

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS
AMBIENTAL, ALIMENTARIO Y CLÍNICO MEDIANTE FIA,
HPLC Y CE CON DIVERSOS TIPOS DE DETECCIÓN
ESPECTROSCÓPICA**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ FERNANDO HUERTAS PÉREZ
GRANADA, 2008

**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS
AMBIENTAL, ALIMENTARIO Y CLÍNICO MEDIANTE FIA,
HPLC Y CE CON DIVERSOS TIPOS DE DETECCIÓN
ESPECTROSCÓPICA.**

por

JOSÉ FERNANDO HUERTAS PÉREZ

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de **Doctor Europeo en Química.**

Fdo.- **José Fernando Huertas Pérez.**
Licenciado en Ciencias Químicas.

VISADO en Granada, a 22 de Febrero de 2008

Los directores de la Memoria,

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

Fdo.- **Prof. Dr. Antonio González
Casado**, Profesor Titular 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, y responsable del grupo de investigación “Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica” (FQM-302),

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral, con el título: **“DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA ANÁLISIS AMBIENTAL, ALIMENTARIO Y CLÍNICO MEDIANTE FIA, HPLC Y CE CON DIVERSOS TIPOS DE DETECCIÓN ESPECTROSCÓPICA”**, ha sido realizado bajo mi dirección y la del Prof. D. Antonio González Casado, ambos del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 22 de Febrero de 2008.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca para estudios de postgrado en el área “Medio Ambiente y Sostenibilidad” de “**La Fundación La Caixa**”, al apoyo del grupo FQM-302 “Calidad en Química Analítica Ambiental, Alimentaria y Clínica”, 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).
- “Nuevas estrategias basadas en técnicas miniaturizadas acopladas con detección por fluorescencia y espectrometría de masas para el control de pesticidas y fármacos en muestras ambientales”. (Ref: CTM2006-06363, Ministerio de Educación y Ciencia).
- “Development of a detection method for the analysis of tranexamic acid in blood” (Ref.: lcvu001286, LCVU-Laser Center, Vrije Universiteit Amsterdam).

**A MIS PADRES, ANTONIO Y MERCEDES,
A MI ABUELA MERCEDES,
A M^a JESÚS.**

AGRADECIMIENTOS

Hace mucho tiempo que soñaba con sentarme a escribir la última parte de esta Memoria, los agradecimientos. Lo cierto es que ahora que ha llegado el momento y me dispongo a hacerlo, al mirar atrás y recordar a toda la gente que me ha acompañado durante esta aventura, no sé ni cómo ni por donde empezar.

Como es lógico, he de comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a los Directores de esta Tesis, los Profesores Ana María García Campaña y Antonio González Casado, por el esfuerzo y dedicación que les ha supuesto la tutela de esta Tesis, por su apoyo, enseñanzas y orientaciones sin los que hubiera sido imposible la realización de la misma. De manera especial, a Ana le agradezco profundamente la confianza que desde un primer momento depositó en mí, y que me brindara la oportunidad de formar parte de su equipo.

Me gustaría extender estas primeras palabras de agradecimiento a la Dra. Laura Gámiz Gracia. De su mano inicié mi andadura por el laboratorio, y a ella debo gran parte de lo que he aprendido a lo largo de estos años. Thanks!

Quiero expresar un agradecimiento especial al Prof. Willy R.G. Baeyens y al Dr. Thomas de Beer de la Universidad de Gante, por toda la ayuda que nos han prestado siempre que lo hemos necesitado.

A todos los miembros del grupo FQM-302, especialmente a mis compañeros de laboratorio, de los cuales será imposible olvidarme. A los que ya "volaron" (M^a Carmen, Jorge) y a los que se quedan, mis queridos Isa y Manolo (aún no sé cómo hacías para arrancar siempre una sonrisa). A Carolina, y por supuesto a los excelentes nuevos fichajes (Esaú, David y Guiuseppe). A todos mil gracias por haber estado ahí cuando os he necesitado, por haber compartido conmigo tantos momentos (buenos a veces, otros tan...amargos). A todos los estudiantes que han ido pasando por el laboratorio, Pietro, Mari Ángeles, Virtu, Edyta, Marzana, Magda...

Por que no sólo de ciencia vive "el menda" y por que no estamos locos, doy las gracias al Dr. Alejandro Lapresta Fernández, por todo su aporte y su soporte. Esto no hubiera sido posible sin esos "cafeses" y las horas dedicadas a superar tantas...¿desavenencias?; por tu amistad y por que sé que en ningún momento he caminado solo. Sin duda, prefiero una aproximación tuya al cálculo exacto de otro!

Unas gracias mayúsculas van para mis cuatro poetas de la locura: la Dra. Ana López Montes (gracias por todo lo que me has enseñado sobre "pintu-mentos"), y a los Sres. D. José Manuel Ramos Fernández (¡Poeta de cañería!), D. Enrique Ramos Fernández y D. Emilio López López. Por vuestras elevadas dosis de comprensión en tantas conversaciones tan políticamente incorrectas, por los sabios consejos que (vaso en mano) siempre me dais y por estar siempre dispuestos a echarme una mano, con lo que sea. Espero que cuando seáis alguien no olvidéis lo que tantas veces nos hemos repetido: *"lo primero es ser persona", "la verdad te hace libre"...*

Al resto de compañeros del "Depar", Inma, Carolina, Bea (Shaki), David, Sonia, Silvia, Ale, Alfonso, Adela, Ana, Roci, Clara, Younes, López, Miguel...gracias por haber hecho más agradables las horas de trabajo (y las de no trabajo!!). De manera especial me gustaría agradecer a Julio Ballesta y Arnold Goffin las interesantes conversaciones sobre ciencia que hemos mantenido, las palabras de aliento y estímulo que en muchas ocasiones fueron pieza clave para poder tirar "pa lante", y toda la ayuda que con lo que necesitaba siempre me prestaron.

I want to express my most sincere thanks to Prof. Cees Gooijer and Dr. Freek Ariese from Vrije Universiteit Amsterdam, for introducing me into the exciting field of phosphorescence and fluorescence detection, for a great supervision and many interesting discussions throughout the time that I spent at the ACAS group. (Also, for your support outside the lab and the time you took to show me around Amsterdam and some beautiful parts of The Netherlands).

I also would like to thank Prof. Jan Lankelma and Dr. Henk Dekker from the VU Medical Centre for their aid and great collaboration. To my college Michal Heger from Medical Centre (University of Amsterdam), who started the TA project. Thanks, because I learnt a lot working with all of you.

Johannes Hoos and Hans Krabbe not only for their theoretical and practical assistance in the lab, but also for their friendship and warm welcome. Pim Voogt and Joost Buijs for their technical support, and to the rest of the team I met at the ACAS department, Joost, Lineke, Ivonne, Mark, Niels, Evtim, Silvia, Diego, Alois... To Carol, Rose, Osmar. Thanks for your hospitality and good humour.

A la Dra. Eva Almansa, a D. Ignacio Centeno y a todos mis compañeros del Centro de Instrumentación Científica (no doy nombres, que sois muchos!), por su interés, ayuda y cooperación que, durante este último año y medio, ha hecho más fácil simultanear este trabajo con el desarrollo de la Tesis. También a mis compañeros, los Becarios de Calidad, aleatoriamente a José Claudio, Elisa, Elia, Ana, Macarena, Estrellita...

A vosotros que sois parte de mi fortuna personal, gracias por estar siempre al pie del cañón, por contagiarme con vuestra alegría y por hacer que la palabra amistad cobre sentido cuando pienso en alguno de vosotros (perdonad que, a pesar de todo lo acontecido últimamente, haya estado tan ausente!): A José Carlos y M^a José, Alex, Javi (Z) y Ana, Juan Antonio, Lidia, Víctor y Salvia, Javi (Bola) y Teresa, Juan Carlos y Rosa, José Luís (our brother-in-law!) y Rosa, Sonia, "los chaveas" (DaviLillo y Samuel), Sergio, Javi (Sierra) y Pedro, Pablo. A todos gracias.

A mis amigos de la infancia y de la adolescencia; es evidente que si ellos no me hubieran acompañado durante "aquellos maravillosos años" yo no sería el mismo. Por la amistad y cariño que después de tantos años seguimos manteniendo, a Alfredito, Armando, Michu, Nico...por nombrar sólo a algunos.

A mis padres, Antonio y Mercedes, por su constante sacrificio y dedicación, por la comprensión y paciencia con la que me tratan, por apoyarme en todas mis decisiones, por...todo; también (por qué no) por su ayuda económica cuando escaseaba la financiación, y que ha hecho posible que hoy todos estemos leyendo estas líneas.

A mi Súper-abuela Mama-Yeyes (sé que esto te ha quitado tantas horas de sueño como a mí), a mis hermanos Jesús y Yeyitas (María Mercedes), y a mi cuñado Luisito. Al resto de los miembros de mi familia: mis tíos Rafael y Encarnita, Elisa, Fernando y Josefina, y a mis primas Elisa, Inmaculada y Miriam; aunque sé que alguno aún no entiende bien a que dedicaba tantas horas en la "facu" (quizás por no saber transmitirlo adecuadamente), gracias por esos ratos y reuniones en los que con vosotros, desconectaba de todo. Por vuestro cariño, gestos y palabras de ánimo, y por procurar siempre lo mejor para mí. A mi sobrina Sarita, que me ayudaba sin saberlo, con sólo una sonrisa y su mirada inocente.

Al abuelo, D. Andrés, a Paqui, Luís, Tere y Esteban, a Isa, Michel, José, Francis, Andrés (a los dos), a Paco y al resto de los y las "sobris" y a toda la gente de Úbeda city por el interés y afecto mostrado.

Los últimos son los primeros. Por ello, he reservado estas líneas para M^a Jesús, mi as de corazones. Parecía que nunca iba a llegar, pero al fin lo hemos conseguido!!!. Gracias por estar siempre a mi lado, incondicionalmente, por hacer tuyas mis alegrías, júbilos y triunfos; también mis tormentos e irritaciones (*purificas el aire!*). Por tu paciencia, comprensión, por tu "siempre estar ahí para lo que sea", y en definitiva por hacer de mí una mejor persona.

A todos gracias, y que la Fuerza os acompañe.

José Fernando (Fefo).

***No existen los límites,
sólo nuestros miedos nos detienen.***

(Yoda, Maestro Jedi)

ÍNDICE

OBJETO DE LA MEMORIA	31
INTRODUCCIÓN.....	35
PARTE I: ASPECTOS RELACIONADOS CON LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS Y LAS METODOLOGÍAS APLICADAS	37
1. GENERALIDADES SOBRE QUIMIOLUMINISCENCIA.....	37
1.1. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE EN SISTEMAS FIA	40
1.2. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE EN HPLC.....	44
2. ELECTROFORESIS CAPILAR	50
2.1. COMPONENTES BÁSICOS DE UN SISTEMA CE	55
2.1.1. CAPILARES	57
2.1.2. SISTEMAS DE INYECCIÓN	58
2.1.3. SISTEMAS DE DETECCIÓN	60
3. USO DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS	64
3.1. USO DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN LA OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS	64
3.2. DISEÑOS FACTORIALES A DOS NIVELES	66
3.2.1. DISEÑO FACTORIAL 2^K	66
3.2.2. DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS A DOS NIVELES: 2^{K-P}	67
3.3. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	68
3.3.1. DISEÑOS CENTRALES COMPUESTOS.....	70
4. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	72
4.1. EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD	72
4.2. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN	75

4.3. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD	76
PARTE II: ASPECTOS RELACIONADOS CON LOS ANALITOS ESTUDIADOS	82
5. CONSIDERACIONES SOBRE PLAGUICIDAS	82
5.1. CONCEPTOS GENERALES SOBRE PLAGUICIDAS	83
5.1.1. RESIDUO DE PLAGUICIDA	86
5.1.2. BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN EL USO DE PLAGUICIDAS (BPA) ..	86
5.1.3. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDA (MRL)	87
5.1.4. INGESTIÓN DIARIA TOLERABLE PROVISIONAL (IDTP)	88
5.1.5. INGESTIÓN DIARIA ADMISIBLE (IDA)	88
5.1.6. INGESTIÓN DIARIA ADMISIBLE TEMPORAL (IDAT)	89
5.1.7. MEDIDA DE LA TOXICIDAD DE UN PLAGUICIDA	89
6. CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBAMATOS	91
6.1. ACCIÓN DE LOS CARBAMATOS	91
6.2. DISTRIBUCIÓN Y TRANSPORTE EN EL MEDIOAMBIENTE	92
6.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CARBAMATOS	94
6.4. CARBARIL	95
6.4.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS	96
6.4.2. EFECTOS ECOLÓGICOS	98
6.4.3. DESTINO AMBIENTAL	99
6.4.4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	99
6.5. CARBOFURANO	100
6.5.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS	100
6.5.2. EFECTOS ECOLÓGICOS	101
6.5.3. DESTINO AMBIENTAL	102
6.5.4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	102
6.6. METIOCARB	103
6.6.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS	103
6.6.2. EFECTOS ECOLÓGICOS	104
6.6.3. DESTINO AMBIENTAL	105
6.6.4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	105

7. CONSIDERACIONES SOBRE HERBICIDAS	107
7.1. METRIBUZIN	109
7.1.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS.....	110
7.1.2. EFECTOS ECOLÓGICOS	111
7.1.3. DESTINO AMBIENTAL	112
7.1.4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	113
8. CONSIDERACIONES SOBRE EL ÁCIDO TRANEXÁMICO.....	114
8.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	114
8.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN.....	114
8.1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	114
8.1.3. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	115
8.1.4. INCOMPATIBILIDADES	116
8.2. ÁCIDO TRANEXÁMICO COMO ADYUVANTE EN EL TRATAMIENTO DEL HEMANGIOMA PLANO (<i>NEVUS FAMMEUS</i> O MANCHA DE VINO DE OPORTO)	116
8.2.1. LIPOSOMAS COMO SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS	119
8.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	121
8.2.3. LIPOSOMAS "STEALTH" O ESTÉRICAMENTE ESTABILIZADOS	122
8.2.4. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS.....	123
9. REFERENCIAS.....	124
 CHAPTER 1. SENSITIVE DETERMINATION OF CARBARYL IN VEGETAL FOOD AND NATURAL WATERS BY FLOW INJECTION ANALYSIS BASED ON THE LUMINOL REACTION.....	133
 RESUMEN.....	135
 SUMMARY	135
 1. INTRODUCTION	137
 2. EXPERIMENTAL.....	144

2.1. APPARATUS.....	144
2.2. CHEMICALS AND REAGENTS.....	145
2.3. PREPARATION OF STANDARD SOLUTIONS	145
2.4. GENERAL PROCEDURE AND POSSIBLE MECHANISM.....	146
2.5. SAMPLE PREPARATION PROCEDURES.....	148
3. RESULTS AND DISCUSSION	149
3.1. SELECTION OF THE OXIDANT AND CONTINUOUS-FLOW ASSEMBLY.....	149
3.2. OPTIMISATION OF THE METHOD.....	149
3.2.1. OPTIMISATION OF CHEMICAL VARIABLES	150
3.2.2. OPTIMISATION OF INSTRUMENTAL VARIABLES.....	154
3.3. ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS	158
3.4. ANALYTICAL APPLICATIONS.....	160
4. CONCLUSIONS	163
5. REFERENCES.....	164
CHAPTER 2. CHEMILUMINESCENCE DETERMINATION OF CARBOFURAN AT TRACE LEVELS IN LETTUCE AND WATERS BY FLOW INJECTION ANALYSIS.....	169
RESUMEN	171
SUMMARY.....	171
1. INTRODUCTION.....	173
2. EXPERIMENTAL	174

2.1. APPARATUS.....	174
2.2. CHEMICALS AND REAGENTS	175
2.3. GENERAL PROCEDURE.....	175
2.4. SAMPLE PREPARATION.....	176
3. RESULTS AND DISCUSSION	178
3.1. OPTIMISATION OF THE METHOD	178
3.1.1. SCREENING OF THE SELECTED VARIABLES.....	178
3.1.2. OPTIMISATION OF THE SIGNIFICANT VARIABLES	180
3.2. ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS	183
3.3. INTERFERENCE STUDY	186
3.4. ANALYTICAL APPLICATIONS	188
4. CONCLUSIONS	190
5. REFERENCES.....	191
CHAPTER 3. DETERMINATION OF N-METHYLCARBAMATE PESTICIDES IN WATER AND VEGETABLE SAMPLES BY HPLC WITH POST-COLUMN CHEMILUMINESCENCE DETECTION USING THE LUMINOL REACTION ...	193
RESUMEN.....	195
SUMMARY	196
1. INTRODUCTION	197
2. EXPERIMENTAL.....	199
2.1. CHEMICALS AND REAGENTS	199

2.2. INSTRUMENTATION AND SOFTWARE.....	200
2.3. GENERAL PROCEDURE	202
2.4. SAMPLE PREPARATION PROCEDURES.....	203
2.4.1. WATER SAMPLES.....	203
2.4.2. VEGETABLE SAMPLES	204
3. RESULTS AND DISCUSSION	206
3.1. OPTIMISATION OF THE METHOD.....	206
3.1.1. CONFIGURATION OF THE POST-COLUMN CL ASSEMBLY.....	206
3.1.2. MOBILE PHASE	207
3.1.3. OPTIMISATION OF THE POST-COLUMN CL REACTION.....	208
3.1.3.1. OPTIMISATION OF THE CHEMICAL VARIABLES	209
3.1.3.2. OPTIMISATION OF INSTRUMENTAL VARIABLES	213
3.2. CALIBRATION CURVES AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	216
3.3. ANALYTICAL APPLICATIONS.....	226
3.3.1. ANALYSIS OF WATER SAMPLES	226
3.3.2. ANALYSIS OF CUCUMBER SAMPLES.....	229
4. CONCLUSIONS	231
5. REFERENCES.....	232
CHAPTER 4. DETERMINATION OF THE HERBICIDE METRIBUZIN AND ITS MAJOR CONVERSION PRODUCTS IN SOIL BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY	235
RESUMEN	237
SUMMARY.....	238
1. INTRODUCTION.....	239
2. EXPERIMENTAL	243

2.1. CHEMICALS	243
2.2. STABILITY OF SOLUTIONS	244
2.3. INSTRUMENTATION	246
2.4. ELECTROPHORETIC PROCEDURE	246
2.5. SAMPLE PREPARATION PROCEDURE	247
2.5.1. EXTRACTION PROCEDURE	248
2.5.2. PRECONCENTRATION AND CLEAN-UP OF EXTRACTS BY SPE	248
3. RESULTS AND DISCUSSION	249
3.1. OPTIMISATION OF PROPOSED METHOD.....	249
3.1.1. SELECTION OF THE CE MODE	249
3.1.2. EFFECT OF BUFFER PH.....	250
3.1.3. EFFECT OF SDS CONCENTRATION	252
3.1.4. EFFECT OF NATURE AND CONCENTRATION OF THE BACKGROUND ELECTROLYTE	255
3.1.5. EFFECT OF ORGANIC MODIFIERS	257
3.1.6. EFFECT OF THE TEMPERATURE	257
3.1.7. EFFECT OF THE APPLIED VOLTAGE	260
3.1.8. OPTIMISATION OF THE INJECTION TIME	261
3.2. OPTIMISATION OF THE SAMPLE TREATMENT.....	263
3.3. CALIBRATION CURVES AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS	265
3.4. TRUENESS OF THE METHOD.....	269
3.5. SPECIFICITY	270
4. CONCLUSIONS	272
5. REFERENCES.....	273
CHAPTER 5. DETERMINATION OF TRANEXAMIC ACID IN BLOOD SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH FLUORESCENCE DETECTION.....	275

RESUMEN	277
SUMMARY	278
1. INTRODUCTION	279
2. EXPERIMENTAL	285
2.1. CHEMICALS AND REAGENTS	285
2.2. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TA-ENCAPSULATING LIPOSOMES	286
2.3. SAMPLE PREPARATION AND DERIVATIZATION	287
2.4. HEAT-INDUCED TA RELEASE FROM LIPOSOMES	288
2.5. INSTRUMENTATION AND HPLC-FL PROCEDURES	289
3. RESULTS AND DISCUSSION	291
3.1. OPTIMISATION OF THE HPLC SEPARATION	291
3.2. SELECTION OF AN INTERNAL STANDARD	293
3.3. OPTIMISATION OF THE LABELING REACTION	294
3.4. CALIBRATION CURVE AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS	296
3.5. STABILITY OF THE DERIVATIZED SAMPLES	298
3.6. TA RECOVERY FROM WHOLE BLOOD	300
3.7. HEAT-INDUCED TA RELEASE FROM LIPOSOMES	302
4. CONCLUSIONS	304
5. REFERENCES	306

CONCLUSIONES	309
PUBLICATIONS.....	315

OBJETO DE LA MEMORIA

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los Proyectos de Investigación que se han desarrollado a lo largo del transcurso de este trabajo y que forman parte de las líneas de investigación del grupo en el que se ha realizado. Así, se ha llevado a cabo la puesta a punto de nuevos métodos de análisis sensibles y selectivos para la determinación de residuos de plaguicidas (carbamatos) y herbicidas (metribuzin y sus productos de degradación) en muestras de aguas, alimentos vegetales y suelos. En el caso de los alimentos, la legislación vigente establece unos Límites Máximos de Residuos (MRLs) que no deben ser superados con objeto de garantizar la calidad del producto y permitir su distribución y consumo. En aguas y suelos es ampliamente conocido el interés que ha suscitado el control del nivel de residuos de plaguicidas y herbicidas que pueden encontrarse como resultado de los tratamientos de cultivos. Para ello en esta memoria se propone el empleo de técnicas relativamente 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.

Igualmente, la parte de la Tesis desarrollada en la Vrije Universiteit of Ámsterdam (laboratorios del *Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*, y *Department of Medical Oncology, VU Medical Centre*), con objeto de conseguir la mención de “Doctorado Europeo”, aborda el desarrollo de un método para la cuantificación del ácido tranexámico en sangre. Este método será empleado en estudios que permitan la mejora del tratamiento de hemangiomas capilares y otras anomalías vasculares, por lo que debe presentar como principales características robustez, selectividad y sensibilidad. Para ello se ha empleado la cromatografía líquida con detección fluorescente.

Así como objetivos específicos destacan:

1. Desarrollo de dos métodos FIA-CL para la determinación de carbaril y carbofurano respectivamente, en muestras de vegetales y aguas, empleando la reacción quimioluminiscente del luminol, dado que estos compuestos producen una exaltación de la emisión que permitirá su cuantificación.
2. Desarrollo de un método mediante HPLC-CL para la separación y cuantificación simultánea de tres N-metilcarbamatos en aguas y muestras vegetales, empleando la reacción del luminol.
3. Propuesta de un método para la cuantificación del herbicida metribuzin y sus productos de degradación mediante cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC), con objeto de demostrar la utilidad de esta técnica en su aplicación al control de estos residuos en suelos.
4. Establecimiento de un método para la cuantificación del ácido tranexámico mediante cromatografía líquida con detección fluorescente, previa formación de un derivado que permita su sensible y selectiva detección en una matriz tan compleja como es la sangre.

INTRODUCCIÓN

PARTE I: ASPECTOS RELACIONADOS CON LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS Y LAS METODOLOGÍAS APLICADAS

1. GENERALIDADES SOBRE QUIMIOLUMINISCENCIA

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^{1,2}.

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 ultratrazo 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^{3,4} tales como FIA⁵, o en técnicas separativas como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)^{6,7}, la Electroforesis Capilar (CE)^{7,8,9} y la Cromatografía de Gases (GC)¹⁰, combinando la eficacia separativa 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 aminos, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, esteroides, lípidos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas y compuestos de interés farmacéutico y toxicológico) implicando la participación de estos analitos en las reacciones quimioluminiscentes como oxidante, cofactor, catalizador o fluoróforo².

Algunos artículos de revisión recientes recogen los aspectos generales de la detección quimioluminiscente y las tendencias actuales^{11,12,13,14}, así como su aplicación al análisis orgánico¹⁵, de plaguicidas¹⁶ o en el ámbito del análisis farmacéutico y biomédico^{17,18,19}.

Entre las reacciones quimioluminiscentes en fase líquida cabe destacar las siguientes²⁰:

a) Quimioluminiscencia directa: Incluye varios tipos de reacciones, como son:

- I. 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. Esta reacción, que se muestra en la Figura 1, es la utilizada en los métodos analíticos propuestos en los capítulos 1, 2, y 3 de esta Memoria.

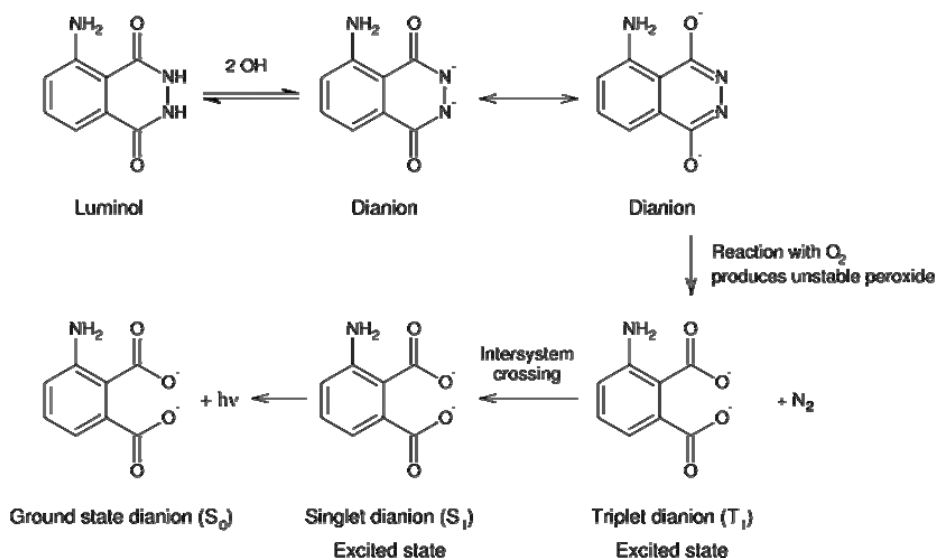


Figura 1. Reacción de oxidación del luminol en medio básico.

II. Reacciones de oxidación que utilizan como precursores quimioluminiscentes ésteres de acridinio en medio básico, fundamentalmente la lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio).

III. 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.

b) 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.

1.1. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE EN SISTEMAS FIA

El análisis por inyección en flujo (FIA) se clasifica entre las técnicas automáticas de análisis como de flujo no segmentado^{21,22,23,24} 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 en régimen de equilibrio. Las características más destacables de la técnica son su versatilidad, rapidez, precisión y bajo precio del dispositivo instrumental.

En resumen, las cuatro características esenciales del FIA son:

- (a) Flujo no segmentado.
- (b) Inserción directa de la muestra.
- (c) Dispersión parcial controlada.
- (d) 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^{21,22,23,24,25,26}, son las siguientes:

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

En cuanto al empleo de la detección CL en FIA, 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.

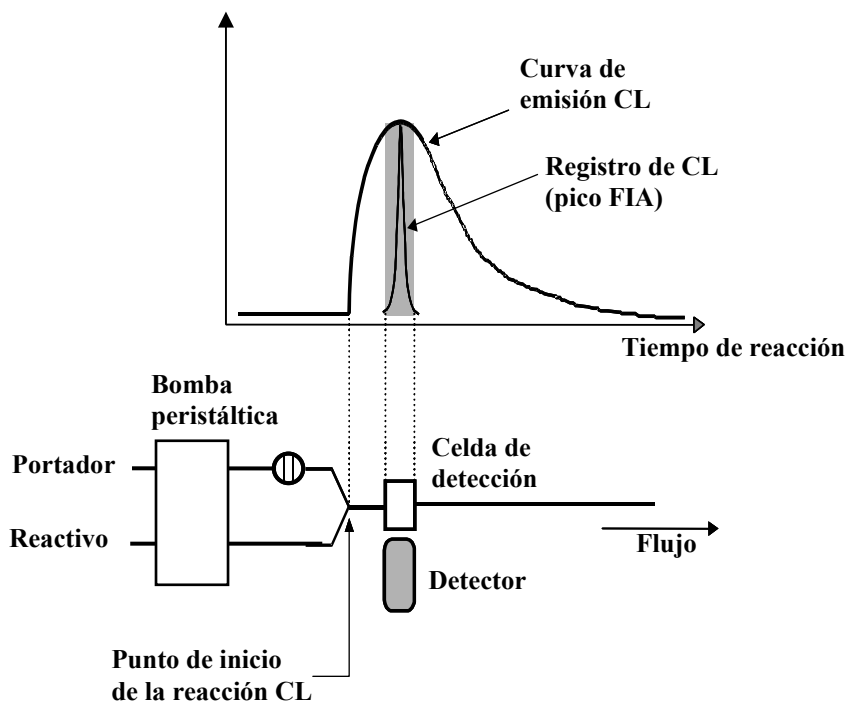


Figura 2. Registro de la señal transitoria CL en un sistema FIA-CL.

En cuanto a los aspectos prácticos que afectan el acoplamiento FIA-CL, hay que tener en cuenta los siguientes²⁷:

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

b) *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.

c) *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.

d) *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.

e) *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 μ l 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.

1.2. DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE EN HPLC

En el Capítulo 3 de esta Memoria se ha empleado el acoplamiento HPLC-CL, empleando la reacción del luminol, comentada en el apartado anterior. 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. Así, como ejemplo, se encuentran aplicaciones recientes en HPLC del sistema luminol para el análisis de peróxidos orgánicos²⁸, corticosteroides en riñón y orina^{29,30}, trans-reverastrol en vinos³¹, o aplicaciones del sistema de los POs en alcaloides³², peróxidos orgánicos³³, catecolaminas³⁴, bisfenol A³⁵ o quinonas³⁶.

En diferentes publicaciones de nuestro grupo de investigación se recogen las aplicaciones del acoplamiento HPLC-CL al análisis de plaguicidas^{16,37}, y en el primer capítulo relativo a la determinación de carbamatos se comentan en particular las aplicaciones en este ámbito del sistema del luminol.

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.

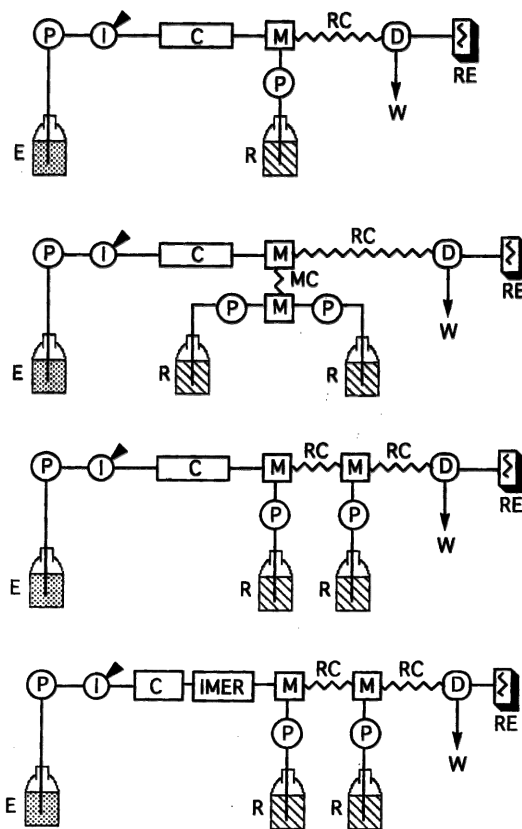


Figura 3. Diversas configuraciones para el acoplamiento HPLC-CL. P: bomba; I: inyector; C: columna; M: confluencia para mezcla; D: detector; RC: reactor; MC: tubo de mezcla; RE: registro; E: eluyente; R: reactivo; W: desecho; IMER: reactor enzimático inmobilizado⁶.

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 sistema⁶:

- *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^{38,39,40,41}.

- *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 µl. 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 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.

- 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, afectando por tanto a la sensibilidad y la reproducibilidad, por lo que es preferible trabajar a temperatura constante⁴².

- La naturaleza de los *disolventes orgánicos* empleados puede afectar a la eficacia de las reacciones, principalmente al sistema de los POs.

- El *pH*, las *especies iónicas* presentes o la *fuerza iónica* también pueden afectar la reacción CL, por lo que la elección de los tampones empleados, su concentración y pH es de gran importancia en estos sistemas.

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.

2. ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis Capilar (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^{-1}) 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^{43,44,45,46,47} y la técnica ha demostrado su potencialidad en aplicaciones muy diferentes. Algunos artículos de revisión recogen su aplicación reciente en el ámbito del análisis de fármacos⁴⁸, de biopolímeros⁴⁹, antibióticos en alimentos, muestras biológicas o medioambientales^{50,51,52,53,54}, plaguicidas^{52,55,56,54}, péptidos y proteínas⁵⁷, toxinas⁵⁴, compuestos de interés forense⁵⁸, 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 electroósmosis⁵⁹.

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 es la velocidad con la que se mueven las especies cargadas) e inversamente proporcional a la longitud total del capilar (L)^{60,61,62}.

$$V_e = \frac{\mu_e \cdot V}{L} \quad (\text{Ec. 1})$$

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.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{Ec. 2})$$

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 100 platos teóricos.

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

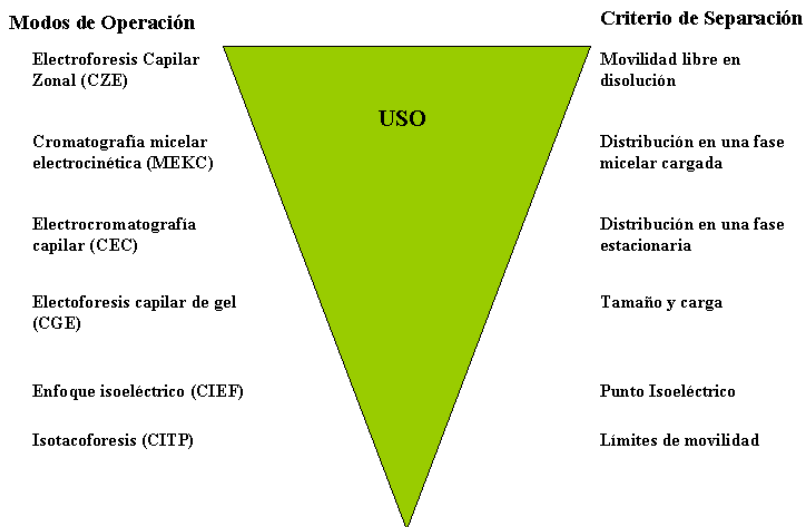


Figura 4. Modos de operación en CE.

La modalidad más simple en CE se conoce con el nombre de *electroforesis capilar en zona* (CZE). 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

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

En esta memoria, la modalidad utilizada ha sido la *cromatografía electrocinética micelar* (MEKC). En esta modalidad, que permite la separación de moléculas tanto cargadas como neutras, se emplean disoluciones micelares de surfactantes iónicos en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica. En MEKC, existe dos fases, la acuosa y la micelar (fase pseudoestacionaria), ambas en movimiento, y la separación se basa en las diferencias en la interacción de cada uno de los analitos con las micelas presentes en la disolución tampón. Se trata de un modo de separación que combina el mecanismo de separación de la cromatografía con los movimientos electroforéticos y electroosmóticos de los solutos y las disoluciones.

2.1. 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). Normalmente los componentes básicos son⁵⁹:

- a) Fuente de alto voltaje.
- b) Electroodos.
- c) Viales de entrada, de salida y de muestra.
- d) Capilar.
- e) Sistema de inyección de muestra.
- f) Sistema de detección.
- g) 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 otros⁶³.

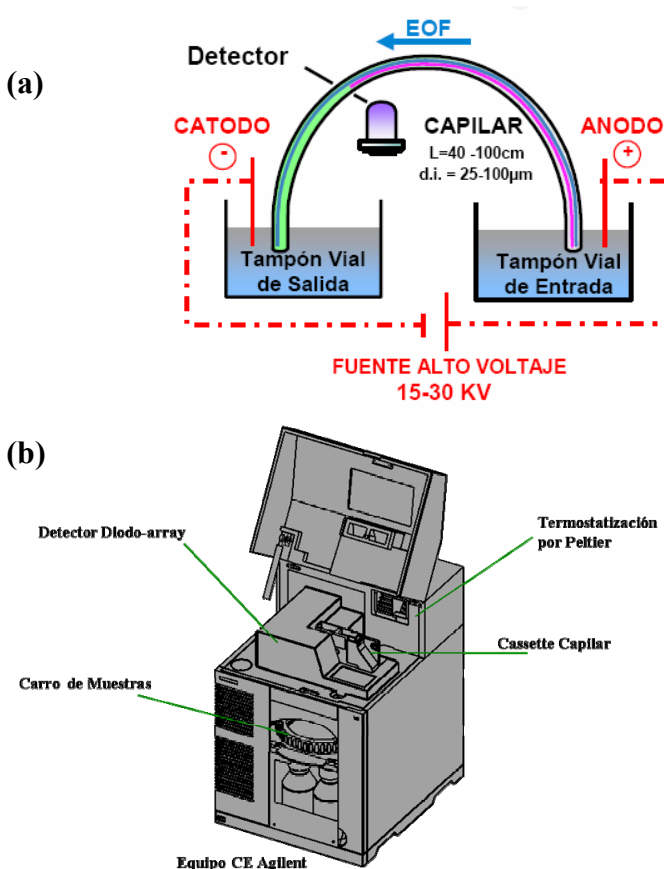


Figura 5. (a) Componentes básicos de un equipo de CE; (b) ejemplo de equipo comercial.

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

2.1.1. 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 poliiimida, 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.

2.1.2. 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.

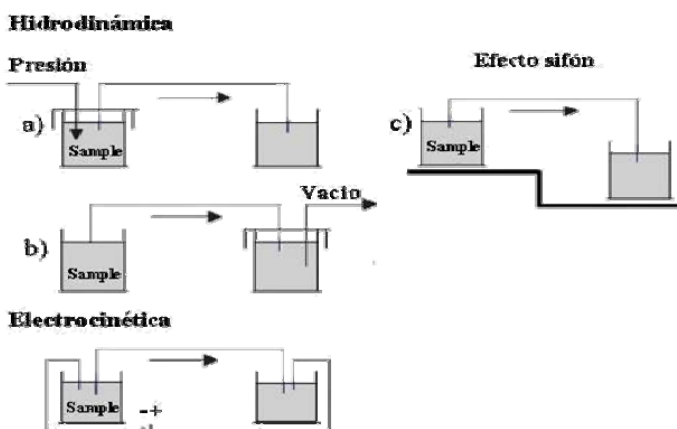


Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de inyección en CE.

- *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,

$$vol = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (\text{Ec. 3})$$

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

solos 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.

2.1.3. 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.

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

Técnica	Comentarios
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, utilizado en la presente Memoria, 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. 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.

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.

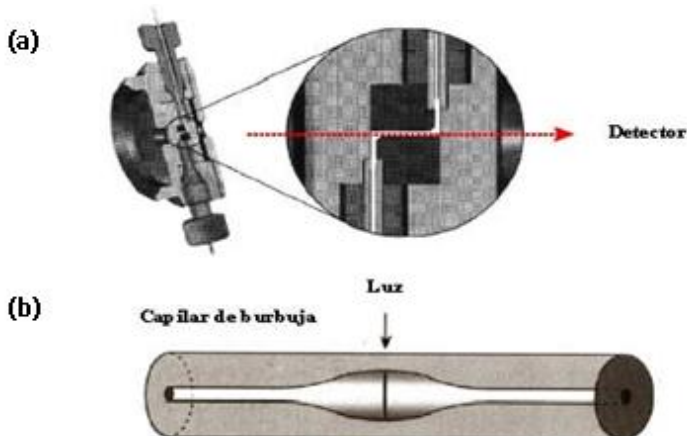


Figura 7. Celda de flujo de alta detección (a) y capilar burbuja (b).

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.

3. USO DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL DISEÑO Y ANÁLISIS DE EXPERIMENTOS

3.1. 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 obtenidos⁶⁴.

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 sistema⁶⁵. 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.

En el diseño de experimentos es frecuente realizar la experimentación en varias etapas. En una primera etapa se suelen emplear los *diseños de cribado* (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 ($P > 0.05$).

3.2. DISEÑOS FACTORIALES A DOS NIVELES

3.2.1. 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 aún 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)⁶⁶.

Al estar basado en los modelos de primer orden, representa generalmente planos inclinados en lugar de superficies de respuesta conteniendo un máximo⁶⁷.

3.2.2. DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS A DOS NIVELES: 2^{k-p}

El número de experimentos que requiere un diseño factorial 2^k completo aumenta geoméricamente al crecer k . Cuando k es grande la información deseada se puede obtener, casi siempre, realizando sólo una fracción del diseño factorial completo⁶⁸. 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 cribado⁶⁸, donde el objetivo del diseño es el estudio de aquellas variables que pueden producir cambios significativos en la respuesta seleccionada. El éxito de su utilización se basa en tres ideas clave⁶⁵:

- a) *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.
- b) *La proyección*. Los diseños factoriales fraccionados pueden proyectarse en diseños más poderosos (más grandes), en el subconjunto de factores significativos.
- c) *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.

3.3. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

En la metodología de superficies de respuesta (RSM)⁶⁹ 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

$$R = a + bX + cY + dX^2 + eY^2 + fXY \quad (\text{Ec. 4})$$

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 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.

3.3.1. DISEÑOS CENTRALES COMPUESTOS

Uno de los modos más importantes de diseños para ajustar modelos de segundo orden consiste en los diseños centrales compuestos (CCD)⁷⁰. 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.

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.

- d) 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.

4. 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*⁷¹. 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.

4.1. 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*⁷¹. La evaluación de la veracidad consiste en estimar la concentración media del analito en una muestra y compararla con el valor 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. Igualmente es posible el empleo de ensayos de recuperación para evaluar la veracidad, estrategia adoptada en la presente Memoria.

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

$$\%R = \frac{C_{encontrada}}{C_{añadida}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

4.2. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN

La precisión mide el *grado de concordancia entre resultados independientes de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas*⁷¹. 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:

$$\text{RSD}(c) = 100 \cdot S_c / c \quad (\text{Ec. 6})$$

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 replicados⁷², y c el valor de la concentración considerada.

Asimismo, la precisión se puede expresar como RSD de la señal obtenida a partir 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 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*.

4.3. 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 calibrado⁷². Los parámetros a evaluar serán:

- Linealidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Selectividad
- Resolución analítica

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).

También puede definirse como⁷³:

- Linealidad “In-line“: se refiere al ajuste a la línea recta (bondad del ajuste) de los valores de señales analítica obtenidas experimentalmente para cada concentración de analito. Describe la ausencia de curvatura de la recta de calibrado. (Valor-P del Test del fallo de ajuste).

- Linealidad “On-line“: Indica el grado de dispersión de los datos en torno a la recta de calibrado. Un bajo grado de linealidad “on-line“ implica que no es posible distinguir con exactitud la curvatura mediante el Test de fallo de ajuste,

$$\text{LIN}_{\text{OL}} (\%) = 100 \cdot [1 - \text{DER}(b)] \quad (\text{Ec. 7})$$

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 11843⁷⁴ 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 IUPAC⁷⁵, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{LD} = \Delta_{\alpha,\beta} \cdot S_{\text{C0}} \quad (\text{Ec. 8})$$

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

$$\Delta_{\alpha,\beta} = t_{gl,\alpha} + t_{gl,\beta} \quad (\text{Ec. 9})$$

si se considera igual probabilidad de error tipo I y tipo II ($\alpha = \beta = 5\%$), por lo que

$$\Delta_{\alpha,\beta} = 2 \cdot t_{gl,\alpha} \quad (\text{Ec. 10})$$

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 $\Delta_{\alpha,\beta}$ por 10,

$$LQ = 10 \cdot S_{C0} \quad (\text{Ec. 11})$$

En cuanto al cálculo de S_{C0} (desviación estándar del valor de concentración cero o blanco), se ha realizado de los siguientes modos:

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

$$S_{C0} = S_{R,0}/b \quad (\text{Ec. 12})$$

donde $S_{R,0}$ es la desviación estándar de las respuestas obtenidas para concentración cero. Este cálculo se ha empleado en los Capítulos 1 y 2 de la Memoria.

b) Otra posibilidad cuando no 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 calibrado⁷², que incluye los valores medidos de la señal del "blanco", dada por la expresión:

$$s_{C0} = \sqrt{\left(\frac{S_{R,c}}{b}\right)^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + RSD_b^2 \cdot c_m^2} \quad (\text{Ec. 13})$$

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.

c) 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 la regresión lineal únicamente a los valores de concentraciones bajos, próximos al valor esperado para el límite de detección, con objeto de realizar la extrapolación de forma más exacta⁷⁶, a partir de la ecuación anterior, considerando que el calibrado no incluye medidas a concentración cero.

