril puede afectar la mitosis celular y cromosomas en las ratas [216].

Efectos cancerígenos: El carbaril no ha causado tumores en diez estudios de larga duración en ratones y ratas. Se administraron a ratas altas dosis diarias del plaguicida durante dos años, y a los ratones durante dieciocho meses, sin encontrar señales de carcinogenia. Sin embargo, el N-nitrosocarbaril, formado por la reacción de carbaril y nitrito, se ha mostrado como carcinogénico en ratas a dosis elevadas [217].

Toxicidad en órganos: La ingestión de carbaril afecta los pulmones, los riñones y el hígado. La inhalación también puede afectar a los pulmones. Pueden ocurrir daños en el sistema nervioso después de la administración de altas dosis durante 50 días en ratas y cerdos. Algunos estudios indican que el carbaril puede afectar el sistema inmunológico en animales e insectos. Sin embargo estos efectos no han sido documentados en seres humanos.

Efectos en seres humanos y animales

La mayoría de los animales, incluyendo seres humanos, degradan el carbaril fácilmente y lo excretan rápidamente en la orina y las heces. Trabajadores expuestos a la inhalación de carbaril en polvo excretaron el 74% de la dosis inhalada en orina en forma de productos de degradación. La metabolización del 85 % del carbaril ocurrió en menos de 24 horas después de la dosis.

[216] U.S. Environmental Protection Agency, Office of Drinking Water. Carbaryl Health Advisory. Draft Report. August (1987).

[217] J.D. Regan, R.B. Setlow, A.A. Francis, W. Lijinsky, *Mutat. Res.* 38 (1976) 293.

Efectos ecológicos: Uno de los problemas que presenta el carbaril es su alta actividad sobre insectos, muy superior a la que presenta sobre los mamíferos. Así, la destrucción de poblaciones de insectos no perniciosos (como por ejemplo, la abeja melífera) en áreas rociadas con carbaril es a veces un problema. El carbaril es medianamente tóxico para organismos acuáticos, como las truchas arco iris y las de lago. Puede acumularse en cangrejos de río y caracoles, así como en algas. En general, debido a su metabolismo rápido y su rápida degradación el carbaril no debe plantear un riesgo de bioacumulación importante en el agua alcalina.

Destino ambiental

El carbaril tiene una vida residual pequeña sobre cosechas tratadas (menos de dos semanas), quedando muy localizado y conservando sus propiedades como insecticida de 3 a 10 días. Las pérdidas de carbaril son atribuibles a la evaporación y a consumo en plantas, mientras que su degradación en la tierra se debe principalmente a la luz del sol y a la acción bacteriana. Los metabolitos de carbaril son mucho menos tóxicos en los seres humanos que el propio carbaril.

Propiedades físico-químicas

El carbaril es un sólido que varía de incoloro a blanco o gris, dependiendo de la pureza del compuesto. Los cristales son inodoros. Es estable al calor, la luz y los ácidos, pero no es estable en medio alcalino. No es corrosivo frente a metales, ni materiales de embalaje.

Las propiedades físicas del carbaril se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades físicas del carbaril.

CAS :	63-25-2
Nombre químico:	Metilcarbamato de 1-naftilo
Solubilidad en agua:	0.005 g / 100 g (20 °C), 0.004 g / 100 g (30 °C)
Solubilidad en otros disolventes	Es soluble en etanol, éter de petróleo, éter dietílico, y cloroformo; medianamente soluble en otros disolventes como acetona, dimetil sulfóxido, y ciclohexanona.
Punto de fusión:	145 °C
Presión de vapor:	<0.0001 torr (20-25 °C)
log P:	<-3.00

1.2 Consideraciones preliminares sobre el sistema FIA-CL propuesto

El uso de los POs como precursores de reacciones CL (ver mecanismo en la Introducción de la Memoria, Figura 1), presenta algunos inconvenientes en su acoplamiento a un sistema FIA, siendo el más importante de ellos la alta inestabilidad de los POs en medio acuoso, lo que obliga al empleo de disolventes orgánicos para evitar su degradación, siendo el más usual el acetonitrilo (ACN).

Debido a la imposibilidad de emplear tubos para bombas peristálticas convencionales de PVC, que son atacados por el ACN, los métodos descritos en bibliografía para llevar a cabo la reacción de los POs en sistemas en flujo emplean costosas bombas de alta presión con tubería de acero o PEEK, o tubos especiales de Viton para bomba peristáltica, de precio muy superior a los usuales [218,219,220].

[218] M. Lin, C. Huie, Anal. Chim. Acta 339 (1997) 131.

[219] M. Stigbrand, E. Ponten, K. Irgum, Anal. Chem. 66 (1994) 1766.

[220] M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Nakashima, Anal. Sciences 13 (1997) 945.

En la presente memoria se ha utilizado una solución alternativa de bajo coste, que implica una configuración especial del sistema FIA (Figura 17) y que ha sido previamente aplicada a la determinación de albúmina en muestras farmacéuticas [221,222]. El sistema emplea dos bombas peristálticas para incorporar los caudales de portador, catalizador y oxidante y dos válvulas de inyección manuales: una para la introducción de la disolución que contiene al analito (en este caso MA previamente marcada con OPA) y la otra para introducir la disolución del peroxioxalato empleado, en este caso TCPO, disuelto en ACN. El giro de ambas válvulas se sincroniza de tal forma que ambas disoluciones se mezclan en el canal de portador en un reactor (50 cm de longitud y 0.5 mm de i.d.), confluyendo posteriormente con las disoluciones de catalizador (imidazol) y de oxidante (peróxido de hidrógeno) para producir la reacción CL. Al no requerir tubos ni bombas especiales, el sistema resulta mucho más asequible, desde el punto de vista instrumental, que los propuestos anteriormente.

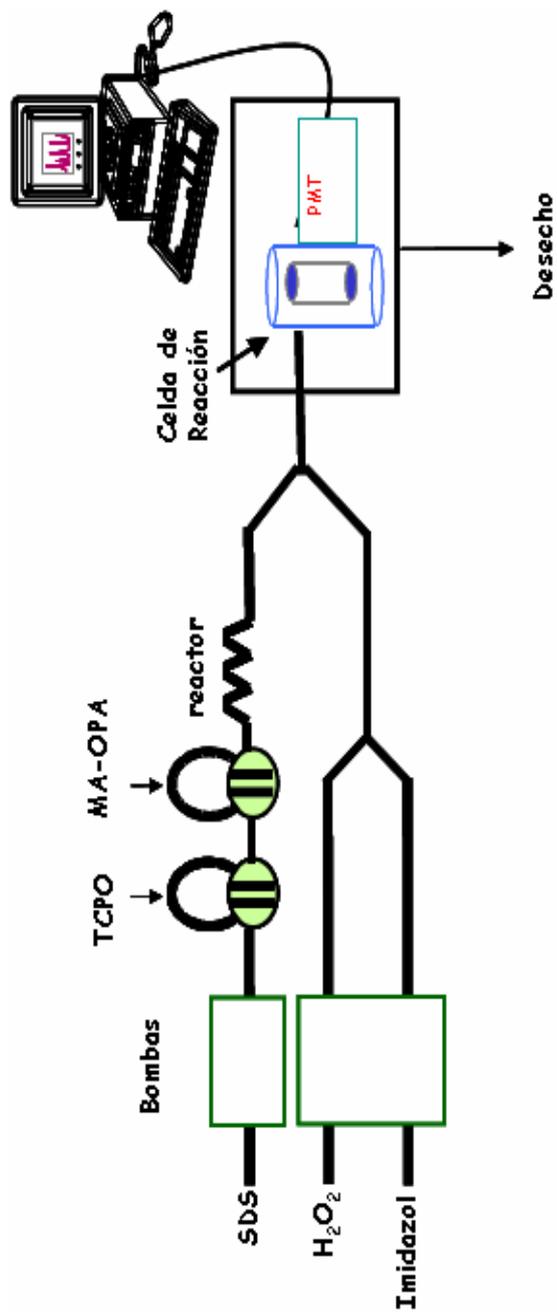
Así mismo, en la presente Memoria se propone el uso de un medio micelar, dodecilsulfato sódico (SDS) como portador del TCPO y del analito marcado, y como medio para disolver el oxidante y el catalizador. En trabajos anteriores [221] se probaron diversos medios micelares (aniónicos, catiónicos y no iónicos), encontrándose que los mejores resultados se obtenían con el surfactante aniónico SDS a concentración superior a su concentración micelar crítica (8.1 mM). Con el empleo de este medio, se retarda considerablemente la descomposición del TCPO, evitándose la obtención de picos con colas (que aparecían en ausencia del medio micelar) [223,224] y mejorándose significativamente la reproducibilidad de los mismos.

[221] L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, M.A. Dorato, M. Román Ceba, W.R.G. Baeyens, *Luminescence* 17 (2002) 199.

[222] L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, L. Cuadros Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 281.

[223] N. Dan, M. Ling Lau, M.L. Grayeski, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1766.

Figura 17. Esquema del sistema FIA usado para la determinación de carbaril mediante análisis de MA previa formación del derivado fluorescente con OPA.



[224]O.M. Steijger, H.M. Van Mastbergen, J.J.M. Holthuis, Anal. Chim. Acta 217 (1989) 229

Una vez seleccionada la configuración FIA adecuada y compatible con el sistema CL de POs, se pasó a optimizar el resto del método, de acuerdo con los siguientes pasos:

- Optimización de las variables influyentes en la determinación de MA.
- Estudio de las variables que afectan al sistema CL y selección de los valores óptimos empleando como analito MA.
- Selección y optimización de la reacción de descomposición del carbamato a MA.

2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES INFLUYENTES EN LA DETERMINACIÓN DE METILAMINA

Considerando el montaje FIA anterior, se procedió a la optimización de todas las variables experimentales que afectan a la intensidad de la señal CL (medida en altura de pico), llevándose a cabo en varias etapas, que implican:

(i) Selección del caudal de portador en el que se inyectarán las disoluciones de TCPO y MA-OPA.

(ii) Selección de las variables a estudiar (concentraciones de las disoluciones de TCPO, de peróxido de hidrógeno y de imidazol, pH y caudales de imidazol y peróxido de hidrógeno) y delimitación del dominio experimental. Una vez seleccionadas, se aplica un primer diseño factorial fraccionado saturado 2^{7-4} , que tiene por objeto discriminar las variables que afectan significativamente a la respuesta analítica seleccionada y estimar sus interacciones (diseño de diagnóstico o “*screening*”).

(iii) Optimización de las variables que han resultado significativas en el diseño anterior mediante el uso de un diseño de superficie de respuesta Draper-Lin.

(iv) Optimización de las concentraciones de OPA y NAC (N-Acetilcisteína) en la disolución de marcado por un lado, y del tiempo y la temperatura de la reacción de marcado por otro, usando un diseño factorial 3^2 para cada etapa.

(v) Optimización de los volúmenes de inyección de TCPO y analito marcado (MA-OPA) junto con el lapso de tiempo entre el giro de ambas válvulas de inyección, usando un diseño factorial 2^3 con estrella centrada en las caras.

A continuación se desarrollarán cada una de estas etapas.

2.1 Selección del caudal de portador

Basándonos en estudios previos del sistema y como etapa anterior a la optimización de las demás variables, se seleccionó como portador en el que se incorporan al sistema las disoluciones de TCPO y MA-OPA un medio micelar consistente en una disolución de SDS 10 mM en tampón de dihidrógeno fosfato sódico 0.1 M, pH 7, debido a que este pH es propicio para la reacción de los PO. El hecho de utilizar el medio micelar es debido a que el TCPO es inestable y también precipita en medio acuoso, dando lugar a colas en los picos obtenidos y provocando así mismo atascos en el sistema FIA. Una vez fijada su composición, se pasó a optimizar de forma univariante el caudal del portador, ya que, al ser esta variable la que controla el tiempo de giro entre las dos válvulas de inyección, se fijó previamente como punto de partida para la optimización del resto de variables. El flujo estudiado estaba comprendido en un rango entre 1 y 4 ml min⁻¹, seleccionándose finalmente un caudal de 3 ml min⁻¹, con un intervalo de 5 segundos de giro entre las válvulas de inyección, ya que era el valor que proporcionó una mejor señal en términos tanto de sensibilidad (alta señal CL) como de precisión (baja desviación estándar relativa en condiciones de repetibilidad). Ésta fue la única variable que se optimizó de forma univariante, mientras que las demás variables se optimizaron utilizando una estrategia formal basada en el uso de diseño de experimentos.

2.2 Selección de las variables, delimitación del dominio experimental y diseño de diagnóstico

El primer paso en la optimización del sistema fue seleccionar aquellas variables (tanto variables químicas como variables instrumentales inherentes al sistema FIA) que “a priori” se esperaba que influyeran en la respuesta analítica. Dichas variables fueron las siguientes: concentraciones de las disoluciones de TCPO, imidazol y peróxido, pH y caudales de las disoluciones de peróxido e imidazol. Asimismo, basándonos en estudios bibliográficos previos del sistema CL, se seleccionó el dominio

experimental dentro del cual se optimizó cada una de ellas. En la Tabla 6 aparecen los niveles del diseño seleccionados para cada variable, así como los valores codificados y no codificados correspondientes.

Tabla 6. Variables estudiadas en la optimización del sistema y niveles seleccionados.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A) log [Peróxido]	-2	-1	0
(B) log [Imidazol]	-3	-2	-1
(C) [TCPO](M)	$5 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$
(D) pH	5	7	9
(E) Caudal de Imidazol (ml min ⁻¹)	0.25	2	3.75
(F) Caudal de Peróxido (ml min ⁻¹)	0.25	2	3.75

Antes de comenzar a optimizar el sistema se realizó un diseño de diagnóstico o screening para discernir qué variables e interacciones de las seleccionadas son significativas (esto es, tienen influencia sobre la señal analítica), usando un diseño factorial fraccionado 2^{7-4} con 3 réplicas del punto central (N= 11 experiencias). Al ser el número de variables seleccionadas (6) inferior al requerido para llevar a cabo este tipo de diseños (7), se añadió una variable “fantasma”. La planificación del diseño se realizó de tal modo que en el patrón de confusión del mismo, esta variable apareciera confundida con las interacciones más probables. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7. Todas aquellas variables (y las interacciones de segundo orden confundidas con ellas) cuyo efecto total estimado resultó ser inferior al 5% del valor absoluto del mayor efecto (que

se corresponde con el efecto total del caudal de peróxido de hidrógeno, es decir $738 \cdot 0.05 = 36.9$ se consideraron variables no significativas ($P > 5\%$).

Tabla 7. Efectos estimados para las variables que afectan la señal CL

Variable	Efecto total ^a	Es significativa
(A) log [Peróxido] + BD + CE	52	SI
(B) log [Imidazol] + AD + CF	-103	SI
(C) [TCPO] + AE + BF	-19	NO
(D) pH + AB + EF	-49	SI
(E) Caudal de Imidazol + AC + DF	-35	NO
(F) Caudal de Peróxido + BC + DE	-738	SI
(G) Fantasma + AF + BE + CD	37	SI

^a Desviación estándar (SD) = ± 12.8 , basada en el error puro (2 grados de libertad); el signo indica el efecto de disminución (-) o aumento (+) producido en la señal CL; Los efectos y las SD se expresan en unidades arbitrarias de Intensidad CL.

Como se observa, todas las variables y/o interacciones de segundo orden resultaron significativas (incluida la variable fantasma), excepto la concentración de TCPO, el caudal de imidazol y las interacciones confundidas con ellos [225]. Así se seleccionó el nivel 0 (0.25 ml min^{-1}) para el caudal de imidazol, mientras que para el TCPO se seleccionó una concentración de 1 mM, ya que se comprobó que a valores superiores, el TCPO precipitaba y producía atascos en el sistema.

[225] L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, E. Almansa-López, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García-Campaña, Talanta 60 (2003) 523.

2.3 Optimización de las variables significativas mediante el uso de un diseño Draper-Lin

El siguiente paso fue la optimización de las variables significativas (concentración de peróxido e imidazol, caudal de peróxido y pH). Con este propósito se seleccionó un diseño reducido compuesto tipo Draper-Lin ortogonal [226,227], que permite la optimización de variables con un mínimo número de experiencias, en este caso N=19. La región experimental seleccionada en este caso junto con los valores codificados y no codificados para cada nivel en estudio se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Dominio experimental seleccionado y niveles correspondientes para la optimización de los factores significativos mediante un diseño Draper-Lin.

Variables	Niveles				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
(A) log [Peróxido]	-1.735	-1.5	-1	-0.5	-0.265
(B) log [Imidazol]	-3	-2.71	-2	-1.29	-1
(C) pH	5	5.64	7	8.36	9
(D) Caudal Peróxido(ml min ⁻¹)	0.53	1	2	3	3.47

Una vez medida la señal CL para cada experiencia del diseño se analizaron los datos mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA), de modo que aquellos coeficientes correspondientes a interacciones cuyo valor de P era superior al 5% no fueron considerados en el modelo por ser no significativas, realizándose un nuevo ANOVA ya sin estos valores. La ecuación de la superficie de respuesta obtenida finalmente fue:

[226] N.R. Draper, Technometrics 27 (1985) 173.

[227] N.R. Draper, D.K.J. Lin, Technometrics 32 (1990) 187.

$$\text{Señal CL} = 502.4 + 105.8 \cdot A - 173.1 \cdot B - 150.0 \cdot C - 87.0 \cdot D - 126.4 \cdot A^2 - 100.5 \cdot AC - 261.5 \cdot AD - 88.6 \cdot B^2 - 179.2 \cdot BC + 78.0 \cdot BD - 52.7 \cdot C^2$$

El coeficiente de determinación para esta superficie fue $R^2=94.7\%$, indicando un buen ajuste de los datos experimentales al modelo.

A partir de ésta se obtuvieron los valores óptimos de cada uno de los factores en estudio que hacen máxima la respuesta. Para el log [Imidazol] y el flujo de peróxido estos valores fueron 0.093 y -1.34 , respectivamente, ambos incluidos en la región experimental seleccionada. Estos valores codificados se corresponden con los valores experimentales de $1.2 \cdot 10^{-2}$ M y 0.66 ml min^{-1} , respectivamente. Por otro lado, los valores óptimos obtenidos para log [peróxido] y pH fueron $+1.41$ y -1.41 , que se encuentran en el límite de la región experimental, y se corresponden con los valores reales de 0.54 M y 5.0, respectivamente.

Dada la escasa aplicación de este tipo de diseños en Química Analítica y con objeto de verificar la validez de estos óptimos, se llevó a cabo un nuevo diseño, en este caso seleccionando una región experimental más reducida. Para ello se construyó un diseño Draper-Lin centrado en las caras que requiere un total de $N=19$ experiencias, tomando como nivel 0 los valores del primer óptimo. En este caso, al tratarse de un diseño centrado en las caras, el número de niveles se vió reducido a tres, a diferencia del diseño ortogonal anterior, que constaba de cinco niveles. La nueva región experimental junto con los niveles para cada variable se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Región experimental seleccionada y niveles correspondientes para la validación de los óptimos mediante un diseño Draper-Lin centrado en las caras.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A) log [Peróxido]	-0.75	-0.5	-0.25
(B) log [Imidazol]	-2.5	-2.0	-1.5
(C) pH	5.0	5.75	6.5
(D) Caudal de Peróxido(ml min ⁻¹)	0.5	1	1.5

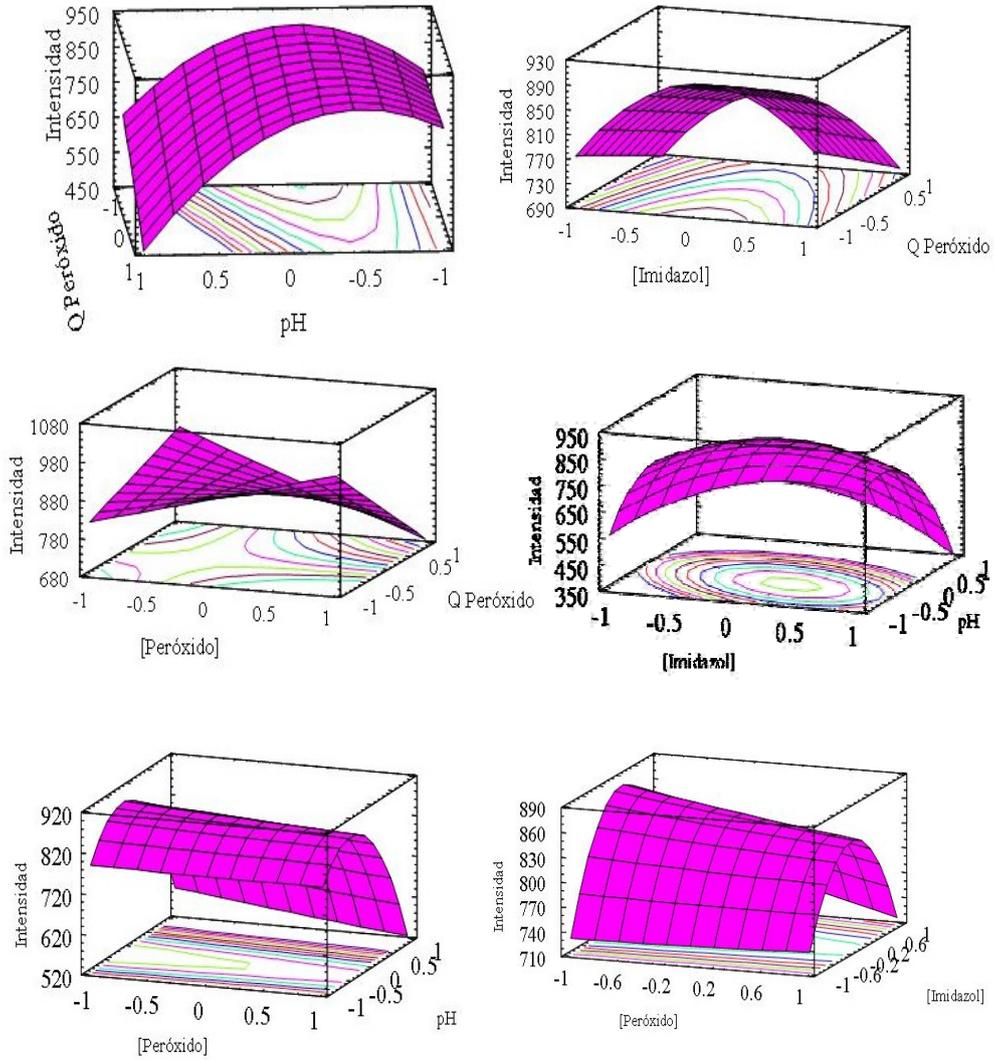
Una vez más, medidas las respuestas CL correspondientes a cada experiencia del diseño, se analizaron los datos mediante el ANOVA. Los coeficientes cuadráticos cuyo valor de P era mayor del 5% (A: log[Peróxido], B: log[Imidazol], AA, AB, BD y DD) fueron excluidos del modelo. La ecuación final de la superficie de respuesta obtenida fue:

$$\text{Señal CL} = 858.3 - 112.3 \cdot C - 30.6 \cdot D - 16.0 \cdot AC - 114.7 \cdot AD - 113.6 \cdot B^2 - 101.6 \cdot BC - 185.7 \cdot C^2$$

De nuevo, el coeficiente de determinación fue $R^2=94.7\%$, indicando un buen ajuste de los datos experimentales al modelo teórico.

En la Figura 18 se pueden observar las superficies de respuesta obtenidas en el diseño de confirmación.

Figura 18. Superficies de respuesta obtenidas en la optimización mediante el uso de un diseño Draper-Lin.



Los valores óptimos codificados correspondientes a los máximos de respuesta, obtenidos a partir de esta ecuación fueron: $\log[\text{Imidazol}] = 0.29$, $\text{pH} = -0.10$, que corresponden con los valores experimentales de $1.4 \cdot 10^{-2}$ M y 5.7, respectivamente. Los óptimos codificados para el $\log[\text{Peróxido}]$ y el flujo de Peróxido fueron +1 y -1 respectivamente, ambos en el límite de la región experimental y que corresponden con los valores reales de 0.56 M y 0.5 ml min^{-1} , respectivamente.

La Tabla 10 muestra los valores de los óptimos finalmente seleccionados para todas las variables, pudiéndose comprobar que los valores obtenidos están muy próximos a los que se obtuvieron en el primer diseño Draper-Lin, confirmándose así la aplicabilidad del diseño experimental propuesto. Estos valores finales serán utilizados en el establecimiento del método FIA-CL para la detección de MA.

Tabla 10. Valores óptimos seleccionados.

Variable	Primer Óptimo	Óptimo Final
Caudal del portador (ml min^{-1})	3	3
[Peróxido] (M)	0.54	0.56
[Imidazol] (M)	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-2}$
[TCPO] (M)	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$
pH	5.0	5.7
Caudal de Peróxido (ml min^{-1})	0.66	0.50
Caudal de Imidazol (ml min^{-1})	2.0	2.0

2.4 Optimización de la reacción de formación del derivado fluorescente

El siguiente paso en la optimización del método propuesto fue el establecimiento de las condiciones óptimas de la reacción de marcado de MA con OPA. En este sentido, se sustituyó el mercaptoetanol (empleado usualmente junto con la OPA como portador del grupo tiol necesario para catalizar la reacción de marcado) por (NAC), evitando de este modo los problemas de toxicidad que acarrea el uso de aquel [228].

La reacción de formación del derivado fluorescente se optimizó en dos etapas independientes, empleando en cada una de ellas un diseño factorial 3^2 . En primer lugar, se optimizaron las concentraciones de OPA y NAC en la disolución de marcado, empleando los valores codificados que se muestran en la Tabla 11. El marcado se realizó con 1 ml de cada una de las disoluciones (analito y marcador).

Tabla 11. Región experimental seleccionada y niveles correspondientes para la optimización de las concentraciones de OPA y NAC en la disolución de marcado.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A) OPA (mg l^{-1})	100	200	300
(B) NAC (mg l^{-1})	200	300	400

Una vez analizados los resultados del diseño, cuya superficie de respuesta se muestra en la Figura 3 y está descrita por la siguiente ecuación;

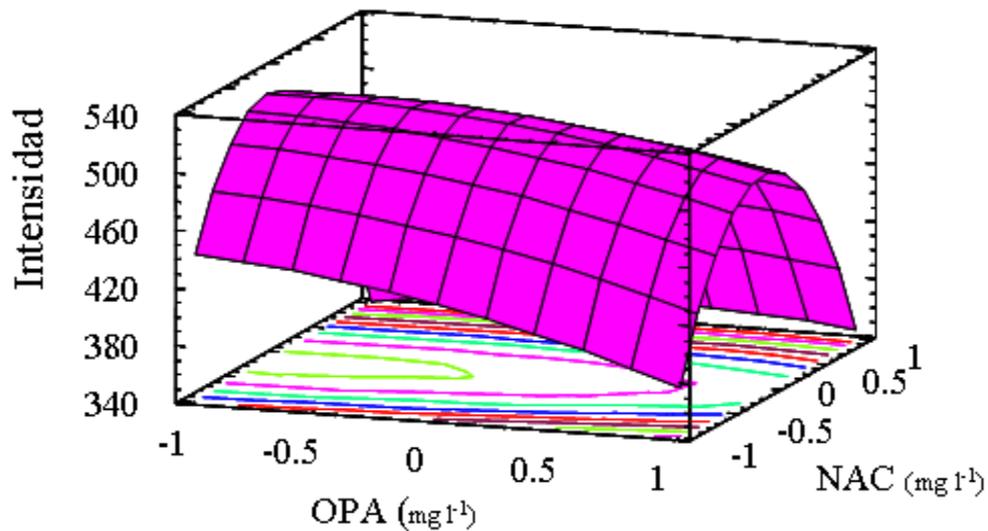
$$\text{Señal CL} = 516.2 - 15.41 \cdot A - 32.4 \cdot B - 10.8 \cdot A^2 + 18.4 \cdot AB - 129.8 \cdot B^2$$

$$(R^2 = 62.9\%)$$

[228] C. Vannecke, E. Van Gysegheem, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta 446 (2001) 413.

los óptimos codificados encontrados fueron: -0.873 y -0.188 para la concentración de OPA y NAC, respectivamente. Decodificando los valores, éstos se corresponden con concentraciones de 112.7 mg l⁻¹ y 281.2 mg l⁻¹ para OPA y NAC, respectivamente. (Figura 19)

Figura 19. Superficie de respuesta para la optimización de las concentraciones de OPA y NAC en la reacción de marcado.



A continuación se llevó a cabo la optimización del tiempo de reacción necesario para la formación del derivado fluorescente (tiempo de marcado: permanencia de las disoluciones de OPA y NAC en baño de ultrasonidos) y temperatura de la reacción de formación del derivado (temperatura de marcado), seleccionando el dominio experimental que se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Región experimental seleccionada y niveles correspondientes para la optimización del tiempo y temperatura de la reacción de marcado.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A) Tiempo (min)	1	3	5
(B) Temperatura (°C)	20	40	60

El óptimo codificado fue de -1 en ambos casos, que se corresponde con unos valores reales de un tiempo de reacción de 1 minuto y una temperatura de 20 °C, indicando que el marcado es prácticamente instantáneo y que es posible trabajar a temperatura ambiente.

2.5 Optimización de los volúmenes de los bucles de inyección y tiempo de giro de ambas válvulas

Se optimizaron los volúmenes de los bucles de inyección de ambas válvulas, así como el lapso de tiempo entre ambas inyecciones. Este lapso es importante para asegurar una buena mezcla del analito marcado (MA-OPA) con la disolución de TCPO. Para esta optimización se seleccionó un diseño factorial $2^3 +$ estrella centrada en las caras con tres puntos centrales, cuyos valores codificados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Región experimental seleccionada y niveles correspondientes para la optimización de los bucles y el tiempo de giro de las válvulas de inyección.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A) Bucle TCPO (µl)	100	300	500
(B) Bucle MA-OPA (µl)	20	100	180
(C) Tiempo entre ambas inyecciones (s)	3	4	5

Los óptimos codificados encontrados fueron +0.999 y +1.0 para los bucles de TCPO y MA-OPA, respectivamente, y -0.008 para el tiempo de giro. No obstante, el tiempo de giro resultó ser una variable no significativa, lo que nos permite usar cualquier tiempo de giro entre los valores estudiados. Finalmente, se seleccionó un tiempo de 5 segundos por cuestiones prácticas de uso del sistema FIA.

En cuanto a los valores óptimos obtenidos para ambos bucles, a pesar de estar en el límite de la región seleccionada, no se ensayaron valores superiores debido a que ya con los bucles de mayor tamaño se provocaban picos dobles, lo que daba lugar a irreproducibilidad en los resultados. Por ello, y para evitar esta irreproducibilidad, se escogió como óptimo para el volumen de inyección de la disolución de TCPO el valor de 500 µl (+1) y para seleccionar el volumen de inyección de la disolución de analito marcado (MA-OPA) se sustituyeron en la ecuación de la superficie de respuesta los valores codificados de TCPO (+1) y tiempo de giro (+1), resultando:

Ecuación Inicial:

$$\text{Señal CL} = 376.388 + 163.591 \cdot A + 2.301 \cdot B - 29.102 \cdot C - 100.063 \cdot A^2 + 57.289 \cdot AB + 22.526 \cdot AC + 74.767 \cdot B^2 + 5.874 \cdot BC - 46.458 \cdot C^2$$

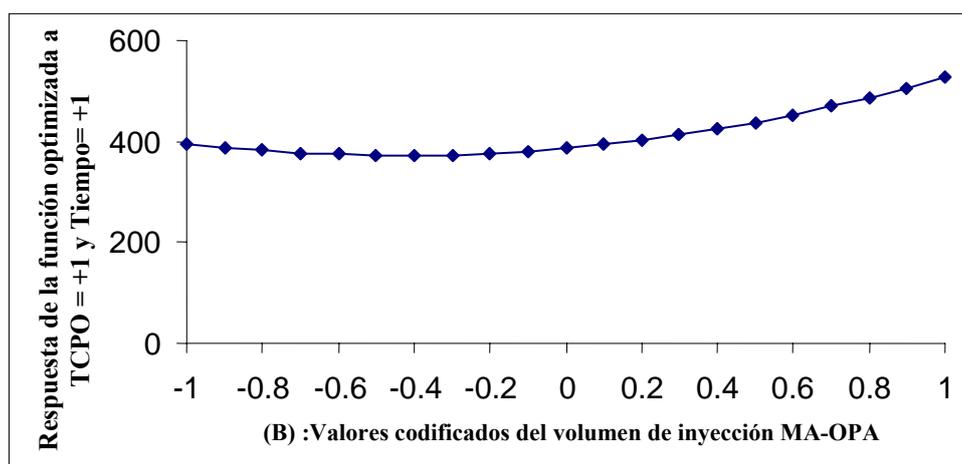
(R²=94.8%)

Ecuación Sustituida:

$$\text{Señal CL} = 74.767 B^2 + 65.463 \cdot B + 389.882$$

donde B es el valor codificado para el volumen de inyección de la disolución de MA-OPA, introducida mediante la segunda válvula de inyección del sistema. Representando esta función frente a distintos valores codificados del volumen del bucle de inyección, se obtiene la siguiente gráfica que se muestra en la Figura 20.

Figura 20. Representación de la ecuación de la superficie de respuesta para distintos valores codificados de B, con valores fijos de TCPO (+1) y Tiempo (+1).



Como se observa, entre los puntos -0.7 y 0 (valores codificados que se corresponden con un intervalo de trabajo de $54\text{--}100\ \mu\text{l}$) la respuesta a los distintos volúmenes inyectados de disolución MA-OPA no varía significativamente, por lo que se obtendría una respuesta similar para cualquiera de ellos. Por ello, se optó por escoger como volumen de inyección óptimo un bucle de $60\ \mu\text{l}$, por ser el menor volumen con el que se obtienen respuestas precisas y adecuada sensibilidad. En la Figura 20 se

observa también que el valor que más intensidad produce es el +1, pero a pesar de esto no se escogió porque provocaba señales menos reproducibles y picos dobles.

El resumen final de los óptimos seleccionados para todas las variables estudiadas en el sistema FIA-CL propuesto para la determinación de carbaril mediante la previa descomposición a MA marcada con OPA, empleando la reacción de los POs se recoge en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores óptimos para todas las variables estudiadas para la determinación de MA mediante FIA-CL usando la reacción de POs.

Caudal de portador (SDS)	3.00 ml min ⁻¹
Caudal de Imidazol	2.10 ml min ⁻¹
Caudal de Peróxido	0.66 ml min ⁻¹
pH	5
[TCPO]	1 mM
[Peróxido]	540 mM
[Imidazol]	12.4 mM
Concentración de OPA en la disolución de marcado	112.7 mg l ⁻¹
Concentración de NAC en la disolución de marcado	281.2 mg l ⁻¹
Tiempo de la reacción de marcado	1 min
Temperatura de la reacción de marcado	20 °C
Bucle de TCPO	500 µl
Bucle de MA-OPA	60 µl
Tiempo de giro entre las válvulas	5 s

3 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE FOTODESCOMPOSICIÓN DE N-METILCARBAMATOS

La reacción de fotólisis de los NMCs a MA mediante irradiación ultravioleta ha sido estudiada por algunos autores [229,230], y constituye una gran alternativa al protocolo propuesto por la *Environmental Protection Agency* (EPA) [231] basado en una hidrólisis básica a alta temperatura. Sin embargo, un inconveniente de esta reacción de fotodescomposición es su duración, que en algunas ocasiones puede llegar a ser de varios días, aunque este inconveniente ha sido solventado en un reciente trabajo en el que se ha propuesto la acetona como un fuerte sensibilizador de la reacción fotoquímica, reduciéndose los tiempos de reacción a tan sólo 10-60 segundos [232]. Se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar este efecto:

(i) El primero implica que la acetona actuaría como un donador de átomos de hidrógeno. Sin embargo, un simple cambio de la acetona por metanol (MeOH) o ACN hace que no se produzca reacción alguna, demostrando que este mecanismo es dudoso, y por tanto que la acetona no actúa como donador de hidrógeno.

(ii) El segundo mecanismo propone que la acetona es un sensibilizador triplete-triplete. Debido a que la acetona es un compuesto carbonílico con un alto rendimiento en el proceso de cruzamiento entre sistemas y un alto tiempo de vida del estado triplete, es posible usarla como un excelente sensibilizador del estado triplete [233]. La presencia de

[229] D.A. Volmer, J. Chromatogr. 794 (1998) 129.

[230] C.J. Miles, H.A. Moye, Anal. Chem. 60 (1988) 220.

[231] EPA Method 531.1., Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post-column derivatisation (1995) Revision 3.1.

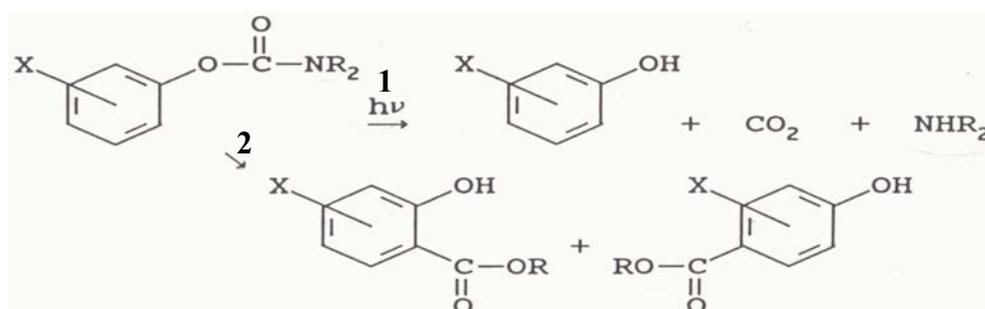
[232] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás, J. Martín, Anal. Chim. Acta 476 (2003) 141.

[233] A.M. Braun, M.T. Maurette, E. Oliveros, "Photochemical Technology", Wiley, New York (1986) p. 28.

acetona podría aumentar la población del estado triplete de los N-metilcarbamatos a través de una transferencia de energía triplete-triplete, acelerando así la fotodescomposición química [234].

La reacción se produce a una longitud de onda de 250 nm y se muestra en la Figura 21 (ruta 1).

Figura 21. Posibles caminos de reacción para la fotodegradación de los carbamatos



Como se puede comprobar en la Figura 21, el camino de reacción (1) da lugar a metilamina, pero el camino (2) produce un reordenamiento de la molécula, lo que daría lugar a bajos rendimientos. El que se dé la reacción por uno u otro camino dependerá del disolvente usado, favoreciéndose el proceso de descomposición y la generación de metilamina en este caso mediante la adición de pequeñas cantidades (del orden de pocos μ l) de acetona.

Considerando las ventajas de esta metodología frente a la hidrólisis básica, en esta Memoria se propone la obtención de MA mediante fotodescomposición, realizando el estudio con una lámpara de descarga de

[234] J. Kagan, Organic Photochemistry: Principles and Application, Academic Press, New York (1993) P. 16.

mercurio de 8 w cuya longitud de onda de emisión es de 250 nm. La reacción de fotodescomposición se optimizó para cuatro NMCs por separado: aldicarb, promecarb, carbofuran y carbaril. La fotodescomposición se llevo a cabo “offline” usando como reactor un tubo de PTFE enrollado alrededor de la lámpara y a través del cual circulaban las correspondientes disoluciones de plaguicidas, controlando la velocidad de flujo mediante una bomba peristáltica y relacionando este caudal con el diámetro de los tubos y su longitud para evaluar el tiempo necesario de exposición a la radiación (tiempo de irradiación).

Se realizó un estudio de la fotodescomposición de los cuatro carbamatos a distintos tiempos de irradiación, usando como medio agua:acetona a distintas proporciones. En todos los casos se fotoirradiaron y midieron 10 ml de una disolución de concentración 0.3 mg l^{-1} de cada carbamato.

El resumen de estas experiencias se muestra en la Tabla 15, donde se recogen los porcentajes de recuperación encontrados a distintos tiempos de irradiación y en presencia de dos porciones distintas de acetona en agua, para cada uno de los plaguicidas. Lógicamente, para realizar esta estimación se llevó a cabo la medida de la emisión CL correspondiente al contenido de MA de cada una de las disoluciones irradiadas, usando el sistema FIA-CL propuesto anteriormente que utiliza la reacción de los POs en las condiciones optimizadas. El cálculo se realizó comparando la señal obtenida con la señal perteneciente a una cantidad de MA correspondiente al 100% de rendimiento en la fotodescomposición del correspondiente carbamato, considerando su concentración inicial.

Tabla 15. Porcentajes de recuperación correspondientes a la transformación de carbamatos a MA y posterior detección de ésta mediante el sistema FIA-CL propuesto, a diferentes tiempos de irradiación.

Tiempo	Disolvente: Agua:Acetona (90:10)			
	Aldicarb	Promecarb	Carbofuran	Carbaril
10 s	89.8 %	42.2 %	105.6 %	33.1 %
15 s	24.3 %	5.4 %	86.6 %	18.4 %
25 s	----- ^a	----- ^a	43.8 %	92.6 %
35 s	31.9 %	35.1 %	42.9 %	41.7 %
45 s	----- ^a	----- ^a	77.2 %	138.0%
Disolvente: Agua: Acetona (99.7:0.3)				
Tiempo	Aldicarb	Promecarb	Carbofuran	Carbaril
10 s	----- ^a	22.6 %	10.5 %	43.1 %
15 s	36.8 %	70.4 %	----- ^a	88.9 %
25 s	72.1 %	----- ^a	----- ^a	96.2 %
35 s	2.4 %	----- ^a	112.9 %	94.5 %
45 s	----- ^a	----- ^a	104.6 %	56.2 %

a: sin señal.

Asimismo, se realizaron experiencias a los mismos tiempos de irradiación con los siguientes disolventes y mezclas: acetona pura, agua:acetona (95:5), ACN puro, agua:ACN (70:30), MeOH puro, MeOH:agua (50:50) y agua pura, aunque para ninguno de estos disolventes o mezclas se obtuvieron resultados satisfactorios, bien porque no se producía señal, como en el caso del MeOH, agua y sus mezclas, o bien porque el blanco proporcionaba una emisión tan alta que saturaba el detector.

Los resultados de este estudio parecen confirmar que la acetona actúa de sensibilizador de la reacción, y que se reducen los tiempos de irradiación de días a pocos segundos con unos rendimientos altos en la reacción de fotodescomposición.

El resumen de las condiciones más satisfactorias para la fotodescomposición de los carbamatos estudiados se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones óptimas seleccionadas para la reacción de fotodescomposición.

	Tiempo	Disolvente	Recuperación
Aldicarb	10 s	Agua:Acetona (90:10)	89.8 %
Promecarb	15 s	Agua:Acetona (99.7:0.3)	70.4 %
Carbofuran	45 s	Agua:Acetona (99.7:0.3)	104.6 %
Carbaril	25 s	Agua:Acetona (99.7:0.3)	96.5 %

Los estudios realizados hasta el momento ponen de manifiesto la posibilidad de la detección quimioluminiscente de NMCs mediante el sistema CL de los POs, que constaría de los siguientes pasos: a) fotodescomposición "offline" del plaguicida a MA en las condiciones seleccionadas, b) formación del derivado fluorescente MA-OPA; c) incorporación de éste al sistema FIA; d) participación del derivado en la reacción CL de los POs; y d) cuantificación del plaguicida por la emisión CL registrada, proporcional a la concentración de MA obtenida.

Aunque conste de varias etapas, puede afirmarse que el método es rápido ya que la descomposición requiere pocos segundos y la reacción de marcado es instantánea.

Finalmente, para demostrar la aplicabilidad del método para la determinación cuantitativa de NMCs, se seleccionó el carbaril al ser uno de los plaguicidas más usados en agricultura y estar dentro del grupo de estudio de plaguicidas de evaluación periódica según la FAO/WHO (JMPR) [235].

[235] Alinorm 01/24A, Appendix IX, Priority list of compounds scheduled for evaluation or reevaluation by JMPR, 2001, in: Proceedings of the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR).

4 RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO

La recta de calibrado para la determinación de carbaril se estableció mediante la medida de 3 réplicas de disoluciones patrón de concentraciones crecientes de carbaril, preparadas aplicando el método analítico propuesto que consiste en la previa irradiación de la disolución patrón con luz UV durante 25 s, en medio agua:acetona (99.7:0.3) con objeto de descomponer el carbamato a MA. Posteriormente se procede a la obtención del derivado fluorescente MA-OPA tratando la disolución resultante con la disolución de marcado, que contiene OPA y NAC, previamente optimizadas, en baño ultrasonidos a temperatura ambiente. Utilizando el montaje FIA mostrado en la Figura 17 y empleando las condiciones óptimas seleccionadas se procede a la adquisición de la medida de la señal CL (altura de pico).

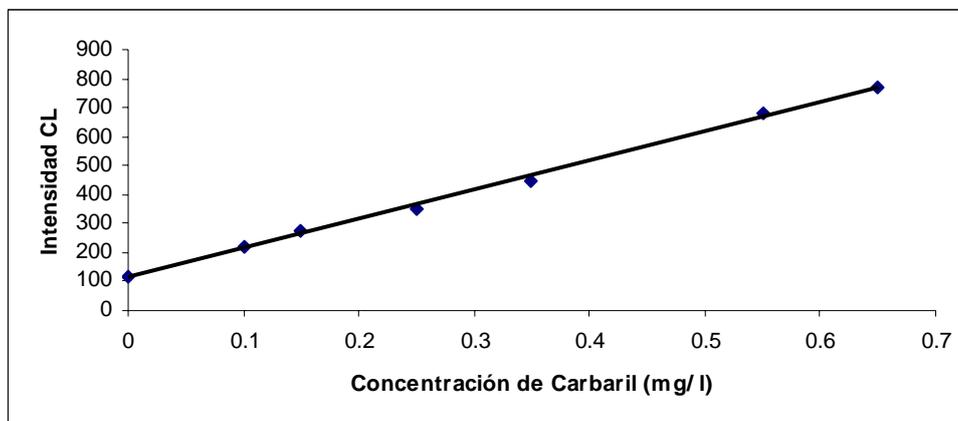
Las concentraciones utilizadas para establecer la recta de calibrado estuvieron comprendidas entre 0–0.65 mg l⁻¹ (Figura 22). Los valores medios obtenidos de señal CL, así como los parámetros estadísticos y de calidad del método se muestran a continuación en las Tablas 17 y 18, respectivamente.

Tabla 17. Valores obtenidos para la recta de calibrado.

Concentración de Carbaril (mg l ⁻¹)	Señal CL *
0	117.60 ± 2.08
0,10	219.73 ± 9.21
0,15	277.00 ± 6.68
0,25	353.40 ± 5.25
0,35	443.87 ± 3.96
0,55	683.47 ± 9.61
0,65	770.73 ± 13.35

* Medida en altura de pico, (n=3)

Figura 22. Recta de calibrado.



La ecuación de la recta de calibrado fue la siguiente:

$$\text{Intensidad CL} = 114.2342 + 1007.8831 \cdot \text{Concentración carbaril (mg l}^{-1}\text{)}$$

Tabla 18. Parámetros de calidad del método.

Rango lineal	0.026 – 0.65 mg l ⁻¹
Pendiente	1007.88 c.u./ mg l ⁻¹
Ordenada en el origen	114.23 c.u.
S _{R,c}	30.62 c.u./ mg l ⁻¹
R ²	99.59 %
Limite de detección	0.031 mg l ⁻¹ (a)/0.009 mg l ⁻¹ (b)
Limite de cuantificación	0.102 mg l ⁻¹ (a)/0.026 mg l ⁻¹ (b)
Precisión ^c	2.8 %

c.u. = Unidades de quimioluminiscencia

S_{R,c} = desviación estándar de regresión

a= A partir de los datos del calibrado [236] y b= Criterio IUPAC [237]

c=Expresada como la desviación estándar relativa (%) para una concentración de 0.35 mg l⁻¹ en condiciones de repetibilidad y calculada a partir de los datos de la regresión.

[236] A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés-Barrero, M. Román-Ceba, J.L. Sierra-Fernández, Trends Anal. Chem., 16 (1997) 381.

[237] Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, IUPAC Technical Report, Pure Appl. Chem., 74 (2002) 835.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos para este método están por debajo del límite máximo del residuo de plaguicida (LMR) establecido para pepinos en 1 mg l^{-1} [238], lo que demuestra la aplicabilidad del método propuesto al análisis en estas muestras.

[238] Límites Máximos de Residuos de Productos Fitosanitarios, Ed. 2.1 (1/7/03), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Real Decreto 198/2000.

5 ESTUDIO DE INTERFERENTES

Como posibles interferentes se estudiaron los plaguicidas que usualmente se emplean junto con el carbaril para el tratamiento de plagas en vegetales. La influencia de estas especies fue estudiada preparando disoluciones de 0.3 mg l⁻¹ de carbaril y concentraciones crecientes del posible interferente, comenzando desde su LMR más bajo al más alto para diferentes matrices vegetales [238].

Los plaguicidas estudiados y su rango de concentraciones fueron: Deltametrin (0.05–0.50 mg l⁻¹), Fenvalerato (0.02–0.10 mg l⁻¹), Acrinatrín (0.02–1.00 mg l⁻¹), Clorpirifos (0.05–3.00 mg l⁻¹) y Clorpirifos Metil (0.05–3.00 mg l⁻¹).

El estudio se realizó considerando como interferencia aquel nivel de concentración que produjese una señal CL excluida del intervalo de confianza definido para la concentración de 0.3 mg l⁻¹ de carbaril obtenido a partir de la ecuación de la recta de calibrado. La estimación se realizó a partir de la ecuación:

Respuesta predicha $\pm t \cdot s_r = (416.6 \pm 19.5)$ c.u.

resultando el intervalo de confianza:

Valor superior = 436.1 c.u.

Valor inferior = 397.1 c.u.

donde:

$t(n-2=19 \text{ gl}; \alpha=0.05) = 2.093$

$$s_r = \sqrt{s_{R,c}^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m} \right) + s_b^2 \cdot (c - \bar{c})^2} = 9.3$$

t es el parámetro de Student y S_r la desviación estándar de la respuesta a esa concentración.

Tal y como se muestra en la Tabla 19, en presencia de la concentración máxima probada para estos plaguicidas la señal CL obtenida se encontró incluida en todos los casos dentro del intervalo de confianza.

Por lo tanto, se concluyó que ninguno de ellos produjo interferencia en el rango estudiado.

Tabla 19. Señales producidas por los potenciales interferentes a los niveles máximos de concentración seleccionados.

Interferente	Acrinatrín (1 mg l ⁻¹)	Clorpirifos (3 mg l ⁻¹)	Clorpirifos Metil (3 mg l ⁻¹)	Deltametrin (0.5 mg l ⁻¹)	Fenvalerato (0.1 mg l ⁻¹)
Intensidad CL	403 ± 3.6 ^a	417 ± 5.06	412 ± 6.7	422 ± 4.9	428 ± 8.3

^a Media ± SD (n=4)

6 APLICACIONES ANALÍTICAS

Con objeto de demostrar la validez del método propuesto se procedió a su aplicación en distintos tipos de muestras reales: aguas de diversa procedencia (río, pozo y agua de red) y un alimento vegetal (pepino). A continuación se comentarán cada una de las aplicaciones realizadas.

6.1 Análisis de carbaril en aguas

Para demostrar la aplicabilidad del método al análisis de muestras medioambientales, se seleccionaron aguas de las siguientes procedencias:

Agua de la red de de la capital de Granada

Agua de un pozo situado en la Vega (Santa Fe, Granada)

Agua del río Dílar (Granada)

El único tratamiento que requirieron las muestras antes de su análisis fue su paso a través de un filtro de tamaño de poro de 0.20 μm , conservándose a 4°C en recipientes de plástico hasta su análisis. Posteriormente se fortificaron a tres niveles de concentración diferentes: 0.25 mg l⁻¹, 0.35 mg l⁻¹ y 0.45 mg l⁻¹ de carbaril. Previamente se llevó a cabo el análisis de un blanco de matriz con objeto de comprobar la ausencia en la misma de este tipo de analito. La validación del método en este tipo de matriz se realizó mediante estudios de recuperación. Los resultados obtenidos tras la aplicación del método (n = 4) se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Aplicación del método propuesto para la determinación de carbaril en muestras de agua.

Tipo de agua	Añadido (mg l ⁻¹)	Encontrado (mg l ⁻¹) ^a	Recuperación ^a (%)
Pozo	0.25	0.220 ± 0.004	89.0 ± 1.5
	0.35	0.360 ± 0.006	106.0 ± 1.7
	0.45	0.440 ± 0.010	96.9 ± 1.3
Río	0.25	0.247 ± 0.002	99.0 ± 1.2
	0.35	0.345 ± 0.006	98.1 ± 1.7
	0.45	0.455 ± 0.005	101.1 ± 1.5
Red	0.25	0.250 ± 0.003	100.0 ± 0.8
	0.35	0.330 ± 0.006	94.3 ± 1.7
	0.45	0.430 ± 0.008	95.5 ± 1.6

^a Media ± SD (n=4)

Como se puede observar, las recuperaciones obtenidas, comprendidas entre 89.0-106.0 % para los distintos niveles de concentración, se pueden considerar satisfactorias en todos los casos, así como la desviación estándar obtenida.

6.2 Análisis de carbaril en muestra vegetal (pepino)

En el caso del análisis de un vegetal, se requiere una etapa previa de extracción del carbaril de la matriz y posterior limpieza (“*clean-up*”) del extracto obtenido. Con objeto de optimizar esta etapa, diferentes porciones de 20 g de pepino procedente de una granja ecológica (Chimeneas, Granada), libre, por tanto, de plaguicida, fueron troceadas y fortificadas con 200 µl de una disolución que contenía 100 mg l⁻¹ de carbaril disuelto en una mezcla agua:acetona (90:10), dejando 5 minutos de siembra. La

concentración final obtenida fue de 1 mg l^{-1} en la muestra vegetal. A partir de aquí, se procedió a optimizar la etapa de tratamiento de muestra.

6.2.1 *Optimización de la etapa de extracción*

Las muestras así tratadas, se mezclaron con 35 ml de disolvente orgánico (MeOH, acetona o acetato de etilo), y con 30 g de sulfato sódico anhidro (para eliminar el agua que pueda contener la muestra), siendo esta mezcla homogeneizada durante 5 min con una batidora. A continuación la mezcla se filtró aplicando vacío a través de papel de filtro ($0.45 \mu\text{m}$) en un embudo Büchner. El contenido del kitasatos se trasvasó a un matraz esférico de 100 ml. A continuación el kitasatos se lavó con 3 porciones de 5 ml del mismo disolvente utilizado en la extracción, que se adicionaron al primer extracto, obteniéndose un volumen final de 50 ml. El extracto así obtenido se concentró en rotavapor a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta un volumen aproximado de 3 ml. Estos 3 ml de extracto se pasaron a un vial de 10 ml. A continuación se lavó el matraz del rotavapor con 2 ml del disolvente orgánico y se agregaron al vial. Estos 5 ml de extracto se secaron en corriente de nitrógeno y se recompusieron en 2 ml de metanol para su posterior medida.

De entre los disolventes ensayados (MeOH, acetona y acetato de etilo) fue con este último con el único que se obtuvo alguna señal, aunque con un rendimiento inferior al 30%, por lo que se requirió una etapa posterior de limpieza del extracto.

6.2.2 *Optimización de la etapa de limpieza del extracto (“clean-up”)*

Para este paso de limpieza del extracto final obtenido en la etapa anterior, se seleccionó la extracción en fase sólida (SPE), ensayándose diversos cartuchos de extracción con rellenos de distinta naturaleza, y diversos disolventes tanto para el acondicionamiento como para la elución. El mismo proceso se realizó tanto para el extracto que contenía carbaril como para un blanco de matriz. Los procesos seleccionados se llevaron a cabo en un sistema de extracción de vacío, y se comentan a continuación.

Cartuchos C18. Los primeros cartuchos usados fueron C18, con el fin de retener el carbaril y eliminar la matriz y posibles interferentes. El proceso estudiado fue el siguiente:

- a) Acondicionamiento del cartucho con 3 ml de agua seguidos de 3 ml de metanol.
- b) Paso de los 5 ml de extracto.
- c) Elución del carbaril con 3 ml de acetato de etilo.
- d) Estos 3 ml finales se secaron con corriente de nitrógeno, recomponiéndose el extracto seco con 2 ml de MeOH, obteniéndose una concentración teórica de 10 mg l^{-1} de carbaril. De aquí se toman las alícuotas para su cuantificación en el sistema FIA-CL. Asimismo, también se recogieron los residuos para medir igualmente la señal analítica con objeto de evaluar posibles pérdidas de analito en el proceso.

Los resultados obtenidos fueron:

Recuperación de carbaril en el extracto final: 25 %

Recuperación de carbaril en el residuo: 25 %

Como se puede ver no es un sistema válido para extraer el carbaril, ya que además de que los rendimientos no son buenos, el blanco analítico presentaba una señal muy elevada, perdiéndose sensibilidad.

Cartuchos SAX. La metodología para usar los cartuchos de SAX (strong anion exchange) es distinta que con los cartuchos C18, ya que con los cartuchos SAX en lugar de ser retenido el carbaril, éste es eluido, quedando retenidos los posibles interferentes.

El proceso en este caso constó de los siguientes pasos:

- a) Acondicionamiento del cartucho con 2 porciones de 3 ml de agua
- b) Paso de los 5 ml del extracto, que se recogen sin necesidad de elución posterior.
- c) El extracto recogido se secó con corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 2 ml de MeOH. De este extracto se tomaron las

correspondientes alícuotas para su medida. Las señales obtenidas para el blanco a partir de este procedimiento saturaban al detector, por lo que su aplicación resultó inviable.

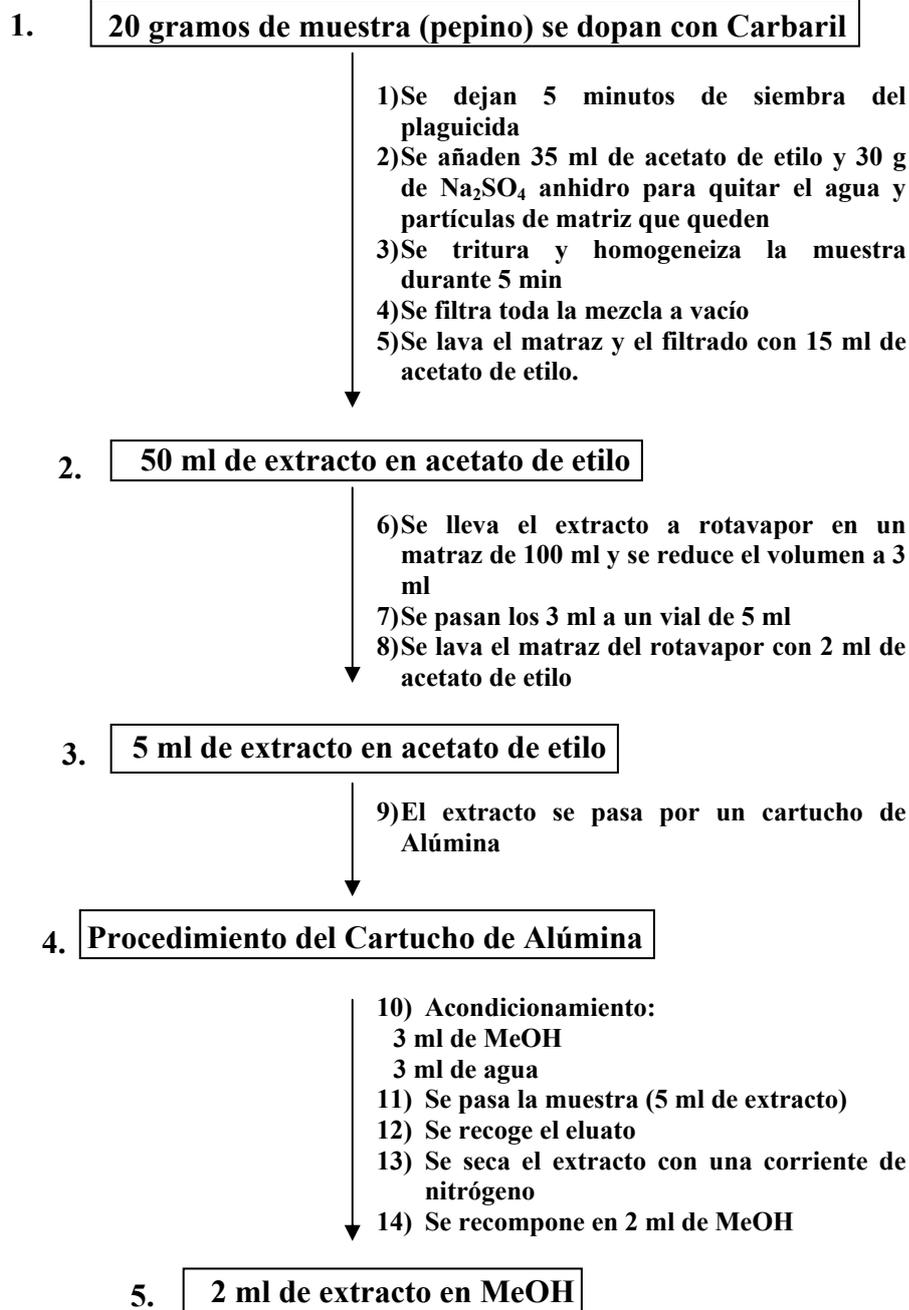
Cartuchos de Alúmina. La metodología con los cartuchos de alúmina fue similar a la de SAX, quedando retenida la matriz y posibles interferentes.

El proceso propuesto fue:

- a) Acondicionamiento del cartucho con 3 ml de MeOH seguidos de 3 ml de agua.
- b) Paso de los 5 ml del extracto, que se recogen sin necesidad de eluyente.
- c) El extracto recogido se secó con corriente de nitrógeno y se reconstituyó con 2 ml de MeOH. Las diluciones de este extracto fueron medidas, obteniéndose una recuperación de 101.6%, para una concentración de 0.2 mg l⁻¹ de carbaril.

Este método se muestra muy eficaz para la limpieza del extracto, proporcionando además una preconcentración del orden de 10 y presentando como ventaja adicional el que la señal que presenta la matriz no difiere significativamente del blanco del método, con lo que se concluye que este procedimiento elimina los posibles componentes de la matriz que pudieran interferir. Por tanto, se selecciona este procedimiento de limpieza del extracto como el más adecuado para el tratamiento de muestras de pepino previo al análisis de carbaril mediante el sistema FIA-CL propuesto.

A continuación se muestra el proceso completo de extracción y limpieza de las muestras de pepino de forma esquemática:



Finalmente, con objeto de evaluar la existencia de errores sistemáticos debidos a posibles pérdidas de analito durante el proceso de tratamiento de muestra o al efecto matriz, se realizaron estudios de recuperación a varios niveles de concentración de carbaril, dopando en dos momentos diferentes del proceso. Así, se consideraron dos tipos diferentes de recuperaciones [239]:

Recuperación aparente (R^):* calculada a partir de las muestras dopadas al principio del proceso de extracción (paso 1 del esquema anterior). Este tipo de recuperación está relacionada con los errores sistemáticos que se pueden producir en la totalidad del proceso analítico.

Recuperación de calibración (R^c): calculada a partir de muestras dopadas justo antes de aplicar el método FIA-CL propuesto (paso 5). Este tipo de recuperación está relacionada con el tipo de error sistemático debido al efecto matriz y al propio error del proceso de medida.

Los niveles a los que se realizó el estudio fueron los que se muestran en la Tabla 21. En ella aparecen reflejadas las concentraciones teóricas de analito en las siguientes etapas: C_0 : Concentración dopada en la muestra inicial (paso 1 del esquema); C_t : Concentración teórica una vez llevado a cabo el proceso de extracción y limpieza (extracto final en metanol); C_f : Concentración final inyectada en el sistema, una vez diluido el extracto final adecuadamente.

[239] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, E. Almansa-López, A. González-Casado, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *Talanta* 66 (2005) 1063.

Tabla 21. Concentraciones empleadas en el estudio de recuperaciones en muestras de pepino.

C_0	C_t	C_f
0.6 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	0.20 mg l ⁻¹
0.8 mg l ⁻¹	8 mg l ⁻¹	0.26 mg l ⁻¹
1.0 mg l ⁻¹	10 mg l ⁻¹	0.33 mg l ⁻¹
1.5 mg l ⁻¹	15 mg l ⁻¹	0.50 mg l ⁻¹

Una vez medidas las distintas alícuotas, las señales CL obtenidas se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Estudios de recuperación en muestras de pepino.

Dopando antes del proceso de extracción			Dopando el extracto final		
C_f	Señal CL	$R^*{}^1$	C_f	Señal CL	$R^c{}^1$
0.20 mg l ⁻¹	208.97	84.3 ± 5.1	0.20 mg l ⁻¹	234.27	93.0 ± 2.5
0.26 mg l ⁻¹	230.23	80.6 ± 1.2	0.26 mg l ⁻¹	280.90	90.0 ± 1.2
0.33 mg l ⁻¹	270.17	86.8 ± 5.1	0.33 mg l ⁻¹	338.87	92.0 ± 2.6
0.50 mg l ⁻¹	341.50	84.8 ± 2.7	0.50 mg l ⁻¹	411.23	90.0 ± 0.5

R^* : recuperación aparente calculada a partir de muestras dopadas al principio del proceso de extracción.

R^c : recuperación de calibración calculada a partir de señales obtenidas dopando el extracto final.

¹ Media ± SD (n=4)

Como puede observarse en la Tabla 22, existe diferencia entre ambas recuperaciones, con menores valores para la recuperación aparente (R^*), lo que resulta lógico al considerar en esta evaluación que los errores pueden

ser debidos tanto a las posibles pérdidas de analito durante el proceso de extracción como al efecto matriz, junto con los errores aleatorios del proceso de medida. Sin embargo, en el caso de la recuperación de calibración (R^c), se observan menores desviaciones respecto al 100%, lo que implica un efecto matriz prácticamente despreciable. Para todos los niveles estudiados, la recuperación está comprendida entre 80.6-86.8% para la recuperación aparente y 90-93% para la recuperación del calibrado. Teniendo en cuenta que en el análisis de residuos de plaguicidas el rango aceptable para la recuperación está establecido entre 70-110% con una desviación estándar relativa (RSD) de un máximo de 20% para validación, y entre 60-140% para el análisis de rutina [240,241,242], los resultados obtenidos con el método propuesto demuestran que éste puede satisfacer las demandas actuales.

[240] Guidance Document on Residue Analytical Methods, European Commission, SANCO/825/00 rev. 6, (2000).

[241] Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, Guidelines for residues monitoring in the European Union, Second edition, 1999/2000, SANCO/3103/2000.

[242] Regulatory Limits for Pesticide Residues in Water, IUPAC Technical Report, Pure Appl. Chem., 75 (2003) 1123.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE TOTAL DE

N-METILCARBAMATOS

MEDIANTE HPLC EN AGUAS

1 INTRODUCCIÓN

La preocupación pública por los residuos de plaguicidas ha aumentado notablemente durante la última década y su determinación exacta en muestras medioambientales es de gran importancia. No obstante en el caso del control de calidad rutinario en laboratorios, en ocasiones esta cuantificación se hace innecesaria porque sólo se necesita conocer si la concentración de un determinado compuesto o familia de compuestos está o no por debajo del límite máximo de residuo (LMR) permitido. En este caso los laboratorios están más interesados en resultados de tipo binario “SI/NO” en relación con el LMR que en un resultado numérico específico para un analito concreto. Este tipo de análisis está relacionado con el ámbito de los sistemas de diagnóstico (“*screening*”) que pueden producir información cualitativa o semicuantitativa. La rápida respuesta instrumental proporcionada por este tipo de sistemas se utiliza frecuentemente para tomar decisiones inmediatas, por ejemplo someter o no a una muestra a un análisis cuantitativo más exhaustivo. Esto conlleva importantes ventajas tales como menores costes, rapidez y simplicidad o minimización de errores debido a la diferencia de tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis, entre otras [243,244].

En general, los métodos de diagnóstico tienen las siguientes características [245]:

1. Tienen más interés en conocer si el resultado supera un determinado valor más que en el resultado cuantitativo en sí.
2. Normalmente requieren un menor tratamiento de la muestra.
3. Proporcionan una respuesta que se usa para tomar una decisión inmediata.

[243] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, Trends Anal. Chem. 11 (1999) 685.

[244] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, Crit. Rev Anal. Chem. 30 (2000) 345.

[245] R. Muñoz-Olivas, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 203.

4. Sirven para un primer paso en control de calidad.
5. La respuesta obtenida a veces requiere confirmación mediante una alternativa convencional.

A pesar del hecho de que los métodos cualitativos o semicuantitativos no proporcionan la misma cantidad de información que los métodos cuantitativos, poseen algunas ventajas para la monitorización de grupos de compuestos con límites regulados, donde la clave es conocer si la muestra cumple o no con la legislación vigente, en lugar de conocer con exactitud una concentración dada. Algunas de estas ventajas son especialmente útiles en laboratorios de análisis de rutina, fundamentalmente en calidad y seguridad alimentaria o en análisis biomédico, tales como la de evitar continuas recalibraciones, proporcionar un alto número de análisis, la obtención de una respuesta rápida a un problema analítico, la reducción de las operaciones de mantenimiento para obtener una respuesta instrumental satisfactoria y el fácil establecimiento de gráficos de control, siempre que el número de concentraciones bajo estudio sean pocas [246]. Valcárcel y Cárdenas establecen una clasificación para estas metodologías analíticas de diagnóstico basada en la distinción entre sistemas de diagnóstico de muestra (*sample screening systems*) y sistemas de diagnóstico de analito (*analyte screening systems*) [247]. El primer caso hace referencia a metodologías analíticas rápidas dirigidas a identificar y seleccionar, a partir de un conjunto, un grupo de muestras que contendrán uno o más analitos por encima de un determinado nivel de concentración. El segundo caso se usa para definir metodologías orientadas a la identificación de los analitos en muestras complejas y en multideterminaciones [243,248]. En el caso de los sistemas de diagnóstico de muestra, la respuesta esperada es de tipo binario (SI/NO) y/o un índice total, mientras que en los sistemas de diagnóstico de

[246] J. Aybar Muñoz, E. Fernández González, L.E. García-Ayuso, A. González Casado, L. Cuadros-Rodríguez, *Talanta* 60 (2003) 433.

[247] M. Valcárcel, S. Cárdenas, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 81.

[248] M. Valcárcel, M. Gallego, S. Cárdenas, *Chromatographia* 53 (2001) 149.

analito se proporciona información acerca de cada uno de los analitos presentes en la muestra. Como resultado, en el primer caso se requiere una instrumentación analítica más sencilla, mientras que en el segundo caso se deben utilizar detectores más potentes acoplados generalmente a técnicas electroforéticas o cromatográficas. Los métodos de diagnóstico han demostrado su utilidad en muestras de interés medioambiental, clínico y análisis de alimentos [247]. Recientemente se ha usado el análisis por (FIA) para establecer métodos de diagnóstico para la determinación de clorpromazina en orina [249] o de Cu(II) en aguas [250].

La respuesta binaria proporcionada por estos sistemas de diagnóstico también posee connotaciones cuantitativas, ya que al utilizar instrumentos y trabajar con datos que deben ser convertidos en una respuesta binaria debe considerarse la siguiente información cuantitativa [243]:

- El límite de detección de la técnica empleada.
- El umbral impuesto por el usuario o por la legislación en vigor.
- El nivel de corte (“*cut-off*”) adoptado por el analista.
- La incertidumbre del análisis.

El uso de una respuesta binaria no es tan simple como pudiera parecer, siendo necesario considerar tratamientos quimiométricos adecuados para diseñar y aplicar un sistema de diagnóstico de muestra. Igualmente como para cualquier método analítico, los métodos de diagnóstico deben validarse, estableciendo sus correspondientes parámetros de calidad con objeto de comprobar que son válidos para la finalidad con la que se han diseñado. Entre estos parámetros se encuentra la estimación de la incertidumbre, que aunque ha sido ampliamente estudiada en análisis cuantitativo, no es tan conocida en el caso de los métodos de diagnóstico, siendo diferente su expresión [251]. En estos casos la incertidumbre debe

[249] B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 516 (2004) 67.

[250] S. Meseguer-Lloret, P. Campins-Falcó, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Talanta 64 (2004) 1030.

[251] S. Ellison, Accred. Qual. Assur. 5 (2000) 346.

relacionarse con el proceso de toma correcta o incorrecta de decisiones, y debe tener en cuenta las probabilidades α y β de cometer errores tipo I (o falso positivo) o tipo II (falso negativo). Rius y *col.* [252] han recogido las diferentes aproximaciones existentes para calcular la incertidumbre en este tipo de metodologías de diagnóstico (métodos cualitativos o semicuantitativos). Estos autores han propuesto una metodología combinada basada en intervalos estadísticos para estimar la incertidumbre de respuestas binarias proporcionadas por métodos de diagnóstico [253]. Esta metodología consiste en distintos pasos experimentales: una vez que se conoce el *límite de especificación* (es decir, el límite establecido en términos de concentración de analito), debe establecerse la relación entre este límite y la respuesta instrumental. Una vez registradas las respuestas instrumentales para muestras de rutina, estas se comparan con la respuesta instrumental previamente establecida por el límite de especificación por medio de un valor de corte (“*cut-off*”). Finalmente puede tomarse una decisión de conformidad si/no, con un determinado nivel de probabilidad de cometer errores. En este caso igualmente se considerará la estimación de parámetros de calidad con objeto de validar el método, tales como la *sensibilidad* o la *especificidad*.

Considerando el interés que suscita la determinación de carbamatos, como se indicó en el capítulo anterior y teniendo en cuenta las ventajas que presentan las metodologías de diagnóstico, en el presente capítulo se propone el establecimiento de un nuevo método para el control de NMCs en aguas, que puede clasificarse como método de diagnóstico de muestra (“*sample screening system*”), ya que implica el empleo de una instrumentación básica y además tiene como finalidad la obtención de un índice total, en este caso relativo al contenido total de NMCs, sin distinción entre ellos. Para ello se empleará la reacción CL de los POs como forma de detección muy sensible y de fácil acoplamiento con sistemas de flujo, como

[252] A. Pulido, I. Ruisánchez, R. Boqué, F.X. Rius, Trends Anal. Chem., 22 (2003) 647.

[253] A. Pulido, I. Ruisánchez, R. Boqué, F.X. Rius, Anal. Chim. Acta, 455 (2002) 267.

el FIA. La estimación de la incertidumbre y la validación del método propuesto se llevará a cabo siguiendo la metodología comentada anteriormente [253].

2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DEL MÉTODO

El sistema FIA-CL usado para establecer este nuevo método de determinación del índice total de NMCs es el mismo que el propuesto para llevar a cabo el método de determinación cuantitativa de carbaril, descrito en el Capítulo 1 de la Memoria y que se basó en la descomposición de carbaril a metilamina (MA) y detección de ésta mediante la reacción CL de los peroxioxalatos. El procedimiento que proponemos en este caso puede resumirse en los siguientes pasos:

- (i) Descomposición conjunta de los NMCs presentes para obtener MA.
- (ii) Formación del derivado fluorescente MA-OPA en presencia de N-acetilcisteína (NAC).
- (iii) Oxidación del bis[2,4,6-triclorofenil]oxalato (TCPO) mediante H_2O_2 usando imidazol como catalizador, en presencia del un fluoróforo, el cual emite radiación CL de forma proporcional a la concentración de MA y por lo tanto proporcional a la concentración de NMCs presentes en la muestra.

El sistema FIA-CL empleado, así como los valores óptimos seleccionados para el método de determinación de MA se muestran en la Figura 1 y la Tabla 9 del Capítulo 1 de esta Memoria y obviamente son comunes al método que aquí se propone.

En este caso, la descomposición previa de los posibles NMCs presentes en la muestra con objeto de obtener MA se llevará a cabo mediante hidrólisis. Esta hidrólisis puede realizarse de tres formas diferentes:

- a) Hidrólisis ácida: requiere pH inferior a 2 y se produce de forma muy lenta [254].
- b) *Hidrólisis enzimática*: mediante el empleo de, entre otras, carboxilesterasas [255].
- c) *Hidrólisis básica*: se produce a pH superior a 10 y temperaturas elevadas [256].

Uno de los problemas que presentan estos compuestos es que sus hidrólisis son muy lentas y por lo tanto persisten en la naturaleza originando contaminaciones y pudiendo pasar a la cadena alimenticia. Como ya se comentó en la Introducción, el modo más común para la determinación de carbamatos, es su hidrólisis básica para la obtención de MA y posterior marcado con un fluoróforo para obtener un derivado fluorescente [256]. Este proceso de hidrólisis se produce a un pH superior a 10 y requiere elevada temperatura (100 °C) [257,258]. Dicho proceso puede seguir dos caminos diferentes, mostrados en la Figura 23: (A) mediante la formación de un intermedio tetraédrico, o (B) mediante eliminación. En ambos casos uno de los productos finales es la MA.

[254] Carbamate Pesticides: A general introduction, Environmental Health Criteria, World Health Organization, Ginebra, 1986, Capítulo 7.

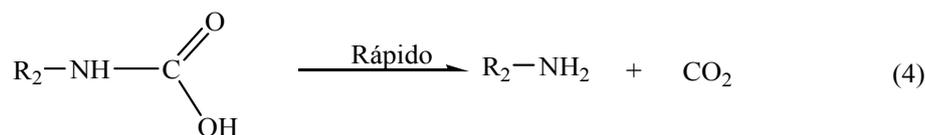
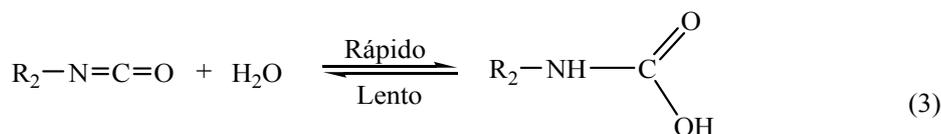
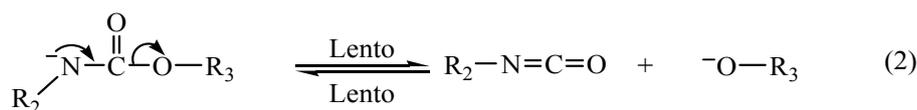
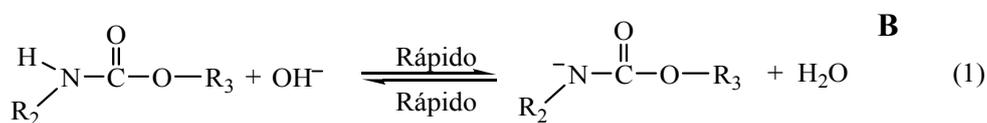
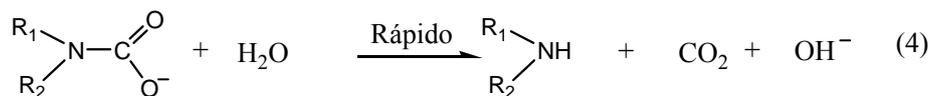
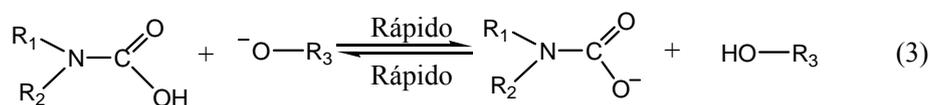
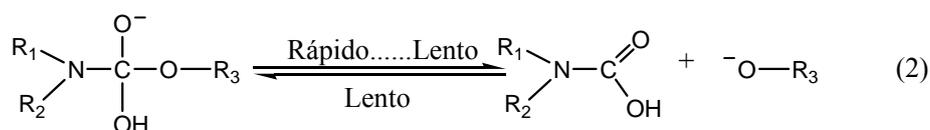
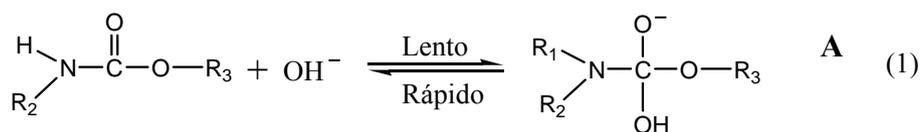
[255] T.L. Huang, A. Szekacs, Pharm. Res. 10 (1993) 639.

[256] EPA Method 531.1., Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatisation (1995) Revision 3.1.

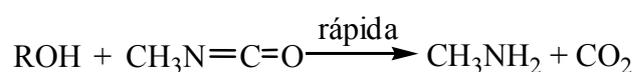
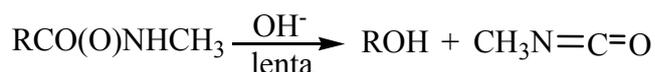
[257] F. García-Sánchez, C. Cruces-Blanco, Anal. Chem. 58 (1986) 73.

[258] M. Rasul Jan, Jasmin Shah, Humayun Khan, Chemosphere 52 (2003) 1623.

Figura 23. Mecanismos de reacción para la hidrólisis básica de NMCs a MA. (A) Esquema de la reacción mediante la formación de un intermedio tetraédrico. (B) Esquema de la reacción mediante un paso de eliminación.



Para acelerar el proceso de hidrólisis básica de los NMCs a altas temperaturas, se ha propuesto la adición de sales de amonio cuaternario en tampón borato (pH 9.3) [259]. El mecanismo de esta reacción comprende dos etapas como se muestra a continuación.



La primera etapa es la que controla la cinética de la reacción, y puede ser catalizada por bases como las sales de amonio cuaternarias, como por ejemplo el Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Considerando este efecto, se seleccionó esta sal de amonio cuaternaria para llevar a cabo la hidrólisis básica.

Posteriormente se procedió a la optimización del tiempo requerido para llevar a cabo una hidrólisis completa. Para realizar este estudio se seleccionaron diferentes NMCs: aldicarb, promecarb, carbofuran y carbaril. Todos ellos producen al final de la reacción de hidrólisis MA, que posteriormente será determinada con el sistema FIA-CL anteriormente propuesto. Aunque se eligieron estos cuatro compuestos como representativos de esta familia de plaguicidas, el número de ellos puede ser mayor, ya que la única condición para su determinación con este sistema es que produzcan MA tras su hidrólisis.

Para llevar a cabo la optimización del proceso de hidrólisis para cada plaguicida, se prepararon patrones de 0.20 mg l⁻¹ de cada uno de ellos en CTAB 20 mM disuelto en un tampón borato sódico 30 mM, pH 9.3. La temperatura de la reacción (controlada mediante un baño de agua) fue de 95°C, y se ensayaron varios tiempos de hidrólisis (1, 5 y 10 min). La

[259] Y.S. Wu, H.K. Lee, S.F.Y. Li, Anal. Chem. 72 (2000) 1441.

disolución resultante, que debía contener MA, fue sometida al procedimiento analítico propuesto en el Capítulo 1, para la determinación de MA mediante el sistema FIA-CL, produciendo previamente el correspondiente derivado MA-OPA. Tras la medida de la señal CL se procedió a calcular el contenido de MA encontrado tras la hidrólisis, relacionando éste finalmente con la cantidad de carbamato en la disolución de partida. Esta cantidad fue comparada con la cantidad teórica presente (0.20 mg l^{-1}) con objeto de calcular los correspondientes porcentajes de recuperación. Los resultados mostraron que la hidrólisis total se completaba en 5 min, con recuperaciones no significativamente distintas al 100% (Tabla 23).

Con objeto de demostrar la ventaja del proceso de hidrólisis seleccionado, se compararon los resultados obtenidos al emplear CTAB, con los obtenidos mediante el método convencional, empleando NaOH. En este último caso igualmente se consideraron las mismas concentraciones de plaguicida (0.20 mg l^{-1}) en las disoluciones estudiadas y las medidas se llevaron a cabo aplicando el método FIA-CL propuesto para determinar la MA generada. Como se puede ver en la Tabla 23, al comparar los diferentes porcentajes de recuperación calculados, los tiempos para alcanzar una hidrólisis completa a MA con CTAB son mucho menores que en el caso de la hidrólisis con NaOH. Otra ventaja adicional es que mediante el empleo de CTAB se consigue una hidrólisis homogénea de todos los NMCs ensayados, mientras que con NaOH, se requieren diferentes tiempos de hidrólisis, dependiendo del carbamato ensayado. Además, en el caso concreto del carbofuran no se obtuvieron señales en NaOH, debido a que las experiencias se llevaron a cabo a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ y para el carbofuran se requiere una temperatura de $150 \text{ }^\circ\text{C}$ [257], mientras que empleando CTAB se consiguió llevar a cabo su hidrólisis a 95°C . En resumen, el uso de CTAB en la hidrólisis de los NMCs, ha posibilitado la hidrólisis de todos los compuestos en estudio en tiempos homogéneos y menores (5 min).

Tabla 23. Comparación de modos de hidrólisis de distintos NMCs a MA a distintos tiempos mediante evaluación de porcentajes de recuperación (0.20 mg l⁻¹ de cada carbamato en disolución original).

Hidrólisis NaOH 1M, 95 °C: Recuperación (%)				
Tiempo (min)	Promecarb	Carbaril	Aldicarb	Carbofuran
0	0.00	0.00	0.00	0.00
40	24.59	91.69	39.56	0.00
60	35.29	88.42	81.83	0.00
80	94.38	132.98	113.32	0.00
Hidrólisis CTAB 20 mM, 95 °C: Recuperación (%)				
Tiempo (min)	Promecarb	Carbaril	Aldicarb	Carbofuran
1	0.00	0.00	0.00	0.00
5	94.03	97.78	95.80	98.30
10	96.70	95.34	90.80	97.60

Para comprobar que todos los NMCs seleccionados se hidrolizaban a las mismas condiciones al encontrarse presentes en una mezcla, se sometieron al proceso de hidrólisis tres mezclas distintas con diferentes concentraciones de patrones de los plaguicidas en estudio, todas ellas con una concentración final de 0.20 mg l⁻¹ de NMCs. Las diferentes mezclas, preparadas por triplicado, presentaron las siguientes proporciones:

- a) 100% de carbaril
- b) 55% de carbaril, 15% de promecarb, 15% de carbofuran y 15% de aldicarb
- c) 25% de carbaril, 25% de promecarb, 25% de carbofuran y 25% de aldicarb.

Estas mezclas se prepararon en un rango de 100 al 25% para el carbaril, porque es el plaguicida de uso más común para el tratamiento de vegetales dentro de la familia de los carbamatos, y por lo tanto es el que con más probabilidad puede encontrarse en aguas naturales. El uso en la agricultura de los otros tres carbamatos seleccionados es similar, por lo que las proporciones usadas fueron las mismas. Una vez sometidas las disoluciones procedentes de la hidrólisis al método FIA-CL propuesto para la determinación de MA, se observó que no existían diferencias significativas entre las señales CL obtenidas, y por tanto tampoco entre los contenidos de MA calculados para cada muestra. De este estudio se concluyó que los NMCs seleccionados se hidrolizan en las mismas condiciones y proporción, y que esta hidrólisis es completa.

3 PROPUESTA Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En este estudio, se propone una metodología basada en el establecimiento de intervalos estadísticos para estimar la incertidumbre asociada a la determinación del índice total de NMCs, basándonos en medidas instrumentales de CL. Así, una vez establecido un límite de especificidad en términos de concentración de analito, se establece la relación entre dicho límite y la respuesta instrumental. Recogidas las respuestas en los análisis de rutina, éstas se comparan con la respuesta instrumental establecida para el límite de especificación mediante el establecimiento de unos límites de “corte”. Finalmente, se toma una decisión acerca de si la muestra contiene o no a los analitos dentro de los límites especificados, con una determinada probabilidad de error, y definiendo unos parámetros para caracterizar la fiabilidad del método.

En esquema, el método consta de las siguientes etapas:

Etapas 1: Definición del *límite de especificidad* (SL)

Etapas 2: Conversión del SL en *señal de especificación* (r_{SL})

Etapas 3: Cálculo del intervalo de incertidumbre del análisis semicuantitativo (u_s).

Etapas 4: Cálculo de la sensibilidad y especificidad del análisis semicuantitativo.

3.1 Etapa 1. Definición del Límite de Especificidad

En esta primera etapa se estableció un *límite de especificidad* (SL), expresado como concentración de analito en muestra. Este límite puede venir impuesto por organizaciones reguladoras o bien por criterios internos dentro de un laboratorio, basados en los requisitos de su sistema de control de calidad. En nuestro caso, el objetivo es saber si el contenido total de cuatro NMCs (carbaril, carbofuran, aldicarb y promecarb) en aguas

subterráneas está por encima o por debajo de un determinado valor, que será nuestro SL.

Con objeto de probar la aplicabilidad del método para varios niveles de concentración de NMCs en muestras de agua, se definieron diferentes SL correspondientes a distintas concentraciones: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ de MA, que corresponden aproximadamente a 0, 0.03, 0.07, 0.10, 0.13, 0.16 y 0.20 mg l^{-1} del contenido total de NMCs, respectivamente, en muestra de agua.

3.2 Etapa 2. Conversión del SL en señal de especificación (r_{SL})

Con objeto de agilizar el método y dada la rapidez de la respuesta instrumental del sistema FIA-CL empleado en el estudio, cada SL definido anteriormente es convertido en una señal instrumental, definida como *señal de especificación* (r_{SL}), donde cada r_{SL} se corresponde con la media de la intensidad de la señal CL obtenida para un SL dado (es decir, un nivel de concentración definido). Con el propósito de calcular los diferentes r_{SL} asociados a los siete SL propuestos, se prepararon diferentes alícuotas de muestras de agua dopada con varias proporciones de los plaguicidas en estudio, del mismo modo que en la sección 2.1, es decir:

- a) 100% de carbaril
- b) 55% de carbaril, 15% de promecarb, 15% de carbofuran y 15% de aldicarb
- c) 25% de carbaril, 25% de promecarb, 25% de carbofuran y 25% de aldicarb.

De esta forma se tiene en cuenta en el cálculo de los r_{SL} la posible variabilidad introducida por las diferentes proporciones en las que pueden encontrarse los NMCs en las muestras reales. Cada una de las mezclas se preparó por triplicado para cada SL seleccionado (es decir, 9 disoluciones dopadas para cada SL). Posteriormente se sometieron las distintas muestras al método analítico propuesto para la determinación de MA, procediendo

previamente a la hidrólisis en las condiciones optimizadas. Las muestras fueron medidas en el sistema FIA-CL propuesto, siendo inyectadas por triplicado, originando un número final de 27 medidas individuales para cada SL considerado. A partir de los conjuntos de muestras independientes, conteniendo todas ellas la misma concentración total de NMCs a un SL dado, se calcularon las r_{SL} asociadas como media de las respuestas instrumentales.

3.3 Etapa 3. Cálculo del intervalo de incertidumbre del análisis (u_s)

A partir del cálculo de cada r_{SL} , y asumiendo que la señal experimental sigue una distribución normal, se calculó un intervalo de incertidumbre del análisis (u_s) para cada límite de especificación seleccionado a partir de un intervalo de cobertura definido como (Eq. (1)):

$$u_s = r_{SL} \pm \Delta(\alpha, \beta, v) \cdot \sqrt{\frac{MS_{SL}}{m}} \quad (1)$$

donde $\Delta(\alpha, \beta, v)$ es el parámetro de una *distribución t no central* con v grados de libertad (igual a $N-r$) que depende tanto de α como de β , siendo α la probabilidad de cometer un error estadístico de tipo I (falso positivo, normalmente 0.05) y β la probabilidad de cometer un error estadístico de tipo II (falso negativo, normalmente 0.05); MS_{SL} es la media cuadrática (es decir, la varianza) para un valor de SL dado, que tiene en cuenta que cada SL (nivel de concentración) ha sido medido para tres grupos con proporciones de NMCs diferentes y m es el número de réplicas que habría que realizar para el análisis de una muestra desconocida (usualmente $m=1$). MS_{SL} se calcula como:

$$MS_{SL} = \frac{\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N - r} \quad (2)$$

donde x_{ij} es cada una de las medidas individuales llevadas a cabo, definidas como réplica j de cada una de las mezclas i ; \bar{x}_i es la media de los valores de cada mezcla; N es el número de determinaciones independientes llevadas a cabo para calcular cada r_{SL} ($N=27$); y r es el número de muestras dopadas preparadas para determinar cada SL ($r = 9$).

Como se ha comentado anteriormente, este intervalo se ha calculado teniendo en cuenta la variabilidad introducida por las diferentes mezclas preparadas al calcular r_{SL} . Así, MS_{SL} es similar a la *media cuadrática entre grupos* calculada cuando se lleva a cabo un análisis de la varianza (ANOVA). Además el uso del estadístico Δ , en lugar de la más usual *t de Student*, reduce la probabilidad de aceptar una muestra como válida en relación con un cierto límite especificado cuando en realidad la concentración del analito está por encima de dicho límite (falsos negativos).

Como resumen, la incertidumbre del límite de especificación depende de la probabilidad de cometer errores estadísticos tanto de tipo I como de tipo II, de la precisión del análisis semicuantitativo y del esfuerzo experimental, en términos del número de réplicas realizadas para cada determinación, como se deduce de las ecuaciones 1 y 2.

3.4 Etapa 4. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del análisis

Una vez establecidos los límites del intervalo de cobertura para r_{SL} en función de la incertidumbre del análisis (valores superior e inferior del intervalo definido por u_s), la señal instrumental (r_i) correspondiente a las muestras dopadas, conteniendo mayor o menor concentración que el SL, se compararon directamente con tales límites. Como resultado, se puede discernir si el nivel de concentración de NMCs cumple o no con los requisitos establecidos por el límite impuesto. De esta comparación se pueden obtener tres resultados diferentes:

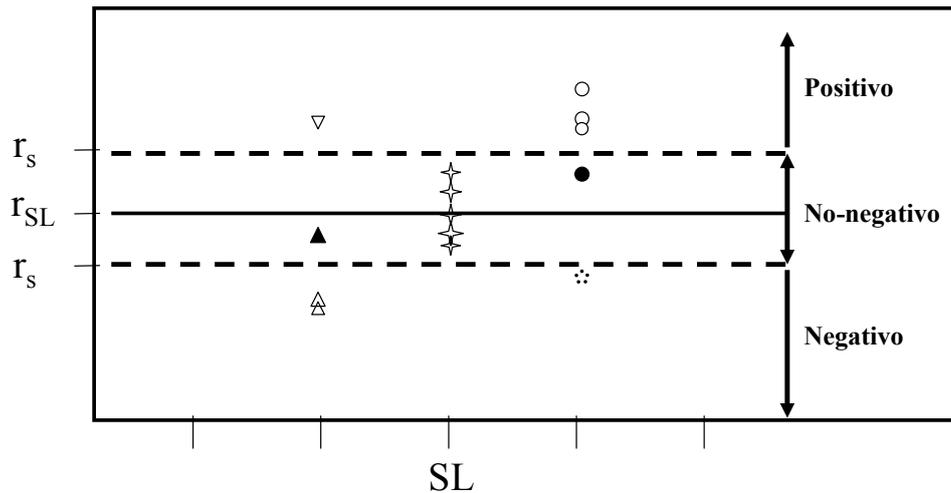
- (a) La señal instrumental de la muestra desconocida está por debajo del límite inferior definido por u_s (*valores negativos*).

- (b) La señal instrumental de la muestra desconocida está entre los dos valores o es igual a los límites superior e inferior definidos por u_s (*valores no-negativos*).
- (c) La señal instrumental de la muestra desconocida está por encima del valor definido por el límite superior definido por u_s (*valores positivos*).

En el caso (a) la muestra desconocida debería ser clasificada como *negativa*, esto es, el contenido total de NMCs es más bajo que el SL correspondiente. En el caso (c), la muestra debería ser clasificada como *positiva*, es decir, contiene una concentración de NMCs mayor que el SL correspondiente. Por el contrario, en el caso (b) la muestra debe ser considerada como *no-negativa*. En este caso no se puede asegurar que el contenido de NMCs en la muestra sea menor que el SL y por lo tanto no se puede considerar como negativo, pero podría ser una muestra positiva, por lo que será considerada como muestra *no-negativa*. Además hay que considerar que muestras clasificadas como positivas o negativas pueden no serlo realmente (probabilidad de falsos positivos y falsos negativos, respectivamente). Estas diferentes situaciones están representadas gráficamente en la Figura 24.

Figura 24. Esquema de las diferentes situaciones simuladas en análisis semicualitativo.

SL: límite de especificidad, r_{SL} : señal de especificación; \star respuestas obtenidas para SL; \triangle verdaderos negativo; \circ verdaderos positivos; \diamond falsos negativos; ∇ falsos positivos; en negrita los no-negativos.



Considerando el valor de r_i obtenido para cada SL, la fiabilidad del análisis viene determinada a partir de la relación entre el número de verdaderos positivos (t_p), falsos positivos (f_p), verdaderos negativos (t_n), falsos negativos (f_n) y los valores no-negativos (n_n) obtenidos. Con este propósito, se definen los siguientes parámetros [252]:

$$Sensibilidad = \frac{tp}{tp + fn + nn} \times 100$$

$$Especificidad = \frac{tn}{tn + fp} \times 100$$

La *Sensibilidad* es por tanto la proporción de verdaderos positivos que el método genera con respecto al número total de positivos reales, incluyendo los valores dentro del intervalo definido (los no-negativos). El

sentido estadístico de la sensibilidad puede explicarse en términos de “*potencia*” del método, definido como $(1-\beta)$, donde β representa la probabilidad de obtener falsos negativos. En el mismo sentido, la *Especificidad* se define estadísticamente como la proporción de verdaderos negativos con respecto al total de negativos reales, estando esto relacionado con el nivel de significación α (probabilidad de obtener un falso positivo).

Como resumen, una vez realizadas las medidas de CL para las diferentes muestras de agua dopadas, los resultados obtenidos para cada SL se muestran en la Tabla 24.

Como se puede ver, el método muestra una excelente especificidad, ya que el número de falsos negativos es igual a 0 en todos los casos. Igualmente, la sensibilidad es muy satisfactoria ya que no se encontró ningún falso positivo, tan sólo algunos valores no-negativos.

En cualquier caso, el método podría aplicarse para valores diferentes de SL, dependiendo de la aplicación particular o de la matriz de interés.

Tabla 24. Validación del método para la determinación del índice total de NMCs en aguas a distintos niveles de NMCs ensayados.

SL: MA ($\mu\text{g l}^{-1}$)^{a)}	5	10	15	20	25
SL: NMCs (mg l^{-1})^{a)}	0.03	0.07	0.1	0.13	0.16
r_{SL}	150.49	184.01	186.34	275.16	273.78
u_s	134.25-166.73	154.62-213.39	170.52-202.15	242.89-307.42	275.49-292.82
Verdaderos positivos	45	27	27	7	8
Verdaderos negativos	0	16	26	36	36
Falsos positivos	0	0	0	0	0
Falsos negativos	0	0	0	0	0
No-negativos	9	11	1	11	7
Sensibilidad (%)	83.3	71.1	96.4	38.8	53.0
Especificidad (%)	----	100	100	100	100

^{a)}N = 27 determinaciones para cada nivel

INTRODUCCIÓN AL BLOQUE II

ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS

1 ANTECEDENTES

En el análisis de alimentos de origen animal es necesario el control de residuos procedentes del uso de *fármacos aplicados en veterinaria* para el tratamiento y control de enfermedades en animales destinados a consumo humano, existiendo límites máximos de residuos (LMRs) establecidos en distintos tejidos animales y productos derivados. Estos fármacos son fundamentalmente *antibióticos*. La antigua clasificación, que aún no ha sido abandonada, reserva el término “antibiótico” a compuestos naturales o semisintéticos que actúan sobre los organismos patógenos por muy distintos mecanismos, mientras que denomina “antibacterianos” a aquellos otros compuestos de origen sintético. La terminología aquí empleada, será la de llamar “antibiótico” a cualquier compuesto farmacéutico que actúe contra las bacterias [260].

El uso de antibióticos en veterinaria comenzó en la década de los cincuenta, con el empleo de la oxitetraciclina y la clortetraciclina como aditivos en piensos. En la actualidad una gran variedad de antibióticos se emplean en la prevención y el tratamiento de distintas enfermedades. En los años ochenta, se estimó que al menos el 60% de todos los animales usados en alimentación, habían sido tratados con antibióticos en algún momento de su vida. Con la actual práctica de la ganadería intensiva, esta cifra puede ser bastante mayor.