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

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 interferencia⁷⁷.

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:

$$R \pm k \cdot S_R; (k = 2,3,6 \text{ ó } t_{2\alpha}) \quad (\text{Ec. 14})$$

calculando S_R a través de la expresión

$$s_R = \sqrt{s_{R,c}^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + s_b^2 \cdot (c - c_m)^2} \quad (\text{Ec. 15})$$

donde C es la concentración de analito considerada y C_m la concentración media de los puntos del calibrado. Los demás parámetros son los mismos de la Ec. 13.

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

$$R_x \in R \pm k \cdot S_R \quad (\text{Ec. 16})$$

Resolución Analítica. Se refiere a la capacidad de discriminación y puede definirse como la mínima variación en la concentración que un método analítico puede discernir. Se puede estimar de la siguiente manera:

a) A partir de réplicas de un valor de concentración:

$$\text{RES} = S_R/b \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde S_R es la desviación estándar de la respuesta para una concentración.

b) A partir del conjunto de datos del calibrado:

$$\text{RES} = S_{R,C}/b \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde $S_{R,C}$ es la desviación estándar de la regresión

PARTE II: ASPECTOS RELACIONADOS CON LOS ANALITOS ESTUDIADOS

5. CONSIDERACIONES SOBRE PLAGUICIDAS

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 controlar⁷⁸. 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 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.

5.1. 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^{79,80}. 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 el deterioro 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 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 acción⁷⁹:

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 continuación⁸¹.

5.1.1. 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.

5.1.2. 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 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.

5.1.3. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDA (MRL)

El MRL 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 MRLs se basan en datos de BPA y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos MRLs sean toxicológicamente aceptables.

Los MRLs 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 MRLs 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 MRLs del Codex son inocuos para el consumo humano. La legislación sobre los MRLs 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 MRLs 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 MRLs nacionales de los diferentes países de los Estados miembros, facilitando el funcionamiento del mercado interior, así como con terceros países.

5.1.4. 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 ambiente⁸².

5.1.5. 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 Plaguicidas⁸³. Se expresa en miligramos de sustancia química por kilogramo de peso corporal.

5.1.6. 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).

5.1.7. 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.

- DL₅₀ 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.

6. CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBAMATOS

6.1. 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 metilcarbamato⁸⁴.

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 principales⁸⁴:

a) 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.

b) Inhibidores de la enzima colinesterasa por carbamitación del sitio estérico de la enzima, e inhibidores de la acetilcolinesterasa ya que 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.

6.2. 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.

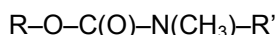
Las condiciones medioambientales que favorecen el crecimiento de microorganismos también favorecen la degradación de los carbamatos. El primer paso en la degradación metabólica de los carbamatos en suelo es su hidrólisis, y los productos de esta hidrólisis serán posteriormente metabolizados en el sistema 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 peces⁷⁹.

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

6.3. 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:

- *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-sustituidos 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 7⁷⁹.

La estructura química de los carbamatos estudiados en esta Memoria, se muestra en la Figura 8.

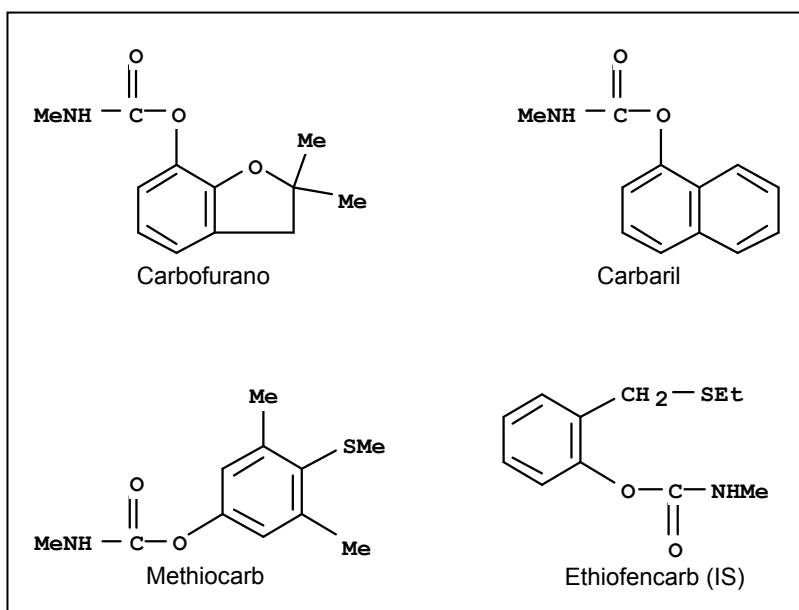


Figura 8. Estructura de los carbamatos estudiados en esta Memoria.

6.4. 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.

6.4.1. 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 contaminada⁸⁵.

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 carbaril⁸⁶. 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 Agencia para la Protección del Medioambiente de EE.UU. (EPA) ha concluido que el carbaril no produce un riesgo teratogénico a los humanos si se usa apropiadamente⁸⁷.

Efectos mutagénicos: Numerosos estudios indican que el carbaril supone un leve riesgo^{86,88}. 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. Esta puede ser una preocupación para los 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 ratas⁸⁹.

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 elevadas⁹⁰.

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.

6.4.2. 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.

6.4.3. 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.

6.4.4. 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 2.

Tabla 2. 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:	2.4 (25 °C)

6.5. CARBOFURANO

El carbofurano es un pesticida carbamato que elimina insectos, ácaros y nematodos por contacto o por ingestión. Es usado contra plagas de suelo o foliar en cultivos de fruta, vegetales y cultivos forestales. El carbofurano está disponible en líquido y formulaciones granulares.

6.5.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

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

Toxicidad aguda: Es altamente tóxico por inhalación e ingestión y moderadamente tóxico por absorción por la piel. El riesgo de la exposición de carbofurano es especialmente alto en personas con asma, diabetes, enfermedades cardiovasculares, obstrucción mecánica del tracto gastrointestinal o urogenital⁹¹. El contacto con la piel o los ojos puede causar quemaduras. Para trabajar con carbofurano, se requiere el uso de protección para los ojos y máscara. Los síntomas por intoxicación por carbofurano incluyen náuseas, vómitos, dolores abdominales, sudor, diarrea, excesiva salivación, debilidad, desequilibrio, vista borrosa, dificultad para respirar, hipertensión e incontinencia. La intoxicación por carbofurano podría resultar en muerte del individuo, debido a fallos en el sistema respiratorio⁹². Los carbamatos generalmente son excretados rápidamente y no se acumulan en tejidos de mamíferos. Si la exposición no es continuada, la inhibición de la colinesterasa se interrumpe rápidamente. En casos no muy graves, la intoxicación dura menos de 24 horas⁹¹.

Toxicidad crónica: La exposición prolongada o repetida al carbofurano podría causar los mismos síntomas que la exposición aguda. La EPA ha establecido un nivel máximo, que podría ser ingerido por una persona sin sufrir efectos sobre su salud, (LHA) de 40 ppb en aguas de consumo humano. Esto significa que una persona podría beber agua conteniendo carbofurano a este nivel o por debajo durante toda su vida sin efectos para su salud.

Efectos reproductores y teratogénicos: La ingesta diaria de 100 ppm de carbofurano en ratas disminuyó intensamente la habilidad de las crías para sobrevivir. No se han observado cambios fatales en hígado de cría de ratón⁹³. La cantidad mínima de carbofurano que produjo efectos teratogénicos en ratón fue 210 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (alimentado durante el embarazo).

Efectos mutagénicos: No se han observado efectos mutagénicos en animales o bacterias. Se han observado cambios genéticos en algas.

Efectos cancerígenos: Numerosos estudios en animales indican que el carbofurano no presenta riesgo de cáncer en humanos⁹⁴.

Efectos en seres humanos y animales: El carbofurano es pobremente absorbido por la piel. Es metabolizado en el hígado y finalmente excretado en la orina. La vida media es de 6 a 12 horas.

6.5.2. EFECTOS ECOLÓGICOS

El carbofurano es altamente tóxico en aves, provocando la muerte por ingesta de gránulos del plaguicida, o cuando aves depredadoras ingieren pequeñas aves o mamíferos que lo han ingerido⁹⁵. Es muy tóxico en faisán,

pollo, pato y codorniz. Puede ser teratogénico para rana, salmón, perca, bluegill y siluro.

6.5.3. DESTINO AMBIENTAL

El carbofurano es soluble en agua y tiene un moderadamente largo tiempo de vida media en suelo (3 - 60 días). Por tanto, tiene un alto potencial de contaminación de aguas subterráneas. En agua, el carbofurano se degrada mediante hidrólisis bajo condiciones básicas. La fotodegradación y los microbios acuáticos podrían también contribuir a la degradación. No se volatiliza cuando está en disolución acuosa ni es absorbido por sedimentos o partículas en suspensión. No es acumulable en sistemas acuáticos.

La vida media del carbofurano en plantaciones es de aproximadamente 4 días cuando se aplica en raíces y mayor cuando se aplica en las hojas.

6.5.4 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El carbofurano es un sólido cristalino inodoro. La descomposición térmica puede incluir óxidos tóxicos de nitrógeno.

Las propiedades físicas del carbofurano se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades físicas del carbofurano.

CAS :	1563-66-2
Nombre químico:	7-Benzofuranol, 2,3-dihidro-2,2-dimetil-, 7-(N-metilcarbamato)
Solubilidad en agua:	320 mg l ⁻¹ (25 °C)
Solubilidad en otros disolventes	Soluble en acetona, acetonitrilo, benceno, ciclohexano.
Punto de fusión:	150 - 153 °C
Presión de vapor:	2 10 ⁻⁵ mmHg (33°C)
log P:	1.76 (25 °C)

6.6. METIOCARB

El metiocarb es un insecticida, acaricida y molusquicida, usado para el control de caracoles, babosa, arañas e insectos en hierba, césped y decoración vegetal. Es particularmente efectivo en ácaros. Está disponible en gránulos y en bolitas/tabletas.

6.6.1. EFECTOS TOXICOLÓGICOS

A continuación se enumeran algunos términos relativos a la toxicidad del metiocarb⁹⁶.

Toxicidad aguda: Estudios con animales de laboratorio, indican que es altamente tóxico por la ruta oral, siendo clasificado como categoría de toxicidad I (el más alto de 4 niveles) para efectos orales agudos. Es moderadamente tóxico por inhalación y levemente tóxico por contacto con la piel, siendo

clasificado en las categorías II y III para estos efectos. No es irritante ni para los ojos ni para la piel.

Toxicidad crónica: En estudios de alimentación crónica en ratas y perros, el metiocarb causó inhibición de la colinesterasa en células rojas y plasma, pero no la colinesterasa en el cerebro. En el estudio con perros, a grandes dosis se debilitaron las extremidades traseras y los animales comenzaron a temblar.

Efectos mutagénicos: No parece tener potencial mutagénico. Administrado por ruta dérmica, presenta toxicidad en el desarrollo en conejos.

Efectos cancerígenos: Numerosos estudios en ratas indican que no es cancerígeno.

Efectos en seres humanos y animales: El metiocarb es extremadamente tóxico vía oral, pero de moderada a ligeramente tóxico por otras vías. Puede afectar al desarrollo.

6.6.2. EFECTOS ECOLÓGICOS

El metiocarb es tóxico para mamíferos terrestres. Es altamente tóxico en aves por vía oral. Estudios subcrónicos, han dado como resultado que es ligeramente tóxico en anfibios y crustáceos. Es altamente tóxico en peces de agua fría y caliente, y extremadamente tóxico en invertebrados acuáticos. También tóxico en abejas. Su toxicidad varía de alta a extremadamente alta para insectos y de ligera a alta para moluscos.

6.6.3. DESTINO AMBIENTAL

En el aire está presente como vapor y como partículas. El vapor es degradado en la atmósfera mediante reacciones con radicales hidroxilo. El tiempo de vida media para esta reacción se estima en 29 horas. Por su parte las partículas son eliminadas por precipitación húmeda y seca. Este compuesto es susceptible a la fotólisis directa con una vida media que varía de 6 a 16 días. En el suelo muestra una movilidad baja y puede ser degradado por acción de los microorganismos, bajo condiciones aerobias y anaerobias (vida media de 17 a 111 días y 64 días, respectivamente), o por acción de la luz (vida media de 4 a 9 días). En los cuerpos de agua se espera que se adsorba a los sólidos suspendidos y sedimentos o que sea eliminado por fotólisis (vida media de 23 minutos). La volatilización no es un destino ambiental importante para este compuesto. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es moderado.

6.6.4 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El metiocarb es un polvo cristalino blanco, con olor parecido al fenol. No es corrosivo.

Sus propiedades físicas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físicas del metiocarb.

CAS :	2032-65-7
Nombre químico:	4-metilo-3,5-xilil metilcarbamato
Solubilidad en agua:	27 mg l ⁻¹ (20 °C)
Solubilidad en otros disolventes	Soluble en diclorometano, isopropanol, tolueno y hexano.
Punto de fusión:	119 °C
Presión de vapor:	2.7 10 ⁻⁷ mmHg (25°C)
log P:	2.9 (25 °C)

7. CONSIDERACIONES SOBRE HERBICIDAS

Hoy en día, la agricultura depende en gran medida del uso de herbicidas para el control de malezas (plantas que crecen en un cultivo y que no corresponden a la especie o al genotipo cultivado). Las malezas están siempre presentes, compitiendo con el cultivo por luz, agua, nutrientes y espacio, y por tanto producen pérdidas de rendimiento físico y económico.

Los herbicidas son compuestos orgánicos, generalmente sintéticos, cuyas propiedades fisicoquímicas (masa molecular < 500 Da y lipofilidad) facilitan su entrada a la célula. Interfieren con procesos vitales de las plantas, y a veces de las bacterias, tales como por ejemplo la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos o la síntesis de ácidos grasos.

Idealmente, un herbicida no debe afectar al cultivo y debe ser fitotóxico contra sus principales malezas. Este aspecto se denomina selectividad y puede lograrse por mecanismos físicos o bioquímicos⁹⁷:

a) Los *mecanismos bioquímicos* implican la existencia de resistencia al herbicida por parte del cultivo, fenómeno natural que puede deberse a la presencia de alteraciones en el sitio blanco de acción del herbicida o a la capacidad metabólica de degradar el componente fitotóxico, es decir, las plantas tolerantes detoxifican al herbicida con suficiente rapidez como para evitar que cantidades fitotóxicas del ingrediente activo se acumulen en el simplasto. El metabolismo de los herbicidas involucra transformaciones que aumentan la solubilidad en agua y esto regularmente es seguido por la conjugación con azúcares o aminoácidos.

b) La *selectividad física* se basa en la diferencia de volumen de herbicida retenido por el cultivo y las malezas. Esto se relaciona al modo de aplicación, la estructura de la planta y las propiedades de las hojas de las malezas.

Los herbicidas pueden ser divididos atendiendo a varios criterios:

a) *Modo de aplicación:*

- I. Aplicados a la parte aérea de la planta:
 - Contacto: aquellos que se aplican al follaje y afectan solamente la parte tratada.
 - Sistémicos: aquellos que se trasladan del follaje tratado hacia un punto de acción en otro lugar de la planta se denominan herbicidas sistémicos.
- II. Aplicados al suelo: generalmente afectan la germinación de las malezas, y tienen que persistir por algún tiempo para ser efectivos, denominándose herbicidas residuales.

Algunos herbicidas residuales tienen acción de contacto y afectan a las raíces y los tallos en la medida en que emergen de la semilla, mientras que otros entran en la raíz y las partes subterráneas de la planta y se trasladan a su punto de acción.

b) *Tiempo de aplicación:*

- I. Antes de la siembra del cultivo: pre-siembra.
- II. Después de la siembra del cultivo: pre-emergencia y post-emergencia.

c) *Modo de acción:*

- I. Inhibidores de la síntesis de aminoácidos.
- II. Inhibidores de la fotosíntesis.
- III. Inhibidores de la síntesis de lípidos.
- IV. Inhibidores de la síntesis de pigmentos.
- V. Reguladores de crecimiento de tipo auxínico.
- VI. Inhibidores de la división celular.

7.1. METRIBUZÍN

El metribuzín es un herbicida selectivo sistémico que pertenece a la familia de las triazinonas, y es utilizado para controlar el crecimiento de pasturas anuales y malezas de hoja ancha, entre otras, en plantaciones de soja, patata, tomate y zanahoria, caña de azúcar, alfalfa, espárragos y cereales a 0.07-1.05 kg a.i./ha. Es comercializado principalmente con los nombres Lexone y Sencorex.

En lo que respecta a su mecanismo de acción, el metribuzín es absorbido por las raíces y el follaje de las malezas. Cuando se aplican al suelo es absorbido por el sistema radical y rápidamente transportado hacia las hojas, vía apoplasto (xilema). Cuando se aplica al follaje se comporta como herbicida de contacto, al no poder movilizarse vía simplasto (floema), puede darse un significativo movimiento vía apoplasto funcionando como herbicida de contacto. Inhibe el proceso fotosintético en el fotosistema II (FSII), interfiriendo con la reacción de Hill⁹⁸. En general, se da un cambio en la secuencia de aminoácidos serina por glicina lo que conlleva a la destrucción por fotooxidación de los carotenoides, por lo tanto, de la clorofila. Pueden ser degradados por plantas

superiores, existiendo diferencias entre ellas en cuanto a la tasa y velocidad de metabolización y pueden ser a través de algunos procesos como la de alquilación, conjugación o absorción.

Klepper observó que, al igual que otros herbicidas inhibidores de la fotosíntesis, el metribuzín puede dar lugar a efectos tóxicos secundarios al aumentar la acumulación de nitritos en las células vegetales⁹⁹.

7.1.1 EFECTOS TOXICOLÓGICOS

Toxicidad aguda: El metribuzín es de ligera a medianamente tóxico en humanos por vía oral¹⁰⁰, por exposición dérmica y por inhalación. En ratas infectadas se observó sedación y dificultad para respirar. La muerte ocurrió a las 24 horas, y las que sobrevivieron se recuperaron lentamente sin efectos permanentes¹⁰¹. No se observaron efectos en ratas expuestas con aerosol a una concentración de 31 mg m³ durante 6 horas al día, 5 días por semana, durante 3 semanas. No se observaron efectos en ratas con dosis dérmicas de 1000 mg kg⁻¹ al día durante 3 semanas¹⁰². El metribuzín no irrita la piel ni los ojos. La inhalación intensa puede causar irritación en las vías respiratorias.

Toxicidad crónica: Estudios de alimentación en ratas durante 2 años mostraron que con dietas que contenía una concentración del herbicida por debajo de 5 mg kg⁻¹ no se produce ningún efecto. En perros el nivel es de 2.5 mg kg⁻¹. En estudios durante 2 años alimentando perros con dietas que contenían 37.5 mg kg⁻¹ se observaron reducción de peso y aumento de muertes, cambios químicos en la sangre, y daños tanto en hígado como en riñón¹⁰².

La EPA ha establecido nivel de aviso para la salud en 200 ppb, de manera que el agua con esta concentración o menor es aceptable como agua para el consumo diario durante el transcurso de una vida, y no posee ningún riesgo para la salud. Sin embargo, el consumo de concentraciones altas de metribuzín durante un largo periodo de tiempo causó daños en los riñones en estudios con animales

Efectos reproductores y teratogénicos: No se han encontrado efectos en la madre ni en el feto en estudios con conejos. No existen evidencias de efectos teratogénicos.

Efectos mutagénicos: El metribuzin no tiene actividad mutagénica.

Efectos cancerígenos: Estudios con ratas y ratones concluyen que el metribuzin no tiene efectos cancerígenos

Efectos en seres humanos y animales: Después de que el metribuzín sea absorbido, es rápidamente distribuido por el flujo sanguíneo y excretado en la orina. En animales de sangre caliente, el 90% de la eliminación ocurre durante las 96 horas, distribuido a partes iguales en la orina y los excrementos.

7.1.2. EFECTOS ECOLÓGICOS

Su toxicidad varía de ligera a moderada en aves y de prácticamente nula a ligera en peces. Es ligeramente tóxico para crustáceos y zooplancton. No es tóxico para abejas. Puede producir efectos fitotóxicos en plantas que no sean blancos de su acción.

7.1.3. DESTINO AMBIENTAL

El metribuzín es poco persistente (3 meses). Se encuentra en el aire asociado a las partículas o en forma de vapor. Las partículas son eliminadas por precipitación húmeda y seca, mientras que el vapor es eliminado por reacciones con radicales hidroxilo, con una vida media estimada de 21 horas.

Es moderadamente persistente en los suelos, su vida media varía de 30 a 120 días con un valor representativo de 60 días aproximadamente. Su persistencia en los sistemas terrestres está determinada por el tipo de suelo y las condiciones climáticas. Muestra una baja afinidad por las partículas, que aunada a su alta solubilidad en agua, favorece su movilidad y aumenta sus posibilidades de lixiviación en muchos tipos de suelo. Su movilidad depende de las condiciones específicas de cada sitio, incluyendo: el contenido de materia orgánica, la textura y la porosidad del suelo, el régimen de lluvias en la zona y la tasa de aplicación del plaguicida.

La biodegradación del metribuzín (aerobia y anaerobia) es el principal mecanismo de eliminación de este compuesto. Por el contrario, la fotólisis y volatilización no son importantes bajo condiciones de campo. En extensiones de agua permanece más en el agua que en los sedimentos, debido a su baja afinidad por las partículas y a su elevada hidrosolubilidad. Su vida media en agua dulce (estanque) es de 7 días. No se espera que se bioconcentre en organismos acuáticos. Puede ser adsorbido por las hojas de las plantas, sin embargo su principal ruta de ingreso son las raíces. De las raíces puede ser translocado a las partes aéreas. Se concentra en las raíces, tallos y hojas de las plantas tratadas.

7.1.4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El metribuzín es un sólido cristalino incoloro o blanco dependiendo de la pureza del compuesto, con débil olor característico. Las propiedades físicas del metribuzín se indican en la tabla 5.

El metribuzín se descompone al arder produciendo gases tóxicos que incluyen a los óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre.

Tabla 5. Propiedades físicas del metribuzin

CAS :	21087-64-9
Nombre químico:	1,2,4-Triazin-5(4H)-ona, 4-amino-6-(1,1-dimetil-etil)-3-(tio-metil)
Solubilidad en agua:	1050 mg l ⁻¹ (20°C)
Solubilidad en otros disolventes	Soluble en dimetilformamida, ciclohexanona, en cloroformo, en acetona, en metanol, en diclorometano, en benceno, en n-butanol y en etanol.
Punto de fusión:	126.2 °C
Presión de vapor:	4.35 10 ⁻⁷ mmHg (20 °C).
log P:	1.3 (25 °C)

La estructura del metribuzín y su ruta de degradación se recogen en la Figura 4.1, en el capítulo 4.

8. CONSIDERACIONES SOBRE EL ÁCIDO TRANEXÁMICO

El ácido tranexámico (TA) (nombre comercial Cyclokapron; productor Pharmacia & Upjohn) es un derivado del aminoácido lisina. Este fármaco, se utiliza en medicina para neutralizar el sistema de fibrinólisis.

8.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

8.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El TA ejerce su efecto antifibrinolítico mediante el bloqueo de los sitios de unión de la lisina con las moléculas de plasminógeno, inhibiendo por tanto la interacción de plasminógeno y la cadena pesada de plasmina con los residuos de lisina en la superficie de la fibrina. Aunque la plasmina puede todavía ser formada bajo estas circunstancias, no tiene la capacidad de unirse y degradar a la fibrina¹⁰³, lo que en definitiva inhibe la disolución de los coágulos (fibrinólisis). Por ello, se denomina antifibrinolítico (inhibidor de la fibrinólisis). En dosis reducidas, el TA actúa como inhibidor competitivo de la plasmina, en dosis elevadas como inhibidor no competitivo.

8.1.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El TA, es un polvo blanco, químicamente estable, y no higroscópico. La estructura del TA se muestra en la Figura 13, y las propiedades físicas en la Tabla 7.

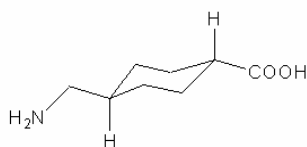


Figura 13. Estructura del TA

Tabla 7. Propiedades físicas del TA

CAS :	1197-18-8
Nombre químico:	Trans-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid
Peso molecular:	157.21
Solubilidad en agua:	36 g l ⁻¹ (25 °C)
Solubilidad en otros disolventes	Ligeramente soluble en alcohol y éter. Prácticamente insoluble en el resto de disolventes orgánicos.
Punto de fusión:	386 - 392 °C
Presión de vapor:	2.68 10 ⁻⁴ mmHg (25 °C)
log P:	0.315 ± 0.205 (25 °C)
pK_a:	4.79 ± 0.25; 10.27 ± 0.29 (25 °C)

8.1.3. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Absorción y biodisponibilidad: La máxima concentración de TA en el plasma se alcanza en tres horas por vía oral. La presencia de alimentos en el aparato gastrointestinal no afecta a los parámetros farmacocinéticos del fármaco.

Eliminación: La eliminación tras una administración intravenosa, es tri-exponencial, y aproximadamente el 95% de cada dosis se elimina sin ningún cambio en su estructura por los riñones y el aparato urinario (eliminación renal).

Metabolismo: El TA se metaboliza de forma mínima en el hígado. Como productos metabólicos, se han encontrado en la orina ácido carboxílico (1% de la dosis administrada) y la forma acetilizada del TA (0,1% de la dosis administrada).

8.1.4. INCOMPATIBILIDADES

El TA es bien tolerado. Los efectos negativos no son comunes y normalmente se manifiestan en náuseas, diarrea y ocasionalmente en hipotensión. Estudios clínicos no han confirmado nada acerca de la posibilidad de aumentar la tendencia de trombosis en pacientes tratados con inhibidores de la fibrinólisis. Se han observado cambios retinales en perros a muy altas dosis de TA durante un año, pero no en humanos recibiendo dosis terapéuticas del fármaco. Sin embargo, se han documentado alteraciones en el color de la vista.

8.2. ÁCIDO TRANEXÁMICO COMO ADYUVANTE EN EL TRATAMIENTO DEL HEMANGIOMA PLANO (NEVUS FLAMMEUS O MANCHA DE VINO DE OPORTO)

Un hemangioma plano o mancha de vino de Oporto (PWS) es una marca de nacimiento que causa una porción rojiza-morada de piel. La marca de nacimiento está compuesta de capilares agrandados (30 - 300 μm), los cuales le dan el color distintivo¹⁰⁴.

Por lo general, las PWS ocurren en el nacimiento y típicamente son planos en un inicio, y se pueden volver más oscuros y protuberantes a medida que el niño crece. Generalmente, las marcas de nacimiento se encuentran en la cabeza y cuello, pero pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo. Los hemangiomas planos adquiridos pueden ocurrir a una edad mayor y ser causados por una lesión traumática, pueden causar problemas emocionales y sociales a causa de su apariencia cosmética. A veces, pueden estar asociadas con anomalías visuales, del sistema nervioso, u óseas.

Los síntomas incluyen una marca de nacimiento que:

- a) Puede ser de color rojizo o morado (en adultos).
- b) Puede ser una lesión plana, de color rojo o morado claro (en niños).
- c) Puede ser protuberante en adultos.
- d) Ocurre típicamente en la cabeza o cuello.
- e) Puede sangrar si se rasca.
- f) Se oscurece con la edad.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de este tipo de anomalía.



Figura 9. Ejemplo de Mancha de vino de Oporto.

El tratamiento más ampliamente empleado para las PWS consiste en el empleo del Láser de Pulso de Tinte Bombeado por Lámpara con Flash, el cual fue desarrollado de acuerdo con la teoría de la foto-termólisis. Esta modalidad de tratamiento no-invasivo se basa en la conversión de la energía radioactiva en calor por los cromóforos endovasculares (Hb y HbO₂), seguido de la desnaturalización de la sangre y del tejido vascular debido a la difusión térmica. Esto se traduce en coagulación (formación de trombos), seguido de hipoxia y muerte celular. Posteriormente se formarían vasos sanguíneos de un tamaño normal (8 - 26 μm de diámetro interno), con la consecuente reducción de volumen sanguíneo y blanqueamiento de la piel.

Uno de los problemas principales que presenta este tratamiento, y por el que todavía sólo un 60% de los pacientes no responde adecuadamente, es el propio mecanismo del cuerpo a disolver los trombos, la fibrinolisis.

El éxito de esta terapia, podría ser enormemente aumentado con el uso de fármacos antifibrinolíticos (o pro-trombóticos). El aspecto fundamental de este novedoso enfoque que han propuesto algunos investigadores¹⁰⁴, que haría referencia a la farmacoterapia en el sitio específico, consiste en aplicar un sistema de liberación controlada de fármacos usando liposomas termosensibles, mediante el cual un fármaco antifibrinolítico, el TA, será transportado y sistemáticamente liberado en el tejido diana. Para realizar estudios sobre la dosis de fármaco, ratios y mecanismos de liberación del mismo, tiempo de vida de circulación, estudios farmacocinéticos in-vitro e in-vivo, etc. es necesario cuantificar de manera precisa la concentración de TA en plasma y en sangre. En este sentido, en la presente Memoria se ha desarrollado un método analítico sensible, selectivo y robusto para la determinación de TA en este tipo de muestras. Para comprender mejor la

acción de los liposomas en el transporte de fármacos se incluyen a continuación algunos aspectos relacionados.

8.2.1. LIPOSOMAS COMO SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS

Los liposomas son vesículas huecas de tamaño variable que encapsulan parte del disolvente en el que se han preparado, y cuya membrana esta formada por una o varias bicapas constituidas por moléculas lipídicas (generalmente de fosfolípidos).

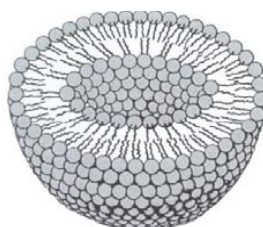


Figura 10. Representación esquemática de un liposoma.

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que poseen una región hidrofílica (cabeza polar), compuesta por ácido fosfórico y una molécula de colina (en el caso de las fosfatidilcolinas), unida por una molécula de glicerol a una región hidrofóbica (cola apolar) formada por dos cadenas largas de ácidos grasos. Debido a las dos cadenas largas de ácidos grasos, la estructura que adoptan en contacto con el agua es de una capa bimolecular, y no micelar, y en su forma más estable, se repliegan formando estructuras cerradas, que encierran parte de la suspensión acuosa.

Las razones principales por las cuales estas estructuras son utilizadas como sistemas portadores de fármacos son¹⁰⁵:

a) *Direccionamiento*: Los liposomas pueden ser utilizados para elevar la selectividad del fármaco por el sitio de acción, de este modo se puede tanto aumentar la eficacia terapéutica como así también disminuir potenciales efectos secundarios.

b) *Aumento de la duración del efecto*: Estos sistemas pueden actuar como “depot” (depósito) desde el cual la droga vehiculizada se puede liberar lentamente. Esta estrategia puede ser utilizada para mantener los niveles terapéuticos de fármaco tanto a nivel local como en circulación sanguínea por períodos prolongados de tiempo. Esto trae aparejado un incremento de la duración de la acción, así como una disminución de la frecuencia de administración.

c) *Protección del fármaco encapsulado*: Los compuestos “cargados” en liposomas, principalmente aquellos vehiculizados en el compartimiento acuoso, son protegidos de algunos eventos degradativos (por hidrólisis enzimática).

d) *Internalización celular de los compuestos encapsulados*: Estas vesículas pueden interactuar con las células de varias maneras y promover el ingreso de los activos.

e) *Amplificación de los efectos del material transportado*: Cuando las drogas son antígenos, estos sistemas pueden actuar como adyuvantes de vacunas.

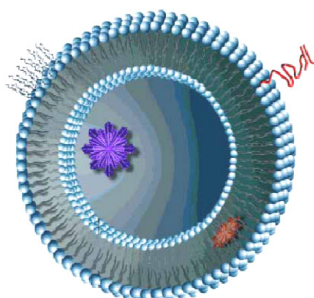


Figura 11. Liposoma transportando fármacos de distinta naturaleza.

8.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas pueden ser clasificados atendiendo a varios criterios:

- a) Atendiendo al número de bicapas y al tamaño final:
- I. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV): 20 - 50 nm.
 - II. Vesículas unilamelares grandes (LUV): 200 - 1000 nm.
 - III. Vesículas multilamelares (MLV): 400 - 3500 nm.
 - IV. Vesículas multivesiculares (MVV): 400 - 3500 nm.

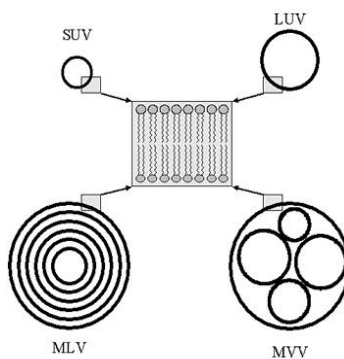


Figura 12. Estructura de los liposomas

- b) Atendiendo a la funcionalidad¹⁰⁶:
- I. Liposomas catiónicos.
 - II. Liposomas aniónicos.
 - III. Liposomas pH sensibles.
 - IV. Inmunoliposomas.
 - V. Geles vesiculares fosfolipídicos.
 - VI. Liposomas termosensibles.

8.2.3. LIPOSOMAS “STEALTH” O ESTÉRICAMENTE ESTABILIZADOS

La desestabilización que sufren los liposomas al alcanzar el torrente circulatorio está relacionada con la interacción que se produce con las lipoproteínas y opsoninas^{106,107}. Esta interacción implica cambios en los lípidos, que finalmente produce la destrucción del liposoma. La opsonización, o adsorción de marcadores macromoleculares, como por ejemplo las macroglobulinas, es un proceso que forma parte del propio mecanismo de defensa del cuerpo. Los invasores marcados son capturados por macrófagos especializados en eliminar partículas extrañas del sistema circulatorio. Estos macrófagos pertenecen al sistema reticuloendotelial (RES). Debido a esto, la mayoría de los liposomas convencionales permanecen en el sistema circulatorio sólo unos pocos minutos. Esto ha dado lugar al desarrollo, a partir de la década de los 90, de los liposomas “stealth” o estéricamente estabilizados recurriendo al recubrimiento con polímeros, que actúan de barrera, protegiendo la superficie de la interacción con lipoproteínas y moléculas marcadoras del RES. De esta manera se aumenta el tiempo de circulación de los liposomas de unos pocos minutos a varios días, permitiendo su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos.

De entre los polímeros que presentan unas características adecuadas (hidrofílicos y flexibles) y que sean biocompatibles, los polietilenglicoles (PEG) son los que han suscitado mayor interés y sobre los que se han centrado un gran número de investigadores¹⁰⁸.

8.2.4. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Existen diversas técnicas para la preparación de liposomas que permiten obtener distinto número y tamaño de vesículas, volumen interno y capacidad de encapsulación. Otro parámetro importante es la temperatura de transición (T_c) de los fosfolípidos, determinada por su composición de ácidos grasos, lo que influye en la permeabilidad de los liposomas¹⁰⁹.

Los principales métodos de preparación de liposomas se enumeran a continuación¹¹⁰:

- a) *Método de hidratación del film.*
- b) *Método de inyección rápida en etanol o éter.*
- c) *Método de eliminación del detergente.*
- d) *Método de evaporación en fase reversa.*

9. REFERENCIAS

1. T.A. Nieman, en "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", F. Settle (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 541.
2. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Eds.). Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, New York (2001).
3. 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.
4. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, G. Van Der Weken, E. Smet, Biomed. Chromatogr. 14 (2000) 166.
5. P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Worsfold, Luminescence 16 (2001) 1.
6. 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.
7. M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, J. Chromatog. A, 950 (2002) 1.
8. A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, W.R.G. Baeyens, F. Alés Barrero, J. Chromatog. B 793 (2003) 49.
9. X. Huang, J. Ren, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 155.
10. Y. Xinwei, J. Chromatog. A 976 (2002) 3.
11. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, Analisis 28 (2000) 686.
12. A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Guardigli, Trends Biotech. 22 (2004) 295.
13. Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang, Anal. Chim. Acta 541 (2005) 37.
14. A.M. García-Campaña, F.J. Lara, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 165.
15. 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.

16. L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, A. González Casado, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 927.
17. F. Li, C. Zhang, X. Guo, W. Feng, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 96.
18. L.J. Kricka, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 279.
19. A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 826.
20. K. Nakashima, K. Imai, en "Molecular Luminescence Spectrometry", Parte 3, S.G. Schulman (Ed.), Wiley, New York, 1993, pp. 1.
21. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Automatic Method of Analysis", Elsevier, Amsterdam, 1998.
22. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Flow Injection Analysis: Principles and Applications", Ellis Horwood, Chichester, 1987.
23. J. Ruzicka, E.H. Hanse, "Flow Injection Analysis" 2ª Ed., Wiley & Sons, Nueva York, 1988.
24. B. Karlberg, G.E. Pacey, "Flow Injection Analysis: A Practical Guide", Elsevier, Amsterdam, 1989.
25. M.D. Luque de Castro, "Principles of Flow Injection", en "Encyclopedia of Analytical Sciences". Academic Press Ltd., 1995, pp. 1299.
26. M.D. Luque de Castro, "Instrumentation in Flow Injection", en "Encyclopedia of Analytical Sciences". Academic Press Ltd., Londres, 1995, pp. 1306.
27. 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.
28. S. Baj, A. Chrobok, M. Cieslik, T. Krawczyk, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 327.
29. Y. Iglesias, C. Fente, C. Franco, A. Cepeda, S. Mayo, S. B. Vazquez, *Analyst* 125 (2000) 2071.

30. B. Vazquez, X. Feas, M. Lolo, C.A. Fente, C. Franco, A. Cepeda, *Luminescence* 20 (2005) 197.
31. J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, *Food Chem.* 88 (2004) 613.
32. J. Cepas, M. Silva, D. Perez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 73.
33. M. Wada, K. Inoue, A. Ihara, N. Kishikawa, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 189.
34. M. Tsunoda, *Chromatography* 26 (2005) 95.
35. Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 49.
36. S. Ahmed, S. Fujii, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 76.
37. L. Gámiz-Gracia, J.F. Huertas-Pérez, J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, Analysis of pesticides by chemiluminescence detection, in *Handbook of pesticides: Methods of pesticide residues analysis*, L.M.L. Nollet & Hamir Rathore (Eds). Taylor and Francis (en prensa).
38. R.W. Frei, L. Michel, W. Santi, *J. Chromatogr.* 126 (1976) 665.
39. S. Katz, W.W. Pitt Jr., G. Jones Jr., *Clin. Chem.* 19 (1973) 817.
40. S. Kobayashi, K. Imai, *Anal. Chem.* 52 (1980) 1548.
41. M. Sugiura, S. Kanda, K. Imai, *Biomed Chromatogr.* 7 (1993) 149.
42. N. Hanaoka, *J. Chromatogr.* 503 (1990) 155.
43. S.F.Y. Li, "Capillary Electrophoresis: Principles, and Practice and Applications", Elsevier, Amsterdam, 1993.
44. P. Camilleri, "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice", CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
45. J.P. Landers, "Handbook of Capillary Electrophoresis", CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.

46. D.L. Baker, "Capillary Electrophoresis", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1995.
47. K.D. Altria, "Capillary Electrophoresis Guidebook. Methods in Molecular Biology" Vol 52, Humana Press, Totowa, 1996.
48. L. Geiser, J.L. Vetheuy, *Electrophoresis* 28 (2007) 45.
49. S. Hu, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2833.
50. H.Y. Huang, Y.C. Shih, Y.C. Chen, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 317.
51. M. Hernández, F. Borull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.
52. E. Jiménez-Lozano, D. Roy, D. Barrón, J. Barbosa, *Electrophoresis* 25 (2004) 65.
53. A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *Electrophoresis* 26 (2005) 1550.
54. A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 793.
55. Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 133.
56. J. Hernández-Borges, S. Frías-García, A. Cifuentes, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 947.
57. A.M. García-Campaña, H. Fabre, M. Taverna, *Electrophoresis* 28 (2007) 208.
58. C. Cruces-Blanco, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 215.
59. C. Cruces-Blanco, "Electroforesis Capilar", Ed. Universidad de Almería, 1998.
60. J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
61. J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *J. High Resolut. Chromatogr. Comm.* 4 (1981) 230.
62. J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *Science* 222 (1983) 266.
63. R.P. Oda, T.C. Spelsberg, J.P. Landers, *LC-GC* 12 (1994) 50.
64. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: A Textbook", Elsevier, Ámsterdam, 1988.

65. D.C. Montgomery, "Diseño y Análisis de Experimentos", Ed. Iberoamericana, México D.F., 1991.
66. P. W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 63.
67. A. Delacroix, C. Porte, Analisis 24 (1996) 22.
68. P. W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 26.
69. 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.
70. R.G. Brereton, "Chemometrics: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems", Ellis Horwoods Limited, Chichester, 1990.
71. Norma ISO 5725, Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). International Organization for Standarization, Ginebra, 1994.
72. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, Anal. Lett. 26 (1993) 1243.
73. L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, J.M. Bosque-Sendra, Anal. Lett. 29 (1996) 1231.
74. Norma ISO 11843, Capability of detection, Ginebra, Part 1, 1997 y Part 2, 2000.
75. Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemical, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC 2002.
76. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, G. Van der Weken, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, Biomed. Chromatog. 12 (1998) 177.
77. A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, C. Jiménez Linares, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, Anal. Lett. 28 (1995) 369.
78. M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.
79. "Carbamate Pesticides: A general introduction, Enviromental Health Criteria", World Health Organization, Ginebra, 1986, Capítulo 7.

80. D. Watson, "Pesticides, Veterinary and Other Residues in Food", Ed. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004.
81. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. <http://www.mtas.es/insht>
82. Informe de la JMPR de 1995, documento de la serie FAO: Producción y protección vegetal, nº 127, p 5.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Carbaryl. February 4, (1992).
87. ACGIH. Documentation of Threshold Limit Values and Biological Indices. American Conference of Governmental and Industrial Hygienists, Inc., Cincinnati, OH. (1991).
88. D. Siebert, G. Eisenbrand, *Mutat. Res.* 22 (1974) 121.
89. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Drinking Water. Carbaryl Health Advisory. Draft Report. August (1987).
90. J.D. Regan, R.B. Setlow, A.A. Francis, W. Lijinsky, *Mutat. Res.* 38 (1976) 293.
91. U.S. Department of Agriculture, Soil Conservation Service. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database: Version 2.0 (Summary). USDA - Soil Conservation Service, Syracuse, New York . November 1990.