Es un hecho demostrado que los residuos de antibióticos en los alimentos procedentes de animales sacrificados, ya sea por la administración de estos compuestos al animal o por su adición a los piensos que comen, constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, ya que residuos de antibióticos en los alimentos pueden causar reacciones alérgicas a aquellos individuos que sean hipersensibles a los mismos. Por otro lado,

[260] A. Di Corcia, M. Nazzari, J. Chromatogr. A 974 (2002) 53.

Introducción bloque II

concentraciones de residuo de antibióticos bajas en los animales, durante tiempo prolongado, pueden hacer que ciertas bacterias se transformen en especies resistentes y que pasen a los humanos a través de los alimentos con el lógico perjuicio [261]. Además, todavía no se conocen los efectos que pueden producir en humanos niveles bajos de residuos de antibióticos durante largo tiempo de exposición a los mismos mediante ingesta. Los niveles de riesgo de residuos de antibióticos en los alimentos están causados fundamentalmente por dos factores:

- a) Por no respetar las recomendaciones de tiempo de la eliminación del antibiótico por el animal, antes de ser sacrificado.
- b) Por contaminación de los piensos durante su manejo por errores humanos.

La normativa Europea establece los requisitos necesarios para garantizar la seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos veterinarios en todo el proceso de su autorización, elaboración, comercio, almacenamiento, suministro y utilización, en relación con los animales de destino, así como de su seguridad, habida cuenta las repercusiones sobre la salud pública y el medio ambiente [262]. En el R.D. 109/1995 se exponen los requisitos de calidad, eficacia, seguridad y pureza que ha de cumplir un medicamento veterinario para poder ser registrado y autorizado. En este sentido, no podrá autorizarse la puesta en el mercado de un medicamento veterinario, con excepción de los inmunológicos, para ser administrado a animales cuya carne o productos sean destinados al consumo humano si no tiene establecido el correspondiente LMR tal y como está previsto en la Decisión de la Unión Europea 2377/90/CEE [263]. Esta normativa entró en

[261] H.C. Wegener, F.M. Aarestrup, P. Gerner-Smidt, F. Bager, *Acta Vet. Scand. Suppl.* 92 (1999) 51.

[262] Real Decreto 109/1995, de 27 de enero sobre medicamentos veterinarios. *BOE.* 53, de 3 de marzo de 1995.

[263] Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990. *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.

vigor a partir del 1 de Enero de 1997, quedando desde entonces prohibido el uso de medicamentos veterinarios que contengan sustancias farmacológicamente activas que no estén mencionadas en tal normativa, en especies productoras de alimentos. La Directiva comunitaria 96/23/CE [264] de 29 de abril de 1996 establece las medidas de control y los planes de vigilancia que deben aplicarse para la detección de determinadas sustancias y sus residuos, potencialmente tóxicos para el consumidor, en animales vivos o productos de origen animal destinados a consumo humano. Según los estudios realizados sobre el efecto de ciertas sustancias en la salud humana, los residuos se han clasificado en dos grupos: el *grupo A*, que engloba sustancias con efecto anabolizante y otras sustancias no autorizadas, y el *grupo B*, que son medicamentos veterinarios y otros contaminantes para los que se fija un LMR.

Asimismo, el Reglamento (CE) 1181/2002 de la Comisión [265] modifica el anexo I del Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, sobre los LMR de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, incorporando nuevas sustancias. Los grupos incluidos cuyos LMRs están legislados en diferentes tejidos animales comestibles y productos (grasa, hígado, riñón, leche, músculo, etc.) se aplican a diversas especies productoras de alimentos (bovinos, porcinos, caprinos, equinos, aves, conejos, salmónidos, etc.). Dentro de los agentes antiinfecciosos se encuentran los quimioterapéuticos (sulfonamidas y derivados de la diaminopirimidina), antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, flurofenicol y compuestos asociados, tetraciclinas, ansamicina,

[264] Directiva 96/23/EC de Abril 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancia y sus residuos en animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/EEC y 86/469/EEC y las Decisiones 89/18/EEC y 91/664/EEC, Off. J. Eur. Commun. L125 (1996) 10.

[265] Reglamento 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento CEE 2377/90 del Consejo 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 172 de 2 de Julio de 2002.

Introducción bloque II

pleuromutilinas, lincosamidas, aminoglucósidos, etc.) y agentes antiparasitarios (salicilanidas, benzimidazoles, derivados fenólicos, etc.).

Además de todo lo expuesto hasta ahora en cuanto al riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos y su control, existe otro problema adicional y es el de su presencia en el medio ambiente, ya que a pesar de que el efecto de los plaguicidas ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, los fármacos se han incorporado constantemente en el medio ambiente (a través de la alimentación animal o de residuos orgánicos animales) sin el debido control [266,267]. En los últimos años se han publicado algunos artículos de revisión concernientes al efecto de los fármacos en el medio ambiente [268], lo que demuestra el creciente interés que este problema está suscitando en la comunidad científica.

En los últimos tiempos se han obtenido nuevos conocimientos sobre los efectos de xenobióticos de uso extendido, que actúan como disruptores endocrinos, lo que ha provocado inquietud en ámbitos relacionados con la salud pública ya que sustancias consideradas como seguras pueden causar efectos desconocidos incluso a concentraciones traza. Así, una gran variedad de productos farmacéuticos que incluye β -bloqueantes (como el propanolol), analgésicos (como el ibuprofeno), disruptores endocrinos (como el etinilestradiol) y antimicrobianos (como eritromicina, ciprofloxacina, sulfametazina y tetraciclina) se han detectado en plantas de tratamiento de aguas residuales [269,270,271,272,273,274]. Además, estos

[266] F. M. Christensen, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28 (1998) 212.

[267] "Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts of Aquatic Ecosystems, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)", R.T. Williams (Ed.), Florida, 2005.

[268] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alba, D. Barceló, *Trends in Anal. Chem.* 22 (2003) 340.

[269] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2719.

[270] X.S. Miao, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 133.

[271] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A.* 910 (2001) 69.

[272] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109.

[273] A. Gobel, C.S. Mc Ardell, M.J.F. Suter, W. Giger, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4756.

contaminantes emergentes presentan las propiedades necesarias para su bioacumulación, provocando efectos desconocidos en los ecosistemas acuáticos o terrestres. De esta forma, los medicamentos se han convertido en un problema medioambiental de envergadura. Si hasta hace unos años lo que preocupaba prioritariamente eran los vertidos de carácter industrial, ahora el interés se centra en el impacto de los vertidos que reciben los ríos desde los núcleos de población.

La exposición a fármacos del medio ambiente es función de la combinación de varios factores:

- Cantidad manufacturada
- Desecho del producto sin usar o una vez caducado
- Dosis (cantidad, frecuencia y duración)
- Eficacia de la excreción del compuesto inalterado y de sus metabolitos bioactivos
- Adsorción/ desorción en los suelos
- Descomposición metabólica una vez sedimentado

Así, los antibióticos y las sustancias empleadas como aditivos alimentarios para incrementar el crecimiento de animales (como por ejemplo en piscifactorías), acaban vertiéndose al medio ambiente, sin que se tenga gran conocimiento de las consecuencias de esta exposición. Por ejemplo, las sustancias empleadas en ganadería, se excretan en la orina o heces directamente al campo, pudiendo presentar concentraciones locales altas. En concreto, en el caso de las sulfonamidas se han encontrado concentraciones del orden de varios mg kg^{-1} en muestras de estiércol [275,276], valores que pueden dar lugar a varios cientos de gramos de sulfonamida por hectárea, que pueden alcanzar a suelos dedicados a la

[274] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfé, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3533.

[275] M.Y. Haller, S.R. Muller, C.S. McArdell, A.C. Alder, M.J.F. Suter, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 111.

[276] T. Pfeifer, J. Tuerk, K. Bester, M. Spiteller, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 663.

Introducción bloque II

agricultura. Así mismo, los antibióticos empleados en piscifactorías se vierten directamente al agua, acumulándose y afectando a los microorganismos acuáticos.

El destino de los fármacos en el medio ambiente puede dividirse en tres rutas principales [277,278]:

1. El producto se mineraliza a dióxido de carbono y agua
2. El producto es lipofílico y parte de él no se degrada, quedando en los sedimentos.
3. El producto se metaboliza a una forma más hidrofílica, pero aún persistente, terminando en las aguas residuales o en un río, pudiendo afectar a organismos acuáticos, si los metabolitos son biológicamente activos. Pueden permanecer en sedimentos o campos de cultivo, terminar formando parte del estiércol y afectar a microorganismos o cultivos.

Las directivas propuestas prescriben que el control del riesgo ambiental debe ser parte del procedimiento para aprobar un nuevo fármaco. La *Food and Drug Administration* (FDA) ha emitido el *Environmental Assessment Technical Handbook* para sus requerimientos medio ambientales. En 1995 emitió una guía para la industria destinada a la valoración medio ambiental de fármacos y suplementos de consumo humano, así como documentos para el control del impacto ambiental de algunos fármacos en concreto. Sin embargo, estas normativas parecen no tener una gran difusión, ya que en los últimos años, sólo unos pocos de los nuevos fármacos incluyen un estudio ecotoxicológico apropiado. En Europa la legislación en este campo se inició al comienzo de los 90, y distingue entre sustancias médicas que no contienen (o no consisten en) organismos modificados genéticamente (OMGs) y aquellas que los contienen. Así, las nuevas normativas de la UE incluyen el medio ambiente en sus decisiones.

[277] S.E. Jørgensen, B. Halling-Sørensen, *Chemosphere* 40 (2000) 691.

[278] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhøfl, S.E. Jørgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.

Esto implica que cualquier ley (en transporte, agricultura, pesca, medicina e industria farmacéutica) tendrá en cuenta el posible impacto medio ambiental. En enero de 1998, la UE emitió una guía técnica para controlar el riesgo de la exposición medio ambiental a fármacos empleados en veterinaria (EM/CAMP/055/96-final). Asimismo, la Directiva Técnica 81/852/EEC (enmienda desde el 1 de abril de 1993) concerniente a productos médicos veterinarios, incluye secciones con los requerimientos básicos para hacer un estudio del riesgo de ecotoxicidad medio ambiental, mientras que la guía EMEA/cvmp/055/96-Final de 1997 proporciona las directrices técnicas para la evaluación del riesgo de sustancias médicas veterinarias.

Sin embargo, las directivas técnicas para productos médicos de consumo humano (directiva UE 75/318/EEC) no incluyen ninguna referencia a la ecotoxicidad o ecotoxicología y aparentemente no hay planes de incluirlas próximamente. En este aspecto difiere de su homólogo veterinario (directiva UE 81/852/EEC), descrito anteriormente. Así, excepto para los productos que contienen OMGs, la legislación no especifica cómo realizar una evaluación del riesgo medio ambiental de los productos farmacéuticos. El borrador de la Guía III/5504/94 propuesta en 1994, indica que las recomendaciones dadas para productos veterinarios son también aplicables a fármacos de consumo humano. En Europa, Alemania es el país que más ha trabajado en este campo y Dinamarca destaca por el número de depuradoras que ya tiene operativas con medios suficientes como para eliminar los restos de medicamentos antes de que lleguen a los ríos. En los demás países, las investigaciones aún son escasas y en España se conoce muy poco del grado de contaminación real que ejercen estas sustancias. Avanzar en el conocimiento del problema es uno de los principales objetivos del programa europeo «Aquaterra», que se desarrollará durante cinco años en cinco grandes ríos del continente: Ebro, Meuse, Brevilles, Elba y Danubio. Participan 45 instituciones de trece países de la UE, más Suiza y Serbia. Un grupo de expertos, coordinado por el Dr. Damiá Barceló

Introducción bloque II

[279,280,281], del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC, lleva ya varios años evaluando la calidad de las aguas del Ebro y profundizando en el impacto que están teniendo los medicamentos y de evaluar en general la contaminación industrial, agrícola y urbana. Aunque el efecto contaminante de los medicamentos no es un hecho nuevo, el avance en las técnicas analíticas ha permitido detectarlos y tomar conciencia del problema que causan en los ecosistemas, siendo necesario potenciar los estudios que determinen el alcance del riesgo, para tomar las medidas necesarias. De momento no hay ninguna legislación sobre el tema, siendo necesario impulsar los estudios que proporcionen métodos suficientemente fiables, sensibles y selectivos para su determinación con objeto de esclarecer si es necesario regular la cantidad máxima de cada fármaco que puede salir de una depuradora.

Por todo lo expuesto hasta ahora, el consumo de fármacos (tanto humano como en veterinaria) obliga al control de sus residuos tanto en alimentos como en el medio ambiente, garantizando que no supongan un riesgo para la salud pública. La correcta evaluación del impacto que supone el uso de estos productos y el diseño de medidas conducentes a eliminar o paliar sus efectos, sólo se puede llevar a cabo si se dispone de técnicas analíticas suficientemente sensibles y selectivas que originan datos analíticos fiables.

[279] Barcelo D., Brix R., Farre, Trends in Analytical Chemistry 25 (8), (2006) 743.

[280] Barth J., Grathwohl P., Das integrierte EU-Projekt AquaTerra erreicht sein zweites Projektjahr. Grundwasser 11(2), (2006) 131.

[281] Ratola N., Lacorte S., Alves A., Barcelo D., J. Chromatogr. A 1114, (2006) 198.

2 CONCEPTOS GENERALES SOBRE SULFONAMIDAS

Las sulfonamidas fueron los primeros fármacos eficaces empleados para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano, aunque la evolución en la investigación, con la aparición de nuevos agentes, limitó su uso. Se emplean en medicina humana contra una gran variedad de microbios, siendo su principal uso en el tratamiento de infecciones del tracto urinario. A su vez, también son extensamente usadas junto con el forraje en granjas y como fármaco veterinario en acuicultura con propósitos profilácticos y terapéuticos. Además, las sulfonamidas actúan como sustancias promotoras del crecimiento.

La primera sulfonamida de importancia clínica fue el prontosil (sulfamidocrisoidina), que se sintetizó en 1935 en Alemania, y se metaboliza *in vivo* a sulfanilamida. Después, se han sintetizado muchas sulfonamidas, las cuales difieren poco en sus actividades antimicrobianas, pero bastante en sus propiedades farmacocinéticas [282].

La presencia de residuos de éstos compuestos en alimentos ha generado un problema de índole social, debido al potencial carcinogénico y la posibilidad del desarrollo de resistencia a los antibióticos humanos, así como severas reacciones alérgicas, como ya se ha comentado anteriormente. Debido a esto, la UE establece en su reglamento un LMR en músculo y leche de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para la suma total de sulfonamidas presentes [263].

2.1 Mecanismo de acción

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas del PABA e impiden la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico. Éste a su vez actúa en la síntesis de timina y purina. Esta acción se ejerce compitiendo por la acción de una enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico.

[282] M. Cué Brugueras, M. Morejón García, Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 15 (1999) 156.

Introducción bloque II

Así, inhiben las enzimas responsables de la condensación del pirofosfato de la 2-amino-4-oxo-6-hidroxi-metildihidropteridina con el PABA. Las células de los mamíferos requieren ácido fólico preformado ya que no pueden sintetizarlo y por lo tanto no son atacadas. El efecto sinérgico de las sulfonamidas asociadas a TMP se debe a la inhibición secuencial de esta vía metabólica.

En cuanto a su actividad antimicrobiana, su espectro de acción es amplio, abarca la mayoría de los microorganismos gram positivos y muchos gram negativos, especialmente estos últimos, pero su uso se ha limitado debido al desarrollo de resistencia. La mayoría se absorbe bien por vía oral, siendo el intestino delgado su lugar principal de absorción. La administración parenteral es difícil, ya que las sales solubles son altamente alcalinas e irritantes para los tejidos. Se distribuyen ampliamente en todos los tejidos y alcanzan niveles altos en los líquidos pleural, peritoneal, sinovial y ocular. Los niveles en el líquido cefaloraquídeo son eficaces en las infecciones meníngeas, pero raras veces se usan para esta indicación [282].

2.2 Combinaciones con TMP

Hoy en día, los preparados comerciales farmacéuticos y veterinarios contienen junto con las sulfonamidas otros compuestos que actúan como potenciadores para incrementar su actividad. Así, enfermedades relacionadas con el sistema respiratorio se tratan usualmente con una combinación de sulfonamidas y TMP.

El TMP actúa en la misma vía metabólica de la síntesis de precursores de nucleótidos que las sulfonamidas, pero a un nivel posterior, concretamente inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa responsable de la conversión del dihidrofolato en tetrahidrofolato.

Actualmente el cotrimoxazol o sulfametoxazol con trimetoprim (SMX/TMP) ha aumentado su interés clínico. Es una combinación fija (5:1)

de los 2 fármacos, por lo general bacteriostática. Ambos agentes bloquean el ciclo metabólico del ácido fólico de las bacterias y son muchos más activos juntos que por separado. Es activo frente a la mayoría de las bacterias gram positivas y gram negativas. Al mismo tiempo, se emplea para el tratamiento de neumonía en pacientes inmunodeprimidos, como son los enfermos de SIDA y aquellos que estén recibiendo medicamentos inmunosupresores, y ha reemplazado el uso de las sulfonamidas solas en el tratamiento y profilaxis de infecciones urinarias bajas (cistitis) y en las altas (pielonefritis) no complicadas [282].

Otras sulfonamidas que se usan en combinación con el trimetoprim son la sulfadiazina (cotrimazina), sulfamoxol (cotrifamol), sulfametopirazina, sulfametrol, sulfadimidina y sulfametoxipiridazina.

2.3 Mecanismos de resistencia

La resistencia a las sulfonamidas está muy extendida, tanto para gérmenes comunitarios como nosocomiales. Los microorganismos desarrollan resistencia por mecanismos que pueden ser de naturaleza cromosómica o extracromosómica.

- *Cromosómica*: A través de mutaciones que producen un cambio en las enzimas de lo que resulta una disminución de afinidad por las sulfonamidas, o aumentando la producción de PABA lo que neutraliza la competencia de éstas.

- *Extracromosómica*: La producción de una enzima dihidripteroato sintetasa alterada, que es 1.000 veces menos sensible a la droga, es el principal mecanismo de resistencia a sulfonamidas.

2.4 Estructura química y propiedades físico-químicas de las sulfonamidas y del TMP

Las sulfonamidas (o sulfamidas) son N-derivados de la 4-amino-bencenosulfonamida, cuya estructura es similar al ácido p-aminobenzoico (PABA), requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. El

Introducción bloque II

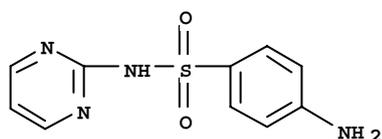
grupo amino libre en posición 4 es de gran importancia, pues se relaciona con su actividad. Las sustituciones a nivel del radical sulfonilo modifican las características farmacocinéticas, pero no la actividad antibacteriana. Las sustituciones en el grupo amino en posición 4 dan compuestos de menor absorción intestinal.

El TMP se obtiene a partir del núcleo de la diaminobencilpirimidina. Es un derivado trimetilado, pues incorpora grupos metoxi en las posiciones 3, 4 y 5 del radical bencilo de dicho núcleo.

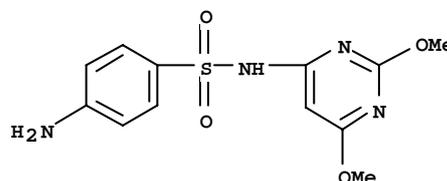
En la Figura 25 se muestran las estructuras químicas de las sulfonamidas empleadas en el desarrollo de esta Memoria y del TMP.

Figura 25. Estructura de las sulfonamidas y del TMP, legislados por la UE en el Reglamento 2377/90/CEE y analizados en esta Memoria.

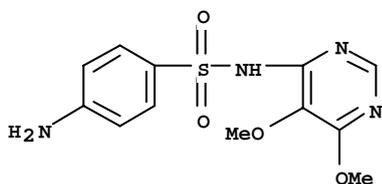
Sulfadiazina (SDZ)



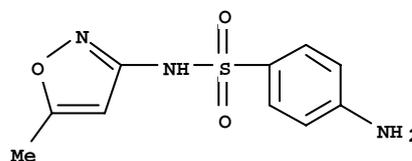
Sulfadimetoxina (SDM)



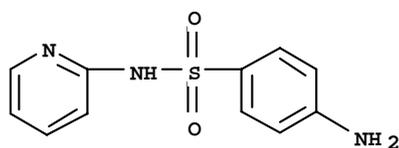
Sulfadoxin (SDX)



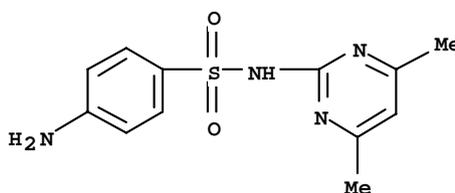
Sulfametoxazol (SMX)



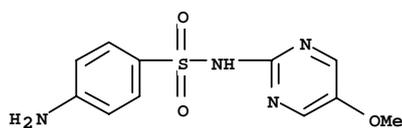
Sulfapiridina (SPD)



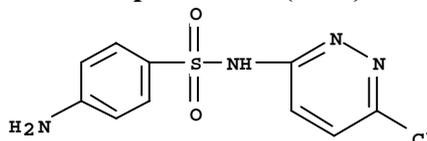
Sulfametazina (SMZ)



Sulfameter (SMT)

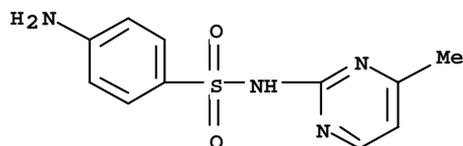


Sulfaclopiridazina (SCP)

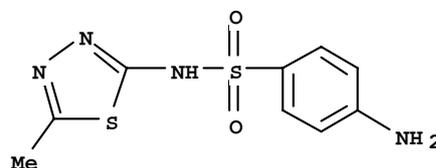


• Na

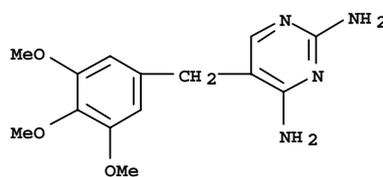
Sulfamerazina (SMR)



Sulfametizol (SMI)



Trimetoprim (TMP)



Introducción bloque II

La mayoría de las sulfonamidas se presentan bajo la forma de polvos blancos o amarillentos, cristalinos, de sabor amargo, poco solubles en agua y algo más en alcohol etílico, acetona y N,N'-dimetilformamida e insolubles en cloroformo y éter sulfúrico; las de empleo parenteral se utilizan bajo la forma de sales sódicas que son algo más hidrosolubles. Son sustancias de naturaleza anfótera, pues mientras el grupo amino les confiere carácter básico, el grupo sulfonamido (SO_2NH_2) les otorga características ácidas. Son estables en disolución, pudiendo ser hervidas sin que se produzcan pérdidas significativas de actividad [283].

El TMP es un polvo blanco o ligeramente amarillento, inodoro y amargo, de naturaleza cristalina y con caracteres ligeramente básicos, poco soluble en agua ($44 \mu\text{g ml}^{-1}$) aunque el lactato es mil veces más hidrosoluble (50 mg ml^{-1}); es soluble en acetona y N,N'-dimetilformamida.

En la Tabla 25 se muestran algunas de las propiedades de estos compuestos.

Tabla 25. Propiedades de las sulfonamidas y el TMP.

Compuesto	Siglas	Pm	log P	pKa ₁	pKa ₂
Trimetoprim	TMP	290.32	0.791±0.12	-----	7.34±0.12
Sulfapiridina	SPD	249.29	0.034±0.318	2.90±0.19	8.54±0.30
Sulfadoxin	SDX	310.33	0.342±0.433	3.15±0.49	6.16±0.50
Sulfametazina	SMZ	278.33	0.803±0.259	2.79±0.24	7.45±0.50
Sulfadimetoxina	SDM	310.33	1.455±0.441	2.44±0.48	6.21±0.50
Sulfameter	SMT	280.33	0.422±0.279	1.48±0.10	6.69±0.30
Sulfamerazina	SMR	264.33	0.343±0.257	1.58±0.10	6.98±0.30
Sulfaclopiridazina	SCP	287.73	----	----	----
Sulfadiazina	SDZ	250.28	-0.117±0.255	1.57±0.10	6.50±0.30
Sulfametoxazol	SMX	253.28	0.887±0.419	1.39±0.10	5.81±0.50
Sulfametizol	SMI	270.33	0.369±0.259	1.19±0.10	5.51±0.50

[283] D. Dámaso, "Antibacterianos", Marketing Pharm, S.A., Madrid, 1990, cap. 23.

2.5 Características farmacocinéticas

Sus características farmacocinéticas permiten clasificarlas en:

- a) Absorbibles de acción corta o intermedia: sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, sulfametizol.
- b) Absorbibles de acción prolongada. De larga vida media. Su uso fue limitado por el potencial riesgo de producir reacciones de hipersensibilidad. Como ejemplo se menciona la sulfametoxipiridazina
- c) No absorbibles. Tienen acción tópica a nivel de la luz intestinal o cutánea. Entre ellas se encuentran: sulfadiazina argéntica, ftalilsulfatiazol y sulfasalazina.

Introducción bloque II

3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS

A partir de la década de los 80, diversas agencias medio ambientales y de calidad de los alimentos comienzan a abordar la determinación de residuos de antibióticos en productos alimenticios. El análisis de estos residuos suele presentar dos tipos de problemas: el primero deriva de la complejidad y diversidad de las matrices en las que suelen determinarse, y el segundo problema surge como consecuencia de la baja concentración en la que generalmente se encuentran estos productos. Esta problemática obliga a utilizar métodos de análisis que presenten al menos las siguientes características: una adecuada selectividad que permita efectuar el análisis sin que interfieran los numerosos contaminantes presentes en la matriz y una alta sensibilidad para poder determinar cantidades de analito a nivel de trazas. La selectividad se puede conseguir mediante etapas previas de extracción y separación de los analitos, mientras que la sensibilidad se suele conseguir mediante una etapa previa de preconcentración.

Las técnicas analíticas que nos permiten desarrollar métodos con estas características y que, por tanto, son las más utilizadas en la actualidad son las técnicas cromatográficas, fundamentalmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV, fluorescencia, electroquímica, y espectrometría de masas [284,285,286,287,288,289,290].

[284] Y. Ikai, H. Oka, N. Kawamura, J. Hayakawa, M. Yamada, K. Harada, M. Suzuki, H. Nakazawa, J. Chromatogr. 541 (1991) 393.

[285] J.F. Jen, H.L. Lee, B.N. Lee, J. Chromatogr. A 793 (1998) 378.

[286] C. Hartig, T. Storm, M. Jekel, J. Chromatogr. A 854 (1999) 163.

[287] M.S. Fuh, S.A. Chan, Talanta 55 (2001) 1127.

[288] Y. Ito, H. Oka, Y. Ikai, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, H. Nagase, J. Chromatogr. A 898 (2000) 95.

[289] D.N. Heller, M.A. Ngoh, D. Donoghue, L. Podhorinak, H. Righter, M.H. Thomas, J. Chromatogr. B 774 (2002) 39.

Los métodos analíticos aplicados a la determinación de sulfonamidas en alimentos de origen animal han sido objeto de diversos artículos de revisión [291,292]. Recientemente se ha publicado un artículo de revisión donde se recogen los principales métodos para el análisis de sulfonamidas en tejidos animales [293].

En general se trata de métodos de gran potencialidad, útiles para analizar un elevado número de compuestos en matrices muy diferentes y que presentan gran fiabilidad en los resultados obtenidos ya que permiten la detección, cuantificación y, en el caso de la espectrometría de masas, la confirmación de los mismos. Estos métodos requieren normalmente la extracción previa de las sulfonamidas con disolventes orgánicos o su purificación mediante SPE y posterior análisis mediante HPLC o menos frecuentemente, GC [294,295,296] o CE.

3.1 Determinación de sulfonamidas mediante HPLC

En cuanto a HPLC, la detección UV es la más empleada, y se ha aplicado al análisis de sulfonamidas en leche [297,298,299,300], huevos y carne [301,302] y muestras ambientales [303] aunque presenta el problema

[290] C. Cavaliere, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agr. Food Chem.* 51 (2003) 558.

[291] V.K. Agarwal, *J. Chromatog. A* 624 (1992) 411.

[292] D. Guggisberg, A.E. Mooser, H. Koch, *J. Chromatogr.* 624 (1992) 425.

[293] S. Wang, H.Y. Zhang, L. Wang, Z.J. Duan, I. Kennedy, *Food Add. Contaminants* 23 (2006) 362.

[294] K. Takatsuki, T. Kikuchi, *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 886.

[295] G. Carignan, K. Carrier, *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 479.

[296] J.A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 127.

[297] N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 185.

[298] I. Pecorelli, R. Bibi, L. Fiorni, R. Galarini, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 23.

[299] F. de Zayas-Blancos, M.S. García-Falcón, J. Simal-Gándara, *Food Control* 15 (2004) 375.

[300] AOAC Official Method 993.32. Multiple sulfonamide residues in raw bovine milk. Official Methods of Analysis of AOAC Int., 17th Edition, Current Through Revision #1, 2002 (versión CD).

[301] G.Z. Fang, J.X. He, S. Wang, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 12.

[302] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49.

Introducción bloque II

de la falta de selectividad, siendo necesaria la aplicación de procedimientos de limpieza muy eficaces [288]. La extracción en fase sólida (SPE) y la extracción líquido-líquido (LLE) son los métodos más frecuentemente empleados para la extracción de sulfonamidas de muestras de agua [304,305], muestras biológicas [306,307], aguas subterráneas [308] y aguas residuales [274]. Otros métodos de extracción, como la extracción con disolventes a alta presión (*pressurized liquid extraction*, PLE) también se han propuesto para la extracción de sulfonamidas de suelos [309].

Más recientemente, y debido a su poder de caracterización intrínseco, la espectrometría de masas se ha empleado acoplada a HPLC para el establecimiento de métodos de análisis de compuestos farmacéuticos en muestras ambientales incluyendo sulfonamidas, con detección por MS [310,311,312,290,313,314,] o MS/MS [286,289,315] como sistema de detección y confirmación.

Centrándonos en las aplicaciones publicadas sobre la determinación de sulfonamidas en alimentos mediante HPLC con detección luminiscente,

- [303] N.T. Malintan, M. Ali Mohd, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 154.
- [304] M. Rodríguez, D.B. Orescan, Anal. Chem. 70 (1998) 2710.
- [305] V.K. Balakrishnan, K.A. Terry, J. Toito, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 1.
- [306] W.J. Blanchflower, R.J. McCracken, A.S. Hagen, D.G. Kennedy, J. Chromatogr. B 692 (1997) 351.
- [307] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A.J. Hewitt, J. Chromatogr. A 812 (1998) 77.
- [308] M.E. Lindsay, M. Meyer, E.M. Thurman, Anal. Chem. 73 (2001) 4640.
- [309] K. Stoob, H.P. Singer, S. Stettler, N. Hartmann, S.R. Mueller, C.H. Stamm, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 1.
- [310] M.Y. Haller, S.R. Muller, C. S. Mc Ardell, A.C. Alder, M.J.F. Suter, J. Chromatog. A 952 (2002) 111.
- [311] D.H. Kim, D.W. Lee, J. Chromatogr. A 984 (2003) 153
- [312] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M.L. Polci, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 4225.
- [313] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M. Sergi, Rapid Commun. Mass Spectrom. 17 (2003) 1146.
- [314] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, Anal. Chem. 75 (2003) 1798.
- [315] L. Verze gnassi, M.C. Savoy-Perroud, R.H. Stadler, J. Chromatogr. A 977 (2002) 77.

podemos destacar la determinación de doce [316] y ocho [317] sulfonamidas en miel, derivatizando los analitos con fluorescamina (4-fenilspiro[furan-2(3H), 1'-ftalan]-3,3'-diona, FR) para su detección fluorescente, obteniéndose unos límites de cuantificación entre 2 y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (con un factor de preconcentración de 30), y 5-10 g kg^{-1} , respectivamente, con recuperaciones entre el 37 y 67% [316] y el 73.5-94.1% [317]. La FR también ha sido empleada como agente derivatizante para la determinación mediante HPLC-fluorescencia de 10 sulfonamidas en alimentos de origen animal, con unos límites de cuantificación de pocos $\mu\text{g kg}^{-1}$ (con un factor de preconcentración de 10), un tiempo de análisis de 30 minutos y recuperaciones del 64 al 75% [318]; de 8 sulfonamidas en diversas muestras de carne y tejidos animales, con recuperaciones entre el 96-99% y límites de detección de 0.01 mg g^{-1} [319], y de 14 sulfonamidas en salmón con recuperaciones entre el 79.7-88.2 %, y límites de cuantificación de 5 ng g^{-1} y 1 ng g^{-1} , dependiendo de la sulfonamida [320].

No obstante, y a pesar de las ventajas de la detección quimioluminiscente, comentadas ampliamente en la Introducción de esta Memoria, los métodos de análisis publicados para la determinación de sulfonamidas empleando este tipo de detección son escasos. Así, se ha propuesto el uso de esta detección para la oxidación de sulfacetamida y sulfafurazol con permanganato potásico en medio ácido y su cuantificación en preparados farmacéuticos mediante análisis por inyección secuencial (SIA), proporcionando unos límites de detección entre 2-8 mg kg^{-1} [321]. Otro ejemplo es la determinación de sulfametoxazol en preparados farmacéuticos mediante reacción fotoquímica seguida de una oxidación con

[316] K.E. Maudens, G.F. Zhang, W.E. Lambert, J. Chromatog. A 1047 (2004) 85.

[317] G.F. Pang, Y.Z. Cao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, Z.Y. Li, G.Q. Jia, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 534.

[318] G. Stoev, A. Michailova, J. Chromatogr. A 871 (2000) 37.

[319] C.D. Salisbury, J.C. Sweet, R. Munro, J. AOAC Int. 87 (2004) 1264.

[320] T.A. Gehring, L.G. Rushing, H.C. Thompson, Jr., J. AOAC Int. 80 (1997) 751.

[321] H. Paseková, M. Poláček, J. Filipe Cigarro, J. Dolejšová, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 165.

Introducción bloque II

permanganato similar a la del método anterior, con límites de detección de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ [322]. Asimismo, basándose en el efecto del formaldehído sobre la CL producida en la oxidación de las sulfonamidas con Mn (IV), se ha propuesto un método para la determinación de sulfametoxazol, sulfadiazina y sulfaguanidina con FIA, que se ha aplicado al análisis de estos compuestos en productos farmacéuticos [323]. Recientemente se ha publicado un test de *screening* para el desarrollo de sistemas CL para la determinación de compuestos farmacéuticos basados en la fotodescomposición en línea de 97 compuestos presentes en fármacos entre los que se incluyen las sulfonamidas [324].

Entre las diversas reacciones CL, la reacción de los POs presenta diversas ventajas (comentadas en la Introducción de esta Memoria), entre las que cabe destacar en su acoplamiento con HPLC el amplio rango de pH al que se puede llevar a cabo la reacción. Los ésteres de oxalato más comúnmente empleados en este tipo de acoplamientos han sido el bis-(2,4,6-triclorofenil)oxalato (TCPO) seguido del bis-(2,4-dinitrofenil)oxalato (DNPO). Sin embargo, a pesar de las ventajas inherentes a la detección CL, su acoplamiento como detección post-columna con HPLC presenta como inconveniente principal la duración relativamente prolongada de la reacción luminiscente, donde los perfiles de emisión tienen una duración media de unos 60 s, lo que puede producir ensanchamientos de los picos. Este problema se ha subsanado con facilidad mediante el uso de catalizadores, fundamentalmente del imidazol, que aceleran la reacción, a la vez que mantienen una alta eficiencia cuántica, evitando el ensanchamiento de banda de los analitos separados cromatográficamente y haciendo que el volumen efectivo de la celda sea más dependiente de la velocidad de mezcla del eluato con los reactivos CL que del volumen total de la celda de detección.

[322] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 57.

[323] Y.H. He, X.H. Zhu, J.R. Lu, Fenxi Shiyanshi 25 (2006) 69.

[324] B. Gómez-Taylor, M. Palomeque, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 347.

El imidazol ha demostrado ser el catalizador más eficiente en la catálisis de la reacción PO-CL [325,326] debido a su habilidad para desestabilizar el PO mediante formación de un intermediario menos estable, pero más susceptible a un ataque nucleofílico por parte del peróxido de hidrógeno. Hadd y Birks han propuesto un mecanismo general para describir la reacción nucleofílica del imidazol con los POs [327]. En cuanto a las configuraciones empleadas en los sistemas HPLC-PO-CL, generalmente las dos disoluciones de reactivos (la que contiene al PO y la que transporta el peróxido de hidrógeno) se mezclan en línea y la disolución resultante se une posteriormente al eluato de la columna cromatográfica.

En cuanto al acoplamiento HPLC-CL para la determinación de sulfonamidas, únicamente se ha publicado un trabajo relativo a la determinación de sulfametazina, previamente derivatizada con FR, en suero de pollo y huevo, empleando la reacción de POs y consiguiendo un límite de detección de 1 ng ml^{-1} y recuperaciones de 95.8% [328].

3.2 Determinación de sulfonamidas mediante CE

La Electroforesis Capilar (CE) es, actualmente, una técnica de separación muy poderosa y extendida, principalmente debido a sus numerosas ventajas, incluyendo la alta resolución y eficacia, la rapidez de los análisis y el bajo consumo tanto de muestra como de disolventes, en comparación con HPLC, aunque su uso no está generalizado como técnica en laboratorios de rutina. Esta técnica ha demostrado su utilidad en la determinación de antibióticos, fundamentalmente en fármacos y muestras biológicas y en menor grado en la detección de tales residuos en alimentos [329,330,331].

[325] M. Emteborg, E. Pontén, K. Irgum, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2109.

[326] T. Jonsson, M. Emteborg, K. Irgum, *Anal. Chim. Acta* 361 (1998) 205.

[327] A.G. Hadd, J.W. Birks, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 2657.

[328] C.E. Tsai, F. Kondo, Y. Ueyama, J. Azama, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 365.

[329] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 20 (1999) 3269.

[330] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 22 (2001) 4249.

Introducción bloque II

Cross y *col.* fueron los primeros en llevar a cabo estudios sistemáticos sobre la separación de sulfonamidas, estudiando las limitaciones del pH y los pKas en el análisis de sulfonamidas mediante electroforesis capilar en zona (CZE) [332], o estudiando el efecto de las sales en la separación de sulfonamidas y en su influencia en la resolución, factores de selectividad y tiempos de migración [333,334]. Igualmente Lin y *col.* realizaron estudios sistemáticos sobre la separación de sulfonamidas y de su orden de migración, el cual dependía de la relación carga/masa y de los pKas, determinados usando CE. Así observaron el comportamiento de las sulfonamidas en cuanto a su migración electroforética y establecieron las características de la separación mediante CZE, usando tampón fosfato-borato a pH 6.9, observando que la adición al tampón de un modificador orgánico o de una concentración baja de β -ciclodextrina conseguía una separación eficaz de trece sulfonamidas en 5.5 min [335]. Igualmente comprobaron que con el uso de tampón citrato como electrolito de fondo se conseguía la separación de las trece sulfonamidas como especies cargadas negativamente en 2.1 min a pH 6.9 [336], y usando el mismo tampón pero a pH bajo (2.1), se conseguía la separación de dieciséis sulfonamidas como especies cargadas positivamente [337]. Los mismos autores usaron cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) para separar trece sulfonamidas en tampón borato-fosfato en presencia de SDS como surfactante aniónico [338], determinando los valores de pKas de las sulfonamidas en estudio.

[331] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 416.

[332] R.F. Cross, M.C. Ricci, LC-CG 13 (1995) 132.

[333] R.F. Cross, J. Cao, J. Chromatogr. A 818 (1998) 217.

[334] R.F. Cross, J. Cao, J. Chromatogr. A 849 (1999) 575.

[335] C.E. Lin, W.C. Lin, W.C. Chiou, E.C. Lin, C.C. Chang, J. Chromatogr. A 755 (1996) 261.

[336] C. Lin, C. Chang, W. Lin, J. Chromatogr. A 768 (1997) 105.

[337] C. Lin, C. Chang, W. Lin, J. Chromatogr. A 759 (1997) 203.

[338] C. Lin, W. Lin, Y. Chen, S. Wang, J. Chromatogr. A 792 (1997) 37.

No obstante, la CE no es una técnica muy común para la determinación de sulfonamidas en matrices reales. Así usando CZE y detección a 210 nm, Ng y *col.* publican los primeros trabajos sobre la separación sistemática de sulfonamidas mediante CE [339] y la determinación de siete sulfonamidas (sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfamerazina, sulfasalazina, sulfadiazina, sulfaquinoxalina y sulfaclopiridazina) mediante CZE en presencia de β -ciclodextrina, en tampón fosfato-borato a pH 7, obteniéndose rangos lineales entre 100-1000 mg l⁻¹ y aplicándose el método a la determinación de estos compuestos en preparados farmacéuticos [340]. Posteriormente se establece un método para la determinación conjunta de siete sulfonamidas junto con inhibidores de la dihidrofolato reductasa, proponiendo el empleo de los diseños experimentales para la optimización de variables influyentes, aunque sin llevar a cabo ninguna aplicación a muestras reales [341]. También usando CZE se ha determinado sulfametoxazol y sulfadiazina junto con otros compuestos asociados, en preparados farmacéuticos [342], consiguiendo la separación en tampón fosfato de pH 6.2 en 6 min, con límites de cuantificación del orden de 1 mg l⁻¹. Estos compuestos junto con TMP se han separado y determinado en fármacos usando un sistema microfluídico de CE que incorpora una interfase para la introducción continua de muestra [343], presentando límites de detección de 0.17, 1.05 y 1.28 mg l⁻¹ para TMP, sulfadiazina y sulfametoxazol, respectivamente. Sulfametoxazol y TMP se han determinado en plasma humano en tampón fosfato a pH 6.5 en 8 min, alcanzándose límites de cuantificación de 10 y 2 mg l⁻¹,

[339] C.L. Ng, H.K. Lee, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. 598 (1992) 133.

[340] C.L. Ng, H.K. Lee, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. 632 (1993) 165.

[341] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, J. Chromatogr. A 768 (1997) 97.

[342] J.J. Berzas Nevado, G. Castañeda Peñalvo, F.J. Guzmán Bernardo, J. Chromatogr. A 918 (2001) 205.

[343] L.Y. Fan, H.L. Chen, X.G. Chen, Z. De Hu, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1376.

Introducción bloque II

respectivamente, siendo necesaria la extracción del plasma con acetato de etilo y consiguiéndose recuperaciones superiores al 99 % [344].

El modo MEKC ha sido menos aplicado, empleándose en la separación de siete sulfonamidas (sulfanilamida, sulfaguanidina, sulfafenazol, sulfadimetoxina, sulfatiazol, sulfadiazina y sulfametoxazol) y TMP en fármacos de uso humano, empleando SDS y bromuro de tetrabutilamonio como aditivo [345]. Igualmente MEKC se ha aplicado a la determinación de cinco sulfonamidas (sulfanilamida, sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfaguanidina y sulfadiazina) mediante detección fluorescente, previa derivatización de éstas con fluorescamina [346]. La separación de los cinco compuestos se llevó a cabo en 7 min, usando tampón fosfato pH 7.5 en presencia de SDS, consiguiendo límites de detección comprendidos entre 1.59-7.68 nM y recuperaciones entre 85-114%.

La detección electroquímica a final del capilar (“*end-column*”) se ha aplicado a la determinación de sulfadiazina y sulfametoxazol en fármacos y muestras de orina [347], proporcionando límites de detección de 0.024 y 0.021 fmol para sulfadiazina y sulfametoxazol (inferiores a 0.1 μM). Asimismo, la detección amperométrica se ha empleado con CZE para la determinación de sulfadiazina, sulfametazina y TMP en fármacos [348], obteniéndose límites de detección de $1.0 \cdot 10^{-3}$, $1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.0 \cdot 10^{-4}$ nM para las tres sulfonamidas anteriores, respectivamente.

La primera utilización de la CE en el análisis de sulfonamidas en alimentos de origen animal, concretamente en carne, fue publicada por Ackermans y *col.* [349] que estudiaron los correspondientes tiempos de

[344] D. Teshima, K. Otsubo, K. Makino, Y. Itoh, R. Oishi, Biomed. Chromatogr. 18 (2004) 51.

[345] Q. Dang, Z. Sun, D. Ling, J. Chromatogr. 603 (1992) 259.

[346] S. Lamba, S.K. Sanghi, A. Asthana, M. Shelke, Anal. Chim. Acta 552 (2005) 110.

[347] T. You, X. Yang, E. Wang, Analyst 123 (1998) 2357.

[348] A. Wang, F. Gong, H. Li, Y. Fang, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 265.

[349] M.T. Ackermans, M.T. Beckers, F.M. Everaersts, H. Hoogland, M.J.H. Tomasen, J. Chromatogr. A 596 (1992) 101.

migración y la influencia del extracto de la carne en función de la naturaleza del medio electroforético. Se aplicó un sencillo pretratamiento de la muestra que consistió en la extracción con acetonitrilo y posterior centrifugación, obteniendo límites de detección entre 2 y 9 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para las cinco sulfonamidas determinadas (sulfadimidina, sulfamerazina, sulfadoxin, sulfatroxazol y sulfametoxazol), llevándose a cabo la separación a pH 7 con tampón fosfato-borato. Debido a la naturaleza tan compleja que presenta la carne, los tratamientos previos de estas muestras son prácticamente imprescindibles para eliminar las proteínas, la grasa y las potenciales interferencias. Además, un problema importante que se presenta al emplear la CE acoplada a un sistema de detección como el UV/Vis es la falta de sensibilidad, lo que supone una importante desventaja para su aplicación en el control de residuos de fármacos en alimentos, teniendo en cuenta los bajos LMRs establecidos por la EU en este tipo de matrices. Así, la extracción con disolventes y la SPE se han empleado para la limpieza de las muestras y la preconcentración de los analitos en éstas antes de la determinación cuantitativa de ocho sulfonamidas en carne (sulfametazina, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfamonodimetoxina, sulfafenazol, sulfaquinoxalina y sulfisoxazol), empleando CE, transcurriendo la separación a pH 6.5 en tampón fosfato en 17 min y obteniéndose límites de detección en el rango entre 5-10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [350].

La Decisión 2002/657/EC [351] en el marco de la Directiva 96/23/EC relativa a la validación de los métodos analíticos de control de tales residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados no establecen obligación de usar métodos normalizados en el control de tales residuos en los alimentos. Sin embargo, se establecen distintos criterios de funcionamiento y requisitos que deben cumplir los métodos analíticos a aplicar. En el caso de requerir confirmación inequívoca

[350] M.R.S. Fuh, S.Y. Chu, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 215.

[351] Commission Decision 2002/657/EEC, Off. J. Eur. Comm.L 221 (2002) 23.

Introducción bloque II

de los residuos encontrados se indica que la detección por Espectrometría de Masas (MS) es el método de detección más adecuado tras una separación cromatográfica, empleándose un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos, basado en el uso de la MS mediante análisis de los fragmentos (modo SIM: control de iones específicos). La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A (anabolizantes y sustancias no autorizadas) de la Directiva 96/23/EC requiere un mínimo de 4 puntos de identificación y las clasificadas en el grupo B (medicamentos de uso veterinario con LMR establecido, dentro de los cuales se incluyen las sulfonamidas) un mínimo de 3 puntos.

El acoplamiento de la CE con MS para la determinación de sulfonamidas ha adquirido gran importancia durante los últimos años. Como precedentes del acoplamiento CE-MS, podemos destacar una primera aplicación para la determinación de estos analitos en alimentos [352] donde se propone también la caracterización de sulfonamidas isómeras empleando la CE acoplada con el tándem MS/MS para identificar residuos en extractos de leche. Recientemente, se ha propuesto una nueva metodología para el análisis semicuantitativo (“*screening*”) y la confirmación analítica de residuos de siete sulfonamidas en leche empleando CE-MS [353]. En ninguno de estos trabajos se lleva a cabo junto con la identificación de los analitos, la cuantificación en el modo MS/MS.

En esta segunda parte de la Memoria se proponen métodos alternativos para la determinación de sulfonamidas en muestras de alimentos (leche, carne de cerdo y carne de ternera) y medio ambientales (aguas subterráneas). Estos métodos se basan en acoplamientos escasamente empleados hasta el momento para este fin, como son HPLC-CL, CE-UV empleando técnicas de preconcentración online, CE-MS y CE-MS/MS.

A continuación se desarrollan cada una de estas aplicaciones.

[352] S. Pleasance, P. Thibault, J. Kelly, J. Chromatogr. 591 (1992) 325.

[353] B. Santos, A. Lista, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, Electrophoresis 26 (2005) 1567.

DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS

MEDIANTE EL PLCC EN LECHE

1 INTRODUCCIÓN

Con objeto de demostrar la gran capacidad que posee la detección CL (en concreto, la reacción de los POs) unida a una técnica separativa como es HPLC, se ha desarrollado un método para la cuantificación de siete sulfonamidas cuyos LMRs están legislados por la UE en leche cruda de vaca: sulfapiridina (SPD), sulfadiazina (SDZ), sulfametazina (SMZ), sulfacloropiridazina (SCP), sulfadoxin (SDX), sulfametoxazol (SMX) y sulfadimetoxina (SDM). Para el desarrollo de este método se siguieron los siguientes pasos, que se describirán en detalle a lo largo del capítulo:

* OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA

- Estudios previos del sistema HPLC-PO-CL
- Optimización de la fase móvil
- Optimización de la reacción PO-CL post-columna
 - Optimización de la reacción de marcado
 - Optimización del bucle de inyección

* RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

* OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN

* APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN LECHE CRUDA DE VACA

2 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA

En primer lugar, y con objeto de conseguir una alta sensibilidad a la vez que un método suficientemente preciso, se procedió a la optimización de todas las variables influyentes del sistema HPLC-CL. Las etapas seguidas para llevar a cabo este proceso fueron:

1. Estudios previos del sistema HPLC-PO-CL
2. Optimización de la fase móvil
3. Optimización de la reacción de formación de los correspondientes derivados fluorescentes a partir de las sulfonamidas estudiadas con OPA
4. Optimización de la reacción PO-CL post-columna

2.1 Estudios previos del sistema HPLC-PO-CL

El principal problema del acoplamiento propuesto fue compatibilizar las condiciones de la separación cromatográfica en fase inversa usando una columna C18 (disolventes, pH, caudal...) con la detección CL post-columna, teniendo en cuenta la inestabilidad de los POs en medio acuoso. Para facilitar esta etapa, en todo momento se trabajó con un detector UV/Vis ($\lambda=265$ nm) en línea con el detector CL, con objeto de monitorizar la separación cromatográfica de forma independiente a la detección CL. El primer inconveniente encontrado fue la composición de la fase móvil, ya que las comúnmente empleadas para la separación de estos compuestos contienen un alto porcentaje de disoluciones acuosas, lo que supone un problema debido a la baja solubilidad de los POs en medio acuoso, provocando su precipitación y, como consecuencia, atascos en el sistema cromatográfico.

Por todo lo anterior, los primeros experimentos se encaminaron a conseguir una señal CL de partida que permitiese la posterior optimización del sistema. Para ello se utilizó la configuración mostrada en la Figura 26 . Las condiciones iniciales fueron las siguientes:

Fase móvil: acético/acetato, pH 3/ACN (70/30), trabajando en modo isocrático. El tampón se preparó a partir de ácido acético al 10% añadiendo NaOH 1M para ajustar el pH.

Disolución de TCPO: 1mM en ACN

Disolución mezcla de Imidazol: 10 mM y peróxido de hidrógeno 500 mM, ambos en ACN

Caudal de TCPO: 0.3 ml min⁻¹

Caudal de la disolución imidazol-peróxido de hidrógeno: 0.3 ml min⁻¹

Reacción previa de marcado: 1 ml de FR (1200 mg l⁻¹) en ACN + 1 ml de la disolución mezcla de sulfonamidas (10 mg l⁻¹) en tampón fosfato pH 7 (5 min a temperatura ambiente en baño de ultrasonidos).

Con estas primeras pruebas se consiguió separar gran parte de las sulfonamidas en estudio, pero no se obtuvo señal CL alguna, además de producirse atascos en el sistema debido a la precipitación del TCPO. Por ello, y con objeto de conseguir una señal CL de partida, se procedió al estudio del pH de la fase móvil en el rango de pH en el que se produce la reacción de los POs (pH: 3, 5, 7), manteniendo el resto de condiciones de medida como se mencionó anteriormente. Así, se consiguió obtener una primera señal CL a pH 5.

A continuación, y antes de proceder a una optimización más rigurosa de la composición de la fase móvil, se ensayaron dos posibles configuraciones para el acoplamiento post-columna HPLC-PO-CL, tanto la ya mostrada en la Figura 26 como una nueva disposición, que se muestra en la Figura 27.

Figura 26. Acoplamiento de la reacción CL post-columna con el sistema HPLC. Mezcla conjunta.

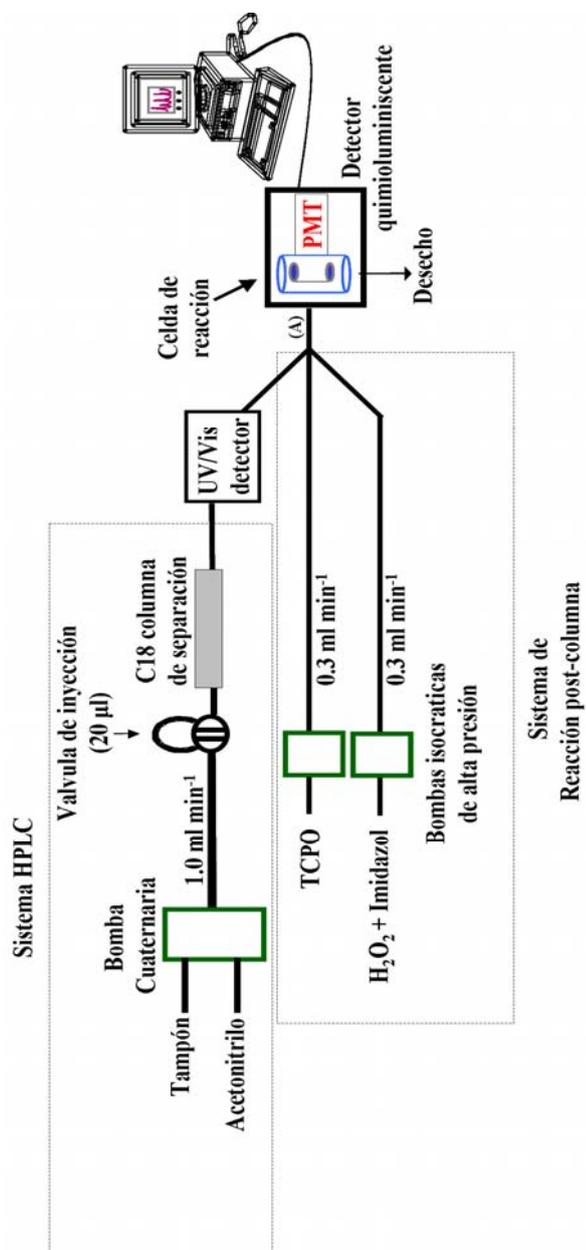
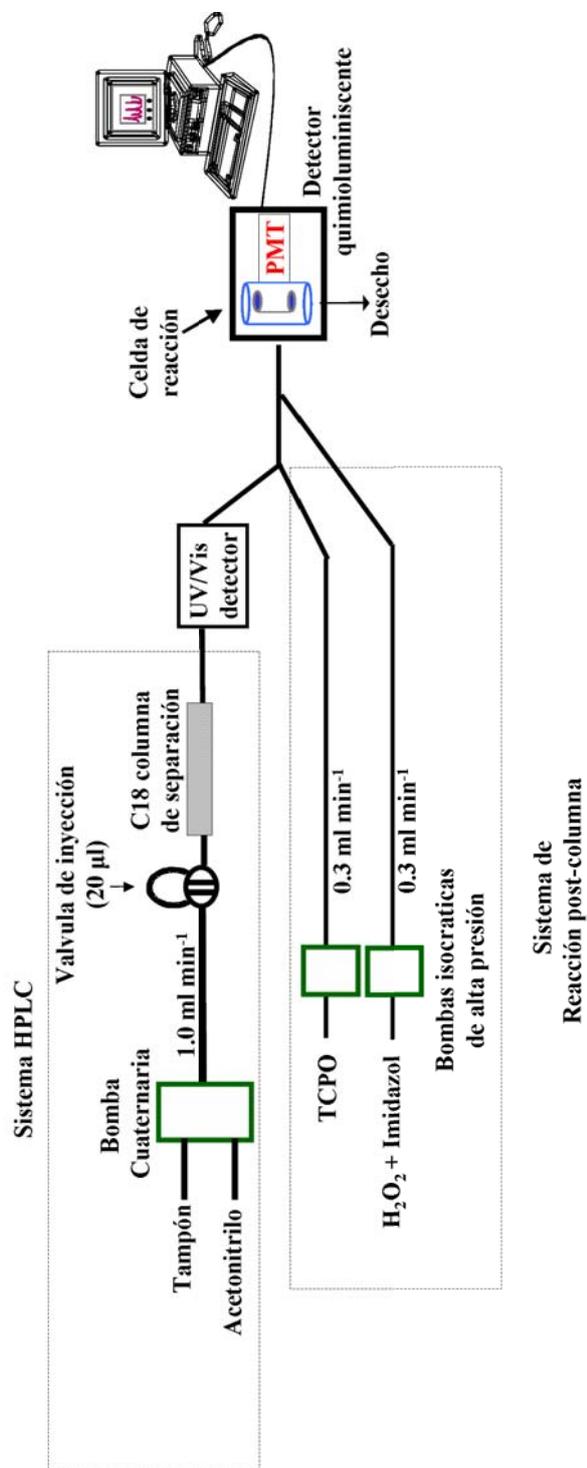


Figura 27. Acoplamiento de la reacción CL post-columna con el sistema HPLC. Mezcla secuencial de reactivos.



Capítulo 3

En la Figura 26 los dos canales de los reactivos (PO e imidazol-peróxido) se mezclan con el eluato procedente de la columna de separación en una confluencia de cuatro vías muy próxima a la celda de detección. La distancia “A” de la confluencia a la entrada a la celda de detección se modificó a su vez, probándose dos valores: 4.5 y 9.0 cm. En la Figura 27, el canal del PO se mezcla en primer lugar con el eluato de la columna de separación y el caudal resultante se mezcla posteriormente con el canal del imidazol-peróxido. Los mejores resultados se obtuvieron para la primera configuración descrita, con una distancia “A” de 4.5 cm, lo que demuestra que la reacción de los POs ocurre de forma casi instantánea al mezclarse los reactivos. Por lo tanto, se escogió esta configuración para posteriores estudios.

Asimismo, y como etapa previa a la optimización de la fase móvil, se procedió a disolver el TCPO en una mezcla ACN:THF (75:25) en lugar de en ACN puro, consiguiéndose de este modo aumentar su solubilidad, incrementando su concentración de 1 mM a 2.5 mM, y mejorando la señal CL con este aumento de la concentración, así como la estabilidad del PO frente a la fase móvil [354].

2.2 Optimización de la fase móvil

Una vez conseguidas las condiciones de partida, se procedió a la optimización de la fase móvil empleada. En todo momento se trabajó en modo de cromatografía en fase inversa en modo isocrático, con una columna Luna C18 (150 cm × 4.6 mm, 5 µm), y considerando los resultados en base a la resolución de los picos y la intensidad de la señal CL como altura de pico. Así, con objeto de separar las siete sulfonamidas seleccionadas en el menor tiempo posible, se probaron distintas fases móviles consistentes en mezclas binarias o ternarias de los siguientes

[354] S. Meseguer-Lloret, P. Camping-Falcó, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *Talanta* 64 (2004) 1030.

disolventes orgánicos y tampón: ACN, MeOH, THF y disolución tampón de ácido acético 10% ajustado con NaOH 1 M a pH 5, todas ellas empleando un caudal de 0.8 ml min⁻¹. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 26, en el que además de la composición de la fase móvil ensayada, se especifica si se consiguió la separación de las siete sulfonamidas y si se observaron problemas de precipitación del TCPO.

Tabla 26. Optimización de la composición de la fase móvil.

Tampón %	ACN %	THF %	MeOH %	Separación	Precipita
70	30	0	0	no	sí
50	50	0	0	no	no
45	55	0	0	no	no
40	60	0	0	no	no
60	0	0	40	no	sí
30	50	0	20	no	no
30	40	0	30	no	no
70	20	10	0	no	sí
67	23	10	0	no	sí
66	23	11	0	no	no
66	22	12	0	no	no
65	30	5	0	no	sí
65	25	10	0	no	sí
65	22	13	0	sí	no
65	20	15	0	sí	sí
63	27	10	0	sí	sí
63	17	20	0	no	sí
60	30	10	0	no	no
60	20	20	0	no	no

Capítulo 3

Los mejores resultados se obtuvieron con una fase móvil compuesta por tampón ácido acético al 10%, ajustando el valor del pH a 5 con NaOH 1 M:ACN:THF (65:22:13). Además de actuar como modificador de la fase móvil, consiguiendo una mejor resolución de los picos, el uso del THF en la fase móvil, proporcionó como ventaja adicional el que éste actúa como estabilizador del TCPO, evitando su precipitación al ponerse en contacto con la disolución acuosa.

En los estudios previos se puso de manifiesto que el pH de trabajo más eficiente era 5. Por ello, con objeto de mejorar la sensibilidad del método, y como paso siguiente en la optimización de la fase móvil, se probaron distintas naturalezas de tampón a este pH para ver con cual se obtenía mejor señal CL, sin detrimento de la separación cromatográfica. Los tampones ensayados, manteniendo la proporción de disolventes orgánicos seleccionada y un pH de 5, fueron los siguientes: acético/acetato, cítrico/citrato y fosfórico/fosfato, todos ellos a una concentración 10 mM. El tampón cítrico/citrato (cuyo pH final fue de 5.2) fue el que proporcionó mayor intensidad CL, presentando además la ventaja de su alta estabilidad.

Una vez seleccionada la naturaleza del tampón de la fase móvil, se procedió a optimizar su concentración, estudiándose los siguientes niveles: 10, 20, 30 y 40 mM. Entre ellas, la que mejor resultado proporcionó fue la de 10 mM, observándose un descenso de la señal CL conforme se aumentaba la concentración, sin mejora en la resolución entre los compuestos.

Finalmente se realizaron pruebas con distintos caudales en el rango 0.7-1.2 ml min⁻¹, obteniéndose los mejores resultados con un caudal de 1 ml min⁻¹.

Así, la fase móvil finalmente seleccionada consistió en: tampón citrato (10 mM, pH 5.2):ACN:THF (65:22:13) a un caudal de 1 ml min⁻¹, obteniéndose entonces los casos resoluciones superiores a 1.66.

2.3 Optimización de la reacción PO-CL post-columna

Una vez obtenida una separación satisfactoria de las siete sulfonamidas, se procedió a realizar la optimización de la reacción PO-CL post-columna. El primer paso fue la elección del PO más adecuado para la reacción. En segundo lugar, y con objeto de tener en cuenta todas las posibles interacciones entre las distintas variables implicadas en el sistema (especialmente en una reacción como la de los POs, en la que la mayoría de los factores que en ella concurren están interrelacionados), se llevó a cabo la selección de los valores más apropiados para cada variable empleando la metodología del diseño de experimentos en su doble vertiente: (i) Diseños de diagnóstico o “*screening*”, para discernir las variables e interacciones significativas; y (ii) Diseños de superficie de respuesta para obtener los valores óptimos finales de las variables seleccionadas en el paso anterior. A continuación se comentan cada una de las etapas implicadas.

2.3.1 Selección del peroxioxalato

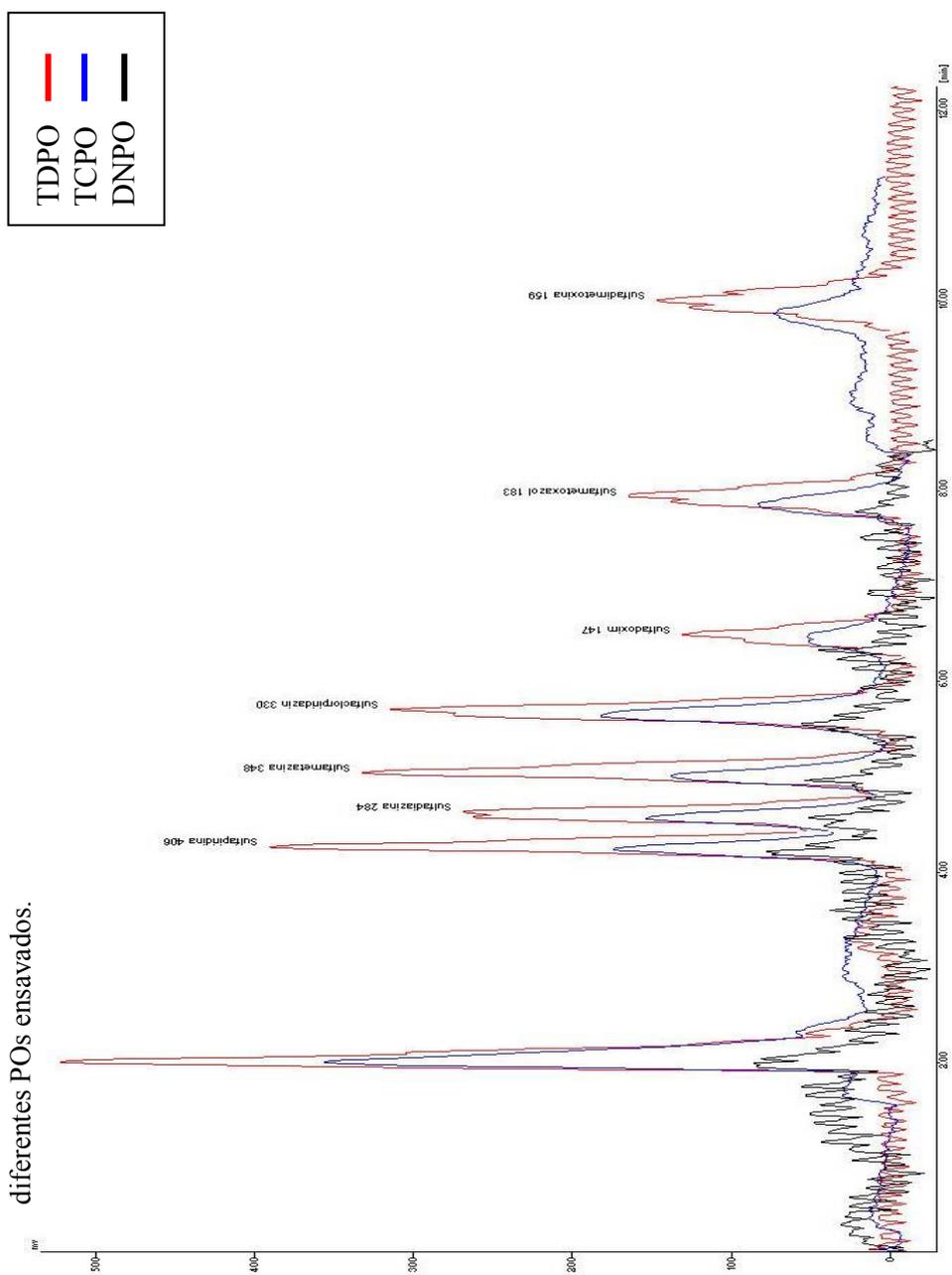
La primera etapa del estudio de la reacción CL post-columna fue la selección del peroxioxalato más apropiado. Con este propósito se seleccionaron tres de los POs más comúnmente empleados en bibliografía, como son: el TCPO (empleado hasta el momento en la optimización), el DNPO y el bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadeciloxicarbonil)fenil] oxalato (TDPO). Todos ellos se ensayaron a una concentración de 2.5 mM disueltos en una mezcla ACN/THF (75:25). Una vez ensayados los tres POs, se observó que el DNPO producía una señal de fondo tan alta que saturaba el detector, impidiendo la determinación de los analitos. Con objeto de subsanar este problema, se probó a diluir hasta concentración de 1 mM, y aunque se evitó la saturación del detector, no se mejoraron las señales de los analitos con respecto al TCPO. Por el contrario, el TDPO proporcionó excelentes resultados ya que, además de producir una mejora significativa en la intensidad de la señal CL (aproximadamente el doble que el TCPO), es

Capítulo 3

más estable y más soluble que los otros oxalatos empleados, por lo que se escogió para posteriores estudios. En la Figura 28 se muestra un cromatograma de una mezcla de las siete sulfonamidas en estudio (1 mg l^{-1} de cada una de ellas), a las condiciones ya establecidas, usando los distintos peroxioxalatos.

Como se acaba de comentar, se observó que el TDPO era mucho más soluble que el TCPO, por lo que se comprobó si se podía disolver en ACN únicamente, en lugar de en la mezcla ACN:THF empleada hasta el momento, ya que el THF actúa disminuyendo la señal CL. La prueba resultó positiva, por lo que a partir de este momento se usó ACN puro como disolvente del TDPO.

Figura 28. Cromatogramas de una mezcla de 7 sulfonamidas (1 mg l⁻¹ cada una) obtenidos con los diferentes POs ensavados.



Capítulo 3

2.3.2 Optimización de las variables de la reacción post-columna

Como se ha comentado anteriormente, las diferentes variables implicadas en la reacción post-columna (esto es, concentraciones de TDPO, peróxido de hidrógeno e imidazol y caudales del TDPO y de la disolución imidazol-peróxido de hidrógeno) fueron optimizadas siguiendo una estrategia secuencial mediante el diseño de experimentos. En todos los casos se usó como respuesta la suma de las intensidades de CL (en forma de alturas de pico) de los 3 analitos que menor señal producían (SDX, SMX, y SDM), con objeto de mejorar la sensibilidad del método respecto a ellos.

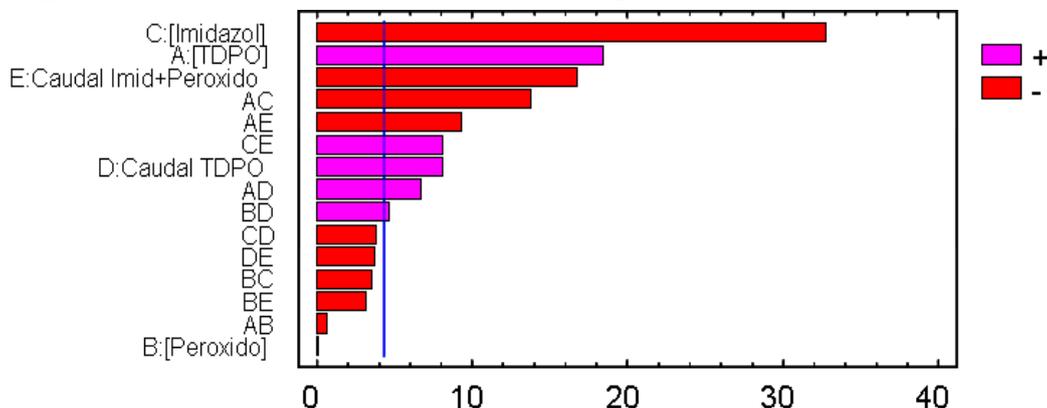
La primera etapa fue llevar a cabo un diseño de diagnóstico factorial fraccionado 2^{5-1} con tres réplicas del punto central para ver qué variables eran significativas. En la Tabla 27 se muestra el dominio experimental seleccionado para cada una de ellas.

Tabla 27. Optimización de la reacción post-columna: Dominio experimental seleccionado para el diseño de diagnóstico.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A): [TDPO] (mM)	1	2.5	4
(B): [Peróxido] (mM)	200	500	800
(C): [Imidazol] (mM)	5	45	85
(D): Caudal TDPO (ml min ⁻¹)	0.2	0.4	0.6
(E): Caudal (Imidazol + Peróxido) (ml min ⁻¹)	0.2	0.4	0.6

Con objeto de discernir las variables e interacciones significativas, se analizó el gráfico de Pareto que se representa en la Figura 29, donde el cálculo de los efectos se basa en el error puro. La línea muestra el límite de decisión para considerar los efectos significativos (basado en el efecto normalizado = efecto estimado, error estándar, la valor $P=0.05$ y un nivel de confianza del 95%).

Figura 29. Gráfico de Pareto del diseño de diagnóstico.



Como se observa, la única de las variables seleccionadas que no es significativa en el rango de estudio es la concentración de peróxido. Esto nos indica que variaciones de dicha concentración dentro del dominio experimental seleccionado no influyen de forma significativa en la respuesta experimental. Por lo tanto, esta variable no se incluyó en el siguiente paso de la optimización, fijándose su valor en el punto central del diseño de diagnóstico (500 mM).

El resto de las variables significativas se optimizaron usando un diseño de superficie de respuesta 2^{4-1} más estrella centrada en las caras, incluyendo 3 puntos centrales. Como región experimental se escogió la misma que para el diseño de diagnóstico (manteniendo la concentración de peróxido en 500 mM). Una vez llevado a cabo el diseño se obtuvo la ecuación de la superficie de respuesta correspondiente.

$$\text{Señal CL} = 38.0741 + 64.0556 \cdot A - 129.778 \cdot B + 28.4444 \cdot C - 63.8889 \cdot D - 13.9444 \cdot A^2 - 52.5 \cdot A \cdot B + 25.5 \cdot A \cdot C - 35.625 \cdot A \cdot D + 127.5556 \cdot B^2 - 14.5 \cdot B \cdot C + 30.875 \cdot B \cdot D - 17.4444 \cdot C^2 - 13.875 \cdot C \cdot D + 25.5556 \cdot D^2$$

Los óptimos proporcionados por el diseño, considerando el valor codificado y el valor real, fueron: [TDPO]: (+1) = 4 mM;

Capítulo 3

[Imidazol]: (-1) = 5 mM; Caudal de TDPO: (+1) = 0.6 ml min⁻¹;
Caudal de Imidazol-Peróxido: (-1) = 0.2 ml min⁻¹.

Como podemos comprobar, estos óptimos se encuentran en los límites del dominio experimental seleccionado, por lo que fue necesario plantear un nuevo diseño con objeto de verificar si valores más allá del dominio experimental seleccionado mejorarían la respuesta analítica. Sin embargo, en este nuevo diseño experimental se excluyó la variable [TDPO], para la que se fijó el óptimo dado por el diseño anterior (4 mM), debido a que se observó que el aumento en la concentración del TDPO provocaba también un incremento muy considerable del ruido de fondo, lo que llevaba consigo una pérdida de la sensibilidad.

El nuevo diseño seleccionado fue un 2³ más estrella centrada en las caras, con tres réplicas del punto central, empleando el dominio que se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28. Dominio experimental del segundo diseño 2³ + estrella centrada en las caras.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
(A): log [Imidazol]	-0.3	0.2	0.7
[Imidazol] (mM)	0.5	1.6	5.0
(B): Caudal (Peróxido + Imidazol) (ml min ⁻¹)	0.050	0.125	0.200
(C): Caudal de TDPO (ml min ⁻¹)	0.6	0.7	0.8

La ecuación de superficie de respuesta obtenida fue:

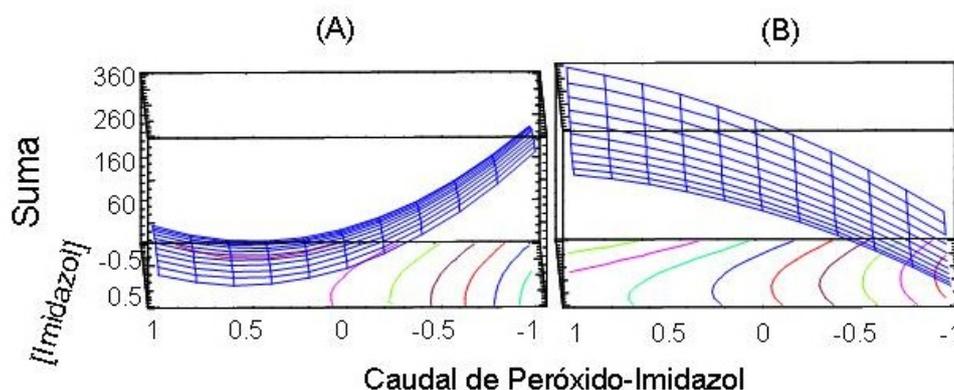
$$\text{Señal CL} = 130.986 + 11.2 \cdot A + 54.7 \cdot B - 14.7 \cdot C + 10.7746 \cdot A^2 + 7.125 \cdot A \cdot B + 0.625 \cdot A \cdot C - 16.7254 \cdot B^2 + 0.375 \cdot B \cdot C + 1.27465 \cdot C^2$$

La superficie de respuesta generada por este diseño volvió a proporcionar valores óptimos en los límites del dominio experimental

seleccionado. Así, los valores óptimos obtenidos fueron: [Imidazol]: (+1) = 5 mM; Caudal de Imidazol-Peróxido: (+1) = 0.2 ml min⁻¹; Caudal de TDPO: (-1) = 0.6 ml min⁻¹.

Sin embargo, se observa que estos valores óptimos coinciden con los proporcionados por el anterior diseño de superficie de respuesta. Así, gráficamente, si enfrentamos las superficies obtenidas por los 2 diseños, tal y como muestra la Figura 30 para el caso de concentración de imidazol y caudal de imidazol y peróxido, se observa claramente que ambos diseños conducen a los mismos óptimos.

Figura 30. (A) Superficie representativa del primer diseño. (B) Superficie representativa del segundo diseño.



Como resumen, los valores óptimos finalmente seleccionados para las variables que afectan a la reacción CL post-columna fueron los siguientes:

[Peróxido]: 500 mM

[TDPO]: 4 mM

[Imidazol]: 5 mM

Caudal de Peróxido-Imidazol: 0.2 ml min⁻¹

Caudal de TDPO: 0.6 ml min⁻¹

Capítulo 3

2.4 Optimización de la reacción de derivatización

Un factor primordial para la consecución de una mejor señal CL, fue el estudio de la reacción de formación de los correspondientes derivados fluorescentes a partir de los analitos en estudio, que participarán en la reacción del PO. De la selección de un fluoróforo adecuado y eficiente dependerá que se obtenga una adecuada sensibilidad en el análisis, ya que si éste no produjera rendimientos cuantitativos en la reacción de marcado, se producirían pérdidas que nos llevarían a no cuantificar todo el analito presente en la muestra. Esta etapa de optimización se dividió en dos partes: (i) Estudio de la reacción de derivatización y (ii) Optimización de la concentración de agente derivatizante y tiempo de reacción.

2.4.1 Estudio de la reacción de derivatización

En esta optimización se tuvieron en cuenta los siguientes factores:

- Selección del agente derivatizante
- Disolvente de la muestra (o patrón)
- Estabilidad del derivado fluorescente
- Disolvente del agente derivatizante

Así, para realizar este estudio se seleccionaron dos agentes derivatizantes para aminas ampliamente usados en fluorescencia, como son OPA y FR (empleada hasta el momento para la optimización del método). En el estudio con OPA se emplearon dos disoluciones diferentes: una de ellas preparada del modo convencional empleando mercaptoetanol [355], y otra preparada de modo similar al empleado en los Capítulos 1 y 2 de esta Memoria, empleando N-acetilcisteína (NAC). Asimismo la reacción de derivatización con FR se aplicó usando disolución de FR en ACN (1.2 g l^{-1}),

[355] EPA Method 531.1., Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatisation (1995) Revision 3.1.

con mercaptoetanol (1.2 g l^{-1} de FR y 22.2 g l^{-1} de mercaptoetanol), y con NAC (1.2 g l^{-1} de FR y 10 g l^{-1} de NAC).

Para disolver los patrones de las sulfonamidas se probaron dos pH distintos (ya que el pH al que se desarrolla la reacción de derivatización influye en la efectividad del mismo) y dos naturalezas distintas del tampón usado. Los tampones elegidos fueron fosfato 10 mM a pH 3, fosfato 10 mM a pH 7, y Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) 10 mM a pH 7.

En todos los casos se empleó 1 ml de disolución del agente derivatizante para 1 ml de disolución patrón de 7 mg l^{-1} de SDM, agitando 5 min en baño de ultrasonidos.

Asimismo, y con objeto de evaluar la estabilidad del derivado obtenido en la reacción, se realizaron dos ensayos en cada una de las condiciones propuestas: uno inmediatamente después de llevar a cabo la reacción y otro transcurrido 10 min desde éste.

En la Tabla 29 se muestran los valores de intensidad CL obtenidos en el estudio propuesto para 7 mg l^{-1} de SDM. La altura de pico de esta sulfonamida fue empleada como respuesta instrumental en esta optimización ya que era la que menos señal presentaba. Los resultados obtenidos mostraron que con OPA en ninguna de sus modalidades se consiguió hacer efectiva la formación del derivado fluorescente, y que de las tres modalidades empleadas con FR, la que mejores resultado proporcionó fue la disolución de FR en ACN, por lo que se seleccionó ésta para el trabajo posterior.

En cuanto al disolvente empleado para la disolución de las sulfonamidas, tanto con el tampón fosfato a pH 7, como con Tris se obtuvieron resultados satisfactorios en términos de intensidad de la señal y estabilidad del derivado obtenido, escogiéndose finalmente el tampón Tris 10 mM a pH 7 debido a que la forma de los picos obtenida con el tampón fosfato era muy irregular (en forma de sierra).

Capítulo 3

Tabla 29. Estudio de la reacción de derivatización de SDM a distintas condiciones. Entre paréntesis valores de intensidad CL (altura de pico) obtenidos usando el sistema HPLC-PO-CL propuesto.

Tiempo desde el marcado	FR en ACN		FR + Mercaptoetanol		FR + NAC		OPA	
	0 min	10 min	0 min	10 min	0 min	10 min	0 min	10 min
Tris pH 7, 10 mM	201	211	153	184	143	163	0	0
Fosfato pH 7, 10 mM	206	208	10	30	150	163	0	0
Fosfato pH 3, 10 mM	198	213	181	193	129	140	0	0

Una vez seleccionada la FR como agente derivatizante, se realizó una prueba de cambio del disolvente empleado para su disolución, usando acetona en lugar de ACN. En este ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre la señal CL obtenida con ambos disolventes. Sin embargo, se optó por elegir la acetona por ser la FR más soluble en ella, lo que permitiría preparar disoluciones más concentradas (de 4 g l⁻¹ en lugar de 1.2 g l⁻¹), requiriéndose menos volumen de disolución de agente derivatizante en la reacción (50 µl en lugar de 1 ml), evitando así diluir la muestra a inyectar innecesariamente.

Al ser la FR el agente derivatizante seleccionado finalmente, comentaremos brevemente su correspondiente reacción selectiva con aminas primarias [356]. Reacciona casi instantáneamente formando 5-(2-carboxifenil)-5-hidroxi-3-fenil-2-pirrolina-4-ona, mientras que el exceso se hidroliza a un producto no fluorescente, no siendo el reactivo por sí mismo un producto fluorescente. La Figura 31 ilustra la reacción. La conversión se lleva a cabo en una mezcla agua-acetona con agitación, y los derivados producidos pueden ser directamente separados mediante cromatografía en fase inversa. También tiene la ventaja de que al ser una reacción tan rápida, se puede acoplar post-columna y producir el marcado de los compuestos

[356] R.W. Frei, J.F. Lawrence (Ed.), Chemical derivatization in analytical chemistry Vol. 2, Plenum Press, New York (1982), pp 210-211.

después de su separación. La excitación de los productos fluorescentes ocurre normalmente a 390 nm con una emisión fluorescente a 475 nm.

Figura 31. Reacción de la FR con aminas primarias [356].

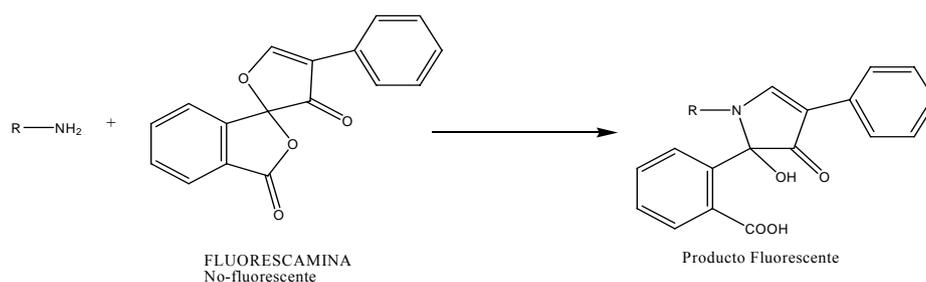
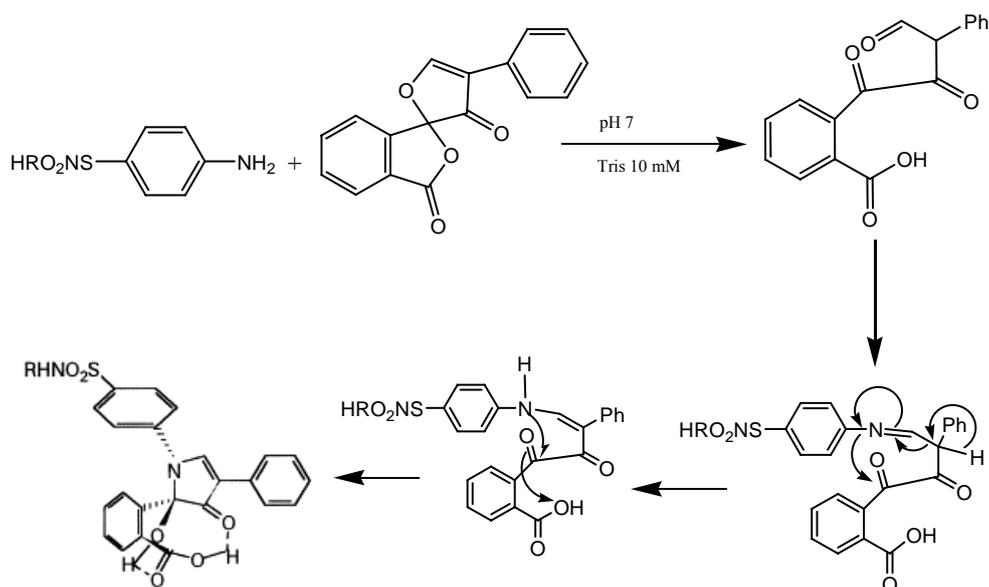


Figura 32. Mecanismo de la reacción de derivatización FR-Sulfonamida.



Capítulo 3

En cuanto al mecanismo de la reacción de derivatización de las sulfonamidas, una posible vía se muestra en la Figura 32.

2.4.2 *Tiempo de reacción y concentración de FR*

Se llevó a cabo un estudio conjunto del tiempo de reacción necesario para la formación del derivado fluorescente, empleando un baño ultrasonidos, y de la concentración de FR, usando un diseño 3^2 con tres réplicas del punto central. El dominio experimental seleccionado en el diseño se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Dominio experimental seleccionado en la optimización de la reacción de derivatización.

	-1	0	+1
(A)[FR] (g l⁻¹)	1	2.5	4
(B)Tiempo de reacción (min)	1	8	15

Una vez analizado el diseño, la ecuación de la superficie de respuesta obtenida fue:

$$\text{Señal CL} = 221.625 + 70.6667 \cdot A + 16.0 \cdot B - 15.375 \cdot A^2 + 5.25 \cdot AB + 9.625 \cdot B^2$$

Tal y como lo demuestran los coeficientes de la ecuación, ambas variables son significativas, siendo la concentración de FR la más influyente en la respuesta CL.

La superficie de respuesta dio como óptimos del diseño los valores codificados y reales, respectivamente, concentración de FR: +1 = 4 g l⁻¹ y tiempo de reacción: +1 = 15 min. Esto nos obligaría a tener que realizar un nuevo diseño partiendo de estos valores hacia valores más elevados de ambas variables, ya que están en uno de los límites del dominio experimental. Sin embargo, en el caso de la concentración de FR, se

mantuvo el valor de 4 g l^{-1} como valor óptimo dado que mayores concentraciones presentaban problemas de solubilidad.

Con objeto de verificar el valor óptimo obtenido para el tiempo de reacción, se realizó una prueba adicional a 20 min, pero las señales no mejoraron significativamente con respecto a 15 min, eligiéndose por tanto este tiempo como óptimo. Este tiempo de reacción puede parecer elevado, pero si lo comparamos con procedimientos y tiempo de reacción descritos en la bibliografía (que en algunos casos llegan a durar 40 min) [357], se puede comprobar que el procedimiento propuesto para la reacción de formación de derivados fluorescentes a partir de sulfonamidas se puede considerar rápido y sencillo.

Resumiendo la optimización de la etapa de derivatización con FR, los valores encontrados utilizando 1 ml de disolución de SDM fueron:

- Agente derivatizante: 50 μl de FR 4 g l^{-1} disuelta en acetona.
- Disolvente de la muestra: Tampón Tris 10 mM, pH 7.
- Tiempo de reacción: 15 minutos en ultrasonidos.

2.5 Optimización del bucle de inyección

El último parámetro a optimizar del sistema fue el volumen del bucle de inyección, que se aumentó con objeto de mejorar la sensibilidad del método. Para ello, se hicieron pruebas con bucles de 20, 40, 60, 80 y 100 μl , inyectando una mezcla de sulfonamidas de una concentración total de $500 \mu\text{g l}^{-1}$. El bucle que ofreció mejores resultados fue el de 100 μl , ya que aumentó considerablemente la señal CL, sin perder resolución.

Como resumen de todo el proceso de optimización del método propuesto, la Tabla 31 muestra todos los valores óptimos del sistema.

[357] S. Lamba, S. Kumar, A. Asthana, M. Shelke 552, (2005) 110.

Capítulo 3

Tabla 31. Óptimos de la separación cromatográfica, reacción PO-CL post-columna y reacción de derivatización para el análisis de sulfonamidas.

Composición de la fase móvil	Tampón Cítrico/Citrato (10 mM, pH 5.2) ACN: THF, (65:22:13)
Caudal de la fase móvil (ml min⁻¹)	1.0
Volumen de inyección (μl)	100
[TDPO] (mM)	4
[Peróxido] (mM)	500
[Imidazol] (mM)	5
Caudal de TDPO (ml min⁻¹)	0.6
Caudal (Peróxido + Imidazol) (ml min⁻¹)	0.2
Concentración de FR (g l⁻¹)	4.0 en acetona
Tiempo de reacción (min)	15
Disolvente de la muestra	Tampón Tris (10 mM, pH 7.0)

3 RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

La recta de calibrado para la determinación de las siete sulfonamidas se estableció mediante la medida de tres réplicas de disoluciones de patrones a siete niveles de concentración en las condiciones óptimas seleccionadas. Debido a que tanto la SPD como la SMZ producen señales considerablemente más elevadas que el resto, las concentraciones de ambas usadas para el establecimiento de sus rectas de calibrado fueron menores que para las demás. Así los rangos de la recta de calibrado para la SPD y para la SMZ fueron 5-60 $\mu\text{g l}^{-1}$ y para la SDZ, SCP, SDX, SMX y la SDM de 10-120 $\mu\text{g l}^{-1}$. La representación gráfica de las rectas de calibrado obtenidas se puede ver en la Figura 33, mientras que los valores de las ecuaciones de las rectas, así como los parámetros de calidad del método se muestran en la Tabla 32 (Como señal analítica se utilizaron las alturas de pico). El criterio para calcular los límites de detección y cuantificación fue el recomendado por la IUPAC [358]. Los límites obtenidos en este método son más que suficientes para poder cuantificar la cantidad de sulfonamidas establecida en legislación para estos residuos en alimentos de origen animal, que es de 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ [359]. Además en los límites calculados no se ha tenido en cuenta el factor de preconcentración obtenido con el tratamiento de muestra, que es 10. De este modo, por ejemplo se podrían cuantificar muestras con una concentración de hasta 4 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cualquier sulfonamida, ya que al final del proceso la concentración estaría en 40 $\mu\text{g l}^{-1}$. Esto hace que este método pueda encontrarse entre los más sensibles para el análisis

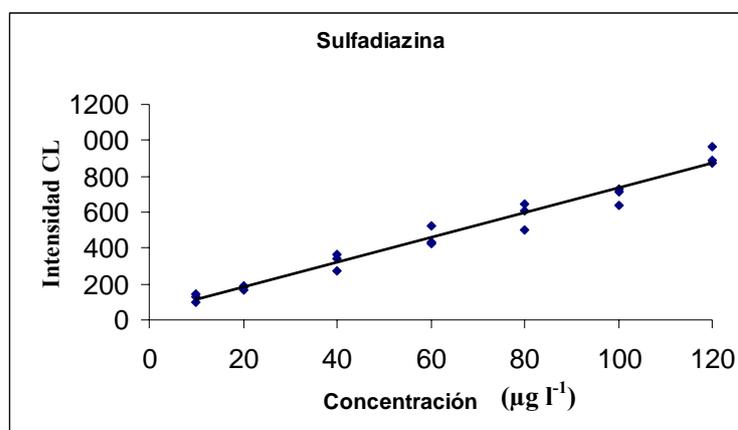
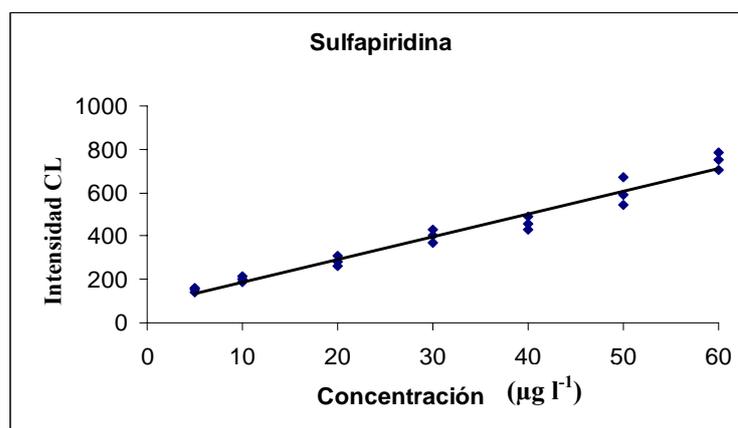
[358] Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, IUPAC technical report. Pure Appl. Chem. 74 (2002) 1699.

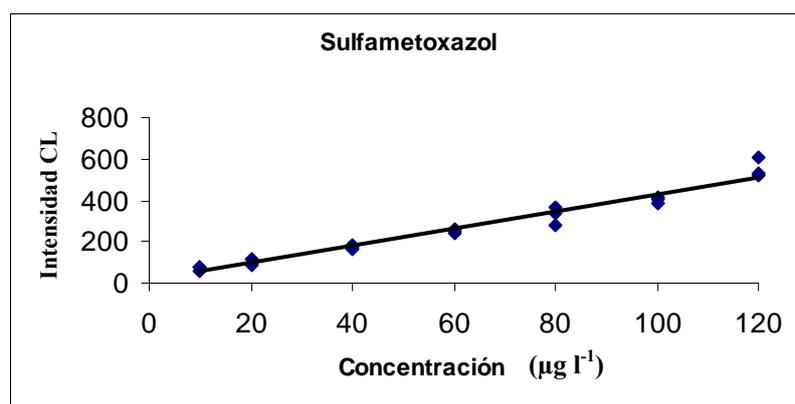
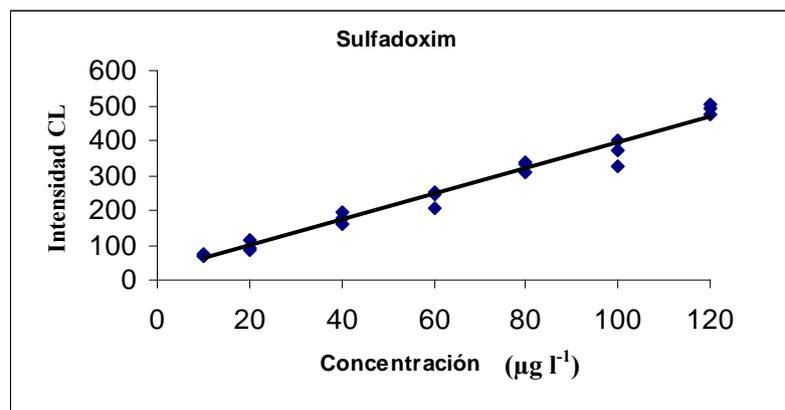
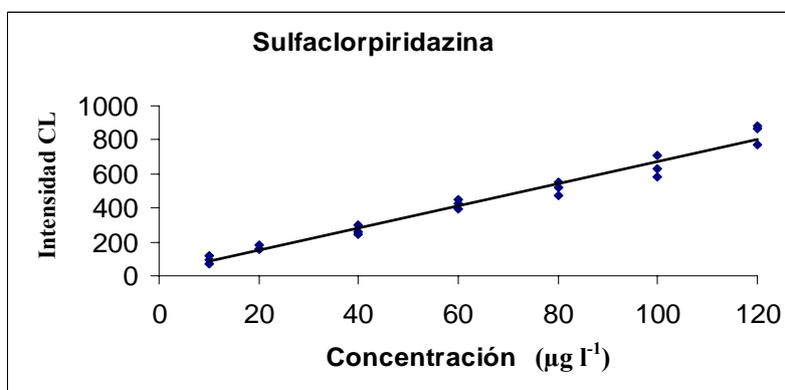
[359] Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DOCE L 224 de 18 de agosto de 1990. Modificado por el Reglamento 1338/2000/CE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

Capítulo 3

de sulfonamidas, cumpliendo con las especificaciones establecidas por la EU en relación al LMR establecido.

Figura 33. Rectas de calibrado con patrones para las siete sulfonamidas en estudio.





Capítulo 3

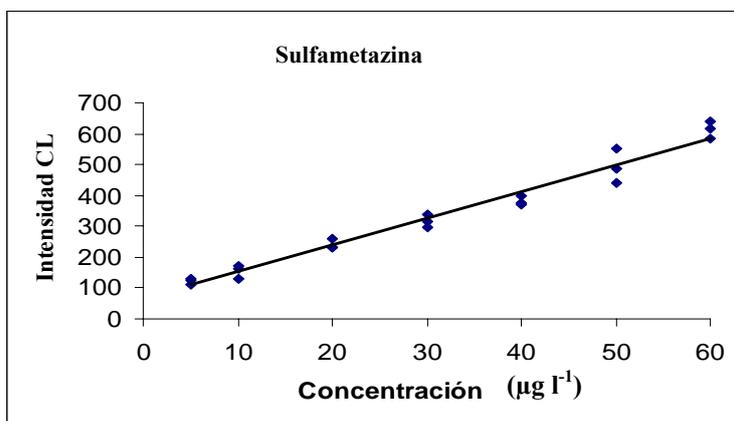
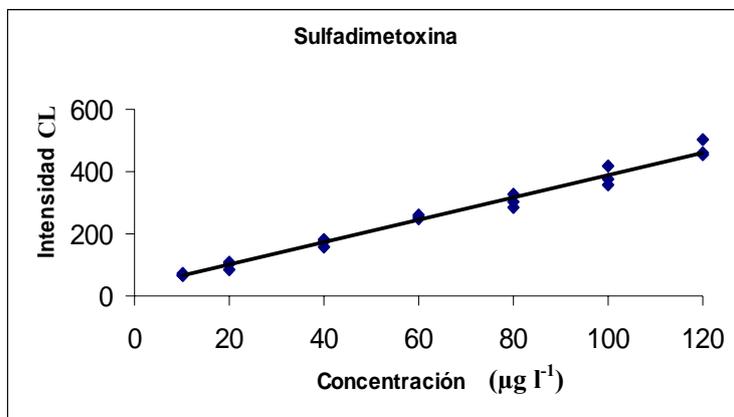


Tabla 32. Características de los calibrados para cada analito y límites de detección y cuantificación.