92. R. Tucker. Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. USDI Fish & Wildlife Service, 1970.
93. W. J. Hayes, Pesticides studied in man. MD: Williams & Wilkins. Baltimore, 1982.
94. Occupational Health Services, Inc. MSDS for carbofuran. OHS Inc., Secaucus, 1991 (Oct. 29), New Jersey.
95. U.S. Environmental Protection Agency. Health Advisory Summary for Carbofuran. US EPA, Washington, DC, 1989.
96. U.S. Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticidas and Toxic Substances (7508W). EPA-738-F-94-002, February 1994.
97. R. Labrada, J.C. Caseley, C. Parker, "Manejo de Malezas para Países en Desarrollo". (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120), Roma 1996.
98. Büchel KH (1972) Pesticide Sci 3 (1972) 89.
99. Klepper, Lowell A., Weed Science 23(3) (1975) 188.
100. US EPA Metribuzin: Health Advisory. Office of Drinking Water, US EPA, Washington, DC, August 1988.
101. R.E. Gosselin, R.P. Smith, H.C. Hodge, J. Braddock, "Clinical toxicology of commercial products". Fifth edition. Baltimore. Williams and Wilkins, 1984.
102. Occupational Health Services, Inc. 1991 (May 1). MSDS for metribuzin. OHS Inc., Secaucus, NJ.
103. C.J. Duna, K.L. Goa, Drugs 57 (1999) 1005.
104. M. Heder, J.F. Beek, N.I. Moldovan, C. M.A.M. van der Horst, Thromb. Haemost. 93 (2005) 242.
105. S.D. Palma, D.A. Allemandi, Nuestra Farmacia 38 (2005) 38.
106. J.L. Vila Jato, "Nanotecnología farmacéutica: Una galénica emergente". Discurso para su ingreso como Académico de Número. Real Academia Nacional de Farmacia de España.

- 107.N. Bergstrand, "Liposomes for drug delivery: from physico-chemical studies to applications". Tesis Doctoral. Universitatis Upsaliensis, Uppsala 2003.
- 108.V.P. Torchilin, J. Liposome Research 6(1) (1996) 99.
- 109.Y.E. Gelabert-Rodríguez, R. Díaz- González, Rev. Cubana Invest. Biomed., 20 (2001) 70.
110. D. Rickwood, B.D., "Liposomes: a practical approach". Liverpool, UK: Oxford University Press, 1989. Ed. The practical approach series.

CHAPTER 1

SENSITIVE DETERMINATION OF CARBARYL IN
VEGETAL FOOD AND NATURAL WATERS BY
FLOW INJECTION ANALYSIS BASED ON THE
LUMINOL REACTION

SENSITIVE DETERMINATION OF CARBARYL IN VEGETAL FOOD AND NATURAL WATERS BY FLOW INJECTION ANALYSIS BASED ON THE LUMINOL REACTION

RESUMEN

Se ha descrito un método quimioluminiscente (CL) rápido y sensible mediante análisis por inyección en flujo (FIA) para la determinación directa de carbaril. El método se basa en el aumento que el carbaril produce en la emisión CL generada por la oxidación del luminol con permanganato potásico en medio alcalino. La optimización de las variables instrumentales y químicas que afectan a la respuesta CL se ha llevado a cabo mediante la metodología del diseño de experimentos, usando el montaje FIA propuesto. Bajo las condiciones óptimas, la intensidad CL es lineal para concentraciones de carbaril en el rango comprendido entre 5-100 ng ml⁻¹, obteniéndose un límite de detección de 4.9 ng ml⁻¹. El método se ha aplicado satisfactoriamente a la determinación de residuos de carbaril en diversas muestras de agua y en una hortaliza.

SUMMARY

A sensitive and fast chemiluminescence (CL) flow-injection analysis (FIA) method has been described for the direct determination of carbaryl. The method is based on the enhancing effect of carbaryl on the CL emission generated by the oxidation of luminol with potassium permanganate in alkaline medium. The optimisation of instrumental and chemical variables influencing the CL response of the method has been carried out by applying experimental designs, using the proposed flow injection manifold. Under the optimal conditions, the CL intensity

was linear for a carbaryl concentration over the range of 5-100 ng ml⁻¹ with a detection limit of 4.9 ng ml⁻¹. The method has been successfully applied to the determination of carbaryl residues in water and cucumber samples.

1. INTRODUCTION

Pesticides of the carbamate family are widely used in agriculture for crop protection because of their powerful biological activity^{1,2,3}. Therefore, their residues may be encountered in fruits, vegetables and surface waters, which pose a potential hazard for consumers. To watch over the safety of our food supply, international organizations regulate their maximum residue levels (MRLs) on crops, which are in the 0.02-7.00 mg kg⁻¹ range depending on the particular pesticide commodity combination⁴. They are employed as insecticides, fungicides, nematocides, miticides and molluscocides. Among these pesticides, carbaryl (1-naphthyl-methylcarbamate), a N-methylcarbamate (NMC), is an broad-spectrum pesticide for the control of pests in fruit, vegetables, forage, cotton and other crops, as well as in poultry and domestic animals. Its common use is due to its volatility, low solubility in water and relatively short half-life. However its acute toxicity is of great concern and makes necessary the determination of the carbaryl residues at very low concentrations⁵.

The most often applied analytical technique to determine carbamate pesticides is high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with UV/Vis, fluorescence and mass spectrometry detection modes. Gas chromatography has been less used due to the poor thermal stability of carbaryl. Those techniques have been reviewed⁶. Some methods based on the use HPLC-MS have been developed for the monitoring of traces of this pesticide in fruits, vegetables⁷ and water samples⁸. Also, spectrophotometric detection coupled with flow injection analysis (FIA) has been used, based on the coupling of 1-naphtol (the product of the hydrolysis of carbaryl) with a diazoted compound^{9,10,11}. Luminescence methods such as fluorescence^{12,13,14,15,16} and phosphorescence^{17,18}, as well as immunoassay¹⁹ and biosensors²⁰, have been employed for the analysis of carbaryl residues. Post-column hydrolysis of NMCs

to methylamine (MA) and subsequent derivatization with *o*-phthalaldehyde (OPA) is the basis of the HPLC-fluorescence method which has been accepted as a standard protocol by several official organizations²¹.

Among luminescence techniques, chemiluminescence (CL) is considered as the most sensitive and versatile analytical technique that can be used in the determination of different compounds depending on their participation in different CL systems²². CL analysis has advantages such as high sensitivity, easy of use and simple instrumentation, being actively applied for detection of small amounts of chemical species at ultra-trace levels. Considering the kinetic characteristics of this technique, it can be easily coupled to continuous manifold as detection mode. Some reviews include the applications of different CL systems to pesticide residue monitoring^{23,24}.

Some CL systems have been used for the determination of carbamates, such as the photo-oxidation of $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ with peroxydisulphate by using a FIA manifold^{25,26}. The method was based on the photo-conversion of the carbamate into methylamine (MA), which subsequently reacts with the photo-generated $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. It was applied in the determination of carbaryl in commercial formulations and spiked water, soil, grain and blood serum²⁵ and to the determination of carbofuran and promecarb in spiked soil and water²⁶. This CL system has been recently adapted to HPLC for the simultaneous determination of NMCs (propoxur, bendiocarb, carbaryl and promecarb) in fruits²⁷. Also, the peroxyoxalate CL reaction using bis-(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) has been applied for the analysis of carbaryl, carbofuran and propoxur by HPLC in spiked fruits juice, using dansyl chloride as derivatization reagent and a previous hydrolysis of the carbamates in order to produce an alcohol which is derivatised²⁸. Our research group has reported two FIA methods, for quantitative determination of carbaryl²⁹ and for screening analysis of total carbamate

content³⁰ in vegetables and different types of water, using in both cases the TCPO–hydrogen peroxide system with previous hydrolysis of the carbamates to obtain MA, which is subsequently derivatized with OPA to form the fluorophore. This method was applied to the analysis of spiked tap, river and ground water and spiked cucumber, with satisfactory recoveries for routine analysis. Also, two different papers have been reported concerning the determination of two carbamates, aldicarb³¹ and asulam³², by means of photodegradation of the pesticide, followed by an oxidation reaction into a fully automated multicommutation based flow-assembly. In the case of aldicarb, the determination is based on the iron (III) catalytic mineralization of the pesticide by UV irradiation followed by the reaction of the photodegraded product with potassium permanganate and quinine sulphate as sensitizer, producing a CL emission proportional to the concentration of the pesticide. In the case of asulam, the CL reaction is obtained in a similar way, involving the irradiation of an aqueous solution of the carbamate in glycine buffer with UV light, following by oxidation of the photoproducts with potassium permanganate in a sulphuric acid medium, or, as an alternative, oxidation with alkaline ferricyanide. The methods were applied to a certified technical formulation and to water samples with satisfactory precision. Also, carbaryl has been determined in commercial formulations from the CL emission produced in its reaction with Ce(IV) in a nitric acid medium containing Rodamine 6G as sensitizer, using a FIA manifold³³.

The production of strong CL emission by the oxidation of luminol in alkaline medium is one of the best known and more efficient CL reactions. Different oxidants can be used, such as, hydrogen peroxide, molecular oxygen, hypochlorite, iodide or permanganate, mainly in the presence of some type of initiator or catalyst such as peroxidase, ferricyanide, heme compounds or metal ions (Co(II), Cu(II), Cr(III), Ni(II), etc). In this respect, this CL system has been applied for the direct determination of luminol derivatives, catalysts, oxidants or

inhibitors of the cited CL reaction. The reaction presents a powerful application as detection system in FIA or in HPLC, where luminol-type compounds can be also used as a derivatization reagents allowing the analytes to be detected at very low levels³⁴. The luminol system has been scarcely applied to the detection of some pesticides and fungicides, which can act as both inhibitors of the CL emission and as substances that are easily oxidised and acts as interferences in the luminol reaction, being indirectly determined by measuring the decrease produced in the CL emission.

A simple FIA-CL system, in which luminol and H₂O₂ are introduced into a mixing cell at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, and the resulting solution acts as the carrier of the sample, introduced by means of an injection valve, has been applied as a highly sensitive assay for parathion in rice samples³⁵. In this case, polyethylene glycol 400 surfactant was used as the enhancer of the CL signal. This enhancing effect may be attributed to the tendency of molecules to form micelles in aqueous solution; this microenvironment not only increases the solubility of the pesticide in water and the chance to react with hydrogen peroxide and luminol in solution, but also provides a protective environment for the excited singlet state of 3-aminophthalic acid ions. In order to eliminate the interference of some cations, which can participate as catalysts in the CL reaction, a cation exchange column was connected into the sample line to remove these metal ions. The CL intensity was linear in the range of 0.02-0.1 mg l⁻¹ of parathion, obtaining good recoveries. This method was also proposed for the determination of monocrotophos³⁶, using sodium chloride instead of polyethylene glycol 400 surfactant as enhancer of the CL signal obtaining a linear range from 2 x 10⁻⁸ to 1 x 10⁻⁶ g ml⁻¹. The method was successfully applied to the determination of monocrotophos in water samples. A possible mechanism of the reaction was also included.

Hydrogen peroxide has also been used as oxidant in the luminol reaction for the determination of methamidophos residue on vegetables with solid phase extraction (SPE) and FIA-CL³⁷. The method is based on the enhancing effect of methamidophos on the CL reaction and provides a LD of 0.047 $\mu\text{g ml}^{-1}$ with recoveries in the range of 90%–109%. The method was successfully applied to the determination of the methamidophos residue on some vegetable samples.

An original, rapid and inexpensive methodology was developed by Song *et al.* for the determination of chlorpyrifos in spiked orange and pomelo samples, using the reaction of luminol with potassium periodate³⁸. The CL intensity is inhibited in the presence of chlorpyrifos, which can be oxidized by periodate. In the proposed FIA manifold, both CL reagents were immobilized in an on-line anion-exchange resin with a molar ratio of 1:2 (luminol:periodate). These reagents are quantitatively eluted with water at pH 6.5 and transferred to the six-way injection valve, and subsequently mixed with the sodium hydroxide stream. Under the optimal conditions, the decrease of CL intensity was linear over the logarithm of concentration of chlorpyrifos from 0.48 to 484.0 ng ml^{-1} .

The luminol- H_2O_2 CL system coupled with HPLC has been used for the selective detection of organophosphorus insecticides (diclorvos, isocarbophos and methyl parathion)³⁹. For the assembly, a mixing coil after the mixture of CL reagents was necessary to decrease the background signal. Subsequently, this mixture is merged with the eluent from the chromatography column. The composition of mobile phase was methanol-water 60:40 (v/v). A great advantage over HPLC with UV detection is that the HPLC–CL method allowed the analysis of vegetable samples without need of an elaborated extraction process to remove potential interfering substances, as these substances do not provide CL signal. The method was successfully applied to the determination of these

pesticide residues in spiked samples of chervil leaves, cucumber peels and leaves from trees.

Recently, a less common oxidant, potassium peroxodisulphate, has been proposed for the simultaneous determination of three organophosphorus pesticide residues (omethoate, dichlorvos and dipterex)⁴⁰. This method is based on the fact that organophosphorus pesticides can be decomposed into orthophosphate with potassium peroxodisulphate as oxidant under UV radiation and that the decomposing kinetic characteristics of the pesticides with different molecular structure are significantly different. The produced orthophosphate can react with molybdate and vanadate to form the vanadomolybdophosphoric heteropoly acid, which can oxidize luminol to produce intense CL emission. The obtained data were processed chemometrically by use of a three-layered feed-forward artificial neural network trained by back-propagation learning algorithm. After multivariate calibration of the method, which provides a LD of $1 \times 10^{-8} \text{ g ml}^{-1}$, it was applied to the analysis of the three pesticides in different types of vegetables (lettuce, rape, spinach and leek), obtaining recoveries ranging from 93-113%.

Specifically for carbamates, a FIA-CL method has been proposed to determine some dithiocarbamate fungicides, such as ziram, mancozeb and propineb⁴¹, based on the oxidation of luminol in alkaline medium, using hexacyanoferrate(III) as catalyst/cooxidant and hexacyanoferrate(II) as depressor. The behaviour of the dithiocarbamates in alkaline medium was studied by electron spin resonance using 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide as a spin trap agent. Hydroxyl radicals were detected in the spectra of the three fungicides, showing that these are important intermediates in the luminol CL reaction. Good sensitivity was obtained when the optimised conditions were applied although the use of this method with real samples was not reported. This

CL reaction has been used for the enzyme-linked inhibitory CL detection of carbofuran and other organophosphorous pesticides, using two consecutive enzymatic reactions of choline oxidase and peroxidase which produce photons when luminol is used as a substrate⁴². In this case, the pesticides inhibit the acetylcholinesterase activity, so the acetylcholine is not hydrolysed in choline and subsequently it is not oxidized into hydrogen peroxide, blocking the oxidation of luminol and decreasing the CL emission. This method has been reported only for the analysis of tap water at $\mu\text{g l}^{-1}$ level. The method is highly sensitive and selective but the enzymes employed are very expensive and unstable.

In our case, we found that the pesticide carbaryl produces a great enhancement on the CL emission from the luminol oxidation by potassium permanganate in alkaline medium without catalyst. This enhancement in the CL emission is proportional to the concentration of the studied compound, which can be determined by measuring the increase in the CL intensity. Based on these findings, a new FIA-CL method has been developed for the determination of carbaryl, which has been satisfactorily applied in waters and cucumbers.

2. EXPERIMENTAL

2.1. APPARATUS

CL intensity was measured with a Camspec CL-1 detector (Camspec, United Kingdom), equipped with a quartz flow cell with a volume of 120 μl , and data control and acquisition programme. A peristaltic pump (Gilson Minipulse-3, France) and PTFE tubing (1.60 mm, i.d.) were used to construct the FIA manifold. Sodium hydroxide and luminol solutions were controlled at a flow rate of 5 ml min^{-1} , while the KMnO_4 solution were pumped at a flow rate of 3 ml min^{-1} . Sample solutions were inserted into the carrier stream of sodium hydroxide using a Rheodyne 5020 manual injection valve (with a sample loop of 70 μl). A rotavapor (Büchi RE 121, Büchi Laboratoriums-Technik AG), a vacuum manifold system (Supelco) and a domestic blender (Taurus) were used for sample preparation.

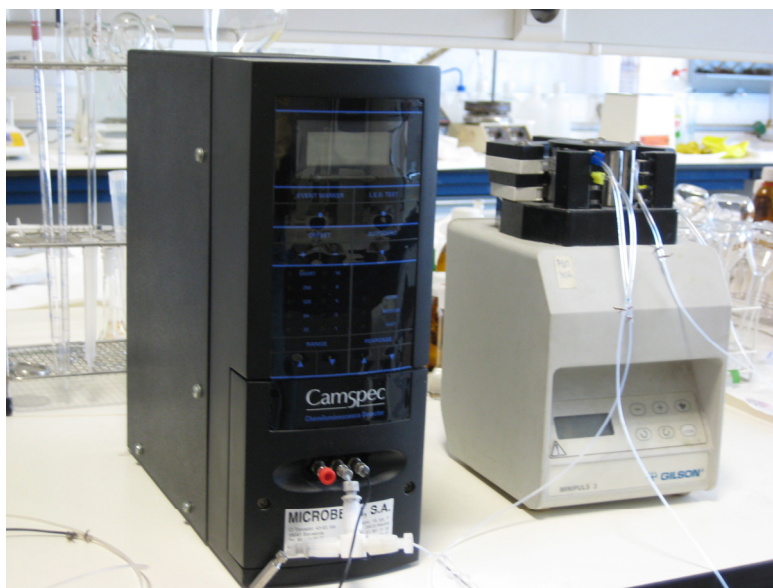


Figure 1.1. Chemiluminescence detector and peristaltic pump.

2.2. CHEMICALS AND REAGENTS

All the reagents used were of analytical grade and solvent of HPLC grade. Deionised water (Milli-Q Plus, Millipore Iberica) was used throughout the work.

A stock solution of luminol 1 mM (3-aminophthalhydrazide), purchased from Sigma, was prepared by dissolving it in 0.1 M sodium hydroxide (98 % Panreac) solution and stored at least one day in refrigerator to attain stability before use^{43,44}. This solution is stable at least for one week.

A solution of potassium permanganate 1 mM (98%, Panreac) was prepared daily by dissolving the product in deionised water; the corresponding working solutions were prepared by appropriate dilutions.

For sample preparation, filter paper (0.45 µm pore size, Millipore), ethyl acetate (Panreac) and anhydrous sodium sulphate (Panreac) and alumina (Merck) homemade cartridge for solid phase extraction (1.5 g) were used.

2.3. PREPARATION OF STANDARD SOLUTIONS

A stock standard solution of carbaryl (100 mg l⁻¹) was prepared by dissolving 25 mg of the product (purity 99.5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH) in 25 ml of methanol (Panreac). Working standard solutions were prepared by proper dilution in water.

2.4. GENERAL PROCEDURE AND POSSIBLE MECHANISM

The FIA configuration used consisted in a three-channel manifold where either the standard or sample solutions were incorporated to a NaOH solution carrier with the aid of a rotary valve (Figure 1.2). Prior to the CL measurement acquisition corresponding to the solutions containing carbaryl, the alkaline luminol solution stream was mixed with the permanganate solution stream in a three-way “T” connector, as can be shown in Figure 1.2. The resulting stream was then mixed with the NaOH carrier solution into the detection cell and the CL emission resulting from the oxidation of luminol was recorded as the background blank signal (baseline). Standard or sample solutions containing carbaryl were injected into the NaOH stream and allowed to mix with the luminol-KMnO₄ mixture before passed through the CL detection region of the cell, obtaining a positive CL intensity peak with a height proportional to the analyte concentration.

The determination of carbaryl was based on the increase in the CL intensity, calculated as

$$\Delta I = I - I_0 \quad (\text{Eq. 1.1})$$

where I is the net CL signal due to the presence of carbaryl in the luminol-KMnO₄ system, expressed in terms of peak high, and I_0 is the CL intensity corresponding to the baseline.

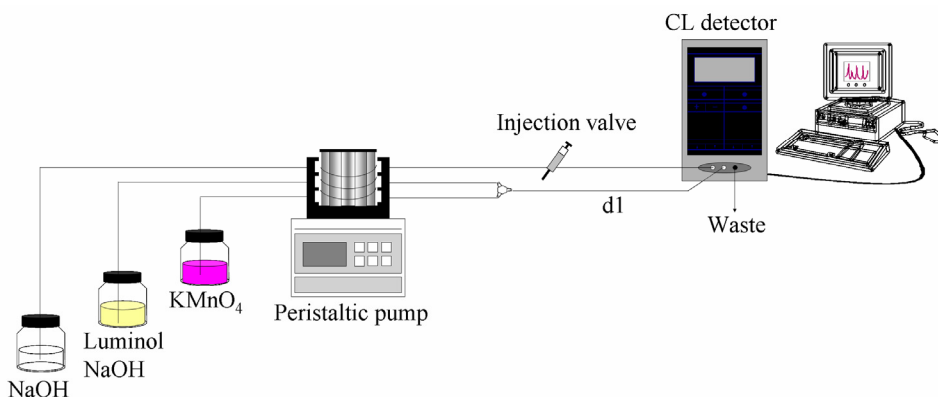


Figure 1.2. Schematic FIA manifold. d1: mixing reactor reactor.

The CL mechanism of luminol system has been extensively investigated and many research works have confirmed that 3-aminophthalate anion was the emitter in the luminol system, regardless of the medium and oxidant being used⁴⁵. There are some papers about the role of other pesticides (as organophosphorous pesticides) in the luminol reaction^{46,47}, producing a similar effect that this one observed in our study, but as far as we know, the role of the carbamates in this reaction has not been studied in deep. Nevertheless, based on the discussions proposed in the literature for this CL direct systems using luminol, and considering our previous studies of the reaction using different oxidants, a possible mechanism of present reaction could be as follows: carbaryl is firstly oxidised by permanganate, to produce an intermediate which could subsequently oxidise luminol to form the excited state 3-aminophthalate anion; finally this excited anion decayed to the ground state and produce CL.

2.5. SAMPLE PREPARATION PROCEDURES

For the analysis of carbaryl, water samples of different origins were filtered through a filter paper with a 0.45 μm pore size (Millipore) and collected in a glass bottle previously cleaned with nitric acid. The samples were stored in the dark at 4° C until analysis.

For the determination of carbaryl in cucumbers, a portion of cucumber sample (20 g) collected from an ecological farm, was spiked with different concentrations of carbaryl (0.2 - 2.0 mg kg^{-1}). After 5 minutes, samples were chopped and homogenized for 5 minutes with 35 ml of ethyl acetate and 30 g of anhydrous sodium sulphate. The mixture was filtered through a paper filter with vacuum and collected in a flask; 15 ml of ethyl acetate was used to clean both the filter and flask. The obtained solution was concentrated in a rotavapor to an approximate volume of 2 ml, then adding 3 ml of ethyl acetate. For the sample clean up, different adsorbents (namely: alumina, silica, SAX and C-18) were checked; the best recoveries were obtained when the extract was passed through an alumina cartridge, which was previously conditioned with 3 ml of methanol and 3 ml of water. The sample was eluted and collected in a glass vial. The ethyl acetate extract was evaporated under nitrogen stream until dryness. The final residue was re-dissolved with 2 ml of methanol, properly diluted (200 times with ultra pure water) and measured.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. SELECTION OF THE OXIDANT AND CONTINUOUS-FLOW ASSEMBLY

The factors affecting the enhancing effect of the carbaryl on the CL emission generated by the oxidation of luminol in alkaline medium were carefully studied. Different oxidants, such as hydrogen peroxide, potassium permanganate, hexacyanoferrate (III), potassium bisulphate and cerium(IV), were tested. This effect of carbaryl on the CL emission was only observed when potassium permanganate was used as oxidant in alkaline medium.

Several FIA configurations were tested for the determination of carbaryl using this luminol-KMnO₄ – based CL system, selecting as the most convenient the three-channel FIA manifold presented in Figure 1.2. Employing this configuration, the effect of both experimental (concentrations of hydroxide, permanganate and luminol solutions) and instrumental variables (injected volume of analyte and stream flow rates) were optimised in order to achieve the highest CL signal, proportional to the analyte concentration.

3.2. OPTIMISATION OF THE METHOD

The optimisation of the method was carried out by applying the experimental design methodology for both groups of factors separately (factors related with the CL reaction, named, chemical variables and factors related with the FIA manifold configuration, named instrumental variables).

This multivariate optimisation implies two steps: a) a preliminary evaluation, using screening factorial designs, in order to select the significant factors in the

analytical procedure; and b) an appropriate estimation of the real functional relationship (response function) between the analytical response (CL intensity) and the significant factors, obtaining from it the optimum values for these factors. The application of experimental designs was carried out using Statgraphics⁴⁸.

3.2.1. OPTIMISATION OF CHEMICAL VARIABLES

The effect of varying the concentrations of sodium hydroxide, luminol and potassium permanganate solutions was tested on the analytical response corresponding to a carbaryl solution concentration of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, by using a full factorial 2^3 experimental design plus two centred points so as to screen the significant factors. Minimum and maximum levels of each studied factor were chosen according to the selected experimental region (Table 1.1).

Table 1.1. Factors and selected levels used in the screening design and optimisation of chemical variables.

Variable	Low(-)	High(+)
A : Luminol concentration (mol l^{-1})	5×10^{-6}	5×10^{-5}
B : Potassium permanganate concentration (mol l^{-1})	10^{-6}	10^{-4}
C : Sodium hydroxyde concentration (mol l^{-1})	0.01	1

Standardized Pareto chart (Figure 1.3) shows the values of the effects for the studied variables on the CL emission, as well as the limit value for considering these effects non-significant with a confidence interval of 95%.

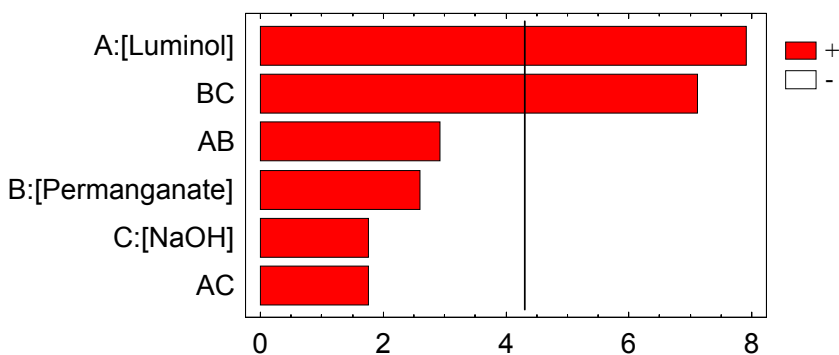


Figure 1.3. Standardized Pareto chart for the analytical signal in the screening of chemical variables.

Considering the enhancement on CL intensity as the analytical response of the model, this study showed that the luminol concentration and the interaction between permanganate and hydroxide concentrations were significant factors, having important effects on the response when their values change in the selected region. Therefore the three factors were simultaneously optimised by application of a 2^3 central composite design plus face centred star (with two centred points). The maximum and minimum levels of the factors were the same as in the screening step.

In view of the results obtained from the established response surface (Figure 1.4), the following optimum values were found: a 1.02×10^{-5} M potassium permanganate concentration, a 0.116 M sodium hydroxide concentration, and a 5×10^{-5} M luminol concentration (corresponding to the highest level).

As can be seen in the Figure 1.4 (C), there is a maximum for the analytical response inside the selected experimental region for the permanganate and the sodium hydroxide concentrations. However, in the case of the luminol concentration (Figure 1.4 (A) and (C)) there is an enhancement on the analytical

signal as the concentration increases, being not possible to find a maximum in the experimental region.

These last results indicate that a further optimisation for luminol concentration would be required, as the optimum value seems to be out of the studied experimental domain. However, a concentration of 1.58×10^{-5} M for luminol was selected as higher concentrations gave rise to a high background signal, which reduces the application range of the method.

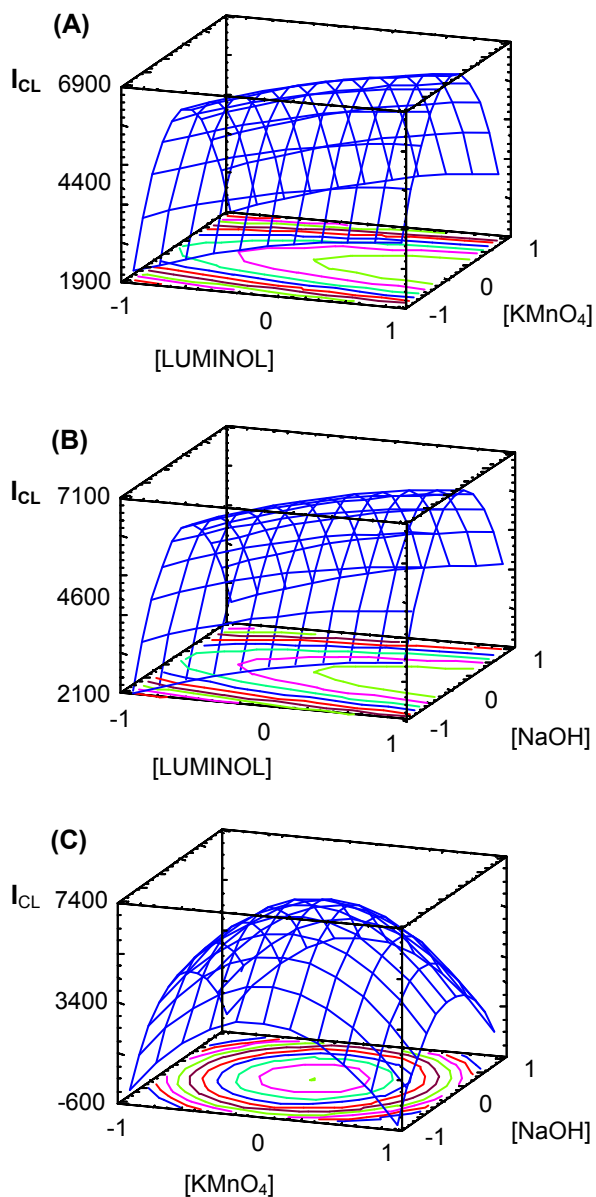


Figure 1.4. Response surfaces from the optimisation of chemical variables for the proposed FIA-CL system for the carbaryl detection by using a 2^3 central composite design plus face centred star.

3.2.2. OPTIMISATION OF INSTRUMENTAL VARIABLES

The FIA-variables studied, using the optimised reagent concentration values above-mentioned, were the length of the reactor and the flow rates of sodium hydroxide, luminol and potassium permanganate solution streams. The length of the reactor was varied between 0 cm and 100 cm, and the flow rate of the three channels was changed in the range of 1-5 ml min⁻¹ (Table 1.2). This study was carried out using a concentration of carbaryl of 0.1 µg ml⁻¹ and 50 µl of injection volume.

Table 1.2. Factors and selected levels used in the screening design for the study of the instrumental variables.

Variable	Low(-)	High(+)
A : Luminol flow rate (ml min ⁻¹)	1	5
B : Potassium permanganate flow rate (ml min ⁻¹)	1	5
C : Sodium hydroxide flow rate (ml min ⁻¹)	1	5
D : Length of the reactor (cm)	0	100

The results obtained from a previous screening design, using a 2⁴ full factorial design plus two centred points (see Pareto chart for effects in Figure 1.5), demonstrated that the three flow rates were significant factors, while neither the length of the reactor nor its interaction with the rest of considered variables were significant factors with a probability of 95%, thus its central value (50 cm) was selected for further experiments to ensure a proper mixing of the reagents.

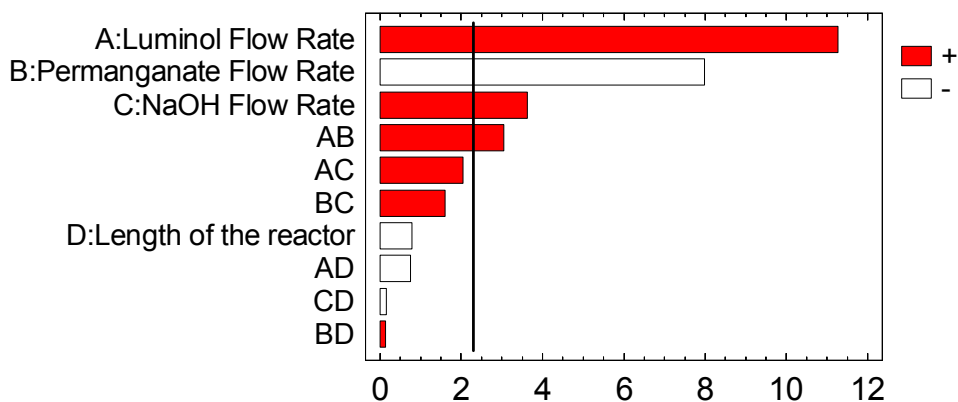


Figure 1.5. Standardised Pareto chart showing the effects of instrumental variables and their interactions on the CL emission.

For the simultaneous optimisation of the three flow rates, a 2^3 central composite design plus rotatable star (with two centred points) was applied, using a carbaryl concentration of $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$. The optimum conditions obtained from the response surface, shown in Figure 1.6, were: a luminol flow rate of 5 ml min^{-1} , a potassium permanganate flow rate of 2.99 ml min^{-1} and a hydroxide flow rate of 4.95 ml min^{-1} . According to these results, further experiences testing higher luminol flow rates would be required, but we use this value because higher values of flow rates caused overpressure in the system.

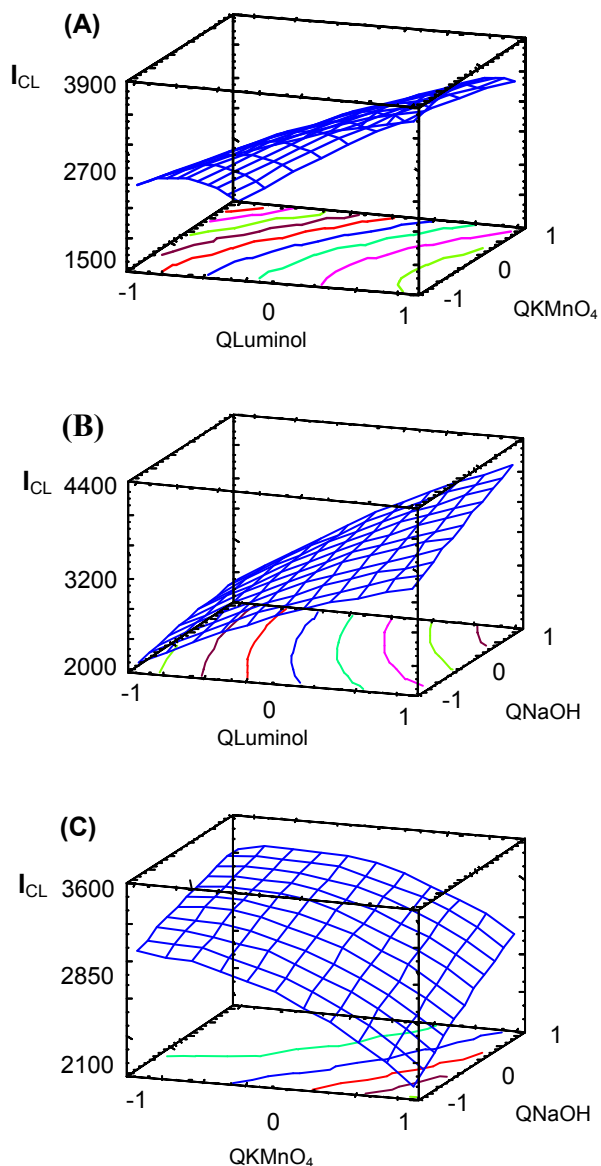


Figure 1.6. Response surfaces obtained in the optimisation of instrumental factors for the proposed FIA-CL system for the carbaryl detection by using a 2^3 central composite design plus rotatable star. Q = flow rates.

Under these optimum conditions, the effect of the injection volume of a $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ carbaryl solution was examined over the range between 10-200 μl . An injection volume of 70 μl was selected as optimum as it produced the best signals in terms of both repeatability and CL peak height.

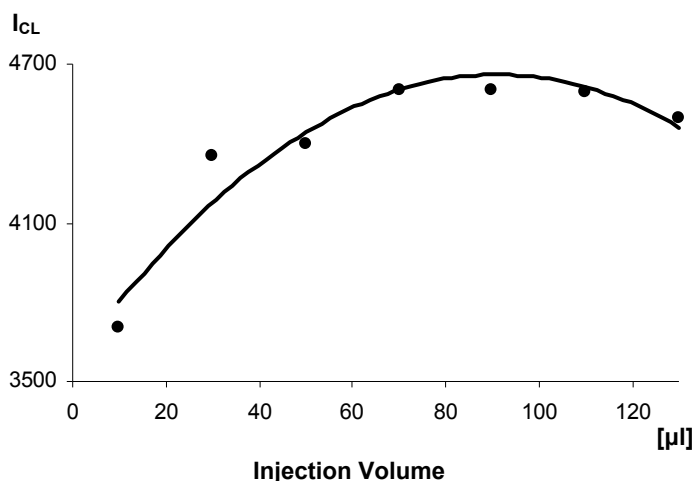


Figure 1.7. Influence of the injection volume on the analytical signal (concentration of carbaryl $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$).

As a summary, all the optimum values for the variables involved in the CL system are included in Table 1.3.

Table 1.3. Optimum values for the variables involved in the proposed method.

Variable	Optimum value
[Luminol]	1.58×10^{-5} M
[KMnO ₄]	1.02×10^{-5} M
[NaOH]	0.116 M
Luminol flow rate	5 ml min ⁻¹
KMnO ₄ flow rate	2.99 ml min ⁻¹
NaOH flow rate	4.95 ml min ⁻¹
Injection volume	70 μ l
Reactor length	50 cm

3.3. ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A calibration curve for the determination of carbaryl was established by injections of increasing analyte concentrations in the range from 5-100 ng ml⁻¹, using the proposed FIA manifold and the optimised values for the significant chemical and instrumental variables. Three injections were performed for each standard solution. A plot of the CL intensity *versus* concentration of the carbaryl was linear over the range studied (Figure 1.8).

The performance characteristics calculated from the calibration data set using the ALAMIN software⁴⁹ are shown in Table 1.4, and the calibration plot is shown in Figure 1.9. Good linearity and satisfactory precision were obtained,

achieving a detection limit which is lower than the MLRs legislated for vegetal matrixes⁵⁰.

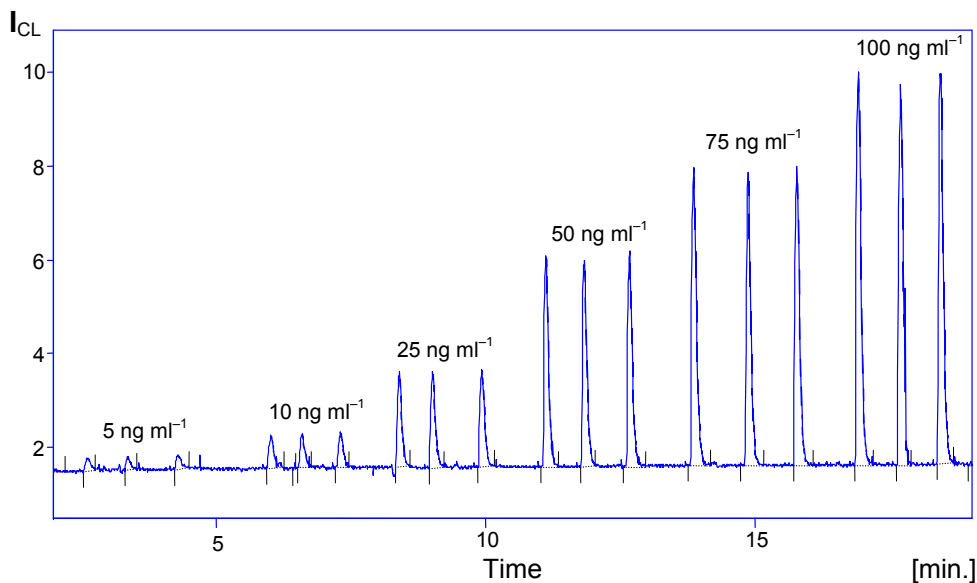


Figure 1.8. Calibration curve for the CL determination of carbaryl. Standard solutions of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 ng ml⁻¹ were injected in triplicate.

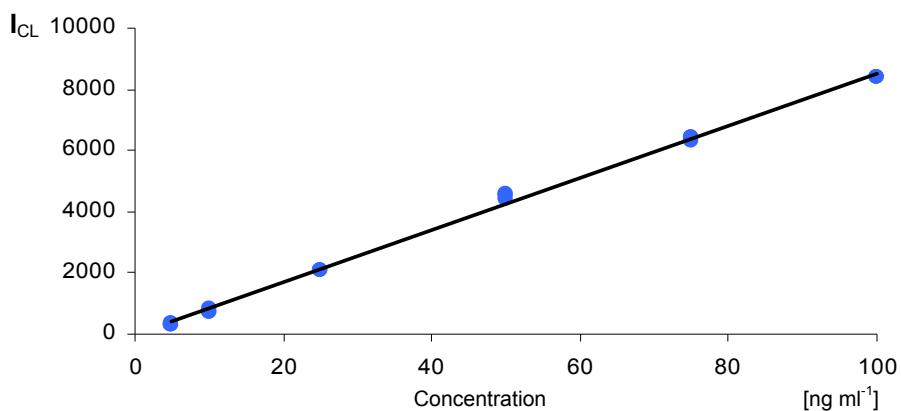


Figure 1.9. Calibration curve for the determination of carbaryl by mean of the proposed method.

Table 1.4. Performance characteristics for the CL determination of carbaryl.

Linear Range	5 - 100 ng ml ⁻¹
Slope	85.52 c.u./ ng ml ⁻¹
Intercept	-38.61 c.u.
S _{R,c}	144.22 c.u./ ng ml ⁻¹
R ²	99.79 %
Linearity	98.85 %
Analytical resolution	1.69 c.u./ ng ml ⁻¹
Precision *	2.0%
Detection limit	4.90 ng ml ⁻¹
Quantification limit	16.36 ng ml ⁻¹

c.u. = chemiluminescence units.

S_{R,c} = standard deviation of the regression.

R² = determination coefficient.

* expressed as relative standard deviation (%) for a concentration of 50 ng ml⁻¹ and calculated from the calibration data set.

3.4. ANALYTICAL APPLICATIONS

To illustrate the usefulness of the FIA-CL method in the analysis of real samples, carbaryl was determined in different water samples and in cucumber. Water samples were selected from different origins: tap water from Granada, ground water from Santa Fe (Granada) and river water from Dilar (Granada). Cucumber samples were purchased from ecological agriculture. No incurred residues were detected in the tested samples by previous application of the proposed method.

For the preparation of the fortified samples, known amounts of the pesticide were added to the samples and then analysed, after the appropriate treatment above described.

Two different recoveries can be considered according to the moment in which the fortification procedure is carried out, namely: apparent recovery (R^*), calculated from samples spiked at the beginning of the extraction process and related with the overall systematic error of the whole analytical process; and calibration recovery (R^c), calculated from sample extracts spiked just before the measurement process, and related with the type of systematic error due to the matrix effect^{51,52}.

In the case of water samples, as no extraction procedure is needed, only calibration recovery (R^c) was estimated for various types of water of different origins (ground water, river water and tap water). The obtained results for both water and cucumber samples are shown in Table 1.5 and Table 1.6, respectively. Taking into account that in pesticide residue analysis the acceptable range for recovery is usually between 60-140% for routine analysis^{53,54}, the results obtained with the proposed method can be considered in agreement with the current demands.

Table 1.5. Determination of carbaryl in different kinds of waters (ground, river and tap waters).

Type of water	Added (ng ml ⁻¹)	Found (ng ml ⁻¹) ^a	Recovery (%)
Ground	25	23.5 ± 0.7	93.8 ± 3.0
	50	45.0 ± 0.3	90.1 ± 0.7
	75	76.6 ± 0.4	102.1 ± 0.6
River	25	32.3 ± 0.3	129.1 ± 1.2
	50	59.8 ± 0.7	119.7 ± 1.4
	75	79.7 ± 1.0	106.2 ± 1.3
Tap	25	23.6 ± 0.7	94.5 ± 2.9
	50	46.9 ± 1.4	93.8 ± 2.7
	75	77.1 ± 0.3	102.8 ± 0.5

^a Mean of four determinations ± standard deviation.