Rango lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Ecuación del calibrado ^a	S _{R.C}	R ² (%)	Valor P para el fallo de ajuste ($\alpha = 0.05$)	LD ^b ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LQ ^b ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Precisión ^c
SPD	CL = 10.4·C+85.20	38.7	96.67	17.4	6.2	17.0	7.03
SDZ	CL = 6.88·C+45.58	47.0	97.15	49.9	6.9	18.8	6.80
SMZ	CL = 8.68·C+65.62	29.4	97.20	25.0	7.1	19.5	8.32
SCP	CL = 6.47·C+22.60	42.3	97.39	29.7	13.2	36.5	9.97
SDX	CL = 3.66·C+25.60	23.0	97.58	11.6	13.6	37.0	6.98
SMX	CL = 4.17·C+12.72	31.7	96.49	7.2	10.4	28.3	6.55
SDM	CL = 3.62·C+27.67	18.9	98.33	70.2	9.5	26.0	12.63

^a Obtenidas a partir de inyecciones por triplicado de mezclas de patrones.

CL: altura del pico cromatográfico medida en el sistema CL

C: concentración de sulfonamida en la disolución de patrón ($\mu\text{g l}^{-1}$)

^b Calculado a partir de las curvas de calibración para el rango bajo de concentraciones

S_{R.C}: desviación estándar de regresión

^c expresada como la RSD (%) para una concentración de 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ en condiciones de repetibilidad

S_{R.C}: Desviación estándar de la regresión.

Capítulo 3

4 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS EN LECHE

Para la aplicación del método propuesto se seleccionó la leche dado que es una matriz en la que es probable encontrar restos de sulfonamidas, procedentes del tratamiento de los animales, el tratamiento de este tipo de muestra se basó en el método oficial propuesto por la AOAC [360] para el análisis de sulfonamidas que se describe a continuación:

- 1) Fortificar 10 ml de leche y poner en un embudo de decantación**
- 2) Añadir 75 ml de disolución de extractante Cloroformo-Acetona (100 ml +50 ml)**
- 3) Agitar 1 min y ventilar por el tapón (repetir 2 veces)**
- 4) Dejar separar las 2 fases durante 1min**
- 5) Repetir pasos 3-4**
- 6) Dejar separar 5 min**
- 7) Pasar el extracto al filtro de papel y recoger la fase orgánica (inferior) en un matraz**
- 8) Añadir 38 ml del extractante al embudo de decantación, y repetir los pasos 3-7**

[360] AOAC Official Method 993.32. Multiple sulfonamide residues in raw bovine milk. Official Methods of Analysis of AOAC Int., 17th Edition, Current Through Revision #1, 2002 (versión CD).

- 9) Lavar el filtro con 2 porciones de 8 ml de extractante (Volumen de 129 ml de extracto a rotavapor)**
- 10) Rotavaporar a 32° C**
- 11) Añadir 1.5 ml de Tampón fosfato 100 mM, pH 7 y agitar con vortex durante 1 min**
- 12) Añadir 7.5 ml de Hexano y agitar con vortex durante 1 min**
- 13) Esperar 3 min para que se separen las fases y volver a agitar durante 1min**
- 14) Esperar un mínimo de 15 min a que se separen las dos fases**
- 15) Recoger la fase acuosa (inferior) con una pipeta Pasteur**

Este procedimiento se modificó para adaptarlo a las necesidades del método propuesto. Así, se cambió el tampón fosfato empleado en la etapa 11 por tampón Tris 10 mM, pH 7 y las últimas etapas (13-15) por una única etapa de centrifugación (10 min y 4000 rpm), más rápida e igual de eficaz.

Con objeto de comprobar si durante el proceso de extracción propuesto se producían pérdidas de analito, y por lo tanto se introducían errores sistemáticos en el método debido al tratamiento de las muestras, se establecieron de nuevo las curvas de calibrado usando las mismas concentraciones que las utilizadas anteriormente, pero aplicándole el proceso de extracción a cada disolución patrón. En la Tabla 33 podemos comprobar los resultados de la comparación estadística de las rectas (calibrado con patrones sin y con tratamiento previo), basada en la comparación estadística de las pendientes y las ordenadas en el origen

Capítulo 3

mediante el test de la *t de Student* [361]. Tal y como muestran los valores de P obtenidos ($P > 5\%$) se pudo comprobar que no había diferencias significativas entre las rectas de calibrado en ambos casos. Este resultado aseguraba la inexistencia de errores sistemáticos debidos a pérdidas significativas durante el proceso de extracción y que por lo tanto se pueden usar las rectas de calibrado con patrones establecidas sin tratar los patrones para la cuantificación de las sulfonamidas en leche.

[361] A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés-Barrero, M. Román-Ceba, J.L. Sierra-Fernández, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 381.

Tabla 33. Comparación del calibrado con patrones tratados y sin tratar.

	Calibrado patrones sin tratar	Calibrado patrones tratados	Comparación de pendientes Valor P (%)	Comparación de ordenadas Valor P (%)
SPD	CL = 10.4·C+85.20	CL = 8.86·C-136.69	7.2	8.8
SDZ	CL = 6.88·C+45.58	CL = 3.18·C+114.09	97.1	33.5
SMZ	CL = 8.68·C+65.62	CL = 6.10·C+19.00	98.8	26.0
SCP	CL = 6.47·C+22.60	CL = 2.98·C+27.55	89.9	79.0
SDX	CL = 3.66·C+25.60	CL = 2.29·C+6.30	94.0	74.9
SMX	CL = 4.17·C+12.72	CL = 4.13·C-6.27	99.1	43.6
SDM	CL = 3.62·C+27.67	CL = 1.76·C+40.41	76.8	7.6

Capítulo 3

5 APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN LECHE CRUDA DE VACA

Con objeto de demostrar la aplicabilidad del método propuesto al análisis de muestras reales, se escogió una muestra de leche entera de vaca suministrada por PULEVA BIOTECH, S.A. La leche suministrada se encontraba libre de sulfonamidas, por lo que era apropiada para realizar ensayos de recuperación.

La validación del método se llevó a cabo dopando diferentes porciones de leche con mezcla de las siete sulfonamidas, obteniendo concentraciones finales de 5, 10 y 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ para cada una de ellas. Estas concentraciones fueron elegidas porque son las propuestas por el método oficial de la AOAC [360] con el que se realizará una comparativa de resultados. Una vez dopadas, las muestras se homogeneizaron mediante agitación durante 15 min y se aplicó el procedimiento de extracción antes expuesto. Cada uno de los niveles ensayados se realizó por duplicado, inyectándose a su vez por duplicado. También se analizó un blanco de muestra para poder corroborar que las muestras estaban libres de sulfonamidas y que no había ningún interferente que afectara al análisis. Las recuperaciones obtenidas fueron comparadas en términos de valores medios y desviaciones estándar para cada nivel de concentración y para cada sulfonamida, con los valores obtenidos mediante aplicación del método oficial en un estudio colaborativo [362]. Esta comparación se llevó a cabo realizando dos test estadísticos. Un test de la F de Snedecor para comprobar si las varianzas de ambos métodos eran significativamente diferentes y un test de la *t de Student* de comparación de medias, para ver si las recuperaciones obtenidas con el método propuesto eran significativamente diferentes a las del método oficial.

[362] M.D. Smedley, J. AOAC Int. 77 (1994) 1112.

Excepto para la SPD y la SMZ al nivel de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ y para la SMZ en el nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$, se concluyó afirmando que no hay diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas por el método propuesto y las del método oficial. Los resultados se muestran en la Tabla 34, y como se puede comprobar el método desarrollado proporciona resultados satisfactorios en términos de veracidad (recuperaciones) y de precisión (desviaciones estándar), incluso para el nivel más bajo estudiado ($5 \mu\text{g l}^{-1}$). Ni para el SDX, ni para el SMX hay datos disponibles, ya que no estaban incluidas en el estudio colaborativo empleado para validar el método propuesto.

Tabla 34. Estudio de recuperaciones en leche cruda de vaca a diferentes niveles de concentración. Comparación con los valores obtenidos en un estudio colaborativo con el método oficial de AOAC.

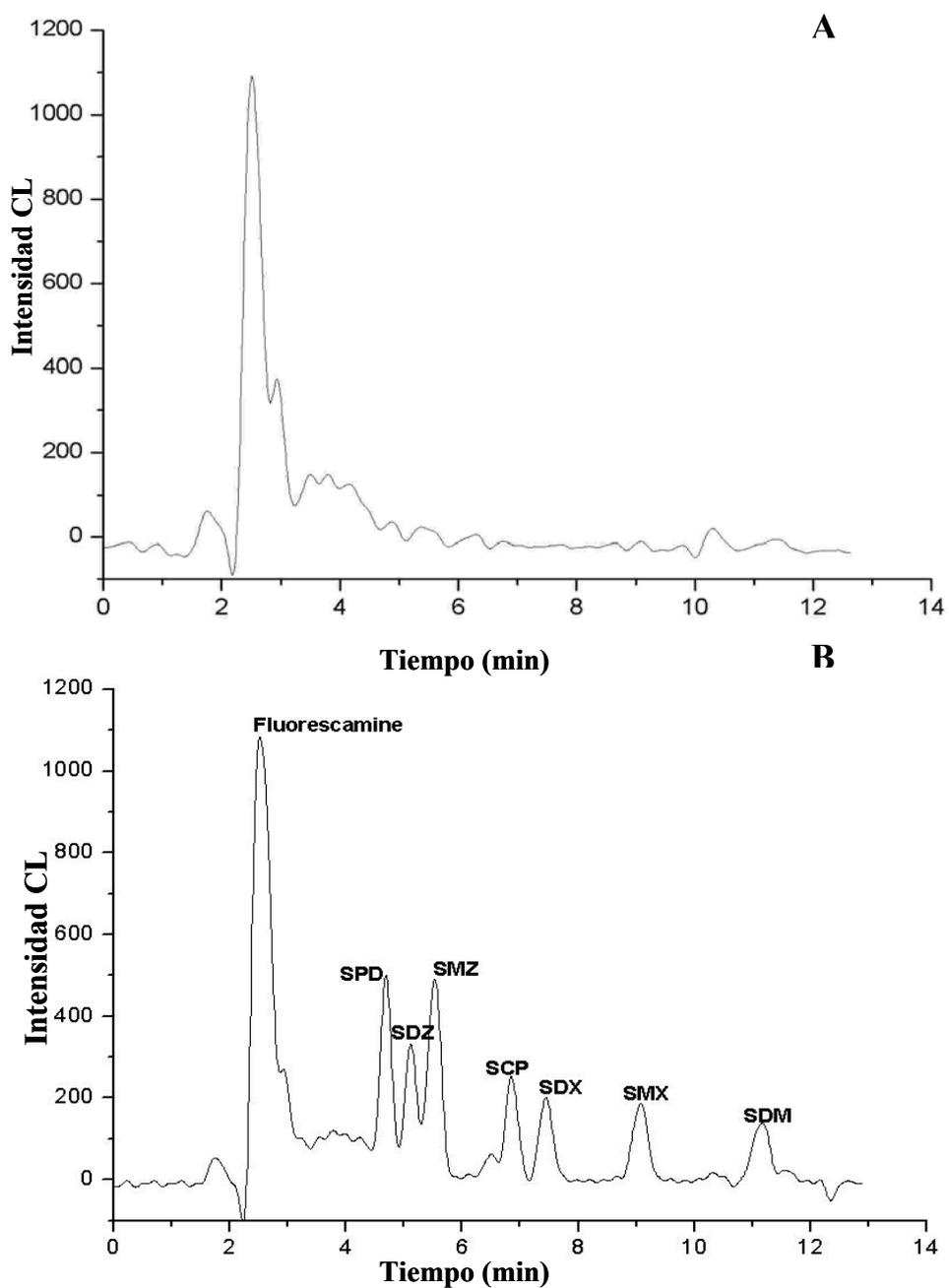
	SPD	SDZ	SMZ	SCP	SDX	SMX	SDM
	5 µg l⁻¹						
R^a (%)	87.3	82.71	73.79	81.47	94.94	93.75	71.44
S^a	4.22	13.17	6.92	8.02	14.71	8.16	6.87
R^b (%)	80.46	74.09	85.38	79.08	n.p.	n.p.	68.03
S^b	7.48	6.00	9.26	11.35	n.p.	n.p.	12.08
	10 µg l⁻¹						
R^a (%)	59.33	55.04	67.09	67.05	78.17	41.74	56.38
S^a	3.85	15.35	7.91	9.89	13.21	5.12	11.56
R^b (%)	76.73	75.36	82.36	71.22	n.p.	n.p.	66.54
S^b	5.82	5.37	6.78	6.11	n.p.	n.p.	4.23
	20 µg l⁻¹						
R^a (%)	83.03	88.06	86.35	96.13	96.79	53.10	71.79
S^a	11.19	16.66	10.12	22.13	9.96	6.49	8.52
R^b (%)	76.23	75.01	82.87	67.88	n.p.	n.p.	67.05
S^b	5.47	5.14	5.78	3.82	n.p.	n.p.	3.18

R: recuperación (%) (n=4); S: desviación estándar; ^a Valores obtenidos con el método propuesto. ^b Valores proporcionados por el estudio colaborativo [362] n.p.: no proporcionado.

En la Figura 34 se muestran dos cromatogramas, correspondientes a un blanco de leche entera de vaca y a una muestra de leche entera de vaca dopada con $20 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada sulfonamida. Se puede comprobar que no existen interferentes en la matriz que solapen con los analitos. En este sentido es importante resaltar que la SDZ esta muy bien resuelta como se puede ver en el cromatograma de la muestra dopada, resolviéndose el problema de interferentes de la aplicación del método oficial, en la cual puede aparecer confundida con la teobromina. Otra ventaja adicional que presenta el método propuesto sobre el método oficial es que en este último, dependiendo de las sulfonamidas que van a ser determinadas, hay que cambiar las condiciones de la fase móvil, mientras que en el método propuesto, con una única fase móvil isocrática se pueden determinar 7 sulfonamidas.

Capítulo 3

Figura 34. Cromatograma de un blanco de leche cruda de vaca (A) y de una muestra de leche cruda de vaca dopada con $20 \mu\text{g l}^{-1}$ (B).



**DETERMINACIÓN DE SUFONAMIDAS
MEDIANTE CE-UV/VIS
EN CARNE DE CERDO Y AGUA**

1 INTRODUCCIÓN

Con objeto de demostrar la gran capacidad de resolución que posee la CE unida a una técnica separativa de preconcentración online como es el apilamiento de muestra de gran volumen (LVSS), se desarrolló un método para la cuantificación de nueve sulfonamidas (sulfapiridina (SPD), sulfametazina (SMZ), sulfamerazina (SMR), sulfameter (SMT), sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDM), sulfametoazol (SMX), sulfaclopiridazina (SCP), y el sulfametizol (SMI)) cuyos LMRs están regulados por la EU [363] en carne de cerdo y en aguas subterráneas.

Para el desarrollo de este método se siguieron los siguientes pasos.

- * OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORETICA
- * DESARROLLO DEL MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN ONLINE
- * RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD
- * APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE LAS 9 SULFONAMIDAS EN CARNE DE CERDO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

[363] 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.

2 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

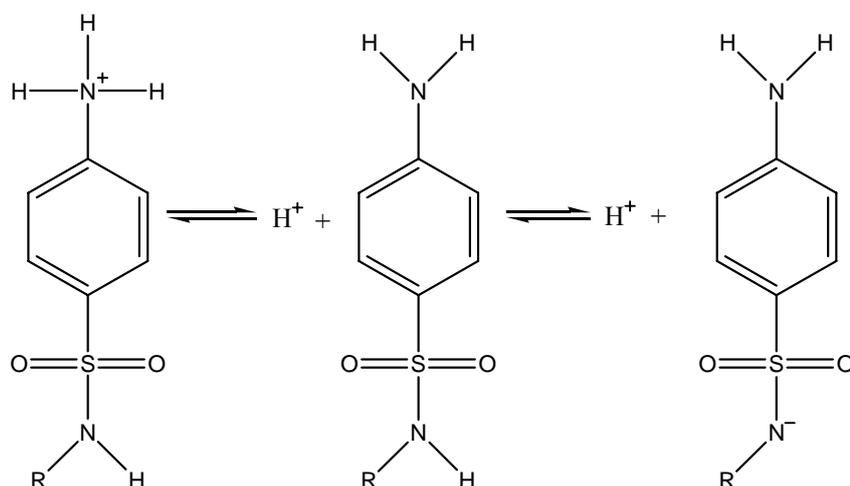
Con objeto de conseguir un método lo más sensible posible, que a la vez fuera suficientemente preciso, se procedió a optimizar todas las variables influyentes del sistema electroforético: pH, naturaleza del tampón, concentración del tampón, voltaje, temperatura y tamaño del capilar. Como criterio para seleccionar los valores óptimos se seleccionó tanto la resolución de los diferentes picos como la señal de absorbancia. Para identificar los analitos se empleó tanto el tiempo de migración como el espectro correspondiente, registrado a $\lambda = 265$ nm y empleando un ancho de banda de 16 nm. En todos los casos, se impuso como restricción que el valor de la intensidad de corriente generada no superara los 120 μ A. Las diferentes etapas del proceso, se describen a continuación.

2.1 Optimización del pH

Dada la estructura general de las sulfonamidas y a su carácter anfotérico (Figura 35), las sulfonamidas pueden cargarse de forma positiva a pH por debajo de 3.0, o pueden cargarse de forma negativa a pH por encima de 6.0 [364]. En cualquiera de las dos formas cargadas la separación mediante CZE sería posible, como ya se ha comentado en la introducción.

[364] Z. Qiang, C. Adams, Water Research 38 (2004) 2874.

Figura 35. Esquema de ionización de las sulfonamidas.



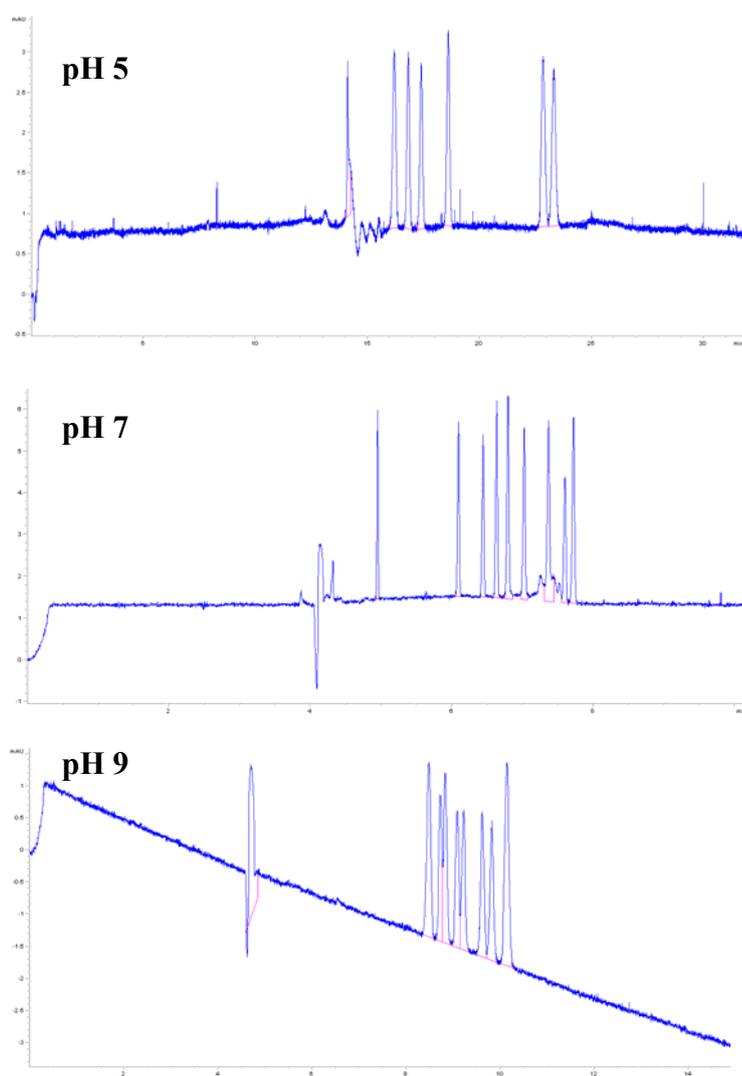
Por ello, el primer paso de la optimización del sistema electroforético fue determinar qué pH era el más adecuado para la separación. Con este propósito se realizó un estudio del pH del tampón electroforético en el rango comprendido entre 2.0-9.5. La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida de una longitud de 64.5 cm, 50 μm de i.d y con la ventana de detección situada a 8.5 cm del cátodo, aplicando un voltaje de 30 kV y una temperatura de 25 °C. La disolución mezcla de las 9 sulfonamidas en estudio poseía una concentración de 10 mg l⁻¹ para cada analito, inyectándose en el sistema mediante inyección hidrodinámica durante 5 s a una presión de 50 mbar. Los tampones empleados para este estudio fueron los siguientes: pH 2.0, 5.0 y 7.0, tampón fosfato (50 mM); pH 8.0, tampón Tris/HCl (50 mM); pH 9.5, tampón borato (20 mM).

Como resultado se observó que, a pH por debajo de 5, no aparecían picos antes de los 70 min, por lo que se desecharon esos valores. Esta lentitud en el análisis puede deberse a la falta de flujo electrosmótico (EOF). Por encima de pH 5, sólo se apreció la separación de los compuestos a pH 7, dentro de los valores estudiados. En la Figura 36 se muestra como varía la

Capítulo 4

separación con respecto al pH. Dado que esta variable es tan crítica para la separación, se realizó una segunda optimización en un rango de pH más estrecho, comprendido entre 6.5-7.5, con variaciones de 0.1 unidades. El pH en el que se consiguió una mejor separación fue el de 7.3, en el que todos los compuestos presentan una resolución superior a 1.5.

Figura 36. Estudio del efecto del pH del tampón en la separación electroforética de las nueve sulfonamidas.



2.2 Optimización de la naturaleza del tampón

Una vez optimizado el pH y fijado a 7.3, se pasó a la optimización de la naturaleza del tampón. Los tampones elegidos para este valor de pH fueron: acetato amónico/ NH_3 , imidazol/HCl, tris/HCl, cítrico/citrato y dihidrógeno fosfato sódico/monohidrógeno fosfato disódico. La concentración elegida para todos los tampones fue de 50 mM excepto para el tampón cítrico/citrato que fue de 25 mM, ya una concentración de 50 mM producía una corriente en el capilar muy elevada (130 μA), dando lugar a un incremento del efecto Joule y a irreproducibilidad en las señales. Las demás condiciones de medida son las descritas en el apartado 2.1 del presente capítulo. Los electroferogramas obtenidos para cada tampón se muestran en la Figura 37.

Los resultados muestran que se puede descartar tanto el uso del tampón Tris como el del tampón acetato, ya que con ninguno se consigue la separación de todos los compuestos. Con los demás tampones se consiguió la separación de todos los analitos, por lo que para escoger uno de ellos se siguió como criterio de selección aquel que produjera la respuesta analítica más alta (en forma de altura de pico) con una intensidad de corriente lo más baja posible. En la Tabla 35 se muestran los resultados en forma de rango de señales obtenidas para todas las sulfonamidas en estudio e intensidad de corriente para cada uno de estos tampones.

Figura 37. Optimización de la naturaleza del tampón electroforético (pH 7.3).

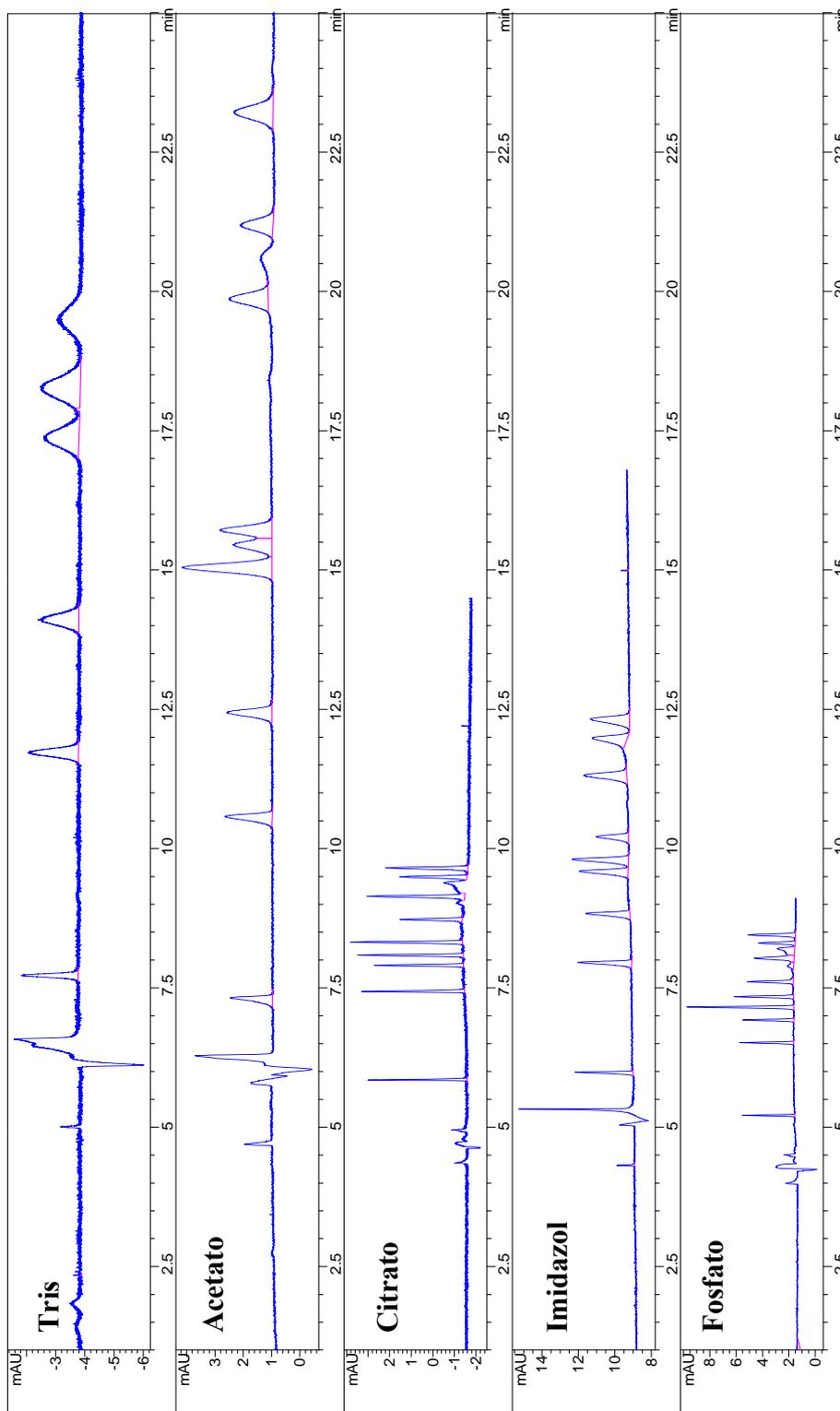


Tabla 35. Rango de señales (altura de pico) obtenidas e intensidad de corriente eléctrica producida por los distintos tampones ensayados.

Tipo de Tampón	Rango de señales (mUA)	Corriente (µA)
Cítrico/Citrato (25 mM)	5.8-3.5	67
Fosfato (50 mM)	8.9-3.5	75
Imidazol/HCl (50 mM)	4.1-3.3	21

De los tampones ensayados el primero que se descartó fue el tampón imidazol, ya que era el que producía unas señales más pequeñas, además de producir una distorsión de los espectros, lo que dificultaba la identificación de los analitos. En cuanto a los otros dos, el fosfato produjo señales más altas que el citrato y una corriente relativamente más baja, considerando que la concentración de citrato es la mitad que la de fosfato.

La conclusión de esta optimización es por tanto que el tampón dihidrógeno fosfato sódico/monohidrógeno fosfato disódico es el que mejor se ajusta a los criterios de selección establecidos: conseguir la separación de todos los compuestos, dar lugar a intensidades de señales más elevadas e intensidad de corriente aceptable.

2.3 Optimización de la concentración del tampón de separación

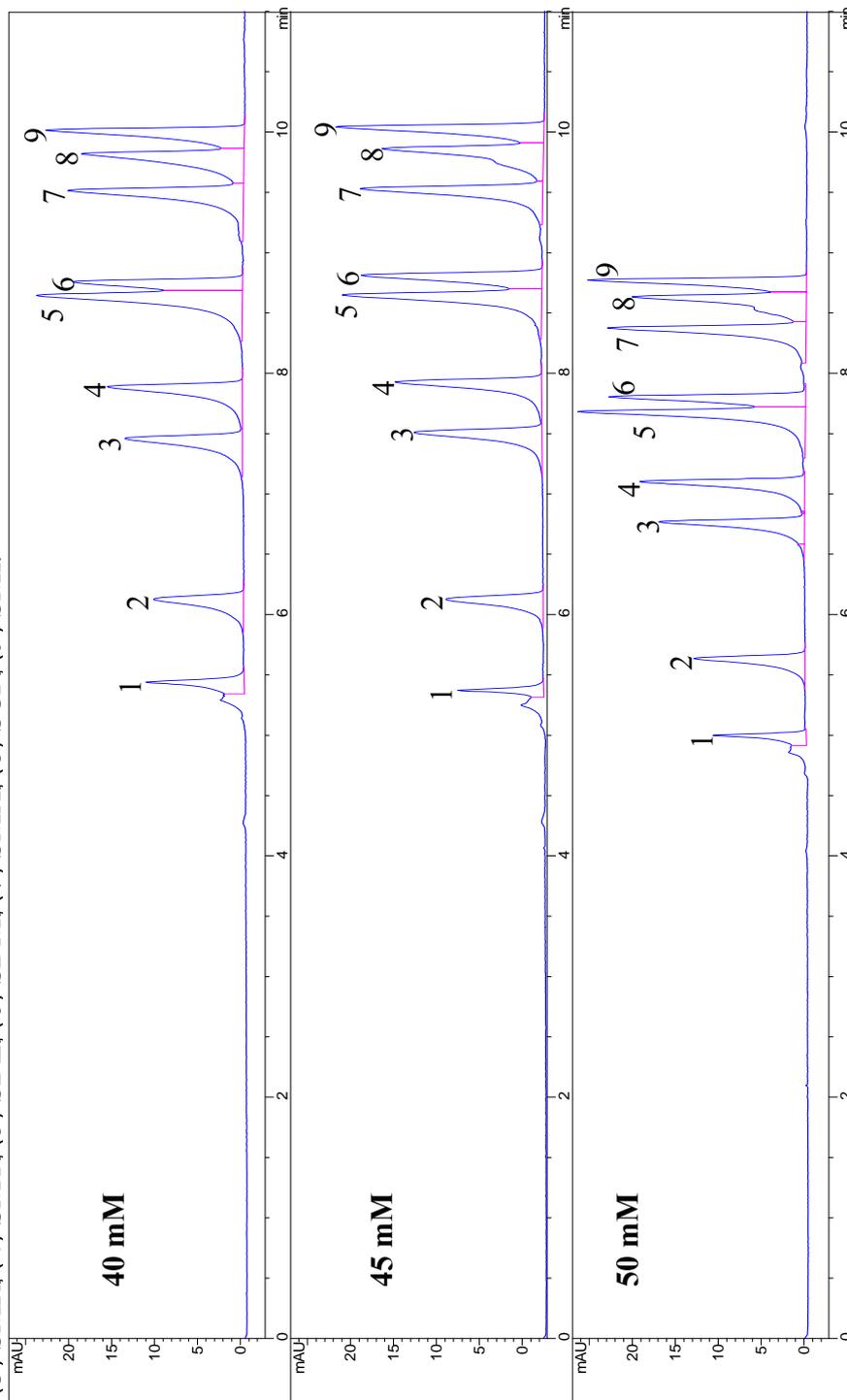
La concentración del tampón de separación fue el siguiente parámetro en estudio, y el criterio para seleccionar la más adecuada fue conseguir la mejor resolución de los analitos. Se impusieron dos limitaciones en la optimización: (i) que el tiempo de análisis no fuera excesivamente largo; y (ii) que la corriente del capilar se mantuviera dentro de unos rangos admisibles (por debajo de 120 µA).

Capítulo 4

Un parámetro importante que se modificó en esta parte de la optimización, fue el diámetro interno del capilar de separación. Hasta ahora el capilar usado era de 50 μm de i.d. y una longitud de 64.5 cm. Este capilar se cambió por un capilar burbuja (con paso extendido) de la misma longitud, pero con un i.d. de 75 μm y una ventana de detección de 200 μm . El aumento del diámetro interno del capilar provoca una pérdida de resolución entre los picos y un aumento de la corriente, pero el empleo del capilar burbuja proporciona un aumento en sensibilidad de unas 4 veces respecto al capilar de 50 μm . Es necesario aclarar que la pérdida de resolución no se debe al ensanchamiento en la ventana de detección sino al paso del capilar de 50 μm al de 75 μm .

El rango de concentraciones en las que se realizó el estudio fue de 40-50 mM. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 38. Las sulfonamidas que más problemas presentaron en su separación fueron: SDZ (pico 5) con SDM (pico 6), y SCP (pico 8) con SMI (pico 9). Tanto a la concentración de 45 mM como a 50 mM la resolución entre estos pares de picos alcanzaba el mínimo de 1.5 (1.52 y 1.56, respectivamente), pero con el tampón de 40 mM la resolución era muy baja (0.7). Finalmente se seleccionó una concentración de 45 mM, ya que la corriente producida era menor que la que producía la de 50 mM (125 y 140, respectivamente) y la resolución era adecuada.

Figura 38. Optimización de la concentración del tampón de la separación electroforética. (1) SPD, (2) SMZ, (3) SMR, (4) SMT, (5) SDZ, (6) SDM, (7) SMX, (8) SCP, (9) SMI.



Capítulo 4

Una vez definida la concentración de tampón, se probó el uso de un modificador orgánico como es el metanol para aumentar la resolución entre los picos. Así, se estudiaron porcentajes de metanol de 5, 10 y 15 % en el tampón de separación. El valor óptimo seleccionado fue 10%, ya que por debajo y por encima de este valor se solapaban completamente SDZ (pico 5) y SDM (pico 6).

Como resumen de esta etapa de la optimización:

- Se ha cambiado el capilar de 50 μm de i.d. por un capilar burbuja de 75 μm y con una ventana de detección de 200 μm , aumentándose por tanto la sensibilidad unas 4 veces.
- La concentración del tampón fosfato se ha fijado a un valor de 45 mM.
- El tampón de separación contendrá un porcentaje del 10 % de metanol como modificador orgánico.

2.4 Optimización del voltaje, temperatura y tamaño del capilar

En esta última etapa de la optimización de la separación, se comenzó optimizando el voltaje entre 20 y 30 kV. Se encontró que el valor que mejores resultados proporcionaba era el de 25 kV, ya que con este valor ni la resolución, ni el tiempo de análisis empeoraba con respecto a valores por encima o por debajo de él y sin embargo se reducía un poco la intensidad de corriente producida con respecto a 30 kV (paso de 125 a 110 μA).

El estudio de la temperatura del capilar se realizó entre 20-30 °C, con un intervalo de medida de 5 °C. Los mejores valores se obtuvieron para una temperatura de 25 °C. A continuación, se realizó un estudio más pormenorizado para valores de 25, 26, 27 y 28 °C. La decisión se tomo en base a la resolución que se producía entre los picos 5 (SDZ) y 6 (SDM), y el 8 (SCP) y 9 (SMI). La Tabla 36 contiene los valores obtenidos para cada temperatura. Como podemos comprobar la única temperatura a la que se obtiene una separación óptima es a 27 °C.

Tabla 36. Optimización de la temperatura del capilar.

Temperatura (°C)	Resolución picos 5 y 6	Resolución picos 8 y 9
25	1.16	1.05
26	1.26	1.39
27	1.54	1.52
28	1.10	1.19

Por último, se probaron dos longitudes de capilar totales, 48.5 cm y 64.5 cm. La longitud más favorable fue de 64.5 cm, ya que con 48.5 cm se presentaban dos grandes inconvenientes: no se conseguía la separación de los analitos y la corriente aumentó a valores de 240 μA .

3 DESARROLLO DEL MÉTODO DE PRECONCENTRACIÓN ONLINE

3.1 Optimización del LVSS

Considerando la baja sensibilidad de la CE empleando detección UV/Vis, el empleo directo de esta técnica para el análisis de residuos de sulfonamidas no sería adecuado para su determinación en alimentos de origen animal, ya que los límites de detección obtenidos estarían por encima de los LMRs impuestos por la legislación de la EU. Por este motivo, se ha aplicado la modalidad de LVSS con objeto de conseguir la preconcentración de la muestra en el propio capilar, mejorando la sensibilidad significativamente.

Los analitos considerados en este trabajo deben encontrarse cargados negativamente al pH del disolvente de la muestra para poder aplicar *LVSS con cambio de polaridad para aniones*. El proceso seguido en este tipo de preconcentración es el siguiente (ver Figura 9 Introducción General):

- Al inicio del análisis, se inyecta mediante presión en el capilar una gran cantidad de muestra disuelta en un disolvente de baja conductividad
- Posteriormente se aplica un voltaje de polaridad negativa con objeto de focalizar la muestra en una pequeña parte en la entrada del capilar y retirar la matriz de la misma
- Cuando los aniones están totalmente focalizados en el inicio del capilar y la mayor parte de la matriz ha sido eliminada, se para el voltaje aplicado y se cambia la polaridad. Esto se consigue cuando la corriente ha alcanzado un 95-99% del valor que presenta cuando el capilar contiene sólo tampón.
- Finalmente, se aplica voltaje con polaridad positiva con objeto de separar y detectar los analitos concentrados.

En LVSS, se han optimizado tres parámetros significativos: disolvente de la muestra, tamaño de muestra inyectada y voltaje aplicado, siendo la variable más influyente en este tipo de preconcentración el disolvente empleado, ya que se requiere una baja conductividad para conseguir una buena focalización de los analitos. Así, se estudiaron diferentes disolventes, tales como: agua, MeOH y una disolución de imidazol (10 mM, pH 9.8, con 10 % MeOH), seleccionados por su baja conductividad y por tener un pH adecuado en el que todas las sulfonamidas están cargadas negativamente [365]. No se ensayó tampón fosfato diluido como disolvente de la muestra, ya que no proporcionaba un pH adecuado para que todas las sulfonamidas estuvieran cargadas de forma negativa, y además presentaba mayor conductividad que los disolventes anteriores, disminuyendo la efectividad del LVSS. Únicamente con imidazol se obtuvieron resultados satisfactorios en el empleo del LVSS, ya que con MeOH no era posible llevar a cabo el rellenado del capilar con el tampón de separación, mientras que con el agua no era posible llevar a cabo el proceso de preconcentración para la SPD, por no estar cargada.

Con objeto de aumentar la eficacia del proceso de LVSS, se estudió la adición en el disolvente de la muestra (imidazol 10 mM) de diversos porcentajes de MeOH (0, 5, 10 y 25 %, v/v), obteniéndose los mejores resultados para un 10 % de MeOH. Por debajo del 10%, las señales analíticas fueron menores, mientras que para valores superiores, se produjo solapamiento de los picos.

Para la optimización del tamaño de muestra inyectado, se llenaron en cada experiencia diferentes porciones del capilar (50, 70, 90, 100%). Estos porcentajes se estimaron en base al diámetro y longitud del capilar y a la presión aplicada [366]. Los resultados muestran que es posible llenar el

[365] Q. Zhimin, A. Craig, *Water Research* 38 (2004) 2874.

[366] C. Cruces Blanco. "Electroforesis Capilar", Universidad de Almería, Almería, 1998, pp.113.

Capítulo 4

capilar completo mediante la aplicación de una presión de 7 bar durante 0.5 min.

El voltaje negativo aplicado para realizar la focalización de los analitos en el capilar, se estudió en el rango de -25 a -30 kV, seleccionándose un voltaje óptimo de -28 kV, que permite un llenado rápido del capilar. Valores superiores a -28 kV producían frecuentes rupturas del capilar en el extremo de salida.

Una vez seleccionados todos los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso (disolvente de la muestra: Imidazol 10 mM + 10 % de MeOH; voltaje para la focalización: -28 kV; porcentaje de muestra en el capilar: 100 %), el proceso de LVSS se completaba aproximadamente en 3.5 min, consiguiéndose una mejora de la sensibilidad de unas 15 veces respecto a una inyección hidrodinámica normal.

A continuación se muestran los óptimos obtenidos tanto para la separación como para el LVSS. Tabla 37.

Tabla 37. Tabla de óptimos la separación y el LVSS.

Capilar	64.5 cm. de longitud, 75 μ m de i.d., con una ventana de detección de 200 μ m
Tampón de separación	fosfato 45 mM con un 10% de MeOH
pH	7.3
Voltaje de separación	25 kV
Temperatura	27°C
Disolvente de la muestra para LVSS	Imidazol 10 mM con un 10% de MeOH
Voltaje para LVSS	-28 kV

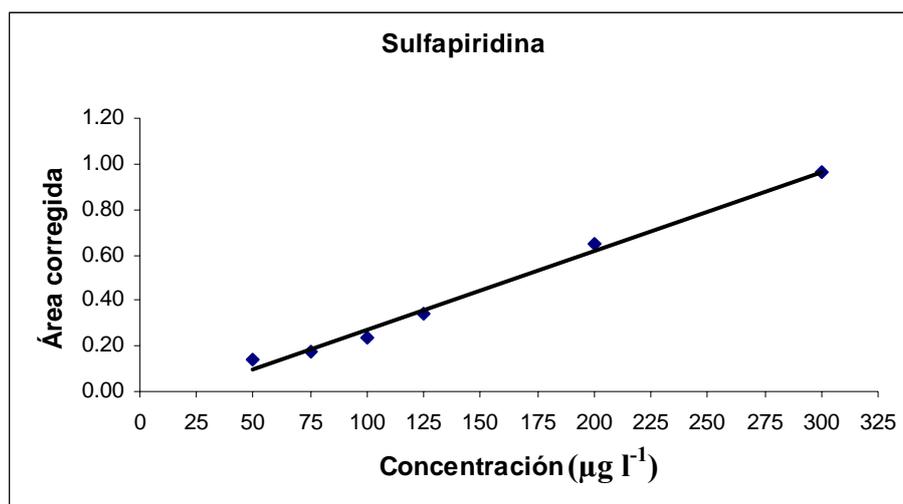
4 RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de ocho niveles de concentraciones correspondientes a 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada sulfonamida, excepto para SPD, para la que los niveles de concentración ensayados fueron de 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g l}^{-1}$.

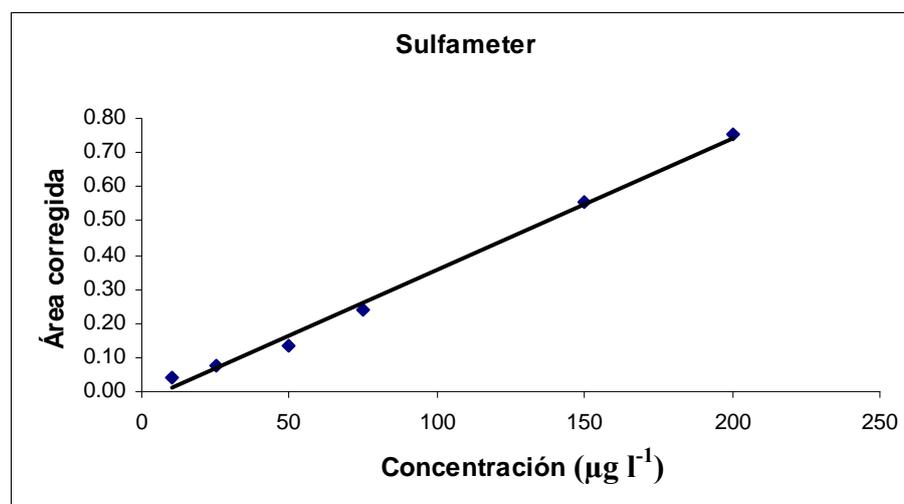
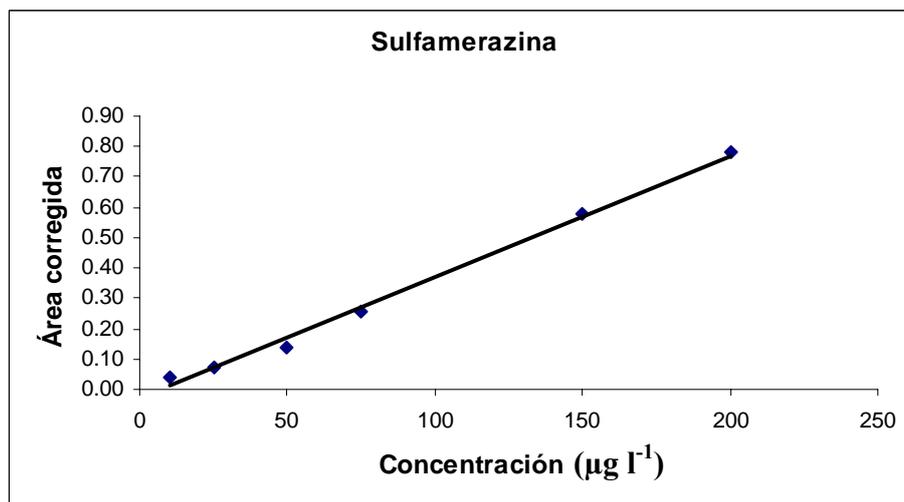
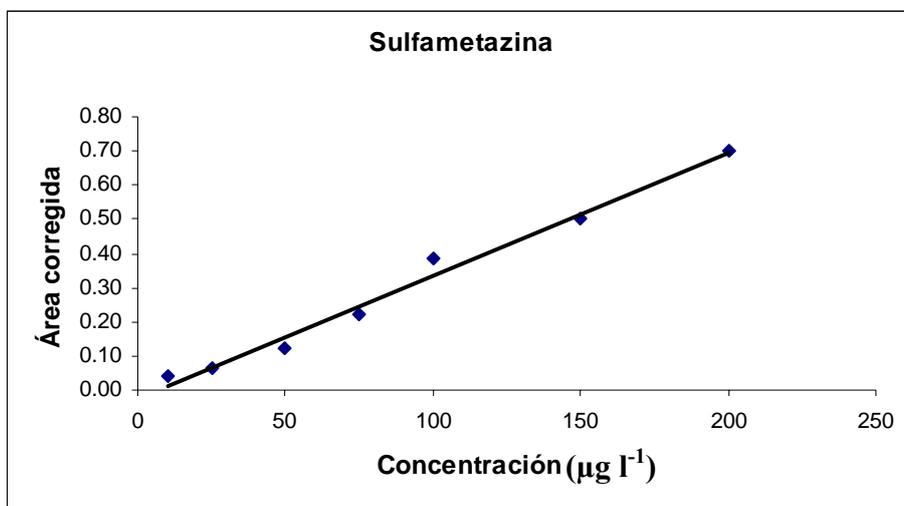
En esta parte del método se comenzó a emplear un estándar interno (IS), con objeto de conseguir una mayor reproducibilidad en las señales y en los tiempos de migración. El IS que se seleccionó fue el ácido p-aminobenzoico (PABA) y en todos los casos se emplearon 150 $\mu\text{g l}^{-1}$.

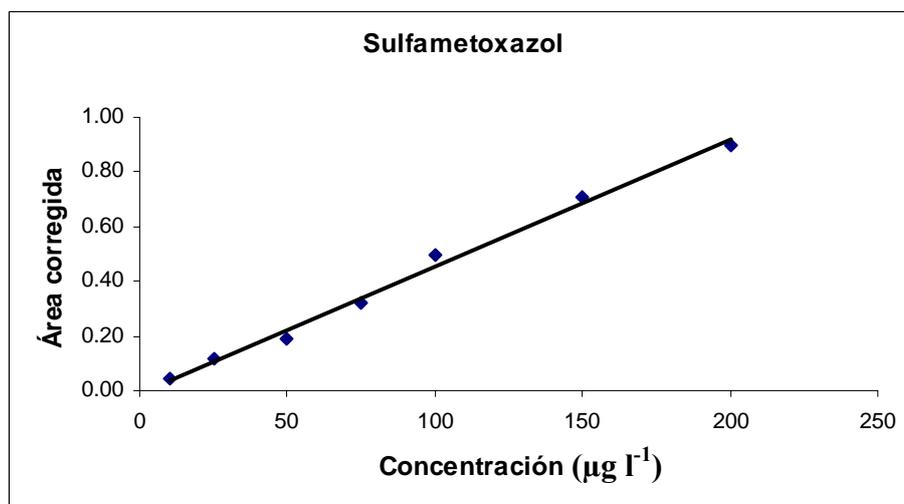
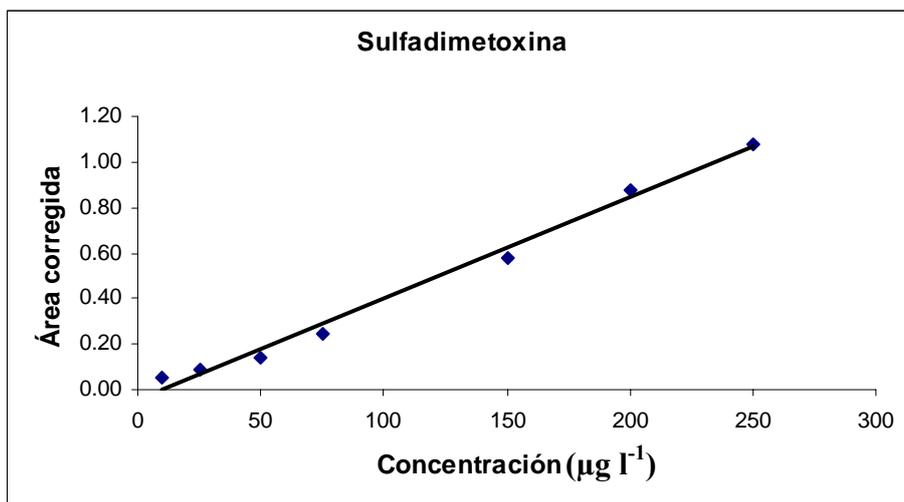
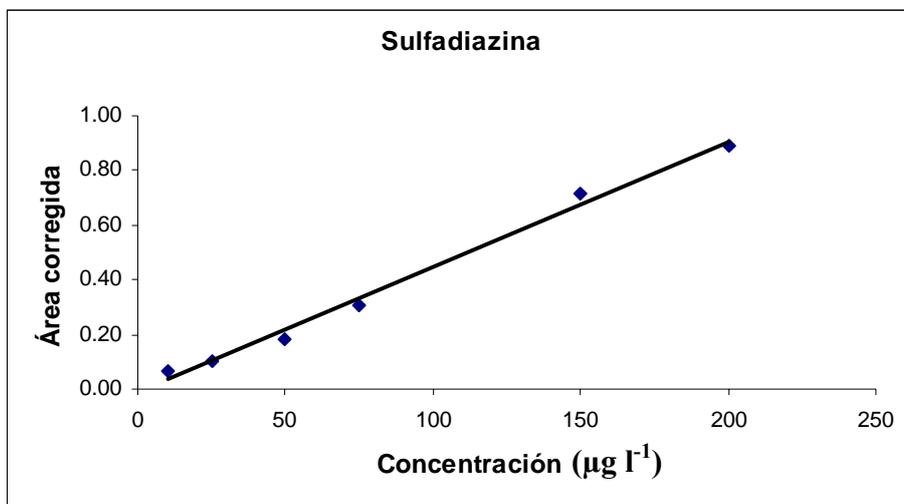
Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico relativas corregidas (relación entre el área de pico del analito entre el tiempo de migración y el área del patrón interno entre el tiempo de migración) en función de la concentración de cada analito. La representación gráfica de las rectas de calibrado se muestra en la Figura 39.

Figura 39. Rectas de calibrado de las nueve sulfonamidas determinadas.

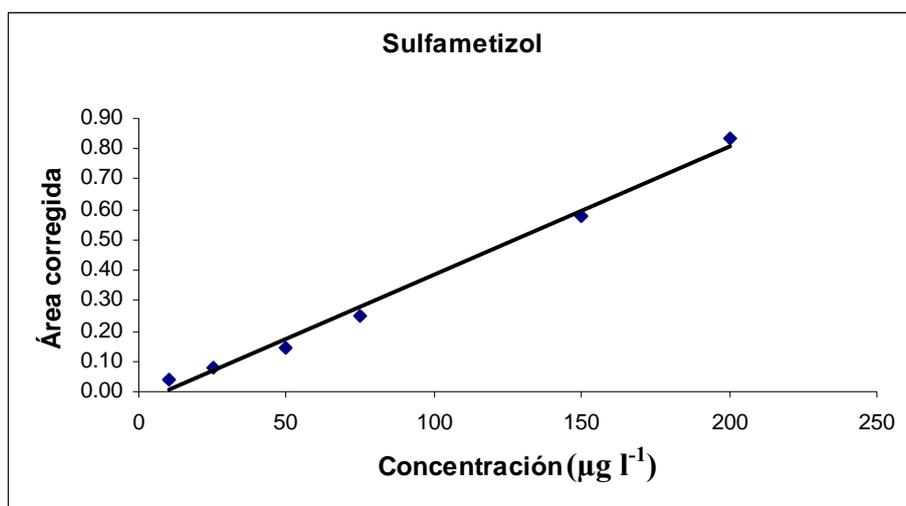
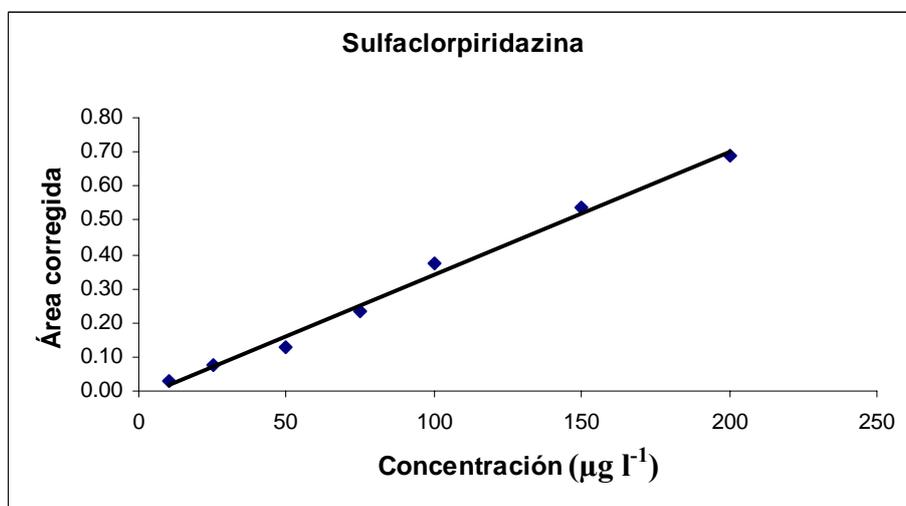


Capítulo 4





Capítulo 4



Los parámetros estadísticos calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla 38. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para las sulfonamidas son lineales en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido como recomienda la IUPAC [367], considerando el procedimiento analítico sin tener en cuenta el tratamiento previo de la muestra. Los límites obtenidos por el método son más que suficientes para poder cuantificar la cantidad de sulfonamidas correspondiente al LMR establecido por la EU ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de la suma total de sulfonamidas) [363]. Además no se ha tenido en cuenta la preconcentración obtenida en el proceso de preparación de las muestras, que haría bajar todavía más los límites reales del método para cada matriz.

Tabla 38. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto (concentración frente a áreas de pico relativas corregidas).

Analito	Rango lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Pendiente	Ordenada	R^2	LD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Precisión
SPD	26 – 300	- 0.076	0.0035	9919	22.95	25.83	4.75
SMZ	10 – 250	- 0.023	0.0036	9863	7.59	10.39	7.00
SMR	11 – 250	- 0.029	0.0040	9949	8.33	10.85	5.35
SMT	11 – 250	- 0.026	0.0039	9939	7.93	10.51	3.59
SDZ	6 – 250	- 0.013	0.0046	9920	3.68	5.87	6.24
SDM	13 – 250	- 0.045	0.0044	9906	11.19	13.48	5.87
SMX	5 – 250	- 0.008	0.0046	9936	2.59	4.78	4.24
SCP	9 – 250	- 0.019	0.0036	9926	6.50	9.30	6.51
SMI	12 – 250	- 0.038	0.0042	9922	10.00	12.40	5.53

Precisión: expresada como RSD (%) para una concentración de $20 \mu\text{g l}^{-1}$ en condiciones de repetibilidad (n=9).

[367] Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, IUPAC technical report. Pure Appl. Chem. 74 (2002) 1699.

5 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE 9 SULFONAMIDAS EN CARNE DE CERDO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado en muestras reales, se escogieron dos matrices, carne de cerdo y aguas subterráneas de un pozo situado en una explotación ganadera bovina de la provincia de Granada.

5.1 Determinación de sulfonamidas en carne de cerdo

Varias fueron las metodologías de extracción que se ensayaron antes de obtener un resultado satisfactorio. Las pruebas que se realizaron se basaron en trabajos previos sobre extracción de sulfonamidas en muestras de carne, la mayoría de ellos analizando posteriormente las muestras mediante HPLC.

La primera fue la denominada “*dispersive solid phase extraction*” (DSPE), que consiste básicamente en realizar una extracción de los analitos de la muestra con disolvente orgánico y posteriormente agregar al disolvente extractante una fase sólida que actuaría eliminando los posibles interferentes [368]. Esta metodología extremadamente fácil de realizar, no resultó útil para la aplicación propuesta, ya que daba lugar a extractos con muchos interferentes e incluso algunos de ellos con mayor conductividad que el propio tampón de separación por lo que una de las premisas básicas para poder realizar el LVSS no se cumplía.

El siguiente procedimiento ensayado se basó en una serie de extracciones: una extracción sólido-líquido seguida de cuatro extracciones líquido-líquido, con diferentes disolventes orgánicos y distintos tampones de

[368] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitroska, J. Chromatogr. A 768 (1997) 105.

diverso pH y naturaleza [369]. Este procedimiento dio lugar a extractos con muchos interferentes, además de ser muy tedioso en su realización.

El método propuesto por Stoev y *col.* [370], consistía en extraer los analitos con acetato de etilo, rotavaporar ese extracto, redisolverlo con agua y realizar una extracción líquido-líquido con cloruro de metileno desechando la parte acuosa, rotavaporar a sequedad la fase orgánica y una nueva redisolución con un tampón. Tampoco con este método se consiguieron resultados satisfactorios debido a la cantidad de interferentes presentes en los extractos y a su alta conductividad.

Asimismo, se aplicó el método oficial de la AOAC para la extracción de sulfonamidas en tejidos animales [371], que consistía en una extracción sólido-líquido seguida de cuatro extracciones líquido-líquido con diversos ajustes de pH, pero resultó ser igual de ineficaz.

Una posible explicación a los malos resultados obtenidos con estos métodos, puede ser que todos son procedimientos para muestras que posteriormente se analizaban por HPLC o por cromatografía en capa fina como era el caso del método de la AOAC. De esta forma podemos concluir que no es sencillo transferir un método de extracción optimizado para análisis mediante HPLC al análisis mediante CE, debido a que son muy distintos los principios e interacciones que caracterizan ambas técnicas, de modo que interferentes que no lo son en una pueden serlo en la otra.

Finalmente se decidió aplicar, con las correspondientes modificaciones, el método de extracción recientemente desarrollado por Fuh y *col.* [372] para la determinación de ocho sulfonamidas mediante CE, de las cuales tres (SMZ, SMR, SDZ) coinciden con las sulfonamidas que el presente método propuesto analiza. Este método se basó en una extracción sólido-líquido con acetonitrilo (ACN), que origina la extracción de gran

[369] Committee for veterinary medicinal products. Sulphonamides (2) EMEA/MRL/026/95.

[370] G. Stoev, A.I. Michailova, J. Chromatogr. A 871 (2000) 37.

[371] AOAC Official Method 983.31, Sulfonamide residues in animal tissues.

[372] Fuh, M.R.S., Chu, S.Y., Anal. Chim. Acta 499 (2003) 215.

Capítulo 4

cantidad de sustancias endógenas de la carne y el posterior uso de la SPE para limpiar los extractos y preconcentrar la muestra. Para ello se utilizaron dos tipos de cartuchos: Alúmina N, que es un adsorbente polar y Oasis HLB que presenta como empaquetamiento un co-polímero macroporoso con funciones hidrofílicas y lipofílicas.

Tras las correspondientes modificaciones para conseguir la extracción de todas las sulfonamidas en estudio, el método finalmente empleado, partiendo de una muestra libre de sulfonamidas, se presenta en el siguiente esquema:

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS EN CARNE

1) Fortificar 3 g de carne y colocarlos en un tubo de centrifuga (40 ml)

- Añadir 20 ml de ACN
- Agitar 2 min

2) SPE: 20 ml de Extracto en ACN

- Acondicionado cartucho:
3ml H₂O + 3 ml ACN
- Pasar el extracto por un
Cartucho Alúmina N 500 mg
- Lavar con 5 ml ACN/H₂O (80/20)

3) 25 ml de Extracto en ACN

- Rotavaporar a casi sequedad
- Reconstituir en 10 ml de H₂O
mediante agitación (2 min)

4) SPE: 10 ml de extracto en H₂O

- Acondicionado cartucho:
2ml MeOH + 2ml H₂O
- Pasar el extracto por un
Cartucho HLB 60 mg
- Eluir con 3 ml de MeOH

5) 3 ml de MeOH

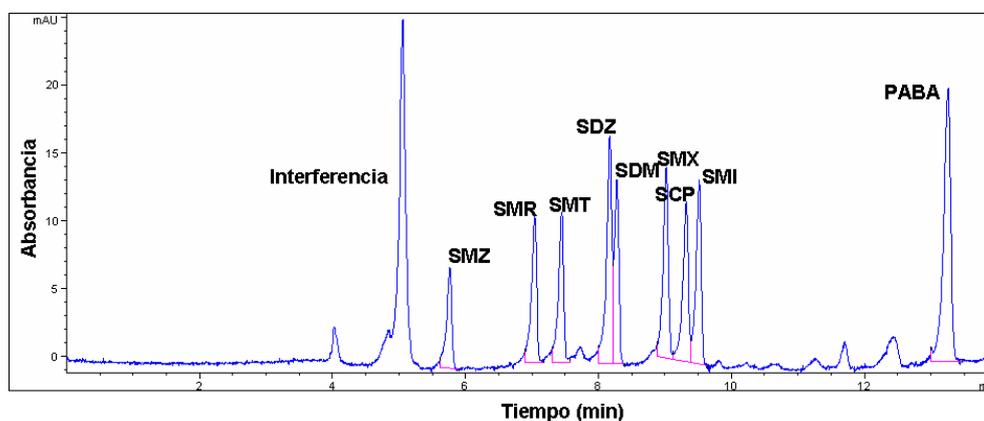
- Secar con Nitrógeno a 50 °C

**6) Reconponer con 750 µl de Imidazol 10 mM (10% MeOH)
y 150 µg l⁻¹ IS, agitar 2 min**

Capítulo 4

El uso de este procedimiento posibilitó la extracción de las sulfonamidas de la carne de forma cuantitativa. El único inconveniente, que podemos ver en la Figura 40, donde se muestra un electroferograma de una muestra de carne de cerdo dopada con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada sulfonamida, es que aparece un interferente al mismo tiempo que la SPD, por lo que ésta no pudo determinarse en carne de cerdo.

Figura 40. Electroferograma de una muestra de carne de cerdo dopada con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada sulfonamida.



El análisis de un blanco de carne, mostró que no había residuos previos de los analitos en la misma.

Con objeto de validar el método propuesto para su aplicación en carne, se realizaron estudios de recuperación, añadiendo sulfonamidas a muestras de carne de cerdo libres de las mismas. Las muestras de carne se doparon con una mezcla de las ocho sulfonamidas (SMZ, SMR, SMT, SDZ, SDM, SMX, SCP y SMI) a diferentes niveles de concentración (50 , 100 , $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada una), seleccionados de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Europea relativas a la monitorización de

fármacos [373]. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. La identificación de las sulfonamidas se basó tanto en los tiempos de migración como en sus espectros de absorción. Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 39. Como puede observarse, el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas.

Tabla 39. Recuperaciones obtenidas en muestras de carne de cerdo dopadas a distintos niveles de concentración de sulfonamidas.

(n = 9)	SMZ	SMR	SMT	SDZ	SDM	SMX	SCP	SMI
Añadido	50 µg l⁻¹							
R (%)	83.9	94.8	83.8	98.7	90.2	93.3	96.2	87.1
RSD	6.0	4.9	3.9	4.8	8.6	7.6	3.7	4.7
Añadido	100 µg l⁻¹							
R (%)	95.8	98.0	94.0	99.3	96.3	95.1	98.0	81.2
RSD	3.5	2.9	4.8	3.6	3.8	5.0	3.8	9.4
Añadido	150 µg l⁻¹							
R (%)	98.0	97.3	97.6	98.0	93.0	93.2	90.9	96.3
RSD	3.7	2.5	4.0	3.6	8.6	6.2	6.5	8.4

[373] European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, OJ L, 2002, p.221.

Capítulo 4

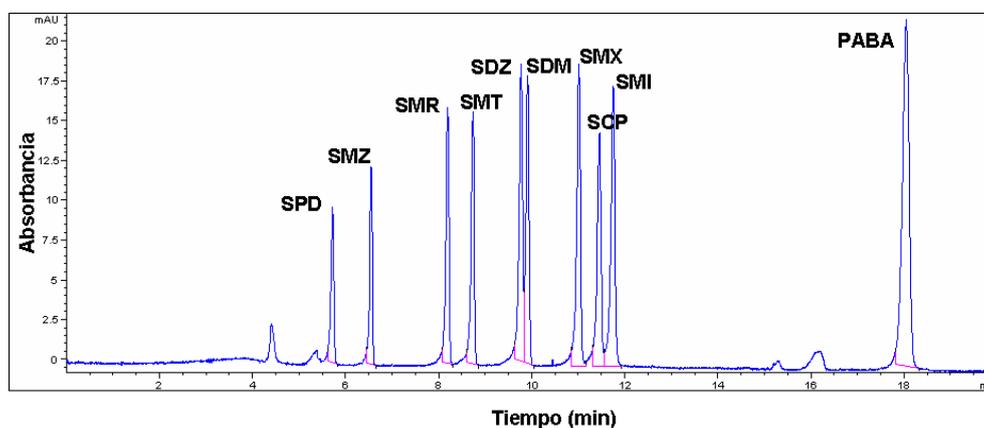
5.2 Determinación de sulfonamidas en aguas subterráneas

Un gran problema medioambiental que se plantea es la filtración de residuos de fármacos utilizados en ganaderías o piscifactorías a acuíferos naturales provocando su contaminación. Por ello y con objeto de demostrar la validez del método propuesto en el control de residuos de sulfonamidas en aguas, se tomaron muestras de agua de un pozo situado en una explotación ganadera bovina en la que se emplean estos compuestos para el tratamiento de los animales, con objeto de comprobar si el agua estaba contaminada con estos antibióticos.

El procedimiento para la extracción de las sulfonamidas del agua fue mucho más sencillo que para la carne. Así, el método era el mismo usado en el apartado anterior pero sólo desde la etapa 4. Sólo se llevó a cabo una modificación que consistió en el acondicionamiento del cartucho HLB, que se realizó con 3 ml de MeOH y 3 ml de ácido acético al 50%, pH 3.

Las muestras de aguas subterráneas se doparon con una mezcla de las nueve sulfonamidas (SPD, SMZ, SMR, SMT, SDZ, SDM, SMX, SCP y SMI) a diferentes niveles de concentración (5, 20, 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada una) seleccionados en base a las bajas concentraciones a las que es posible encontrar estos compuestos en este tipo de muestras. Cada nivel se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Previamente se analizó un blanco de esta agua y el electroferograma obtenido no mostró restos de ninguna sulfonamida. Asimismo, tal y como se puede comprobar en la Figura 41, en el caso del agua no aparece ningún interferente y por lo tanto se pudo cuantificar la SPD.

Figura 41. Electroferograma de una muestra de agua subterránea dopada con $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada sulfonamida.



Las recuperaciones medias obtenidas se muestran en la Tabla 40, siendo estas satisfactorias y demostrando la idoneidad del método propuesto para el control de tales residuos en aguas.

Tabla 40. Recuperaciones obtenidas en muestras de aguas subterráneas dopadas a distintos valores de concentración de sulfonamidas.

(n = 9)	SPD	SMZ	SMR	SMT	SDZ	SDM	SMX	SCP	SMI
Añadido	$5 \mu\text{g l}^{-1}$								
R (%)	89.2	91.9	92.8	97.4	94.7	90.7	93.6	98.2	75.6
RSD	8.8	7.7	7.6	3.4	8.6	7.2	4.7	4.5	6.8
Añadido	$20 \mu\text{g l}^{-1}$								
R (%)	98.0	96.1	99.4	98.8	98.6	95.9	100.3	96.9	96.7
RSD	3.0	5.0	2.4	2.8	3.1	3.0	1.3	2.6	3.5
Añadido	$50 \mu\text{g l}^{-1}$								
R (%)	98.9	98.8	98.5	98.7	99.1	99.0	99.3	98.9	98.5
RSD	1.0	1.5	0.9	2.1	1.4	1.8	1.1	1.3	1.5

DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS

Y TMP MEDIANTE

CE-MS Y CE-MS/MS

EN CARNE DE TERNERA Y AGUA

1 INTRODUCCIÓN

Con objeto de cumplir con los requisitos establecidos por la EU en cuanto a métodos de confirmación para el análisis de residuos de antibióticos en alimentos, en este capítulo de la Memoria se propone un método para la identificación y cuantificación de diez sulfonamidas (sulfapiridina (SPD), sulfadoxin (SDX), sulfametazina (SMZ), sulfadimetoxina (SDM), sulfameter (SMT), sulfamerazina (SMR), sulfaclopiridazina (SCP), sulfadiazina (SDZ), sulfametizol (SMI), sulfametoxazol (SMX)) y trimetoprim (TMP) en muestras de carne de ternera y aguas subterráneas, mediante Electroforesis Capilar con detección por Espectrometría de Masas (CE-MS) y Espectrometría de Masas en tandem (CE-MS/MS).

Para el desarrollo de este método se siguieron los siguientes pasos:

- * OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA
- * OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE MS Y MS/MS
- * RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD
- * APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE LAS 10 SULFONAMIDAS Y EL TRIMETOPRIM EN CARNE DE TERNERA Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

2 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

La primera parte del desarrollo de este método consistirá en la optimización de la separación electroforética. Para ello, se monitorizará el espectro UV-visible de los analitos a separar. Se empleará un capilar de separación de 96 cm de longitud y 50 μm de i.d. Este capilar será igual que el que se utilice posteriormente cuando se realice el acoplamiento al espectrómetro de masas, con la salvedad de que en este capilar se practicará una ventana para monitorizar el espectro UV/Vis. En este estudio se empleará una disolución de 10 mg l⁻¹ de cada uno de los analitos disueltos en metanol.

2.1 Optimización del pH del tampón de separación

Con esta optimización se pretende conseguir una resolución lo más satisfactoria posible de los analitos en estudio. La principal premisa a la hora de comenzar la optimización del pH consiste en seleccionar una naturaleza del tampón para llevar a cabo la separación electroforética que sea compatible con el posterior acoplamiento a la detección por MS; por lo tanto únicamente se podrán usar tampones volátiles y que mantengan la corriente por debajo de 50 μA , ya que si no es así se podrían producir oclusiones o descargas en la interfase, además, valores de corriente inferiores reducen el riesgo de ensanchamiento de picos debido al efecto Joule incluso cuando el capilar no está adecuadamente termostaticado cerca o dentro del nebulizador [374].

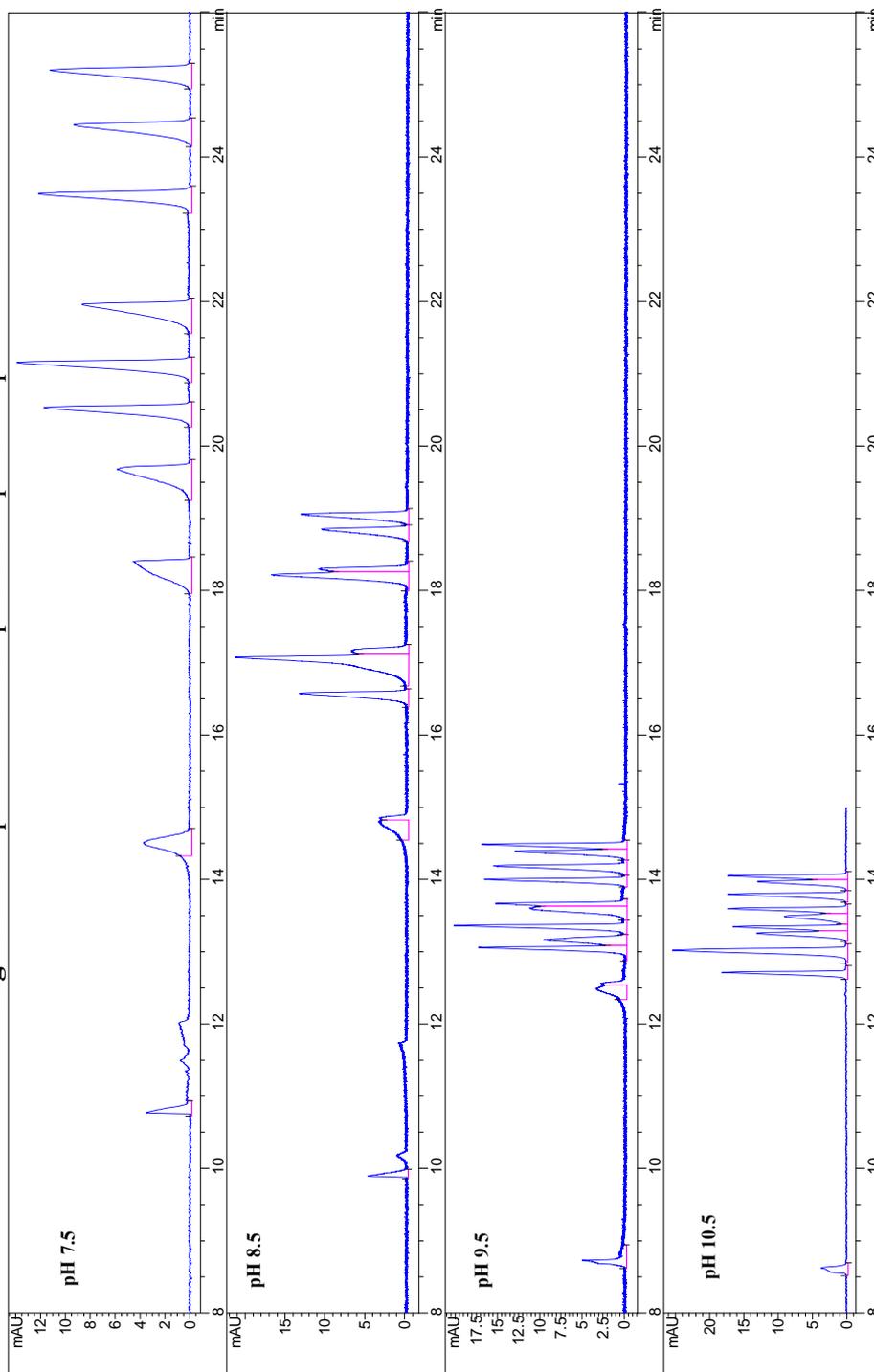
Considerando este hecho se escogió como tampón compatible para realizar este estudio acetato amónico/amoniaco. Para realizar la optimización del pH se estudió el rango comprendido entre 7.5-10.5, usando acetato amónico 50 mM y ajustando el pH con NH₃ 1 N. Se escogió este

[374] J. Ohnesorge, C. Neüsuß, H. Wätzig, *Electrophoresis* 26 (2005) 3973.

intervalo basándose en el capítulo anterior de la presente memoria, en el que se comprobó que la mejor separación se obtenía a valores neutros y/o alcalinos. Para este estudio los demás parámetros de la separación se fijaron en los siguientes valores:

Voltaje: 30 kV; temperatura: 25°C e inyección hidrodinámica, aplicando una presión de 50 mbar durante 5 s. El capilar empleado fue el anteriormente descrito, monitorizándose la señal a $\lambda = 256$ nm.

Figura 42. Optimización del pH del tampón de separación.



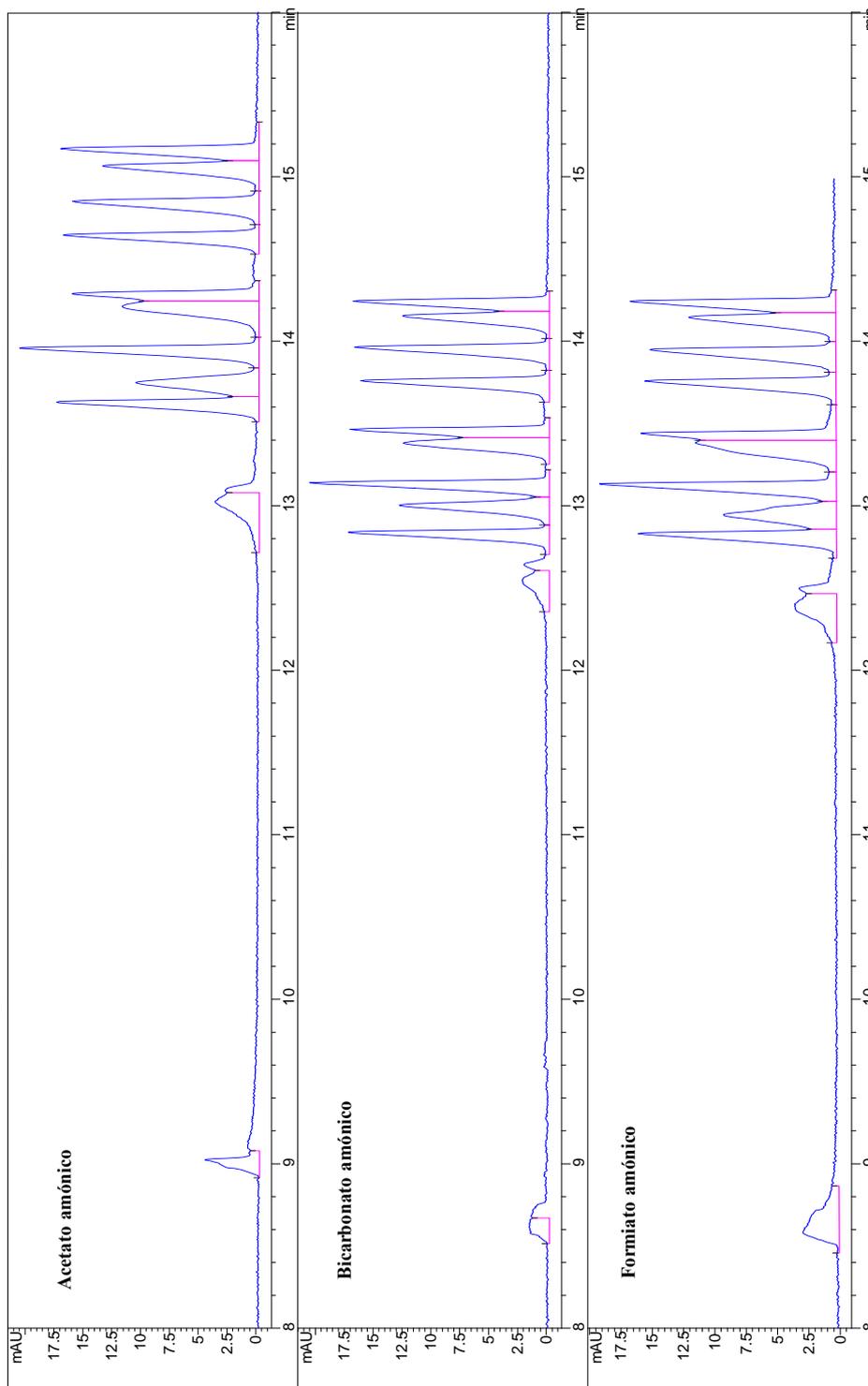
En la Figura 42 se muestran los distintos electroferogramas recogidos para cada uno de los pH ensayados. A valores de pH de 7.5, 8.5 y 10.5 existe solapamiento en los picos correspondientes a algunos analitos. Además, a pH 7.5 no se consigue una buena reproducibilidad en las señales. De ahí que el pH seleccionado en este caso será 9.5, con el que se consigue la mejor resolución de los 11 analitos en un menor intervalo de tiempo.

Una vez elegida una zona de estudio de pH, se prosiguió con su optimización en una región experimental más acotada con el fin de obtener un valor óptimo mejor delimitado. Para ello se estudió el rango de pH comprendido entre 9.3-9.7, con incrementos de 0.1 unidades de pH y manteniendo constantes todos los demás parámetros. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que en este rango de pH, la resolución entre los analitos no variaba de forma significativa, por lo que se mantuvo 9.5 como pH óptimo.

2.2 Optimización de la naturaleza del tampón de separación

Una vez optimizado y fijado el pH en un valor de 9.5, se procedió a la optimización de la naturaleza del tampón de separación. Debido a la restricción que de que sólo se puedan emplear tampones volátiles para el acoplamiento CE-MS, las naturalezas ensayadas únicamente fueron tres: formiato amónico/amoniaco, acetato amónico/amoniaco y bicarbonato amónico/amoniaco. La concentración elegida para todos los tampones fue de 50 mM y se usó NH_3 1N para ajustar el pH al valor requerido. Las demás condiciones de medida son las mencionadas anteriormente. En la Figura 43 se pueden observar los electroferogramas resultantes.

Figura 43. Optimización la naturaleza del tampón de separación.



Como se puede comprobar en los electroferogramas, los mejores resultados se obtienen con el acetato amónico y con el bicarbonato amónico. Ambos daban lugar a resoluciones entre picos de los compuestos en estudio muy parecidas. La elección se realizó en base a la reproducibilidad de la separación. Basándonos en este criterio, el tampón elegido fue el acetato amónico, que producía una separación aceptable de los analitos y una mayor reproducibilidad respecto a los demás tampones ensayados.

2.3 Optimización de la concentración del tampón de separación

La optimización de la concentración del tampón de separación se lleva a cabo para mejorar la resolución de los seis analitos que se encontraban peor separados, buscando una solución de compromiso. Por tanto, la resolución de estas tres parejas de picos será el parámetro en el que se base la elección de la concentración más adecuada.

Se impusieron dos limitaciones: (i) que el tiempo de análisis no fuera excesivamente largo; y (ii) que la corriente se mantuviera por debajo de 50 μA .

Las concentraciones que se ensayaron fueron 50,60,70,80 y 90 mM de acetato amónico, ajustado a pH 9.5 con NH_3 1 N.

Tabla 41. Optimización de la concentración del tampón de separación.

Concentración (mM)	50	60	70	80	90
Corriente (μA)	32	37	45	52	60
Resolución picos 3 y 4	1.01	1.08	1.79	1.13	1.19
Resolución picos 6 y 7	0.60	0.61	0.92	0.69	0.73
Resolución picos 10 y 11	1.05	1.15	1.36	1.43	1.54

Capítulo 5

En la Tabla 41 se muestran los valores de la corriente producida por el tampón y la resolución de los picos escogidos. Como se puede ver, la concentración de 70 mM es la que mejores resultados proporciona, sin llegar a sobrepasar el límite impuesto de 50 μA de intensidad de corriente.

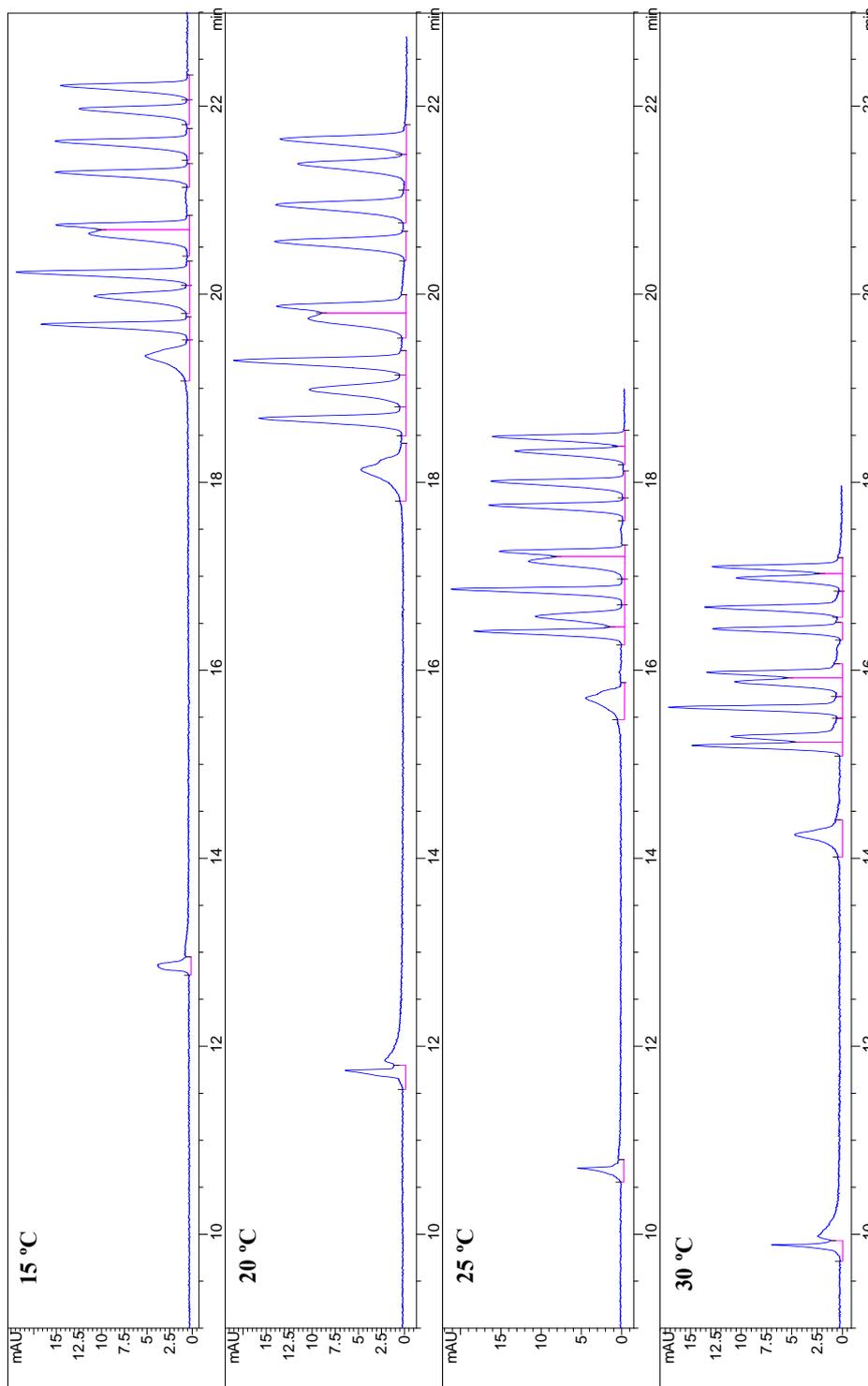
Una vez elegido el tampón se probaron modificadores orgánicos para ver si se obtenía una mejor resolución entre los analitos. Los modificadores que se ensayaron fueron el acetonitrilo y el metanol. Sin embargo se optó por trabajar sin modificador, ya que éstos producían solapamientos de la mayoría de los picos.

2.4 Optimización del voltaje de separación y temperatura del capilar

En esta etapa se comenzó optimizando el voltaje, variando el valor de este parámetro entre 26 y 30 kV, con intervalos de 2 kV. Se encontró que el valor que mejores resultados proporcionaba era el de 28 kV. Con este valor no se observaron diferencias significativas ni en los tiempos ni en las resoluciones, y sin embargo se reducía la intensidad de corriente hasta 42.5 μA .

El estudio de la temperatura del capilar se realizó entre 15-30 $^{\circ}\text{C}$, con un intervalo de medida de 5 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados se muestran en la Figura 44. Se seleccionó una temperatura de trabajo de 20 $^{\circ}\text{C}$, ya que se obtenía una mejor resolución con un tiempo de análisis satisfactorio.

Figura 44. Optimización la temperatura del capilar de separación.



Capítulo 5

A continuación se muestran los valores óptimos finales para la separación electroforética:

- * Tampón de separación: acetato amónico/amoniaco
- * pH del tampón de separación: 9.5
- * Concentración del tampón de separación: 70 mM
- * Voltaje: 28 kV
- * Temperatura: 20 °C
- * Capilar: 96.5 cm. de longitud, 50 μm de i.d.

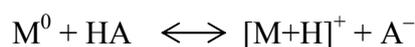
3 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DE CE-MS y CE-MS/MS

Una vez optimizada la separación de los analitos propuestos para el análisis, se procedió a la optimización de los parámetros concernientes al acoplamiento CE-MS utilizando la ionización por electrospray (ESI), empleando una disolución de 10 mg l⁻¹ para cada uno de los analitos, disueltos en el tampón de separación. Los pasos seguidos durante la optimización se describen a continuación:

- Elección del modo de trabajo en MS: polaridad + (ESI +) o polaridad - (ESI -)
- Elección de la composición del líquido adicional y delimitación del dominio experimental de las variables que afectan al líquido adicional
- Realización de un diseño de diagnóstico para la selección de las variables significativas del electrospray que afectan a la respuesta analítica
- Optimización de las variables significativas de la etapa anterior
- Optimización de otros parámetros

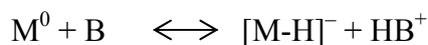
3.1 Elección del modo de ionización por electrospray (ESI +, ESI -)

Las sulfonamidas, como se vio en el capítulo anterior, poseen dos centros de ionización (Capítulo 4, Figura 1), uno de ellos tiene carácter básico, y es capaz de aceptar un protón en un medio más ácido:



El otro centro tiene un carácter más ácido y por lo tanto tiene tendencia a ceder protones en un medio básico:

Capítulo 5



Debido a esta característica, es posible determinar las sulfonamidas en CE-MS tanto en un modo de polaridad positiva (ESI+) como en un modo de polaridad negativa (ESI-).

Para poder usar el modo ESI+ es necesario que los analitos estén disueltos en disoluciones ácidas. Generalmente las que mejores resultados producen son aquellas que contienen ácidos débiles como fórmico, acético o propiónico, ya que los ácidos fuertes, como el ácido trifluoroacético (TFA) o el ácido clorhídrico, no son adecuados debido a la formación de pares iónicos con los analitos catiónicos, reduciendo la concentración de ión analito.

Para el modo ESI-, las disoluciones que mejores resultados producen son las sales de amonio y otras bases volátiles.

A partir de estas consideraciones se procedió a la selección del modo en el que se producían mejores resultados.

Para probar el modo ESI+ se usó una composición del líquido adicional consistente en ácido fórmico:isopropanol:H₂O (1:50:49 v/v/v) y para el modo ESI-, la composición del líquido adicional fue NH₃:isopropanol:H₂O (1:50:49 v/v/v). Las condiciones para la separación en CE fueron los óptimos descritos anteriormente. Los parámetros iniciales usados en MS fueron:

- Presión del nebulizador: 5 psi
- Caudal del gas de secado: 6 l min⁻¹
- Temperatura del gas de secado: 150 °C
- Masa objetivo: 280 m/z
- Objetivo: 30000
- Rango de masas monitorizado: 245-320
- Tiempo de acumulación: 200 ms
- Medias: 2

Estos parámetros se mantuvieron a lo largo del proceso previo al diseño de optimización.

En las Figuras 45 y 46 se puede ver que el modo ESI+ produce mejores resultados que ESI-, ya que la intensidad de las señales que produce es muy superior. Además, sólo en el modo ESI+ aparecen todos los analitos en estudio, mientras que en el modo ESI- hay 3 compuestos que no aparecen. Por lo tanto será el modo ESI+ el seleccionado.

Figura 45. Modo de detección MS en polaridad positiva (ESI+) (1: TMP; 2: SPD 3: SDX; 4: SMZ; 5: SDM; 6: SMT; 7: SMR; 8: SCP; 9: SDZ; 10: SMX; 11: SMI).

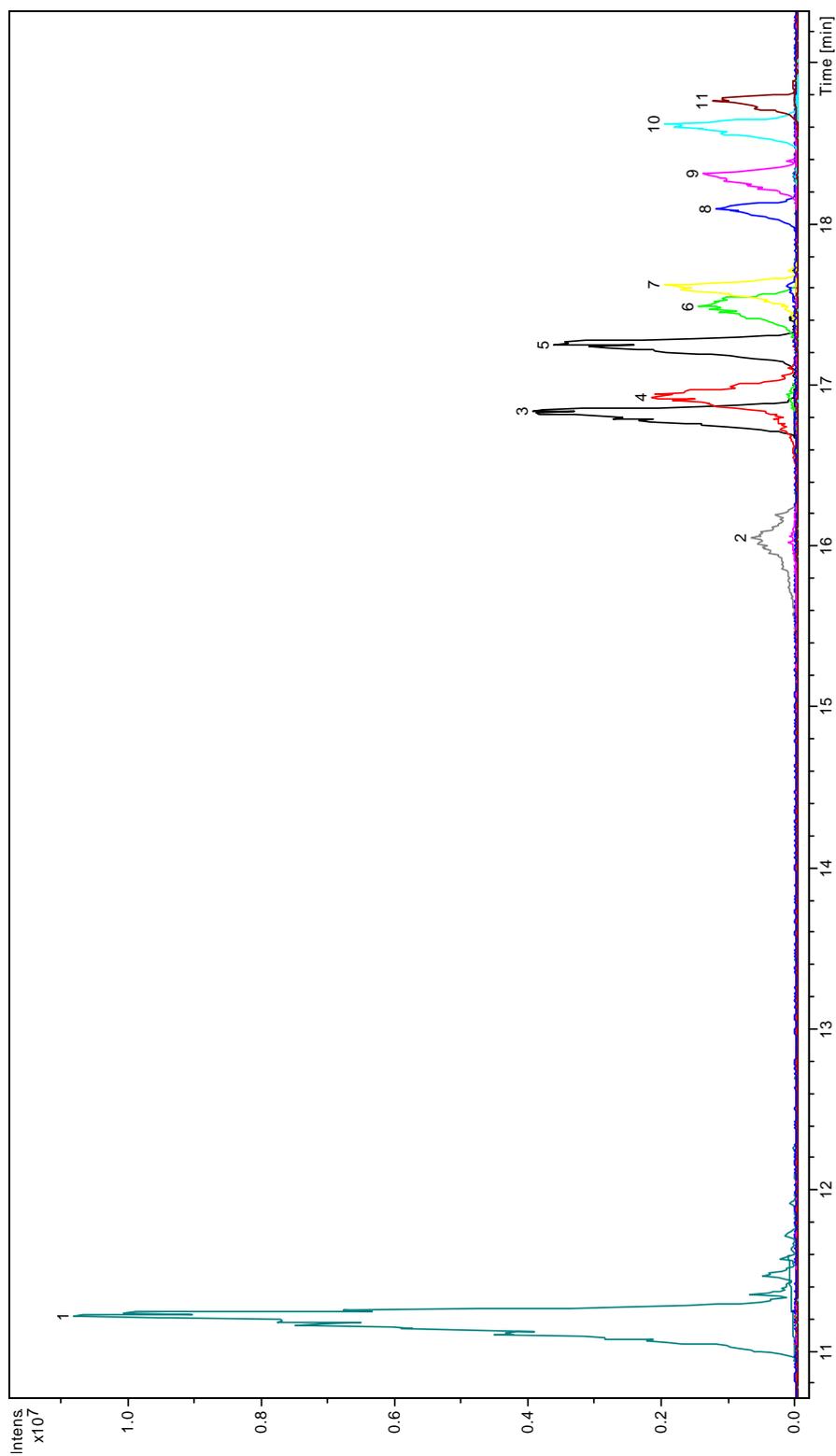
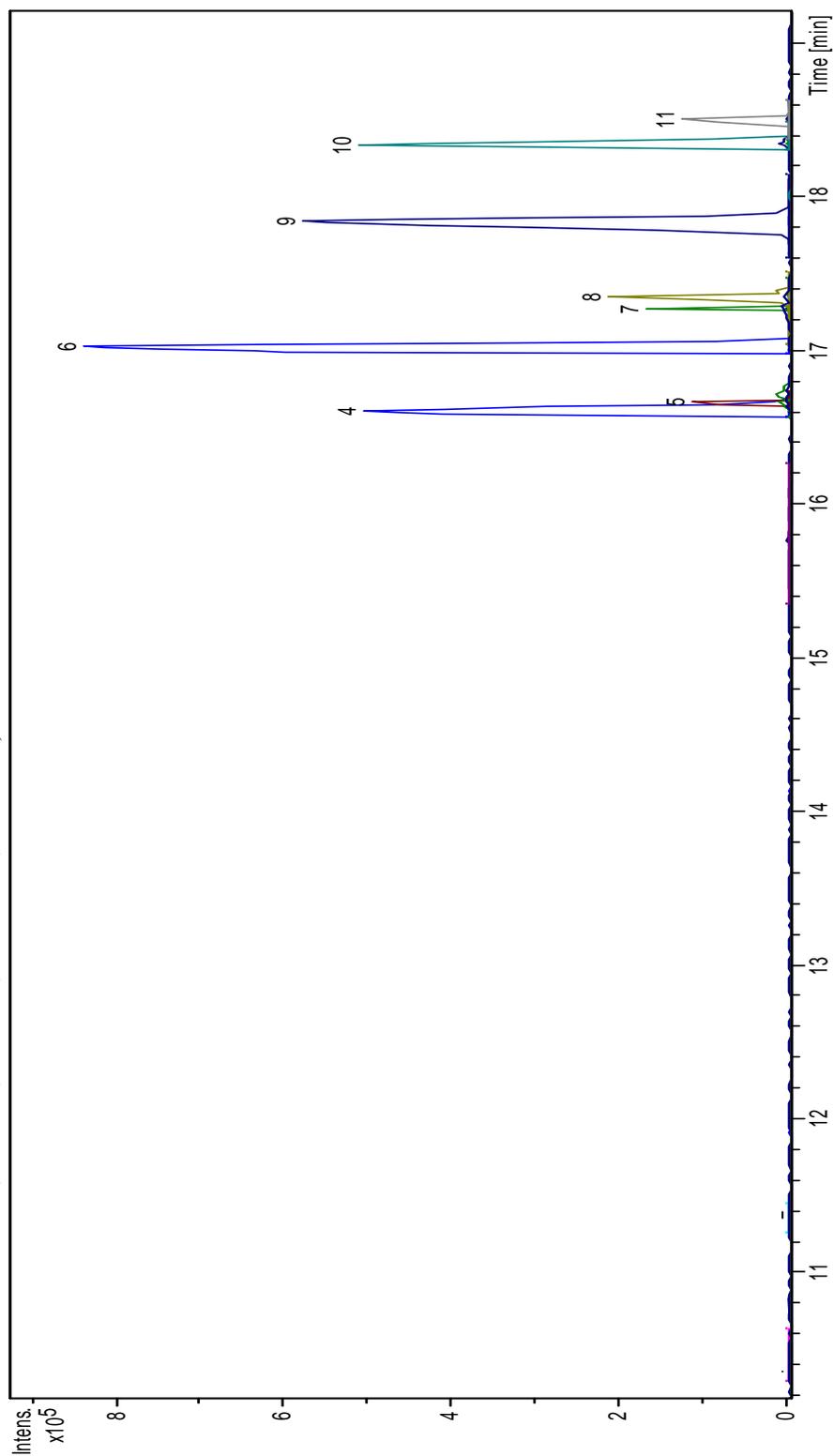


Figura 46. Modo de detección (MS) en polaridad negativa (ESI-) (4: SMZ, 5: SDM, 6: SMT; 7: SMR; 8: SCP; 9: SDZ; 10: SMX; 11: SMI).



3.2 Optimización del líquido adicional

Uno de los parámetros más influyentes en el acoplamiento CE-MS es la elección del líquido adicional. Como ya se ha mencionado en la introducción, este va a cumplir tres funciones: aumentar el flujo del capilar de CE (del orden de los nl min^{-1}) facilitando el acoplamiento CE-MS y dando lugar a la formación de un electrospray estable (la interfase ESI requiere flujos del orden de los ml min^{-1}), cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar y finalmente facilitar la ionización de las moléculas de los analitos; en nuestro caso, con el líquido adicional cambiaremos la carga de las sulfonamidas, que se separan como aniones y se detectarán mediante MS como cationes.