Table 1.6. Determination of carbaryl in cucumber.

Sample	Added (ng ml ⁻¹)	R* ¹ (%)	R ^c ² (%)
Cucumber	30	91.3 ± 3.6	103.2 ± 4.6
	40	69.2 ± 1.0	122.9 ± 0.8
	50	73.1 ± 1.3	119.4 ± 2.1
	75	71.1 ± 0.9	95.6 ± 0.5
	100	76.0 ± 1.3	95.7 ± 0.8

1. R* : apparent recovery. This recovery was calculated from samples spiked at the beginning of extraction process.

2. R^c : calibration recovery. This recovery was calculated from sample extracts spiked just before the measurement process.

4. CONCLUSIONS

The CL luminol reaction has been proposed for the first time for the determination of a N-methylcarbamate, the carbaryl pesticide.

This luminol–KMnO₄–based CL system in basic medium, coupled to a FIA manifold shows an easy, fast and cheap alternative detection mode for the analysis of carbaryl residues in environmental and food samples.

The method implies a previous extraction and sample clean-up in vegetal samples, while in waters, no pre-treatment is required.

The method shows good recoveries in compliance with the current guidelines, with a detection limit comparable with the most sensitive reported methods.

5. REFERENCES

1. J.H. Ruzicka, Proc. Soc. Anal. Chem. 10 (1973) 32.
2. B.D. McGarvey, J. Chromatogr. 642 (1993) 89.
3. S.S. Yang, A.I. Goldsmith, I. Smetena, J. Chromatogr. A 754 (1996).
4. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). www.fao.org.
5. Handbook of pesticide toxicology (2^o Ed.). R. Krieger (ed). Academic press, San Diego, CA, (2001).
6. J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, J. Chromatogr. A 882 (2000) 175.
7. M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatog. A 871 (2000) 43.
8. J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, J. Chromatog. A 996 (2003) 133.
9. P. Yáñez-Sedeno, C. Nova, L.M. Polo, Microchem. J. 38 (1988) 370.
10. K.D. Khalaf, A. Morales-Rubio, M. De la Guardia, Anal. Chim. Acta 280 (1993) 231.
11. B. Fernández-Baud, P. Linares, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chem. 68 (1991) 1672.
12. F. García-Sánchez, C. Cruces, Talanta 37 (1990) 573.
13. J.L. Vílchez, R. Avidad, A. Navalón, J. Rohaud, L.F. Capitán-Vallvey, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 53 (1993) 139.
14. M. del Olmo, J. Laserna, D. Romero, J.L. Vílchez, Talanta 44 (1997) 443.
15. F. García Sánchez, A. Navas, M.C. Torrijas, Anal. Chim. Acta 414 (2000) 25.
16. N.L. Pacioli, A.V. Veglia, Anal. Chim. Acta 488 (2003) 193.
17. W. Yansheng, J. Weijun, Z. Rahna, L. Changsong, Z. Sushe, Talanta 41 (1994) 1617.
18. S. Panadero, A. Gómez Hens, M.D. Pérez Bendito, Anal. Chem. 66 (1994) 919.
19. S. Morais, A. Maqueira, R. Puchades, Anal. Chem. 71 (1999) 1905.

20. P. Skladal, G.S. Nunes, H. Yamanaka, M.L. Ribeiro, *Electroanalysis* 9 (1997) 1083.
21. EPA Method 531.1., Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatisation, Revision 3.1, Edited 1995.
22. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, in A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Eds.), *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2001.
23. L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 927.
24. L. Gámiz-Gracia, J.F. Huertas-Pérez, J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, Chapter: Analysis of pesticides by chemiluminescence detection, in *Handbook of pesticides: Methods in pesticide residue analysis*, L.M.L. Mollet, H. Rathore (eds.). Taylor & Francis (in press).
25. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V Tomas, J. Martín, *Analyst* 127 (2002) 1526.
26. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V Tomas, J. Martín, *Anal. Chim. Acta* 476 (2003) 141.
27. T. Pérez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, M.D. García, *J. Chromatog. A* 1164 (2007) 174-180.
28. E.Orejuela, M. Silva, *J. Chromatog. A* 197 (2003) 1007.
29. J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 235.
30. J.J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 113.
31. M. Palomeque, J.A. García Bautista, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 149.

32. A. Chivulescu, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 113.
33. J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Talanta* 68 (2006) 586.
34. M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, *J. Chromatog. A* 950 (2002) 1.
35. X. Liu, J. Du, J. Lu, *Luminescence* 18 (2003) 245.
36. J.X. Du, X.Y. Liu, J. Lu, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1029.
37. X.Z. Li, T.T. Guan, C. Zhou, J.Q. Yin, Y.H. Zhang, *Chemical Research in Chinese Universities* 22 (2006) 21.
38. Z. Song, S. Hou, N. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4468.
39. G. Huang, J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, Y. Yang, C. Tao, *Anal. Chim. Acta* 474 (2002) 21.
40. B. Li, Y. He, C. Xu, *Talanta* 72 (2007) 223.
41. H. Kubo, Y. Tsuda, Y. Yoshimura, H. Homma, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 49.
42. P. Moris, I. Alexandre, M. Roger, J. Remacle, *Anal. Chim. Acta* 302 (1995) 53.
43. M. Tabata, C. Fukunaga, M. Ohyabu, T. Murachi, *J. Appl. Biochem.* 6 (1984) 251.
44. C. A. Koerner, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* 58 (1986) 116.
45. Y. Rakicioğlu, J.M. Schulman, S.G. Schulman, in A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Eds.), *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 2001, p 108.
46. X. Liu, J. Du, J. Lu, *Luminescence* 18 (2003) 245.
47. Z. Song, S. Hou, N. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4468.
48. Statgraphics Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville (USA) 2000.

49. A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés-Barrero, M. Róman-Ceba, J.L. Sierra Fernández, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
50. Límites Máximos de Residuos de Productos Fitosanitarios. Ed. 2.1 (1/7/03). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto 198/2000.
51. L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, E. Almansa-López, A. González-Casado, F.J. Egea-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *Talanta* 66 (2005) 1063.
52. L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, J. J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, A.M. García-Campaña, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 295.
53. Guidance Document on Residue Analytical Methods, European Commission, SANCO/825/00 rev. 6, (2000).
54. Regulatory Limits for Pesticide Residues in Water, IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1123.

CHAPTER 2

CHEMILUMINESCENCE DETERMINATION OF
CARBOFURAN AT TRACE LEVELS IN LETTUCE
AND WATERS BY FLOW INJECTION ANALYSIS

CHEMILUMINESCENCE DETERMINATION OF CARBOFURAN AT TRACE LEVELS IN LETTUCE AND WATERS BY FLOW INJECTION ANALYSIS

RESUMEN

Se ha descrito un método quimioluminiscente (CL) rápido y simple para la determinación directa de carbofurano mediante análisis por inyección en flujo (FIA), basado en la reacción del luminol con KMnO_4 en medio alcalino. El método se basa en la exaltación que se produce de la emisión de luz debida a la oxidación del luminol en presencia de carbofuran. La optimización de las variables instrumentales y químicas que afectan a la respuesta CL del método se ha llevado a cabo mediante la aplicación de diseño de experimentos, usando el montaje FIA propuesto. Bajo las condiciones óptimas, la intensidad CL es lineal para concentraciones de carbofurano en el rango comprendido entre $0.06 - 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, con un límite de detección de $0.02 \mu\text{g ml}^{-1}$. El método se ha aplicado satisfactoriamente a la determinación de carbofurano en muestras dopadas de agua y en una matriz vegetal.

SUMMARY

A simple, fast chemiluminescence (CL) flow-injection (FIA) method based on the reaction of luminol with KMnO_4 in alkaline medium has been described for the direct determination of carbofuran. The method is based on the enhancing effect in the emission light from the oxidation of luminol produced in presence of carbofuran. The optimisation of instrumental and chemical variables influencing

the CL response of the method has been carried out by applying experimental design, using the proposed flow injection manifold. Under the optimal conditions, the CL intensity was linear for a carbofuran concentration over the range of 0.06 - 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, with a detection limit of 0.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The method has been successfully applied to the determination of carbofuran residues in spiked waters and in a vegetal sample.

1. INTRODUCTION

Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate) is a broad-spectrum pesticide belonging to the N-methylcarbamate group. These pesticides are biodegradable and of low soil persistence. They are degraded in water by hydrolysis, biodegradation, oxidation, photolysis, biotransformation and metabolic reactions in living organisms^{1,2}. However, some carbamate pesticides are suspected to be endocrine disruptors^{3,4}. Because these chemicals in minute quantities affect to human body, very low concentrations of these pesticides in the environment need to be measured. Carbofuran products are used worldwide for control of insects on a wide variety of fruit, vegetables, forage, cotton and other crops including bananas, coffee beans, grapes, potatoes, corn, rice, sugarcane, and wheat^{5,6}.

In this study, we have found that the pesticide carbofuran produces a great enhancement on the CL emission from the luminol oxidation by potassium permanganate in alkaline medium without catalyst, considering a similar mechanism that it was proposed on chapter 1. This enhancement in the CL emission is proportional to the concentration of the studied compound, which can be determined by measuring the increase in the CL intensity. Based on these findings, a simple and fast new direct FIA-CL method has been developed for the determination of carbofuran, which has been satisfactorily applied in different natural waters and in vegetal food.

2. EXPERIMENTAL

2.1. APPARATUS

The manifold used to deliver all solutions is shown in Figure 2.1. A peristaltic pump (Gilson Minipulse-3) was used to drive the carrier and CL reagent streams through the flow system. Each stream was pumped at a constant flow rate of 4 ml min^{-1} . The sample solution was injected into the carrier stream of sodium hydroxide using a Rheodyne 5020 injection valve.

The intensity of CL emission was measured with a Camspec CL-1 detector (Camspec), equipped with a quartz flow-cell ($120 \mu\text{l}$ volume), data control and acquisition software. A rotavapor (Büchi RE 121, Büchi Laboratoriums-Technik AG), a vacuum manifold system (Supelco) and a domestic blender (Taurus) were used for sample preparation.

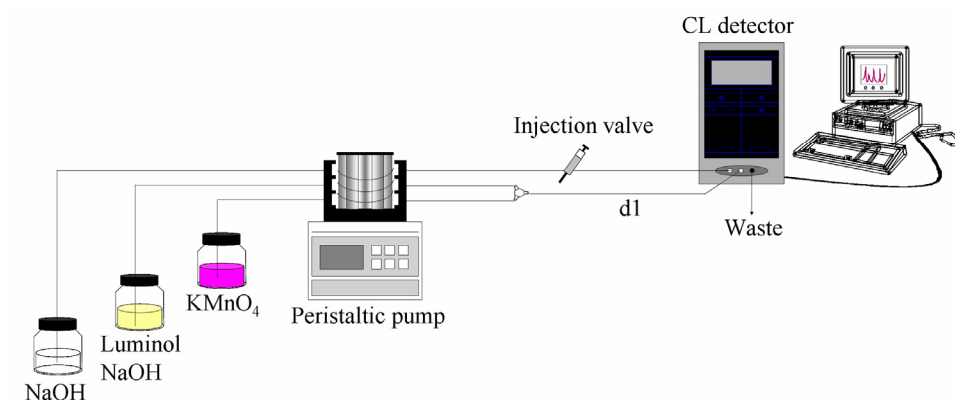


Figure 2.1. Schematic FIA manifold. d1: mixing reactor.

2.2. CHEMICALS AND REAGENTS

All the reagents used were of analytical grade and solvent of HPLC grade. The water used to prepare the solutions was purified with a Milli-Q Plus water system (Millipore Iberica).

A 1 mM stock solution of luminol (3-aminophthalhydrazide), purchased from Sigma, was prepared in 0.1 M sodium hydroxide (98 % Panreac) and stored at least three days in refrigerator to attain stability before use^{7,8}. This solution is stable at least for one week.

A 1 mM stock solution of potassium permanganate (98%, Panreac) was prepared by dissolving the product in water and the corresponding working solutions were prepared daily by appropriate dilutions. A stock standard solution of carbofuran (100 mg l⁻¹) was prepared by dissolving 2.5 mg of the product (99%, ChemService) in 25 ml of methanol (Panreac). Working standard solutions were prepared by dilution in water.

Filter paper (0.45 µm pore size, Millipore), ethyl acetate (Panreac), anhydrous sodium sulphate (Panreac) and alumina (Merck) homemade cartridge (1.5 g) were used for sample preparation.

2.3. GENERAL PROCEDURE

The FIA configuration consisted on a three-channel manifold where either the standard or sample solutions containing carbofuran were incorporated to a NaOH solution carrier with the aid of a manual injection valve (Figure 2.1). Prior to the CL measurement acquisition corresponding to the solutions containing

carbofuran, the alkaline luminol solution stream was mixed with the permanganate solution stream in a three-way “T” connector. The resulting stream was then mixed with the NaOH carrier solution into the detection cell and the CL emission resulting from the oxidation of luminol was recorded as the background blank signal (baseline).

Solutions containing carbofuran were injected into the NaOH stream and allowed to mix with the luminol-KMnO₄ mixture in the CL detector. The determination of carbofuran was based on the increase in the CL intensity, calculated as

$$\Delta I = I - I_0 \quad (\text{Eq. 2.1})$$

where I is the net CL signal of the system in presence of carbofuran and I_0 is the CL intensity corresponding to the baseline.

2.4. SAMPLE PREPARATION

For the application of the method, water samples of different origins were filtered through a filter paper and collected in a glass bottle previously cleaned with nitric acid. The samples were stored in the dark at 4°C until analysis.

For the determination of carbofuran in vegetables, portions of lettuce sample (20 g) were spiked with different amounts of carbofuran (2-4 mg l⁻¹). After 5 minutes, samples were chopped and homogenized for 5 minutes with 35 ml of ethyl acetate and 30 g of anhydrous sodium sulphate. The mixture was

filtered through a filter paper with vacuum and collected in a flask. A 15 ml volume of ethyl acetate was used to clean both the filter and flask. The obtained solution was concentrated in a rotavapor to a low volume (2 ml), and then 3 ml of ethyl acetate were added. The obtained extract was passed through an alumina cartridge, containing 1.5 g of alumina, which was previously conditioned with 3 ml of methanol and 3 ml of water. The sample was eluted and collected in a glass vial. The ethyl acetate extract was evaporated under nitrogen stream until dryness. The residue was re-dissolved with 2 ml of methanol, properly diluted with ultra pure water and analysed in the FIA–CL system.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMISATION OF THE METHOD

The optimisation of the method was carried out by application of the experimental design and surface response methodologies for those factors, chemical and instrumental, affecting the analytical response. This multivariate optimisation implies two steps: a) a preliminary evaluation, using a screening factorial design, in order to select the significant factors in the analytical procedure; and b) an appropriate estimation of the real functional relationship (response function) between the analytical response (CL intensity) and the significant factors, so as to obtain their optimum values. The analysis of the data was carried out using the Statgraphics software⁹. In this case, we decided to carry out a simultaneous optimisation of all the variables (chemical and instrumental) jointly, using the same experimental design to consider all the possible interactions.

3.1.1. SCREENING OF THE SELECTED VARIABLES

In order to check the effect of varying the concentration of the each solution, the flow rate of the three channels and the length from the mixing “T” to the detector on the CL intensity, a 2^{7-2} screening design plus three cantered points was carried out, selecting the levels showed in Table 2.1 to define the experimental domain. The measurements were carried out using a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ carbofuran concentration solution, and an injection loop of 70 μl . Considering the enhancement on CL intensity as the analytical response of the model, the total effects of the different variables as well as their second order interactions were evaluated.

Table 2.1. Studied factors and selected levels in the experimental region for the screening design.

Variable	Low(-1)	High(+1)
A: Sodium hydroxide concentration (mol l ⁻¹)	0.03	0.3
B: Luminol concentration (mol l ⁻¹)	5 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁵
C: Potassium permanganate concentration (mol l ⁻¹)	3.2 x 10 ⁻⁶	3.2 x 10 ⁻⁵
D: Length of the reactor (cm)	0	100
E: Sodium hydroxide flow rate (ml min ⁻¹)	2.5	5.5
F: Luminol flow rate (ml min ⁻¹)	2.5	5.5
G: Potassium permanganate flow rate (ml min ⁻¹)	2.5	5.5

As can be seen in the standardized Pareto chart (Figure 2.2), the study showed that sodium hydroxide concentration, luminol concentration and potassium permanganate flow rate as well as their second order interactions were significant factors affecting the response when their values change into the selected region. The second order interaction between sodium hydroxide flow rate and reactor length was also significant. However, this interaction was not considered in further studies as, under a chemical point of view, it has no sense because the sodium hydroxide channel is independent from the distance between the mixing "T" and the detector, that is, the reactor length. For non-significant variables, the nominal values of the zero level (central value of the experimental region) were selected for further studies, corresponding to: 4.0 ml min⁻¹ for sodium hydroxide and luminol flow rates, 1 x 10⁻⁵ M for potassium permanganate concentration and 50 cm (0.5 mm i.d.) for the reaction coil length.

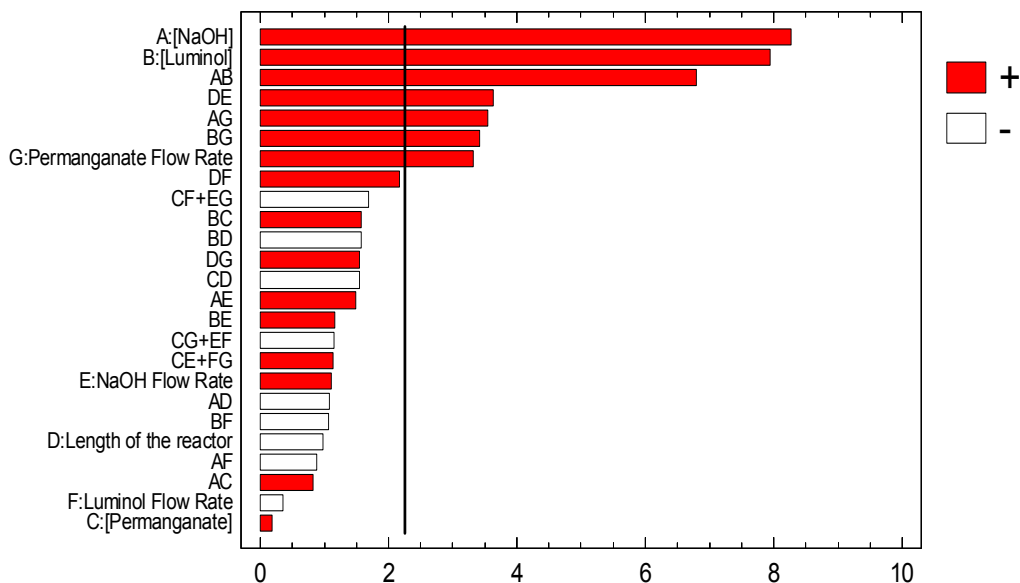


Figure 2.2. Standardised Pareto Chart showing the effects of chemical and instrumental factors and their interactions on the CL emission.

3.1.2. OPTIMISATION OF THE SIGNIFICANT VARIABLES

In order to optimise simultaneously the significant factors, a 2^3 central composite plus centred face star design (with three central points) was applied, using the selected levels indicated in Table 2.2.

Table 2.2. Selected levels used in the optimisation of significant factors.

Variable	Low(-1)	High(+1)
A: Sodium hydroxide concentration (mol l^{-1})	0.01	1
B: Luminol concentration (mol l^{-1})	2.5×10^{-6}	2.5×10^{-5}
G: Potassium permanganate flow rate (ml min^{-1})	1	5

For this first design, it was not possible to obtain optimum conditions for the selected factors because the selected experimental domain was too wide and the response variation was not well defined. Consequently and with the aim of obtaining more accurate optimum values and taking into account the results previously obtained, the experimental domain for the studied variables was reduced (Table 2.3). Again, a 2^3 central composite plus face centered star design (with three central points) was applied.

Table 2.3. Selected levels used in the optimisation of significant factors.

Variable	Low(-1)	High(+1)
A: Sodium hydroxide concentration (mol l ⁻¹)	0.1	0.5
B: Luminol concentration (mol l ⁻¹)	1×10^{-5}	2×10^{-5}
G: Potassium permanganate flow rate (ml min ⁻¹)	2	4

The optimum obtained conditions were 0.39 and 1.46×10^{-5} M for sodium hydroxide and luminol concentrations, respectively, and a 4 ml min⁻¹ flow rate for the potassium permanganate stream. The estimated response surfaces are shown in Figure 2.3. According to these results, further experiences with increasing potassium permanganate flow rates were required, as the optimum value was just in the upper limit of the selected experimental domain. Thus, a univariate study was developed testing flow rates in the range of 4 - 5.5 ml min⁻¹. Finally a flow rate of 4 ml min⁻¹ was selected, as higher flow rates did not enhance the CL intensity.

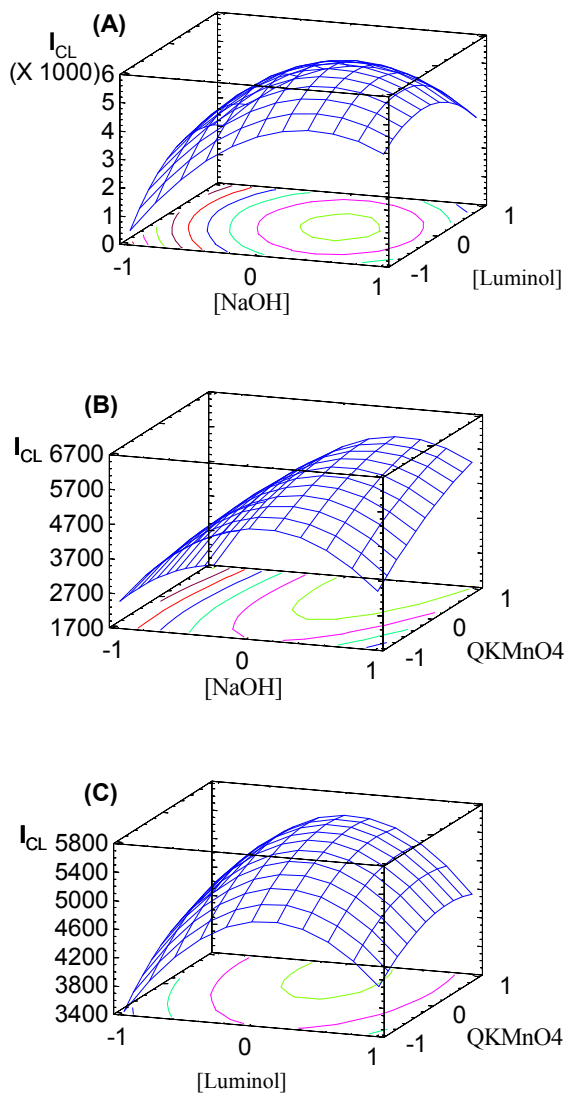


Figure 2.3. Response surfaces obtained in the optimisation of the factors affecting the CL-FIA system for the detection of carbofuran by using a 2^3 central composite plus centred face star design (with three central points). The concentrations are expressed in coded values. Q = flow rates

Under these optimum conditions the effect of the injection volume was examined over the range of 20 - 150 μl , using a 0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ carbofuran solution, which assured a non-saturated signal in all cases. An injection volume of 50 μl was selected as optimum as it provided the best signals in terms of both repeatability and CL peak height.

The final selected values for the studied variables are summarised in Table 2.4.

Table 2.4. Final selected values for the studied variables.

Variable	Selected value
Sodium hydroxide concentration (mol l^{-1})	0.39
Luminol concentration (mol l^{-1})	1.5×10^{-5}
Potassium permanganate concentration (mol l^{-1})	1.0×10^{-5}
Length of the reactor (cm)	50
Sodium hydroxide flow rate (ml min^{-1})	4.0
Luminol flow rate (ml min^{-1})	4.0
Potassium permanganate flow rate (ml min^{-1})	4.0

3.2. ANALYTICAL PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Under the optimum conditions above described and using the proposed FIA manifold, the calibration curve for the determination of carbofuran was established by quadruple injections of standard solutions with analyte concentrations of 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The obtained FIA-gram is shown in Figure 2.4. Using least square regression, CL intensity (I_{CL}) was proportional to the carbofuran concentration (C) over the studied range. The

obtained curve is presented in Figure 2.5 and the performance characteristics in Table 2.5.

Table 2.5. Performance characteristics for the determination of carbofuran.

Lineal Range	0.06 - 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Slope	-92.00 c.u./ $\mu\text{g ml}^{-1}$
Intercept	6101.76 c.u.
$S_{R,c}$	35.91 c.u./ $\mu\text{g ml}^{-1}$
R^2	99.84 %
Linearity	99.07 %
Analytical resolution	0.01 c.u./ $\mu\text{g ml}^{-1}$
Precision *	1.09 %
Detection limit	0.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Quantification limit	0.06 $\mu\text{g ml}^{-1}$

c.u. = chemiluminescence units.

$S_{R,c}$ = standard deviation of the regression.

R^2 = determination coefficient.

* expressed as relative standard deviation (%) for a concentration of 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and calculated from the calibration data set.

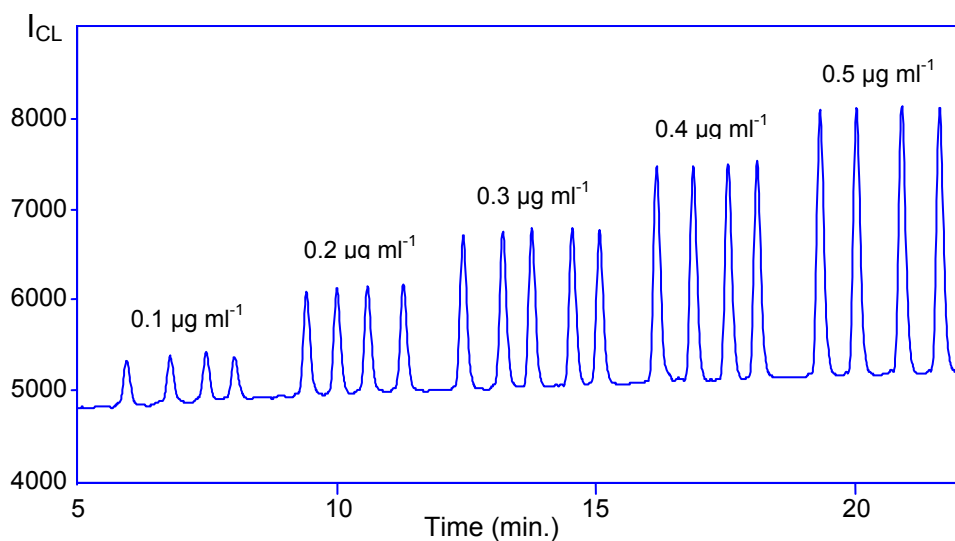


Figure 2.4. Calibration curve for the CL determination of carbofuran. Standard solutions containing 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

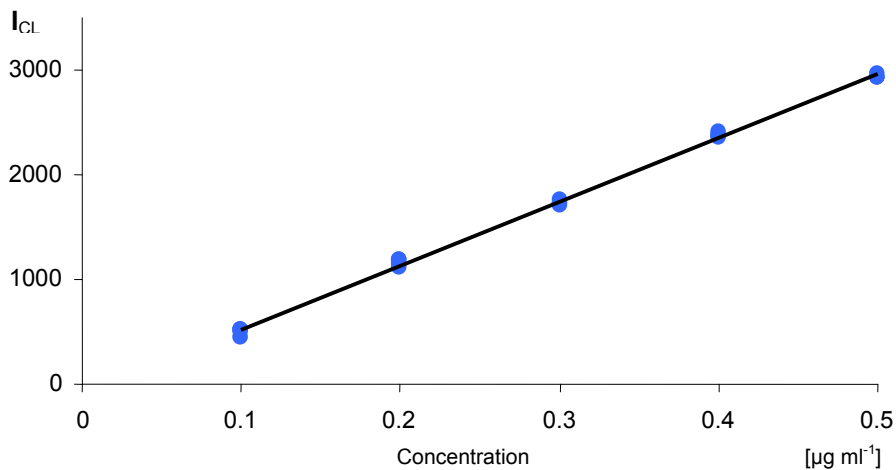


Figure 2.5. Calibration curve for the determination of carbofuran by mean of the proposed method.

3.3. INTERFERENCE STUDY

An extensive interference study was carried out on a selected concentration of carbofuran ($0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$), to test the influence of foreign species that could be present in real samples. Several ions, carbamates (aldicarb and promecarb), organophosphorous (dichlorvos and chlorpyrifos-methyl) and pirethroid (femproathrin and acrinathrin) pesticides were studied. Firstly, a confidence interval on the analytical response was established by repetitive injections ($n = 4$) of standard solutions of $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of carbofuran. This interval was defined as¹⁰

$$R \pm t_{2\alpha} \cdot S_R \quad (\text{Eq. 2.2})$$

being R the predicted CL signal from the regression equation for the selected analyte concentration, $t_{2\alpha}$, the two-tailed Student-t ($\alpha=0.05$; $(n-1)$ degrees of freedom) and S_R , the standard deviation for the CL selected response at the selected analyte concentration level.

Then, standard solutions containing a concentration of $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ of carbofuran and increasing concentrations of each potential interferent were injected into the flow system and their signal were compared with the defined interval, with the purpose to estimate the maximum rate of interferent tolerated by the method. A substance was considered as an interferent at a certain level if the obtained signal was out of the confidence interval, being a *positive interference* if the signal was above the upper limit of the interval, and a *negative interference* if the signal was below the lower limit of the interval. Thus, each species was studied until the obtained signal corresponding to a specific ratio

analyte:interferent was into the confidence interval, considering this concentration as the maximum tolerance level.

It can be concluded that the tolerated interferent concentrations were in most cases higher than those normally present in real samples. No interference effect was found for sulphate, phosphate, potassium (I), sodium (I), calcium (II), zinc (II) and chloride in the studied range (1000-fold was the maximum tested), while the maximum tolerate rate was 500-fold excess for fempropatrhin, acrinathrin, chlorpyriphos-methyl, aldicarb, 100-fold for magnesium (II), dichlorvos and 10-fold for promecarb.

Some ions, such as iron (III), cobalt (II) and copper (II) interfered in low concentrations (0.1-fold was the less tested), because they could act as a catalyst in the oxidation of luminol.

Table 2.6. Study of possible interferences on the CL intensity corresponding to a carbofuran concentration of 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Foreign species	Maximum tolerable ratio
SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cl^-	>1000
Fempropatrhin, acrinathrin, chlorpyriphos-methyl, aldicarb	500
Mg^{2+} , dichlorvos,	100
Promecarb	10
Fe^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+}	0.1

3.4. ANALYTICAL APPLICATIONS

The applicability of the proposed FIA-CL method for the analysis of carbofuran was demonstrated in real samples. For this purpose different water samples (river water from Dílar (Granada), ground water from Santa Fe (Granada) and tap water from Granada) and lettuce samples obtained from ecological agriculture, free of carbofuran, were spiked at different concentration and trueness was evaluated by means of recovery studies.

The water samples were filtered and stored in a refrigerator. For the determination of carbofuran in vegetables, portions of lettuce sample (20 g) were spiked with different amounts of carbofuran (2, 3 and 4 mg l⁻¹, which corresponds to a final injected concentration of 0.1, 0.15 and 0.2 mg l⁻¹) and then analysed, after the appropriate treatment above described.

As we indicated in chapter 1, two different recoveries can be considered according to the moment in which the spiking procedure is carried out^{11,12}:

- a) Apparent recovery (R^*), calculated from samples spiked at the beginning of the extraction process and related with the overall systematic error of the whole analytical process.
- b) Calibration recovery (R^c), calculated from sample extracts spiked just before the measurement process, and related with the type of systematic error due to the matrix effect.

In the case of water samples, as no extraction procedure was required, only calibration recovery (R^c) was estimated. The obtained results are shown in Table 2.7 and Table 2.8 for water and lettuce analysis, respectively. Taking into account that in pesticide residue analysis the acceptable range for recovery is

usually between 60-140% for routine analysis^{13,14}, the results obtained with the proposed method can be considered in agreement with the current demands.

Table 2.7. Determination of carbofuran in different kinds of waters (ground, river and tap water).

Type of water	Added ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^a	Recovery (%)
Ground	0.10	0.12 \pm 0.01	117 \pm 6
	0.15	0.15 \pm 0.01	98 \pm 4
	0.20	0.23 \pm 0.01	113 \pm 3
River	0.10	0.14 \pm 0.02	137 \pm 15
	0.15	0.15 \pm 0.01	102 \pm 4
	0.20	0.24 \pm 0.01	118 \pm 3
Tap	0.10	0.09 \pm 0.00	98 \pm 1
	0.15	0.15 \pm 0.01	100 \pm 7
	0.20	0.19 \pm 0.01	93 \pm 4

^a Mean of four determinations \pm standard deviation

Table 2.8. Determination of carbofuran in lettuce samples (n=4).

Sample	Added (mg l^{-1})	Final injected concentration (mg l^{-1})	R* ¹	R ^c ²
Lettuce	2	0.10	69 \pm 2	72 \pm 3
	3	0.15	73 \pm 1	70 \pm 1
	4	0.20	64 \pm 2	76.2 \pm 0.4

Mean of four determinations \pm standard deviation

1. R* : apparent recovery

2. R^c: calibration recovery

4. CONCLUSIONS

The results presented in this work demonstrate that the coupling of luminol–KMnO₄ CL reaction and FIA is a very suitable approach to determine carbofuran residues at trace levels in environmental and vegetable samples, being a fast and cheap alternative.

The proposed method offers several advantages which are associated with the use of both FIA technique (low reagent consumption, high throughput and easy automation) and CL detection (high sensitivity, wide dynamic range and simple instrumentation).

The method implies a previous extraction and sample clean-up in vegetal samples, while in waters, no pre-treatment is required. Nevertheless, in the case of tap water for human consumption, the maximum limit of residue for carbofuran is 0.1 µg l⁻¹, and a previous pre-concentration step would be required. The method shows good recoveries in compliance with the current guidelines.

5. REFERENCES

1. S. Chiron, J.A. Torres, A. Fernández de Alba, M.F. Alpendurada, D. Barceló, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 65 (1996) 37.
2. C. Hidalgo, J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 121.
3. W.P. Porter, S.M. Green, N.L. Debbink, I. Carlson, *J. Toxicol. Environ. Health* 40 (1993) 15.
4. D.M. Klotz, S.F. Arnold, J.A. McLachlan, *Life Sci.* 60 (1997) 1467.
5. B.D. McGarvey, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 89.
6. S.S. Yang, A.I. Goldsmith, I. Smetena, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 3.
7. M. Tabata, C. Fukunaga, M. Ohyabu, T. Murachi, *J. Appl. Biochem.* 6 (1984) 251.
8. C. A. Koerner, T. A. Nieman, *Anal. Chem.* 58 (1986) 116.
9. Statgraphics Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville (USA) 2000.
10. A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, C. Jiménez Linares, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 28 (1995) 369.
11. L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, E. Almansa-López, A. González-Casado, F.J. Egea-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *Talanta* 66 (2005) 1063.
12. L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, J. J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, A.M. García-Campaña, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 295.
13. Guidance Document on Residue Analytical Methods, European Commission, SANCO/825/00 rev. 6, (2000).
14. Regulatory Limits for Pesticide Residues in Water, IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1123.

CHAPTER 3

DETERMINATION OF N-METHYLCARBAMATE
PESTICIDES IN WATER AND VEGETABLE
SAMPLES BY HPLC WITH POST-COLUMN
CHEMILUMINESCENCE DETECTION USING THE
LUMINOL REACTION

DETERMINATION OF N-METHYLCARBAMATE PESTICIDES IN WATER AND VEGETABLE SAMPLES BY HPLC WITH POST-COLUMN CHEMILUMINESCENCE DETECTION USING THE LUMINOL REACTION

RESUMEN

En este capítulo se propone un nuevo método cromatográfico para la determinación simultánea de tres N-metilcarbamatos (NMCs), carbofurano, carbaril y metiocarb usando la reacción quimioluminiscente (CL) del luminol en modo post-columna como técnica de detección. Este método se basa en la exaltación que producen estos analitos en la emisión CL generada por la oxidación del luminol con permanganato potásico en medio alcalino. La separación se consigue en menos de 14 minutos, usando una columna C18 y elución isocrática con una fase móvil binaria compuesta por acetonitrilo:agua (50:50 v/v), bombeada a 1 ml min^{-1} . Los reactivos CL (luminol y KMnO_4) son incorporados mediante una bomba peristáltica y primero se mezclan usando un conector de tres vías. Después esta corriente se mezcla con el eluato procedente de la columna cromatográfica con otro conector justo antes de alcanzar la célula de detección. La optimización de las variables que afectan a la reacción CL (medio de reacción, concentración y flujo de los reactivos, y la distancia del tubo de conexión entre conectores) se llevó a cabo mediante diseño de experimentos. Etiofencarb, un NMC que hoy día ha caído en desuso se usó como patrón interno. Para el análisis de estos pesticidas en muestras reales de agua de diferente procedencia, se llevó a cabo una etapa de pre-tratamiento mediante extracción en fase sólida (SPE), con el objetivo de alcanzar una sensibilidad por debajo de la concentración legal máxima

permitida. En el caso de muestras vegetales, la SPE se usó para la limpieza de la matriz. Los límites de detección están dentro del rango 13.5 - 81.6 ng l⁻¹ para muestras de agua y entre 8.3 - 48.0 µg kg⁻¹ para muestras de vegetales.

SUMMARY

In this chapter a new reverse high performance liquid chromatography (HPLC) method is proposed for the simultaneous determination of three N-methylcarbamates (NMCs) named carbofuran, carbaryl and methiocarb, using the post-column chemiluminescence (CL) detection with the luminol reaction. This method is based on the enhancing effect of these analytes on the CL emission generated by the oxidation of luminol with potassium permanganate in alkaline medium. The separation was reached in less than 14 min. using a C18 column and an isocratic binary mobile phase consisting of acetonitrile:water (50:50, v/v) pumped at a flow rate of 1 ml min⁻¹. CL reagents (luminol and KMnO₄) were incorporated by means of a peristaltic pump and were firstly mixed using a three-way connector. Then this stream was mixed with the eluate using another three-way connector just before reaching the detection cell. The optimisation of variables affecting the CL reaction (reaction medium, concentration and flow rate of reagents and distance between both connectors) was carried out by means of experimental designs. Ethiofencarb, a NMC which has nowadays fallen into disuse was used as internal standard. For the analysis of these pesticides in real water samples a pre-treatment step consisting of solid phase extraction (SPE) was conducted in order to reach sensitivity levels below the legal maximum concentration permitted. In the case of vegetable sample, SPE was used for matrix cleaning purpose. Detection limits were within the range 13.5 - 81.6 ng l⁻¹ for water samples and from 8.3 - 48.0 µg kg⁻¹ for vegetal samples.

1. INTRODUCTION

N-methylcarbamates (NMCs) are compounds with chemical structure: $R-O-C(O)-N(CH_3)-R'$, where R is an alcohol, an oxime or a phenol, and R' is an hydrogen or a methyl group. They are commonly employed as pesticides, due to their neurotoxic effect as reversible inhibitors of the enzyme cholinesterase, being mortal in high dosage. Their main characteristics are high toxicity, low stability, and non-accumulation in organic tissues, as it was indicated in the introduction. Some of the NMCs, including carbaryl, carbofuran and methiocarb, are considered in the final list of compounds to be considered for periodic re-evaluations by the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)¹.

In previous chapters, we have proposed the use of potassium permanganate as oxidant in the luminol CL reaction, establishing two different FIA methods for the determination of carbaryl and carbofuran, respectively in vegetables and different types of waters^{2,3}. The methods are based on the great enhancement produced by the presence of these analytes on the CL emission from the luminol oxidation being this increase proportional to the concentration of the studied compounds.

From these previous results and considering that the CL luminol reaction offers more promising results when is hyphenated with HPLC, providing a high efficiency in separation and low detection limits inherent to CL, the objective in this chapter is to establish a simple, sensitive and selective method for the simultaneous determination of NMCs (carbaryl, carbofuran and methiocarb, see Figure 3.1) in environmental samples. The adequate optimisation of chemical and instrumental variables that affect both the reverse phase LC separation and the post-column CL detection and the selection of the most compatible conditions, as well as and adequate study of the preconcentration and cleanup

procedures for real samples, ensures the efficacy, accuracy and sensitivity of the method, which has provided enough low detection limits to allow the simultaneous analysis of these NMCs in vegetal and water samples.

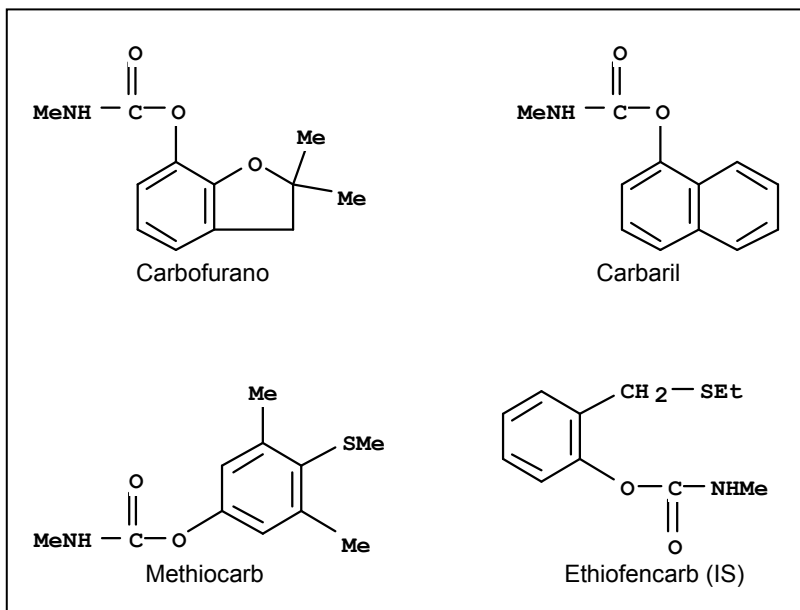


Figure 3.1. Structure of the selected N-methylcarbamates.

2. EXPERIMENTAL

2.1. CHEMICALS AND REAGENTS

All the reagents used were of analytical grade and the solvents of HPLC grade. Ultrapure water (Milli-Q plus system, Millipore Bedford, MA, USA) was used throughout the work. Organic solvents acetonitrile, methanol, ethyl acetate and dichloromethane were acquired from Panreac-Química (Madrid, Spain). Acetone was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Analytical standard of carbaryl (purity 99.5%, CAS RN [63-25-2]), carbofuran (purity 99%, CAS RN [1563-66-2]), methiocarb (purity 99%, CAS RN [2032-65-7]) were purchased from ChemService (West Chester, PA, USA) and ethiofencarb (purity 97.4%, CAS RN [29973-13-5]) from Riedel-de-Haën (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain). Individual stock standard solutions containing 500 mg l⁻¹ of each compound were prepared by dissolving accurately weighed amounts in methanol and stored in darkness at 4 °C. They are stable for at least 4 months. An intermediate stock solution containing 10 mg l⁻¹ of carbaryl, carbofuran and methiocarb was prepared weekly by diluting with methanol. Working standard solutions were freshly prepared by dilution to the desired concentration with water.

A 1 mM stock solution of luminol (3-aminophthalhydrazide), purchased from Sigma, was prepared in 0.1 M sodium hydroxide (purity 98% Panreac) and stored at least three days into the refrigerator to attain stability before use^{4,5}. This solution is stable at least for 1 month. Working solution of desired concentration was obtained by diluting with sodium hydroxide solution of different concentrations. Stock solution of potassium permanganate (98%,

Panreac) was prepared at a concentration of 1 mM in water, diluted to the required concentration and stored in darkness at room temperature for 1 month.

The sorbent used in the application of solid-phase extraction (SPE) for the treatment of water samples was Oasis HLB, a copolymer of poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone (200 mg, 6 mL) (Waters, Milford, MA, USA). For cleanup purposes in the case of the treatment of vegetable samples Alumina N homemade cartridge (1.5 g) obtained from Supelco was used.

2.2. INSTRUMENTATION AND SOFTWARE

The HPLC system consisted on a quaternary high pressure pump coupled to a multichannel UV/Vis detector (Model PU-2089 and UV-2077 respectively, Jasco Analítica, Madrid, Spain), both managed with HSS-2000 System Control version 3.5.2. and Jasco-Borwing version 1.5 (Jasco Analítica). Subsequently, CL intensity was measured with a Camspec CL-1 detector (Camspec, Cambridge, United Kingdom), equipped with a two-intake quartz flow cell with a volume of 120 μ l. Detector CL signal outputs were acquired and processed using CSW32 software version 1.2. (DataApex, Prague, Czech Republic). The reversed-phase separation was carried out on a C18 Luna Column (particle size 5 μ m, 250 \times 4.6 mm., Phenomenex, Torrance, CA, USA) in conjunction with a guard-column equipped with a 4 mm. disposable cartridge of similar packing (Phenomenex). Sample was injected into the chromatographic system using a Rheodyne 7725i manual injection valve (Rheodyne, L.P., Bensheim, Germany) with a 100 μ l loop. Stainless steel and polyetheretherketone (PEEK) tubing and connections were also used in the system. Reagents for the post-column CL reaction were delivered using a peristaltic pump (Gilson Minipuls-3, Villiers-le-Bel, France), Teflon tubing and connectors. Two high pressure pumps (Model

PU-2085 and PU-2080, Jasco Analítica Spain) connected to the system by means of PEEK tubing and connections were also tested. The applied HPLC-UV-CL equipment is shown in Figure 3.2.

A vacuum manifold system from Supelco coupled with a vacuum pump (Büchi model B-169, Flawil, Switzerland), a rotavapor (Büchi RE 121), domestic blender from Taurus (Lerida, Spain) were used for sample preparation. For pH measurements, a pH-meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed with a resolution of ± 0.1 pH unit.

For statistical treatment of data ALAMIN software⁶ and STATGRAPHICS⁷ package were used.



Figure 3.2. HPLC-UV-CL system used in this chapter.

2.3. GENERAL PROCEDURE

A scheme of the applied HPLC-UV-CL system is shown in Figure 3.3. The reverse phase separation was carried out in a C18 column using an isocratic binary mobile phase consisting of ACN:water (50:50, v/v) pumped at a flow rate of 1 ml min^{-1} . Both solvents were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon filter (Supelco, Barcelona, Spain). Separation was made at room temperature ($23 \pm 1.8 \text{ }^\circ\text{C}$). A peristaltic pump was used to deliver luminol and potassium permanganate solutions at a flow rate of 2.00 and 1.54 ml min^{-1} , respectively, to a three-way “T” connector with a 1.5 mm bore size (Omnifit, Cambridge, UK) for mixture. Then, another T-piece with a 0.8 bore size (Omnifit) was used to mix the eluate, after separation and UV/vis detection at wavelength of 220 nm , with the stream of luminol and potassium permanganate solutions. A mixing reactor (d1, teflon tube, 0.5 mm I.D., 25 cm length) linked both “T” connectors. Another mixing reactor (d2, teflon tube, 0.3 mm I.D., 5 cm length), was used to link the outlet of the second connector and the inlet of the detection cell. The resulting stream was passed into the detection cell and CL emission resulting from the oxidation of luminol was recorded as the background blank signal (baseline).

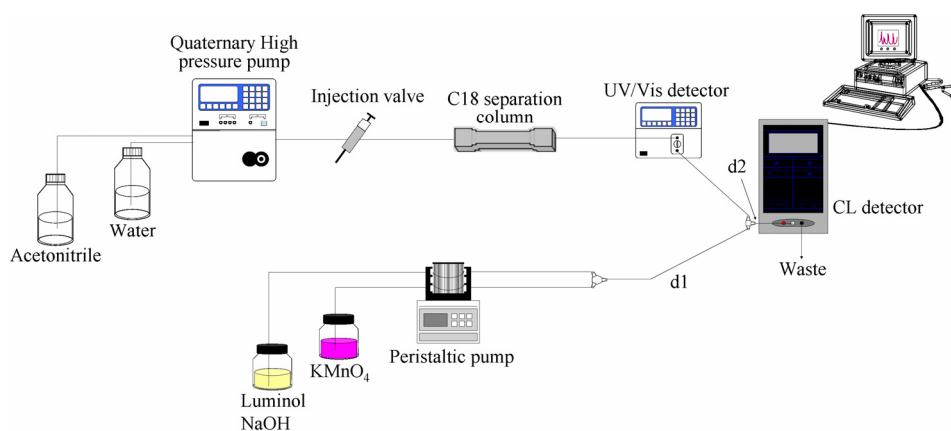


Figure 3.3. Scheme of the HPLC-UV-CL manifold; d1 and d2: mixing reactors.

The quantification of carbamates was based on the increase in the CL intensity due to the presence of the NMCs, calculated as

$$S = [I / I_{IS}] \quad (\text{Eq. 3.1})$$

where S is the analytical signal, I is the net CL signal due to the presence of the analyte in the luminol-KMnO₄ system, expressed in terms of peak area and I_{IS} is the CL signal due to the internal standard. Ethiofencarb was selected as IS due to it is a NMC which has fallen into disuse and also produced an enhancement of the CL emission from the luminol oxidation by potassium permanganate in alkaline medium. Furthermore it is well differentiated from the rest of analytes in the selected chromatographic conditions.

2.4. SAMPLE PREPARATION PROCEDURES

2.4.1. WATER SAMPLES

Freshly collected water samples of different origins were filtered through 0.45 µm nylon filter to remove suspended particulate matter, collected in a glass bottle previously cleaned with nitric acid and adjusted at pH 3.0 in order to prevent the potential degradation of NMC pesticides. The samples were stored in the dark at 4 °C until analysis.

Extraction and preconcentration of the analytes were achieved by SPE with Oasis HLB cartridges (200 mg, 6 ml) preconditioned with 5 mL of ethyl acetate, 5 ml of methanol and 10 ml of ultrapure water, consecutively. Then 1.5 l of water

sample was loaded on the SPE cartridges at the rate of 15 ml min^{-1} by using a vacuum operated pumping system. After sample loading, the cartridges were washed with 5 ml of ultrapure water and air-dried for 15 min. The retained components were eluted with 4 ml of acetone at 3 ml min^{-1} . The eluate was brought to dryness under a gentle nitrogen current at $35 \text{ }^\circ\text{C}$. The dry residue was dissolved first in 100 μl of acetonitrile containing the IS at the concentration of 25 mg l^{-1} and thoroughly vortexed. Then 400 μl of ultrapure water was added and vortexed again. A 100 μl aliquot was injected into the HPLC system.

2.4.2. VEGETABLE SAMPLES

Cucumber samples were purchased from a local market. A sample treatment for extraction and cleanup was based on a one previously reported in chapters 1 and 2, and slight modified. Several portions of 20 g of cucumber were spiked with NMC pesticides at different concentrations level (from $2\text{-}50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ for carbaryl, and from $20\text{-}500 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ for carbofuran and methiocarb). After equilibration for 1 h at room temperature, samples were chopped and homogenized for 3 min. with 50 ml of ethyl acetate and 60 g of anhydrous sodium sulphate. The mixture was filtered through a paper with a Buchner funnel and vacuum, collected in a filtering flask and transferred to a 100 ml round-bottom flask. A 20 ml volume of ethyl acetate was used to clean the funnel, the filter and the filtering flask. The obtained solution was concentrated in a rotavapor to a lower volume (2 ml approximately), and then 2 ml of ethyl acetate were added. The obtained extract was passed through an alumina cartridge containing 1.5 g of alumina at a rate of 3 ml min^{-1} . Alumina cartridges were previously conditioned with 5 ml of ultrapure water, 5 ml of methanol and 10 ml of ethyl acetate, consecutively. The sample was collected in a glass vial and the ethyl acetate was evaporated under a gentle nitrogen stream until dryness at 35

°C. The residue was redissolved, first with 500 µl of methanol containing the IS at the concentration of 20 mg l⁻¹ and thoroughly vortexed. Then 1.5 ml of ultrapure water was added and vortexed again. A 100 µl aliquot was injected into the HPLC system.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMISATION OF THE METHOD

A thorough and sequential optimisation of the proposed method was carried out in several steps in order to ascertain the best conditions to obtain a suitable compatibility between the chromatographic separation and the post-column CL reaction.

3.1.1. CONFIGURATION OF THE POST-COLUMN CL ASSEMBLY

First of all, different configurations for the post-column derivatization system were tested, in order to choose the most suitable one in terms of sensitivity. The following configurations were tested:

- (a) Luminol and permanganate were mixed with the eluate from the separation column in a four-way connection and placed just in front of the detection cell. In this case, we detected a high background emission (which reduces the application range of the method), being necessary a mixing reactor after mixing the CL reagents.
- (b) Luminol and permanganate are mixed in a three-way connector. Then this stream is mixed with the sample carrier directly in the detection cell. In this case weak signals were obtained for carbaryl and carbofuran, while no signal was obtained for methiocarb.
- (c) The most convenient one is presented in Figure 3.3, in which the luminol and potassium permanganate solutions are previously mixed

and then this stream is mixed with the eluent from the separation column in a three-way connection before reach one of the inlets of the detector, being the second inlet of the detector locked.

In some methods previously reported, high pressure pumps have been used for delivering the CL reagents using the luminol reaction^{8,9} for detection coupled with HPLC, however in this case, when peristaltic pumps were tested for the CL reagents transportation instead of high pressure pumps, we obtained a smoother baseline and a much quicker stabilization of it. Furthermore, the use of peristaltic pumps is recommended in order to avoid a possible damage of the detection cell in case of high pressure in the system.

3.1.2. MOBILE PHASE

In HPLC separation, the selected mobile phase should not only be suitable for the separation of NMCs, but also compatible with the post-column CL reaction. Mixtures of methanol or acetonitrile with water have been widely used for the separation of NMCs on reverse phase (RP) C₁₈ and C₈ columns. The CL characteristics of these binary mixtures were tested and acetonitrile:water was selected as the mobile phase since it produces smoother baseline, higher signal-to-noise (S/N) ratio and better peak shape than using methanol. Adequate isocratic chromatographic separation was obtained with a concentration of 50% of acetonitrile in water. Finally the flow rate was studied in the range from 0.7 to 1.2 ml min⁻¹, selecting 1 ml min⁻¹ as optimum.

3.1.3. OPTIMISATION OF THE POST-COLUMN CL REACTION

The optimisation of the different variables involved in the post-column reaction was carried out by application of the experimental design and surface response methodologies for those groups of factors, namely chemical and instrumental variables, affecting the analytical response (peak area). With this purpose, a previous selection of the significant factors in the analytical procedure is carried out by means of screening factorial designs. Then, the real functional relationship (response function) between the analytical response and the significant factors is estimated, obtaining from it the optimum values for these factors. Previous experiments showed that changes on the selected variables enhanced the CL signal of one of the analytes while others were decreased. In order to reach the optimum values for the studied parameters for which the maximum responses, S , are achieved simultaneously for the three studied pesticides, we have applied the desirability function¹⁰ considering the enhancement on CL signal and subsequently on the peak area for each analyte.

This strategy was proposed by Derringer and Suich¹¹. Firstly each response is transformed into a new function that varies between 0 and 1, according to the closeness of the response to a target value. This function is called individual desirability function, d_i . If the aim is to maximize the response, then a target value is defined for the response above which the results are satisfactory and consequently the desirability function is 1. There is also a lower threshold of the response below which the conditions are not adequate and the desirability function is 0. All the individual desirability functions defined for each response, d_i , are composed into one overall or global desirability, D , which is optimised as if it was a single response. The global desirability could be defined, in our case of this mixture of three pesticides, as the weighted geometric mean of all individual desirabilities, d_i , for each compound,

$$D = \sqrt[3]{d_1 + d_2 + d_3} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

In our case, the maximum of this function shows the optimum CL conditions for all compounds. The individual desirabilities for each compound, i , are calculated as follow

$$d_i = \frac{S_i - S_{\min}}{S_{\max} - S_{\min}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

This strategy has been applied in other analytical system for optimisation purposes^{10,12,13}.

3.1.3.1. OPTIMISATION OF THE CHEMICAL VARIABLES

The effect of varying the concentration of sodium hydroxide, luminol and potassium permanganate solutions was tested using a 2^3 screening design plus 3 centred points. All experiments were carried out using a flow rate of 1.5 ml min^{-1} for both solution of reagents, luminol/NaOH and potassium permanganate, a standard solution containing a concentration of 0.5 mg l^{-1} of carbaryl, 5 mg l^{-1} of carbofuran and 10 mg l^{-1} methiocarb and an injection volume of $20 \text{ }\mu\text{l}$.

Luminol solution concentration was studied in the range between 5×10^{-6} to $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, because higher concentrations produce high background, which reduces the application range of the method. Potassium permanganate solution

concentration was studied from 1×10^{-6} to 1×10^{-4} M. At higher concentrations of KMnO_4 , a decrease of CL signals was observed, probably because of certain autoabsorption of KMnO_4 . Sodium hydroxide was studied in the range from 0.01 to 1 M.

As can be observed in the standardized Pareto chart (Figure 3.4), the study showed that NaOH concentration and the interaction between luminol and permanganate concentrations were significant factors for carbaryl, while the three studied factors and their second order interactions were significant for carbofuran. Therefore, the three factors were simultaneously optimised by application of 2^3 central composite design plus face centred star (with three centred points).

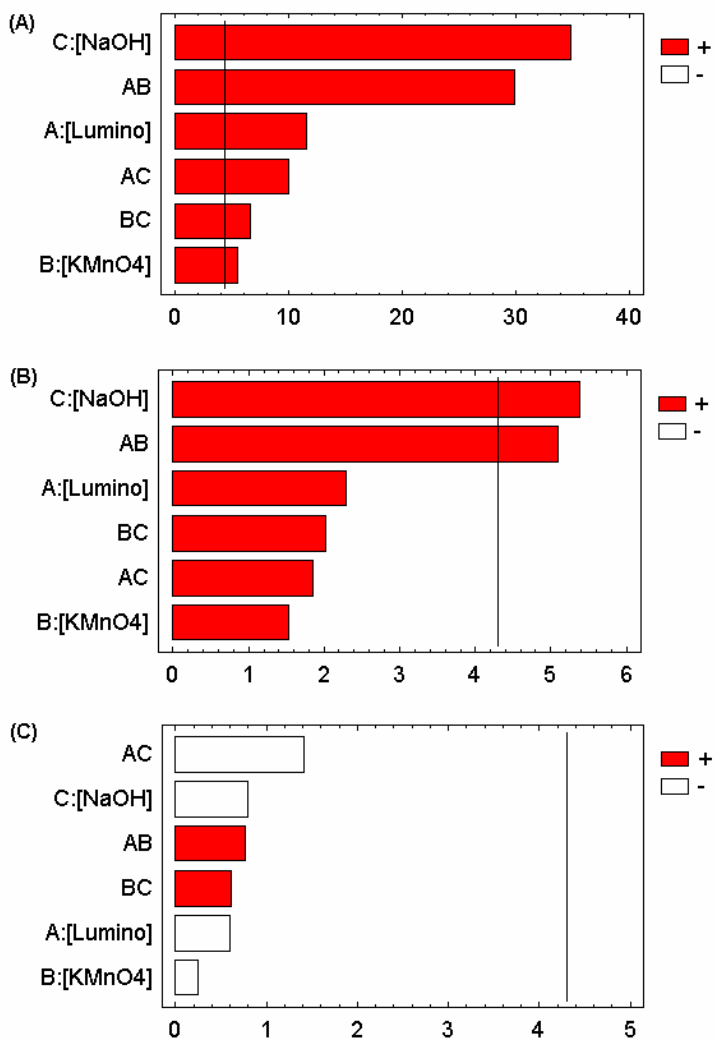


Figure 3.4. Standardized Pareto chart for the analytical signal in the screening of chemical variables. (A) carbofuran, (B) carbaryl and (C) methiocarb.

For the first design, it was not possible to obtain optimum conditions for the selected factors because the selected experimental domain was too wide and the response variation was not well defined.

Consequently, a second design was carried out in a more reduced experimental domain considering the results of the previous design. Luminol and KMnO_4 solution concentrations were studied from 5×10^{-6} to 3.5×10^{-5} M and NaOH solution concentration from 0.2 to 0.8 M. Considering the results obtained from the established response surfaces (Figure 3.5), the following optimum values were found for luminol solution concentration (3.44×10^{-5} M), for permanganate solution concentration (1.07×10^{-5} M) and for sodium hydroxide concentration (0.46 M).

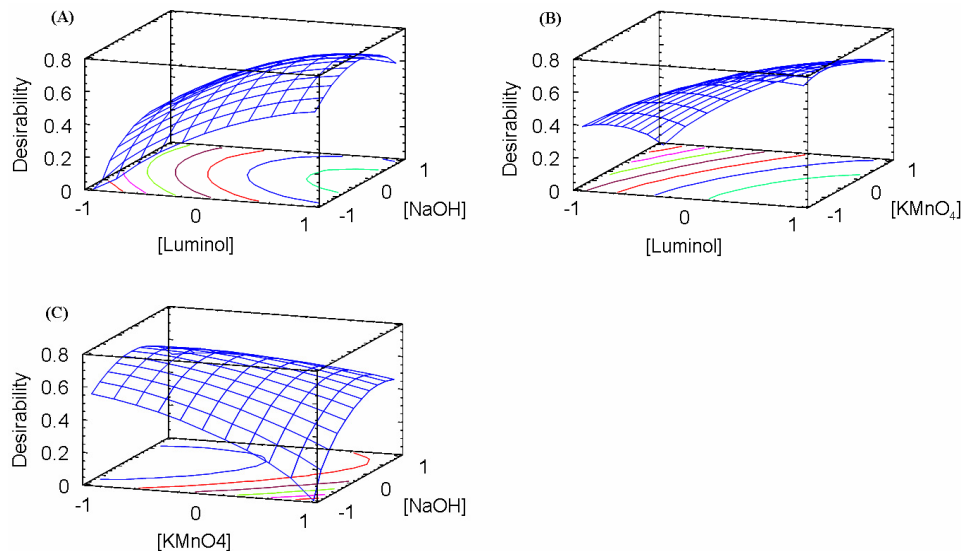


Figure 3.5. Response surfaces for the optimisation of chemical variables in the HPLC-CL method, by using a 2^3 central composite design plus face centred star.

3.1.3.2. OPTIMISATION OF INSTRUMENTAL VARIABLES

Flow rates of CL reagents were simultaneously studied in the range from 1-2 ml min⁻¹ using the optimised reagent concentration values above mentioned by means of a 2² screening design plus 3 centred points. As can be observed from the Figure 3.6, both factors were significant for carbofuran and carbaryl and were subsequently optimised with a 2² central composite design plus face centred star (with three centred points).

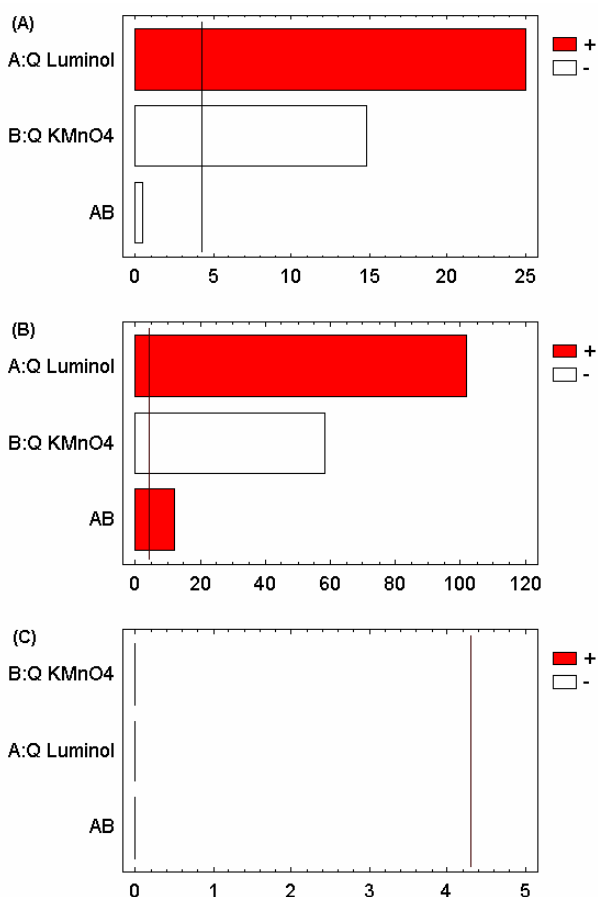


Figure 3.6. Standardized Pareto chart for the analytical signal in the screening of chemical variables. Q= flow rate (A) carbofuran, (B) carbaryl and (C) methiocarb.

The optimum values obtained from the response surfaces (Figure 3.7) were 2.00 and 1.54 ml min⁻¹ for luminol and potassium permanganate solution flow rates, respectively. According to these results, further experiments testing higher luminol flow rates would be required, as the optimum value was just the upper limit of the selected experimental domain. However, 2.00 ml min⁻¹ was the selected value for this factor due to higher flow rates caused overpressure in the system.

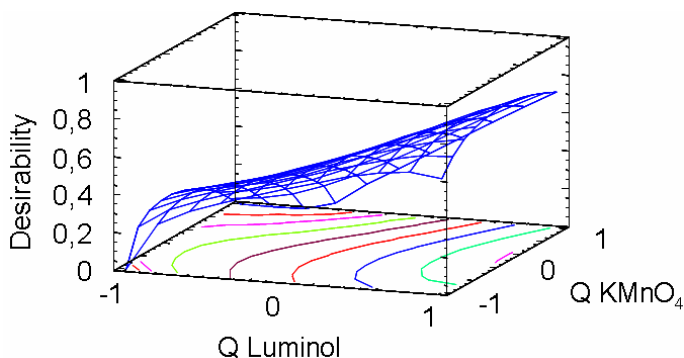


Figure 3.7. Estimated response for the optimisation of flow rates of luminol and KMnO₄ streams by using a 2² central composite design plus face centred star (with 3 central points).

Lengths of both mixing reactors (d1 and d2) were optimised separately, because no optimum conditions were found when we tried to optimise them simultaneously. Distance between the two connectors (d1) ranging from 5 to 125 cm were studied using a PTFE tube of 0.5 mm of internal diameter. The effect of this length on the analytical signal of the three analytes is illustrated in Figure 3.8, selecting 25 cm as optimum value. Subsequently, d2 was varied from the minimum length (5 cm) to 50 cm, obtaining higher peak broadening and worse peak shapes. Therefore, 5 cm was selected as appropriate length.

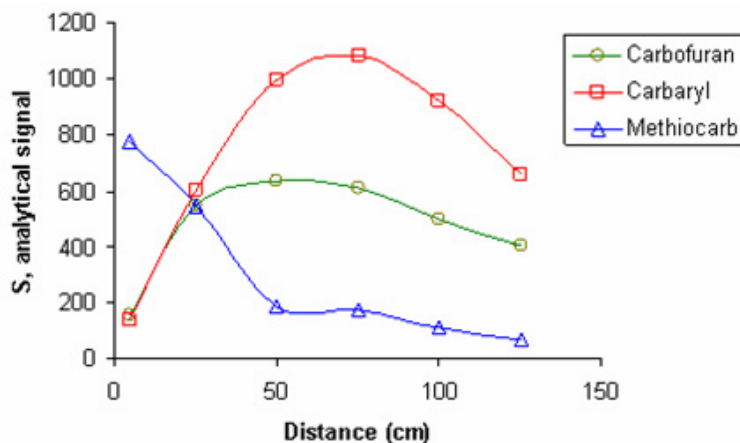


Figure 3.8. Influence of the length of the reactor (d1) on CL signal.

Under these optimum conditions the effect of the injection volume was studied in the range of 20 - 140 μ l, selecting 100 μ l as optimum since higher injection volumes produce less efficient peaks. When a large injection volume is employed the strength of the solvent in which the analyte is injected has to be controlled in order to avoid band distortions. Thus, the percentage of organic solvent (acetonitrile or methanol) on the injected solution was studied, being recommended not to exceed 40% in order to obtain a good chromatographic peak shape.

As a summary, all the optimum values for the studied variables are summarized in Table 3.1.

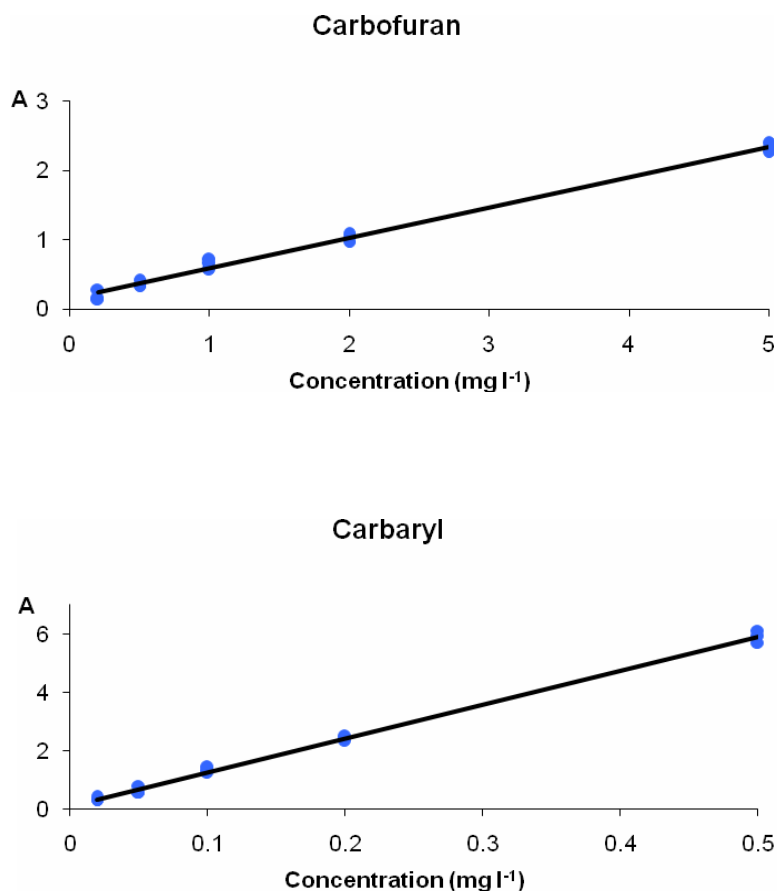
Table 3.1. Optimum values for the variables involved in the proposed method.

	Variable	Optimum value
Chromatographic system	Column	C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 250 mm
	Column temperature	23 ± 1.8 °C
	Mobile phase composition (Isocratic elution)	Acetonitrile-water (50:50, v/v)
	Mobile phase flow rate	1 ml min ⁻¹
	Injection volumen	100 µl
CL detection system	[Luminol]	3.44 x 10 ⁻⁵ M
	[KMnO ₄]	1.07 x 10 ⁻⁵ M
	[NaOH]	0.46 M
	Luminol/NaOH flow rate	2 ml min ⁻¹
	KMnO ₄ flow rate	1.54 ml min ⁻¹
	Reactor size	d1: 25 cm, 0.5 mm I.D. d2: 5 cm, 0.3 mm I.D.

3.2. CALIBRATION CURVES AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Under the optimal conditions above described, the linearity of the CL response was established from different calibration levels corresponding to 0.2, 0.5, 1, 2 and 5 mg l⁻¹ for carbofuran; 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mg l⁻¹ for carbaryl and 0.2, 0.5, 1, 2, 5 and 10 mg l⁻¹ for methiocarb. In all cases, 5 mg l⁻¹ (final concentration) of ethiofencarb was added as IS. Each concentration level was injected by triplicate, and the calibration curves were constructed by considering the relative peak areas (as the ratio of analyte peak to IS peak) as a function of the analyte concentration.

Figure 3.9 shows the obtained calibration curves, and the statistic parameters calculated from least-square regression and the performance characteristics are presented in Table 3.2. The determination coefficients and the P-values for the lack-of-fit test ($\alpha=0.05$) confirm the absence of curvature and that the analyte responses were linear over the studied range. Also, detection (LD) and quantification limits (LQ) are detailed and also the precision, established as relative standard deviation (RSD) for a specific concentration level is estimated.



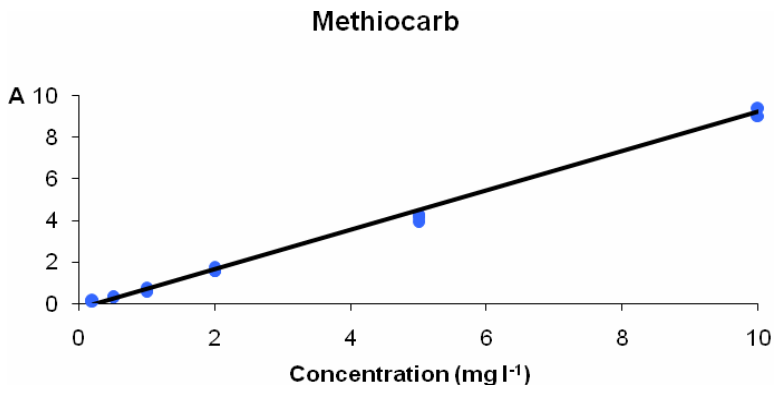


Figure 3.9. Standard calibration curves for the studied analytes using the proposed HPLC-CL method; A: corrected peak area.

Table 3.2. Statistical parameters from the linear regression for each calibration curve and performance characteristics.

	Linear dynamic range (mg l ⁻¹)	Calibration Equation ^a	S _{R,c}	R ² (%)	Lack of Fit P-value (%) (α = 0.05)	LD ^b (mg l ⁻¹)	LQ ^b (mg l ⁻¹)	RSD ^c (%)
Carbofuran	0.35 - 5.0	A = 0.438C + 0.1497	0.067	99.67	27.23	0.35	1.18	4.82
Carbaryl	0.02 - 0.5	A = 11.59C + 0.0996	0.093	99.43	49.28	0.02	0.07	3.17
Methiocarb	0.29 - 10	A = 0.8396C - 0.0960	0.104	99.78	49.03	0.29	0.96	3.83

^a Obtained from three injections of the standard mixture solutions; A: Corrected peak area.

C: concentration of the analyte in the standard solution (mg l⁻¹).

^b Calculated from the calibration data set [21].

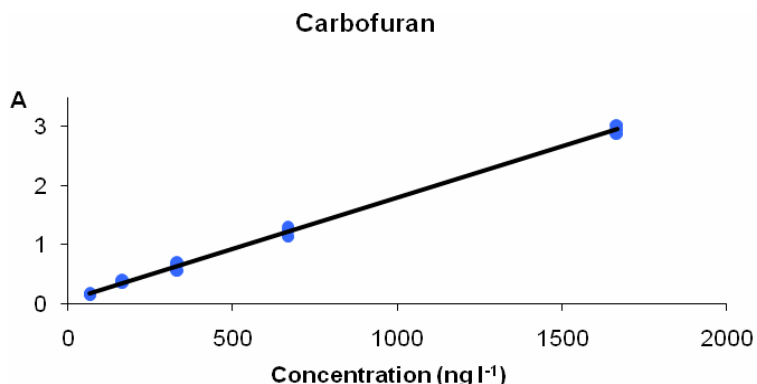
S_{R,c}: Regression standard deviation.

R²: Determination coefficient.

^c 2 mg l⁻¹ carbofuran and methiocarb; 0.2 mg l⁻¹ carbaryl; (n=3).

In order to check the influence of both, the matrix effect of the selected samples (waters and cucumber) and the extraction process and to validate the full method, we have established calibration curves in presence of matrix. For this purpose we used samples free of analytes, which were previously spiked with different analyte concentrations and processed following the procedures above mentioned (see section 2.4.).

In the case of water samples, these calibration curves were established by using river water as representative matrix, spiked at five calibration levels ranging from 5 - 165 ng l⁻¹ for carbaryl, 50 - 1650 ng l⁻¹ for carbofuran and methiocarb. By comparing statistically both curves, no significant differences were observed between the intercepts and the slopes. This comparison ensures that there are neither significant losses of analyte due to the cleanup and preconcentration process nor matrix effects on detector sensitivity, being possible the direct use of the external calibration curve for quantification purposes in water, and therefore no corrections need to be applied to the NMCs measurements for the analysis of water samples (mineral, ground and river water). The obtained calibration curves for each analyte are depicted in Figure 3.10, while the statistical parameters and performance characteristics of the method for the analysis of NMC in water samples are shown in Table 3.3.



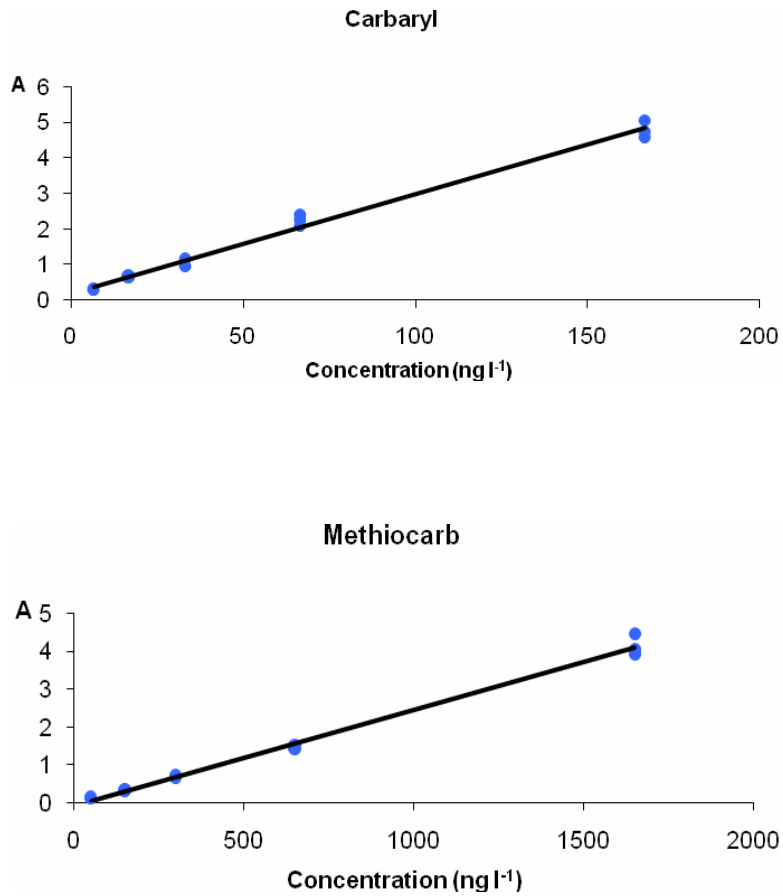


Figure 3.10. Calibration curves obtained for the studied NMCs in water samples applying the proposed method; A: corrected peak area.

Table 3.3. Statistics and performance characteristics of the method for the analysis of NMC in water.

	Linear dynamic range (ng l ⁻¹)	Calibration Equation ^a	S _{R,c}	R ² (%)	Lack of Fit P-value (%) (α = 0.05)	LD ^b (ng l ⁻¹)	LQ ^b (ng l ⁻¹)	RSD ^c (%)
Carbofuran	72.81-1650	A = 0.002C + 0.063	0.045	98.93	65.61	72.81	242.7	5.13
Carbaryl	13.48-165	A = 0.028C + 0.200	0.162	99.14	11.68	13.48	44.93	5.03
Methiocarb	81.55-1650	A = 0.003C - 0.129	0.133	99.29	32.20	81.55	271.8	5.33

^a Obtained from four injections of the standard mixture solutions; A: Corrected peak area.

C: Analyte concentration (ng l⁻¹).

^b Calculated from the calibration data set [21].

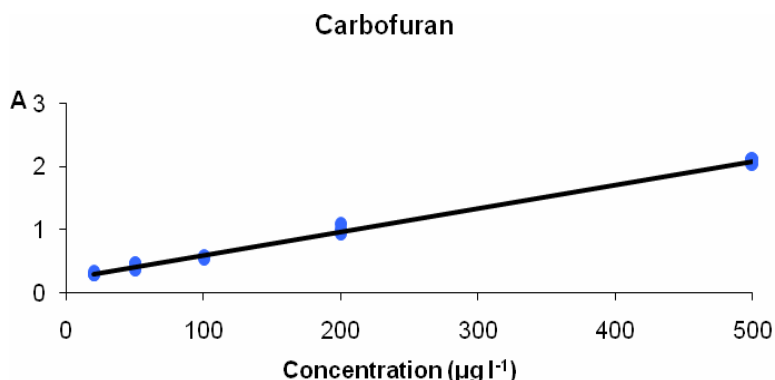
S_{R,c}: Regression standard deviation.

R²: Determination coefficient.

^c 670 ng l⁻¹ carbofuran and methiocarb; 67 ng l⁻¹ carbaryl; (n=3).

For the validation of the method in cucumber samples, matrix calibration curves were established by spiking samples free of analytes at concentration levels 10 times lower than those used in the external calibration before the sample treatment procedure. Each calibration solution was treated according to the whole procedure. The results are shown in both Figure 3.11 and Table 3.4. When these curves were statistically compared with the external calibration curves, significant differences were obtained between the intercepts for carbofuran, and between both intercepts and slopes for carbaryl and methiocarb (P -value $> 5\%$), suggesting the presence of systematic errors.

In order to ascertain if these losses are due to the matrix effect or due to the extraction process, extra calibration curves were established using treated standard solutions, that is, by injecting standard analyte solutions previously processed following the sample treatment above described, using similar concentration levels for the analytes to these ones used for the establishment of matrix calibration curves. No significant differences were obtained from slopes and intercepts (P -value $< 5\%$) when both calibration curves were statistically compared, suggesting that systematic errors are attributable to losses in the extraction procedure.



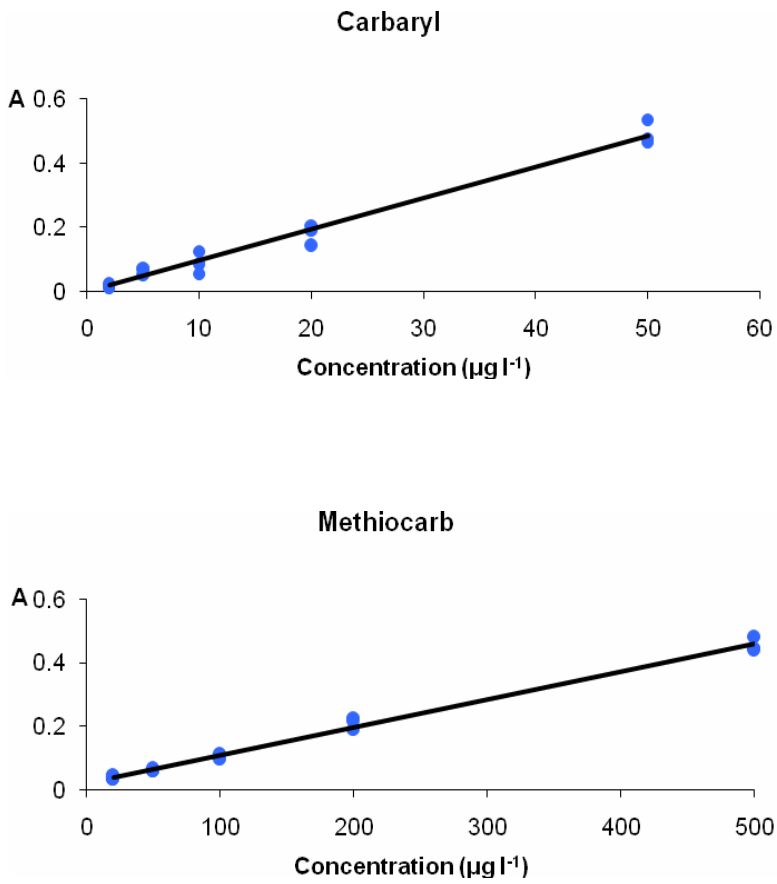


Figure 3.11. Calibration curves obtained for the NMCs in cucumber samples applying the proposed method; A: corrected peak area.

Table 3.4. Statistics and performance characteristics of the method for the analysis of NMC in cucumber samples.

	Linear dynamic range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Calibration Equation ^a	S _{R,C}	R ² (%)	Lack of Fit P-value (%) ($\alpha = 0.05$)	LD ^b ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LQ ^b ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD ^c (%)
Carbofuran	39.4 - 500	A = 0.004C + 0.225	0.054	99.42	33.04	39.4	130.0	4.53
Carbaryl	8.30 - 50	A = 0.009C + 0.001	0.030	98.70	40.66	8.30	27.67	4.98
Methiocarb	48.0 - 500	A = 0.004C + 0.023	0.016	99.56	28.74	48.0	160.1	5.43

^a Obtained from four injections of the standard mixture solutions; A: Corrected peak area.

C: Analyte concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

^b Calculated from the calibration data set [21].

S_{R,C}: Regression standard deviation.

R²: Determination coefficient.

^c 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ carbofuran and methiocarb; 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ carbaryl; (n=3).

3.3. ANALYTICAL APPLICATIONS

3.3.1. ANALYSIS OF WATER SAMPLES

The maximum residue limits (MRLs) of individual NMC pesticides in drinking water allowed by the European Drinking Water Directory¹⁴ is $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$, consequently a preconcentration step prior to HPLC-CL determination is required in order to reach sensitivity levels below to these limits. Several methodologies have been proposed for preconcentrating these analytes¹⁵. Off-line SPE was selected because of its operational flexibility and simplicity.

To determine the optimum conditions of the extraction process to obtain satisfactory recoveries, several variables were investigated using standard solutions containing the three pesticides.

Preliminary experiments showed that the drying of the eluate from cartridges is an important step, being more critical for carbaryl. Thus several experiments were carried out in order to select the extraction solvent and the drying temperature. Ethyl acetate, acetonitrile, acetone and methanol were tested as possible solvents. For this study, 4 mL of standard solutions containing 0.05 mg l^{-1} of carbaryl and 0.5 mg l^{-1} for carbofuran and methiocarb were prepared in these solvents and dried with N_2 and reconstituted in 2 ml AcN:H₂O (20:80 v/v). Using ethyl acetate, no significant losses were obtained for carbofuran and methiocarb, however, the most affected was carbaryl, with losses of 25%. For acetonitrile, acetone and methanol, no significant losses were obtained for all the analytes in the drying process so, a study of the efficiency of these solvents as extraction medium in the SPE procedures was carried out.

Different volumes of these solvents were used to elute the analytes from the cartridges previously charged with 10 ml of standard solution containing 0.02 mg l⁻¹ of carbaryl and 0.2 mg l⁻¹ for carbofuran and methiocarb. The best results were obtained by eluting with 4 ml of acetone. Drying temperature was determined to be up to 35 °C.

Other important parameter to optimize was the sample volume preconcentrated onto the cartridges. The extraction process was carried out with 100, 500, 1000 and 1500 ml of standard solutions containing 0.4 µg of carbaryl and 4 µg of carbofuran and methiocarb. Higher sample volumes were not considered in order to avoid an excessively time-consuming process and because higher preconcentration is not necessary. A volume of 1500 ml was selected as optimum, since breakthrough of the compounds was not observed.

The recovery of the NMC pesticides remained constant when the flow rate of the sample passing through the cartridge was varied from 5 to 15 ml min⁻¹. When a sample volume of 1500 ml was passed through the Oasis HLB cartridges at 15 ml min⁻¹, the recoveries obtained for standard solutions containing 0.2 µg l⁻¹ of carbaryl and 2 µg l⁻¹ carbofuran and methiocarb were 96.32 (RSD 1.75%), 99.43 (RSD 1.66%) and 101.48 (RSD 2.84%), respectively.