En primer lugar, se seleccionó el tipo de ácido y el tipo de disolvente orgánico que componían el líquido adicional, tomando como criterio de selección la relación S/N. Para este estudio se emplearon dos ácidos: ácido fórmico y ácido acético, manteniendo las proporciones del líquido adicional mencionadas anteriormente (ácido:isopropanol:H₂O (1:50:49 v/v/v)). Los resultados mostraban que el ácido fórmico daba lugar a mejores resultados, tal y como se muestra en la Figura 47, usando una disolución de 10 mg l^{-1} mezcla de todos los analitos en estudio.

Tras escoger el ácido, como posibles disolventes orgánicos para el líquido adicional, se probaron los siguientes: isopropanol, metanol y acetonitrilo, todos ellos a un 50%. Los resultados se muestran en la Figura 48, observándose que, con mucha diferencia, es el isopropanol con el que se conseguían los mejores resultados. Esto es debido a que el isopropanol muestra una mayor eficiencia en la ionización y una inferior cantidad de impurezas.

Figura 47. Influencia sobre S/N del tipo de ácido en el líquido adicional.

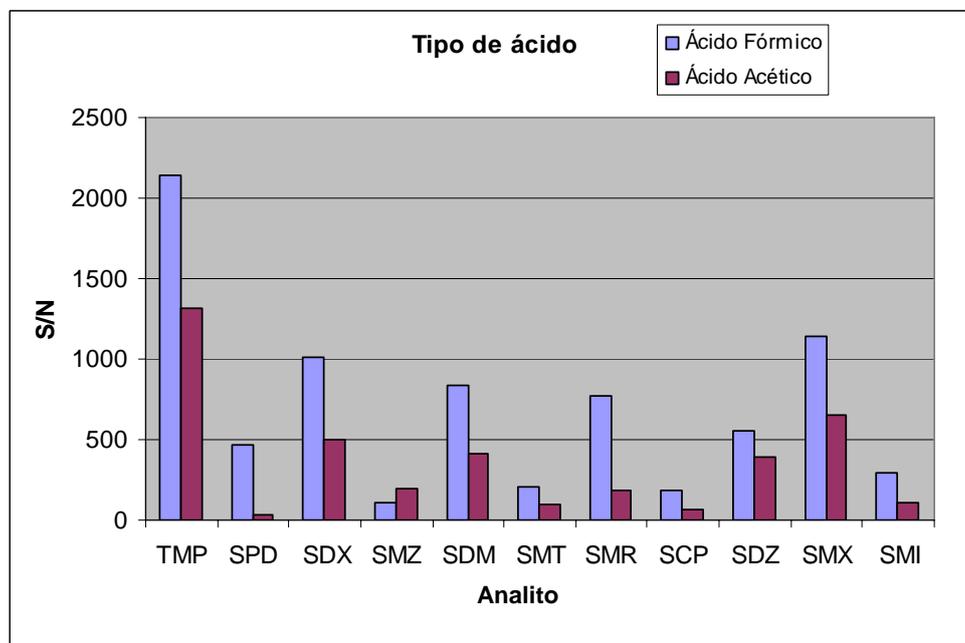
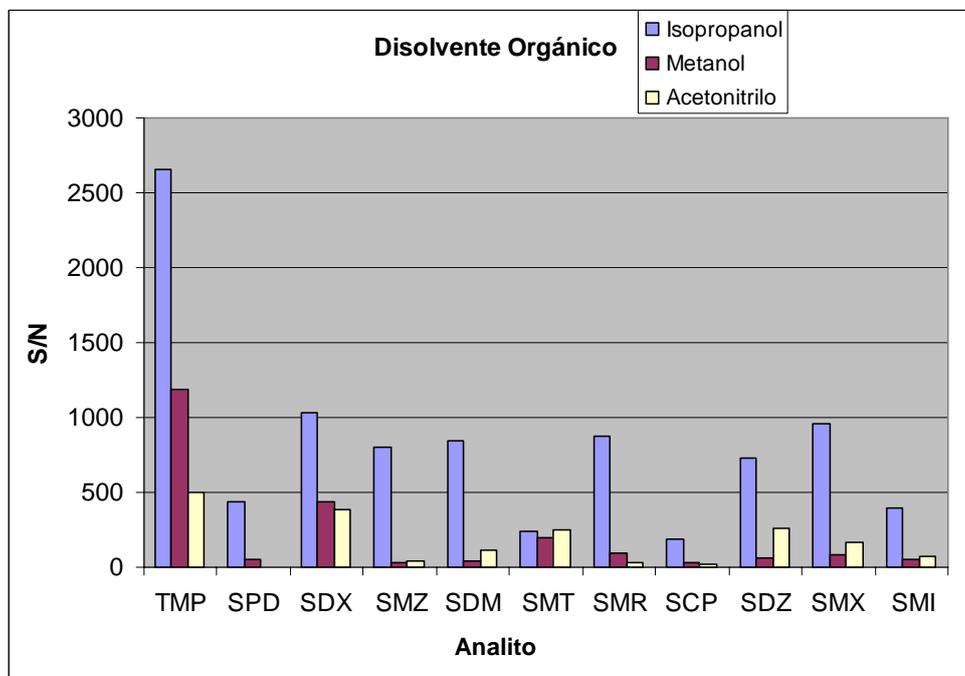


Figura 48. Influencia sobre S/N del disolvente orgánico del líquido adicional.



Capítulo 5

Una vez seleccionados los componentes del flujo adicional, se procedió a realizar una optimización más exhaustiva del mismo con objeto de conseguir la mayor eficacia en la ionización y una estabilidad adecuada del spray. En primer lugar, se realizó un estudio preliminar con objeto de delimitar el dominio experimental a estudiar de las variables del flujo adicional más influyentes en la determinación CE-MS (porcentaje de ácido fórmico, porcentaje de isopropanol y caudal del líquido adicional), para una posterior optimización global de las variables relacionadas con la ionización por electrospray, mediante el uso de diseño de experimentos. El diseño de experimentos ha sido escasamente utilizado en CE-MS aunque representa una interesante alternativa a la optimización univariante al permitir una selección previa de variables significativas y considerar las interacciones entre las variables en estudio para seleccionar los óptimos. Aunque previamente ya se ha usado el diseño de experimentos para estudiar las variables que afectan al electrospray [375], este estudio se realizó usando infusión directa, existiendo sólo un antecedente del empleo de estos diseños estudiando los efectos de las variables bajo condiciones de separación electroforética [376], aproximación más realista al usar las mismas condiciones instrumentales que se aplicarán en posteriores experimentos de CE-MS para establecer el método analítico.

Los intervalos de estudio de cada variable se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Intervalos de estudio de cada variable relativa al flujo adicional.

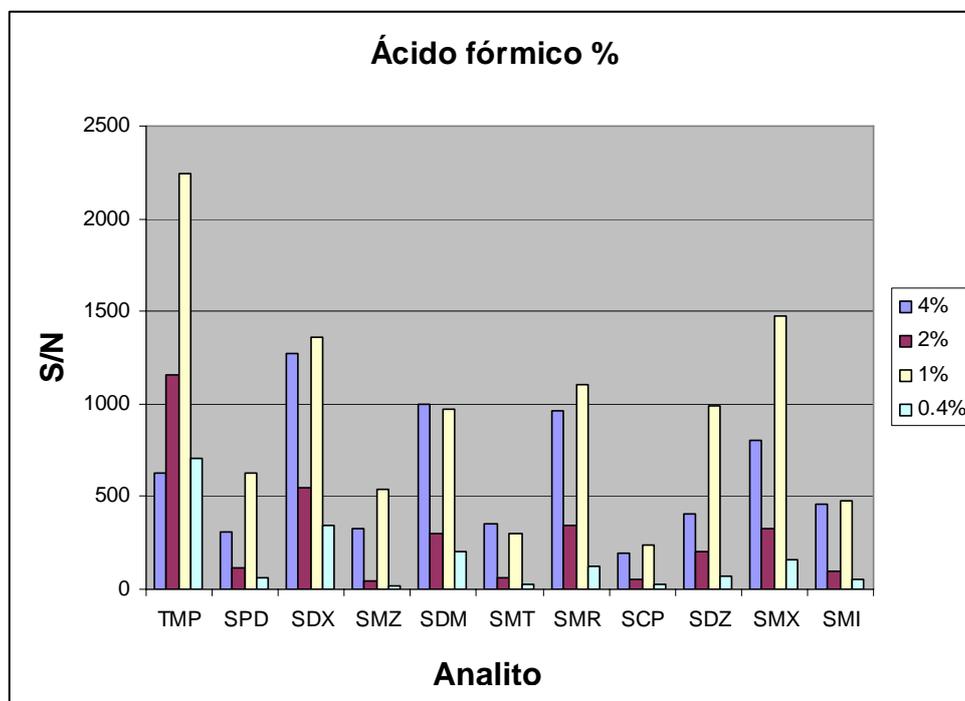
Variable	Ácido fórmico %	Isopropanol %	Caudal del líquido adicional
Intervalo	0.4 – 4.0	10 - 80	1 - 5 $\mu\text{l min}^{-1}$

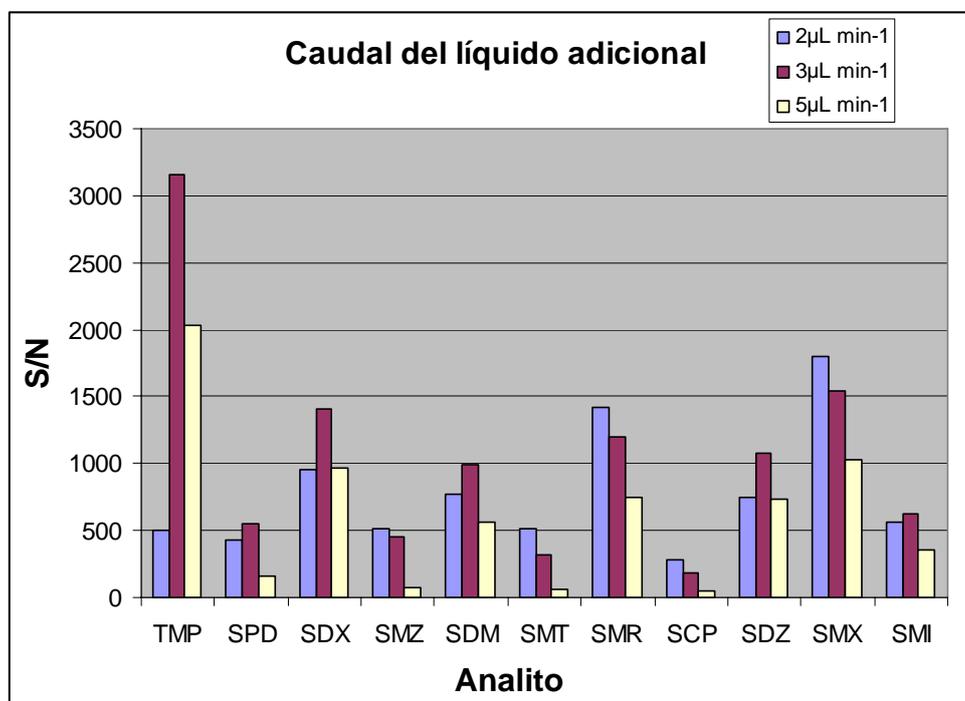
[375] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 948.

[376] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés Barrero, J.M. Bosque Sendra, L.E. García Ayuso, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2065.

En la Figura 49 se muestra la influencia sobre la relación S/N para cada analito del porcentaje de ácido fórmico y del caudal del líquido adicional. En el caso del ácido fórmico, se observa claramente que los mejores resultados se obtienen para un 1%, por lo que se planteará el diseño alrededor de este valor. Para el caudal del líquido adicional los valores no están tan definidos, aunque si que se puede descartar trabajar a caudales inferiores a $2 \mu\text{l min}^{-1}$, ya que por debajo de este valor no se obtenía ninguna señal. En cuanto al porcentaje de isopropanol, se comprobó que valores superiores al 70%, originaban corrientes inestables, ya que no se cerraba bien el circuito eléctrico, por lo que el intervalo para el estudio estaría comprendido entre el 10 y el 70%.

Figura 49. Resultados obtenidos en los estudios previos del flujo adicional. Influencia sobre la relación S/N del % de ácido fórmico y del caudal del líquido adicional.





3.3 Diseño de diagnóstico para las variables del electrospray

Las variables que se escogieron para realizar el estudio, relevantes en el acoplamiento CE-MS y relacionadas con la ionización por electrospray, fueron: porcentaje de isopropanol, concentración de ácido fórmico, caudal del líquido adicional, presión del nebulizador, flujo del gas de secado y temperatura del gas de secado. En primer lugar, y con objeto de comprobar cuales de ellas eran o no significativas, se realizó un diseño de diagnóstico 2^{6-1} en 2 bloques, con 3 puntos centrales, empleando como respuestas analíticas tanto la suma de la relación S/N de todos los analitos como la relación S/N de cada uno de los analitos independientemente. Este diseño se realizó en 2 bloques debido a la gran cantidad de experiencias (N=35) y la duración de algunas de ellas, que imposibilitaban la realización del diseño entero en un solo día. Los dominios experimentales seleccionados, junto con los valores codificados y descodificados para cada variable se indican en la

Tabla 43. Estos valores se han establecido considerando diferentes restricciones tales como la estabilidad del electrospray o limitaciones instrumentales.

Tabla 43. Dominio experimental del diseño de diagnóstico.

	-1	0	1
% Isopropanol	10	40	70
Concentración ácido fórmico (%)	0.2	1.1	2
Caudal del líquido adicional ($\mu\text{l min}^{-1}$)	2	5	8
Presión nebulizador (psi)	2	6	10
Caudal gas secado (l min^{-1})	2	6	10
Temperatura gas secado ($^{\circ}\text{C}$)	150	225	300

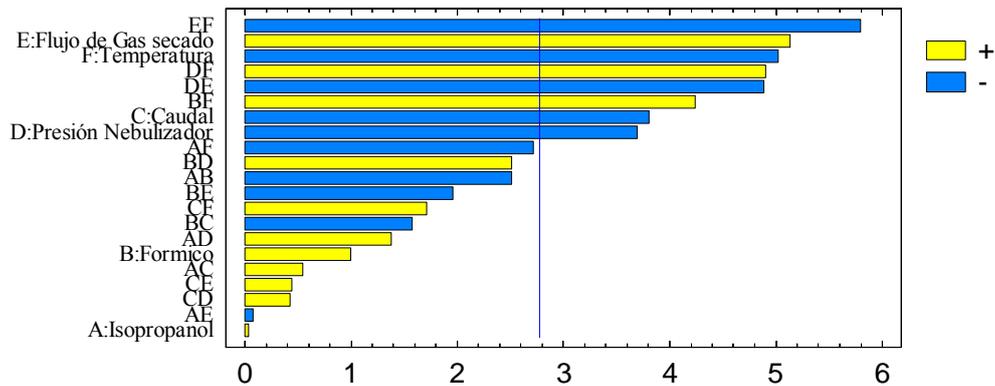
Como se observa en el gráfico de Pareto (Figura 50), tanto la concentración de ácido fórmico en el líquido adicional, como el porcentaje de isopropanol del mismo son variables no significativas en el rango en estudio. La línea muestra el límite de decisión para considerar los efectos significativos (basado en el efecto normalizado = efecto estimado/error estándar, al valor $P = 0.05$, a un nivel de confianza del 95 %). Asimismo, además de las variables principales significativas (flujo del gas de secado, temperatura, caudal del líquido adicional y presión del nebulizador) se encontraron distintas interacciones entre las variables estudiadas, lo que justifica el estudio multivariante.

En el caso del porcentaje de ácido fórmico, esto se explica considerando que se requiere una concentración mínima suficiente para ionizar las moléculas, de modo que alcanzado ese valor no se altera la respuesta, no siendo crítica esta variable una vez ionizados los analitos. En cuanto al porcentaje de disolvente orgánico, normalmente elevadas cantidades de éste proporcionan una mejor sensibilidad pero puede reducir la estabilidad del spray debido a la menor conductividad. En este caso, en el

Capítulo 5

rango estudiado no parece existir una influencia significativa considerable. Así pues, en base a los estudios previos descritos anteriormente, se fijó un porcentaje de ácido fórmico del 1% y un porcentaje de isopropanol del 50% para el líquido adicional, ambos valores cercanos al punto central del diseño, considerando que deben evitarse valores extremos de la región experimental ya que ligeras desviaciones podrían afectar a la robustez del método. Estas variables fueron excluidas de la posterior optimización.

Figura 50. Gráfico de Pareto del diseño de diagnóstico. (+) Efectos positivos sobre la respuesta; (-) Efectos negativos sobre la respuesta.



3.4 Optimización de las variables significativas del electropray

Una vez seleccionadas las variables significativas, se procedió a su optimización mediante un diseño de superficie de respuesta Doehlert [377], para 4 variables con 3 puntos centrales. Este tipo de diseño tiene como ventaja el poder estudiar las variables a distintos niveles según la importancia que tengan en la respuesta. En concreto, el diseño Doehlert que se utilizó, permitía estudiar 2 variables a 7 niveles, 1 variable a 5 y otra a 3 niveles con un total de 23 experiencias. Con objeto de asignar un número

[377] D.H. Doehlert, Appl Statist. 19 (1970) 231.

adecuado de niveles a cada variable (más niveles cuanto más significativa sea la variable), se estudió la importancia de cada una de ellas en la respuesta (relación S/N) para cada uno de los analitos por separado, en base a los resultados obtenidos en el diseño previo de diagnóstico, asignando el nº 1 a la variable más significativa y el nº 4 a la menos significativa. Observando los resultados para todos los analitos se obtuvo la significación de una variable sobre las otras para cada analito y por tanto pudo decidirse cuales de ellas se estudiarían a más niveles (Tabla 44).

Tabla 44. Asignación de importancia de las variables significativas (significación creciente del 4 a 1).

	Temperatura	Presión del nebulizador	Caudal gas de secado	Caudal del líquido adicional
TMP	4	2	3	1
SPD	4	3	1	2
SDX	4	1	2	3
SMZ	4	3	1	2
SDM	4	3	1	2
SMT	3	2	1	4
SMR	4	3	1	2
SCP	4	2	1	3
SDZ	4	3	1	2
SMX	3	4	2	1
SMI	4	2	1	3

Así, se estudiaron a 7 niveles el caudal del líquido adicional y el caudal del gas de secado, a 5 niveles la presión del nebulizador y a 3 niveles la temperatura del gas de secado. En la Tabla 45 aparece el rango de estudio y los niveles para cada una de las variables.

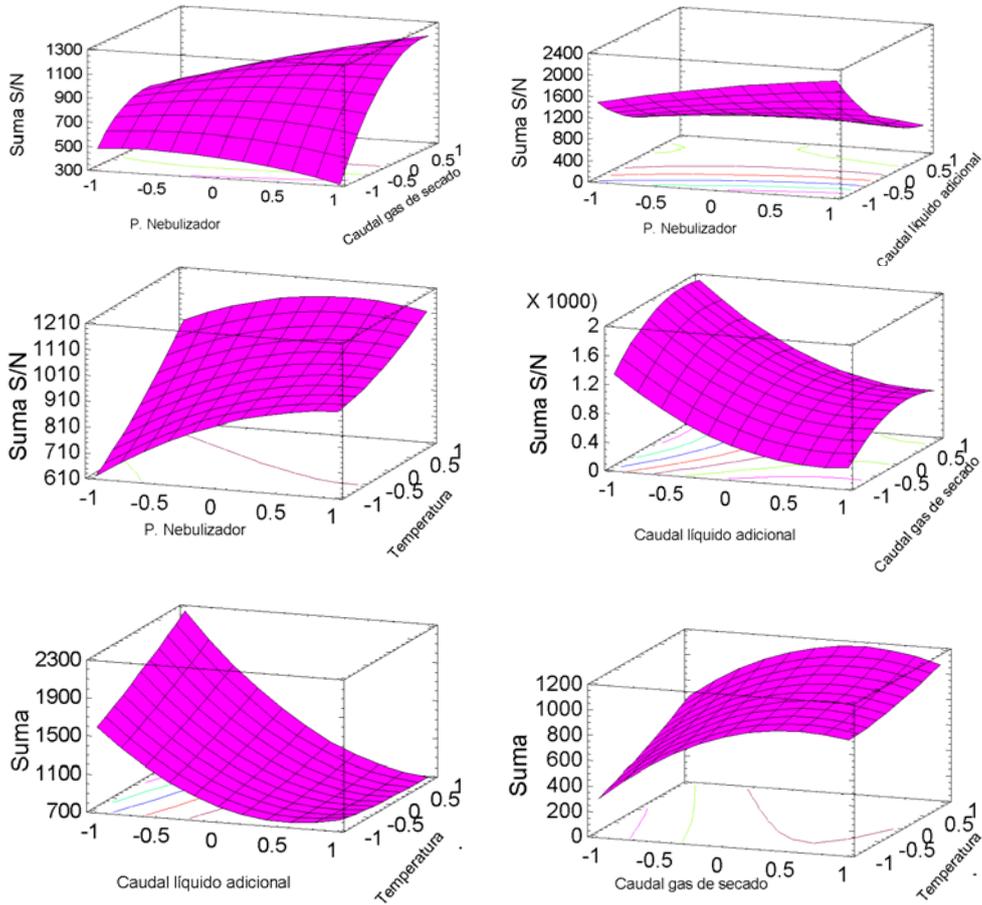
Capítulo 5

Tabla 45. Dominio experimental del diseño Doehlert para la optimización de las variables significativas del electrospray.

	3 Niveles	5 Niveles	7 Niveles	7 Niveles
	Temperatura (°C)	P. Nebulizador (psi)	Caudal líquido adicional ($\mu\text{l min}^{-1}$)	Caudal gas secado (l min^{-1})
1	76	2	2.40	2.73
2	175	4	3.27	3.55
3	274	6	4.13	5.18
4	-----	8	5.00	6.00
5	-----	10	5.87	6.82
6	-----	-----	6.73	8.45
7	-----	-----	7.60	9.27

Una vez realizado el diseño, se procedió a su análisis, considerando como respuesta analítica tanto la relación S/N de cada uno de los analitos individualmente, como la de la suma para el conjunto de analitos en estudio. De esta forma se estudió como afectaban las variables tanto a la respuesta global, así como al comportamiento individual de cada analito. Como ejemplo se muestran las superficies de respuesta obtenidas para la suma de la relación S/N en la Figura 51. Los análisis mostraron que tanto la respuesta global como la individual para la temperatura, el caudal del líquido adicional y el flujo del gas de secado eran muy parecidas, mostrando valores óptimos de 274°C, 2.5 $\mu\text{l min}^{-1}$ y 8 l min^{-1} , respectivamente. En la tabla 46 se muestran todos los óptimos obtenidos tanto para la suma de la relación S/N como para la relación S/N de cada uno de los compuestos individualmente.

Figura 51. Superficies de respuesta obtenidas en el diseño Doehlert.



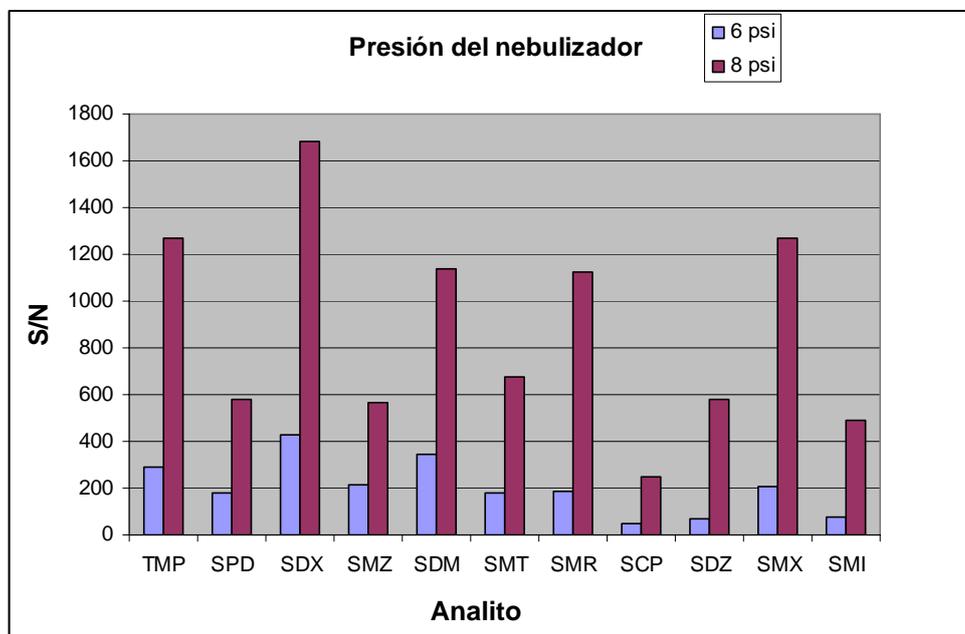
Capítulo 5

Tabla 46. Óptimos del diseño Doehlert para las variables significativas del electrospray.

	P. Nebulizador (psi)	Caudal ($\mu\text{l min}^{-1}$)	F. Gas de Secado (l min^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Suma	8.3	2.5	8.0	274
TMP	5.9	2.5	7.9	274
SPD	6.1	2.8	8.5	242
SDX	4.0	2.4	7.9	272
SMZ	6.5	2.4	8.6	274
SDM	3.7	2.4	8.2	274
SMT	6.0	2.5	8.1	254
SMR	6.7	2.4	6.8	274
SCP	8.1	2.4	7.6	274
SDZ	8.1	2.4	7.7	261
SMX	6.5	2.5	8.0	274
SMI	6.2	2.4	9.3	274

Sin embargo para la presión del nebulizador los valores no eran tan concordantes para todos los analitos individualmente o para la respuesta global. Se encontró que los valores óptimos encontrados oscilaban entre 6 psi y 8 psi. Así, con objeto de asegurar la robustez del óptimo para esta variable se realizaron medidas de la relación S/N para ambos valores de presión del nebulizador, fijando el resto de variables a los valores de los óptimos anteriores. En la Figura 52 se observa claramente cómo el valor de 8 psi para la presión del nebulizador da lugar a mejores resultados, justificándose este hecho debido a que este valor elevado en la presión genera gotas más pequeñas en el spray, de modo que se favorece el proceso de desolvatación. No obstante valores superiores podrían producir pérdida de resolución debido a la succión que genera el gas nebulizador dentro del capilar.

Figura 52. Confirmación del valor de la presión del nebulizador.

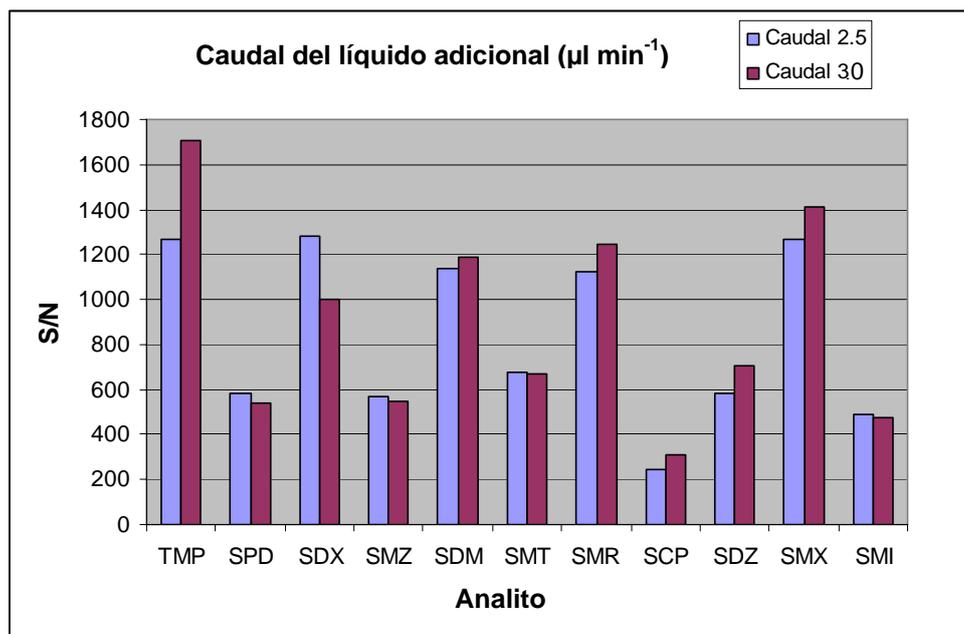


Una vez fijada la presión del nebulizador, y a pesar de que el diseño mostraba un valor claro de $2.5 \mu\text{l min}^{-1}$ como óptimo para el caudal del líquido adicional, las medidas realizadas a este valor daban lugar a un spray no excesivamente estable debido al bajo caudal. Hay que tener en cuenta que cuanto menor es el caudal del líquido adicional, menos dilución de la muestra se produce, lo que origina mejores límites de detección, de ahí que siempre se tienda a intentar utilizar un caudal lo más bajo posible. Sin embargo, en algunas ocasiones valores bajos del caudal dan lugar a que las medidas más irreproducibles porque no se garantiza adecuadamente el cierre del circuito eléctrico, produciéndose un spray deficiente. Ante esto es preferible aumentar un poco el caudal para obtener una mayor estabilidad en el spray generado y por lo tanto mayor robustez en el método. Por ello, se realizaron medidas adicionales a 2.5 y $3.0 \mu\text{l min}^{-1}$, observando el comportamiento del spray. En la Figura 53 se puede observar que no hubo disminución de señal al aumentar el caudal a $3.0 \mu\text{l min}^{-1}$, y que sin

Capítulo 5

embargo, la estabilidad en las medidas aumentó, de modo que se eligió este valor como óptimo.

Figura 53. Comprobación del caudal del líquido adicional.



Como resumen, los valores óptimos obtenidos fueron:

- Caudal del líquido adicional: $3.0 \mu\text{l min}^{-1}$
- Porcentaje de ácido fórmico: 1%
- Porcentaje de isopropanol: 50%
- Presión del nebulizador: 8 psi
- Caudal del gas de secado: 8 l min^{-1}
- Temperatura del gas de secado: $274 \text{ }^\circ\text{C}$

3.5 Optimización de parámetros influyentes en CE-MS y CE-MS/MS

Este apartado se centra en la optimización univariante de otros parámetros influyentes en el acoplamiento CE-MS, como son: voltaje del capilar de entrada al MS, amplitud de fragmentación (ambos relacionados con la detección MS), tiempo de inyección y disolvente de la muestra. En este punto se introdujo el uso del lomefloxacin (fluoroquinolona de uso exclusivo en humanos) como estándar interno.

El primer parámetro que se optimizó fue el voltaje del capilar de entrada al espectrómetro de masas, empleando infusión por voltaje, llenando todo el capilar con una mezcla de los analitos en estudio de 10 mg l^{-1} disueltos en el tampón de separación y aplicando voltaje de separación. De esta forma se realizaba un aporte constante de muestra al detector en unas condiciones parecidas a las de una medida “real”. Así, se varió el voltaje en el intervalo comprendido entre 3500 V y 4400 V, a intervalos de 5 minutos durante los cuales se monitorizó la señal m/z. Las variaciones que se produjeron fueron las siguientes:

- 0-5 min = 3500 V
- 5-10 min = 4400 V
- 10-15 min = 3700 V
- 15-20 min = 4100 V
- 20-25 min = 4400 V

En la Figura 54 se muestran las señales producidas, correspondientes a las variaciones. El valor que produce una señal más alta es el de 4400 V pero, tal y como se observa al repetir este mismo voltaje en el último intervalo de tiempo, las señales que se producían no eran repetitivas, además de dar lugar a intensidades de corriente inestables. Pruebas posteriores demostraron que el voltaje que mejores señales proporcionaba y que daba lugar a señales más estables era el de 4100 V. Para comprobar la influencia de este parámetro sobre la relación S/N de cada analito podemos ver en la

Capítulo 5

Figura 55 como en todos los casos (excepto para la SCP) se duplica o triplica la señal obtenida al variar el voltaje de 3500 V a 4100 V.

Figura 54 Optimización del voltaje del capilar de entrada al espectrómetro de masas.

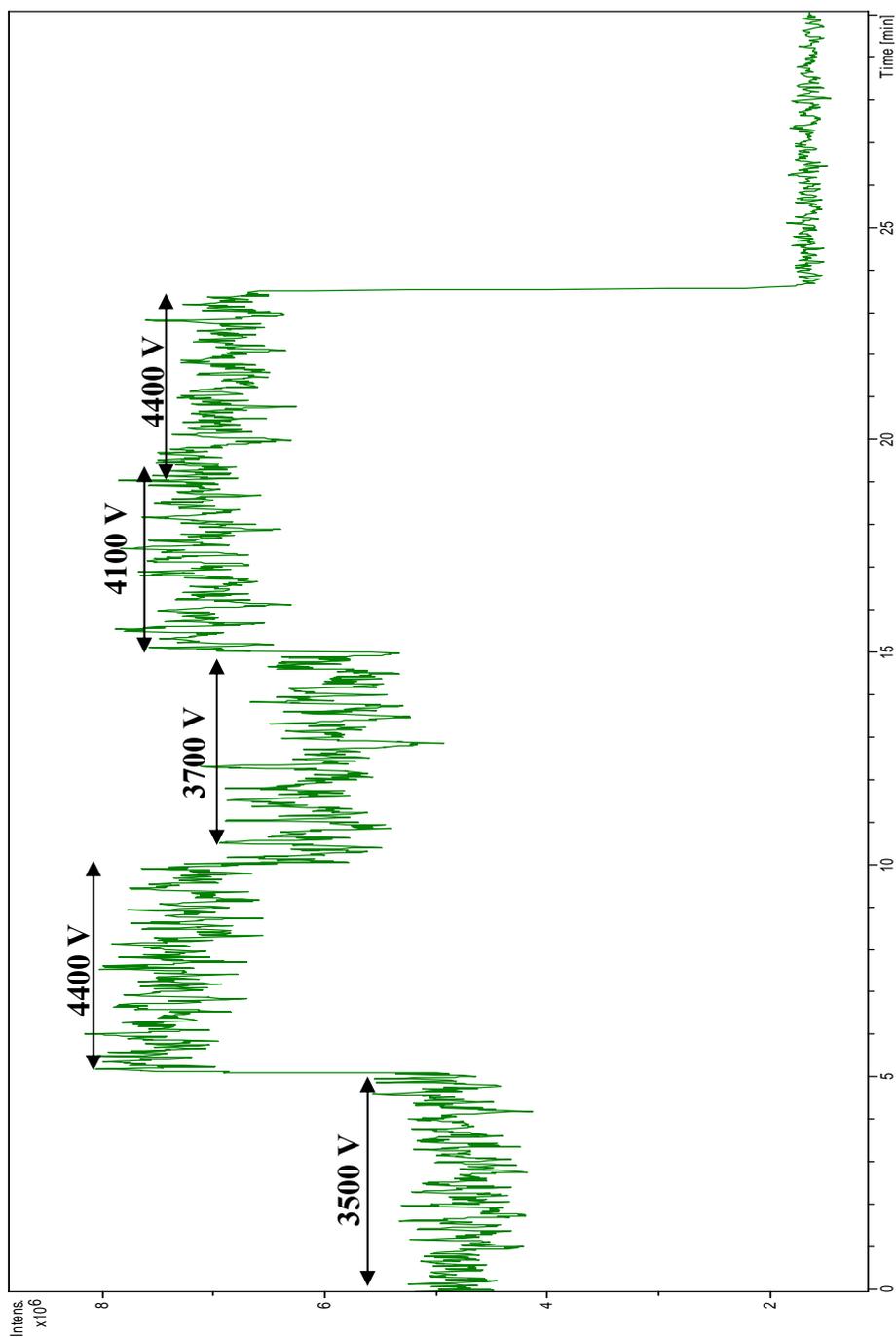
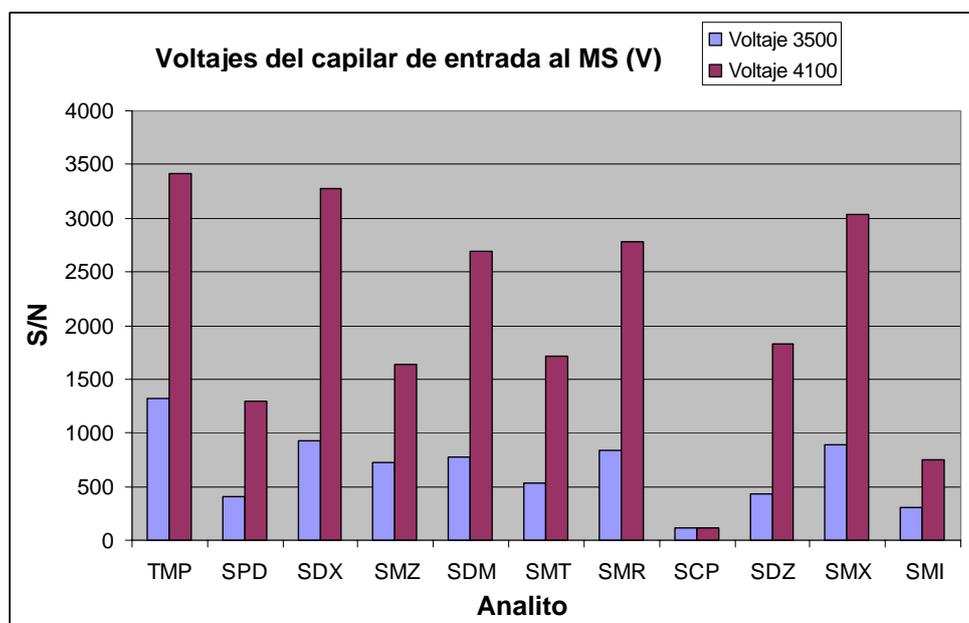


Figura 55. Influencia del voltaje del capilar de entrada al espectrómetro de masas sobre la relación S/N.



Hasta ahora los parámetros que se han optimizado eran comunes para la detección por MS y para MS/MS. A continuación se optimizó la amplitud de fragmentación para llevar a cabo la detección por MS/MS. Con este parámetro se controla la energía utilizada para fragmentar al ión precursor. Valores excesivamente bajos no fragmentarán al ión precursor, mientras que valores excesivamente altos expulsarán de la trampa al ión precursor y a los iones fragmentos obtenidos. Para llevar a cabo esta optimización, se prepararon disoluciones de 10 mg l^{-1} de cada analito disolviéndolos en tampón y llevando a cabo una infusión por voltaje. Se varió la amplitud de fragmentación entre 0 y 1.5, en incrementos de 0.05, y de tal forma que siempre quedara un resto del ión precursor. En la Tabla 47 se pueden ver los valores óptimos obtenidos para la amplitud de fragmentación, así como el número de fragmentos producidos. Con objeto

Capítulo 5

de llevar a cabo la confirmación inequívoca de los analitos, la Decisión 2002/657/EC [378] relativa a la validación de los métodos analíticos de control de residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados, en el marco de la Directiva 96/23/EC, establece un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos, basado en el uso de la MS mediante análisis de los fragmentos. Teniendo en cuenta que las sulfonamidas están clasificadas en el grupo B (medicamentos de uso veterinario con LMR establecido) se requiere un mínimo de 3 puntos. La asignación de puntos se establece adjudicando 1 punto a cada ión precursor y 1.5 puntos a cada ión fragmento. Los puntos de identificación obtenidos en MS/MS en tandem para cada analito se muestran igualmente en la Tabla.

[378] European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L221.

Tabla 47. Principales parámetros del método de MS/MS y puntos de identificación.

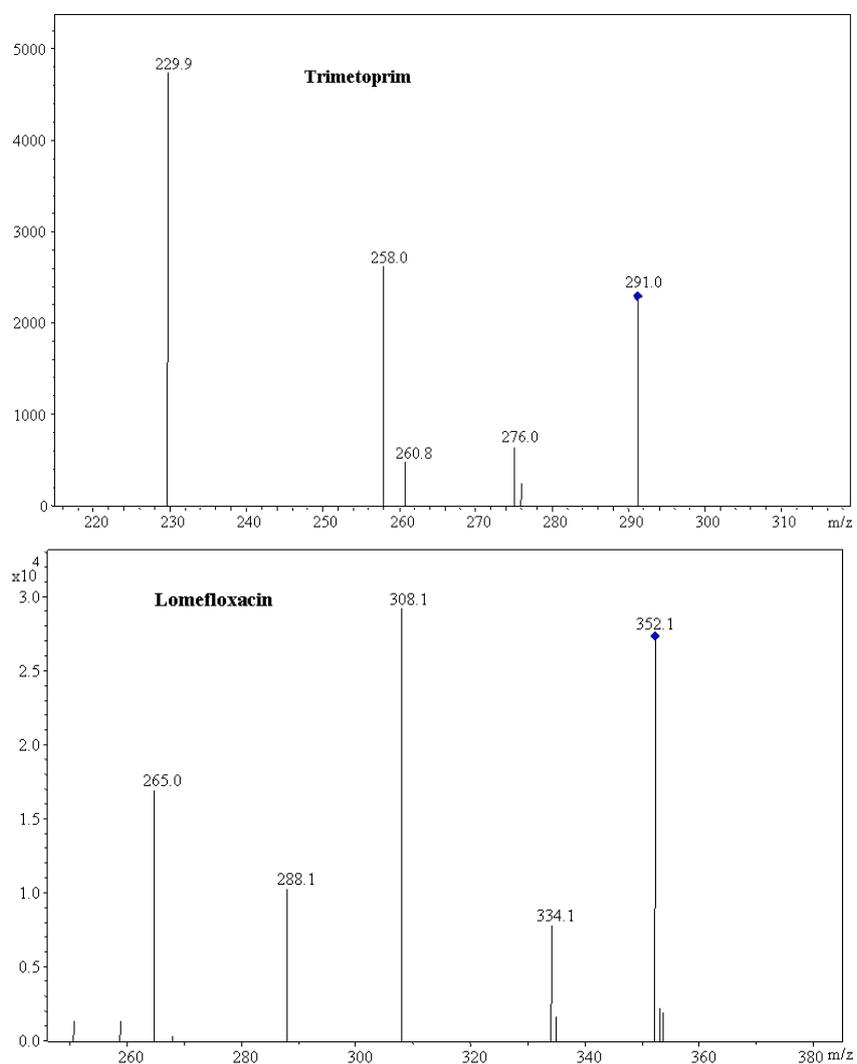
Analito	TMP	LOM	SPD	SDX	SMZ	SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
Ión precursor	291.3	352.1	250.3	311.3	279.3	311.3	281.3	265.3	285.0	251.2	254.3	271.3
Amplitud (V)	0.80	0.80	0.60	0.65	0.65	0.70	0.65	0.60	0.50	0.55	0.55	0.55
Anchura (m/z)	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1
Límite (m/z)	79	96	67	85	76	85	76	72	77	68	69	73
Iones fragmento	230 258 261 276	265 288 308 334	156 184	156 245	124 156 186 204	156 217 245	126 156 174 188 206 215	110 156 172 190	287 156	156 174	147 156 160 188 194	156
Puntos de identificación	7	7	4	4	7	5.5	10	7	4	4	8.5	2.5
Segmentos (min)	0-12	12	13.6	15.7-16.9			16.9-17.8					

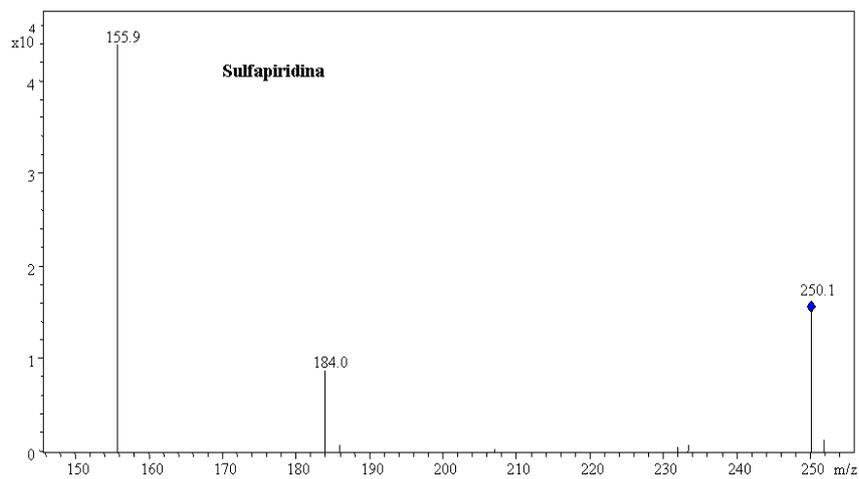
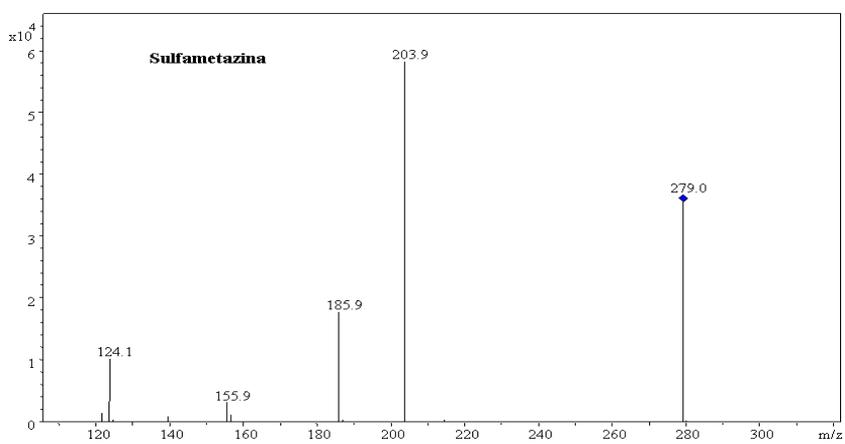
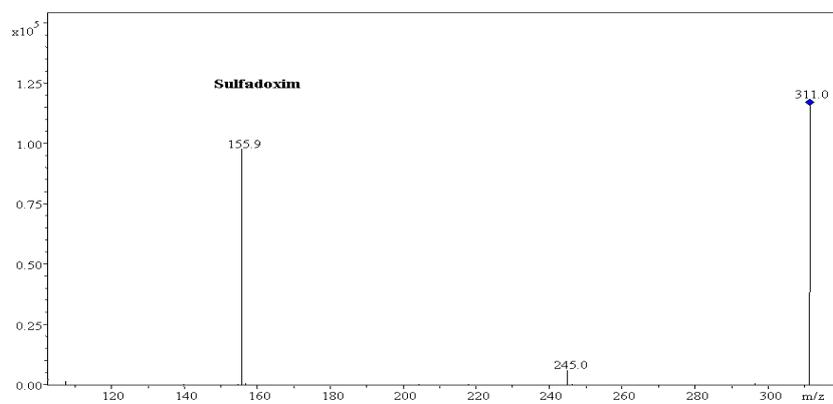
Capítulo 5

De los 12 compuestos para los que se realiza la separación sólo para el SMI no se obtuvieron el número mínimo de puntos de identificación que exige la legislación.