In order to check the applicability of the proposed methodology for the analysis of NMCs to real sample, recovery experiments were carried out in different types of water. Previously the samples were treated following the procedure described in section 2.4.1., and a sample blank was also analyzed in order to check that the samples were free of NMCs. Different water samples (mineral, ground and river waters) were spiked at three different levels (10, 20 and 40 ng l⁻¹ for carbaryl and 100, 200 and 400 ng l⁻¹ for carbofuran and methiocarb). Three replicates were prepared at each concentration level, and

each one was injected by duplicate. The results are showed in Table 3.5, obtaining adequate recoveries in the range of 88.6 – 107.7%. Chromatograms of river water sample (blank and spiked sample) are presented in Figure 3.12.

Table 3.5. Analysis of spiked water samples by the HPLC-CL method.

Type of water	Added (ng l ⁻¹)	Carbofuran		Methiocarb		Added (ng l ⁻¹)	Carbaryl	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)		Recovery (%)	RSD (%)
Mineral (Lanjaron, Granada)	100	102.8	7.79	91.5	6.65	10	97.7	4.94
	200	101.9	4.09	88.6	6.07	20	99.7	3.83
	400	98.9	5.97	94.1	7.15	40	99.8	9.02
River (Dilar, Granada)	100	107.7	7.41	88.9	7.71	10	103.1	3.83
	200	98.2	7.88	93.9	7.88	20	106.6	5.01
	400	99.4	4.31	91.7	7.09	40	101.5	8.13
Ground (Santa Fe, Granada)	100	101.9	4.26	87.6	7.50	10	99.1	4.75
	200	98.1	3.94	90.9	5.61	20	100.5	5.96
	400	93.6	6.14	94.3	8.06	40	97.6	1.92

(n=6)

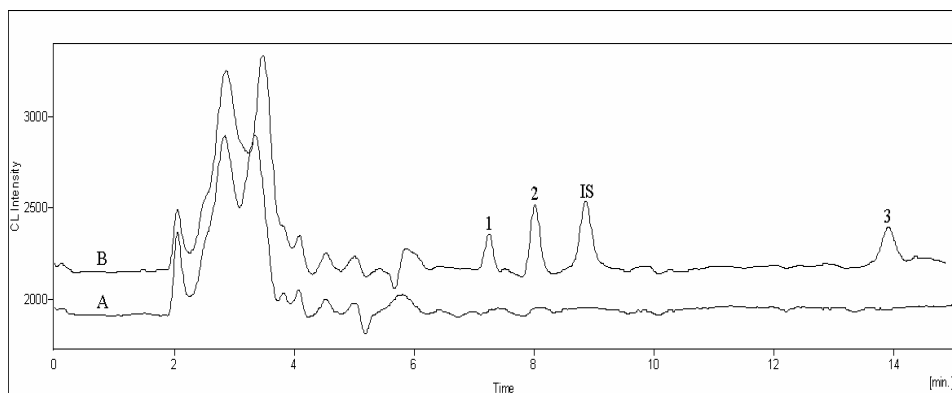


Figure 3.12. Chromatogram of river water sample applying the proposed HPLC-CL method: (A) Blank sample; (B) Sample spiked with 100 ng l⁻¹ of carbofuran and methiocarb and 10 ng l⁻¹ of carbaryl. Peaks: 1 = carbofuran, 2 = carbaryl, 3 = methiocarb, IS = Internal standard.

3.3.2. ANALYSIS OF CUCUMBER SAMPLES

Extraction of analytes from cucumber samples involved a previous liquid extraction with ethyl acetate by means of a blender, and a subsequent cleanup step by SPE using alumina as sorbent.

No NMC residues were detected from the selected cucumber sample by applying the proposed method. Spiked samples at different concentration levels were prepared and analysed following the procedure described in section 2.4.2. Absolute recoveries were calculated by comparing relative peak areas corresponding to cucumber samples spiked before the extraction treatment, and relative peak areas corresponding to standard solutions prepared with the same final analyte concentrations and processed following the same treatment. This procedure evaluates the possible errors on the analytical signal due to the losses from the treatment and from the matrix. Table 3.6 shows the obtained recoveries, and Figure 3.13 shows the chromatograms of a blank and spiked

cucumber sample. As can be see, satisfactory recovery values are obtained for the studied levels, showing the usefulness of the method for this kind of sample.

Table 3.6. Analysis of spiked cucumber samples by the HPLC-CL method.

Added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Carbofuran		Methiocarb		Added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Carbaryl	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)		Recovery (%)	RSD (%)
50	94.98	7.89	96.23	8.83	5	97.39	5.23
100	97.55	4.89	102.15	6.37	10	101.39	6.94
200	97.91	5.33	97.42	3.75	20	99.41	5.70

(n=6)

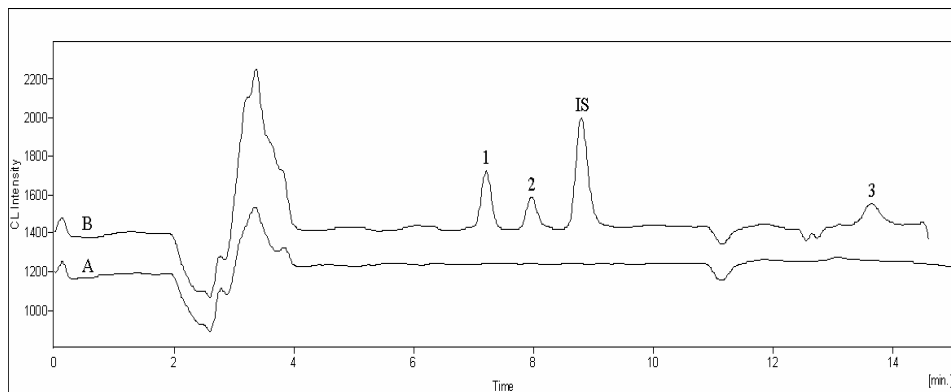


Figure 3.13. Chromatogram of a cucumber sample applying the proposed HPLC-CL method: (A) Blank sample; (B) Sample spiked with $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ carbofuran and methiocarb and $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ carbaryl. Peaks: 1 = carbofuran, 2 = carbaryl and 3 = methiocarb.

4. CONCLUSIONS

A sensitive HPLC–CL method has been developed and validated for the determination of NMCs in environmental samples. The method allows the resolution of three carbamates (carbaryl, carbofuran and methiocarb) in less than 14 min, taking advantage on the great enhancement produced by these compounds on the CL emission of luminol using permanganate as oxidant.

A convenient selection of the post-column configuration to carry out the CL detection is mandatory, as well as a suitable optimisation of the chemical and instrumental variables involved in the chromatographic separation and the CL reaction, which must be as more compatible as possible in order to reach and adequate resolution and a high sensitivity.

Compared with other methodologies using fluorescence or CL detection, the method is very simple because no derivatization process is required. Using an optimised solid phase extraction (SPE) procedure for preconcentration and cleanup of samples the method can be satisfactorily applied to different kind of waters and vegetal samples, showing good recoveries in compliance with the current guidelines.

5. REFERENCES

1. Alinorm 01/24A Appendix IX. Priority list of compounds scheduled for evaluation or reevaluation by JMPR. 2001 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR).
2. J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, M. del Olmo Iruela, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 161.
3. J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, A.M. García-Campaña, *Talanta* 65 (2005) 980.
4. M. Tabata, C. Fukunaa, M. Ohyabu, T. Murachi, *J. Appl. Biochem.* 6 (1984) 251.
5. Y. Rakicioglu, J.M. Schulman, S.G. Schulman, in: A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens (Eds.), *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New Cork (2001) p. 108.
6. A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés-Barrero, M. Román-Ceba, J.L. Sierra-Fernández, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
7. Statgraphics Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation, Manugistics Inc., Rockville [USA] 2000.
8. Y. Iglesias, C. Fente, B.I. Vázquez, C. Franco, S. Cepeda, S. Mayo, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 43.
9. B.I. Vázquez, X. Feas, M. Lolo, C.A. Fente, C.M. Franco, A. Cepeda, *Luminescence* 20 (2005) 197.
10. M.C., Ortíz, A. Herrero, S. Sanllorente, C. Reguera, *Talanta* 65 (2005) 246.
11. G. Derringer, R. Suich, *J. Qual. Tech.* 12 (1980) 214.
12. M.E. Rueda, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortíz, *Anal. Chim. Acta*, 479 (2003) 173.
13. E. Rueda, M.C. Ortíz, L.A. Sarabia, A. Herrero, *Anal. Chim. Acta*, 498 (2003) 119.
14. <http://eur-lex.europa.eu/>.

15. J. M. Soriano, B. Jiménez, G. Font, J. C. Moltó, *Critical Review in Anal. Chem.* 31 (2001) 19.

CHAPTER 4

DETERMINATION OF THE HERBICIDE METRIBUZIN
AND ITS MAJOR CONVERSION PRODUCTS IN SOIL
BY MICELLAR ELECTROKINETIC
CHROMATOGRAPHY

DETERMINATION OF THE HERBICIDE METRIBUZIN AND ITS MAJOR CONVERSION PRODUCTS IN SOIL BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

RESUMEN

En este trabajo se desarrolla un método multiresiduo para el análisis de metribuzin (M) y sus principales productos de degradación, desaminometribuzin (DA), dicetometribuzin (DK) y desaminodicetometribuzin (DADK). Debido a la naturaleza neutra del M y cargada del resto de analitos, el modo electroforético seleccionado ha sido la cromatografía capilar electrocinética micelar (MECK), que proporciona alta eficiencia en análisis cortos. Para optimizar la separación se han estudiado diferentes parámetros electroforéticos, tales como pH y concentración del tampón, concentración de dodecil sulfato sódico (SDS), condiciones de inyección y voltaje aplicado. Se ha conseguido una excelente separación de los compuestos estudiados en 7 min. El método ha sido aplicado a la determinación de estos compuestos en suelos, extrayendo éstos de las muestras de suelo previamente con metanol en un baño de ultrasonidos y posteriormente aplicando un procedimiento de extracción en fase sólida (SPE), usando cartuchos rellenos de LiChrolut EN. Se han obtenido límites de detección de pocos ng ml^{-1} . El método propuesto ha sido satisfactoriamente aplicado en muestras de suelo, mostrando recuperaciones dentro del rango comprendido entre 86.7 - 104.2 %, por lo que representa una alternativa al análisis mediante HPLC.

SUMMARY

In this work a multiresidue method for the analysis in soils of metribuzin (M) and its major conversion products, deaminometribuzin (DA), diketometribuzin (DK) and deaminodiketometribuzin (DADK) is developed. Considering the neutral and charged nature of the molecules, micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MECK) is a very efficient method for the separation of these compounds, providing high efficiency and short analysis times. Different electrophoretic parameters were studied to optimise the separation, such as the buffer pH and concentration, sodium dodecyl sulphate (SDS) concentration, injection conditions and applied voltage. Excellent separation of the studied compounds was achieved within about 7 min. Soil samples were previously extracted using methanol in an ultrasonic bath and then a solid-phase extraction procedure (SPE) was applied to preconcentrate the analytes by passage through a LiChrolut EN sorbent column. Detection limits at the low ng ml^{-1} level were obtained. The proposed method has been satisfactorily applied in soil samples showing recoveries ranging from 86.7% to 104.2 % and represents a valuable alternative to HPLC.

1. INTRODUCTION

Modern agriculture depends to a large degree on the use of herbicides in order to control weeds that compete with the crops. A large number of these compounds are applied directly to the soil and in general their toxicity in mammals is low, and therefore the risk of ingesting toxic levels of herbicides by consuming products is low. However, the extensive use of these products has increased the public interest in the presence of residues in food as well as in different environmental media (soil, underground water and surface water). There is also increasing interest in their transformation products because they can be present at higher levels in soil than the parent compound itself¹.

Metribuzin is a selective systemic herbicide used for pre- and post-emergence control of many grasses and broad-leaved weeds in soya beans, potatoes, tomatoes, sugar cane, alfalfa, asparagus, maize and cereals at 0.07 - 1.05 kg a.i./ha². Metribuzin belongs to the group of triazinone herbicides, it is highly water-soluble (1.05 g l⁻¹) and adsorption in low-organic sandy soils is rather weak, sorption coefficients vary from 0.56 in a very sandy loam to 31.7 in a soil containing 60% organic matter. Metribuzin is considered to be of short to moderate persistence in soils, the half-lives measured have been specified between 5 and 50 days.

The decomposition of metribuzin in the environment is due to microbiological and chemical processes. Only deaminometribuzin (DA), diketometribuzin (DK), deaminodiketometribuzin (DADK) and two glycoside conjugates are known to be metabolites. Both deamination and desulfuration are observed by photolytic and microbial degradation³. Total microbial degradation of metribuzin into CO₂ and water takes place via the metabolite DADK, but in

laboratory experiments mineralisation has not exceeded 20%⁴. Figure 4.1 shows the generally accepted degradation pathway of metribuzin.

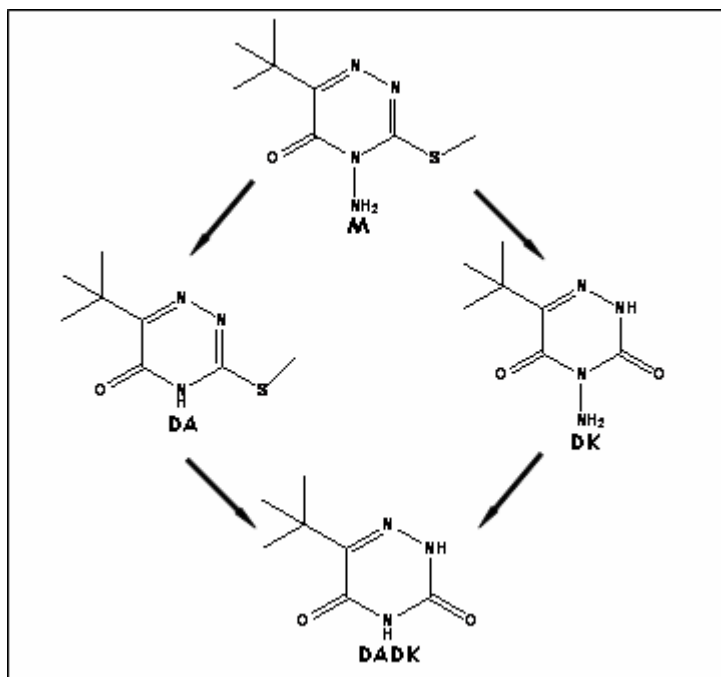


Figure 4.1. Metribuzin and the proposed degradation pathway.

So far analysis of metribuzin and its metabolites has mainly been accomplished by different chromatographic methods such as reverse phase thin layer chromatography (RPTLC) with UV absorption detection⁵ or high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection^{6,7} or mass spectrometry detection^{4,8,9}.

Capillary electrophoresis (CE) presents a very interesting alternative to chromatographic methods for the analysis of pesticide residues and by-products in

environmental samples, due to its low cost, short separation times, high efficiency and no need for high volumes of organic solvents. In spite of these advantages, a relatively low number of papers include the determination of pesticide residues in real samples, mainly using capillary zone electrophoresis (CZE), capillary electrochromatography (CEC) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)^{10,11,12,13,14,15}.

MEKC is a CE method based on the differences between interactions of analytes with micelles present in the separation buffer, which can easily separate both charged and neutral solutes with either hydrophobic or hydrophilic properties. Micelles are formed by adding a surfactant at a concentration above its critical micellar concentration (CMC). The separation principle is based on the differential partition of the analytes between the micelle, which acts as a pseudostationary phase, and the surrounding aqueous phase. Different surfactants and modifiers can be used in MEKC, sodium dodecyl sulphate (SDS) being the most usual, also in the determination of pesticide residues^{15,16,17,18,19,20,21,22,23,24}.

The main limitation to the application of CE methodologies to real samples is the insufficient sensitivity due to the low sample volumes injected (1 - 10 nl). To enhance detection capability, several preconcentration techniques have been applied, one of the most common being off-column concentration by solid-phase extraction (SPE). Generally, SPE procedures for pesticide extraction prior to CE analysis are carried out using disposable cartridges, most of them packed with silica-based phases, including cleanup and preconcentration procedures. C₁₈, silica and porous graphitic carbon PGC, Oasis HLB or carboxypack B have been used as sorbents¹⁴. C₁₈ has been replaced by a polymer of styrene-divinylbenzene (LiChrolut EN) to improve the recovery of metribuzin²⁵. LiChrolut has been used as stationary phase in the off-column SPE procedure previous to the determination of triazines and degradation products by CZE and MECK in tap and river water¹⁸.

Although the determination of metribuzin in conjunction with other pesticides by MEKC has been described in bibliography^{26,27}, to our knowledge there are no methods for the analysis of the herbicide metribuzin and its major conversion products by using this technique. In this chapter an analytical strategy based on the application of MECK for the analysis of metribuzin and its degradation products, DA, DK, and DADK is developed and validated, with the aim to propose a simple, inexpensive and rapid method to be used in environmental protection monitoring, being an interesting alternative to HPLC mainly due to the minimization of the amount of organic solvent needed. The applicability of the proposed off-column SPE procedure for the enrichment of the analytes prior to MECK analysis has been carried out to achieve satisfactory detection limits and efficient cleanup.

2. EXPERIMENTAL

2.1. CHEMICALS

All the reagents used were of analytical grade and the solvents of HPLC grade. The water used to prepare the solutions was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Organic solvents acetonitrile, methanol, ethanol, acetone and ethyl acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). 1-Propanol and 2-propanol were obtained from Panreac-Química (Madrid, Spain).

The separation buffer was prepared from ammonium acetate supplied by Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain) and sodium dodecyl sulfate (SDS) purchased from Panreac (Madrid, Spain). The pH was adjusted to 10 with 0.1 M ammonium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany).

Analytical standards of metribuzin (M), 4-amino-6-(1,1-dimethylethyl)-3-(methylthio)-1,2,4,-triazin-5(4H)-one, CAS RN [21087-64-9] and its degradation products: deaminated metribuzin (DA), 6-(1,1-dimethylethyl)-3-(methylthio)-1,2,4-triazin-5(4H)-one, CAS RN [35045-02-4]; diketometribuzin (DK) 4-amino-6-(1,1-dimethylethyl)-1,2,4-triazin-3,5(2H,4H)-dione, CAS RN [56507-35-0] and deaminated diketometribuzin (DADK) 6-(1,1-dimethylethyl)-1,2,4-triazin-3,5(2H,4H)-dione, CAS RN [52236-30-3] were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Purity was 99.5, 99.0, 99.0 and 98 %, for M, DA, DK and DADK, respectively. Stock standard solutions containing 500 mg ml⁻¹ of each compound were prepared by dissolving accurately weighed amounts in acetonitrile and stored in darkness at 4 °C. Working standard solutions were made daily by diluting them with deionised water.

The sorbents used for solid-phase extraction were silica-based bonded C₁₈ cartridges (500mg, 3cc) (Supelco, Bellafonte, PA, USA), Oasis HLB, a copolymer of poly(divinilbenzene-co-N-vinylpyrrolidone (60 mg, 3 cc) (Waters, Milford, MA, USA) and LiChrolut EN, polymer of styrene-divinylbenzene (200mg, 3cc) (Merck, Darmstadt, Germany).

2.2. STABILITY OF SOLUTIONS

The stability of the stock standard solutions was spectrophotometrically followed up by preparing working standard solutions of 5 mg l⁻¹ for each component every day. In all cases, the obtained UV-vis absorption spectra remained unaffected at least 3 months following its preparation. The UV-vis absorption spectra of four analytes are shown in Figure 4.2.

Also, to test the intraday stability of the working standard solutions, the UV-vis absorption spectra of a working solution containing 5 mg l⁻¹ of each component was recorded every hour during a period of 24 hours. In all cases, the absorption spectra remained unaffected.

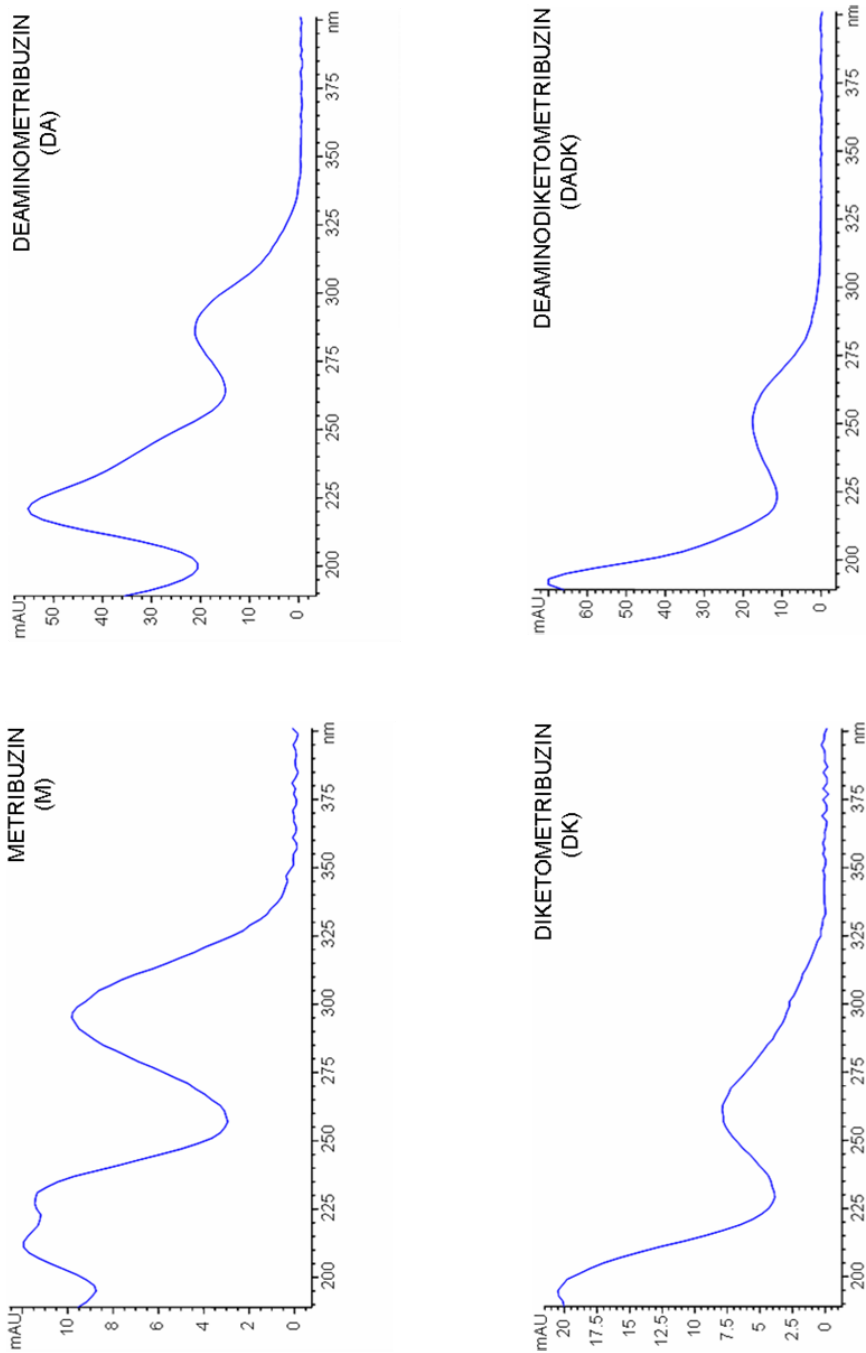


Figure 4.2. Absorption spectra of Metribuzin and its byproducts.

2.3. INSTRUMENTATION

CE experiments were carried out with a HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with a diode-array detector. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation version A.09.01. Separation was carried out in a bare fused silica capillary 64.5 cm × 75 µm i.d. (effective length 56 cm) with an optical path length of 200 µm (bubble cell capillary from Agilent Technologies, Waldbron, Germany). For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed with a resolution of ± 0.01 pH unit.

An ultrasound bath from Selecta (Barcelona, Spain) was used. A vacuum manifold system from Supelco (Bellafonte, PA, USA) coupled with a vacuum pump (Büchi model B-169, Switzerland), nylon filters with a 0.20 µm pore size (Supelco, Bellafonte, PA, USA) and a rotavapor (Büchi, Flawil, Switzerland) were used for sample preparation.

2.4. ELECTROPHORETIC PROCEDURE

Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 10 min. at 60 °C, then with water for 5 min., and finally with the background electrolyte solution for 20 min. A pressure of 1 bar was applied. At the beginning of each day, the capillary was pre-washed with a N₂ pressure of 7 bar for 1 min. with 0.1 M NaOH, 1 min. with water and 2 min. with running buffer. In order to increase migration time reproducibility, after each run, the capillary was post-washed with 7 bar for 0.5 min. 0.1M NaOH, 0.5 min. with deionized water and 1 min. with buffer. If drastic drifts in electrophoretic current and/or migration times were observed, the capillary was rinsed with a N₂ pressure of 7

bar for 1 min. with deionized water followed by 2 min. with methanol. At the end of each day, the capillary was rinsed with deionized water for 1 min. and dried with air for 0.5 min.

Electrophoretic separation was performed using a 10 mM ammonium acetate buffer, pH 10 containing 90 mM SDS, at a voltage of 25 kV (normal mode). Buffer solution was filtered through a 0.20 μm membrane filter before use. Samples were introduced into the capillary under pressure (50 mbar) for a fixed period of time (10 s). M and DA were monitored at 220 nm with a bandwidth of 20 nm, and DK and DADK were monitored at 260 nm with a bandwidth of 30. Normalized peak areas obtained by dividing the observed peak area values (valley to valley) by their corresponding migration times were used to quantify each compound.

The temperature of the capillary was kept constant at 25 °C. Under the selected conditions, the current was around 75 μA . The rinse step was carried out using different vials from those used for the separation in order to keep the level of buffer constant during the separations. The separation vials were changed after every three runs.

2.5. SAMPLE PREPARATION PROCEDURE

A calcareous silt loam soil located in a fertile area, above one of the most important aquifers from Andalucia (Southeastern of Spain) with an organic content of 1.81 % was used in order to check the trueness of the proposed method.

2.5.1. EXTRACTION PROCEDURE

Soil samples were air dried, mixed and sieved through a 2-mm sieve and 10 g portions were processed. Soil samples were transferred into 60 ml cylindrical tubes, and extracted with 45 ml of methanol in an ultrasound bath for 20 min. The suspension was filtered with vacuum, firstly through a filter paper and then through a nylon filter of 20 μm , and collected in a 100 ml spherical flask. Soil, filters and flasks were washed with 20 ml of methanol. The obtained solution was concentrated to approximately 1 ml in a rotary evaporator at a temperature of 40 °C. The extract was diluted with 25 ml of deionized water and pre-concentrated by SPE before being analyzed by CE.

2.5.2. PRECONCENTRATION AND CLEANUP OF EXTRACTS BY SPE

SPE was carried out on Lichrolut EN cartridges (200 mg) pre-conditioned with 6 ml of acetone, 6 ml of methanol and 6 ml of deionized water, consecutively. Extracts were loaded on SPE cartridges at the rate of 3 ml min⁻¹ by using a vacuum operated pumping system. After sample loading, the cartridges were washed with 5 ml of methanol:water (45:55 v/v) and air-dried for 15 min. The elution of solutes was achieved with 4 ml of methanol followed by 1 ml of ethyl acetate. The combined eluates were brought to dryness under a gentle nitrogen current at 40 °C. The dry residue was dissolved in 500 μl of methanol:water (10:90 v/v) and injected into the CE system.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMISATION OF PROPOSED CE METHOD

A thorough study of the different steps involved in the proposed method was carried out in order to obtain the best conditions for both treatment of sample and CE separation. Those steps are discussed in the following sections.

3.1.1. SELECTION OF THE CE MODE

In any CE separation, the pH of the running electrolyte is one of the most important parameters since it determines the ionization of the acidic silanol groups of the capillary wall, the extent of the ionization and, therefore, the electrophoretic mobility of each solute.

The migration behavior of the analytes was first examined by capillary zone electrophoresis (CZE) using pH buffers ranging from 2.5 to 13, with phosphate buffer 50 mM for acidic and neutral pHs, and borate buffer 80 mM for alkaline pHs. For this study, standard solutions of 10 mg l⁻¹ of each compound were used, injected at 50 mbar during 5 s. In very acidic media no peaks were observed. The mobility of DA, DADK and DK were different from EOF mobility at pH greater than 6, 7 and 8.5 respectively. In contrast, M remained neutral under all pH conditions examined and migrated with the EOF. Then, MEKC was investigated in order to carry out the simultaneous determination of the M and its conversion products. In this work, SDS, which is negatively charged and its electrophoretic mobility is opposite in direction to electro-osmosis, was selected as giving a good separation of the analytes.

3.1.2. EFFECT OF BUFFER pH

For the separation of the analytes under study, a pH optimisation was carried out. Based on a previous pH screening, we selected a pH interval for the study of the separation buffer between 9 and 11, in steps of 0.5 units, considering the adequate resolution obtained in this range. All buffers were 10 mM borate and 20 mM SDS. Standard solutions of 5 mg l^{-1} , injected at 50 mbar during 5 s, of each analyte were used for this study and for the rest of the optimisation steps.

The effect of the pH on the migration times is shown in Figure 4.3 and the corresponding electropherograms are presented in Figure 4.4. Variations of pH in the studied interval affected DK to a greater degree. Although the best resolution was obtained at pH 9.5, pH 10 was selected as optimum since it provides good resolution and much better efficiency and sensitivity for DK.

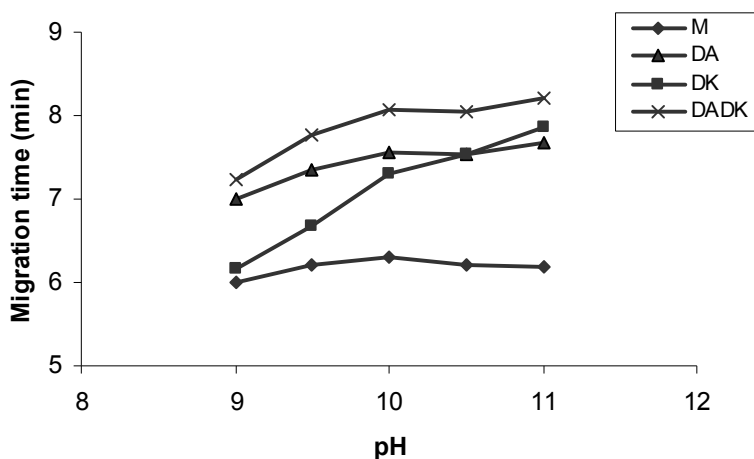


Figure 4.3. Influence of the electrolyte pH on the migration time.

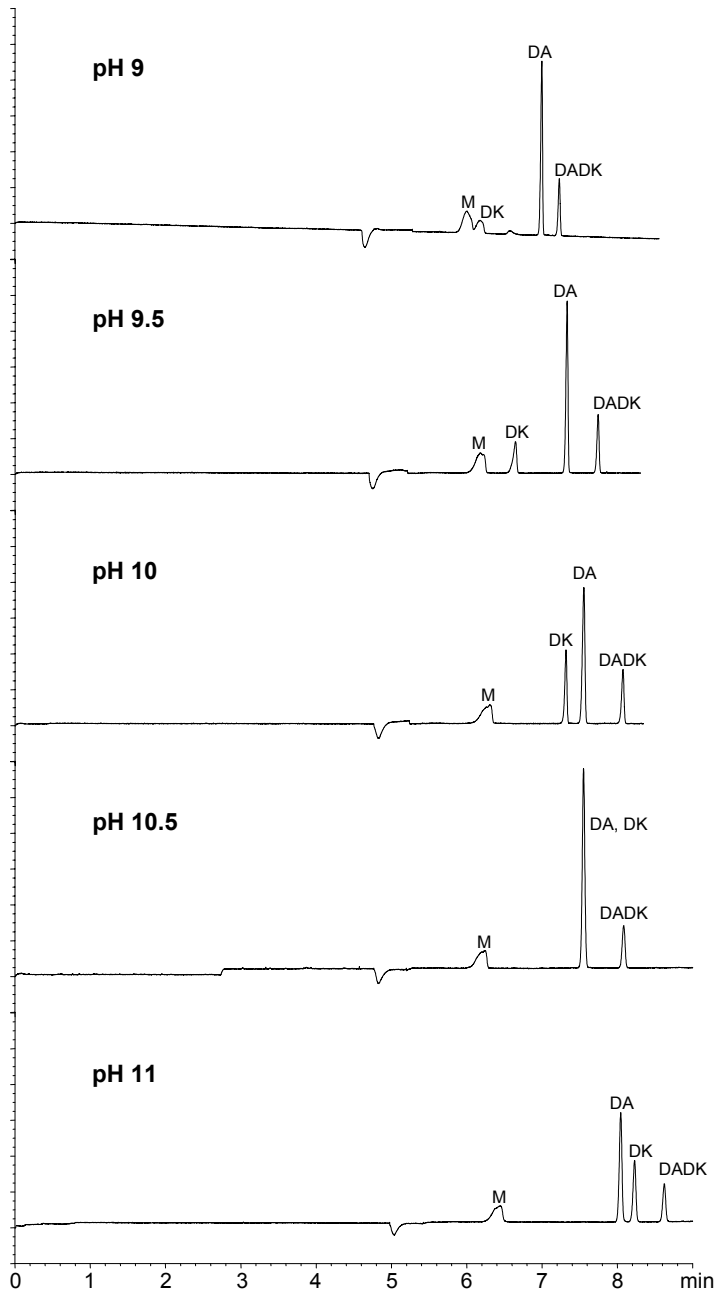


Figure 4.4. Obtained electropherograms at different pHs.

3.1.3. EFFECT OF SDS CONCENTRATION

The influence of SDS concentration in the buffer was also examined. Different behaviours for the compounds studied were observed when the concentration of surfactant was varied in the range between 20 - 120 mM. The molecules that present a greatest interaction with the micelles were M and DK, showing an alteration in the migration time with the increase in the SDS concentration.

As can be seen in Figure 4.5, at a 20 mM SDS concentration, M was the first compound eluted, but as SDS concentration increases, the migration time is displaced, being finally the last compound eluted from a 60 mM SDS concentration. Also, a great enhancement in the efficiency is observed for M as the SDS concentration increases.

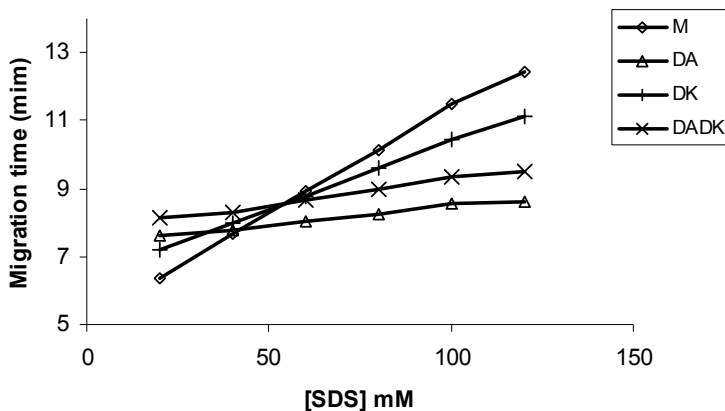


Figure 4.5. Influence of SDS concentration on the migration time of the studied compounds.

DK, which is the second peak appearing in the electropherogram at a 20 mM SDS concentration, suffers an increase in its migration time, being the third compound that elutes from the capillary from a 60 mM SDS concentration.

According to the Figure 4.6, the use of a 90 mM SDS concentration resulted in an efficient separation. Using higher SDS concentrations in the buffer, higher analysis times were observed. This effect can be explained by both the increase of the ionic strength of the buffer separation and a higher interaction between solutes and micelles due to the use of higher SDS concentration. From these facts, a 90 mM SDS concentration was selected as optimum.

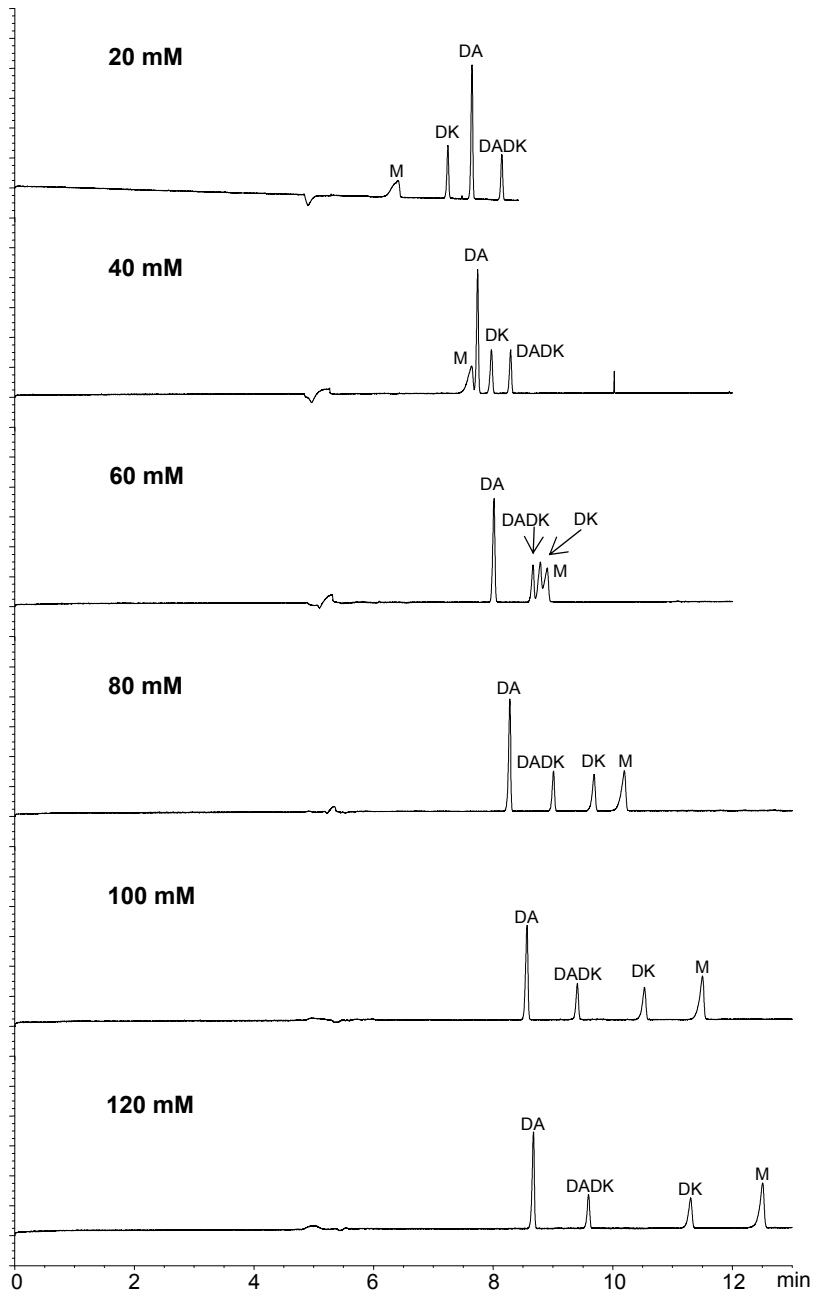


Figure 4.6. Obtained electropherograms at different SDS concentration.

3.1.4. EFFECT OF NATURE AND CONCENTRATION OF THE BACKGROUND ELECTROLYTE

In previous experiments, different buffers such as carbonate, phosphate, borate and ammonium acetate were tested as possible background electrolytes. Unacceptably high Joule heating as a result of a great current generated was observed when phosphate or carbonate were used as electrolyte buffer. Furthermore, as can be observed in Figure 4.7, carbonate provided a inadequate electropherogram shape. Ammonium acetate leads to shorter analysis time than borate; therefore it was selected as an optimum separation buffer.

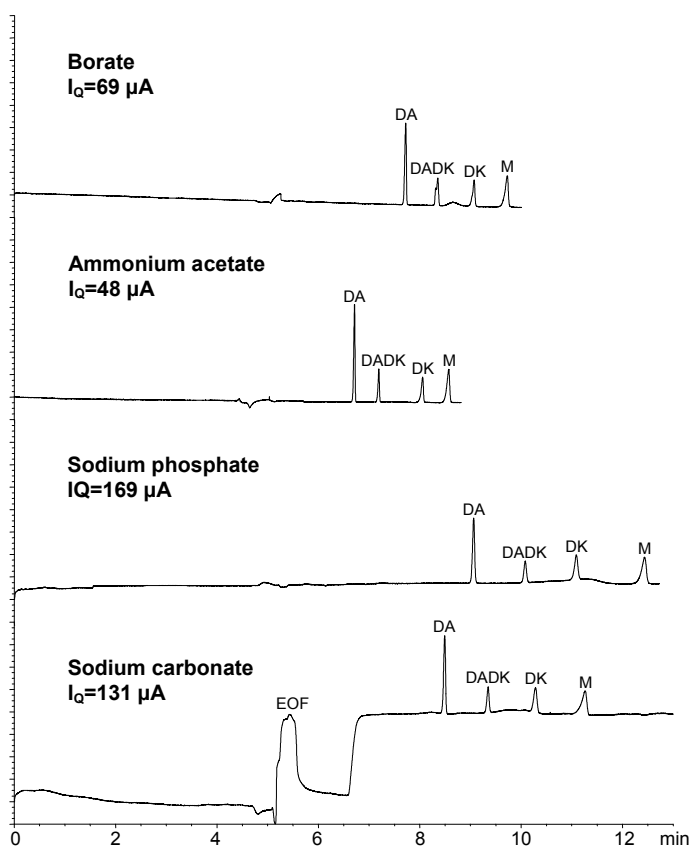


Figure 4.7. Electropherograms obtained with different buffer nature. Buffer concentration 40 mM. I_Q = Current intensity.

The effect of the buffer concentration on the migration time and peak dispersion was evaluated in the range 10 - 50 mM. As expected (Figure 4.8), an increase in buffer concentration caused an increase in the migration time of all the compounds, since mobility is inversely dependent on the buffer concentration. However, no changes in resolution were reported. A buffer concentration of 10 mM was selected as optimum value since it provides good resolution, low current, the better peak shape and the shortest analysis time.

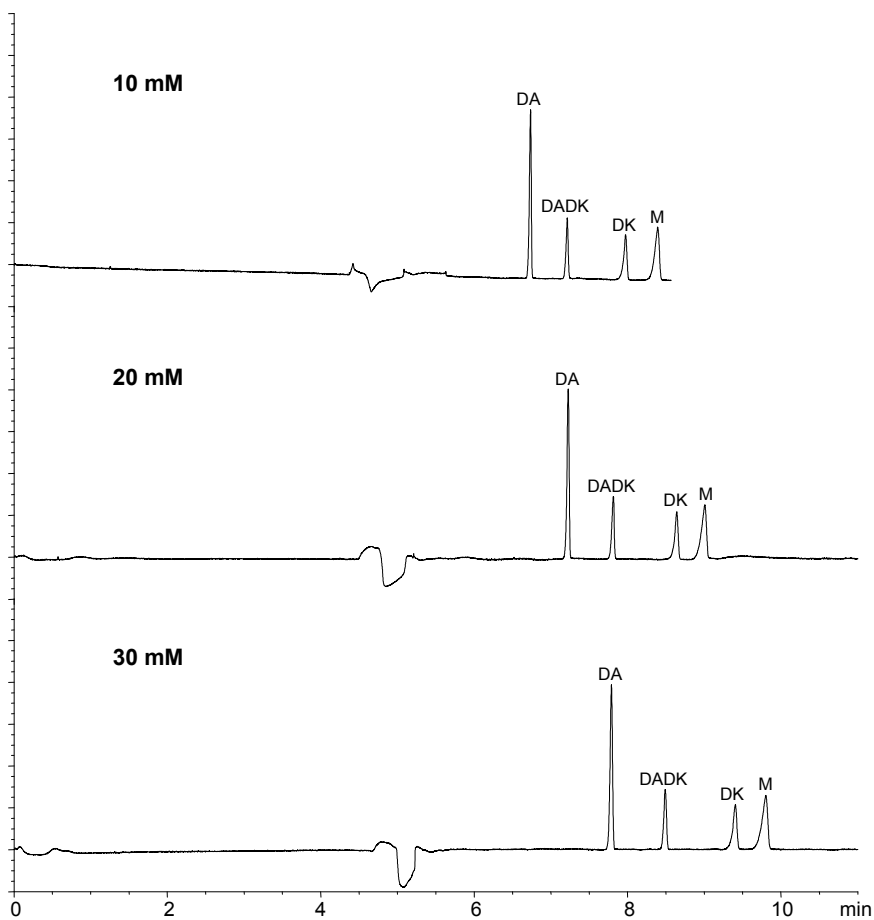


Figure 4.8. Influence of the ammonium acetate concentration on migration times.