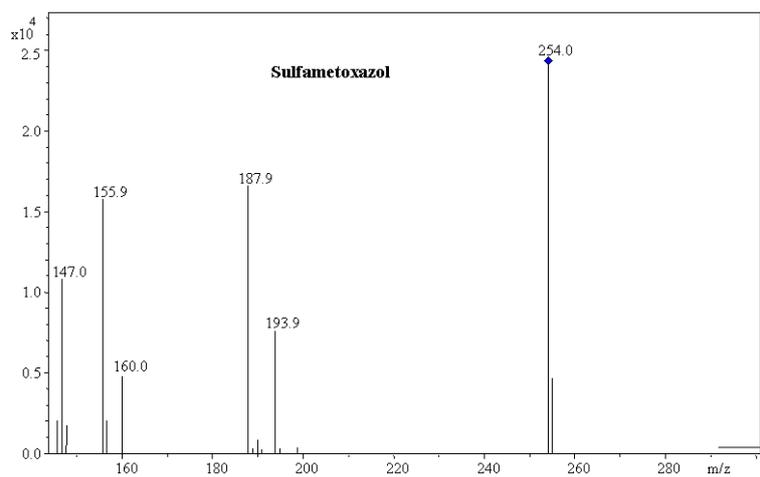
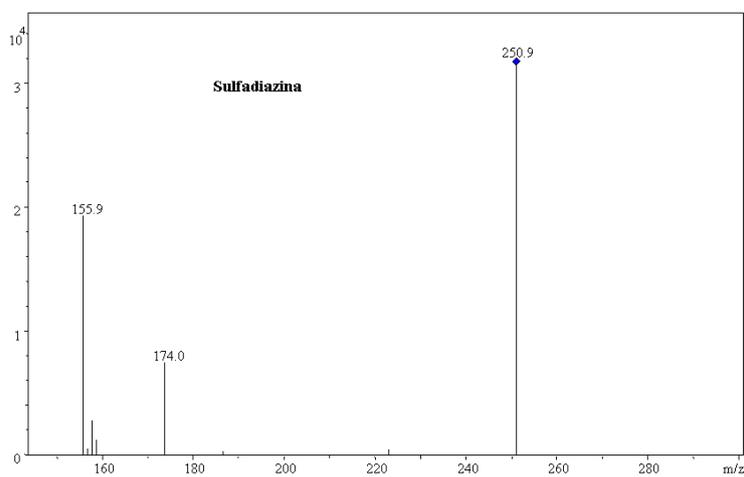
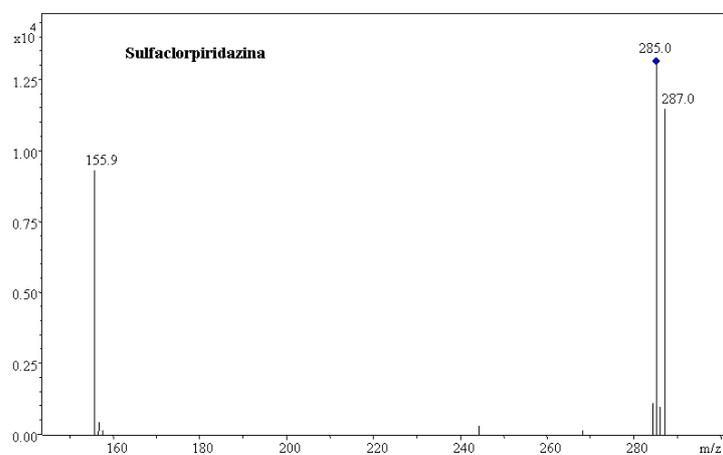
A continuación en la Figura 56 se muestran los distintos espectros de fragmentación en MS/MS

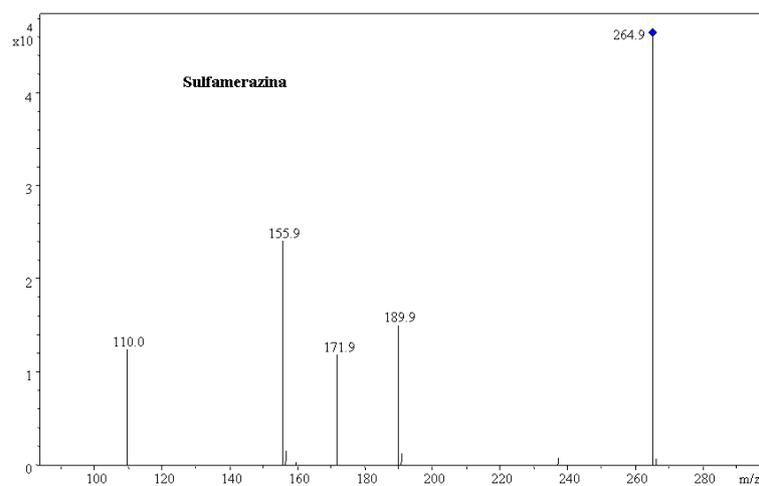
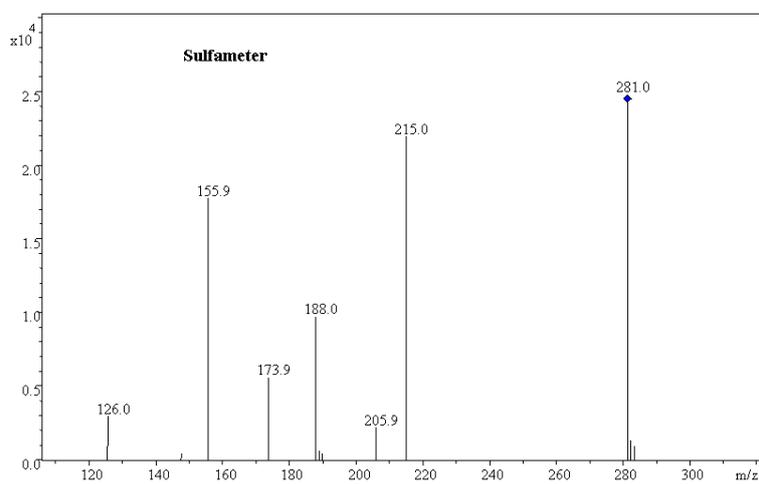
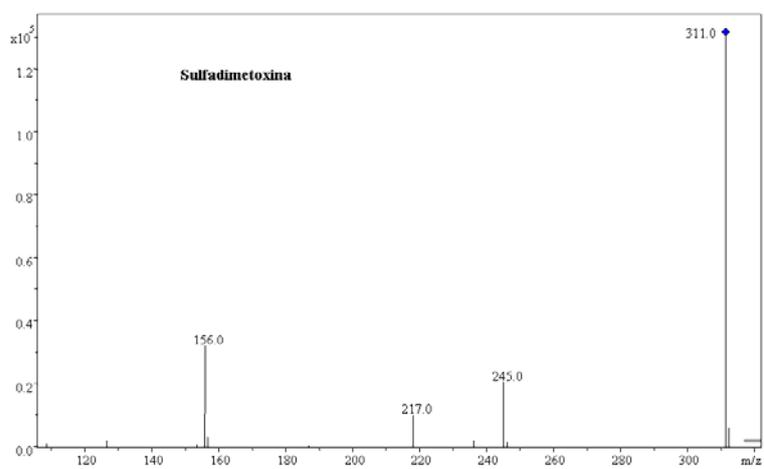
Figura 56. Espectros de MS/MS de los analitos en estudio y del IS.



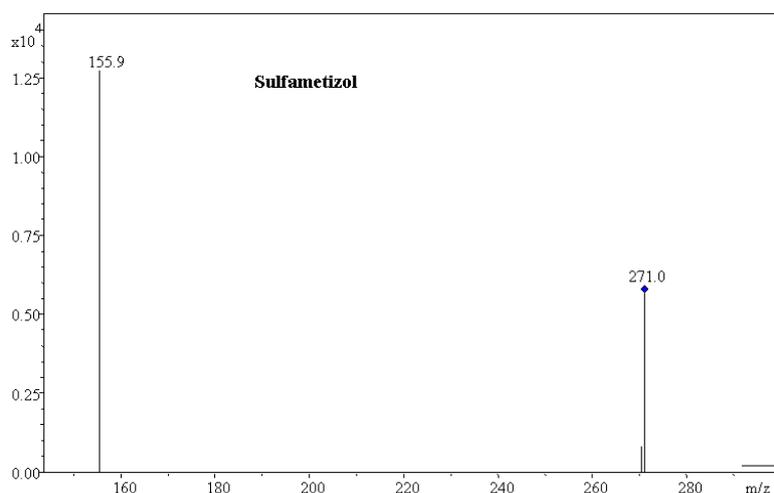


Capítulo 5



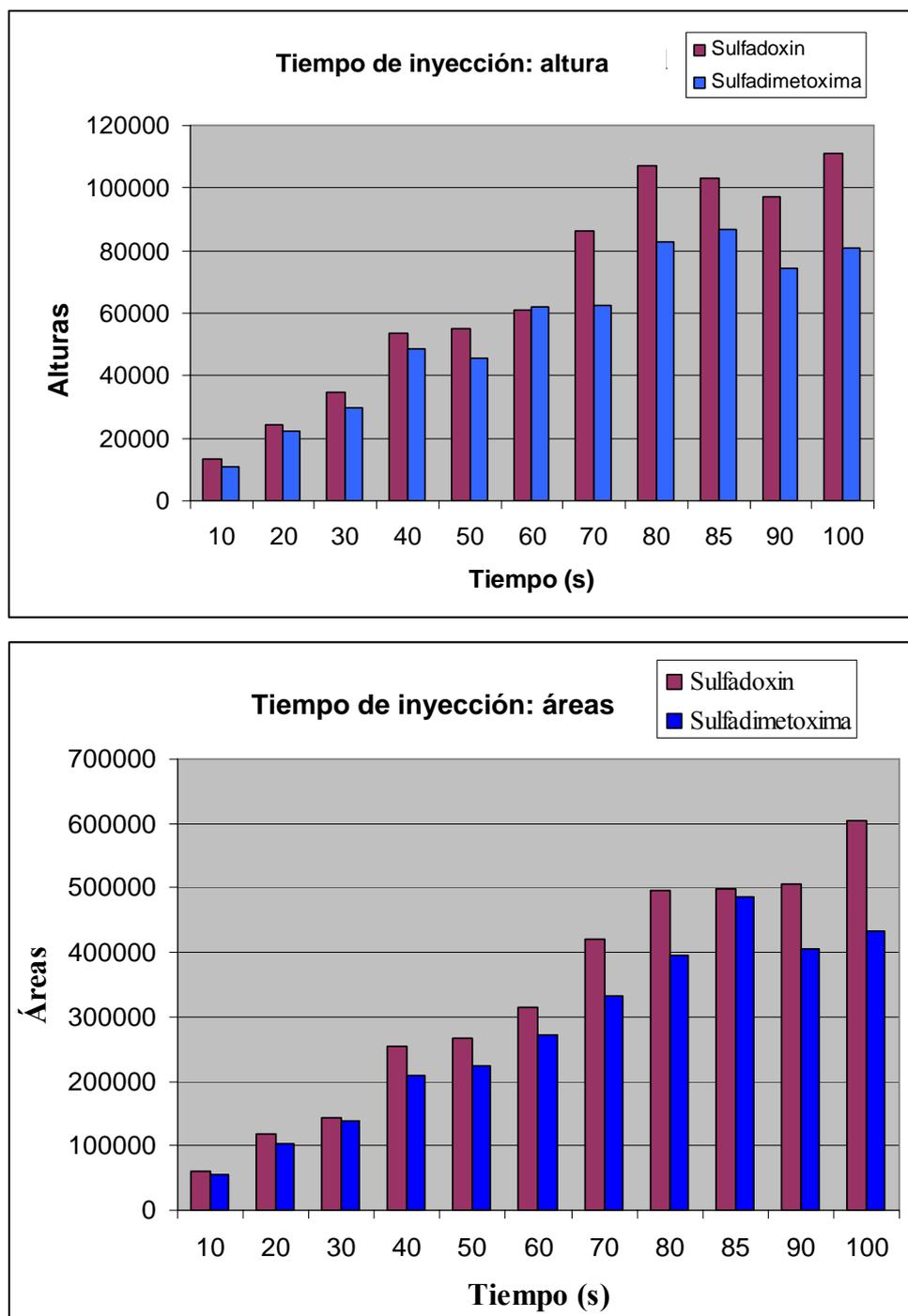


Capítulo 5



Los dos últimos parámetros que se optimizaron fueron el tiempo de inyección y el disolvente de la muestra. La optimización del tiempo de inyección se realizó aumentándolo de 10 hasta 100 s aplicando una presión de 50 mbar. Se seleccionó como óptimo un tiempo que diera lugar a la mejor señal para cada analito en estudio, sin disminución de la resolución entre los dos compuestos isómeros de la mezcla (SDX y SDM). Conforme se aumentaba el tiempo de inyección, mejoraba la señal analítica en términos de área de pico, aunque la altura de pico, permanecía constante a partir de 80 segundos, seleccionándose este tiempo de inyección como valor óptimo, ya que proporcionaba una resolución adecuada de los dos isómeros. En la Figura 57 se muestra la influencia del tiempo de inyección sobre el área y la altura de los dos isómeros (SDX y SDM) cuya resolución es la más crítica.

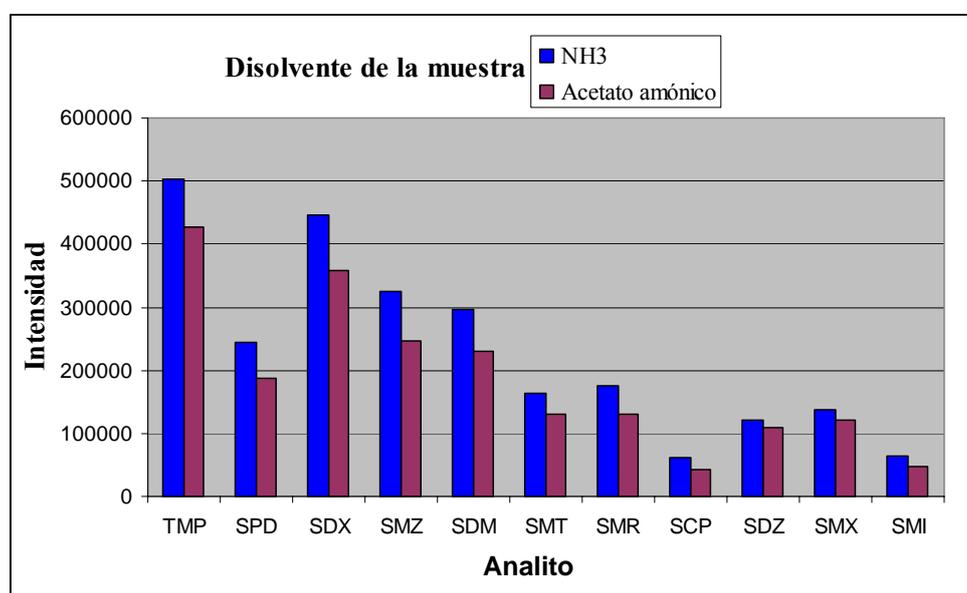
Figura 57. Optimización del tiempo de inyección. Influencia sobre las señales de SDX y SDM.



Capítulo 5

A continuación, para obtener el disolvente más adecuado de la muestra se probaron: agua, NH_3 1N y acetato amónico 7mM. Se compararon las alturas de pico para escoger el más apropiado. El agua se descartó porque al ser el bolo de muestra introducido muy grande, se provocaban caídas de corriente. Entre los otros dos disolventes se seleccionó el NH_3 porque daba lugar a señales más altas que el acetato amónico. Los resultados se pueden ver en la Figura 58.

Figura 58. Optimización del disolvente de la muestra.



Como resumen, los valores óptimos encontrados tras la optimización se muestran a continuación:

- Voltaje del capilar de entrada al MS: 4100 V
- Amplitudes: entre 0.50-0.85
- Tiempo de inyección: 80 s
- Disolvente de la muestra: NH_3 1N

4 RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de siete niveles de concentraciones correspondientes a 150, 250, 350, 500, 1000, 5000, 10000 $\mu\text{g l}^{-1}$ para TMP, SCP, SDZ, SMX y SMI, mientras que para SPD, SDX, SMZ, SDM, SMT y SMR los niveles de concentración ensayados fueron de 75, 150, 250, 350, 500, 1000 y 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado en las condiciones óptimas seleccionadas. Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico corregidas (relación entre el área de pico del analito y el área del patrón interno) en función de la concentración de cada analito. Las rectas de calibrado se establecieron tanto para el método de CE-MS como para el de CE-MS/MS.

Los parámetros estadísticos calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad de los métodos, se muestran en la Tabla 48. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas para las sulfonamidas y el TMP son lineales en el rango estudiado. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido, tal y como recomienda la IUPAC [379], considerando el procedimiento analítico sin tener en cuenta el tratamiento previo de la muestra. Como se observa, los límites obtenidos por ambos métodos son adecuados para poder cuantificar la cantidad de sulfonamidas de acuerdo con los LMRs establecidos por la EU (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de suma total de sulfonamidas, al igual que para el TMP) [380]. Además, si tenemos en cuenta la preconcentración obtenida en el proceso de preparación de las

[379] Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, IUPAC technical report. Pure Appl. Chem. 74 (2002) 1699.

[380] 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.

Capítulo 5

muestras, los límites en muestra real serían aún inferiores. La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia, expresando los resultados como desviación estándar relativa (RSD) de las áreas de pico corregidas. La repetibilidad se llevó a cabo en el mismo día mediante 9 inyecciones de una disolución patrón de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada sulfonamida y TMP. La precisión intermedia se estimó durante 5 días consecutivos (3 inyecciones) con un procedimiento similar al estudio de reproducibilidad. Se obtuvo una precisión satisfactoria en todos los casos pero en general las RSDs fueron inferiores al usar el método CE-MS. Aunque en términos generales el método CE-MS muestra una mayor sensibilidad y precisión, el método CE-MS/MS ofrece simultáneamente la posibilidad de la separación, cuantificación y confirmación de los analitos en estudio en función de los puntos de identificación requeridos por la Decisión de la EU [351].

Capítulo 5

Tabla 48. Parámetros estadísticos y de calidad de los métodos propuestos en CE-MS y CE-MS/MS para las sulfonamidas y el TMP.

Compuesto	TMP	SPD	SDX	SMZ	
CE-MS	LD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	19.2	18	5.5	12.3
	LQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	73	36	20.1	36.2
	Pendiente	0.018	0.0005	0.0008	0.0006
	Ordenada	0.0267	-0.0431	0.0424	-0.0151
	R ²	0.998	0.996	0.997	0.999
	Rango lineal	19.2-10000	18-5000	5.5-5000	12.3-5000
	Precisión (%RSD)				
	Repetibilidad (n=9)	9.8	6.7	5.2	2.6
	Precisión intermedia (n=15)	12.3	6.1	6.2	4.7
	CE-MS/MS	LD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	80.2	22.6	5.1
LQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)		150.2	52.6	20.1	45.2
Pendiente		0.0002	0.0006	0.0009	0.006
Ordenada		0.0086	-0.034	0.160	0.0546
R ²		0.991	0.994	0.990	0.996
Rango lineal		80.2-10000	22.6-5000	5.1-5000	15.7-5000
Precisión (%RSD)					
Repetibilidad (n=9)		9.4	5.8	8.0	7.6
Precisión intermedia (n=15)		20.3	10.9	7.7	8.4

Tabla 48. Continuación.

SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
32.3	31.7	16.6	24.7	24.2	65.4	60.3
64.4	74.3	50.2	79.6	64.5	96.3	90.5
0.0006	0.003	0.004	0.0002	0.0003	0.0003	0.002
-0.0184	-0.0083	-0.0295	-0.0011	-0.0407	-0.022	-0.0194
0.998	0.998	0.999	0.991	0.997	0.997	0.997
32.3-5000	31.7-5000	16.6-5000	24.7-10000	24.2-10000	65.4-10000	60.3-10000
2.9	6.3	4.5	8.2	6.7	7.8	6.4
7.7	11.4	3.8	2.9	11.2	6.7	1.6
10.7	12.3	16.1	43.2	64.8	61.9	33.5
36.6	47.2	74.1	90.3	97.3	87.6	92.6
0.0006	0.0004	0.0005	0.0003	0.0003	0.0004	0.0003
0.0892	0.0418	0.0234	0.0032	0.0586	0.0731	0.0148
0.992	0.991	0.991	0.993	0.996	0.996	0.993
10.7-5000	12.3-5000	16.1-5000	43.2-10000	64.8-10000	61.9-10000	33.5-10000
7.6	9.6	15.6	10.5	5.6	14.2	12.8
8.1	12.4	15.0	10.0	11.5	16.1	17.5

5 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE LAS 10 SULFONAMIDAS Y EL TRIMETOPRIM EN CARNE DE TERNERA Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

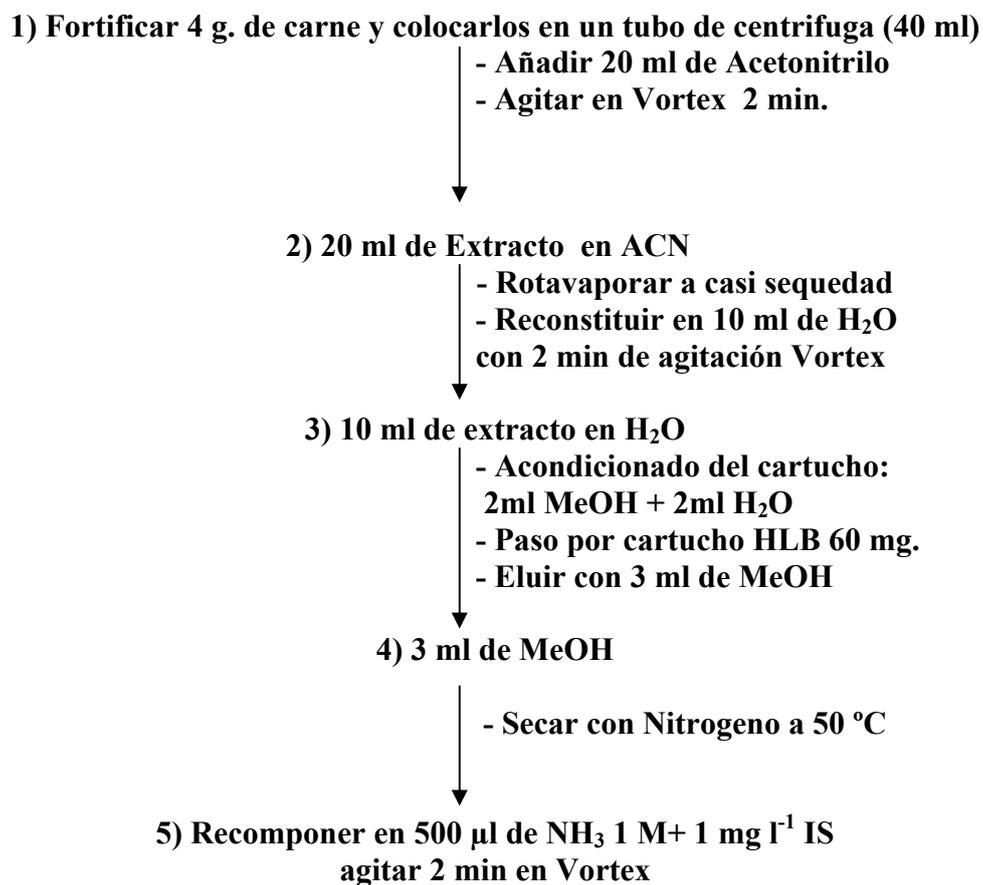
Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado en muestras reales se escogieron dos matrices: carne de ternera y aguas subterráneas de un pozo situado en una explotación ganadera bovina de la provincia de Granada.

5.1 Determinación de sulfonamidas y TMP en carne de ternera

La extracción de las sulfonamidas y el TMP de la carne, se llevó a cabo usando el procedimiento descrito en el capítulo anterior para carne de cerdo. Las recuperaciones obtenidas se encontraron entre el 70 y el 95% para CE-MS y entre el 75 y el 96 % para CE-MS/MS. Antes de realizar la medida de una muestra añadida, se procedió a medir un blanco de carne, obteniéndose un electroferograma en el que no se apreciaban interferentes. Esto, junto con la gran capacidad que posee la detección MS en cuanto a selectividad, llevó a considerar la eliminación de la primera etapa de limpieza con el cartucho de Alúmina N, obteniéndose también extractos del blanco limpios y recuperaciones incluso mejores que las anteriores, tanto en MS como en MS/MS. Con este paso se consigue una preconcentración de 8 veces.

Por lo tanto, el método de extracción que se usó finalmente se muestra en el siguiente esquema:

**PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS Y
TMP EN CARNE**



Con objeto de validar el método propuesto para su aplicación en carne, se realizaron estudios de recuperación, añadiendo sulfonamidas y TMP a muestras de carne de ternera libres de las mismas. Las muestras de carne se doparon con una mezcla de las 10 sulfonamidas y TMP a diferentes niveles de concentración (50, 100, 150 µg kg⁻¹ de cada una), seleccionados de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Europea relativas a la monitorización de fármacos [351]. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado y se inyectó tres veces. Los resultados de estos estudios para

Capítulo 5

MS y MS/MS se muestran en las Tablas 49 y 50, mientras que en la Figura 59 se muestra un electroferograma aplicando el método de CE-MS (A) y un electroferograma aplicando CE-MS/MS (B), para una muestra de carne de ternera. Como puede observarse, los métodos propuestos proporcionan resultados satisfactorios en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas, por lo que podrían ser implementados en laboratorios de control de calidad para análisis de rutina.

Figura 59. Electroferogramas (A) CE-MS y (B) CE-MS/MS en las condiciones óptimas en carne de ternera fortificada con $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada sulfonamida y TMP (1: TMP; 2: LOM; 3: SPD 4: SDX; 5: SMZ, 6: SDM; 7: SMT; 8: SMR; 9: SCP; 10: SDZ; 11: SMX; 12: SMI).

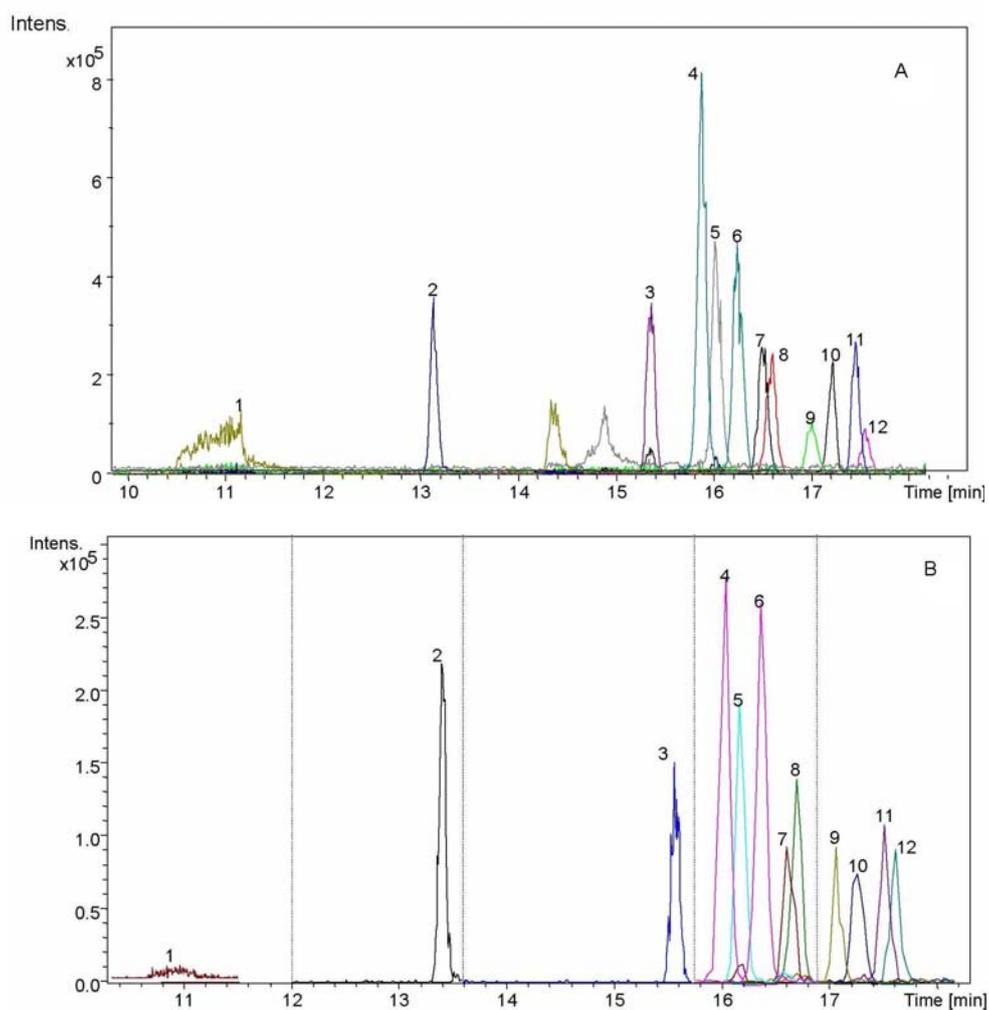


Tabla 49. Recuperaciones obtenidas en muestras de carne de ternera fortificada a distintos niveles de concentración de sulfonamidas y TMP en CE-MS (n=9).

	TMP	SPD	SDX	SMZ	SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
Añadido	50 µg kg⁻¹										
R (%)	73.02	89.00	84.78	92.56	85.21	87.65	86.04	95.12	96.50	91.44	94.44
RSD	6.14	4.64	4.07	7.11	4.08	6.33	4.46	3.90	5.41	6.47	5.93
Añadido	100 µg kg⁻¹										
R (%)	75.00	81.55	81.62	84.07	82.88	86.84	88.57	91.54	91.52	89.60	89.97
RSD	9.81	6.74	5.20	2.63	2.91	5.01	9.23	8.24	6.70	4.01	6.40
Añadido	150 µg kg⁻¹										
R (%)	85.32	96.26	98.33	98.87	97.54	95.30	87.05	99.28	97.34	96.63	93.37
RSD	6.63	5.23	5.31	3.54	4.62	7.83	7.79	5.76	4.90	5.35	2.91

Tabla 50. Recuperaciones obtenidas en muestras de carne de ternera fortificada a distintos niveles de concentración de sulfonamidas y TMP en CE-MS/MS (n=9).

	TMP	SPD	SDX	SMZ	SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
Añadido	50 µg kg⁻¹										
R (%)	76.88	87.53	79.01	77.97	81.07	79.84	80.07	87.18	93.34	85.03	79.61
RSD	10.41	10.77	8.01	3.88	8.27	10.94	9.15	12.98	13.71	10.29	6.38
Añadido	100 µg kg⁻¹										
R (%)	80.00	85.11	81.12	85.82	84.95	83.61	82.77	88.25	94.63	81.68	80.16
RSD	9.38	5.84	8.03	7.62	7.59	9.61	4.30	10.54	5.59	7.75	5.91
Añadido	150 µg kg⁻¹										
R (%)	84.77	92.63	89.54	93.74	95.31	88.13	90.56	89.88	93.08	90.39	84.88
RSD	7.37	5.54	9.38	5.72	6.29	7.95	8.98	4.81	9.92	9.02	12.75

Capítulo 5

5.2 Determinación de sulfonamidas en aguas subterráneas

Se llevó a cabo el análisis de aguas subterráneas de una explotación ganadera bovina, usando el procedimiento de extracción descrito anteriormente, pero sólo a partir del paso 3. En todos los casos se doparon 40 ml de agua recomponiéndose en 500 μ l de NH_3 1 M, añadiendo 1 mg l^{-1} de IS. La preconcentración que se consigue durante todo el proceso es de unas 80 veces.

Las muestras de aguas subterráneas se doparon con una mezcla de las 10 sulfonamidas y TMP a diferentes niveles de concentración (5, 20, 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada una) seleccionados en base a las bajas concentraciones a las que sería posible encontrar estos compuestos en este tipo de muestras. Cada nivel se preparó por triplicado y se inyectó tres veces, analizándose mediante CE-MS y CE-MS/MS. Previamente se analizó un blanco de esta muestra de agua y el electroferograma obtenido no mostró restos de ninguna sulfonamida ni TMP.

Los resultados de estos estudios para CE-MS y CE-MS/MS se muestran en las Tablas 51 y 52. Como se observa, el método propuesto proporciona buenos resultados en términos de precisión y veracidad, con recuperaciones cuantitativas en todos los casos.

En la Figura 60 se muestra un electroferograma CE-MS (A) y un electroferograma de CE-MS/MS (B) para una de estas muestras.

Figura 60. Electroferogramas CE-MS (A) y CE-MS/MS (B) en las condiciones óptimas para muestras de agua fortificada con $50 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada sulfonamida y TMP (1: TMP; 2: LOM; 3: SPD 4: SDX; 5: SMZ, 6: SDM; 7: SMT; 8: SMR; 9: SCP; 10: SDZ; 11: SMX; 12: SMI).

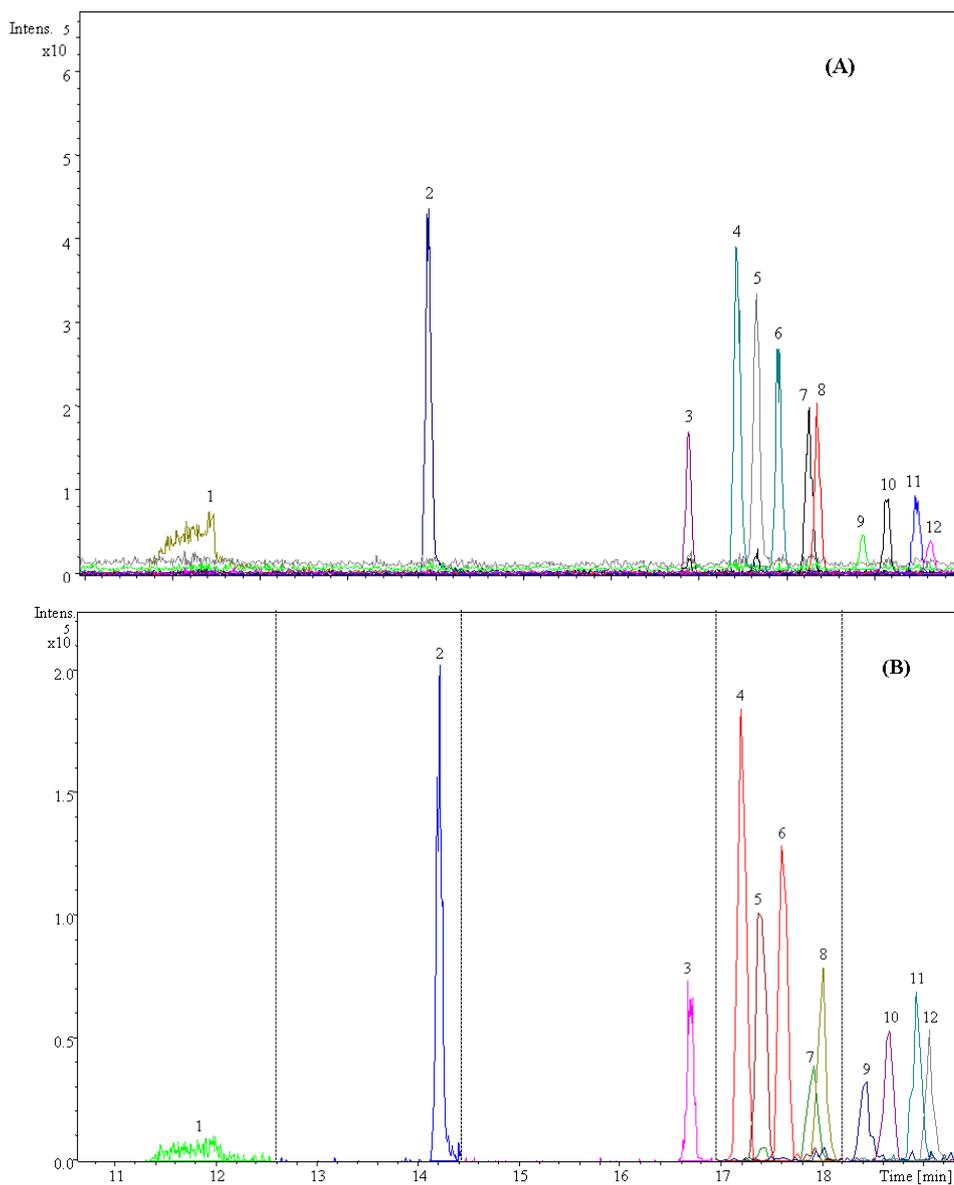


Tabla 51. Recuperaciones obtenidas en muestras de aguas subterráneas fortificadas a distintos niveles de concentración de sulfonamidas y TMP en CE-MS (n=9).

	TMP	SPD	SDX	SMZ	SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
Añadido	5 µg l⁻¹										
R (%)	99.96	100.5	98.99	98.97	102.2	99.04	96.29	97.68	101.2	99.62	96.17
RSD	1.26	4.51	1.30	5.91	6.39	2.17	3.93	2.06	2.17	6.73	8.60
Añadido	20 µg l⁻¹										
R (%)	92.29	97.31	98.12	98.41	96.47	97.73	100.2	97.65	99.43	108.3	102.8
RSD	2.73	5.22	3.98	2.86	1.40	4.47	2.01	1.14	1.11	6.97	4.60
Añadido	50 µg l⁻¹										
R (%)	94.04	96.39	94.66	96.48	99.07	98.65	98.29	98.27	97.28	98.50	97.48
RSD	5.82	4.86	7.74	1.58	2.94	4.29	6.27	6.25	8.00	5.02	2.96

Tabla 52 Recuperaciones obtenidas en muestras de aguas subterráneas dopadas a distintos niveles de concentración de sulfonamidas y TMP en MS/MS (n=9).

	TMP	SPD	SDX	SMZ	SDM	SMT	SMR	SCP	SDZ	SMX	SMI
Añadido	5 µg l⁻¹										
R (%)	101.8	94.55	96.47	98.21	99.39	95.24	97.53	91.70	87.11	96.44	97.86
RSD	0.82	10.63	5.70	10.69	7.03	10.21	12.50	3.42	7.70	14.96	11.09
Añadido	20 µg l⁻¹										
R (%)	97.51	98.47	96.36	99.70	98.32	97.99	95.18	92.17	93.12	98.69	99.92
RSD	2.04	5.29	5.72	3.02	4.98	5.48	9.08	8.11	2.01	1.69	5.23
Añadido	50 µg l⁻¹										
R (%)	98.48	97.06	95.98	95.95	96.95	97.93	95.75	95.93	92.69	93.26	96.50
RSD	5.75	8.70	3.74	8.23	7.13	1.37	5.25	7.01	7.27	5.20	3.20

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 1

1. Se ha desarrollado una nueva metodología quimioluminiscente (CL) para la detección cuantitativa de carbaril en aguas naturales y en matrices vegetales, mediante la reacción de oxidación del TCPO con H_2O_2 mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).
2. Mediante técnicas quimiométricas se han estudiado las variables físicas y químicas que afectaban a la reacción CL, demostrando ser una herramienta muy útil para optimizar el sistema, considerando el elevado número de variables en estudio y las posibles interacciones entre éstas.
3. Se ha desarrollado una metodología de extracción y limpieza de extractos para el análisis de carbaril en matrices vegetales mediante el uso de la extracción en fase sólida, siendo una alternativa viable para su posterior empleo en otro tipo de vegetales al eliminar en casi su totalidad la contribución de la matriz.
4. Se ha optimizado una nueva metodología para la descomposición de los N-metilcarbamatos (NMCs) a metilamina (MA), mediante el uso de una lámpara UV. Se ha empleado N-acetilcisteína (NAC) en vez de mercaptoetanol en la reacción de obtención del derivado fluorescente usando OPA, lo cual evita las desventajas del uso del mercaptoetanol, empleado tradicionalmente, en cuanto su toxicidad.
5. Se han establecido los parámetros característicos del método propuesto, encontrando que los límites de detección y cuantificación se encuentran por debajo del Límite Máximo de Residuos (LMR) permitido para la matriz vegetal en estudio.
6. Se ha aplicado el método propuesto al análisis de dos tipos de muestras dopadas: vegetales (pepinos) y aguas de diversa procedencia, encontrándose en todos los casos recuperaciones acordes con lo estipulado por la legislación vigente, demostrándose así la validez del método propuesto.

Conclusiones

CAPÍTULO 2

1. La reacción CL de los peroxioxalatos en medio micelar acoplada al sistema FIA propuesta muestra su utilidad en el desarrollo de un método de diagnóstico (*screening*) de muestra para el control del índice total de NMCs en muestras de aguas. Este método implica:
 - a) Rápida hidrólisis alcalina de la muestra en un tampón de pH 9.3 y medio micelar catiónico, para producir metilamina (MA).
 - b) Formación del derivado MA-OPA (fluoróforo) en presencia de N-Acetilcisteína.
 - c) Oxidación del TCPO con H_2O_2 usando imidazol como catalizador, en presencia de un fluoróforo, cuya emisión CL será proporcional a la concentración de MA, y por lo tanto proporcional al contenido inicial total de NMCs.
2. El método de diagnóstico propuesto está basado en la medida de la señal CL y ha sido desarrollado para diferentes contenidos (límites de especificidad, SL) de NMCs, obteniendo éstos por mezclas de distintas proporciones de carbamatos ampliamente empleados.
3. Mediante el intervalo de incertidumbre establecido en torno a la señal de especificación (s_r), relativa al SL, es posible decidir si las muestras tienen un contenido de NMCs superior o inferior a una concentración dada, comprobando la fiabilidad del método propuesto mediante el cálculo de dos parámetros, *Sensibilidad* y *Especificidad*, relacionados con la probabilidad de cometer errores de tipo I y II, obteniéndose valores muy satisfactorios de estos parámetros en la validación del método a las concentraciones probadas.

CAPÍTULO 3

1. Se ha desarrollado y validado un método de HPLC-PO-CL para la determinación de sulfonamidas en leche cruda de vaca, que permite la resolución de siete sulfonamidas en menos de 12 min, combinando la sensibilidad de un sistema de detección CL basado en la reacción de los POs.
2. El peroxioxalato más común, TCPO, ha sido sustituido por el TDPO, evitando los problemas de precipitación de aquel en medios acuosos, incrementando la sensibilidad, y facilitando la compatibilidad entre la separación cromatográfica y la detección quimioluminiscente.
3. Las variables de la reacción post-columna se han optimizando usando diseño de experimentos, lo que permitió considerar las interacciones entre las diversas variables y reducir el número de experimentos.
4. El método ha sido aplicado al análisis de leche cruda de vaca y los resultados obtenidos son comparables en términos de veracidad y precisión con los obtenidos en un estudio colaborativo usando el método oficial de la AOAC, subsanando algunos de los problemas que presenta este método oficial.
5. Los límites de detección obtenidos (en el rango de los $\mu\text{g l}^{-1}$) con este método son mejores que los proporcionados para estos compuestos con los métodos comunes usados para su análisis, estando por debajo del LMR establecido para estos antibióticos en leche por la EU. Además, el tiempo de análisis es menor que los requeridos para otros métodos cromatográficos.

Conclusiones

CAPÍTULO 4

1. Se ha desarrollado y validado un método de electroforesis capilar zonal (CZE) sensible y rápido (menos de 13 min) para la determinación de nueve sulfonamidas en carne de cerdo y aguas subterráneas, siendo la primera vez que la SPD ha sido cuantificada mediante CZE.
2. Como etapa previa al análisis mediante CE, se han desarrollado procedimientos de SPE para la extracción y preconcentración de los analitos, así como para la limpieza de la muestra.
3. Se ha desarrollado un método de preconcentración en línea empleando LVSS, que mejora la sensibilidad de la detección en unas 15 veces.
4. El método ha sido aplicado a la monitorización de estos residuos en alimentos de origen animal (carne de cerdo) y en muestras ambientales (aguas subterráneas), obteniéndose recuperaciones satisfactorias, que en el caso de muestras de carne están comprendidas entre 81.2 y 99.3% y para la muestra de agua entre el 89.2 y 99.0%.
5. Los límites de detección obtenidos son suficientemente bajos para la cuantificación de estos residuos en carne, estando por debajo de los LMRs establecidos por la EU, encontrándose entre los métodos más sensibles y rápidos disponibles para el análisis de sulfonamidas. En el caso de muestras de agua, actualmente no están establecidos los LMR para estos contaminantes emergentes, pero el método muestra su utilidad para su detección satisfactoria en muestras ambientales.

CAPÍTULO 5

1. Se han desarrollados dos métodos basados en el acoplamiento CE-MS y CE-MS/MS, sensibles, selectivos y rápidos para la cuantificación e identificación de 10 sulfonamidas y el TMP.
2. Los límites de detección obtenidos son suficientemente bajos para la cuantificación y confirmación de estos residuos en carne, estando por debajo de los LMRs establecidos por la EU. En el caso de muestras de agua, actualmente no están establecidos LMR para estos contaminantes emergentes, pero el método muestra su utilidad para su detección e identificación satisfactoria en muestras ambientales.
3. El método de CE-MS/MS condujo a la obtención de espectros de MS/MS que dieron información estructural, además de dar lugar a un alto grado de confianza en la identificación inequívoca de los analitos. En todos los casos, excepto para el SMI, se cumplen los requisitos establecidos por la EU al contar con más de 3 puntos de identificación.
4. El método ha sido aplicado a la cuantificación de residuos de los compuestos en alimentos de origen animal (carne de ternera) y en muestras ambientales (aguas subterráneas), obteniéndose recuperaciones satisfactorias tanto en CE-MS como en CE-MS/MS.

ANEXO: PUBLICACIONES

ARTÍCULOS

1 Determination of ten sulphonamides and trimethoprim by CE-MS and CE-MS/MS in meat and ground water samples.

Jorge J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia
Electrophoresis, (enviado para su publicación).

2 Chemiluminescence determination of sulphadiazine in drugs using the peroxalate reaction in micellar medium by flow injection analysis.

Giuseppe Lattanzio, Ana M. García-Campaña, Jorge J. Soto-Chinchilla,
Laura Gámiz-Gracia, Stefano Girotti.
Annali di Chimica, (Enviado para su publicación).

3 Application of capillary zone electrophoresis with large volume sample stacking to the sensitive determination of sulphonamides in meat and ground water.

Jorge J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, C.
Cruces Blanco.
Electrophoresis, 27 (2006) 4060-4068.

4 HPLC post-column chemiluminescence determination of sulfonamide residues in milk at low concentration levels using bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)phenyl] oxalate as chemiluminescence reagent.

Jorge J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia, A.M. García Campaña, Luis E.
García-Ayuso, K. Imai.
Journal of Chromatography A, 1095 (2005) 60-67.

5 Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in liquid phase. A review.

L. Gámiz Gracia, A.M. García Campaña, Jorge J. Soto Chinchilla, J.F.
Huertas Pérez y A. González Casado.
Trends in Analytical Chemistry, 24, 11 (2005) 927-942.

6 Establishment of signal-recovery functions for the calculation of the recovery factor. Application to contaminant residue monitoring in vegetables by chemiluminescence detection.

Laura Gámiz-Gracia, Luis Cuadros-Rodríguez, Jorge J. Soto-Chinchilla,
José F. Huertas-Pérez, Antonio González-Casado, Ana M. García-Campaña.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, (2005) 1-7.

7 A new strategy for the chemiluminescent qualitative analysis of total N-methylcarbamate content in water.

Jorge J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia, A.M. García Campaña y L. Cuadros Rodríguez.

Analytica Chimica Acta 541 (2005) 113-118.

8 Determination of N-methylcarbamate pesticide in environmental samples based on the application of photodecomposition and peroxyoxalate chemiluminescent detection.

Jorge J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz Gracia, L. Cuadros-Rodríguez y J.L. Martínez Vidal.

Analytica Chimica Acta 524 (2004) 235-240.

9 Use of highly efficient Draper-Lin small composite designs in the formal optimisation of both operational and chemical crucial variables affecting a FIA-chemiluminescence detection system.

Laura Gámiz-Gracia, Jorge J. Soto Chinchilla, Ana M. García-Campaña.

Talanta 60 (2003) 523-534.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

1 A new method for the determination of carbaryl using photodecomposition and chemiluminescent detection in flow injection analysis, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, L. Cuadros Rodríguez y J.L. Martínez Vidal, VIII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field, La Coruña, 2003.

2 A comparative study of different strategies for the analysis of pesticide residues in vegetal food by chemiluminescent detection, J.F. Huertas Pérez, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, A. González Casado y L. Cuadros Rodríguez, VIII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field, La Coruña, 2003.

3 Development of a detection screening method of methylcarbamates using the peroxyoxalate chemiluminescence reaction in flow injection analysis, J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia, L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña y J.L. Martínez Vidal, XXXIII Colloquium Spectroscopicum Internationale, Granada, 2003.

4 Quimioluminiscencia: Una nueva alternativa para la detección de residuos de plaguicidas en alimentos, A.M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, L. Gámiz Gracia, L. Cuadros Rodríguez, A. González Casado y J.L. Martínez Vidal, Jornadas Seguralimentaria, Madrid, 2003.

5 A new strategy for the chemiluminescent screening analysis of total n-methylcarbamate content in water, L. Gámiz Gracia, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña y L. Cuadros Rodríguez, Euroanalysis XIII, Salamanca, 2004.

6 Correction of systematic errors by applying recovery assays in chemiluminescence analysis, L. Gámiz Gracia, J.J. Soto Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez y A. González Casado, XI International Symposium on Luminescence Spectrometry, Pekín (China), 2004.

7 Sensitive simultaneous determination of sulfonamide residues in milk by HPLC using peroxyoxalate chemiluminescent detection, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, K. Imai y Luis E. García Ayuso, XI Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, 2005.

8 Design, development and validation of a home-made capillary electrophoresis instruments coupled with chemiluminescence detection, F.J. Lara, A.M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia, F. Alés-Barrero y J.M. Bosque Sendra, XI jornadas de análisis instrumental, Barcelona, 2005.

9 Chemiluminescence as detection system in pharmaceutical quality control and contaminant residue monitoring, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, J.J. Soto Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, F.J. Lara y W.R.G. Baeyens, I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada, Lima (Perú), 2005.

10 Determination of nine sulfonamides by capillary zone electrophoresis using large volume stacking, A.M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia y C.Cruces Blanco, 20th International Symposium on Microscale Bioseparations, Ámsterdam (Holanda), 2006

11 Determinación de residuos de sulfonamidas en carne y agua mediante electroforesis capilar usando preconcentración on-line, A.M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia y C.Cruces Blanco CIBSA 2006, Sevilla, 2006.

12 Application of peroxyoxalate system for the post-column chemiluminescent multiresidue detection of sulfonamides in milk by HPLC, J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz Gracia, A.M. García Campaña, K. Imai y L.E. García Ayuso, ISLS 2006, Lugo 2006.

13 Use of flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection for quality control of sulfonamides in pharmaceuticals, G. Lattanzio, V. Pardo Rodríguez, A.M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, C. Cruces Blanco y S. Girotti, ISLS 2006, Lugo 2006.

14 New strategies based on chemiluminescence for monitoring of residues in foods and for drug quality control, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, J.J. Soto Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, F.J. Lara y W.R.G., ISLS 2006, Lugo, 2006.

15 Determination of Ten Sulfonamides and Trimethoprim by CE-MS and CE-MS/MS in meat and ground water samples, J.J. Soto Chinchilla, A.M. García Campaña, L. Gámiz Gracia, 15th Internacional Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, París, (Francia), 2006.

16 Nuevas aportaciones al análisis de residuos de sulfonamidas y quinolonas en alimentos de origen animal, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, F.J. Lara, L. Gámiz-Gracia, II Jornada-Científico-Técnica sobre Residuos de Antibióticos en Alimentos

GLOSARIO

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de la varianza
BGE	Electrolito de fondo
BPA	Buenas Practicas de agricultura
CE	Electroforesis Capilar
CL	Quimioluminiscencia
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CZE	Electroforesis Capilar Zonal
DNPO	Bis(2,4-dinitrofenil) oxalato
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EOF	Flujo electroforético
ESI	Ionización por electrospray
EU	Unión Europea
FAO	Organización para la alimentación y la agricultura
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Análisis por inyección en flujo
FR	Fluorescamina
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
i.d.	Diámetro Interno
I.S.	Estándar interno
IDAT	Ingestión diaria admisible temporal
IDA	Ingestión diaria admisible
IDTP	Ingestión diaria tolerable provisional
LD	Límite de detección
LLE	Estracción líquido-líquido
LMR	Límite Máximo de Residuos
LQ	Límite de cuantificación
LVSS	Apilamiento de muestra de gran volumen
MA	Metilamina
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética

MS	Masas
NAC	N-acetilcisteina
NMC	N-metilcarbamatos
NSM	Modo normal de apilamiento
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA	Orto- ftalaldehido
PABA	Ácido p-Aminobenzoico
PLE	Extracción con liquido presurizado
PO	Peroxióxalatos
RSD	Desviación estándar relativa
SAX	Intercambio ionic fuerte
SCP	Sulfaclopiridazina
SDM	Sulfadimetoxina
SDS	Docecilsulfato sódico
SDX	Sulfadoxin
SDZ	Sulfadiazina
SIA	Análisis por inyección secuencial
SMI	Sulfametizol
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfameter
SMX	Sulfametoxazol
SMZ	Sulfametazina
SPD	Sulfapiridina
SPE	Extracción en fase sólida
TCPO	Bis(2,4,6-triclorofenil) oxalato
TDPO	Bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadeciloxicarbonil) fenil] oxalato
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMP	Trimetoprim
UV/Vis	Ultravioleta/visible