3.1.5. EFFECT OF ORGANIC MODIFIERS

The addition of organic modifiers to the buffer solution decreases the interactions between analytes and micelles, and increases their solubility in the buffer. Although good resolution is reached, in an effort to improve the speed of analysis and efficiency of the peaks, the addition of organic solvents to the buffer solution was examined under the above selected conditions. Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol and acetonitrile were added as modifiers to the buffer solution (10 mM ammonium acetate, 90 mM SDS at pH 10) at a percentage of 5%. As can be observed in Figure 4.9, in all cases, resolution decreases between DK and M and the use of organic modifier was not considered.

3.1.6. EFFECT OF THE TEMPERATURE

The effect of temperature was investigated in the range of 10 - 30 °C (Figure 4.10). Higher temperatures were not considered as it increases the noise of the baseline. A decrease in the temperature resulted in a decrease in the generated current, a decrease in EOF, an increase in the migration times, due to the lower electrolyte viscosity and an increase in the resolutions. According to these effects, 25 °C was selected as suitable.

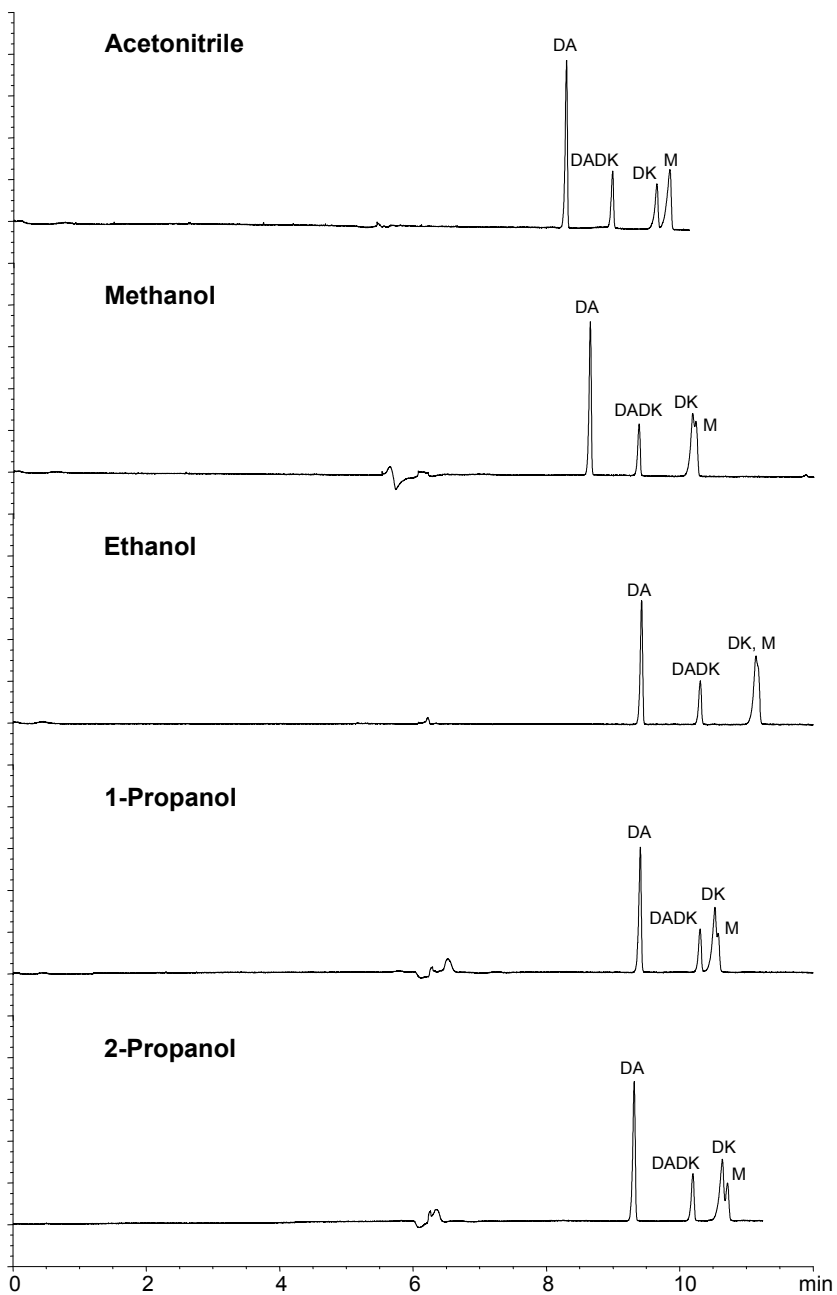


Figure 4.9. Influence of the addition of organic modifiers to the separation buffer. Organic modifier content: 5% (v/v).

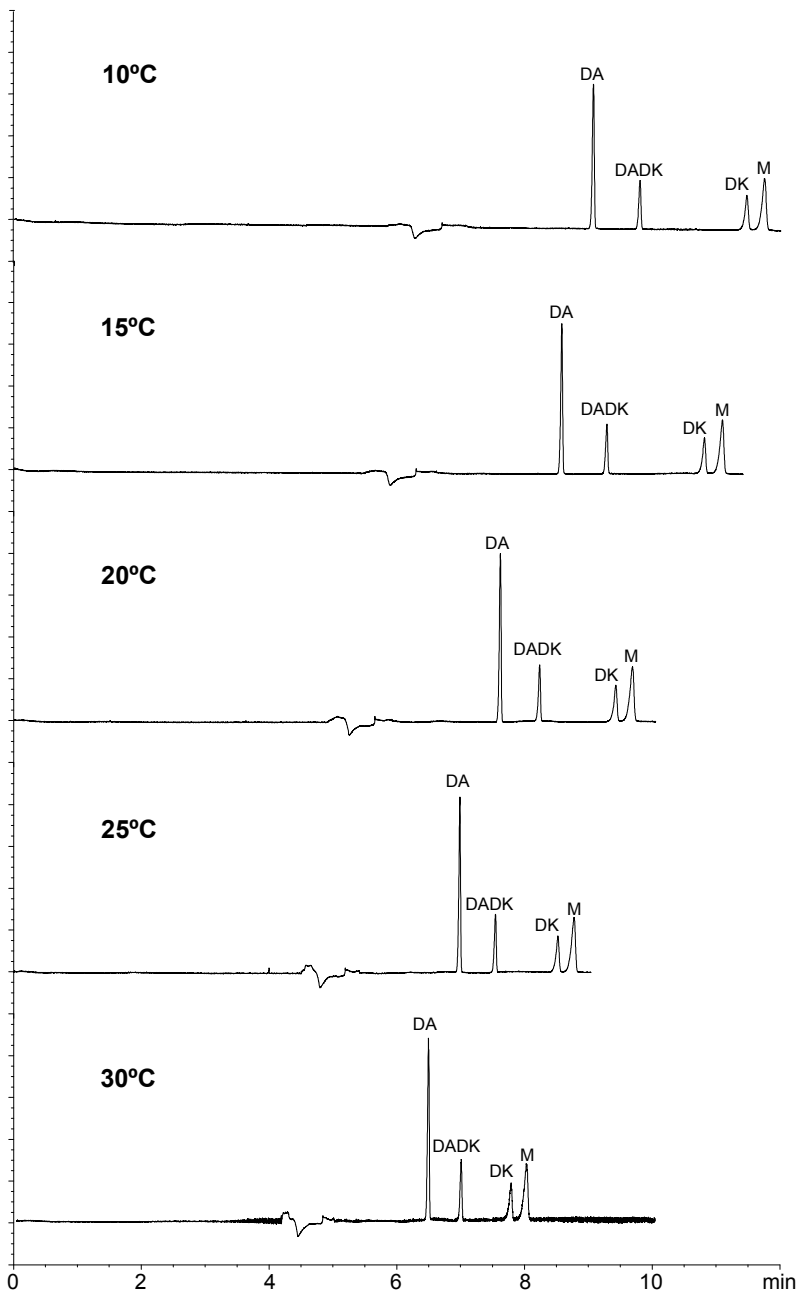


Figure 4.10. Obtained electropherograms at different temperatures.

3.1.7. EFFECT OF THE APPLIED VOLTAGE

The effect of the applied voltage on the resolution was examined in the range of 10 - 25 kV. A higher voltage produced the fracture of capillary in less than ten analyses. A voltage of 25 kV yielded the best compromise in terms of run time, separation time and peak shape, therefore, this value was selected as optimum.

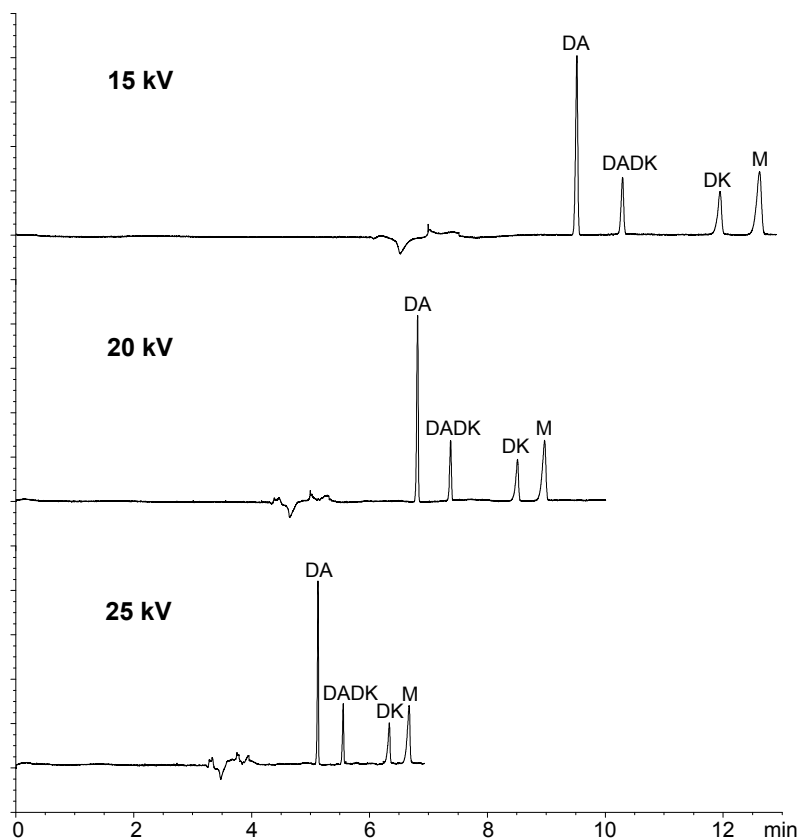


Figure 4.11. Electrochromatograms obtained at different voltages.

3.1.8. OPTIMISATION OF THE INJECTION TIME

The sample must be injected in aqueous medium, because an organic solvent amount above 10 % in the medium produces a significant decrease in the sensitivity and efficiency of M, with the corresponding loss of resolution between DK and M.

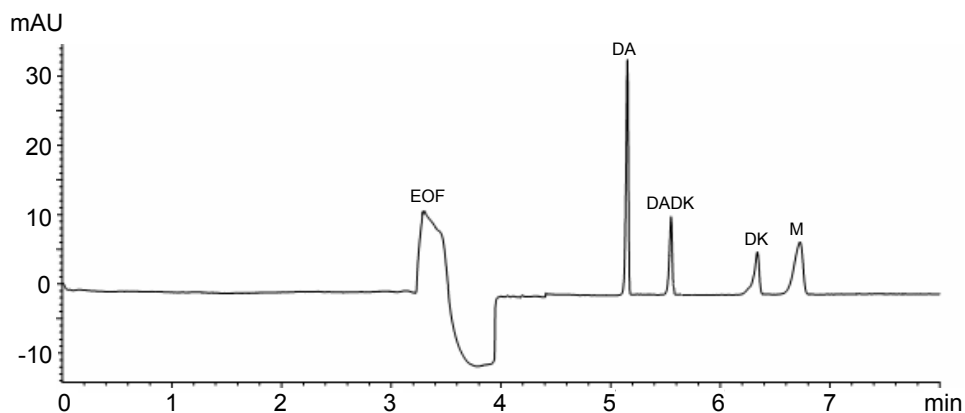
In order to improve the detection limits, the injection time was varied between 2 and 20 s using a 50 mbar hydrodynamic injection. The peak area of all compounds increases as the injection time increases, but poor efficiencies and bad peak shape were obtained for times longer than 10 s. For this reason, 10 s was applied as injection time at 50 mbar.

Once all the experimental variables were optimised, some experiments were carried out using a bubble capillary in order to improve the sensitivity of the method. No decreases in resolution were obtained and therefore this type of capillary was used in further experiments.

As a summary, all the optimum values for the variables involved in the method are included in Table 4.1, and a electropherogram of M and its corresponding by-products at the optimised conditions is shown in Figure 4.12.

Table 4.1. Optimum values for the variables involved in the proposed method.

Variable	Optimum value
pH	10
[SDS]	90 mM
[Amonium Acetate]	10 mM
Temperature	25°C
Voltage	25 kV
Injection time	10 s
Caipllary bubble	L : 64.5 cm I.D. : 75µm
Wavelengths	220 nm (M, DA) 260 (DK, DADK)

Figure 4.12. Electropherogram of 5 µg ml⁻¹ of M, DA, DK and DADK at optimum conditions: 10 mM Ammonium Acetate buffer pH 10 with 100 mM SDS, 25 kV of voltage, 10 s injection time, T^a = 25 °C, detection at 220 nm.

3.2. OPTIMISATION OF THE SAMPLE TREATMENT

With the purpose of selecting the most suitable medium for the extraction of the compounds from soil matrix, and taking into account the differences among the polarities of the analytes, different solvents were tested, namely: ethyl acetate, acetone, acetonitrile and methanol. Recovery studies showed that the best results were obtained using methanol. A volume of 45 ml was enough for the sample size used (10 g) for analysis and an ultrasonic extraction time of 20 min. was chosen as a compromise between the extraction efficiency and the stability of the analytes, as longer times cause their degradation.

In a final step the obtained solution was concentrated to approximately 1 ml, in order to avoid the degradation and retention of the analytes in the round bottom flask, in a rotary evaporator and the extract was diluted with 25 ml of deionized water.

Concerning the preconcentration and cleanup of the obtained extract, different sorbents for the SPE procedure were tested, silica bonded C₁₈, HLB and LiChrolut EN. Higher recoveries and better removal of the interferences were obtained with LiChrolut EN cartridges and so were selected for further studies.

Before the elution of the analytes, the washing step was optimised in order to eliminate some interferences co-migrating with the analytes. The optimisation was carried out with a concentration of 5 mg l⁻¹ for all the analytes and 5 ml of methanol:water as washing solution, changing the percentage of methanol from 0% to 90%. As can be seen in Figure 4.13, the elution of DK and DADK from the cartridge starts at 50% of methanol, causing a decrease of their recoveries, so a

mixture of methanol:water (45:55) was selected to ensure the retention of the analytes until their final elution.

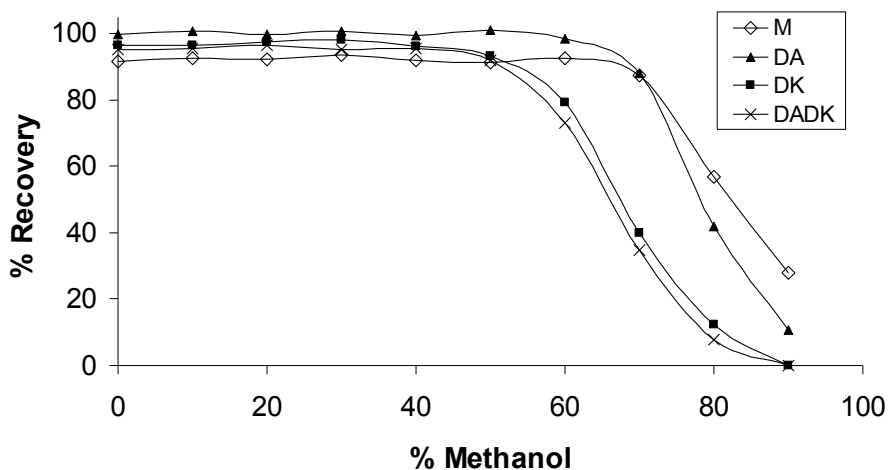


Figure 4.13. Influence of the methanol percentage on the washing of the SPE cartridges.

Elution of the analytes from cartridges was carried out in two steps: firstly all the analytes except M were eluted with 4 ml of methanol. Higher volumes of methanol did not improve the obtained recoveries of any analytes including M. As it has been previously stated⁶ a more apolar solvent (ethyl acetate) was required for efficient desorption of M. Several volumes of this solvent were tested and the recoveries were not improved by using volumes higher than 1 ml. For this reason, this second step consisted of elution with 1 ml of ethyl acetate.

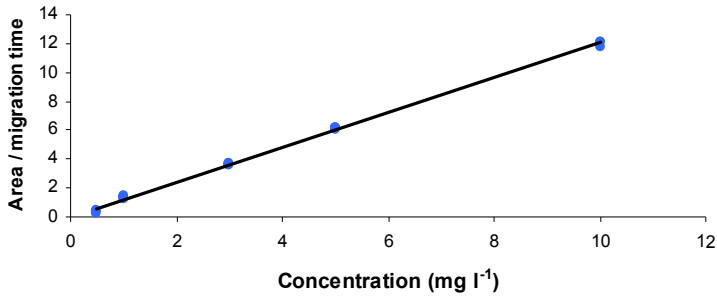
3.3. CALIBRATION CURVES AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Under the optimum conditions above described, calibration graphs were constructed by injection of pure standard solutions of the analytes corresponding to the concentrations of 0.5, 1, 3, 5 and 10 mg l⁻¹. Each calibration level was injected four times. Obtained standard calibration curves are shown in Figure 4.14, and the statistical parameters obtained from the mean square regression and the performance characteristics are shown in Table 4.2.

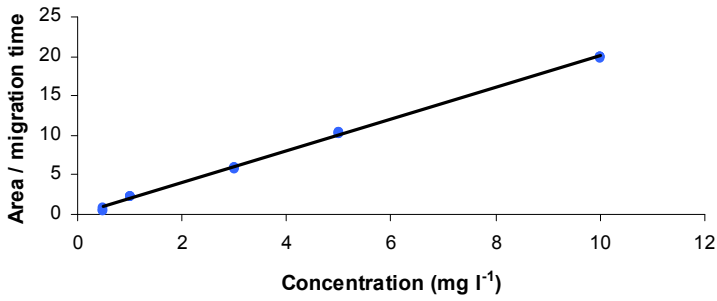
In order to check the influence of the sample treatment (extraction procedure and sample clean-up), the calibration curves were established as well by injection of standard analyte solutions processed as in the described sample preparation procedure. The concentration levels tested in this case are twenty times lower than those corresponding to injected solutions due to the preconcentration step involved (25, 50, 150, 250 and 500 µg l⁻¹). The P-values obtained from the comparison of both calibration curves were higher than 20%, for both slopes and intercepts, indicating that no significant differences exist between both calibration curves, so the sample treatment does not introduce significant systematic error.

Limits of detection and quantification have been calculated as $\Delta_{\alpha,\beta} \cdot S_0$ and $10 \cdot S_0$, respectively²⁸, where $\Delta_{\alpha,\beta}$ is the non-central parameter of a non-central t-distribution with ν degrees of freedom, which depends on both α and β ; α is the probability of committing a statistical type I error (false positive, usually 0.05); β is the probability of committing a statistical type II error (false negative, usually 0.05), and S_0 is the standard deviation for “zero” concentration, estimated as an approximate expression which uses the residual standard deviation²⁹ of the calibration curve.

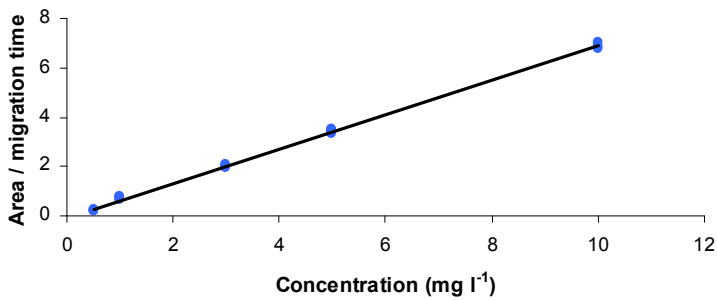
Metribuzin



Deaminometribuzin



Diketometribuzin



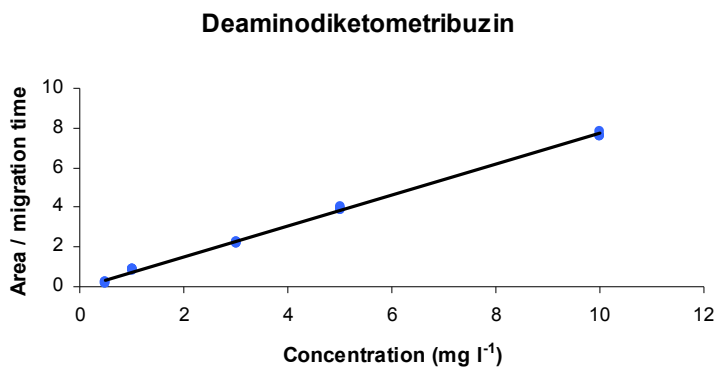


Figure 4.14. Standard calibration curves for metribuzin and its byproducts.

Table 4.2. Statistical parameters from the linear regression for each calibration curve and performance

	Linear dynamic range (mg l^{-1})	Calibration Equation ^a	S _{R,C}	R ² (%)	LD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (3 mg l^{-1})
M ^b	0.02 - 10.0	A = 1.20 · C - 0.03	0.18	99.8	22.9	76.4	2.73
DA ^b	0.02 - 10.0	A = 2.01 · C - 0.08	0.30	99.8	22.4	74.5	2.85
DK ^c	0.02 - 10.0	A = 0.70 · C - 0.05	0.09	99.9	19.0	63.2	2.42
DADK ^c	0.02 - 10.0	A = 0.78 · C - 0.05	0.12	99.8	23.4	78.9	3.02

S_{R,C}: Regression standard deviation; R²: Determination coefficient.

^a Obtained from four injections of the standard mixture solutions. A: area of the electrophoretic peak / migration time.

^b C: concentration of the analyte in the standard solution (mg l^{-1}).

^c Detection at 220 nm.

^c Detection at 260 nm.

3.4. TRUENESS OF THE METHOD

In order to check the trueness of the developed methodology, a recovery study was carried out on soil samples free of the analytes. Samples of soil spiked with each one of the analyte solutions at three different concentration levels (150, 250 and 350 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were analyzed. Three replicates were prepared at each concentration level and each one was injected by triplicate. Previously the samples were extracted following the above described treatment, and a sample blank was also analyzed in order to check that the analyzed soil samples were free of M and its conversion products.

Recoveries were calculated by comparing the obtained concentrations for spiked samples at different concentration levels, and calculated from the calibration curve established with analyte standard solutions processed following the same treatment, with the true concentration value. This procedure ensures the correction of possible errors on the analytical signal due to the losses from the SPE treatment. The obtained values of recoveries for M and its conversion products and the corresponding relative standard deviation (RSD, %) are shown in Table 4.3.

Table 4.3. Trueness of the method. Recovery study at different concentration levels.

Added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	M		DA		DK		DADK	
	Recovery %	RSD %	Recovery %	RSD %	Recovery %	RSD %	Recovery %	RSD %
150	78.3	7.49	86.7	7.01	82.1	9.94	85.7	9.67
250	87.1	5.52	99.2	6.75	86.4	7.12	94.1	8.36
350	91.3	6.41	94.4	6.67	85.8	8.10	93.2	5.91

(n = 9)

Figure 4.15 shows typical electropherogram obtained when a sample of soil spiked at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ of each analyte is processed and analysed following the proposed method.

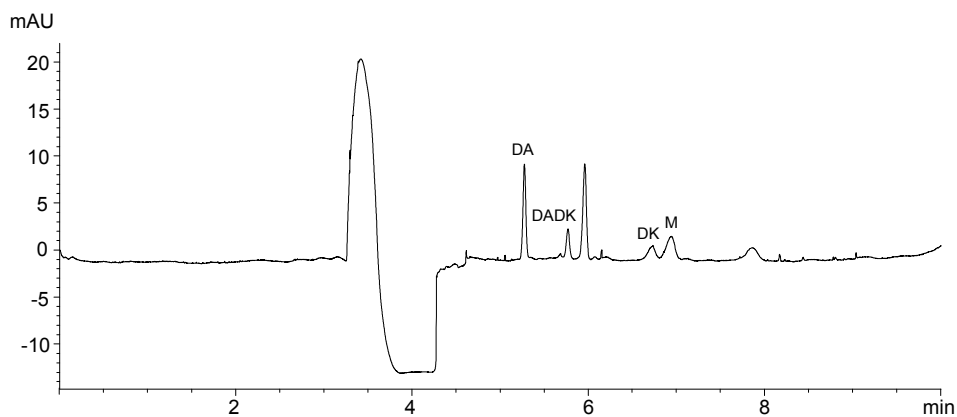


Figure 4.15. Electropherogram of a soil sample spiked at $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ of each analyte.

3.5. SPECIFICITY

Specificity can be determined by measurement of the peak homogeneity. Since the different techniques available in a DAD are not equally effective for the detection of impurities or interferences in an electrophoretic peak, the use of several techniques is recommended³⁰.

In the present work, the procedures used to validate the peak purity of the studied compounds present in soil samples were:

- (a) A blank soil was analyzed by the proposed method and no interferences were found co-migrating with the analytes.

- (b) Measurement of absorbance at two different wavelengths.
- (c) Peak purity index calculated by ChemStation software: 0.391 for M, 0.189 for DA, 0.138 for DK and 0.284 for DADK. This test was carried out with five spectra per peak (from 210 nm to 400 nm) at different times, and each individual spectrum was compared to the average spectrum. A similarity coefficient between each individual spectrum and the average spectrum was calculated and compared with a threshold coefficient calculated taking into account the spectral noise. An absorbance threshold of 1 mAU was set in order to reduce the contribution of spectral noise. A smooth factor of 7 and a spline factor of 5 were selected for spectra processing. Spectral noise was evaluated at 0 min. with 14 spectra. If the peak is pure, similarity coefficient is higher than the threshold coefficient, for this reason if the peak purity index calculated as $ratio = (1000 - similarity / 1000 - threshold)$ is less than 1, the test for peak purity passes, but if it is greater than 1 then it fails³¹.

The three techniques showed that the peaks corresponding to the compounds studied present a high level of purity. Therefore, no interferences from matrix effect were observed.

4. CONCLUSIONS

The results presented in this work demonstrate that MECK is a very efficient methodology to the simultaneous determination of M and its major conversion products (DA, DK and DADK) at trace levels in soils samples, being a very fast and easy alternative to HPLC.

The method implies a previous extraction and sample cleanup in the studied samples using a SPE procedure, which offers an improvement in the sensitivity, considering the limitation of the CE techniques. The satisfactory detection limits obtained are mainly due to the excellent sorption properties of the sorbent used in the SPE procedure, LiChrolut EN.

The simplicity of the proposed method makes it suitable for routine analysis of these analytes in soils, showing good recoveries in compliance with the current guidelines.

5. REFERENCES

1. V. Andreu, Y. Picó, *Trends in Anal. Chem.*, 23 (2004) 772.
2. *The Pesticide Manual*, Twelfth ed., CDS Tomlin (Ed.), British Crop Protection Council, 2000.
3. U. Raschke, G. Werner, H. Wilde, U. Stottmeister, *Chemosphere* 36 (1998) 1745.
4. T. Henriksen, B. Svensmark, R.K. Juhler, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 79.
5. R.M. Johnson, A.B. Pepperman, *J. Liquid Chromatogr.* 18 (1995) 739.
6. E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A*, 962 (2002) 9.
7. J.M. Lawrence, M. Eldan, W.C. Sonzogni, *Wat. Res.* 27 (1993) 1263.
8. C.E. Parker, A.V. Geeson, D.E. Games, E.D. Ramsey, E.O. Abusteit, F.T. Corbin, K.B. Tomer, *J. Chromatogr.* 438 (1988) 359.
9. Tanabe, A., Kawata, A., *Anal. Sci.* 20 (2004) 227.
10. F. Menzinger, P. Schmitt-Kopplin, D. Freitag, A. Kettrup. *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 45.
11. T. Tegeler, Z. El Rassi. *Electrophoresis* 22 (2001) 4281.
12. A. K. Malik, W. Faubel. *Crit. Reviews Anal. Chem.* 31 (2001) 223.
13. Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 133.
14. J. Hernández-Borges, S. Frías-García, A. Cifuentes, M.A. Rodríguez-Delgado. *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 947.
15. A. Juan-García, G. Font, Y. Picó. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 793.
16. F.M. Lancas, S.R. Rissato, M.S. Galhiane. *Chromatographia* 863 (1999) 35.
17. M. Molina, D. Pérez-Bendito, M. Silva. *Electrophoresis* 20 (1999) 3439.
18. R. Loos, R. Niesser. *J. Chromatog. A* 835 (1999) 217.
19. C.W. Henry III, S.A. Shamsi, I.M. Warner. *J. Chromatog. A* 863 (1999) 89.
20. J.P. Quirino, N. Inoue, S. Terabe. *J. Chromatog. A* 892 (2000) 187.

21. E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara. *J. Chromatog. A* 872 (2000) 299.
22. S. Frías, M.J. Sánchez, M.A. Rodríguez. *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 271.
23. A. Juan-García, G. Font, Y. Pico. *J. Chromatog. A* 1153 (2007) 104.
24. C. Molina-Mayo, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado. *J. Chromatog. A* 1150 (2007) 348.
25. http://www.uhl.uiowa.edu/newsroom/hotline/1996/1996_12/solidphase.html.
26. Y. He, H.K. Lee, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2036.
27. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Domínguez-Álvarez, *J Chromatogr. A*, 990 (2003) 291.
28. IUPAC. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities. *Pure and Appl. Chem.*, 1995, 67, 1699–1723.
29. A.M.García-Campaña, W.R.G. Baeyens, G.Van der Weken, L. Cuadros-Rodríguez, F.Alés Barrero, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 177.
30. H. Fabre, A. LeBris, M.D. Blanchin, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 81.
31. M. Stahl, *Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology*, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2003.

CHAPTER 5

DETERMINATION OF TRANEXAMIC ACID IN
BLOOD SAMPLES BY LIQUID
CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH
FLUORESCENCE DETECTION

DETERMINATION OF TRANEXAMIC ACID IN BLOOD SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH FLUORESCENCE DETECTION

RESUMEN

El ácido tranexámico (TA) es un agente antifibrinolítico sintético considerado como candidato a adyuvante en la terapia fármaco-láser para el tratamiento de hemangiomas capilares vinosos (conocidos como “manchas de vino”). Para estudios de la utilidad del fármaco, se ha desarrollado un método para la cuantificación de TA en sangre mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada con detección fluorescente. Una vez obtenido el plasma pobre en plaquetas, se filtra usando un filtro para centrifuga de tamaño de poro 3 kDalton y el TA presente, así como otros compuestos del plasma, se derivatizan con naftaleno-2-3-dicarboxaldehído (NDA) y cianuro, considerando que dicha molécula no presenta fluorescencia nativa. El exceso de NDA se elimina después de 2 min. mediante la adición de triptofano. Los derivados fluorescentes son separados en una columna C18 de 2.1 mm de diámetro usando un gradiente de tampón acetato/acetonitrilo. Se consiguió una separación excelente de los componentes del plasma a un pH 5.5. La detección fluorescente y cuantificación se realiza usando longitudes de onda de excitación/emisión de 440/520 nm, respectivamente. El límite de detección fue 0.5 μM y la recuperación media \pm desviación estándar en sangre fue de $81.7 \pm 10.9\%$. Las muestras de TA derivatizado son estables al menos 36 h a 4 °C. El método fue aplicado satisfactoriamente a la liberación termoinducida de TA en liposomas termosensibles.

SUMMARY

Tranexamic acid (TA) is a synthetic antifibrinolytic agent that is being considered as a candidate adjuvant drug for site-specific pharmaco-laser therapy of port wine stains. For drug utility studies, a high-performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence method was developed for the quantification of TA in blood. Platelet-poor plasma was prepared, size-separated using 3 kDalton cut-off centrifuge filters and derivatized with naphthalene-2-3-dicarboxaldehyde (NDA) and cyanide. The excess of NDA was quenched after 2 min. by adding tryptophan. The derivatives were separated on a 2.1 mm C18 column using an acetate buffer/acetonitrile gradient. Excellent separation from plasma background was obtained at pH = 5.5. Fluorescence detection and quantification was carried out using as excitation/emission wavelengths, 440/520 nm, respectively. The limit of detection was 0.5 μ M and the mean \pm SD recovery from whole blood was 81.7 \pm 10.9%. Derivatized TA samples were stable for at least 36 h at 4 °C. The method was successfully applied to a heat-induced TA release study from thermosensitive liposomes.

1. INTRODUCTION

Tranexamic acid [trans-4-(aminomethyl) cyclohexanecarboxylic acid] (TA) is the most potent antifibrinolytic lysine analogue^{1,2} used in a broad spectrum of peri- and postoperative interventions and bleeding disorders³⁻⁷. The administration of TA is associated with reduction in bleeding due to its inhibitory effect on clot breakdown (fibrinolysis). TA occupies the lysine binding sites of plasminogen, thereby inhibiting the formation of a molecular complex required for fibrinolysis^{8,9}.

It has recently been proposed¹⁰ that synthetic antifibrinolytic agents such as TA may also constitute suitable candidates for site-specific pharmaco-laser therapy, a development-stage treatment modality for vascular anomalies (e.g., refractory port wine stains) in which laser irradiation is combined with the concomitant administration of a prothrombotic and/or antifibrinolytic-encapsulating drug delivery system. The objective of this modality is to induce occlusion of the pathological blood vessel through laser-mediated hemostatic processes, whereby the accumulated drug carrier progressively releases its content at the target site. The release of TA during blood coagulation will impart stability and integrity onto the clot by inhibiting its breakdown. Complete occlusion of the blood vessel, initiated by laser irradiation and facilitated by the presence of prothrombotic and/or antifibrinolytic pharmaceuticals in the circulation, will lead to local hypoxia and the consequent removal of the irradiated vasculature. This ultimately results in a reduction in blood volume, and therefore the redness of the port wine stain¹⁰.

The aim of this study is to develop a suitable method for TA quantification in blood and plasma samples, which will be used in drug release and pharmacokinetics studies during the development phases of site-specific

pharmaco-laser therapy. Although drug concentrations inside such carriers can be very high, the relatively slow release kinetics (minutes to hours) and instantaneous dilution effects will require a highly sensitive and selective chemical analytical approach to quantify TA release rates and half-lives in plasma and blood samples.

In order to develop a simple yet effective quantification method for TA over the 10^{-4} - 10^{-7} M range, several hurdles inherent to TA's molecular structure (Figure 5.1A) must be overcome:

1. - First, TA lacks the electronic configuration (i.e. π -electrons) to behave as a chromophore or fluorophore, necessitating a derivatization step prior to spectroscopic detection.

2. - Secondly, TA shares structural similarity to amino acids with its amino and carboxylic acid groups. High levels of bloodborne amino acids and possibly small peptides are therefore expected to cause major interferences during separation, which is required for assaying TA in biological samples.

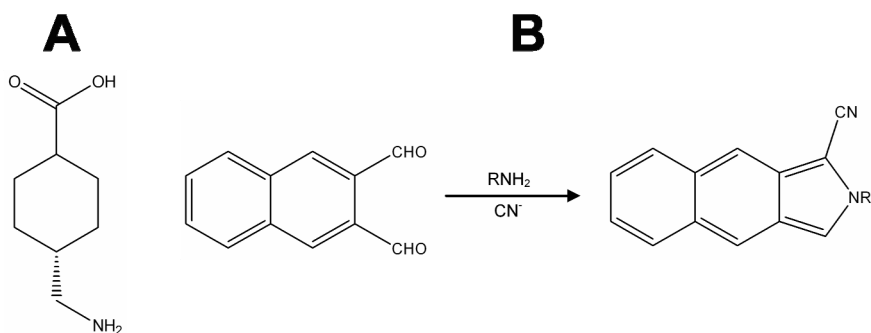


Figure 5.1. (A), Chemical structure of tranexamic acid; (B), Derivatization reaction of naphthalene-2-3-dicarboxaldehyde (NDA)/ CN^- with primary amines.

The chemical analytical techniques for TA determination published to date are summarized in Table 5.1. Limit of detection (LD) values in the low-to-sub- μM range have been reported for pharmaceutical preparations and buffered solutions^{12,15,16,25,27,28,30}, but these techniques are not suitable or have not been investigated for biological samples. In one of these works¹¹ a prodrug of TA with more convenient chromatographic properties was analyzed. The majority of the other published methods, including ion-exchange-, gas-, and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and electrophoresis coupled to spectroscopic or mass spectrometric (MS) detection are either not sensitive or selective enough for our purposes^{13,17-24,26,29,31}. An excellent method based on HPLC-tandem MS, although requiring expensive instrumentation, was recently reported by Chang et al.¹⁴.

Table 5.1. Summary of available chemical analytical techniques for the quantification of tranexamic acid (TA).

Source	Method	Column	Derivatization	Detection	LD (μM)	Sample; remarks
[11]*	HPLC	C8 Nucleosil	pre-column; fluorescamine	fluor. (280/470)	0.04	blood; analyte was prodrug of TA
[12]	HPLC	LiChrosorb RP-18-5	pre-column; o-phthalaldehyde	chemilum.	0.05	buffer
[13]	cat HPLC	Nucleosil SA	post-column; o-phthalaldehyde	fluor. (410/450)	0.064	plasma; higher LD due to plasma interferences
[14]	HPLC-MS/MS	Xterra MS C18	--	tandem MS; m/z 158→95	0.064	plasma
[15]	spectro-fluorometry	--	7-chloro-4-nitrobenzofurazan	fluor. (462/520)	0.064	H ₂ O/methanol
[16]	spectro-photometry	--	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone	abs (470)	1.2	pharmaceutical preps
[16]	spectro-photometry	--	7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane	abs (750)	0.76	pharmaceutical preps
[17]	HPLC	C18 μ -Bondapak	pre-column; 5-(dimethylamino)-naphthalenesulfonyl chloride	fluor. (N.L.)	1.3	blood
[18]	HPLC	Cosmosil 5C8	pre-column; phenylisothiocyanate	abs. (254)	1.3	serum
[19]	HPLC	YMC-ODS	pre-column; 2-hydroxy naphthalaldehyde	abs. (317)	2	H ₂ O/ethanol, blood; LD refers to std. solution
[20]	CE	uncoated fused silica	pre-CE; ofloxacin acyl chloride	abs (300)	2.5	buffer, plasma
[21]	PE	--	post-PE; ninhydrin	abs. (500)	3	plasma, urine
[22]	GC	CHDMS or Chromosorb G	pre-column; 4-fluoro-3-nitrobenzene trifluoride, ethylation	electron capture	6	serum, urine; extra TLC step could lower LD
[23]**	HPLC	Microsorb-MV C18	pre-column; o-phthalaldehyde	fluor. (N.L.)	10	blood
[24]	cat HPLC	Amberlite IR-120	post-column; ninhydrin	abs (570)	13	blood

Source	Method	Column	Derivatization	Detection	LD (μM)	Sample; remarks
[25]	spectro-photometry	--	ninhydrin	abs (565)	13	pharmaceutical preps.
[26]	HPLC	LiChrosorb RP-18	pre-column; fluorescamine	fluor. (390/475)	25	blood
[27]	spectro-photometry	--	chloranil in alcohol	abs (346)	N.L.	pharmaceutical preps.
[28]	spectro-photometry	--	tetracyanoethylene	abs (330)	N.L.	pharmaceutical preps.
[29]	GC-MS	Chromosorb W-HP 80/100	pre-column; dry hydrogen chloride-n-butanol, heptafluorobutyric anhydride	MS	N.L.	blood
[30]	ip HPLC	LiChrospher Si-100; Nucleosil 100	pre-column; naphthalene-2-sulfonate	abs (254)	N.L.	buffer
[31]***	cat HPLC-GC	GC-120; GC: Chromosorb	post-column; CF3COOH, CH2Cl2	MS	N.L.	serum, cerebrospinal fluid

HPLC conditions are reversed-phase, unless otherwise indicated. Abbreviations: LD: limit of detection, cat: cation exchange, ip: ion-pair, GC: gas chromatography, MS: mass spectrometry, CE: capillary electrophoresis, PE: paper electrophoresis, fluor.: fluorescence (excitation/emission wavelength), chemilum.: chemiluminescence, abs.: absorbance (absorption wavelength), TLC: thin layer chromatography, N.L.: not listed.

*A propionic ester of TA was used.

**LD value deduced from text.

***TA was employed as internal standard.

In this chapter, a simple, sensitive, and highly selective RP-HPLC method is proposed based on pre-column derivatization with naphthalene-2-3-dicarboxaldehyde (NDA) for the quantification of TA in the 5×10^{-7} - 1×10^{-4} M range in blood and plasma samples.

NDA has been widely used as a derivatization reagent for the determination of amino compounds in biological samples by fluorescence detection after liquid chromatography³² and capillary electrophoresis³³. The reaction of NDA with a primary amine in the presence of CN^- , which proceeds facilely and quickly due to the high reactivity, is depicted in Figure 5.1B. The derivatives are relatively stable and the reagent blank signal is low inasmuch as the starting reagent itself emits negligible fluorescence³².

Optimisation of the method focuses on sample preparation, optimisation of the derivatization reaction, chromatographic separation from large excesses of amino-containing plasma components, sample stability and the use of internal standards. The method was validated for whole blood and plasma samples that were anticoagulated with citrate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), or heparin. Finally, the optimised method was applied to a heat-induced drug release study in which the amount of TA released from thermosensitive liposomes was quantitated in plasma.

2. EXPERIMENTAL

2.1. CHEMICALS AND REAGENTS

Ultrapure water (Milli-Q-UF Plus, Millipore, Bedford, MA, USA) was used in all assays. 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol (DSPE-PEG2000) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). HPLC-grade acetonitrile was purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands), and acetic acid and ammonium acetate were acquired from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

TA (> 96%, Fluka, Buchs, Switzerland) solution was prepared at a concentration of 20 mM in water, diluted to the desired concentrations, and stored at 4 °C. Cyclohexylamine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), *n*-propylamine (Baker Chemicals, Deventer, The Netherlands), isopropylamine (Sigma-Aldrich), *n*-dodecylamine (Baker Chemicals), and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-DOPA) (Sigma-Aldrich) were tested as internal standards (I.S.). A 1 mM solution of each I.S. as well as the stock of 40 mM NaCN (> 97%, Merck, Darmstadt, Germany) and 10 mM tryptophan (Sigma-Aldrich) were prepared in water and stored at 4 °C.

The 20 mM NDA stock solution (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was prepared in acetonitrile and stored at 4 °C in the dark for up to 4 weeks.

BD Diagnostics (Franklin Lakes, NJ, USA) glass Vacutainer tubes containing buffered sodium citrate, K₂EDTA, or Li/Na heparin were used for blood collection. D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone HCl (PPACK) was obtained

from Calbiochem (Merck Biosciences) and aprotinin was purchased from Bayer (Mijdrecht, The Netherlands).

2.2. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TA-ENCAPSULATING LIPOSOMES

Large unilamellar vesicles were prepared from DPPC and DSPE-PEG at a 96:4 molar ratio. Phospholipids were dissolved in chloroform and mixed at the desired ratios. The solution was desiccated by evaporation under a stream of N₂ gas and exsiccated for 20 min. The resulting lipid film was hydrated with 318 mM TA in 10 mM HEPES buffer [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] (Sigma-Aldrich), pH = 7.4, to a final lipid concentration of 5 mM and bath sonicated for 10 min. The mixture was subjected to 10 freeze-thaw cycles and extruded 5 times through 0.2 µm filters (Anotop, Whatman, Brentford, UK) at 55 °C. Unencapsulated TA was removed from the liposome suspensions by size exclusion chromatography (Sephadex G-50 fine, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Phospholipid concentrations were determined by the phosphorous assay according to Rouser et al.³⁴, and encapsulated TA was quantitated spectrofluorometrically after treatment of liposome suspensions with 1% (final concentration) Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) and derivatization with fluorescamine (Sigma-Aldrich)³⁵. Liposome size and polydispersity were measured by dynamic light scattering at a 90° angle using unimodal analysis (Zetasizer 3000, Malvern Instruments, Malvern, UK), and the phase transition temperature (T_m) of the formulation was determined by differential scanning calorimetry (MicroCal, Northampton, MA, USA). Liposomes were stored in the dark at 4 °C.

2.3. SAMPLE PREPARATION AND DERIVATIZATION

Blood was collected by venipuncture from healthy volunteers into Vacutainer tubes containing buffered sodium citrate, K₂EDTA, or Li/Na heparin. PPACK (25 μM final concentration) and aprotinin (200 KIU/ml) were added to inhibit clotting factors and serine proteases such as plasmin, respectively. The tubes were immediately centrifuged at 3500 x g for 10 min. at 25 °C to obtain platelet-poor plasma (PPP), which was isolated and stored in the dark at -20 °C until further use. Throughout this work, PPP was used instead of platelet-rich plasma, mostly for reasons of long-term stability.

PPP samples (typically 200 μl) were spiked with TA (where applicable) and I.S., and water was added to a final volume of 400 μl. For the recovery studies from blood, whole blood was spiked directly with TA at three concentration levels. A volumetric correction factor, which corrects TA concentrations for volumetric differences between PPP and whole blood, is given by

$$(V_P/V_{WB}) \quad (\text{Eq. 5.1})$$

where V_P is the plasma volume and V_{WB} is the volume of whole blood prior to centrifugation. The average plasma volume for adult males is approximately 52%³⁶, and this value was used in all recovery computations from whole blood.

All experiments were carried out independently; i.e., each assayed sample was individually derivatized prior to HPLC so as to attest the validity of the method in retrospect.

The spiked PPP samples were filtered through 3 kDa cut-off centrifuge filters (Millipore) at 14 000 x *g* and 25 °C until a sufficient volume of the filtrate was obtained (usually within < 20 min). Subsequently, 100 µl of standard solution (TA + I.S. in water) or filtered sample was added to 140 µl of 100 mM borate buffer (pH = 9.3), followed by 30 µl of CN⁻ (40 mM) and 30 µl of NDA (20 mM) to a total volume of 300 µl. The mixture was thoroughly vortexed. It is important to note that the order of reagent addition is crucial for minimizing the possibility of benzoin condensation reactions^{37,38}. The resulting solution was allowed to stand for 2 min. at room temperature (RT), after which the reaction was quenched by the addition of 50 µl of tryptophan (10 mM) to avoid slow side reactions of unused NDA/CN⁻. The samples were stored at 4 °C in the dark for a maximum of 24 h prior to HPLC.

2.4. HEAT-INDUCED TA RELEASE FROM LIPOSOMES

Active drug release from TA-encapsulating DPPC/DSPE-PEG liposomes was quantified following heat exposure at the T_m at predefined time intervals.

Prior to heat treatment the gel filtered suspensions were diluted 10× with PPP that had been kept at 4 °C. Following 5 min. equilibration at 4 °C, 160 µl of the diluted sample was suspended in 0.2 ml ultra-thin PCR tubes and incubated at 4 °C for 10 min. before thermally induced drug release, which was carried out in a thermal cycler (Biozym, Oldendorf, Germany). Samples were heated for 0.5, 1.5, and 3.0 min., after which they were immediately submersed in an ice bath. The samples were then centrifuged at 355 000 x *g* for 60 min. at 4 °C to pellet the liposomes. 50 µl of the supernatant was withdrawn, of which 20 µl was diluted five-fold with water, derivatized as described above for PPP samples, and assayed for TA concentration by HPLC.

2.5. INSTRUMENTATION AND HPLC-FL PROCEDURES

The HPLC system consisted of a master high pressure piston pump equipped with a manometer module, a second high pressure piston pump as slave, and an autoinjector (Models 305, 805s, 302, and 234, respectively, Gilson Medical Electronic, Villiers Le Bel, France), and polyetheretherketone (PEEK) connections with zero-dead volume.

The reversed phase separation was carried out on a C18 Atlantis column (particle size 3 μm , 2.1 mm \times 100 mm, Waters, Dublin, Ireland) in conjunction with an Alltech k852-00 C18 guard column (Keystone Scientific, Bellefonte, PA, USA). The column oven temperature (Model 7971, Jones Chromatography, Cardiff, UK) was maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$, and the sample injection volume was 5 μl . A binary gradient was used for elution; solvent A consisted of 20 mM acetic acid/acetate buffer (pH = 5.5) containing 1 % (v/v) acetonitrile, and solvent B was comprised of 20 mM acetic acid/acetate buffer (pH = 5.5) containing 90% (v/v) acetonitrile. The selected gradient was 30% of solvent B during the first 2 min., which increased linearly to 72% B in 21 min. and then to 100% B in 1 min. 100% of B was sustained during 3 min. for column cleaning. A programmed loop to initial conditions was carried out after 10 min. The mobile phase flow rate was kept at 0.2 ml min^{-1} .

NDA-derivatized compounds were analyzed post-column with a fluorescence detector (λ_{ex} = 440 nm, λ_{em} = 520 nm, Jasco FP-1520, Tokyo, Japan). Detector signal output was processed online with a PC and Chromeleon software (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The used equipment is shown in Figure 5.2.

Recoveries of TA from plasma samples were calculated by dividing the integrated peak area by the respective nominal TA concentration for calibration and PPP samples (F_{CAL} and F_{PPP} , respectively) and expressed as the quotient (in %) of these fractions

$$\frac{F_{PPP}}{F_{CAL}} \cdot 100\% \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Statistical analysis (two-tailed, homoscedastic Student's t-test) was performed where applicable as indicated in the text. P-values < 0.05 were considered significant.



Figure 5.2. HPLC-fluorescence equipment.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMISATION OF THE HPLC SEPARATION

After removal of high molecular weight compounds (> 3 kDa) by centrifuge filtration, plasma samples still contain relatively high levels of small peptides and monomeric amino acids that are also derivatized with NDA and could hence interfere with TA determination. Several HPLC parameters, such as pH, gradient profile, and column temperature were tested in order to achieve the best possible separation of TA from the plasma constituents within a minimum elution time. The optimisation experiments were carried out using a 10% (v/v) plasma solution, diluted with 100 mM borate buffer (pH = 9.3), spiked with TA (0.02 mM final concentration), and derivatized with NDA/CN⁻ (0.07 and 0.2 mM final concentrations, respectively).

Different linear gradients at different pH values were tested using a binary solvent system: solvent A, 1% (v/v) acetonitrile in 20 mM acetic acid/acetate buffer and solvent B, 90% (v/v) acetonitrile in 20 mM acetic acid/acetate buffer. At pH = 3, the carboxylic acid groups of TA, amino acids, and small peptides are predominantly protonated (neutral), which makes these molecules rather lipophilic after NDA labeling. Under these conditions, separation was not possible with any of the tested linear gradients. In contrast, when similar experiments were carried out at pH = 6.5, all derivatized components eluted early (as deprotonated anions) and no separation could be achieved either.

The effect of pH on the resolution was therefore investigated using the same solvents in a pH range of 3.5 - 6, with two different fixed gradient profiles (from 0% B to 100% B in 15 min. and in 30 min.). Adequate separation was achieved with both gradients in a pH range of 4.0 - 5.5, probably due to

differences in pK_a values between TA and plasma amino acids. It is well known that the pK_a of the carboxylic acid group in amino acids is significantly lower than that of an isolated alkyl-COOH such as in TA, and apparently the same holds for their NDA derivatives.

Figure 5.3 shows the separation of NDA-labeled TA in plasma; the derivatized plasma components give rise to major peaks at the beginning of the chromatogram. These are not observed when derivatizing water blanks (NDA itself is non-fluorescent). There is practically no interference at the longer elution times, i.e., in the vicinity of the NDA-TA peak. The best resolution from minor plasma peaks was obtained at pH = 5.5. The slower gradient provided better resolution between TA and plasma components, but the efficiency and symmetry of the peaks were worse and the analysis time longer. Thus, the steeper gradient at pH = 5.5 was selected for further experiments.

The influence of column temperature was also evaluated since changes in temperature could have an effect on retention, selectivity, and efficiency. Complete separation was achieved at 40 °C.

The gradient program was further optimised in order to shorten the analysis time. The best results were achieved when an initial isocratic step was ensued by a solvent gradient after 2 min. The optimised elution program was as follows: from 0 to 2 min. a constant 30% B followed by a linear gradient from 30% B to 72% B from 2 to 23 min. Under these optimum chromatographic conditions TA was well resolved from plasma interferences with a 12 min. elution time.

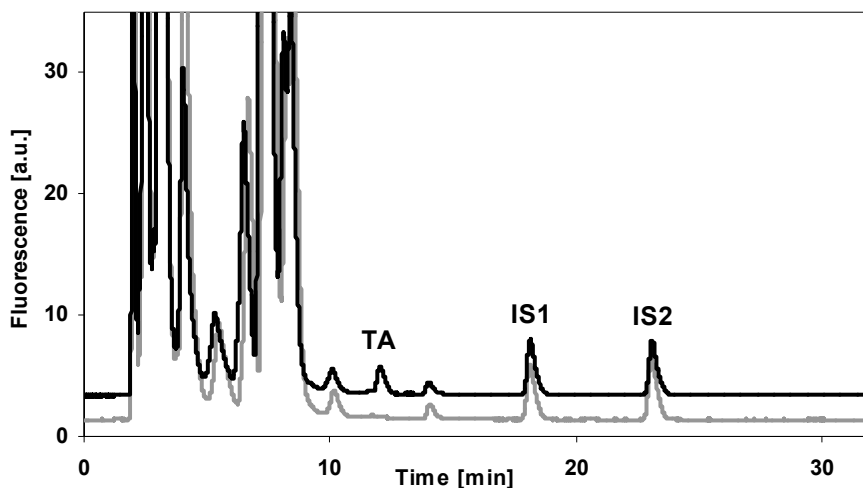


Figure 5.3. Chromatogram of platelet-poor plasma before (gray) and after (black) spiking with 10 μM TA, illustrating the separation at pH 5.5 of NDA-TA from the large excess of all major derivatized plasma components and different internal standards (I.S.1 = nPA; I.S.2 = CHA).

3.2. SELECTION OF AN INTERNAL STANDARD

For quality control purposes, several internal standards (I.S.) were tested. Five commercially available amino compounds were chosen as a model of primary amines for the reaction with NDA/CN⁻ and were evaluated as I.S., namely: *n*-propylamine (nPA), isopropylamine (iPA), *n*-dodecylamine (DA), cyclohexylamine (CHA), and L-DOPA.

Using the selected mobile phase, L-DOPA eluted too early (interference from plasma components) and DA eluted very late, prolonging the analysis time. The high volatility of iPA would affect the precision with which iPA could be added to the samples; the further use of this compound was therefore discontinued. nPA and CHA both eluted shortly after TA in a clean zone of the chromatogram (see Figure 5.3), and throughout most of the work both I.S.s were

used. However, later experiments showed poor recovery of CHA from plasma, presumably as a result of binding to large proteins (e.g., albumin) and consequent retention on the 3 kDa filter. For the more polar TA and the smaller nPA no such losses were observed; nPA was therefore selected as the most appropriate I.S.

3.3. OPTIMISATION OF THE LABELING REACTION

Different parameters were considered to optimise the derivatization reaction: pH, excess of reagents, and reaction time.

A 100 mM borate buffer (pH = 9.3) was selected as derivatization medium³², since the amino group should be electrically neutral for the nucleophilic addition reaction.

To ensure a rapid and complete reaction of TA and I.S. in PPP, an excess of NDA is desirable (especially when plasma components use up a large fraction of the available NDA), but overabundances must remain balanced insofar as side reactions may result in precipitation or the formation of interfering compounds. NDA concentrations in TA and I.S.-spiked plasma samples were therefore assayed from 0.2 to 2.3 mM with steps of 0.3 mM (final concentrations, with a proportional increase in the CN⁻ concentration from 0.6 to 6.9 mM) until no further increase of the peak heights was observed. Consequently, a 2 mM NDA concentration was selected.

The reaction of NDA with TA and I.S. proceeds very quickly (in < 2 min.), whereas the reaction of NDA with some of the plasma components is slower. Increases in plasma peaks were observed with increasing NDA concentrations

above 0.7 mM, while the TA and I.S. signals remained constant in the range 0.7-2.3 mM. These results were corroborated spectrofluorometrically (SPEX Fluorolog, HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA) in batch experiments during which fluorescence emission by NDA-conjugated TA, I.S., and diluted PPP was monitored as a function of time. In the case of TA and I.S. the maximum fluorescence yield was reached in less than 2 min (results not shown).

When excess concentrations NDA were used, slow precipitation of yellow crystals could be observed and the solutions would turn red after several hours. The favorable reaction kinetics of NDA towards TA and I.S.s were utilized to resolve these effects. By adding 50 μ l of 10 mM tryptophan to the reaction mixture after 2 min., the slow side reactions were quenched through the consumption of any remaining NDA by tryptophan and precipitation would not occur. The resulting major peak of labeled tryptophan eluted early with the other plasma components and did not interfere with TA determination. It should be noted that for standard TA solutions in buffer (in the absence of plasma components), the NDA/CN⁻ concentrations must be reduced by a factor 2 so as to prevent degradation of NDA reaction products in the presence of excess NDA.

In the above mentioned experiments, the concentration ratio between CN⁻ and NDA was 3. Once the concentration of NDA had been fixed, the ratio between CN⁻ and NDA was studied in the range 1-5. Although it has been reported before that the optimal ratio between CN⁻ and NDA is 10^{38,39}, we observed no significant differences in signal heights or areas when this ratio was ≥ 1.5 . A ratio [CN⁻]/[NDA] of 2 was therefore selected for further experiments. The use of fresh CN⁻ is recommended: older batches of NaCN or KCN were found to result in lower yields.

As a summary, all the optimum values are summarized in Table 3.1.

Table 5.2. Optimum values for the variables involved in the proposed method.

	Variable	Optimum value
Labeling reaction	Prepared plasma sample	100 μ l
	Borate buffer (pH = 9.3)	100 mM, 140 μ l
	CN ⁻	40 mM, 30 μ l
	NDA	20 mM, 30 μ l
	Tryptophan (after 2 min.)	10 mM, 50 μ l
	Storage	4 °C, in dark. Maximum 24 h
Chromatographic settings	Column	C18 3 μ m, 2.1 x 100 mm
	Column temperature	40 °C
	Injection volulmen	5 μ l
	Mobile phase composition	Solvent A: 20 mM acetate buffer pH = 5.5; water-acetonitrile (99:1, v/v) Solvent B: 20 mM acetate buffer pH = 5.5; water-acetonitrile (10:90, v/v)
	Mobile phase flow rate	0.2 ml min ⁻¹
	Gradient	30% B during 2 min. 30% to 72% B in 21 min. 72% to 100% B in 1 min. 100% B during 3 min.

3.4. CALIBRATION CURVE AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Under the optimum conditions described above, a calibration curve was established by assaying single injections of TA standard solutions (in water) at different concentrations (0.5, 1, 2.5, 5, 10, and 50 μ M). Linearity was confirmed using least square regression analysis, with the analytical signal (integrated

peak area) plotted as a function of TA concentration. In order to check the influence of both the centrifuge filtration protocol and the matrix effect when TA is analyzed in PPP samples, a calibration curve was established for plasma as well using the same TA concentrations. The obtained regression equations were:

$$y = 1.3926x - 0.2083 \quad (R^2 = 0.9997) \text{ for TA standard solution.} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

$$y = 1.4453x + 0.8487 \quad (R^2 = 0.9996) \text{ for TA plasma solution.} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

As can be observed, only a small difference (3.4%) exists between the slope coefficients, suggesting that there are neither substantial losses of analyte throughout the procedure nor matrix effects on detector sensitivity. These results substantiate the direct use of the external calibration curve for quantification purposes in plasma, and therefore no recovery corrections were applied to the TA measurements in recovery studies from blood and liposomes.

The method detection and quantification limits, calculated using an S/N ratio of 3 and 10 respectively, were 0.5 μM and 1.5 μM (Figure 5.4). Variations in the levels of minor plasma interferences, and not detector noise, determined the LD. It is therefore recommended that when low TA levels are expected, a blank blood sample should be collected from the patient or animal prior to TA treatment in order to establish the specific baseline.

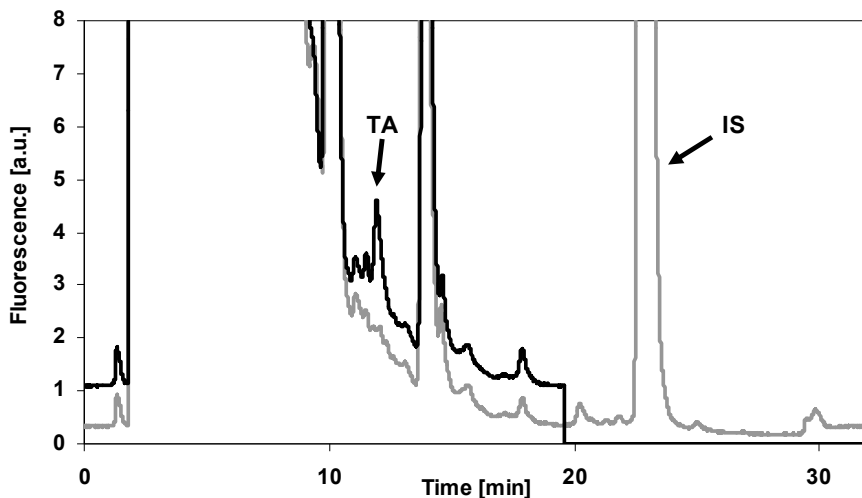


Figure 5.4. Chromatogram of platelet-poor plasma before (gray) and after (black) spiking with 0.5 μM TA and cyclohexylamine as internal standard (I.S.), illustrating the background from derivatized minor plasma components and the intensity of the NDA-TA peak at the limit of detection level.

3.5. STABILITY OF THE DERIVATIZED SAMPLES

In preliminary experiments we found that during long sequences the signal intensity of derivatized TA would slowly decrease after several hours, and that this effect was more pronounced for nPA and CHA.

The stability of the derivatized products was therefore examined more thoroughly. The labeling reaction of spiked plasma was carried out as described above at $\text{pH} = 9.3$ and quenched after 2 min. with tryptophan. Aliquots of the sample were transferred into several autoinjector vials and kept at RT or at 4 °C in the dark and analyzed at various time points up to 36 h. The resulting signal intensities are plotted in Figure 5.5. The stability plots clearly indicate that cooling helps to retard degradation, particularly with respect to NDA-I.S.

products, and that a cooled autosampler should be employed for long chromatographic sequences.

Due to the unavoidable instability of the derivatized nPA, it was decided not to divide the TA peak areas by those of nPA, as this would introduce unjustified error and inaccurately reflect actual TA concentrations. Nevertheless, the use of nPA as a control standard is warranted for assessing the validity of the method by means of logging the peak areas from continued experiments in Shewhart-type charts, which function to monitor experimental outcomes (i.e. fluctuations) over a longer period of time.

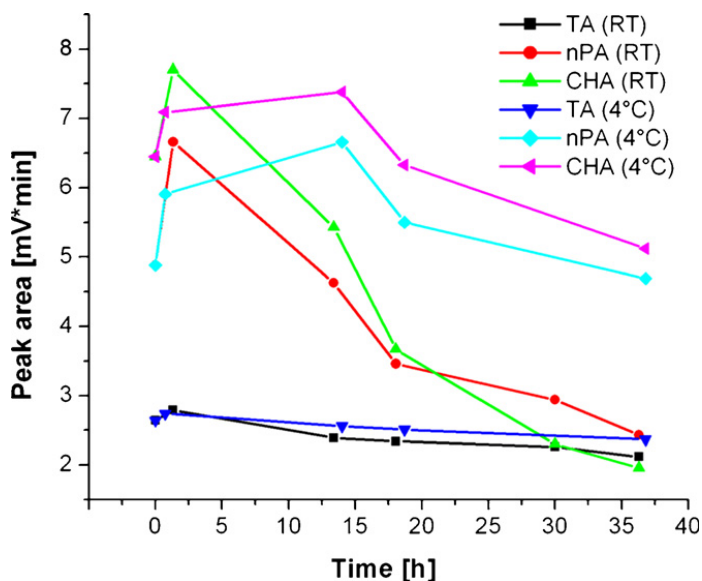


Figure 5.5. Stability curves of NDA-derivatized TA and two internal standards, n-propylamine (nPA) and cyclohexylamine (CHA), at room temperature (RT) and at 4 °C.

3.6. TA RECOVERY FROM WHOLE BLOOD

In order to evaluate the applicability of the proposed method in the context of whole blood, citrate-, EDTA-, and heparin-anticoagulated blood samples were spiked with TA at different concentration levels (10, 30 and 80 μM) and independently assayed in triplicate. The blood samples were treated in accordance with the protocol described above, with the exception of a two-fold dilution step for the 80 μM TA samples so as to stay well within the detection range. The final TA concentrations were corrected for a reduction in volume following centrifugation (see section 2.3). This correction factor must be taken into account when comparing TA levels in blood and in PPP.

The obtained recoveries \pm SD are depicted in Figure 5.6. Statistical analysis showed that no significant differences exist between the mean recoveries of citrate- vs. EDTA- vs. heparin-anticoagulated blood samples (when mean recoveries per anticoagulant group are averaged over the respective TA concentrations), suggesting that the validity of the method is not influenced by the type of anticoagulant used during blood collection. However, when comparing the mean recoveries per TA concentration (i.e. disregarding the type of anticoagulant used), an increasing trend in mean recoveries was found with higher TA spiking levels (72.8 \pm 10.2% for 10 μM , 79.4 \pm 6.9% for 30 μM , and 89.9 \pm 9.4% for 80 μM). The difference in mean recoveries between the 10 and 80 μM as well as the 30 and 80 μM TA concentrations was statistically significant ($P = 0.005$ and 0.016 , respectively). Since this effect was not present during the plasma recovery measurements (section 3.4) it can not be due to the membrane filtration process. Therefore these results imply that part of the TA molecules must be lost during the centrifugation of TA-spiked whole blood samples. The data indicate a constant loss, but the effect is relatively more

pronounced for lower TA concentrations. The exact reason is currently unknown and will be investigated in future experiments.

The reproducibility of the whole blood assays was evaluated by comparing the results obtained for different TA spiked levels on different days. The relative standard deviations (calculated from peak areas) were 9 - 13 % ($n = 9$ per concentration, measured on three different days with different calibration curves). The mean \pm SD elution time was 11.87 ± 0.10 min ($n = 88$).

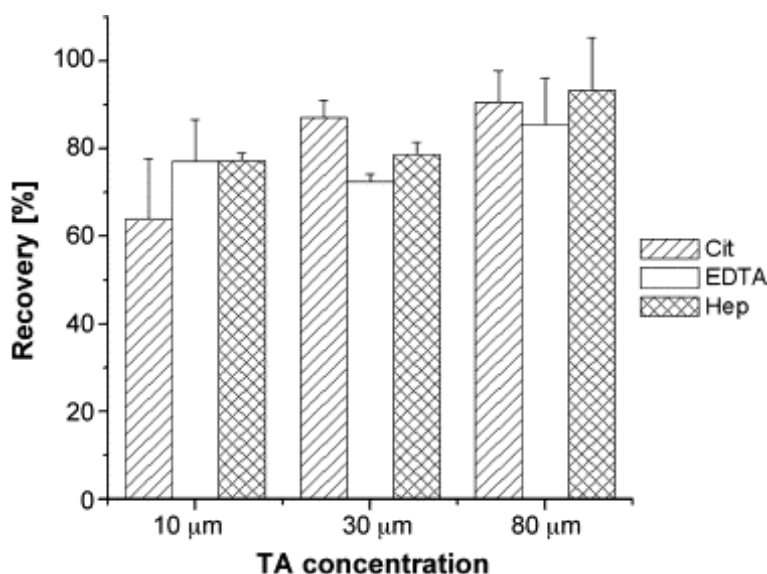


Figure 5.6. Recoveries of different concentrations of TA from whole blood anticoagulated with citrate (Cit, striped), EDTA (blank), or heparin (Hep, checkered). Recoveries were calculated by dividing the integrated peak area by the respective nominal TA concentration for calibration and whole blood samples (F_{CAL} and F_{WB} , respectively) and expressed as the quotient (in %) \pm SD of these fractions: $(F_{\text{WB}}/F_{\text{CAL}}) \times 100\%$. Data from three independent experiments per group per concentration, total of 27 independent measurements.

3.7. HEAT-INDUCED TA RELEASE FROM LIPOSOMES

Sterically stabilized thermosensitive DPPC/DSPE-PEG liposomes with a mean TA:lipid ratio of 0.91, a mean \pm SD external diameter of 153 ± 2 nm at a polydispersity index of 0.083, and a T_m of 43.3 °C were heated at the T_m for 0, 0.5, 1.5, and 3 min. and assayed for TA release as described in section 2.4. Hyperthermia has been employed for numerous liposomal formulations in vitro and in vivo⁴⁰⁻⁴⁸ to initiate a thermotropic alteration in membrane permeability that will lead to triggered release of the loaded molecules. Phospholipids undergoing a phase transition from the relatively ordered gel phase to the relatively disordered liquid-crystalline phase will introduce packing order defects in the lipid bilayer (i.e., liposomal membrane) which makes it easier for small hydrophilic or amphipathic molecules to transgress the highly hydrophobic bilayer core⁴⁹⁻⁵¹. Thus, upon heating of a drug-containing liposomal formulation to the T_m , the release of encapsulated drug should progress in a sigmoidal-type fashion, with the first phase being the result of thermal diffusion, followed by steep release at T_m , and finally an asymptotic phase in which the system gradually moves towards equilibrium (i.e., equal distribution of the drug inside and outside the liposomes).

In agreement with expectations, Figure 5.7 displays a sigmoidal-type progression of the release curve as a function of time. The release capacity of the system, i.e., the maximum number of molecules released from a liposomal formulation, appears to be reached within ~ 3 min. A Student's t-test confirmed that all data points are statistically different from each other ($P < 0.04$). These results demonstrate that the method is also suitable for the determination of liposomal TA in whole blood samples.

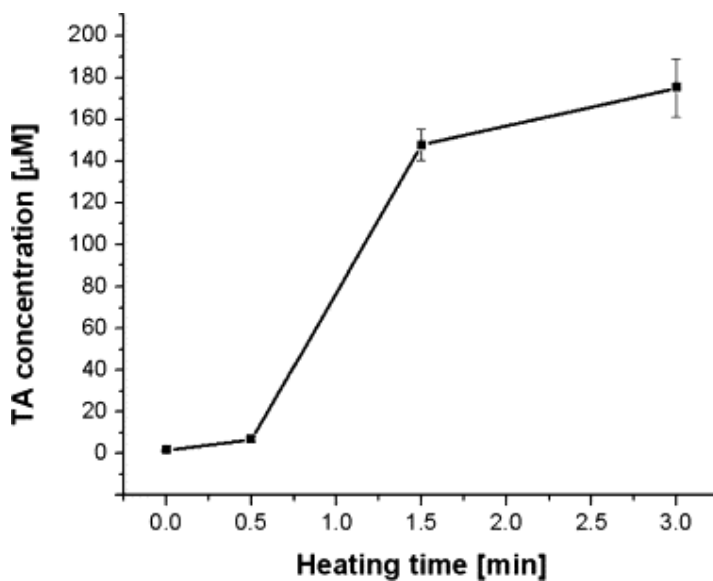


Figure 5.7. Heat-induced TA release from thermosensitive DPPC/DSPE-PEG liposomes (96:4 molar ratio). Liposomes were added to platelet-poor plasma and heated to their phase transition temperature (43.3°C). TA release was quantified by HPLC-fluorescence (based on integrated peak area) as a function of heating time (n = 3).

4. CONCLUSIONS

A novel RP-HPLC method with fluorescence detection was developed for the quantification of TA in blood and PPP samples. In an attempt to eliminate potential chromatographic interferences from plasma components, a rapid and easy centrifuge filtration step was introduced in addition to optimising the HPLC separation (eluent pH, gradient, and column temperature).

The derivatization reaction was optimised for maximum yield (pH, excess of reagents, and reaction time); the addition of tryptophan after 2 min. to quench the derivatization reaction helped to stabilize the sample.

Several internal standards were explored for quality control purposes. Ultimately, nPA was found to be most appropriate. Moreover, the samples proved to be stable for 24 h when stored at 4 °C in the dark. For large RP-HPLC sequences a cooled autosampler is required to maximize sample stability.

The proposed method is affordable, reliable, simple, and fast. One of the major advantages of the method is that TA can be determined in whole blood and PPP samples at concentrations not reported before using similar techniques.

The method was reproducible (RSD < 12% for whole blood samples) and linear in the range tested ($R^2 = 0.9996$ for PPP samples). Moreover, the results were independent of the type of anticoagulant used during blood collection.

An LD of 0.5 μM was obtained. Because the LD is determined by plasma interferences, it is recommended to establish a plasma baseline for every subject prior to assaying TA samples at near-threshold concentrations.

Lastly, it was shown that the method is suitable for in vitro and potentially in vivo experiments with TA-encapsulating drug delivery systems. In the near future we intend to use this method to develop a TA-based, site-specific pharmaco-laser therapy for the treatment of port wine stains and possibly other vascular anomalies.

5. REFERENCES

1. A. Takada, H. Ohashi, H. Matsuda, Y. Takada, *Thromb. Res.* 14 (1979) 15.
2. S.A. Cederholm-Williams, A. Swain, *Thromb. Res.* 16 (1979) 705.
3. M. Verstraete, *Drugs* 29 (1985) 236.
4. D. Ogston, *Blood Rev.* 3 (1989) 1.
5. P.M. Mannucci, *N. Eng. J. Med.* 339 (1998) 245.
6. P.M. Mannucci, *N. Eng. J. Med.* 351 (2004) 683.
7. J. Pereira, T. Phan, *Oncologist* 9 (2004) 561.
8. M. Hoylaerts, H.R. Lijnen, D. Collen, *Biochim. Biophys. Acta* 673 (1981) 75.
9. L. Medved, W. Nieuwenhuizen, *Thromb. Haemost.* 89 (2003) 409.
10. M. Heger, J.F. Beek, N.I. Moldovan, C.M.A.M. van der Horst, M.J.C. van Gemert, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 242.
11. M. Abrahamsson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 4 (1986) 399.
12. K. Sato, Y. Tobita, K. Iwabuchi, S. Tanaka, *Anal. Sci.* 13 Suppl. (1997) 471.
13. P.M. Elworthy, S.A. Tsementzis, D. Westhead, E.R. Hitchcock, *J. Chromatogr.* 343 (1985) 109.
14. Q. Chang, O.Q.P. Yin, M.S.S. Chow, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 275.
15. G. Iskender, *S. Atmaca, Pharmazie* 43 (1988) 290.
16. A. Raza, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2217.
17. E. Puigdel·l·ivol, M.E. Carral, J. Moreno, J.M. Plà-Delfina, F. Jané, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 23 (1985) 298.
18. K. Matsubayashi, C. Kojima, H. Tachizawa, *J. Chromatogr.* 433 (1988) 225.
19. M.Y. Kuhawar, F.M.A. Rind, *Chromatographia* 53 (2001) 709.
20. F.M. Li, H.S. Kou, S.M. Wu, S.H. Chen, A.L. Kwan, H.L. Wu, *Electrophoresis* 26 (2005) 621.
21. O. Eriksson, H. Kjellmann, A. Pilbrant, M. Schannong, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7 (1974) 375.
22. J. Vessman, S. Strömberg, *Anal. Chem.* 49 (1977) 369.

23. B.K. Fiechtner, G.A. Nuttall, M.E. Johnson, Y. Dong, N. Sujirattanawimol, W.C. Oliver, R.S. Sarpal, L.J. Oyen, M.H. Ereth, *Anesth. Analg.* 92 (2001) 1131.
24. Y. Takada, A. Takada, U. Okamoto, *Keio J. Med.* 13 (1964) 115.
25. T.M. Ansari, A. Raza, A. Rehman, *Anal. Sci.* 21 (2005) 1133.
26. C. Lacroix, P. Levert, G. Laine, J.P. Goulle, *J. Chromatogr.* 309 (1984) 183.
27. A.M. Wahbi, E.A. Lofti, H.Y. Aboul-Enein, *Talanta* 31 (1984) 77.
28. M.S. Rizk, S.S. Toubar, M.A. Sultan, S.H. Assaad, *Microchim. Acta* 143 (2003) 281.
29. H. Miyazaki, M. Ishibashi, G. Idzu, T. Izawa, *Chem. Pharm. Bull.* 23 (1975) 1806.
30. J. Crommen, *Acta Pharm. Suec.* 16 (1979) 111.
31. T.R. Keucher, E. B. Solow, J. Metaxas, R.L. Campbell, *Clin. Chem.* 22 (1976) 806.
32. P. de Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L.A. Sternson, T. Higuchi, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1096.
33. C.R. McCurdy, B. Le Bourdonnec, T.G. Metzger, R. El Kouhen, Y. Zhang, P.Y. Law, P.S. Portoghese, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2887.
34. G. Rouser, S. Fleischer, A. Yamamoto, *Lipids* 5 (1970) 494.
35. S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* 178 (1972) 871.
36. M.A. Lightman, E. Beutler, T.J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky and J.T. Prchal, *Williams Hematology*, McGraw-Hill (2006).
37. M.C. Roach, M.D. Harmony, *Anal. Chem.* 59 (1987) 411.
38. L.Y. Zhang, M.X. Sun, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 133.
39. F. Robert, L. Bert, L. Denoroy, B. Renaud, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1838.
40. G.R. Anyarambhatla, D. Needham, *J. Liposome Res.* 9 (1999) 491.
41. D. Needham, M.W. Dewhirst, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 285.

42. M.H. Gaber, K. Hong, S.K. Huang, D. Papahadjopoulos, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1407.
43. J.B. Bassett, R.U. Anderson, J.R. Tacker, *J. Urol.* 135 (1986) 612.
44. K. Maruyama, S. Unezaki, N. Takahashi, M. Iwatsuru, *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993) 209.
45. J.L. Merlin, *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 1031.
46. J.N. Weinstein, R.L. Magin, R.L. Cysyk, D.S. Zaharko, *Cancer Res.* 40 (1980) 1388.
47. M.H. Gaber, N.Z. Wu, K.L. Hong, S.K. Huang, M.W. Dewhirst, D. Papahadjopoulos, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36 (1996) 1177.
48. G. Kong, M.W. Dewhirst, *Int. J. Hyperthermia* 15 (1999) 345.
49. D. Marsh, *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991) 109.
50. J.F. Nagle, H.L. Scott, *Biochim. Biophys. Acta* 513 (1978) 236.
51. S. Doniach, *J. Chem. Phys.* 68 (1978) 4912.

CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo de investigación descrito en la presente Memoria, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La reacción quimioluminiscente (CL) del luminol se ha propuesto por primera vez para la determinación de un plaguicida perteneciente a la familia de los N-metilcarbamatos, el carbaril. Este sistema quimioluminiscente luminol-KMnO₄ en medio básico, acoplado a un montaje de análisis por inyección en flujo (FIA), es un modo de detección sencillo, rápido y barato, además de sensible, alternativo para el análisis de residuos de carbaril en muestras ambientales y de alimentos vegetales. El método implica una etapa de extracción y limpieza de la matriz, previa en el caso de muestras vegetales. En el caso de muestras de agua, no se requiere pre-tratamiento alguno.
2. Los resultados presentados en el capítulo 2 demuestran que el acoplamiento de la reacción CL luminol-KMnO₄ con FIA es adecuado para la determinación de residuos de carbofurano a niveles traza en muestras ambientales y de alimentos vegetales, siendo una alternativa sensible, rápida y barata. El método propuesto ofrece varias ventajas derivadas del uso tanto del FIA (consumo bajo de reactivos, análisis rápidos y posibilidad de automatización) como de la detección CL (alta sensibilidad, amplio rango dinámico lineal e instrumentación simple). El método propuesto, implica una etapa de extracción y limpieza de la muestra en muestra vegetales. En el caso de muestras de agua, no se requiere pre-tratamiento alguno. Sin embargo, en el caso de agua de grifo para consumo humano, el límite máximo de residuo (MRL) permitido por la legislación es 0.1 µg l⁻¹, por tanto, una etapa previa de pre-concentración sería necesaria. El método muestra buenas recuperaciones de acuerdo con las directrices actuales.

3. Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de N-metilcarbamatos en muestras ambientales usando cromatografía líquida con detección quimioluminiscente (HPLC-CL). El método permite la resolución de tres carbamatos (carbaril, carbofurano y metiocarb) en menos de 14 minutos, aprovechando que estos compuestos exaltan enormemente la emisión que se obtiene cuando el luminol es oxidado con permanganato en medio básico. Se necesita una selección adecuada de la configuración post-columna, así como una optimización de las variables químicas e instrumentales implicadas en la separación cromatográfica y en la detección quimioluminiscente, que deben ser lo más compatibles posible para obtener una resolución adecuada y una alta sensibilidad. Comparado con otras metodologías en las que se usa detección fluorescente o quimioluminiscente, el método es muy simple porque no se requiere derivatización de los analitos. Mediante la optimización y uso de una etapa de extracción en fase sólida (SPE) y limpieza de la matriz de la muestra, el método puede ser aplicado satisfactoriamente a la determinación de carbamatos en muestras de diferentes tipos de aguas y vegetales, mostrando recuperaciones adecuadas de acuerdo con las directrices actuales.

4. Los resultados presentados en el capítulo 4 de la presente Memoria, demuestran que la cromatografía micelar electrocinética capilar (MECK) es una metodología muy eficiente en la determinación simultánea del herbicida metribuzin y de sus principales productos de degradación (desaminometribuzin, dicetometribuzin y desaminodicetometribuzin) a niveles traza en muestras de suelo, siendo una alternativa sencilla y rápida a la determinación con HPLC. El método implica una etapa previa de extracción y limpieza de la matriz usando SPE. Esta etapa además, ofrece un considerable aumento de la sensibilidad, corrigiendo una de las principales limitaciones que tienen las técnicas electroforéticas. Los satisfactorios límites de detección obtenidos, se deben

fundamentalmente a las excelentes propiedades de adsorción que presenta el material sorbente Lichrolut EN, usado para el procedimiento de SPE. La simplicidad del método propuesto, hace que este sea adecuado para el análisis de rutina de estos analitos en muestras de suelo, mostrando recuperaciones satisfactorias en las muestras analizadas.

5. Se ha desarrollado un nuevo método de HPLC con detección fluorescente para la cuantificación de ácido tranexámico (TA) en sangre y plasma. Para eliminar posibles interferentes procedentes del plasma, además de optimizar las variables que afectan a la separación cromatográfica (pH de la fase móvil, gradiente y temperatura de la columna), se introdujo una etapa rápida y sencilla de filtración con filtros de centrifuga. Considerando que el TA no presenta fluorescencia nativa, es necesario llevar a cabo previamente una reacción de formación de un derivado fluorescente usando naftaleno-2-3-dicarboxaldehído (NDA). La reacción de derivatización se optimizó con objeto de conseguir el máximo rendimiento (pH, exceso de reactivos y tiempo de reacción). La adición de triptofano transcurridos 2 minutos, inhibe la reacción de derivatización ayudando a estabilizar la muestra. Se probaron varios patrones internos para el control de calidad, seleccionándose la n-propil-amina (nPA) como el más apropiado. Además, se comprobó que las muestras son estables durante 24 horas cuando se guardan en la oscuridad a 4°C, siendo por tanto necesario un automuestreador refrigerado para maximizar la estabilidad de la muestra, cuando se pretende trabajar con secuencias largas. El método propuesto es preciso, asequible, sencillo y rápido. Una de sus principales ventajas es que el TA puede ser determinado en sangre y plasma a concentraciones no publicadas hasta el momento usando técnicas similares. El método es reproducible (RSD 12% para muestras de sangre) y lineal en el rango estudiado ($R^2=0.9996$ para muestras de plasma). Además, los resultados fueron independientes del tipo de anticoagulante usado durante la toma de sangre. Se obtuvo un límite de

detección (LD) de 0.5 μM . Debido a que el LD depende de interferentes procedentes del plasma, es recomendable establecer una línea base inyectando plasma para cada sujeto antes del análisis de muestras conteniendo TA a bajas concentraciones. Por último, se demuestra, que el método es adecuado para experimentos *in vitro* y potencialmente *in vivo* con sistemas de liberación controlada de fármacos, encapsulando TA en liposomas, siendo por tanto posible usar este método durante el proceso de desarrollo de una farmacoterapia láser de sitio específico, basada en el TA, para el tratamiento de manchas de vino de Oporto y otras posible anomalías vasculares.

PUBLICATIONS

ARTICLES

- Sensitive determination of carbaryl in vegetal food and natural waters by flow injection analysis based on the luminol chemiluminescence reaction.
J. F. Huertas-Pérez, A. M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, M. del Olmo Iruela.
Analytica Chimica Acta, 524 (2004) 161-166.

- Potential of the luminol reaction in the sensitive detection of pesticide residues by flow injection analysis.
J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, A. González-Casado, L. Gámiz-Gracia.
Luminescence, 19 (2004) 222-224.

- Chemiluminescence determination of carbofuran at trace levels in food and waters by flow injection analysis.
J. F. Huertas Pérez, L. Gámiz Gracia, A. González Casado, A. M. García-Campaña, J.L. Martínez Vidal.
Talanta, 65 (2005) 980-985.

- Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in liquid phase. A review.
L. Gámiz Gracia, A. M. García Campaña, J.J. Soto Chinchilla, J. F. Huertas Pérez y A. González Casado.
Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 927-942.

- Establishment of signal recovery functions for the calculation of the recovery factor. Application to contaminant residue monitoring in vegetables by chemiluminescence detection.

L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, A.M. García-Campaña.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 384 (2006) 295-301.

- Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography.
J.F. Huertas-Pérez, M. del Olmo Iruela, A.M. García-Campaña, A. González-Casado, A. Sánchez-Navarro.
Journal of Chromatography A, 1102 (2006) 280-286.
- Simple, rapid, and sensitive liquid-chromatography-fluorescence method for the quantification of tranexamic acid in blood.
J.F. Huertas-Pérez, M. Heger, H. Dekker, H. Krabbe, J. Lankelma, F. Ariese.
Journal of Chromatography A, 1157 (2007) 142-150.
- Determination of N-methylcarbamate pesticides in water and vegetable samples by HPLC with post-column chemiluminescence detection using the luminol reaction.
J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña
Analytica Chimica Acta, (submitted for publication).

BOOK CHAPTERS

- Analysis of pesticides by Chemiluminescence detection, in Handbook of pesticides: Methods of pesticide residues analysis, L.M.L. Nollet & Hamir Rathore (Eds). Taylor and Francis (submitted for publication).
L. Gámiz-Gracia, J.F. Huertas-Pérez, J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña.