

t 6/30

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 12-6-2002
ENTRADA NUM. 2035

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
3 / JUN. 2002
COMISION DE DOCTORADO

**NUEVOS MÉTODOS DE FOSFORESCENCIA EN FASE SÓLIDA A
TEMPERATURA AMBIENTE PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS**

TESIS DOCTORAL

OSAMA MOUSA AL-BARBARAWI

GRANADA, 2002

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613584741
Nº Copia 15602436

RESEARCH & DEVELOPMENT
1970-1971

**NUEVOS MÉTODOS DE FOSFORESCENCIA EN FASE SÓLIDA A
TEMPERATURA AMBIENTE PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS**

Por

OSAMA MOUSA AL-BARBARAWI

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a de de 2002



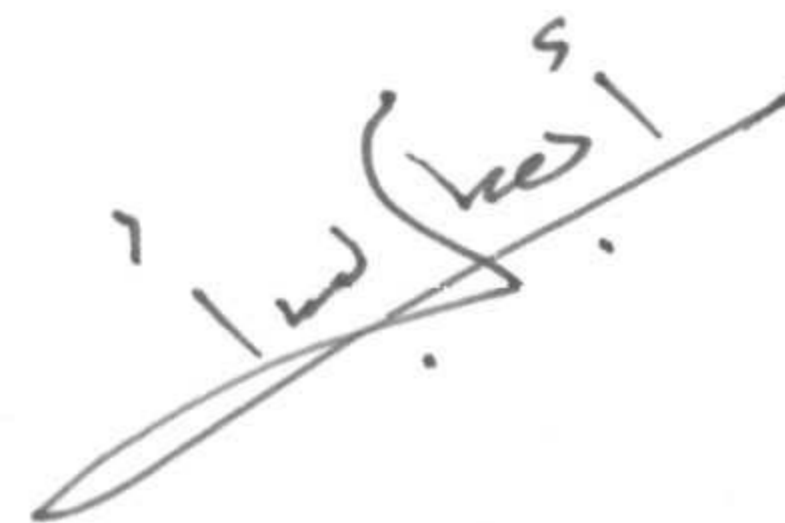
Firmado:
Prof. Dr. D. **Luis Fermín Capitán Vallvey**, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada

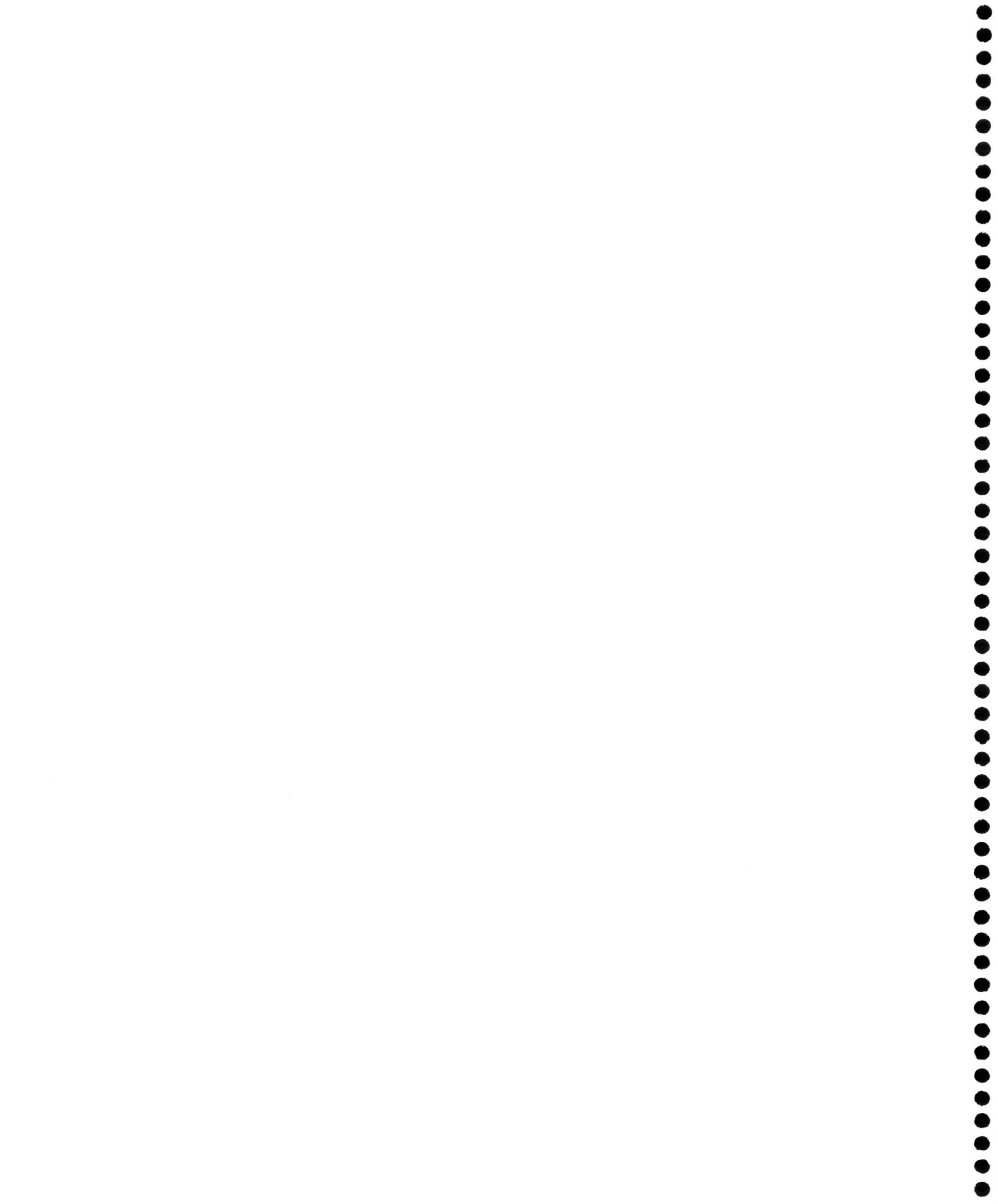
Prof. Dr. D. **Ramiro Avidad Castañeda**, Profesor Titular del mismo Departamento



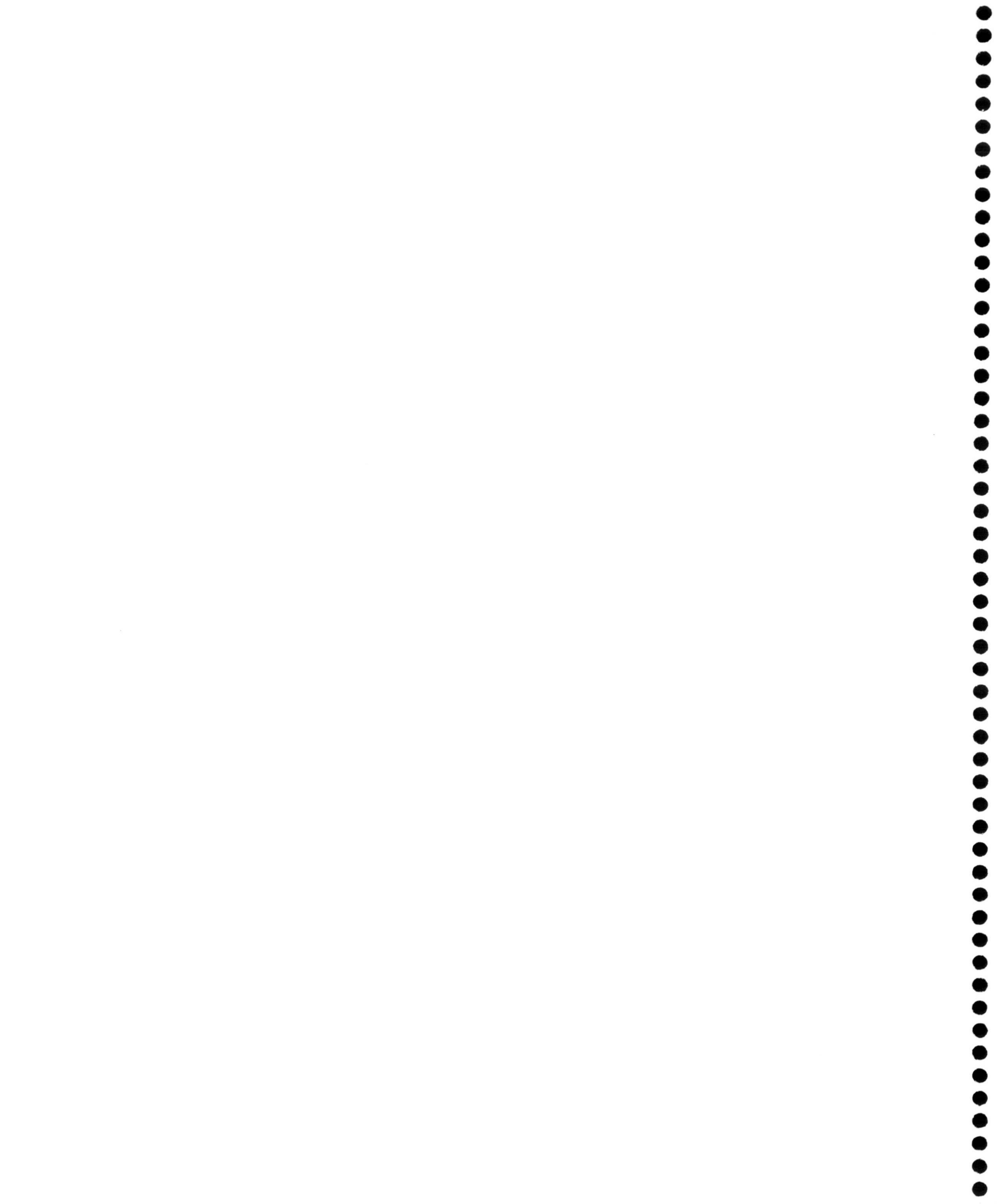
MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.
Granada, de de 2002.

Fdo.-
Osama M. Al-Barbarawi
Licenciado en Ciencias Químicas.





DEDICATORIA



A mis padres, luz de mis ojos y de mi corazón, a los que debo toda mi vida. Espero y deseo que Dios me de la fuerza necesaria para cumplir mi deber hacia ellos.

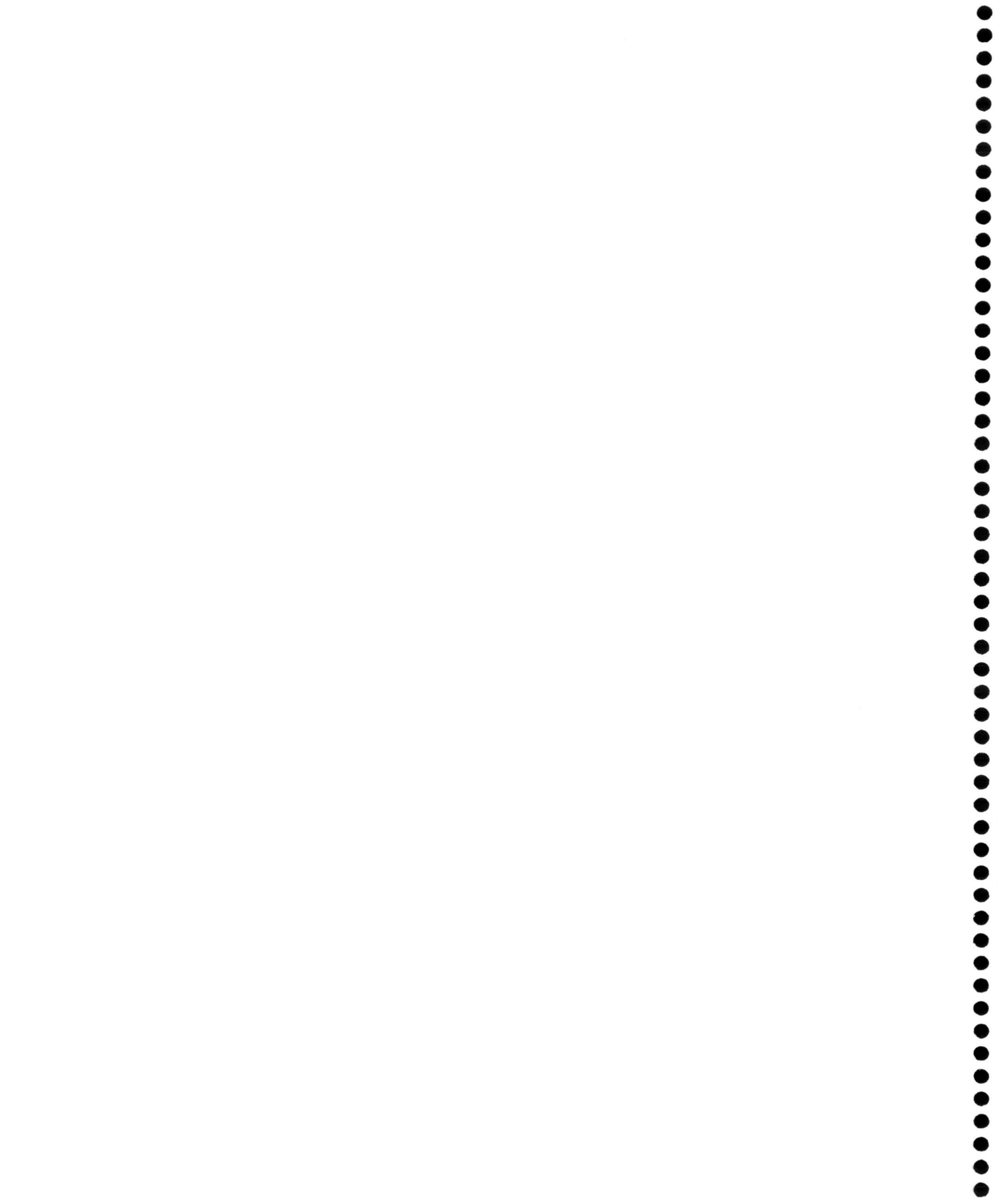
A mis hermanas, a las que les deseo que Dios les conceda una agradable vida y haga realidad sus sueños.

A mi tía Amal que siempre me ha apoyado, y con también he compartido muchos momentos difíciles y dulces lejos de nuestra tierra y nuestra familia y a quién le deseo que el próximo año presente su Tesis Doctoral en Psicología.

A mi tío Mahmoud, que me abrió las puertas de España y me apoyó constantemente en mi primer año.

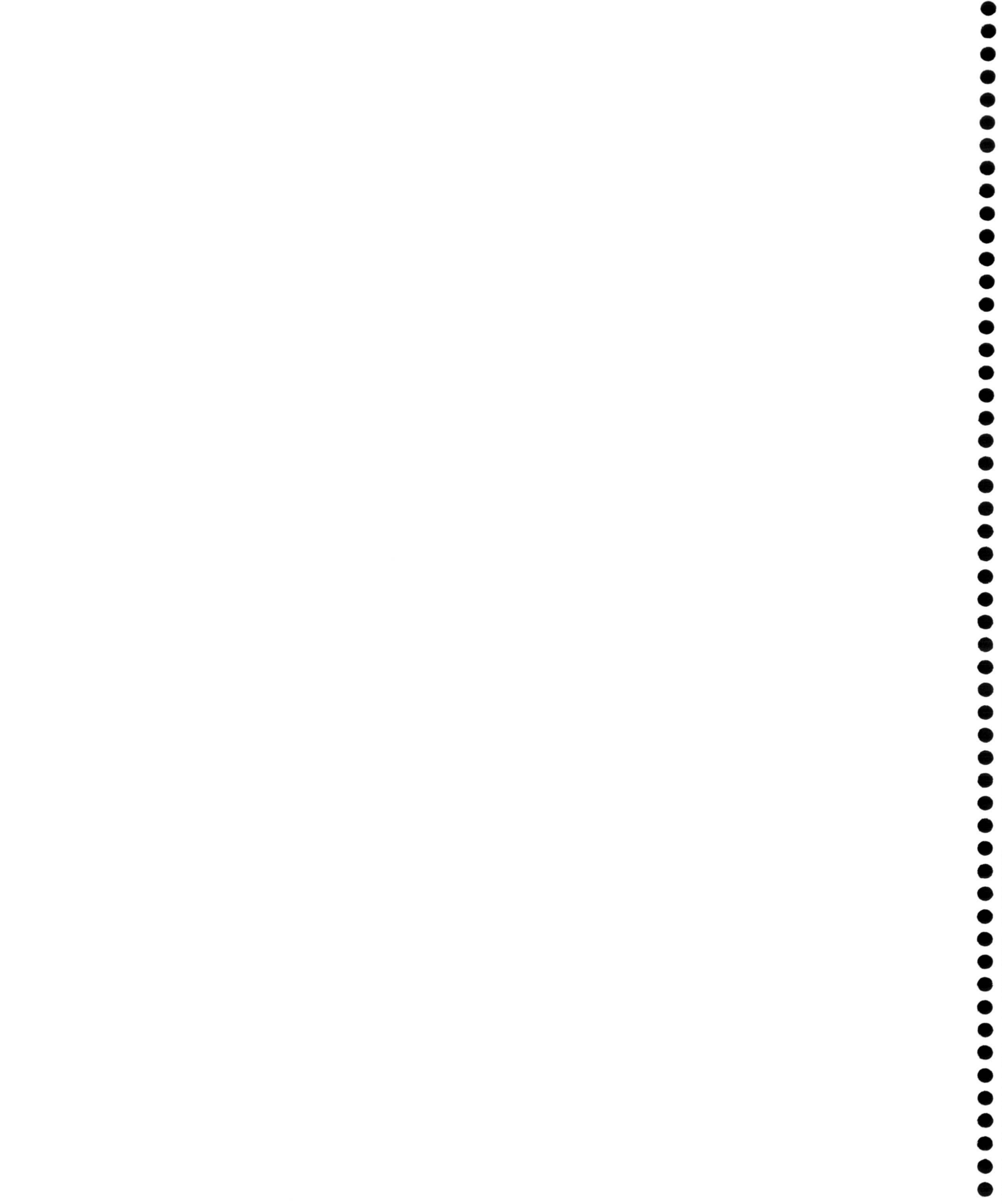
A mi tierra, Palestina.

A mi segunda casa, Granada y a toda España.

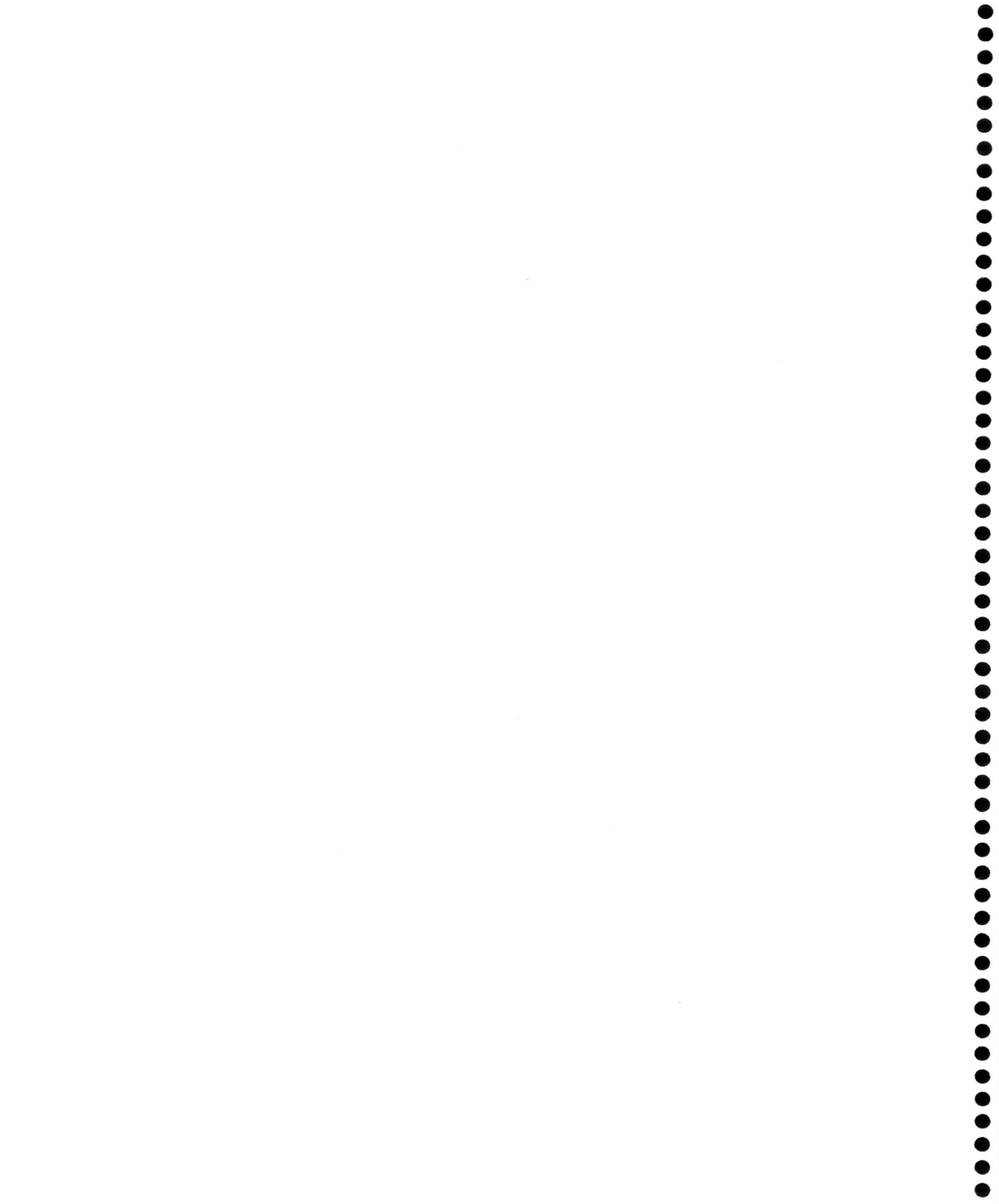


Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento a los Profesores Dr. D. L. F. Capitán Vallvey y Dr. D. Ramiro Avidad Castañeda por su dirección, apoyo, estrecha colaboración y asesoramiento constantes, gracias a los cuales ha sido posible la realización de la investigación recogida en esta Memoria. Asimismo, quiero agradecer su hospitalidad y disponibilidad para poner a mi disposición su amplia experiencia y conocimientos. Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por su acogida y hospitalidad. A todos mis compañeros y amigos del Departamento y de fuera de él, con los que compartí muchos de mis malos y buenos momentos.

Mi agradecimiento también al Profesor Dr. D. Victoriano Ramírez González, Catedrático de Matemáticas Aplicadas de esta Universidad de Granada, por su colaboración en el desarrollo del nuevo método de calibración presentado en esta Memoria.



OBJETIVOS DE LA TESIS



En el planteamiento general de trabajo del Grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, uno de los objetivos principales es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que sean sencillas y que permitan abordar problemas analíticos reales, *in situ* y en el menor tiempo posible. Por ello, en la presente Memoria, continuando con este objetivo general, nos hemos propuesto desarrollar una metodología analítica basada en el uso de sensores fosforescentes en fase sólida a temperatura ambiente, como medio para la determinación de especies químicas utilizadas como fármacos, tanto en Medicina como en Veterinaria, que puedan estar presentes en fluidos biológicos. Por todo ello, los objetivos concretos de esta Memoria de Tesis son los siguientes:

1. Desarrollo de sensores, de los denominados de gota plana por tratarse de tiras de un material inerte y transparente, sobre el que se depositan gotas de la mezcla de componentes que constituyen la zona sensora. Esta zona deberá contener los componentes adecuados para que se fijen en ella los respectivos analitos y se produzca el proceso fosforescente.
 2. Desarrollo de la metodología analítica adecuada para la aplicación de estos sensores en la determinación de especies de interés práctico, presentes en muestras de diversa índole y procedencia.
 3. Desarrollo de sensores de un solo uso, transparentes a la radiación para que se pueda medir en ellos la fosforescencia transmitida, con una señal de fondo lo más débil posible y que, a la vez, sean capaces de preconcentrar los analitos presentes en la muestra en concentraciones traza o ultratrazas.
-

-
4. Conseguir que dicha metodología analítica presente como características más destacables las siguientes: sencillez en su aplicación a la resolución del problema analítico, posibilidad de que sea utilizado por personas sin preparación analítica, bajo costo por análisis y rapidez de respuesta, además de aquellas características que deben acompañar a todo método analítico como son exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, robustez, etc.
 5. Aplicación de esta metodología a la determinación de fármacos de interés, potencialmente presentes en fluidos biológicos –sangre, orina, etc.- procedentes de personas o animales domésticos.
 6. Desarrollar una nueva metodología para la calibración utilizando superficies de calibrado.
-

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

- I. Resumen histórico de la síntesis y propiedades de las quinolonas que se estudian en esta Memoria.
 - II. Análisis de quinolonas.
 - Métodos clásicos.
 - Métodos espectrofotométricos.
 - Métodos espectrofluorimétricos.
 - Métodos con separaciones cromatográficas.
 - III. Espectrofosforimetría.
 - Los fenómenos fotoluminiscentes.
 - IV Bibliografía.
-

Introducción

Los seres vivos están formados por una serie de compuestos químicos, que son sus componentes estructurales, y necesitan de otra serie de compuestos, principalmente orgánicos, que constituyen el aporte plástico y energético necesario para que el ser vivo desarrolle sus funciones vitales. En determinados ocasiones, además de este aporte plástico y energético el organismo vivo necesita asimilar una serie de sustancias que regulan sus actividades funcionales a la vez que permiten la prevención y tratamiento de sus enfermedades. Nos estamos refiriendo a los compuestos denominados fármacos cuyo estudio, así como el de los efectos que producen en su interacción con los seres vivos, es el objeto principal de la farmacología.

La historia de la farmacología es tan antigua como la propia historia del hombre. Los pueblos primitivos, e incluso algunas tribus y pueblos actuales aislados de la llamada civilización occidental, utilizaban y utilizan, diferentes fármacos sin elaborar extraídos de otros seres vivos, principalmente plantas, aplicándolos con fines curativos. Por lo tanto, podemos decir que, de forma totalmente empírica, desde muy antiguo se ha establecido una relación entre el fármaco aplicado y la enfermedad que se pretende curar y que la diferencia fundamental entre esta farmacología primitiva y la actual farmacología radica en que esta última, pretende conocer más científicamente el modo de actuar de los distintos fármacos obtenidos tanto si son de procedencia natural como artificial.

Históricamente podemos decir que la farmacología moderna comienza con los estudios de Françoise Magendie, Ostwald Schmiedeberg y Claud Bernard, en la primera mitad del siglo XIX, que sirvieron de base para establecer los fundamentos de la moderna farmacología experimental.

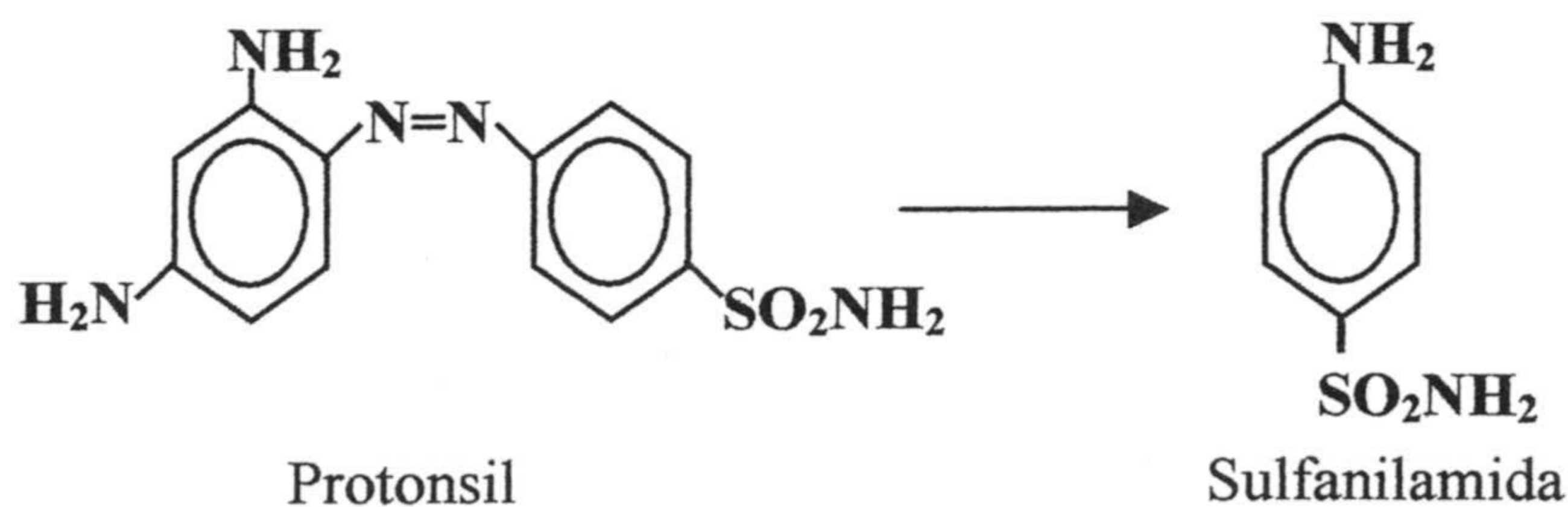
Como hemos indicado anteriormente desde la antigüedad y hasta principios del siglo XX, los únicos fármacos utilizados por el hombre, especialmente los de naturaleza orgánica, eran de origen natural y se obtenían por extracción de los principios activos a partir de los seres vivos, si que posteriormente se llevara a cabo ningún tipo de elaboración. Sin embargo, en la actualidad podemos decir que son mucho más numerosos los fármacos de origen sintético que los de origen natural y que esta gran proliferación de compuestos químicos utilizados con fines terapéuticos, no siempre ha ido acompañada de un estudio de sus propiedades y de los denominados efectos secundarios producidos en las personas, o seres vivos, a los que se administran. Esta falta de estudio y conocimiento del comportamiento de un determinado fármaco, o de los efectos causados por su interacción con otros principios activos, así como el uso indiscriminado de los mismos es el origen de los numerosos problemas médicos que todos conocemos. A pesar de estos problemas, surgidos del desconocimiento y del abuso de los fármacos, hay que destacar que los éxitos de la farmacología en el tratamiento de las enfermedades de los seres vivos son innumerables y superan con creces los problemas que, a veces, puedan surgir de su mala utilización.

La farmacología contempla varios campos o áreas de estudio de las que podemos destacar las siguientes:

- Farmacodinámica o estudio del comportamiento y efectos que los fármacos producen en su interacción con los seres vivos.
 - Quimioterapia que estudia los fármacos capaces de destruir a los organismos que invaden un ser vivo causándole trastornos, sin que por ello afecte al huésped al que se le administra el fármaco.
 - Toxicología, que estudia los posibles efectos tóxicos producidos por los fármacos como parte del conocimiento básico acerca de los mismos.
-

Es obvio suponer de antemano que la aplicación de un fármaco para remediar una determinada enfermedad, no debe producir ningún efecto no deseado sobre el huésped al que se le aplica o, al menos que los efectos secundarios que se produzcan sean pasajeros y más aceptables que los trastornos causados por la enfermedad que deseamos curar. Generalmente así ocurre, pero no hemos de perder de vista que los fármacos son compuestos químicos extraños al ser vivo sobre el que actúa y que, por tanto, pueden causar intoxicaciones e incluso la muerte del propio ser al que intentamos beneficiar, si no se administran en la dosis oportuna. Existe pues la necesidad de un estudio toxicológico de los fármacos, consistente en la identificación, determinación y control de las sustancias que resultan tóxicas para los organismos vivos. Entre estas sustancias tóxicas se encuentran los fármacos.

Se puede decir que fue Ehrlich quien introdujo el concepto inicial de quimioterapia pero su verdadera entidad no la adquirió hasta el año 1935 en el que se publicó un estudio médico acerca de las propiedades bactericidas del colorante azoico llamado *protonsil rojo* que, según este estudio, presentaba la capacidad de proteger y curar a los ratones de laboratorio contagiados con un determinado tipo de estreptococo causante de una enfermedad.



Investigaciones posteriores demostraron que el protonsil no era el agente antibacteriano sino un metabolito derivado de él denominado sulfanilamida o *p*-aminobencenosulfonamida generado en el propio organismo por metabolismo del

protonsil. De esta forma dio comienzo el estudio de los agentes antimicrobianos de origen sintético, capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos en el interior de seres vivos.

La acción antibacteriana de la mayoría de estos agentes quimioterápicos responde a alguno de los siguientes mecanismos:

- Antagonismo competitivo con algún metabolito ya que algunos agentes antibacterianos actúan como antimetabolitos.
- Inhibición de la síntesis de la pared de la célula bacteriana.
- Acción sobre las membranas celulares del microorganismo patógeno.
- Inhibición de la síntesis de proteínas por parte de los microorganismos invasores.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos:
 - ✓ Análogos a los nucleósidos.
 - ✓ Los que se unen a la RNA-polimerasa.
 - ✓ Los que interaccionan directamente con el DNA del microorganismo.
 - ✓ Los que inhiben la acción de la DNA-girasa (1).

Generalmente, los fármacos de este último grupo son inhibidores selectivos de la síntesis de ácidos nucleicos de los microorganismos patógenos pero, en ocasiones, su acción inhibidora afecta al propio huésped bloqueando la acción de las mitocondrias de sus células, lo que supone una alta toxicidad.

Entre los fármacos cuya acción antibacteriana se debe a la capacidad que presentan para inhibir la síntesis de ácidos nucleicos por parte del microorganismo patógeno, se encuentran el ácido nalidíxico y sus derivados y afines, conocidos genéricamente como *quinolonas*, cuyo estudio desde el punto de vista analítico, es el objetivo general de esta Memoria.

La denominación genérica de quinolonas abarca un amplio grupo de antimi-

crobianos de síntesis que actúan sobre la enzima ADN-girasa de la bacteria que es la encargada de mantener la estructura helicoidal de la molécula de ADN (2) impidiendo, de este modo, la replicación del ADN tanto de los gérmenes patógenos gram-negativos que producen infecciones del tracto urinario, como de los gérmenes tipo *salmonella* causantes de las conocidas infecciones intestinales que pueden llegar a ser mortales en determinadas ocasiones.

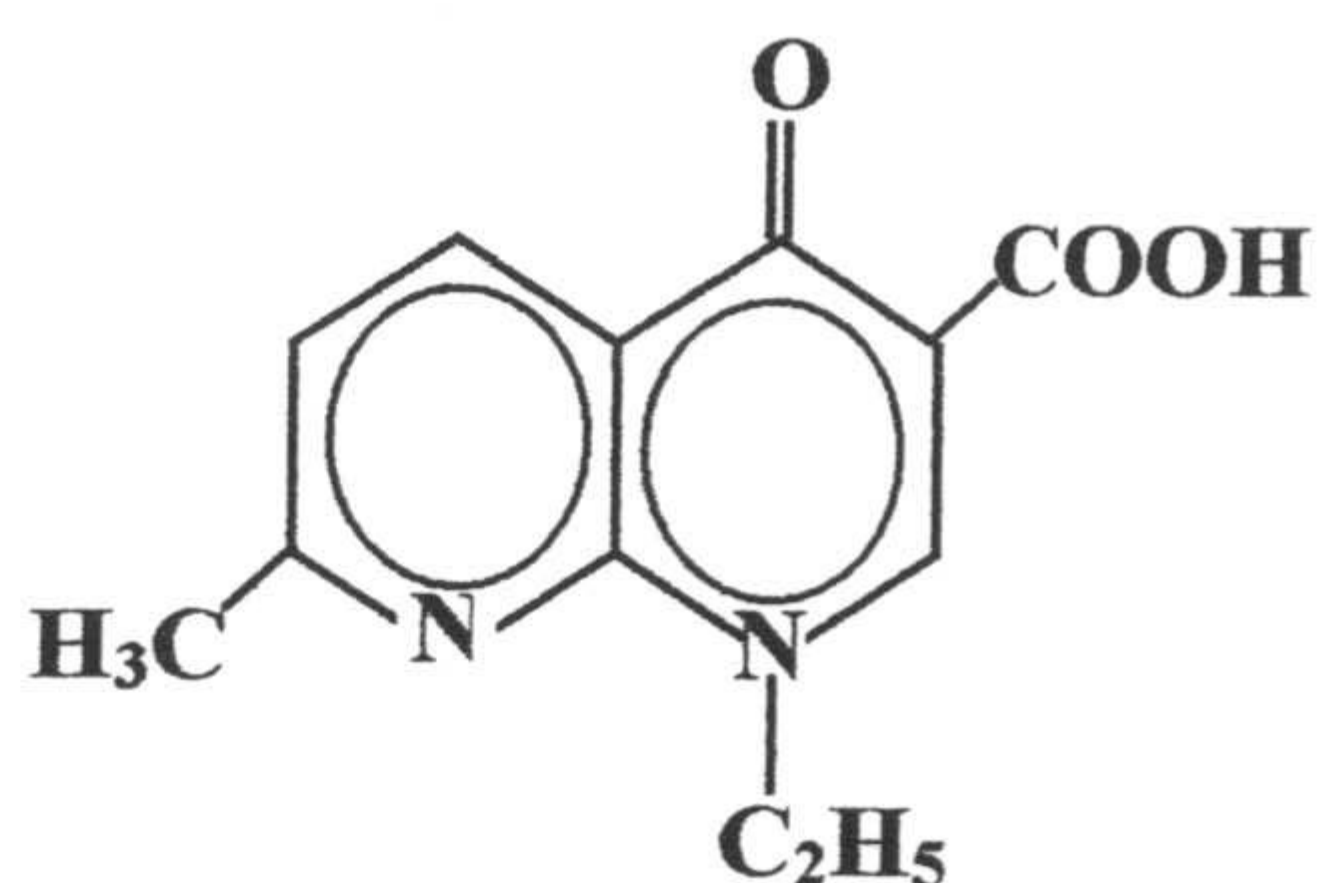
Como acabamos de decir, aunque inicialmente la utilidad de las quinolonas estaba restringida al tratamiento de las infecciones propias del tracto urinario causadas por bacterias gramnegativas, tras los diferentes cambios introducidos en la estructura molecular de estos compuestos, se ha aumentado su espectro de actividad de forma que, en la actualidad, los derivados de las quinolonas iniciales, se pueden utilizar en el tratamiento de infecciones de diferente etiología entre las que cabe destacar a las infecciones respiratorias.

Estas modificaciones estructurales no solo han conseguido ampliar el espectro de aplicación de estos compuestos sino que además, se han mejorado algunas de sus características farmacocinéticas como es el caso de la mejora en su capacidad para ser absorbidas por el organismo debido a su posibilidad de ingestión oral y de su mayor capacidad de penetración intracelular y de su mayor facilidad para ser metabolizadas por el ser que las ingiere.

Históricamente fue Price (3) quién en 1949 obtuvo por primera vez una sustancia a la que se denominó *quinolona*, sometiendo para ello un determinado alcaloide a un proceso de degradación química. Posteriormente muchos otros investigadores fueron sintetizando nuevas moléculas, semejantes a la sintetizada por Price, a las que se englobaron en el amplio grupo de compuestos a los que conocemos hoy día como quinolonas y de los que ya en la década de los años 60 del pasado siglo XX, se conocían más de 80 de ellos, algunos de los cuales, al contrario que

el compuesto sintetizado por Price, presentaban acción antibacteriana.

Sin embargo, es en el año 1962 cuando consigue la síntesis (4) de una nueva quinolona, derivada de la cloroquina, que posteriormente (en 1965) se comenzó a utilizar como agente antibacteriano en la terapéutica de determinadas enfermedades infecciosas. Se trataba del conocido ácido nalidíxico que en la actualidad sólo se utiliza en veterinaria, pero que, durante mucho tiempo ha sido una de los principios activos más utilizados en el tratamiento de enfermedades contagiosas del tracto urinario.



Ácido nalidíxico

El ácido nalidíxico es un compuesto de los que actúan inhibiendo la acción de la enzima ADN-girasa implicada en la replicación del ADN de gérmenes patógenos gramnegativos, se absorbe bien por el tracto gastro-intestinal excretándose en la orina como ácido nalidíxico en su mayor parte y el resto en forma de

ácido hidroxinalidíxico. El tiempo transcurrido entre la ingesta del fármaco y la excreción del mismo se ha podido comprobar que oscila entre 0'5 y 1'5 horas en personas normales.

Así mismo se ha comprobado que, aunque administrado en la dosis apropiada no presenta efectos secundarios dignos de tener en cuenta, cuando se lleva a cabo un tratamiento prologado con ácido nalidíxico, el paciente puede presentar síntomas de vómitos, hipertensión intracraneal, alergias y toda una serie de trastornos secundarios cuyo origen se encuentra en la acción que ejerce el fármaco sobre el sistema nervioso del paciente. Por ello es obligado tomar las oportunas precauciones en tratamientos de más de dos semanas de duración, efectuándose estudios hepáticos, renales y, sobre todo, hematológicos, para comprobar que la concentra-

ción del fármaco en el fluido sanguíneo del enfermo no rebasa los límites aconsejables en ningún caso.

Estos límites aconsejables los podemos estimar fácilmente si tenemos en cuenta que las dosis recomendadas son de 8 comprimidos de 500 mg de ácido nalidíxico al día, durante un período que suele oscilar entre 7 y 14 días por lo que la cantidad máxima de fármaco ingerida por un paciente a lo largo de su tratamiento puede oscilar entre 28 y 56 gramos.

No obstante, como el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo humano es de una a dos horas antes de ser excretado, el nivel de ácido nalidíxico en sangre no superará los 500 mg en ningún caso ya que el intervalo entre la ingestión de comprimidos es al menos de 3 horas. Teniendo en cuenta el volumen de sangre (\approx 4 litros) en el cuerpo de un adulto podemos llegar a la conclusión de que la máxima concentración del fármaco en sangre no debe superar los 125 mg/L.

En el caso de la orina, como no todo el compuesto se excreta en forma de nalidíxico sino que parte de él se excreta como hidroxinalidíxico (entre el 26 y el 10%), se puede estimar que la concentración máxima de fármaco en dicho fluido corporal, debe oscilar alrededor de 200 mg/L (5). Sin embargo, los valores de concentración de ácido nalidíxico en orina encontrados en la práctica se encuentran entre 2'5 y 5'0 mg/L, valores que, como podemos apreciar, son sensiblemente menores que los estimados teóricamente.

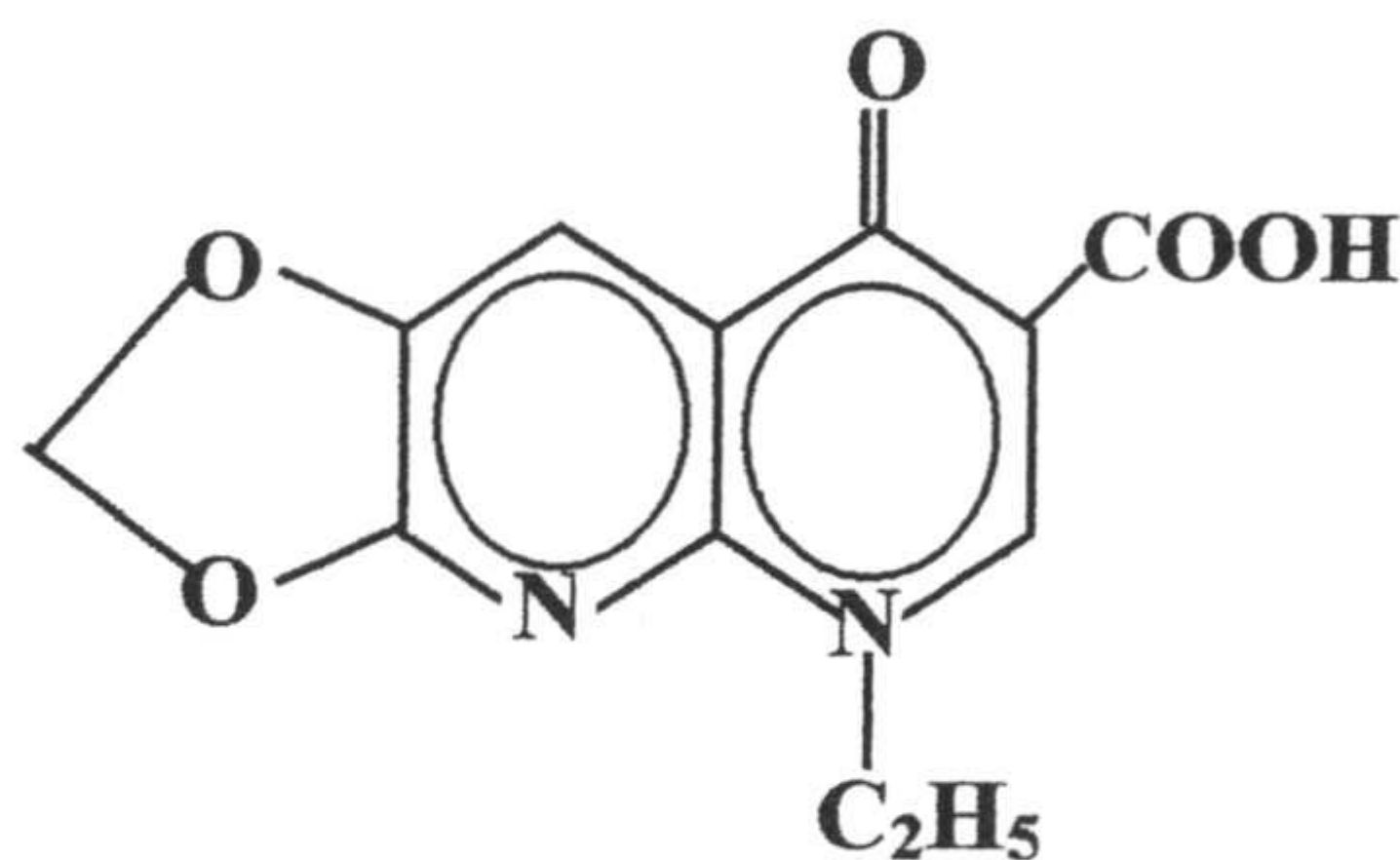
Como se ha dicho con anterioridad, actualmente este compuesto no se utiliza en medicina, por lo cual podríamos pensar que los controles analíticos a los que nos hemos referidos no son necesarios, pero no hemos de olvidar que el ácido nalidíxico se sigue utilizando en veterinaria y que, al igual que ocurre con otros muchos antibióticos, el uso masivo del mismo podría dar lugar a su paso a los seres

humanos a través de la cadena alimentaria.

Tomando en consideración los datos que hemos aportado con anterioridad podemos decir que se necesitan métodos de análisis para la determinación de ácido nalidíxico en fluidos humanos (sangre y orina) y que dichos métodos deben ser suficientemente sensibles para que podamos determinar concentraciones de analito del orden de los miligramos por litro, con una gran selectividad que evite las interferencias producidas por los componentes que normalmente se encuentran en matrices tan complejas como son los fluidos orgánicos.

Considerado bajo un punto de vista puramente químico el ácido nalidíxico, o ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico, es un compuesto sólido que en condiciones normales se presenta en forma de polvo de aspecto cristalino y color amarillo pálido, con un punto de fusión de 229 °C. Es parcialmente soluble en agua (0'1 g/L) y en algunos otros disolventes polares como metanol (1'3 g/L) y etanol (0'9 g/L), aunque es más soluble en disolventes apolares tales como tolueno (1'6 g/L) o cloroformo donde alcanza una solubilidad de 35'0 g/L.

Desde un punto de vista exclusivamente cronológico, la segunda quinolona de



Ácido oxolínico

interés farmacológico que apareció sintetizada en la bibliografía científica, fue un derivado del ácido nalidíxico al que se le dio el nombre de ácido oxilínico.

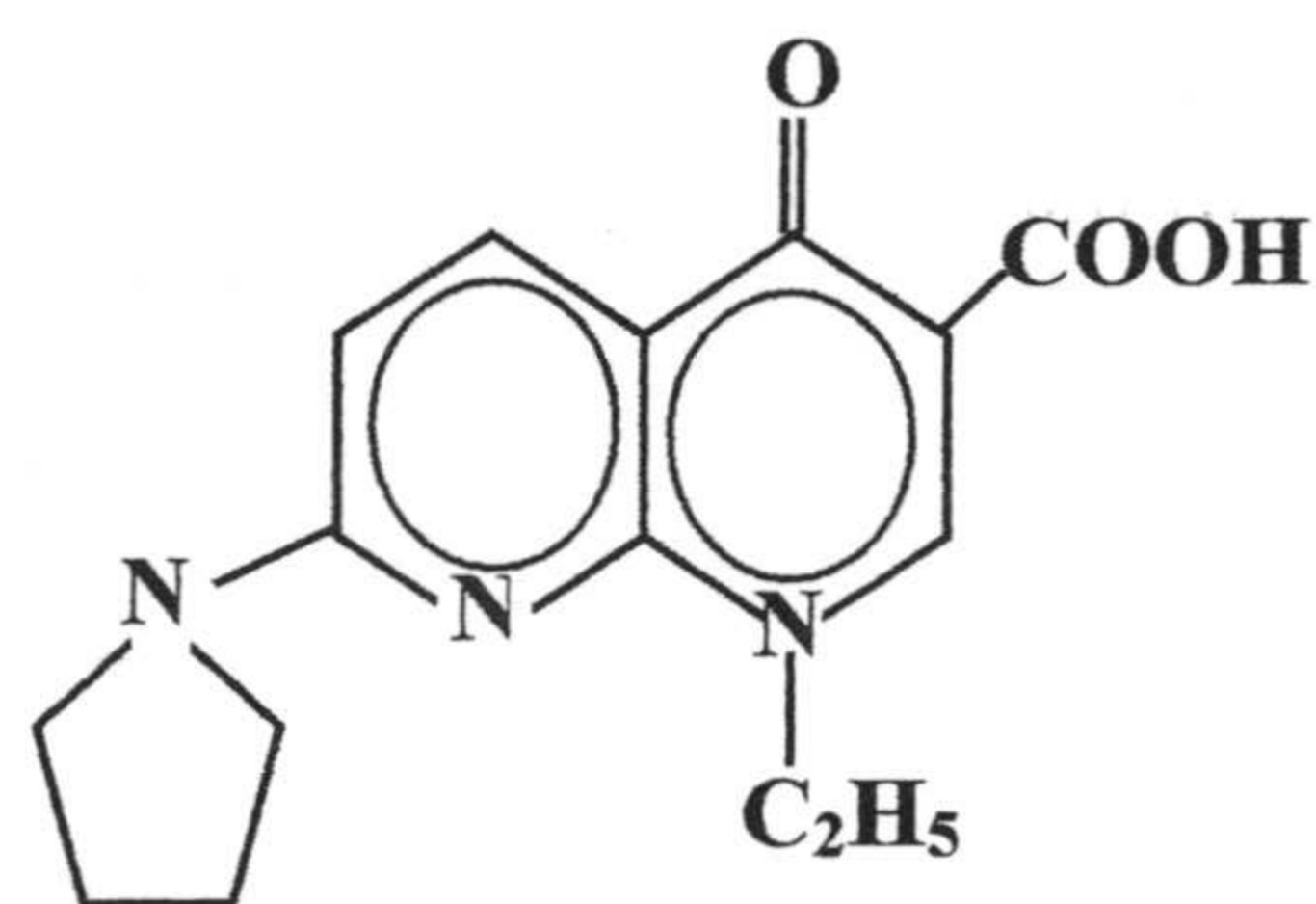
Químicamente considerado el ácido oxolínico o ácido 5-etil-5,8-dihidro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinolin-7-carboxílico ha sido

comercializado bajo un gran número de nombres vulgares tales como Urotrato, Uroxin, Nidantin, etc. desde que fue patentada su obtención en 1966 por Kamins-

ky, (6) aunque los estudios acerca de su metabolismo por los seres vivos se llevó a cabo varios años después (7,8). Este compuesto se puede cristalizar a partir de una disolución de dimetilformamida presentando entonces un punto de fusión de 314-316 °C. Su dosis letal media en ratones por ingestión oral es de 2 g/kg (9).

Este ácido con acción e indicaciones similares a las del ácido nalidíxico, también es eficaz en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario causadas por gérmenes gram-negativos pero, debido a los efectos secundarios que causa en el sistema nervioso central, su uso ha sido prohibido para la práctica médica en numerosos países (10).

Los siguientes compuesto, derivados del ácido nalidíxico, que fueron sintetiza-



Ácido piromídico

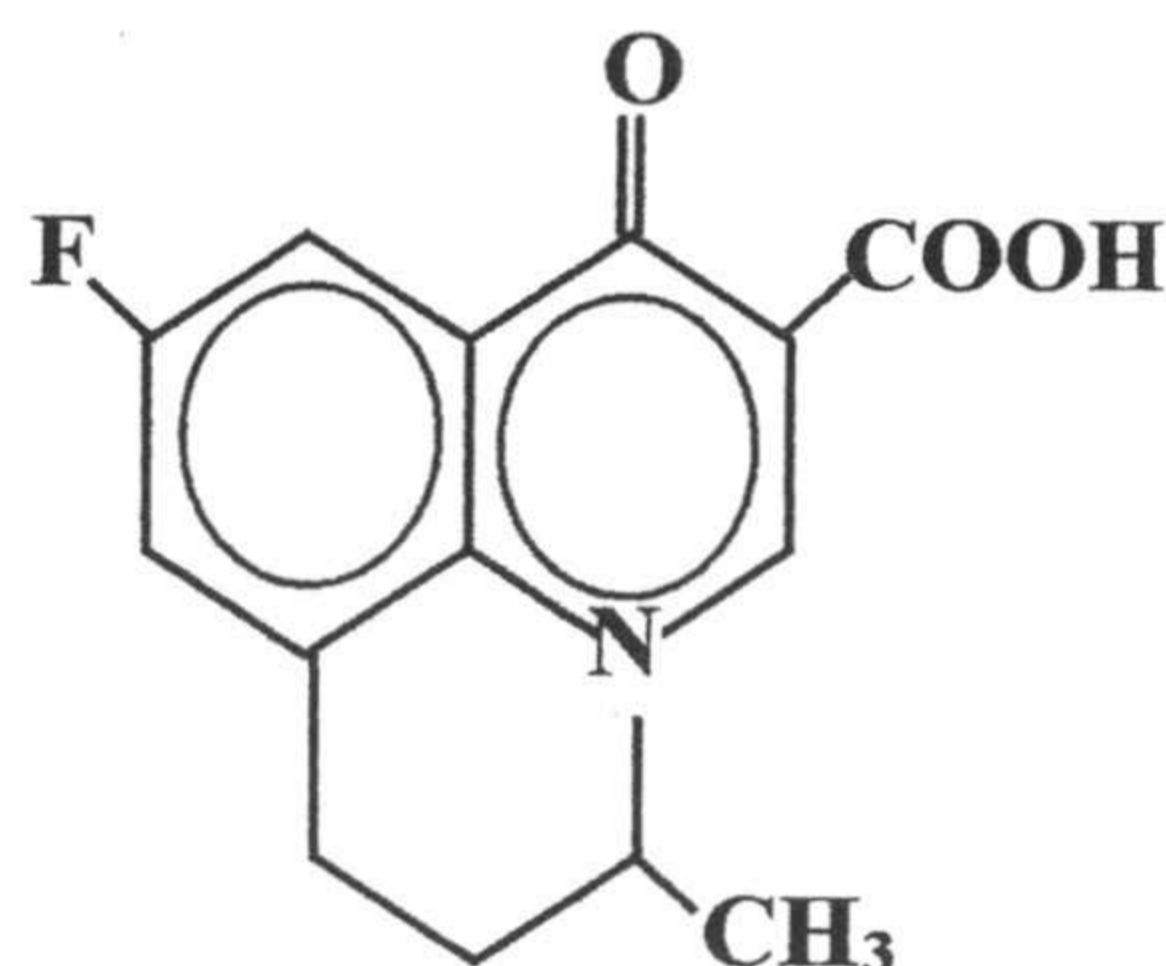
dos son el ácido piromídico y la flumequina, fármacos estos usados como antibacterianos pero de características muy parecidas al ácido nalidíxico, es decir, una actividad limitada contra las bacterias gram-negativa y ninguna sobre las gram-positivas, lo que obliga al uso de elevadas dosis, presentándose así un

cierto número de efectos adversos que aconsejan no utilizarlos en la práctica médica.

El ácido piromídico, cuyo nombre químico es ácido 8-etil-5,8-dihidro-5-oxo-2-(1-pirrolidin)pirido[2,3-d]pirimidina-6-carboxílico, se comercializa varios diferentes nombres comerciales entre los que podemos citar: Bactramil, Enterol, Gastrurol o Uropir. Fue preparado bajo patente por Minami (11) y los estudios acerca de su actividad y metabolismo fueron realizados por Shimizu (12,13). Se consigue cristalizarlo a partir de una disolución de etanol-cloroformo, su punto de fusión es

también de 314 a 316 °C y la dosis oral letal media en ratas es de 0'158 g/kg.

La flumequina fue la primera quinolona en cuya molécula se encuentra un átomo del flúor, dando paso así a la síntesis de un importante grupo de estos fármacos, que se caracteriza por la presencia de dicho átomo de flúor en su molécula,



Flumequina

al que se conoce con el nombre genérico de fluoroquinolonas cuya actividad y espectro de actuación son mucho más amplio que el de las quinolonas anteriores (14).

La flumequina o ácido 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-1H,5H-benzo[i,j]quinolizina-2-carboxílico comercializado bajo los nombres de Apurona o R-802, fue preparado por Gerster (15)

bajo patente, realizándose los estudios de su actividad *in vivo* varios años después (16).

Con la síntesis de la flumequina, comienza la era de las llamadas quinolonas de segunda generación, caracterizadas por la presencia del átomo de flúor en la posición 6 del anillo, lo que le confiere a la molécula un mayor poder antibacteriano, pudiéndose así disminuir la dosis administrable necesaria para que el fármaco ejerza su acción. Aunque la primera quinolona que contenía flúor en su molécula era la flumequina, sin embargo, las quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas, comienzan con la siguiente quinolona sintetizada que fue la norfloxacin. Con esta segunda generación y sobre todo con la generaciones posteriores, se ha conseguido un mayor poder antibacteriano a la vez que una disminución de la dosis necesaria lo que redunda en un menor número de efectos secundarios y una mayor efectividad.

Como hemos dicho con anterioridad, el uso de las quinolonas no sólo se queda

restringido al campo de la medicina, donde las quinolonas de primera generación están siendo prohibidas en gran número de países, sino que también se han usado y se siguen usando en veterinaria, donde hoy día es frecuente su uso en determinados tratamientos de infecciones padecidas por determinados tipos de ganado. Así, a modo de ejemplo podemos decir que tanto la flumequina como el ácido oxolínico se utilizan frecuentemente en el tratamiento de infecciones padecidas por el ganado vacuno, porcino, avícola, así como en piscifactorias. No obstante, hay que decir que no todos los países tienen la misma legislación acerca de la utilización de estos fármacos para el tratamiento de infecciones del ganado. Así por ejemplo, mientras que la flumequina se puede utilizar sin restricciones en el ganado vacuno y avícola en Europa, en países como Canadá o Australia está totalmente prohibida, o en América Latina está permitida con restricciones.

La Agencia Europea para la evaluación de productos médicos (EMA) es el organismo oficial que se encarga de controlar y regular el uso de medicamentos tanto para medicina como para veterinaria dentro del ámbito de nuestra comunidad y, hasta enero de 2001 ha establecido unos Límites Máximos de Residuos (LMR) (17) de quinolonas, permitidos en la carne de animales destinada al consumo humano. Estos límites varían notablemente de un ganado a otro así como de un tipo de quinolona a otra, por ello centrándonos en las dos quinolonas más utilizadas en veterinaria, ácido oxolínico y flumequina, podemos decir, a modo de ejemplo que, en músculo de ganado porcino el LMR de flumequina es 0'2 mg/kg mientras que para el ácido oxolínico este límite se sitúa en 0'1 mg/kg. En cambio en el riñón de pollo el LMR de flumequina es de 1 mg/kg y para el oxolínico 0'15 mg/kg. Queda claro, por tanto, que el LMR establecido para una determinada quinolona varía, como hemos dicho en función del tipo de ganado y de quinolona y también en función de la parte del cuerpo del animal que consideremos.

Análisis de las quinolonas.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto, en la actualidad es de gran interés disponer de métodos analíticos capaces de detectar y cuantificar pequeñas cantidades de cualquiera de estos fármacos, en multitud de matrices complejas como son los fluidos biológicos, ya sean humanos o animales, vísceras de animales, músculos, piel, etc. Los métodos de análisis de este tipo presentan un gran inconveniente *a priori*: la complejidad de la matriz nos exige que sean métodos muy selectivos, o con una gran capacidad de separación, a la vez que deben ser métodos de una sensibilidad adecuada a las concentraciones de analito que se han establecido como máximo permitido.

Los principales métodos analíticos descritos en bibliografía para la detección e identificación de quinolonas los podemos agrupar como sigue:

1. Métodos clásicos: Determinación volumétrica.
 2. Métodos espectrofotométricos:
 - 2.1. Métodos espectrofotométricos.
 - 2.2. Métodos espectrofluorimétricos.
 - 2.3. Otros métodos espectrométricos.
 3. Métodos electroanalíticos.
 - 3.1. Métodos polarográficos.
 - 3.1.1. Polarografía convencional.
 - 3.1.2. Polarografía pulsante diferencial.
 - 3.1.3. Oscilopolarografía.
 - 3.2. Métodos voltamperométricos.
 - 3.2.1. Voltamperometría de redisolución adsortiva
 - 3.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada.
 4. Métodos cromatográficos.
-

- 4.1. Cromatografía de gases.
- 4.2. Cromatografía en capa fina.
- 4.3. Cromatografía de líquidos.
- 4.4. Electroforesis.

Métodos clásicos.

- G. Dondi y colaboradores (18) desarrollaron un método colorimétrico para la determinación de ácido nalidíxico basándose en su reacción, en medio ácido (HCl), con el β -naftol para desarrollar una coloración amarillo-anaranjado, que sirve de base para la determinación.

Estos mismos autores, en el mismo trabajo ya citado, también estudian la determinación de ácido nalidíxico por métodos volumétricos consistentes en:

- Valoración del ácido con NaOH (0'1 N) usando etanol del 95% como disolvente y fenolftaleína como indicador.
- Valoración del ácido con NaO-CH₃ (0'1 N) en CHCl₃ y con azul de timol como indicador.

Junto con estas determinaciones volumétricas también propusieron una determinación gravimétrica del ácido nalidíxico mediante la formación de un complejo del ácido nalidíxico con ácido silicovolfrámico cuya estequiometría resultó ser 8:3 silicovolfrámico:nalidíxico.

Métodos espectrofotométricos.

Son varios los métodos espectrofotométricos que se han empleado para la determinación de quinolonas en general, pero son muy pocos los que se dedican a la determinación de las quinolonas que nos ocupan en esta Memoria. En la mayoría de los casos la determinación del analito se efectúa en preparados farmacéuticos y

los límites de detección logrados no sobrepasan nunca los 0'2 mg/L. En el caso de las quinolonas que nos interesan sólo hemos encontrado el siguiente método espectrofotométrico:

- Vieira da Silva y colaboradores (19) proponen la determinación de ácido nalidíxico en comprimidos con una extracción previa del analito con CHCl_3 ó con disolución de NaOH (0'1 N) y midiendo absorbancias a 259 ó 258 nm respectivamente.

Métodos espectrofluorimétricos.

Los métodos basados en medidas fluorimétricas son algo más numerosos que los anteriores, lo cual es lógico si pensamos que la espectrofluorimetría es una técnica más sensible que espectrofotometría y que los compuestos a los que nos estamos refiriendo poseen moléculas cuya estructura reúne prácticamente todos los requisitos necesarios para presentar fluorescencia natural.

- El ácido nalidíxico se puede determinar en carne de pollo mediante la metodología propuesta por Browning y colaboradores (20) en la que se mide la fluorescencia del analito en una disolución ácida (60% H_2SO_4) tras extracción a partir de la carne.
- R. Staroscik y colaboradores (21) han propuesto un método para la determinación de ácido nalidíxico en orina, tras la extracción del ácido nalidíxico con CHCl_3 , utilizando la fluorescencia emitida en disolución. El método propuesto presenta un límite de detección de 5 mg/L.
- Otro método fluorimétrico para la determinación de ácido nalidíxico, es el propuesto por Durán y colaboradores (22) en el que se determina el analito en preparados farmacéuticos y en orina usando γ -CD para resaltar la fluorescencia del ácido en disolución.

- Un método para la identificación simultánea de ácido nalidíxico y su metabolito mediante fluorescencia y utilizando calibración multivariante (Partial Least Squares) es el propuesto por los mismos autores de la cita anterior (23).
- Estos mismos autores han propuesto recientemente un método fluorimétrico para la determinación conjunta de ácido nalidíxico y ácido oxolínico (junto con pipemídico y ciprofloxacina), con unos límites de detección que oscilan entre 50 y 300 $\mu\text{g/L}$, en orina (24).
- Las medidas de intensidad de fosforescencia transmitida en fase sólida y a temperatura ambiente también han sido utilizadas por Capitan-Vallvey y colaboradores (25) para determinación de ácido nalidíxico utilizando Pb(II) como metal pesado y β -ciclodextrina para resaltar la emisión fosforescente.

Métodos con separación cromatográfica

Los métodos de determinación de quinolonas utilizando técnicas con separaciones cromatográficas y diferentes tipos de detectores son algo más frecuentes que los anteriores

- Shargel y colaboradores (26) han propuesto la determinación de ácido nalidíxico y su metabolito el ácido hidroxinalidíxico en plasma humano y orina mediante, cromatografía líquida de alta resolución. El límite de detección alcanzado por el método es de 2'5 mg/L .
 - Sorel y colaboradores (27) también han propuesto el uso de la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ácido nalidíxico en sangre, previa extracción con tolueno y posterior metilación con yoduro de metilo. El límite de detección alcanzado con este método es de 10 ng de es-
-

ter metílico del ácido nalidíxico por cada inyección efectuada.

- Estos mismos autores (28) proponen también un método para determinar ácido nalidíxico en plasma sanguíneo mediante cromatografía de gases.
 - Un método para la determinación de ácido nalidíxico junto ácido oxolínico ha sido propuesto por G. Cuisinaud y colaboradores (29) en plasma humano y orina mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. En este método los analitos se extraen con CHCl_3 se purifica el extracto y se vuelve a extraer con NaOH y CHCl_3 previamente a su introducción en el sistema cromatográfico con lo cual se alcanza un límite de detección de 0'5 mg/L.
 - Igualmente Mawatari y colaboradores (30) han determinado ácido nalidíxico en orina humana mediante cromatografía líquida de alta resolución, sometiendo al eluyente de la columna cromatográfica a un proceso fotoquímico postcolumna (a 380 nm). El sistema de detección utilizado fue fluorescente y el límite de detección alcanzado es de 40 $\mu\text{g/L}$.
 - Un método cromatográfico para la determinación de los ácidos nalidíxico, oxolínico y piromídico es el propuesto por Horie y colaboradores (31) que mediante cromatografía de líquidos alcanzaron un límite de detección de 5 $\mu\text{g/L}$.
 - Estos mismos analitos (ac. nalidíxico, oxolínico y piromídico) han sido identificados en una mezcla de ellos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta, por Barbato y colaboradores (32).
 - Los ácidos nalidíxico, piromídico y oxolínico se pueden determinar junto con la flumequina utilizando el método propuesto por Doerge y colaboradores (33) basado en cromatografía líquida de alta resolución con detector
-

de espectrometría de masas, con lo que consiguen límites de detección comprendidos entre 0'8 y 1'7 $\mu\text{g/L}$ al aplicarlo a la determinación de los analitos en muestras de pescado.

- Los cuatro compuestos (nalidíxico, oxolínico, piromídico y flumequina) se pueden determinar por cromatografía líquida de alta resolución mediante el método propuesto por Volmer y colaboradores (34) en el que se usa un detector de espectrometría de masas, para determinar estos analitos en pescado, leche y muestras de orina con un límite de detección que oscila entre 0'2 y 2 $\mu\text{g/L}$.
- Flumequina y los ácidos nalidíxico y oxolínico, junto con diez quinolonas más se pueden determinar mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución propuesto por Rose y colaboradores (35). El detector utilizado es un fluorímetro y el límite de detección alcanzado está comprendido entre 5 y 50 $\mu\text{g/kg}$ de carne de cerdo o de pollo o huevos o miel de abeja.
- Flumequina, ácido nalidíxico y ácido oxolínico pueden determinarse por el método cromatográfico propuesto por Yorke y Froc (36) para el análisis de estos tres compuestos, junto con otras seis quinolonas, en carne de pollo, usando un detector de fluorescencia. El límite de detección alcanzado fue de 0'5 a 12 $\mu\text{g/kg}$ dependiendo del analito de que se tratase.
- Para finalizar con los métodos de cromatografía líquida de alta resolución nos queda por citar el método propuesto por Touraki y colaboradores (37) para la determinación de flumequina y ácido oxolínico en pescado utilizando para la detección la espectroscopía ultravioleta y consiguiendo un límite de detección de 0'2 $\mu\text{g/kg}$.

Aunque, como hemos podido apreciar, la técnica más utilizada en el análisis de

quinolonas sea la cromatografía líquida de alta resolución, este hecho no impide que, en mucha menor proporción, la cromatografía en capa fina de alta resolución también se haya utilizado como técnica analítica para la determinación de quinolonas entre las que vamos a resaltar únicamente las que nos interesan en esta Memoria. En efecto tanto el ácido nalidíxico (38,39) como el oxolínico (40) han sido determinados mediante este tipo de cromatografía, tras haber sido previamente extraídos de la matriz.

La electroforesis capilar es otra de las técnicas analíticas que, en cierta medida, se han utilizado para la determinación de quinolonas. Así nos encontramos con ocho publicaciones acerca de determinación de quinolonas mediante esta técnica, de las cuales tres de ellas incluyen alguno de los analitos que aquí estamos estudiando. De esta forma nos encontramos con la publicación de Sun y Chen (41) en la que se identifican catorce quinolonas entre las que se encuentran la flumequina y los ácidos nalidíxico, oxolínico y piromídico. La identificación se lleva a cabo mediante detector de ultravioleta.

Otro método de identificación de quinolonas en preparados farmacéuticos mediante electroforesis y detección ultravioleta es el propuesto por Fierens y colaboradores (42), con el que identifican los ácidos nalidíxico y oxolínico y la flumequina junto con otras seis quinolonas más.

Estos mismos tres analitos, junto el ácido piromídico y seis quinolonas más, han sido determinados en plasma sanguíneo mediante electroforesis por Hernández y colaboradores (43) consiguiéndose límites de detección que oscilan entre 0,1 y 0,5 mg/L.

Finalmente nos vamos a referir a la utilización de métodos electroanalíticos para la determinación de quinolonas. No son muchos los métodos que hemos encontrado en bibliografía, trece en total, de los cuales sólo uno está referido a uno

de los compuestos que estudiamos en esta Memoria. En efecto, los ácido oxolínico y piromídico y tres quinolona más, se pueden determinar mediante polarografía de pulso diferencial (44) consiguiéndose un límite de detección de 0'25 mg/L, para el caso del oxolínico y 0'28 mg/L para el caso de piromídico, cuando la muestra es plasma sanguíneo, orina o preparados farmacéuticos.

Como podemos observar los métodos de determinación de los cuatro compuestos que nos ocupan, en su mayor parte, están encaminados al análisis de muestras de fluidos biológicos tales como sangre, orina o plasma sanguíneo y en gran parte de los casos implican una extracción previa del analito, generalmente con CHCl_3 , antes de la medida de la propiedad analítica elegida y, en determinados casos, bajo unas restrictivas condiciones experimentales para soslayar en lo posible interferencias de otros compuestos presentes en dichas muestras biológicas.

Espectrofosforimetría

El fenómeno de emisión fosforescente es un fenómeno de origen molecular que, a escala macroscópica, consiste en la emisión de radiación electromagnética, de energía $h\nu$, correspondiente a la banda visible del espectro electromagnético, a la que llamaremos haz o radiación de emisión, por parte de un material que previamente ha sido iluminado con otra radiación electromagnética de energía $h\nu_0$, mayor que $h\nu$, a la que denominaremos haz o radiación de excitación.

Como es sabido, un fenómeno físico, como la emisión fosforescente que acabamos de mencionar, podemos utilizarlo como fundamento de una técnica analítica si podemos establecer una relación entre el parámetro químico que queremos conocer que, mientras no se establezca lo contrario, será la concentración de analito fosforescente, y la magnitud física observable macroscópicamente que, en nuestro caso generalmente será la intensidad de radiación fosforescente emitida

por el analito, bajo determinadas condiciones experimentales. Si llamamos I_F a esta intensidad de fosforescencia emitida y C a la concentración de analito fosforescente, el fenómeno de fosforescencia podrá utilizarse como base de una técnica analítica si somos capaces de establecer una relación como la que sigue:

$$I_F = B.C \quad (\text{Ec. I.1})$$

siendo B una constante de proporcionalidad que engloba todos los parámetros experimentales e instrumentales que influyen en el fenómeno.

Esta constante de proporcionalidad, cuyo valor lo podemos establecer a través de un proceso de calibración en el que se optimicen todas y cada una de las variables que influyen en el fenómeno fosforescente, será realmente una constante siempre que no se modifiquen los valores de las variables experimentales e instrumentales utilizadas durante la medida ya que, en caso contrario, el valor de B quedaría modificado.

Por consiguiente, la optimización de los valores de las variables experimentales es de enorme importancia ya que, como veremos más adelante, de su valor en el momento de efectuar la medida depende no sólo el valor de la intensidad de fosforescencia sino incluso el hecho de que se produzca o no el propio fenómeno fosforescente.

Como en cualquier otro tipo de medida de una propiedad analítica, en el caso de los fenómenos fosforescentes también intervienen dos sistemas perfectamente diferenciados. En primer lugar nos encontramos con el material (muestra analítica) que produce la emisión fosforescente y, en segundo lugar, tenemos el sistema o instrumento de medida capaz de cuantificar dicha emisión. En consecuencia tendremos dos tipos de parámetros o variables experimentales cuya influencia en el fenómeno habrá que estudiar y optimizar para establecer el valor de la constante de proporcionalidad B a la que hemos aludido en la ecuación I.1. Estos paráme-

tros son:

1. Los que dependen del propio fenómeno de emisión en sí mismo y de la naturaleza intrínseca de la muestra y del entorno en el que se encuentran: temperatura, pH, etc.
2. Aquellos otros que exclusivamente dependen del instrumento de medida: intensidad de radiación incidente, anchura de rendijas, colocación de la muestra en el compartimiento de cubetas, etc.

Tanto unos como otros son de gran importancia y su estudio, junto con la obtención de la curva de calibrado, constituye la base principal del establecimiento de nuevos métodos analíticos, fosforescentes o no. Para llevar a cabo su estudio vamos a establecer el siguiente orden:

- Resumen del fundamento molecular de los fenómenos de fosforescencia.
- Estudio de la forma en que la intensidad de fosforescencia emitida por el analito puede estar afectada por los parámetros experimentales tanto los debidos al instrumento como los dependientes del entorno físico-químico en el que se encuentra la muestra en el momento de efectuar la medida.

Los fenómenos fotoluminiscentes.

Experimentalmente se ha comprobado que son relativamente pocas las sustancias capaces de emitir fosforescencia y que la mayor parte de las que lo hacen son fundamentalmente compuestos aromáticos. Estos compuestos contienen un cierto número de orbitales π , ocupados por pares electrónicos en su estado fundamental, correspondiente al estado de mínima energía electrónica. Según el principio de exclusión de Pauli estos electrones que forman los pares, deben tener sus espines opuestos y, por lo tanto, el espín total de la molécula, en el estado fundamental, será nulo. La molécula se encuentra en un estado que denominaremos estado sin-

glete fundamental S_0 .

Como se aprecia en el esquema de la figura 1, en la que hemos representado el conocido diagrama de Jablonski, cuando una molécula que se encuentre en estado fundamental puede absorber un fotón de la energía apropiada ($h\nu_0$) y sufrir una transición electrónica consistente en que uno de los electrones de un orbital π enlazante, o un electrón de un par electrónico no compartido n , puede pasar a un orbital antienlazante, inicialmente desocupado, de energía superior y al que denominaremos π^* . En esta transición la molécula pasa a un estado de mayor energía electrónica que la que posee el orbital del que procede, al que denominaremos estado excitado.

Durante la transición, tanto el electrón que salta al orbital de mayor energía como el que se queda en el orbital original, no sufren cambio de sus respectivos espines, es decir, dichos espines continúan estando apareados y diremos que la molécula se encuentra en un estado singlete o singlete excitado al que vamos a representar con la notación S_1 si se trata del primer estado excitado, es decir, el estado excitado más próximo al estado fundamental, S_2 si se trata del siguiente estado excitado y así sucesivamente hasta el enésimo estado singlete excitado al que representaremos por S_n . Este proceso de absorción de la energía del fotón por parte de la molécula, que se produce en un tiempo próximo a 10^{-15} s aproximadamente, constituye el proceso de excitación molecular.

Como podemos apreciar en la figura I.1, en cualquiera de los estados o niveles energéticos electrónicos ya sea el estado fundamental, S_0 , como cualquiera de los estados excitados, $S_1, S_2 \dots S_n$, la molécula puede encontrarse en diferentes niveles energéticos caracterizados por poseer diferentes cantidades de energía vibracional, que también está cuantizada, ($\nu_1, \nu_2, \nu_3, \dots \nu_n$), a los que llamaremos estados vibracionales de la molécula.

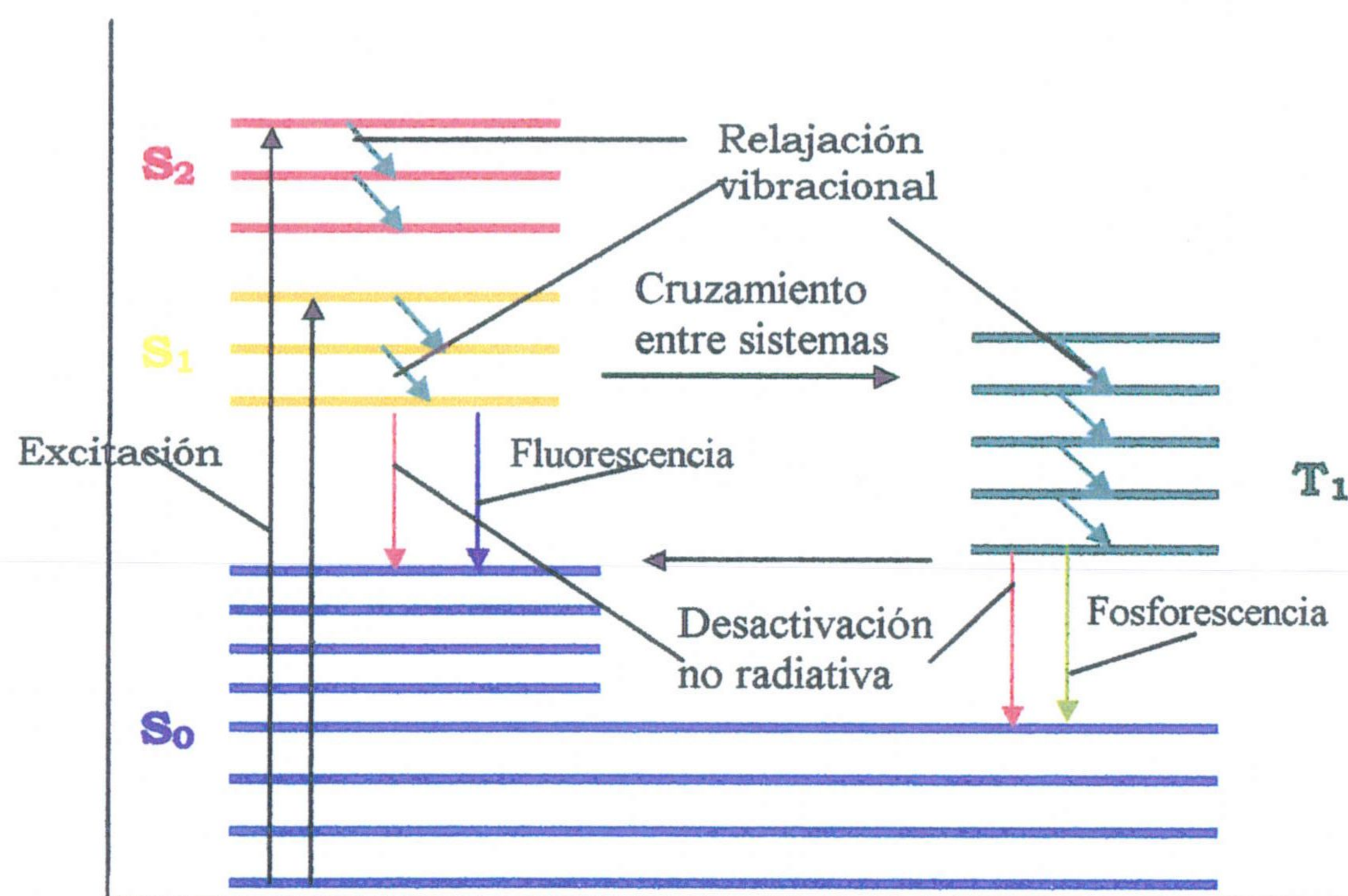


Figura I.1. Diagrama de Jablonski.

Cuando la molécula efectúa una absorción de un fotón, proceso de excitación, el electrón salta a un nivel electrónico superior y la molécula, en su conjunto, queda en un estado vibracional alto, tendiendo a volver, de forma espontánea, al estado fundamental a través de un proceso que llamaremos de desactivación molecular. Este proceso de desactivación molecular puede realizarse de diferentes formas y por diferentes caminos de manera que, dependiendo de la forma en que se desactive así tendremos un tipo de fenómeno u otro.

El primer cambio que se produce en los procesos de desactivación molecular es la pérdida de energía vibracional, a la que se conoce como relajación vibracional. Esta relajación vibracional se puede producir en cualquier estado electrónico y consiste en el paso de un estado de alta energía vibracional a otro de menor energía sin cambio en el estado electrónico en el que se encuentre la molécula. Se trata de un proceso de disipación energética que, al igual que el proceso de absorción fotónica, es un proceso rápido cuya duración oscila alrededor de 10^{-12} s. En con-

secuencia, la molécula tras un proceso de excitación y otro de relajación vibracional, se encontrará en un estado energético caracterizado por un bajo nivel vibracional dentro de un determinado nivel electrónico S_n siendo $n = 1, 2, 3, \dots$. Aunque en teoría el estado excitado que alcanza la molécula puede ser cualquiera, dependiendo de la energía portada por el fotón absorbido, sin embargo, en la práctica el estado singlete que alcanza la mayor parte de las moléculas es el estado S_1 y es a este al que nos vamos a referir en lo sucesivo, a menos que se especifique lo contrario.

Una vez alcanzado este estado, caracterizado por ser el primer estado excitado de menor energía vibracional, la tendencia de la molécula es volver al estado electrónico fundamental de la forma más eficiente posible, es decir, a través de aquel proceso que le permita soltar más rápidamente la diferencia de energía existente entre los valores correspondientes a ambos estados extremos de la transición electrónica. El hecho de que se produzca la transición de una u otra forma dependerá fundamentalmente de la estructura molecular y de las condiciones ambientales en las que se produzca el proceso de desactivación.

Una de las alternativas posibles consiste en la transición de la molécula desde el nivel vibracional ν_0 de un determinado estado excitado S_1 a un nivel vibracional alto del estado fundamental. En estos procesos, que se producen cuando los estados excitado y fundamental se encuentran próximos entre sí porque la molécula tiene grandes posibilidades vibracionales, el nivel de llegada y el de partida son de energía semejante lo que favorece este proceso de conversión interna que, al igual que ocurre con el proceso de relajación vibracional, es una transición rápida y no radiativa. En el diagrama de Jablonski correspondería a la transición que hemos señalado con flechas rojas y las hemos denominado como transiciones no radiativas. Considerando el proceso en su conjunto, es decir, desde el momento de la ab-

sorción fotónica hasta el final de la desactivación molecular por este camino, el fenómeno macroscópico que observaríamos, si la inmensa mayoría de las moléculas activadas optaran por seguirlo, sería un fenómeno de absorción regido por la ley de Beer.

Una desactivación molecular cuyo resultado es así mismo una transición molecular $S_1 \rightarrow S_0$ no radiativa, es la que pueden sufrir determinadas moléculas que, aunque tengan ambos niveles energéticos suficientemente separados, no emiten energía radiante durante la desactivación porque sufren procesos desactivantes tales como interacción con otras moléculas del entorno, colisiones con otras moléculas, formación de excímeros, etc., procesos todos ellos desactivantes pero no radiativos.

Una segunda alternativa de la molécula en su camino para alcanzar el estado fundamental de energía desde el estado energético caracterizado por S_1 y ν_0 , es siguiendo un proceso mucho más lento que el anterior en el que se produce una emisión de energía radiante en forma de fotón. Como podemos ver en la ya citada figura I.1, la molécula puede seguir uno de los siguientes caminos hasta quedar desactivada:

1. Emisión fluorescente, que consiste en la emisión de un fotón de energía menor que la correspondiente al fotón absorbido. Las moléculas capaces de emitir esta radiación fluorescente son aquellas en las que la diferencia entre los niveles energéticos $S_1(\nu_0)$ y $S_0(\nu_n)$ es suficientemente grande y además el estado excitado es "estable" durante un tiempo mayor, debido a la menor energía de los orbitales π^* que se ocupan durante el tiempo de excitación de la molécula.
 2. Cruzamiento entre sistemas. Este proceso consiste en una transición semejante a la conversión interna pero en la que, a la vez que se produce el salto electrónico, también tiene lugar un cambio de espín electrónico. El estado energético
-

que se alcanza es un estado triplete al que denominaremos T_1 , dado su comportamiento en un campo magnético externo. En este estado triplete T_1 los espines del par electrónico implicado en la transición son paralelos entre sí. Esta transición $S_1(v_0) \rightarrow T_1(v_n)$ es condición necesaria, aunque no suficiente, para que se produzca la emisión fosforescente ya que el número de moléculas que pueden acceder al estado T_1 , directamente por excitación desde S_0 es irrelevante. Una vez en el estado vibracional v_n del estado T_1 la molécula sufre una relajación vibracional dentro del propio estado electrónico T_1 y, a continuación, puede seguir varios caminos hasta conseguir su desactivación:

- Un cruzamiento entre sistemas en sentido inverso al anterior. Para ello las condiciones experimentales han de ser adecuadas y, si se produce, la molécula caerá hasta el nivel vibracional más bajo del estado fundamental sin que se produzca emisión radiativa. La duración de este proceso es similar a la de emisión fosforescente.
- La segunda posibilidad que tiene la molécula para su desactivación desde el estado $T_1(v_0)$ es la desactivación no radiativa producida por procesos tales como colisiones bimoleculares, formación de excímeros, o cualquier otro tipo de proceso desactivante cuyo resultado es la desactivación molecular sin emisión de radiación.
- Si las condiciones son adecuadas, la última alternativa para la desactivación molecular desde $T_1(v_0)$ hasta S_0 , es que se produzca una transición electrónica con cambio de espín y emisión fosforescente, fenómeno este que constituye la base de nuestras medidas.

Si consideramos la serie de circunstancias, tanto moleculares como ambientales, que deben concurrir para que una molécula produzca una emisión fosforescente:

1. Excitación molecular desde el estado S_0 al S_1 por absorción de un fotón
-

($h\nu_0$).

2. Relajación vibracional hasta alcanzar el estado S_1 de menor energía vibracional.
3. Cruzamiento entre sistemas y una relajación vibracional para llegar al estado de menor energía vibracional de T_1 y, finalmente,
4. Desactivación radiativa desde T_1 hasta S_0 sin que se produzca ningún otro proceso de los anteriormente indicados.

Llegamos a la conclusión de que la emisión fosforescente tiene que ser un proceso lento (tiene una duración comprendida entre 10^{-4} y 10^2 segundos) y amenazado por cualquier otro proceso de desactivación no radiativa, a los que hemos aludido con anterioridad, cuya ejecución es mucho más rápida que la emisión fosforescente.

Por consiguiente, para que se produzca fosforescencia, han de darse una serie de circunstancias entre las que cabe destacar las siguientes:

- La molécula ha de tener una estructura molecular adecuada -rigidez, planaridad, enlaces π conjugados, etc.- para que, una vez que ha sido excitada hasta el estado S_1 , pueda permanecer en este estado el tiempo suficiente para inducir en ella la transición al estado T_1 .
- Las condiciones ambientales en las que se encuentra la molécula han de propiciar el cambio de espín electrónico.
- Así mismo, estas condiciones ambientales han de ser tales que, una vez alcanzado el estado triplete de menor energía vibracional, mantengan la molécula "protegida" de tal forma que no sufra una desactivación por procesos colisionales, de formación de excímeros, ect.

En lo anteriormente expuesto hemos resumido las diferentes posibilidades de las que dispone una molécula para su desactivación tras haber sido excitada por

absorción de radiación ultravioleta-visible, pero no hemos hablado del comportamiento colectivo que presenta un enorme conjunto de moléculas ($\sim 10^{18}$) cuando son observadas macroscópicamente; comportamiento este que es el responsable tanto de las absorciones como de las emisiones de energía radiante.

La emisión fosforescente que nosotros vamos a utilizar como señal analítica no proviene de las transiciones experimentadas por una sola molécula, ni tan siquiera de un número restringido de ellas, sino de la acción conjunta de ese elevado número de moléculas que actúan de forma conjunta aunque no simultánea.

Al estudiar los procesos de excitación y emisión a escala macroscópica, no hemos de olvidar que no todas las moléculas de una muestra van a presentar un comportamiento semejante, sino que su comportamiento responderá a una forma de actuar por grupos, es decir, existirán grupos de moléculas, más o menos extensos, cada uno de los cuales optará por uno de los posibles caminos de desactivación anteriormente indicados. El hecho de que observemos un fenómeno de fosforescencia, fluorescencia o una simple absorción de energía sin emisión fotoluminiscente, dependerá de la magnitud del grupo de moléculas que se desactiven de una u otra forma.

En consecuencia, cuando medimos la fosforescencia emitida por una determinada muestra, bajo determinadas condiciones experimentales, lo que realmente estamos midiendo son los fotones, de una energía dada, emitidos, bajo el ángulo sólido de captura del detector, por uno de los grupos de moléculas de la muestra en la unidad de tiempo, lo cual no impide que otros grupos de moléculas, menos numerosos que el que emite la fosforescencia, se desactiven por otros mecanismos diferentes al fosforescente. El predominio de un fenómeno sobre otro sólo depende del número de moléculas que se desactiven por uno u otro camino, de ahí la necesidad de optimizar todas las variables experimentales que influyen en la emi-

sión de fosforescencia para que la fracción de moléculas que sigan este camino de desactivación sea la máxima posible y el instrumento capte su emisión en las unas condiciones óptimas que garanticen la calidad de las medidas experimentales. En cualquier caso hemos de tener presente que la emisión fosforescente es un fenómeno de tipo probabilístico, en el que un elevado número de moléculas de una muestra emite un fotón cada una de ellas, pero esta emisión no es simultánea sino espaciada a lo largo de un intervalo de tiempo que puede oscilar entre unas diez-milésimas de segundo y algunos minutos. Ahora bien, el número de fotones por segundo emitidos durante el intervalo de emisión no es constante sino que presenta una distribución como la que podemos observar en la figura I.2, es decir, una vez que la muestra ha sido excitada, se producen los procesos de desactivación fosforescente y transcurridos unos 10^{-4} segundos, comienza la emisión fosforescente, alcanzado rápidamente un máximo y decreciendo lentamente después.

Evidentemente tanto el crecimiento para alcanzar el máximo como el decrecimiento posterior depende en parte de la naturaleza íntima de las moléculas fosforescentes. Por lo tanto, para tener un mejor conocimiento del fenómeno fosforescente, vamos a recordar previamente el comportamiento conjunto de las moléculas para optimizar mejor su utilización analítica. En este estudio hemos de tener siempre presente que la emisión fosforescente se produce con un cierto retraso con respecto al momento en que las moléculas de la muestra son excitadas y que este retraso es muy considerable en fosforescencia razón por la cual los pasos que hemos de seguir para efectuar una medida de fosforescencia son: 1º) Excitar las moléculas mediante un pulso de luz durante un intervalo de tiempo inferior al tiempo en el que las moléculas comienzan a emitir fosforescencia. 2º) Cortar dicha excitación externa y 3º) Medir la radiación emitida.

Para llevar a cabo estas operaciones de excitación durante un corto intervalo de

tiempo, cese de la excitación y posterior medida de la radiación emitida se ha desarrollado dispositivos mecánicos que, al girar alrededor del contenedor de muestra, dejaban pasar radiación o la interrumpían para que se efectuase la medida. Sin embargo, aunque históricamente estos dispositivos mecánicos son los primeros que se utilizaron para medidas de fosforescencia a baja temperatura, en la actualidad los espectrofosforímetros no utilizan este tipo de sistema de corte de la radiación, sino que disponen de un sistema de generación de energía luminosa modulada en pulsos de corta duración ($\sim 10^{-6}$ s), que se producen de forma secuencial a intervalos constantes de tiempo. Para ello suelen incorporar como fuente de energía radiante una lámpara pulsante de xenón que, mediante un circuito electrónico adecuado, genera descargas eléctricas entre los dos electrodos de la lámpara para que esta emita los pulsos de radiación.

El tiempo transcurrido entre el comienzo de un pulso y el comienzo del siguiente constituye un ciclo durante el cual el instrumento lanza un pulso de excitación a la muestra y, a continuación mide la radiación emitida por esta antes de que comience el pulso siguiente.

La intensidad de fosforescencia emitida se mide después de que cese el pulso de excitación y antes de que comience el siguiente ciclo y para ello se abre la entrada de radiación al detector durante un determinado intervalo de tiempo denominado *tiempo de apertura del detector* (t_g). El tiempo transcurrido entre el cese del pulso de excitación y el comienzo de la medida se denomina *tiempo de retraso de lectura* (t_d). Ambos tiempos se pueden seleccionar adecuadamente por el experimentador, dentro de unos límites impuestos por el diseño del propio instrumento y constituyen unos de los parámetros instrumentales, característicos del fenómeno fosforescente, que más influyen en la intensidad de la señal analítica a la vez que permiten un incremento de la selectividad del método analítico.

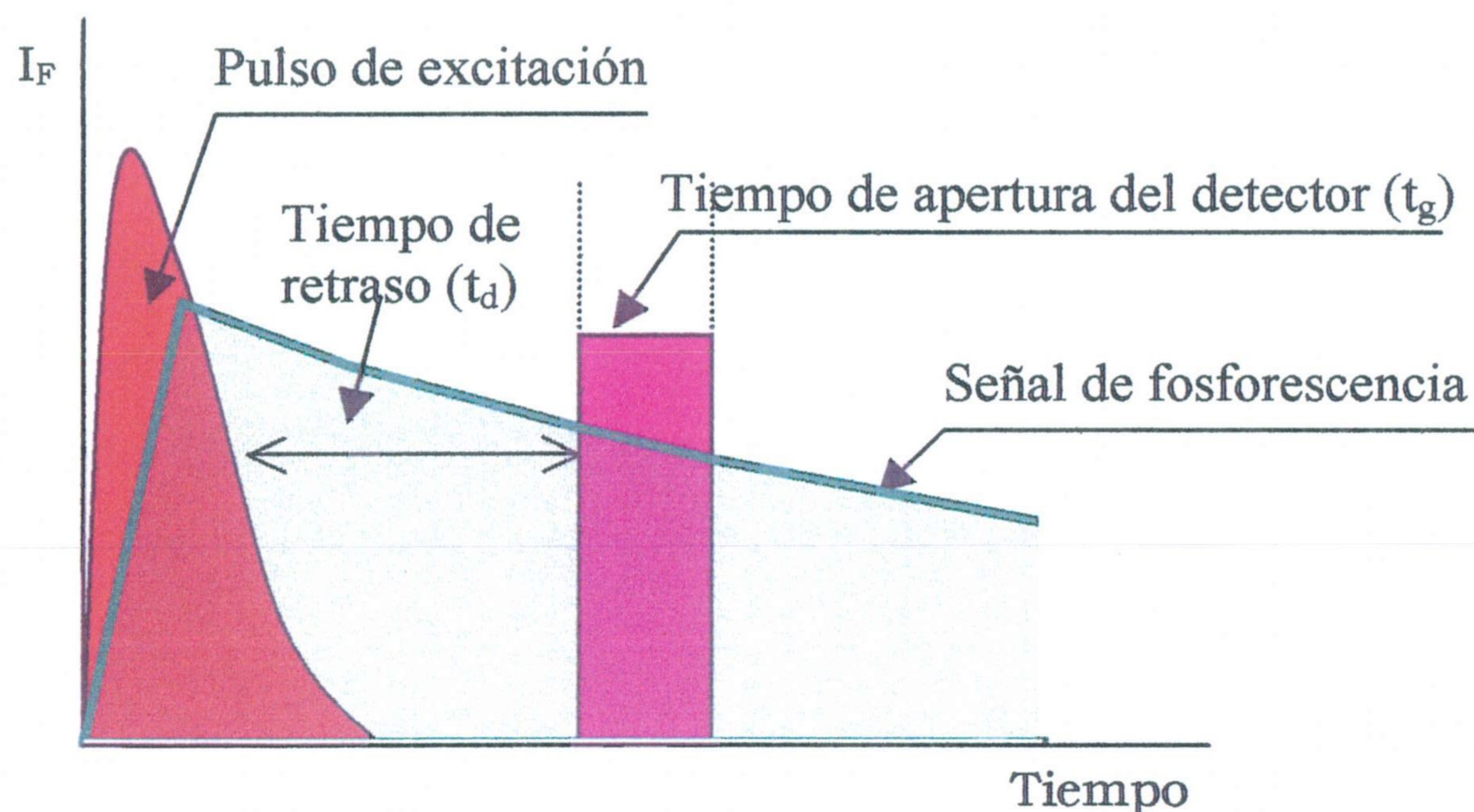


Figura I.2 Esquema de un pulso de fosforescencia con los tiempos de excitación, retraso en la lectura y apertura del detector.

Por otra parte, la caída que experimenta la intensidad de fosforescencia emitida una vez que cesa la excitación, no es la misma para todas las especies fosforescentes ya que dicho decaimiento puede ser más o menos rápido dependiendo de la naturaleza de la molécula emisora. La cuantificación de esta mayor o menor duración de la emisión fosforescente se hace mediante el *tiempo de vida media de la fosforescencia*. Este tiempo de vida media que se representa por (τ_F) se puede definir como el tiempo requerido para que, bajo unas condiciones predeterminadas, la intensidad de fosforescencia disminuya hasta $1/e$ de su valor inicial, o sea,

$$\frac{I_F(t)}{I_F(0)} = e^{-t/\tau_F} \quad (\text{Ec I.2})$$

donde $I_F(0)$ y $I_F(t)$ son, las intensidades de fosforescencia inicial y al cabo de un tiempo t , respectivamente y e es la base de los logaritmos neperianos. Cuando transcurra un tiempo $t = \tau_F$ el cociente $I_F(t)/I_F(0)$ valdrá $1/e$ como se indicó ante-

riormente.

Hasta este instante, sólo nos hemos referido al origen molecular de la fosforescencia y hemos citado algunas de las variables intrínsecas al fenómeno que derivan de la forma en que se efectúa la medida, pero no hemos de olvidar que existen otras variables experimentales relacionadas con la muestra o con el instrumento que también influyen decisivamente en la medida de intensidad de fosforescencia. Nos estamos refiriendo a parámetros experimentales tales como intensidad de radiación de la lámpara, anchura de las rendijas, ángulo sólido del detector, inclinación del plano del sensor en el que se ha preconcentrado la muestra, etc., que dependen tanto del propio instrumento como de las condiciones de la muestra que, en nuestro caso es un sensor plano.

En el esquema de la figura I.3, se puede ver la influencia de las rendijas de excitación y emisión sobre la intensidad de radiación emitida. En efecto, de toda la radiación producida por la fuente (I_0) sólo una fracción de ella atraviesa la rendija R_1 y alcanza el monocromador simbolizado en la figura por el prisma. Cuando este haz de luz seleccionado alcanza el elemento monocromador y se produce la dispersión de las diferentes longitudes de onda, sólo un estrecho haz monocromático atraviesa la rendija R_2 y llega hasta la muestra representada por Z en la citada figura. La intensidad de este haz (I_0k) es una fracción de la radiación inicial cuyo factor k es un parámetro que engloba los siguientes parámetros: ángulo sólido bajo el cual llega radiación a la rendija de entrada (R_1) del monocromador de excitación, dispersión recíproca lineal y transmitancia del elemento dispersante y anchura de la rendija de salida (R_2).

A la salida de R_2 el haz de excitación incide sobre la superficie de la muestra, un sensor plano en nuestro caso, que recibe una intensidad de radiación monocromática de intensidad I_0k_0 .

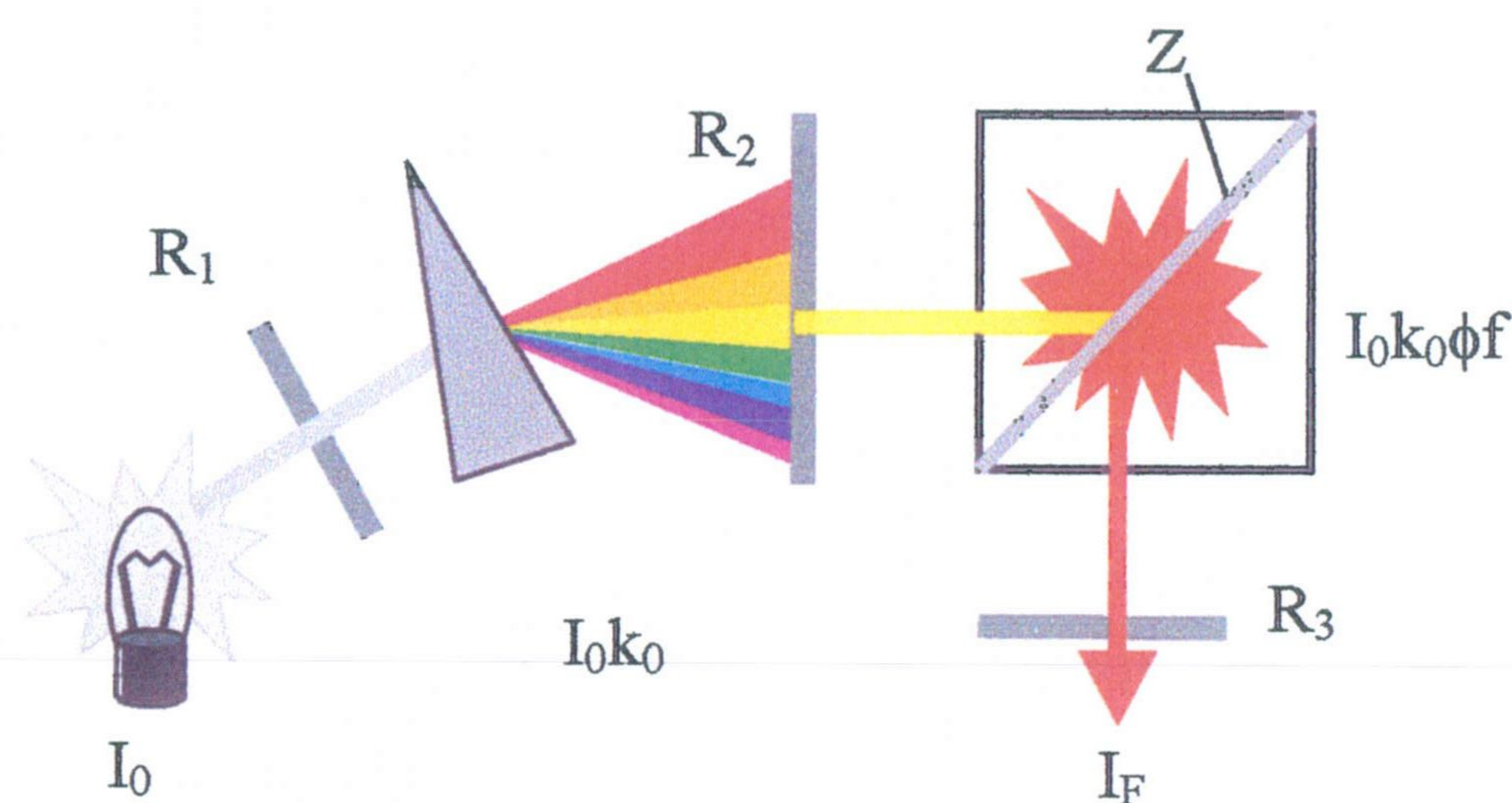


Figura I.3 Proceso de medida de fosforescencia

Parte de ella será reflejada en la superficie del sensor, otra parte será absorbida por una fracción de las moléculas de la especie fosforescente que se encuentren en el espacio barrido por el haz incidente y se producirá el fenómeno de excitación de esta fracción de moléculas. Una tercera fracción será absorbida por concomitantes presentes en la muestra así como por el soporte sólido del sensor y el resto de la energía radiante atravesará la superficie posterior del sensor sin ser absorbida. De todas estas fracciones de radiación sólo la absorbida por moléculas de analito será la que produzca la excitación necesaria para iniciar el proceso fosforescente.

Para conocer el valor de la fracción de moléculas que emite fosforescencia vamos a definir previamente un parámetro físico-químico conocido como: *rendimiento cuántico de fosforescencia* (ϕ_F), intrínseco al fosforóforo para unas condiciones experimentales dadas, cuyo valor viene dado por la expresión:

$$\phi_F = \frac{nf_F}{nf_A} \quad (\text{Ec. I.3})$$

donde: nf_A el número de fotones absorbidos por las moléculas del analito y nf_F es el número de fotones emitidos como radiación fosforescente.

En el caso de fosforescencia en fase sólida, que es nuestro caso, la fracción de moléculas que absorben un fotón y posteriormente emiten fosforescencia, depende no sólo del rendimiento cuántico de fosforescencia de la especie en cuestión sino también de las propiedades ópticas del medio (45). Los sensores planos utilizados en esta Memoria se pueden considerar como medios transparentes y homogéneos, ya que están formados por una fina película de un material transparente (PVC) adherido sobre un soporte sólido que también es transparente a las radiaciones que vamos a estudiar. En estas condiciones podemos admitir que se cumple la ley de Beer, con lo cual la intensidad de radiación absorbida el analito vendrá dada por la expresión:

$$I_a = I_i (1 - e^{-2,303\epsilon bC}) \quad (\text{Ec. I.4})$$

donde, $I_i = I_0k_0$ es la intensidad de radiación monocromática que incide sobre la muestra e I_a es la intensidad absorbida por el analito, C es la concentración de analito, b es el espesor de la muestra y ϵ el coeficiente de absorptividad molar de la especie química en estudio. La anterior expresión la podemos simplificar quedándonos con el primer término del desarrollo en serie el término entre paréntesis y despreciando los restantes dada su escasa influencia sobre el fenómeno. En tal caso nos queda:

$$I_a = 2,303 I_0\epsilon bC \quad (\text{Ec. I.5})$$

que nos expresa la fracción de radiación monocromática absorbida por la muestra cuyo valor es proporcional a la concentración de analito. En esta aproximación, el error cometido al despreciar los términos superiores del desarrollo en serie es del orden del 2% en el más desfavorable de los casos.

Teniendo en cuenta el concepto de rendimiento cuántico que vimos anterior-

mente y aplicándolo a nuestro caso nos queda que la intensidad de fosforescencia total emitida por la muestra, en todas direcciones, será:

$$I_{Ft} = \phi_F I_a = 2,303 \phi_F I_0 \epsilon b C \quad (\text{Ec. I.6})$$

Una fracción de esta radiación total atraviesa la rendija de entrada al monocromador de emisión (R_3) y es dispersada en dicho monocromador y sólo la fracción monocromática de la longitud de onda apropiada es la que finalmente alcanza el detector y se registra como intensidad de fosforescencia I_F constituyendo así la señal analítica medida por el instrumento.

La magnitud de esta fracción de radiación, depende de una serie de factores entre los que podemos citar los siguientes: dispersión y transmitancia del monocromador de emisión, procesos de autoabsorción, procesos de absorción por parte del soporte sólido o de cualquier otra especie presente en la muestra, anchura de la rendija de salida del monocromador de emisión, ángulos que forma el plano del sensor que contiene la muestra con los haces de excitación y emisión (46) y, finalmente, rendimiento del detector para la longitud de onda de medida.

Suponiendo que los ángulos que forma el plano del sensor con los haces de excitación y emisión están optimizados en relación al ancho de las rendijas, nos queda finalmente que la intensidad de radiación fosforescente medida en el detector esta dada por la expresión:

$$I_F = f \phi_F I_a = 2,303 f \phi_F I_0 \epsilon b C \quad (\text{Ec. I.7})$$

siendo f un factor geométrico que engloba todos los parámetros geométricos e instrumentales a los que nos hemos referido anteriormente.

Finalmente, nos falta estudiar los factores intrínsecos a la muestra y su entorno físico-químico que afectan a la intensidad de fosforescencia. Dentro de este grupo vamos a considerar en primer lugar los factores que influyen en el proceso de absorción de radiación y, en segundo lugar, estudiaremos aquellos otros que afectan

al proceso fosforescente. Los del primer grupo son los mismos factores que afectan a cualquier proceso de absorción molecular ultravioleta-visible, es decir, absorptividad molar del analito (ϵ) y naturaleza y estructura de la molécula absorbente y los del segundo grupo, son los factores que afectan específicamente al proceso de emisión fosforescente.

La radiación fotoluminiscente se ve favorecida cuando en la molécula del analito se dan las siguientes condiciones estructurales:

- Presencia de anillos aromáticos que posibilitan transiciones de baja energía $\pi \leftrightarrow \pi^*$ o $n \leftrightarrow \pi^*$ al absorber un fotón.
- Planaridad molecular que favorezca la deslocalización de los enlaces π .
- Rigidez estructural que impida el libre giro alrededor de enlaces y la consiguiente desactivación no radiativa de la molécula.
- Ausencia de cadenas laterales unidas al núcleo central de la molécula.

Si en una determinada molécula se cumplen estas condiciones estructurales, no sólo se favorece su capacidad de absorción de radiación sino que además, la molécula presenta las características ideales para no desactivarse rápidamente mediante un proceso de conversión interna.

Estas condiciones estructurales de la molécula del analito no podemos modificarlas ya que están impuestas por el propio analito y en ellas no podemos influir para optimizar la intensidad de la emisión fosforescente, pero no ocurre así con las condiciones del entorno molecular ya que sobre este entorno sí podemos actuar favoreciendo uno u otro proceso. Por ello vamos a ver a continuación la influencia que pueden ejercer estos factores sobre el rendimiento cuántico de fosforescencia.

Las condiciones del entorno físico-químico que pueden influir en la emisión fosforescente son, principalmente, las siguientes:

- pH del medio especialmente si la molécula posee grupos sustituyentes de ca-
-

rácter ácido o básico.

- Presencia de oxígeno y/o humedad, factor este de gran importancia en el caso de fosforescencia incluso en fase sólida.
- Presencia de átomo pesado en la muestra, para inducir la transición $S_1 \rightarrow T_1$ potenciando así el proceso fosforescente, en detrimento de la emisión fluorescente, debido al acoplamiento espín-orbital.
- Temperatura de la muestra, ya que un aumento de la misma favorece el número de colisiones desactivadoras de las moléculas.

Como se puede ver en el diagrama de Jablonski que anteriormente hemos incluido, el rendimiento cuántico de fosforescencia depende de los siguientes factores:

1º) Rendimiento cuántico de formación del estado triplete a partir del singlete excitado y

2º) Constantes de velocidad de los procesos que compiten con el fosforescente para desactivar la molécula una vez que esta se encuentra en el estado triplete. En consecuencia podemos escribir:

$$\phi_F = \frac{k_{ces}}{k_{ces} + k_f + k_{cif}} \frac{k_F}{k_F + k_{ciF} + \sum_A k_A [A]} \quad (\text{Ec. I.8})$$

donde: k_F es la constante de velocidad del proceso de emisión fosforescente; k_f es la constante correspondiente al proceso de emisión fluorescente; k_{cif} y k_{ciF} son las constantes de desactivación unimolecular de fluorescencia y fosforescencia respectivamente por conversión interna; k_{ces} es la constante del proceso de cruzamiento entre sistemas para la formación del estado triplete desde el estado singlete excitado y k_A son las constantes de los distintos procesos de desactivación por colisiones producidas con especies presentes en la muestra que tengan la capacidad de atenuar el proceso fosforescente cuando la molécula se encuentra en el estado

tripleto. Aunque las constantes k_f , k_F y k_{ces} dependen de la estructura molecular pueden ser afectadas por el entorno (47). Por el contrario, las constantes k_{cif} y k_{ciF} dependen principalmente del entorno y, en una pequeña proporción, de los estados electrónicos de la molécula. Por último, las diferentes constantes k_A dependen exclusivamente de la presencia de desactivantes, del estado de agregación de la muestra (sólida o en disolución), de propiedades físicas de la misma tales como temperatura, viscosidad y de la presencia de medios organizados (ciclodextrinas, micelas, etc.). Cada una de estas constantes la podemos expresar como sigue:

$$k_A = c \frac{T}{\eta} \quad (\text{Ec.I.9})$$

siendo T la temperatura absoluta, η la viscosidad del medio en el que se encuentra el fosforóforo y c una constante que depende de la naturaleza de la sustancia que produce la atenuación de señal fosforescente. De esta ecuación se desprende que para obtener un alto rendimiento cuántico de fosforescencia, o lo que es lo mismo, una alta intensidad de fosforescencia, independientemente de otros parámetros, hay que disminuir las concentraciones de las especies atenuantes y la temperatura de la muestra a la vez que hay que aumentar su viscosidad, factor este que se verá incrementado al máximo si la muestra se encuentra en estado sólido.

Por las razones anteriormente apuntadas, el uso de la fase sólida para el estudio de fenómenos fosforescentes a temperatura ambiente, ha despertado interés en los últimos años ya que su aplicación analítica presenta unas características especiales que le hacen muy útil para el análisis de trazas de contaminantes orgánicos en muestras reales de interés analítico: linealidad de respuesta, alta sensibilidad y aceptable selectividad.

La fosforescencia en matrices sólidas se observó por primera vez en una matriz congelada a la temperatura del nitrógeno líquido, fosforescencia a baja tempe-

ratura, pero esta forma de producir el fenómeno fosforescente es poco viable dada la necesidad de un equipo criogénico y los diferentes problemas que se presentan cuando se introduce la muestra en el instrumento de medida a la temperatura señalada. De ahí el gran interés por la observación de fosforescencia a temperatura ambiente en muestras preparadas mediante la deposición, absorción adsorción o inclusión de los analitos fosforescentes sobre un soporte sólido que actúe como sustrato.

Los materiales utilizados en este sentido han sido muy variados (48) así como las formas ensayadas para fijar los analitos sobre ellos. Se ha estudiado la fosforescencia a temperatura ambiente producida por compuestos absorbidos sobre papel de filtro, gel de sílice, acetato sódico, yeso, óxido de aluminio, almidón, sacarosa y mezclas de sales poliméricas entre otros materiales, aunque el sustrato más utilizado ha sido sin duda el papel de filtro (49-52).

En fosforescencia en fase sólida las propiedades fosforescentes del analito varían de acuerdo con las condiciones experimentales en las que se efectúa la medida y dependen del tipo de sustrato utilizado. Como veremos, la intensidad de fosforescencia emitida está relacionada con parámetros o condiciones tales como pH de la muestra antes de fijarse sobre la fase sólida, presencia de átomos pesados y las características estructurales de las propias moléculas fosforescentes, entre las que destacan polaridad, carga y presencia de heteroátomos.

Wellons y cols. (49) estudiaron la importancia de la existencia de carga en la molécula de analito durante la producción de fosforescencia y observaron que las mayores intensidades de fosforescencia se obtenían con compuestos de doble carga en presencia de hidróxido sódico 1 M, mientras que las especies neutras o con una carga mostraban una emisión muy débil. Por ello llegaron a la conclusión de que la principal interacción entre el soporte y un analito iónico se debe al enlace

de hidrógeno entre los grupos funcionales ionizados y los grupos hidroxilo del soporte.

Análogamente Ford y Hurtubise (53) observaron que los compuestos que se unen mediante enlaces de hidrógeno en cromatoplasmas de gel de sílice presentan una fosforescencia más intensa que aquellos otros, de características similares, que tienen grupos funcionales de menor polaridad y que, por tanto, presentan menor posibilidad de formar enlaces de hidrógeno. Es por esta razón por la que la atenuación de la fosforescencia que se observa por causa de la humedad, se atribuye a la ruptura de los enlaces de hidrógeno formados sobre la superficie del soporte (54). Las moléculas de agua son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las posiciones activas de la superficie del substrato y competir con el analito por estos mismos emplazamientos. En consecuencia, las interacciones soporte-analito disminuyen, aumentando la probabilidad de desactivación no radiante y decreciendo así la emisión fosforescente (55). La acción del agua es tan extrema que puede llegar a romper los enlaces de hidrógeno existentes entre las fibras de celulosa, disminuyendo de este modo la rigidez de la matriz y permitiendo una desactivación colisional por oxígeno que puede penetrar hasta las proximidades del fosforóforo.

Los numerosos inconvenientes que presenta el papel de filtro y las superficies de gel de sílice, alúmina, sacarosa, etc. en su uso como soporte, pueden ser paliados, al menos en parte, mediante la utilización de otros soportes sólidos tales como láminas de materiales poliméricos cuya transparencia a las radiación, tanto de excitación como de emisión, es total y cuya superficie no presenta las rugosidades propias de la superficie del papel de filtro. En este sentido el uso de sensores de tipo óptico constituye una alternativa que vamos a comentar brevemente.

Sensor óptico es todo dispositivo, por lo general de pequeño tamaño, que puede

medir de forma continua, reversible y en tiempo real, la concentración -o la actividad- de una especie química presente en muestras líquidas o gaseosas, transformando dicha información en una señal óptica analíticamente útil (56).

Como señal analítica podemos utilizar la absorbancia del sensor, la fluorescencia que emite bajo unas determinadas condiciones o cualquier otro tipo de señal óptica, como es el caso de la fosforescencia que vamos a utilizar en esta Memoria. El uso de la emisión fosforescente, como señal analítica en sensores, está poco extendido a pesar de su gran potencialidad para la determinación de trazas de especies orgánicas. No obstante, a pesar de su poca aplicabilidad hasta el momento, existen ejemplos de sensores fosforimétricos de diferentes tipos y formas externas que van desde los de tipo sonda hasta los de flujo, pasando por lo de tipo de gota plana cada uno de los cuales los vamos a comentar a continuación.

Campliglia y Vo-Dinh, (57) desarrollaron un sensor fosforimétrico para la determinación de compuestos aromáticos policíclicos que se basa la fosforescencia que presenta el analito cuando se fija sobre una tira de papel de filtro Whatman 4 en presencia de átomo pesado y colocando el sensor en un soporte adecuado provisto de fibra óptica en su extremo. La forma de actuar es como sigue: Tras sumergir la zona sensora en la disolución problema, se excita con un láser pulsante de nitrógeno y simultáneamente se mide la fosforescencia originada.

Sensores intrínsecos y de un solo uso, similares a los que acabamos de describir son los desarrollados por L.F. Capitán y col. (58-62) para la determinación de diferentes pesticidas, como son carbaril, morestan, tiabendazol, warfarina y mezclas de algunos de ellos. La metodología seguida consiste en depositar sobre una tira de papel de filtro una alícuota de muestra y agregar, en caso de ser necesario, los reactivos necesarios o la disolución de átomo pesado y, tras secar la tira de papel con una corriente de aire, colocar la tira entre dos láminas de cuarzo y colocar-

las en el compartimento de muestras del espectrofosforímetro para medir la fosforescencia difusa emitida por el analito.

Más habituales que los sensores intrínsecos son los de tipo extrínseco en los que la fosforescencia se origina tras una reacción de complejación que se produce en el propio sensor. Uno de los ejemplos más simples de este tipo de sensores fosforescentes es el que usa un polímero de órganosilicio para la determinación de uranilo en muestras ambientales para la determinación de uranilo tras su complejación (63).

En configuraciones de tipo FIA (Análisis por inyección en flujo) se puede usar una resina Chelex 100 empaquetada en una cubeta de flujo en la que se ha inmovilizado tenoiltrifluoroacetona para la determinación de europio (III), alcanzándose un límite de detección de 10^{-9} M con un tiempo de respuesta de 1 minuto (64). En el caso de fijar sobre la resina 1,4-bis-(1'-fenil-3'-metil-5'-pirazolona-4'-)-butanodiona podremos determinar gadolinio (III) en muestras sintéticas (65).

De forma semejante se pueden determinar compuestos orgánicos capaces de formar complejos mediante la inmovilización de este último con un ion metálico, como es el caso de la determinación fosforimétrica de antraciclinas (66) o de tetraciclinas (67) mediante la fijación de sus complejos de Eu (III).

Una segunda alternativa metodológica, aunque históricamente una de las más antiguas, para el desarrollo de sensores fosforescentes consiste en utilizar la atenuación de la intensidad de fosforescencia como señal analítica cuantificable, haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer. El fundamento de estos métodos se encuentra en los descubrimientos de Kautsky en los años 30 del pasado siglo, según los cuales determinados colorantes, -tripaflavina, safranina, clorofila, benzo-flavina y hematoporfirina, entre otros, cuando se encuentran absorbidos sobre soportes sólidos tales como sílice ó alúmina, muestran fosforescencia si se encuen-

tran bajo atmósfera de nitrógeno (68). Evidentemente la necesidad de nitrógeno para poder efectuar la medida de fosforescencia se debe a que, en presencia de oxígeno, la fosforescencia se atenúa sensiblemente como hemos tratado de exponer anteriormente. Por este motivo estos fenómenos luminiscentes han sido la base para el diseño de sensores para la determinación de oxígeno, alcanzándose límites de detección de este elemento comprendidos entre 0,004 y 0,0005 torr (69). Existen otros sistemas para la cuantificación de oxígeno basado en la atenuación de señal fosforescente:

- Usando naranja de acridina adsorbido fijado sobre Silochrome S-120 con el que se pueden monitorizar oxígeno de forma continua, si su concentración se mantiene entre 0,06 y 1,00 $\mu\text{g/L}$.(70)
 - Usando fenantreno perdeuterado absorbido sobre papel Whatman 1PS con el que se ha encontrado un límite de detección de 0,09% de oxígeno en nitrógeno(71).
 - Usando canforquinona como fosforóforo, con lo que se logra un rango de trabajo de 0,1 – 25% (72).
 - Utilizando quelatos de metales en los que también se mide la atenuación de fosforescencia, como es el caso de los complejos de paladio (II) y platino (II) con porfirincetonas y, sobre todo, sus derivados fluorosustituidos, con los que se alcanzan rendimientos cuánticos de fosforescencia superiores al 10%, se pueden determinar cantidades traza de oxígeno en diferentes tipos de muestras (73).
 - Usando membranas plásticas de acetato butirato de celulosa, polimetilmetacrilato u otros polímeros igualmente se han desarrollado sensores para la determinación de oxígeno en bajas concentraciones (74,75).
 - Otros quelatos igualmente usados en la determinación de oxígeno son los
-

que forman los metales Al (III), Ga (III), Zr (IV) y Nb (V) con ferrón (8-hidroxi-7-yodo-5-quinolinsulfónico) cuando se encuentran encapsulados en películas de silicona, fijados en resinas de cambio aniónico o en vidrio de tipo sol-gel, e incluso en disoluciones micelares acuosas u orgánicas. Mediante estos sensores se han conseguido alcanzar límites de 0,0005 % en fase gas y $< 0,01$ mg/L en agua (76,77).

El sensor de oxígeno basado en atenuación de fosforescencia del complejo Ferrón-Al fijado sobre una resina de cambio aniónico se ha utilizado para la determinación enzimática de colesterol. Su funcionamiento es como sigue: la enzima colesterol oxidasa inmovilizada en vidrio de poro conocido cataliza la oxidación del colesterol y ello provoca un descenso del nivel de oxígeno que se detecta y mide mediante el complejo que se encuentra inmovilizado en una cubeta de flujo (78).

Otra aplicación de la medida de la atenuación de fosforescencia, además de la citada para obtener sensores de oxígeno, es la de los sensores para determinación de sulfito ya que esta especie química atenúa considerablemente la señal del complejo platino (II) cuproporfirina cuando está conjugado con albúmina de suero bovino fijado en una membrana de inmunoafinidad (79).

Finalmente digamos que los complejos formados por porfirinas con paladio o platino han servido para construir membranas sensoras tipo Langmuir-Blodgett, utilizadas para la determinación de óxidos de nitrógeno en las que se mide también la atenuación de la fosforescencia del complejo (80).

Como podemos apreciar, hasta este momento, no son muy numerosas las aplicaciones analíticas de la fosforimetría a pesar de que se trata de una técnica de gran sensibilidad, eficiencia y utilidad práctica para la identificación y cuantificación de un gran número de compuestos orgánicos, tanto si se encuentran en mues-

tras simples como en muestras de gran complejidad.

Los aspectos analíticos de esta técnica así como sus aplicaciones en diferentes campos han sido revisados por diversos autores entre los que cabe desatacar los siguientes: Vo-Dinh (81), Vo-Dinh y Winefordner (82) y Hurtubise (83), por ello aquí nos vamos a limitar a señalar brevemente los principales campos analíticos en los que se ha usado la fosforimetría a temperatura ambiente, en las dos últimas décadas.

Entre los campos en los que se ha aplicado la fosforescencia a temperatura ambiente destacan los siguientes:

1. Un primer grupo formado por los campos farmacéutico, clínico y forense donde se ha utilizado la técnica para la determinación de ácido p-aminobenzoico, bencimidazol y derivados, teofilina, ácido salicílico, sulfamidas y diversas drogas de abuso tales como morfina y derivados, cannabis, feniletilaminas, etc. en muestras reales como manchas de sangre, fibras, cabellos etc. Como ejemplo, podemos citar la determinación de cocaína en saliva para conocer su contenido en sangre dada la correlación existente (84). En el campo farmacéutico cabe destacar la determinación de ácido nalidíxico en orina y en preparados farmacéuticos (25).
 2. En el campo del análisis ambiental la fosforimetría a temperatura ambiente ha sido usada para el control de la contaminación atmosférica producida por hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterociclos nitrogenados, en agua o en el aire de atmósferas industriales.
 3. En el análisis de pesticidas esta técnica se ha usado en la identificación y determinación de determinados pesticidas. Cabe citar en este punto la metodología propuesta por Aaron (85) que ha llevado a cabo un estudio comparativo de 32 pesticidas de los que se pueden determinar 18 de ellos por su
-

emisión fosforescente.

Igualmente Vannelli y Schulman (86) han estudiado el comportamiento de una serie de 18 pesticidas, sobre papel Whatman 42 utilizando diferentes cationes y aniones como iones pesados, llegando a alcanzar límites de cuantificación comprendidos entre 0,7 ng y 10 ng según el analito en cuestión.

Valores parecidos del límite de cuantificación han obtenido Su y col.(87) para pesticidas y sustancias tóxicas, utilizando como soporte sólido un papel cambiador iónico del tipo DE-81 y Pb(II) como átomo pesado.

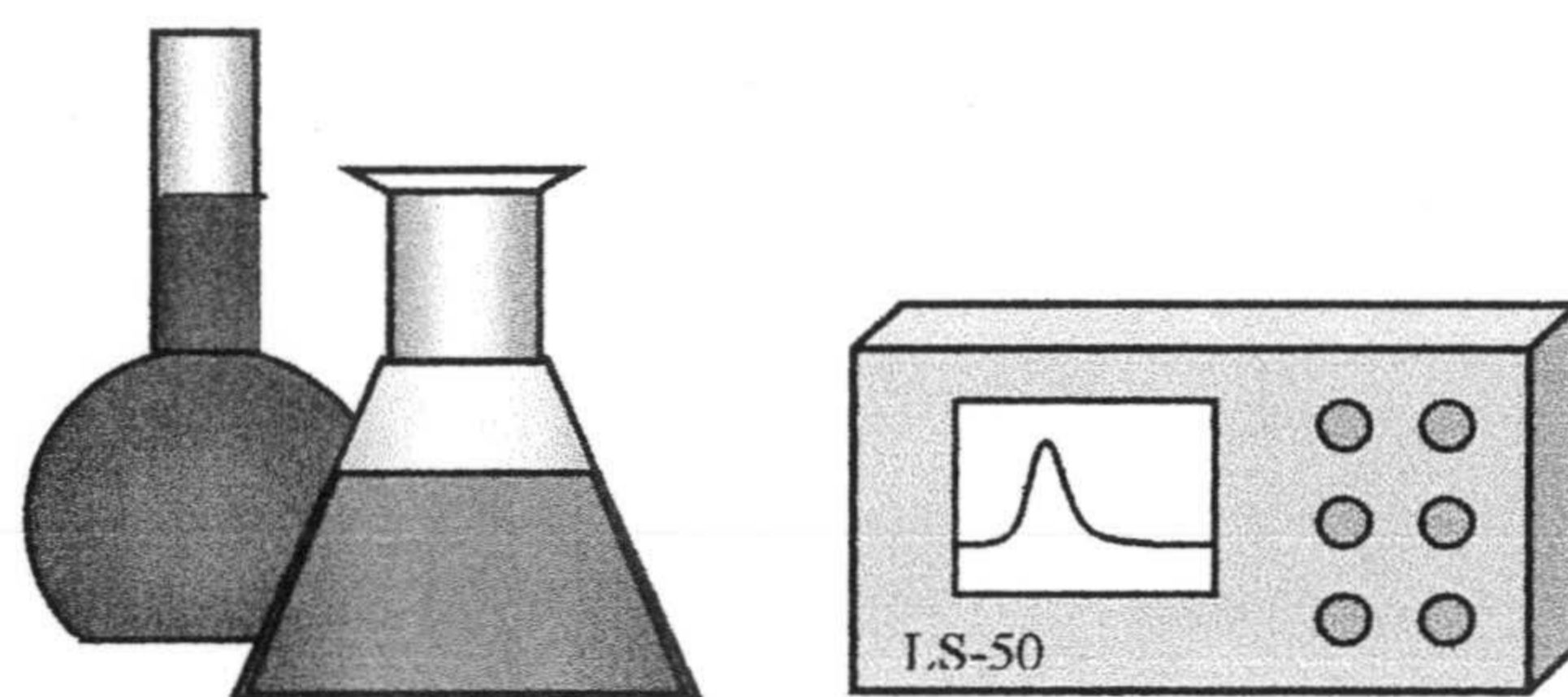
BIBLIOGRAFÍA

1. A. Goth; *Farmacología médica*, (1984) pags 547 y sig.
 2. C. Roy y C. Segura; *Medecine*, 73 (1986) 443.
 3. J.R. Price; *Australian J. Sci. Research*, 217 (1949) 272.
 4. G.Y. Leshner; E.J. Froelich; M.D. Gruett; J.H. Bailey y R.P. Brundage; *J. Med. Pharm. Chem.*, 5 (1962) 1063.
 5. E.W. McChesney, E.J. Froelich, G.Y. Leshner, A.V.R. Crain y D. Rossi, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 6 (1964) 292-309.
 6. M. Kaminsky; *US. Patent*, 3,287,458.
 7. D. Carlo y colaboradores; *Arch. Biochem. Biophys.* , 127 (1968) 503.
 8. C. Crew y colaboradores; *Xenobiotica*, 1 (1971) 193.
 9. C. Turner y colaboradores; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, (1967) 475.
 10. A. Goth; *Farmacología médica*, (1984) pags 561.
 11. S. Minami y colaboradores; *Japan patent* 67 25,912.
 12. M. Shimizu y col.; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, (1970) 117.
 13. M. Shimizu y col.; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, (1970) 123.
 14. E. Cantón; M. Marés; J. Román y M. Gobernador; *Enf. Infec. Microbiol. Clin.*, 6 (1984) 249.
 15. J.F. Gester; *Germany patent*, 2,264,163.
 16. G. Stilwell y col.; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 7 (1975) 483.
 17. <http://www.eudora.org/emea.html>
 18. G. Dondi y M. di Marco, *Boll. Chim. Farm.*, 105 (1966) 491.
 19. M.J.J. Vieira da Silva y M.T.C. Nogueira, *Rev. Port. Far.*, 15 (1965) 290.
 20. R.S. Browning y E.L. Pratt, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 53 (1970) 464.
 21. R. Staroscik y J. Sulkowska, *Acta Pol. Pharm.*, 30 (1973) 499.
 22. I. Durán; A. Muñoz; F. Salinas y M.I. Rodríguez; *Analyst*, 119 (1994) 1215.
 23. I. Durán; A. Muñoz; M.I. Rodríguez y F. Salinas; *Talanta*, 45 (1998) 899.
 24. I. Durán; A. Muñoz; F. Salinas y M.I. Rodríguez; *Analyst*, 125 (2000) 1471.
 25. L.F. Capitán-Vallvey; F. Ojeda; M. del Olmo; R. Avidad; A. Navalón y T. Vo Dinh; *Applied Spectr.* 52 (1998) 101.
 26. L. Shargel, R.F. Koss, A.V.R. Crain y V.J. Boyle, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1452.
 27. R.H.A. Sorel y H. Roseboom, *J. Chromatog.*, 162 (1979) 461.
 28. H. Roseboom, R.H.A. Sorel, H. Lingeman y R. Bouwman, *J. Chromatog.*, 163 (1979) 92.
 29. G. Cuisinaud, N. Ferry, M. Seccia, N. Bernard y J. Sassard, *J Chromatogr.*, 181 (1980) 399.
-

30. K. Mawatari, F. Iunuma y M. Watanabe, *Jpn. J. Clin. Chem.*, 21 (1992) 13.
 31. M. Horie; K. Saito; N. Nose; M. Tera y H. Nakazawa; *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 1463.
 32. F. Barbato; P. Morrica; S. Seccia y M Ventriglia; *Il Farmaco*, 49 (1994) 407.
 33. D. Doerge y S. Bajic; *Rapid Commun Mass Spectr.*; 9 (1995) 1012.
 34. D.A. Volmer; B. Mansoori y S.J. Locke; *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4143.
 35. M.D. Rose; J. Bygrave y G.W.F. Stubbing; *Analyst*, 123 (1998) 2789.
 36. J.C. Yorke y P. Froc; *J. Chromatogr. A*; 882 (2000) 63.
 37. M. Touraki; M. Ladoukakis y C. Procopiou; *J. Chromatogr. B*; 751 (2001) 247.
 38. A.P. Argekar; S.V. Raj y S.U. Kapadia; *Indian Drugs*, 33 (1996) 167.
 39. H.K.L. Hunt y E.C. Barlow; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 12 (1981) 165.
 40. M. Vega; G. Rios; R. Saelzer y E. Herlitz; *J. Planar Chromatogr. MOD-TLC*; 8 (1995) 378.
 41. A.W. Sun y L.Y. Chen; *J. Chromatogr. A*; 766 (1997) 215.
 42. C. Fierens; S. Hillaert y W. Van der Bossche; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 22 (2000) 763.
 43. M. Hernández; F. Borrull y y M. Callul; *J. Chromatogr. B*; 742 (2000) 255-258.
 44. P. Corti; G. Corbini; P. Gratteri; S. Furlanetto y S. Pinzauti; *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 83.
 45. T.V.Dinh. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Ed. John Wiley & Sons, (1984).
 46. M.K.A. Deheidel, *Tesis Doctoral. Aplicaciones de la fosforescencia en fase sólida a temperatura ambiente en el análisis de plaguicidas*. Universidad de Granada, Abril (2000).
 47. R. J. Hurtubise. *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*, VCH Publishers Inc. N.Y. (1990) 7.
 48. H. T. Karnes y S. G. Schulman. *Anal. Chim. Acta*, 164 (1984) 257.
 49. S. L. Wellons, R. A. Paynter y J. D. Winefordner, *Spectrosc. Acta* 30A (1974) 2133.
 50. S. Y. Su y J. D. Winefordner, *Microchem. J.*, 27 (1982)151.
 51. A. M. Alak y T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, 60, (1988) 596.
 52. G. Ramis y I. M. Khasawneh, *Talanta*, 35 (1988) 41.
 53. C. D Ford y R. J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 50 (1978) 610.
 54. E. M. Schulman y R. T. Parker, *J. Phys. Chem.*, 81 (1977) 1932.
 55. A. Pal, W. Watts, J. Caraway y Vo-Dinh, *Analisis* 20 (1992) 149.
 56. *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. I Editor O. S. Wolfbeis, CRC Press, (1991).
-

57. A.D. Campliglia y T. Vo-Dinh, *Talanta*, 43 (1996)1805.
 58. L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A.Deheidel y R. Avidad *Mikrochim. Acta*, 130 (1999) 273.
 - 59 L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A.Deheidel y R. Avidad, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 307.
 - 60 L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A.Deheidel y R. Avidad *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 37 (1999) 1.
 - 61 L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A.Deheidel y R. Avidad, *Anal. Lett.*, 31 (1998) 2767.
 - 62 L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A.Deheidel y R. Avidad, *Analyst*, 124 (1999) 49.
 - 63 A.F. Arruda, A.D. Campliglia, B.P.S. Chauhan y P. Boudjouk, *Anal. Chim. Acta*, 396 (1999) 263.
 - 64 R. Pereiro García, Y. Liu, M. Díaz García y A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 63 (1991)1759.
 - 65 Z. Gong y Z. Zhang, *Mikrochim. Acta*, 126 (1997)117.
 - 66 F. Alava-Moreno, M.J. Valencia-Gonzalez y M.E. Díaz-García, *Analyst*, 123 (1998)151.
 - 67 F. Alava-Moreno, y A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta*, 281 (1993) 367.
 - 68 H. Kautsky y H. Hirsch, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 222 (1935) 126.
 - 69 I.A. Zakharov y T.I. Grihaeva, *Zh. Anal. Khim.*, 36, (1981) 112.
 - 70 I.A. Zakharov y T.I. Grihaeva, *Zh. Anal. Khim.*, 37 (1982) 1753.
 - 71 S.M. Ramasamy y R.J. Hurtubise, *Talanta*, 47 (1998) 971.
 - 72 J.M. Charlesworth, *Sens Actuators B*, 22, (1994) 1.
 - 73 W.L. Rumsey, J.M. Vanderkroi y D.F. Wilson, *Science*, 241 (1988) 1643.
 - 74 W. Trettnak y P. O'Leary, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4112.
 - 75 A. Mills y A. Lepre, *Anal.Chem.*, 69 (1997) 4653.
 - 76 M.E. Díaz-García y A. Sanz-Medel, *Anal.Chem.* 66 (1994) 836.
 - 77 J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García y A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta*, 360 (1998) 17.
 - 78 M.J. Valencia-Gonzalez y M.E. Díaz-García, *Anal.Chem.* 66 (1994) 2726.
 - 79 D. Papkovsky, M.A. Uskova, G.V. Ponomarev, T. Korpela, S. Kulmala y G.G. Guilbault, *Anal.Chim. Acta*, 374 (1998) 1.
 - 80 D. Papkovsky, I.V. Desyaterik, G.V. Ponomarev, I.L. Kurochkin y T. Korpela, *Anal.Chim. Acta*, 310 (1995) 233.
 - 81 T.Vo-Dinh. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley Interscience; New York (1984).
 - 82 T. Vo-Dinh y J.D. Winefordner, *Appl. Spectros. Rev.*, 13 (1977) 261.
 - 83 R. J. Hurtubise. *Solid Surface Luminiscence Analysis: Theory, Instrumentation and Aplications*. Marcel Dekker; N.Y. (1981).
-

- 84 A.D. Campliglia y T. Vo-Dinh, *Talanta*, 43 (1996)1805.
85 J.J. Aaron, E.M. Kaleel y J.D. Winefordner, *Agric. Food Chem.*, 27 (1979)1233.
86 J.J. Vannelli, E.M. Schulman. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1030.
87 S. Y. Su y J. D. Winefordner, *Microchem.*, J 27, 151 (1982).
-



CAPÍTULO 1
METODOLOGÍA E INSTRUMENTACIÓN



Vamos a dedicar este primer capítulo a la exposición de la metodología analítica utilizada en la presente Memoria, junto con las metodologías utilizadas tanto en los procesos de calibración llevados a cabo en los diferentes métodos propuestos, como en el tratamiento estadístico de los resultados experimentales obtenidos. En cualquier caso la técnica analítica usada en la determinación del analito, o mezcla de analitos en estudio ha sido la espectrofosforimetría difusa, en fase sólida y a temperatura ambiente y como señal analítica se ha elegido la intensidad de fosforescencia transmitida por la zona sensora, una vez que el analito, o los analitos han sido fijados en ella.

Por otra parte, para el tratamiento de las señales analíticas, se ha propuesto un nuevo método de calibración consistente en obtener experimentalmente una superficie de respuesta, en la que podemos apreciar la variación que experimenta la señal analítica en función de la concentración de analito y del tiempo durante el cual el sensor permanece en equilibrio con la disolución de muestra para que se produzca la fijación del analito sobre la zona sensora. A partir de esta superficie podremos obtener el tiempo óptimo de medida, que dependerá de la concentración de analito en la muestra. Aunque a partir de esta superficie respuesta podemos obtener directamente la concentración de analito, también existe la posibilidad de obtener una recta de calibrado convencional y univariante a partir de la cual podremos deducir todos los parámetros analíticos que nos sean necesarios.

1.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.

1.1.1. Fosforimetría difusa en fase sólida.

La espectrofosforimetría en fase sólida (EFS) consiste en retener el analito, o los analitos, sobre un soporte sólido adecuado y efectuar las medidas de fosfores-

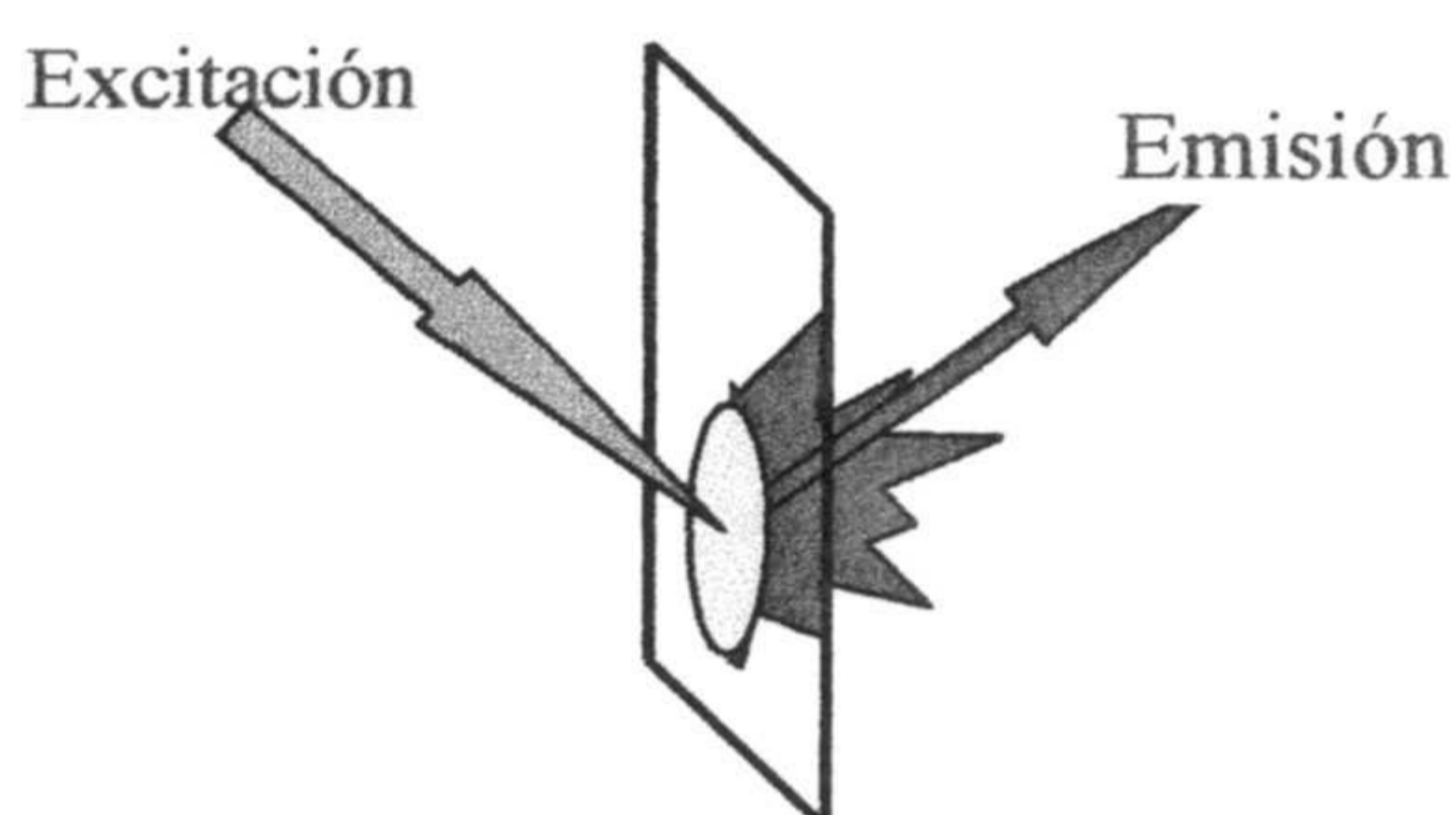


Figura 1.1 Fosforescencia transmitida.

encia directamente sobre dicho soporte después de haberlo adecuado para la medida.

Podemos realizar dos tipos de medida: fosforescencia reflejada, en la cual los haces de excitación y emisión se encuentran en la misma cara de la

superficie fosforescente y fosforescencia transmitida en cuyo caso, como podemos ver en la figura 1.1, la medida de fosforescencia se lleva cabo en la cara opuesta a la que recibe al haz de excitación. En este último caso lo que medimos es la fosforescencia difusa emitida desde la cara opuesta de la zona sensora en la que se encuentra retenido el analito.

1.1.2. Preparación de los sensores.

Los sensores utilizados en esta Memoria están constituidos de la siguiente manera: como soporte sólido inerte se utiliza una lámina de 0,25 mm de espesor, de un material polimérico, politereftalato de etileno tipo Mylar orientado biaxialmente, de la que cortamos una tira rectangular de 3,5 cm de largo y 1,8 cm de ancho. Este material no solo es inerte desde el punto de vista químico sino que además es transparente a las radiaciones que vamos a utilizar.

Sobre este soporte se encuentra adherida una fina capa sólida, que constituye la

zona sensora, y que se ha formado de la siguiente manera: utilizando un dispositivo como el que vemos en la figura 1.2, y con una micropipeta de punta desechable, se depositan 5 μL de disolución de cloruro de polivinilo sobre la superficie de la tira de politereftalato de etileno. Se saca la tira del dispositivo y la colocamos

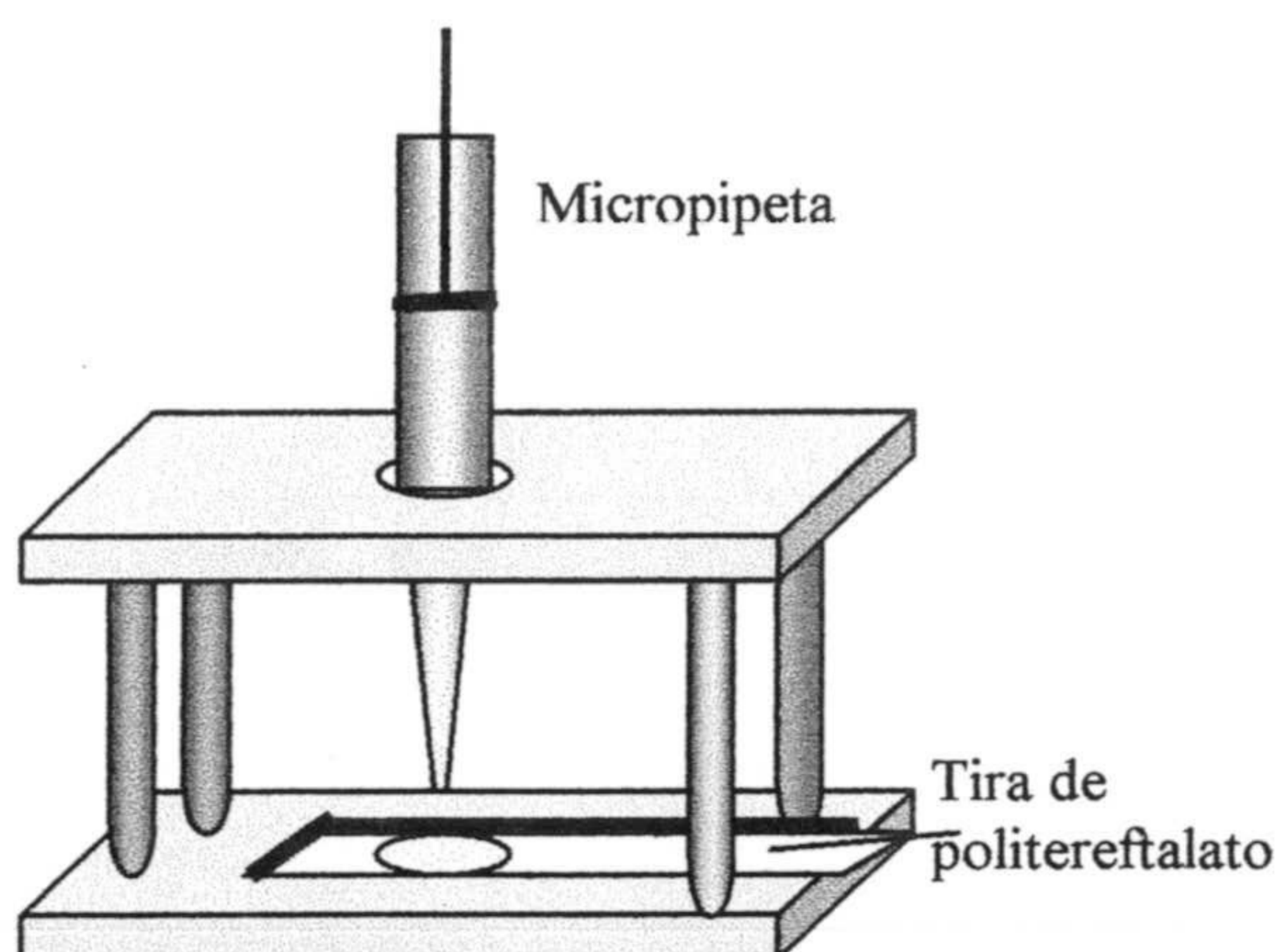


Figura 1.2. Dispositivo para obtener el sensor depositando la mezcla de reactivos con una micropipeta.

en un desecador a vacío durante 20 minutos, hasta que el sensor queda totalmente solidificado. La disolución de cloruro de polivinilo se prepara previamente de la forma que describimos a continuación: en un vial con tapón de rosca, de unos 10 mL de capacidad, se pesan 60 mg de cloruro de polivinilo de alto peso molecular y se le agregan 0,5 mL de tributilfosfato y 2,0 mL tetrahidrofurano, agitándose a continuación hasta que se disuelve y la mezcla queda totalmente homogeneizada.

La fina capa sólida que constituye la zona sensora se forma al evaporarse el disolvente de la gota de disolución que depositamos sobre la tira de soporte sólido, obteniéndose así el sensor preparado para su utilización. Esta zona sensora solidificada adquiere una forma circular de unos seis milímetros de diámetro y 25 μm de espesor, valor este obtenido mediante microscopía de barrido electrónico.

1.1.3. Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra se efectúa según la metodología siguiente: se in-

introduce un volumen adecuado de disolución de muestra en un vaso de precipitado de 50 mL capacidad y se coloca el vaso sobre el plato de un agitador magnético. Se introduce entonces el sensor en la disolución, colgado de un soporte externo, de forma que solo la zona sensora quede sumergida en el seno de la disolución, tal como podemos ver en la figura 1.3.

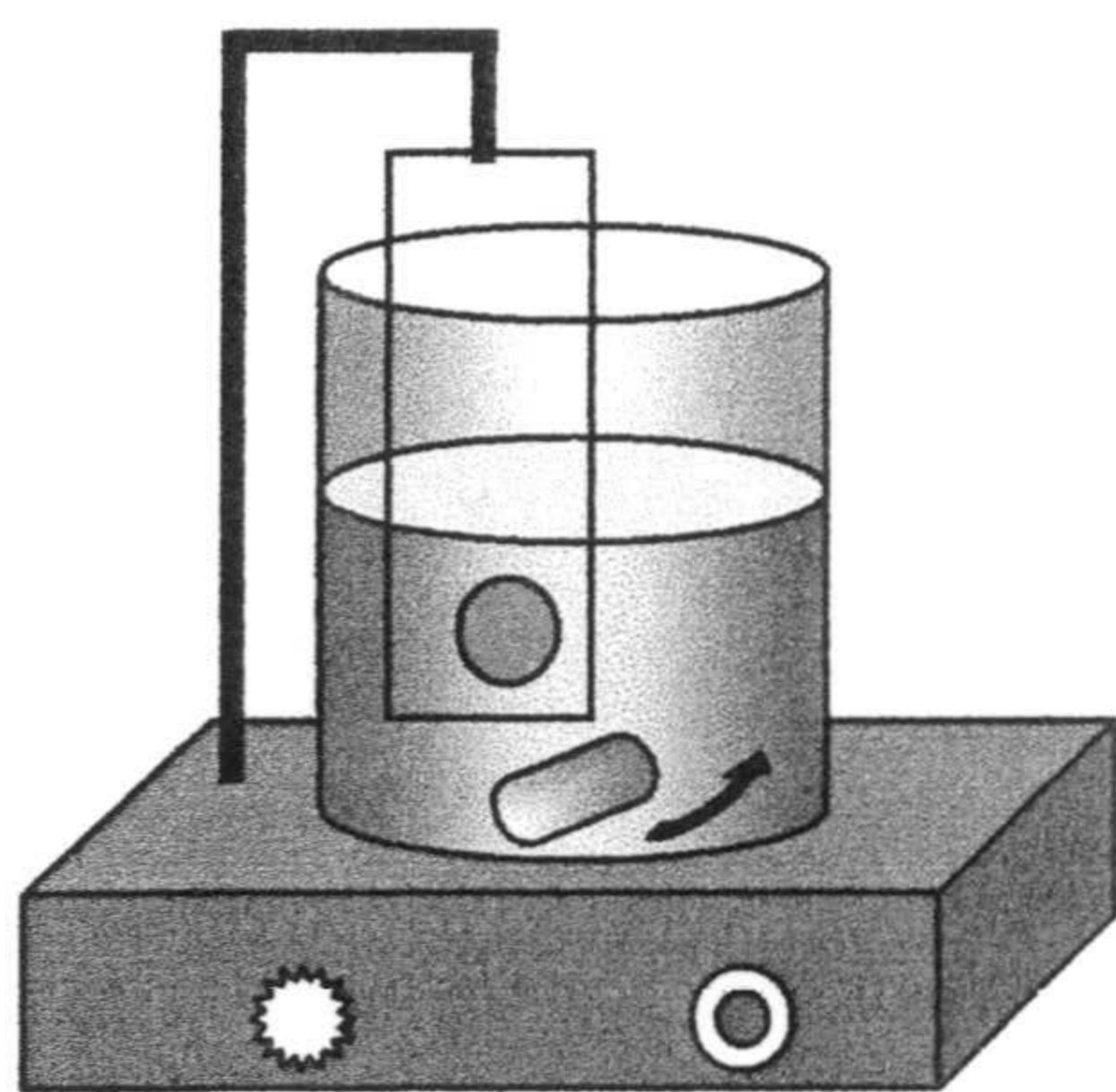


Figura 1.3. Fijación del analito sobre el sensor mediante agitación de la disolución.

Se agita la disolución durante un tiempo apropiado, que puede oscilar de unas muestras a otras entre 30 y 120 minutos, a una velocidad de 30 rpm, procurando que el flujo de la misma incida perpendicularmente sobre la superficie del sensor evitando las turbulencias que se originan en el centro de la masa líquida y, una vez acabado el proceso de agitación, se saca el sensor de la disolución y se coloca en un desecador a vacío durante un determinado tiempo (de 15 a

20 minutos) hasta que quede totalmente seco. Durante este proceso se produce la fijación y preconcentración del analito sobre el sensor. Lo que se pretende con estos sensores es disponer de métodos de análisis rápidos y económicos, ya que todos los reactivos necesarios para que se produzca la reacción analítica se encuentran incluidos en la zona sensora de la lámina.

1.1.4. Medida de la intensidad de fosforescencia.

Para efectuar la medida de la intensidad de fosforescencia emitida hemos utilizado el dispositivo que podemos ver en la figura 1.4, que consta de las siguientes partes: dos prismas metálicos de base triangular 44 mm de altura, pintados de ne-

gro mate, que en conjunto forman un prisma de base cuadrangular de 13 mm de lado. Este conjunto se ajusta perfectamente al portacubetas que posee el fluorímetro. En uno de los prismas se ha practicado un orificio que, desde una de las bases del prisma llega hasta la zona donde queda la parte activa del sensor, cuando este se coloca entre ambos prismas. Este orificio nos permite introducir una corriente de nitrógeno seco que alcanza la zona sensora mientras se efectúa la medida de fosforescencia.

Como podemos apreciar en la figura 1.4, a la altura que queda la zona sensora

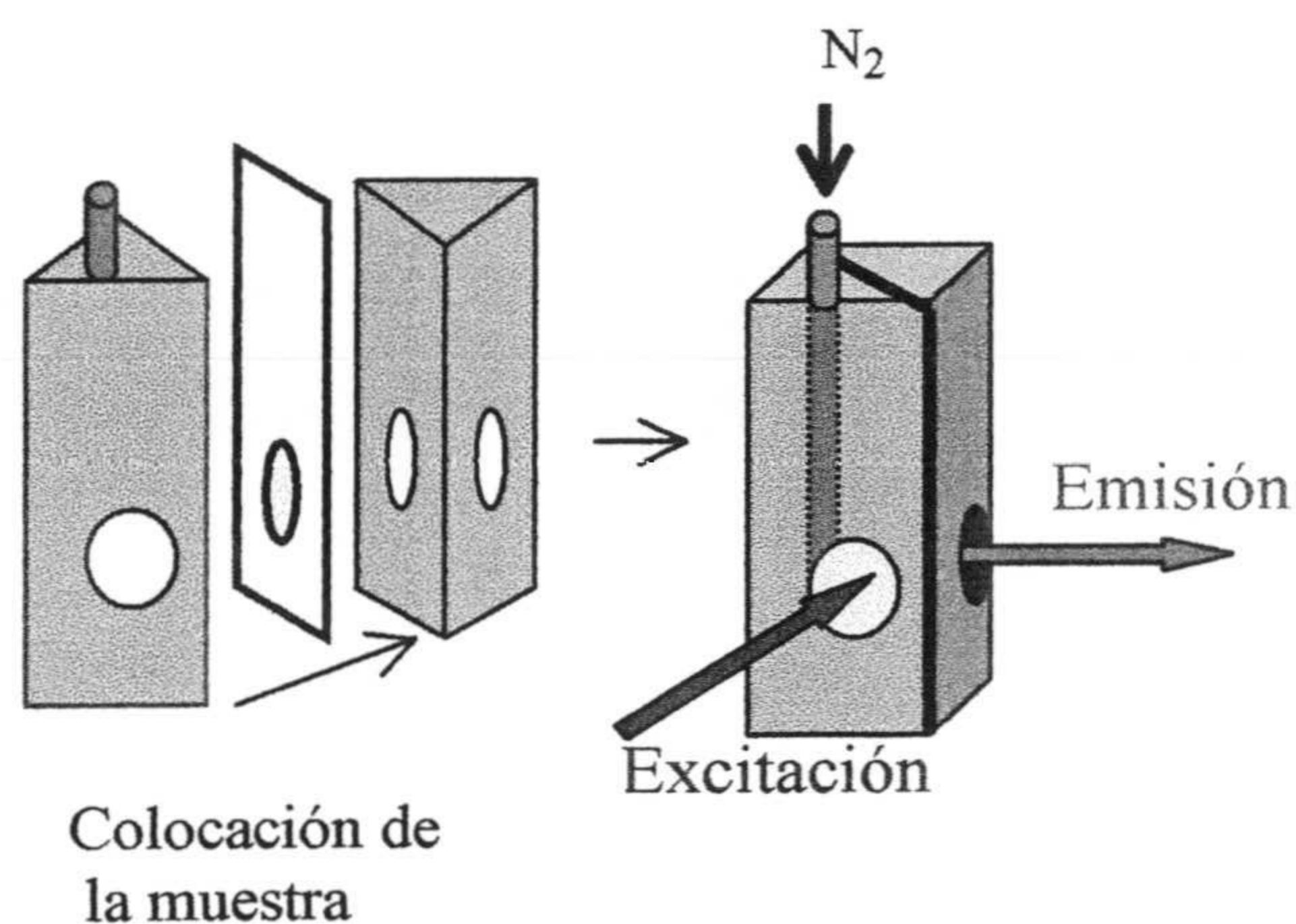


Figura 1.4. Dispositivo para la medida.

al introducirla entre los prismas, estos poseen dos orificios circulares de 7 mm de diámetro por los que pasan los haces de excitación y emisión, cuando el conjunto se encuentra introducido en el compartimiento de medida del instrumento. De esta forma, la disposición del sensor

en el compartimiento de medida del instrumento es tal que su superficie forma ángulos de 45° con los haces de emisión y excitación por lo que estaremos midiendo fosforescencia difusa transmitida.

1.1.5. Tratamiento previo de las muestras reales.

Las muestras reales de orina y leche en las que se aplicaron los métodos propuestos en esta Memoria, se prepararon como sigue:

Muestras de leche: El principal problema que presenta el análisis de este tipo de muestras es que las proteínas propias de la leche eliminan la fosforescencia del analito, por ello, para llevar a cabo el análisis, previamente hay que proceder a la eliminación de dichas proteínas.

Para efectuar la desproteínización de las muestras de leche seguimos el procedimiento recomendado en los Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación según el cual el procedimiento a seguir consta de los siguientes pasos:

- Se pesan con exactitud unos 40 gramos de la muestra de leche y se colocan en un matraz aforado de 200 mL de capacidad y se introduce el matraz en un baño de agua a 20 °C.
- Se le añaden lentamente 50 mL de agua caliente (80 o 90 °C) y se agita suavemente durante unos minutos.
- Se añade agua de nuevo hasta completar unos 150 mL aproximadamente.
- Terminada la adición de agua se añaden, lentamente y agitando con suavidad, 12,5 mL de disolución acuosa de ZnSO_4 que contenga $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- A continuación se añaden otros 12,5 mL de disolución de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ mientras que se agita suavemente.
- Se agita fuertemente la mezcla se enrasa a 200 mL con agua y se deja en reposo unos minutos pasados los cuales se procede a su filtración quedándonos con el filtrado resultante.

En el caso de las muestras de orina no hubo que efectuar ninguna preparación previa de la muestra, pudiéndose realizar el proceso analítico directamente sobre la misma.

Para preparar las muestras de leche con las que vamos a efectuar un estudio de recuperación porque la muestra original no contiene analito, o la cantidad que contiene es insuficiente para ser detectada por el método propuesto, la cantidad de analito, exactamente medida, se añade antes de someter la muestra al proceso de desproteinización que acabamos de exponer.

1.1.6. Optimización de los parámetros experimentales.

Para registrar los espectros de los diferentes analitos se prepararon disoluciones patrón de cada uno de ellos y se procedió a registrar sus espectros y optimizar los parámetros experimentales propios de la muestra, los parámetros instrumentales y los parámetros propios del proceso de medida ya que los que influyen en la construcción del sensor han sido reseñados anteriormente.

1.1.6.1. Espectros de excitación y emisión.

Para registrar estos espectros se prepararon disoluciones patrón de cada uno de los analitos de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración. Fijando valores arbitrarios de los parámetros instrumentales (rendijas de excitación y emisión, velocidad de barrido tiempo de retraso t_d y tiempo de apertura del detector t_g) se registraron los espectros de excitación y emisión fosforescentes en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 300 y 500 nm para excitación y entre 400 y 600 nm de emisión, utilizando en cada caso la longitud de onda máxima obtenida previamente, es decir, en el caso del espectro de excitación, utilizando la longitud de onda máxima de emisión y viceversa. En todos los casos los espectros se registraron obteniendo un punto experimental cada 0,5 nm y utilizando las mismas condiciones experimentales y el método de Savitzky-Golay(1) con ventana de 5 puntos pa-

ra suavizar el espectro obtenido. La velocidad de barrido fue de $120 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

1.1.6.2. Parámetros instrumentales.

Conocidos los espectros de excitación y emisión se procedió a optimizar los valores de los tiempos de retraso de medida (t_d) y de apertura del detector y (t_g). Para optimizar el valor del tiempo de retraso en la medida (t_d), manteniendo constantes, los valores de los restantes parámetros instrumentales se midieron las intensidades de fosforescencia a diferentes valores de t_d comprendidos entre 0,01 y 1,99 ms, valores estos marcados por el instrumento y se repitió la operación para la determinación de t_d efectuando las medidas entre 0,01 y 11,90 ms y utilizando para ello el valor óptimo de t_d previamente obtenido. Una vez obtenidos los valores óptimos de t_d y t_g se optimizaron de los valores de apertura de las rendijas de excitación y emisión efectuando diferentes medidas entre 2,5 y 20 nm que son los límites impuestos por el instrumento utilizado. Finalmente, manteniendo constantes los valores de las variables experimentales previamente optimizadas, se procedió a la optimización de la velocidad de barrido para la obtención de los espectros. Esta velocidad optima quedó fijada en $120 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ en la mayoría de los casos.

1.1.6.3. Parámetros de la muestra.

Conocidos los valores óptimos de los parámetros instrumentales para cada analito en particular, se procedió a la optimización de las variables físico-químicas que potencialmente pueden influir tanto en el proceso de preparación de la muestra como en el de medida de sus propiedades analíticas. Este proceso de medida se llevó a cabo de la siguiente manera: fijando los valores óptimos de los paráme-

tros instrumentales previamente estudiados se procedió a optimizar individualmente cada uno de los siguientes parámetros de la muestra, manteniendo los restantes parámetros con valores constantes y arbitrarios: naturaleza y cantidad de disolvente, pH de la disolución, fuerza iónica y forma y tiempo de secado de la muestra una vez fijado el analito sobre el sensor.

1.1.6.4. Parámetros propios del proceso de fijación y medida.

Nos referimos en este caso a aquellos parámetros que influyen en la intensidad de la señal analítica medida y que dependen exclusivamente de la forma en que se lleve a cabo el proceso de equilibración del sensor con la disolución, o de la forma en que se realiza la medida. Así, nos encontramos con variables tales como tiempo y forma de agitación de la disolución de muestra con el sensor en su interior, velocidad de agitación, forma de secado del sensor una vez finalizado el proceso de fijación y la utilización de atmósfera de nitrógeno en el entorno de la membrana sensora, durante el tiempo en que se está efectuando la medida.

En todos los casos el procedimiento seguido fue optimizar la variable en estudio, mientras las restantes variables se mantenían constantes, hasta obtener así el valor óptimo de dicha variable, excepto en la optimización del tiempo de equilibración del sensor con la disolución, en cuyo caso se estudiaron a la vez, mediante una superficie de respuesta, el citado tiempo de equilibración y la concentración de analito ya que se comprobó que ambas variables están íntimamente relacionadas entre sí.

1.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

1.2.1. Proceso de calibrado.

Una vez optimizados los parámetros experimentales, se procedió al estudio de la relación existente entre la intensidad de fosforescencia y las dos magnitudes que mayor influencia ejercen sobre ella, una vez optimizadas las restantes variables experimentales. Esta forma de proceder obedece al siguiente motivo: el proceso de fijación de los fármacos sobre la zona sensora es un proceso de extracción en el que las moléculas de analito van introduciéndose entre las cadenas del polímero usado, cloruro de polivinilo, ayudado por el tributilfosfato que actúa de plastificante, hasta que se alcanza un determinado equilibrio entre las moléculas que penetran en el soporte sólido y las que salen de él. Este proceso de absorción comienza en el momento en que introducimos el sensor en la disolución de muestra y tiende a llegar al equilibrio con una velocidad relativamente lenta. Por consiguiente, la cantidad de analito absorbida sobre la zona sensora depende de dos factores: en primer lugar la concentración de analito en la disolución y, en segundo lugar, el tiempo que el sensor y la disolución permanecen en contacto, de forma que, aumentando la concentración de analito, disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio al que tiende el proceso, o viceversa, si la concentración de analito es muy baja el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio deberá aumentar.

Por lo tanto la señal analítica, que depende de este último paso de equilibración entre sensor y disolución, la podremos expresar como sigue:

$$I = f(C,t) \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde C es la concentración de analito en la disolución en estudio y t es el tiempo

de equilibrio. Como es sabido, establecer esta función que relaciona la señal analítica con la concentración, es el objetivo de todo proceso de calibrado y para ello se pueden seguir diferentes caminos, uno de los cuales consiste en fijar todas las variables experimentales que influyen en el proceso fosforescente, incluido el tiempo, y relacionar intensidad de fosforescencia y concentración a través de una ecuación o curva de calibrado, en cuyo caso estaremos ante un proceso de calibración univariante, o bien, como vamos a ver a continuación, se puede establecer una ecuación en función de las dos variables citadas (C y t) y obtener una superficie de respuesta o superficie de calibrado con la cual podremos calcular la concentración de analito en condiciones óptimas, ya que lo haremos tras haber seleccionado el tiempo óptimo de equilibrado.

Para obtener esta superficie respuesta procederemos experimentalmente como sigue: en primer lugar, preparamos varios sensores manteniendo constante el tiempo de equilibrio y variando progresivamente la concentración de analito en la disolución. De esta forma se obtendrá una serie de parejas de valores intensidad-concentración para un tiempo de equilibrado predeterminado. A continuación se prepararon nuevas series de sensores con idéntico procedimiento al anterior pero con diferentes tiempos para cada una de las series. En todos los casos cada serie fue medida a un tiempo predeterminado que se mantuvo constante en la serie correspondiente.

De esta forma se obtuvo una tabla de valores de doble entrada (Tabla 1.1) en la que en cada fila podemos leer las intensidades de fosforescencia correspondientes a las distintas concentraciones de analito, pero todas ellas con idéntico tiempo de equilibrado, mientras que en cada columna lo que podemos leer son las intensidades de fosforescencia correspondientes a sensores equilibrados con disoluciones

de una misma concentración pero en diferentes tiempos. La experiencia se realizó de forma que cada uno de los datos de la tabla correspondiente es la media de tres medidas experimentales.

Para obtener una función matemática expresada en la ecuación 1.1, vamos a utilizar un procedimiento matemático mediante el cual obtendremos una aproximación a dicha función interpolando los datos de la tabla 1.1 y usando el método de los elementos finitos.

Concentración Tiempo	C_1	C_2	C_3	C_4		C_n
t_1	I_{11}	I_{12}	I_{13}	I_{14}		I_{1n}
t_2	I_{21}	I_{22}	I_{23}	I_{24}		I_{2n}
t_3	I_{31}	I_{32}	I_{33}	I_{34}		I_{35}
t_m	I_{m1}	I_{m2}	I_{m3}	I_{m4}		I_{mn}

Tabla 1.1. Tabla de valores experimentales.

Esta función obtenida será, como hemos dicho, una aproximación a la función buscada pero a cambio de ello el proceso matemático que seguiremos es sencillo y comprensible.

Mediante la interpolación de datos usando el método de los elementos finitos se obtiene una función *spline* de dos variables $s(C,t)$ continua para unos determinados intervalos de C y t , que mantiene las propiedades de los datos experimentales ya que se mantiene estrictamente creciente para cada una de las dos variables (2).

Cada uno de los elementos finitos representa una superficie rectangular del tipo-I para datos lagrangianos en los vértices del rectángulo. De esta forma la estimación de la intensidad de fosforescencia para un valor (C,t) , donde C está com-

prendida entre dos valores consecutivos cualesquiera de concentraciones (por ejemplo C_1 y C_2) y otros dos valores consecutivos cualesquiera de tiempo (por ejemplo t_1 y t_2), estará dado por la expresión siguiente (Ec. 1.2):

$$I(C,t) = I_{11} \frac{(C - C_2)(t - t_2)}{(C_1 - C_2)(t_1 - t_2)} + I_{12} \frac{(C - C_2)(t - t_1)}{(C_1 - C_2)(t_2 - t_1)} + I_{21} \frac{(C - C_1)(t - t_2)}{(C_2 - C_1)(t_1 - t_2)} + I_{22} \frac{(C - C_1)(t - t_1)}{(C_2 - C_1)(t_2 - t_1)}$$

donde $C_1 \leq C \leq C_2$ y $t_1 \leq t \leq t_2$. Los valores I_{11} , I_{12} , I_{21} e I_{22} son los valores experimentales correspondientes a $C = C_1$ y $t = t_1$; $C = C_1$ y $t = t_2$; $C = C_2$ y $t = t_1$ y $C = C_2$ y $t = t_2$ respectivamente.

Con el *spline* interpolante correspondiente a los datos de una tabla dada de valores experimentales, se obtiene una serie de trozos o superficies planas que en conjunto forman una función continua para $C \in [C_1, C_n]$, $t = [t_1, t_m]$ y que constituyen una superficie respuesta o superficie de calibración a partir de la cual podremos obtener los resultados analíticos.

Cortando esta superficie mediante un plano vertical, paralelo al eje donde se han representado las concentraciones, obtendremos una curva de calibración correspondiente a un tiempo de equilibrado constante, mientras que si cortamos con un plano vertical, paralelo al eje de tiempos, obtendremos una curva representativa de la cinética del proceso de fijación del analito sobre el sensor, para un valor determinado de su concentración.

Para estimar la concentración de analito a partir de esta función o superficie de calibrado podremos seguir el proceso habitual consistente en medir la intensidad de fosforescencia de la alícuota de muestra (I_x) para un tiempo de equilibrado $t = t_x$ y utilizar el interpolante $s(C,t)$ ya que si en él hacemos $t = t_x$, la función $s(C,t_x)$ sólo dependerá de la variable C , siendo una función estrictamente creciente. Para

ello despejamos C en la ecuación 1.2 y obtendremos la estimación de la concentración. En este proceso de estimación de C se nos pueden presentar los siguientes dos casos:

1. Que el tiempo t_x coincida con un tiempo cualquiera (t_j) de los que tenemos en la tabla de resultados experimentales (tabla 1.1), siendo $j = \{1, 2, 3, \dots, m\}$. En tal caso comprobaremos que I_x se encuentra comprendido entre dos valores consecutivos (I_{ij} y $I_{i+1,j}$) de la fila j de la citada tabla, que corresponden a las señales analíticas producidas por dos patrones de concentraciones C_i y C_{i+1} . Si en la ecuación 1.1 hacemos $t = t_x$, nos queda:

$$I_x = I_{ij} (C - C_{i+1}) / (C_i - C_{i+1}) + I_{i+1,j} (C - C_i) / (C_{i+1} - C_i)$$

y despejando la concentración será:

$$C_x = [I_x(C_i - C_{i+1}) + I_{ij}C_{i+1} - I_{i+1,j} C_i] / [I_{ij} - I_{i+1,j}] \quad (\text{Ec. 1.3})$$

2. El segundo caso que se nos puede presentar es que el tiempo t_x no coincida con uno de los tiempos recogidos en la tabla 1.1, en cuyo caso tendremos que proceder de la forma que sigue: suponemos que existe un valor j tal que $t_j < t_x < t_{j+1}$. A partir de las filas j y $j+1$ de la tabla 1.1 estimaremos, mediante interpolación lineal, las intensidades de fosforescencia para cada concentración a un tiempo de equilibrado t_x y obtendremos las intensidades $I_{k,x}$ a partir de la ecuación:

$$I_{kx} = I_{kj} + (t_x - t_j)[(I_{k,j+1} - I_{kj}) / (t_{j+1} - t_j)] \quad (\text{Ec. 1.4})$$

De esta forma hemos calculado una fila auxiliar de datos, que no se obtuvieron experimentalmente, pero que contiene las intensidades de fosforescencia correspondientes al tiempo t_x y que, por tanto, nos permite estimar la concentración C_x de la misma forma que en el caso anterior.

Tiempo óptimo de medida. Una segunda alternativa que nos permite este método

de calibrado es obtener el tiempo óptimo de medida, para una muestra determinada, y, a partir de este dato, obtener una recta de calibrado convencional (univariante) para un valor de tiempo adaptado a la concentración de la muestra.

Como veremos más adelante en una superficie de respuesta $I = f(C,t)$, hay regiones en las que la medida de la intensidad de fosforescencia no garantiza que la estimación de la concentración sea correcta. Es el caso de zonas en las que la superficie es prácticamente horizontal y una pequeña variación en la intensidad no puede atribuirse a un cambio de concentración, puesto que puede deberse a una simple variación de la medida causada por el ruido instrumental. Es el caso que se nos presenta para la zona de elevados tiempos de equilibrado en donde la pendiente de la gráfica es poco pendiente en función del tiempo.

De todo ello se deduce que existen tiempos óptimos de equilibrado para cada concentración de analito en la muestra y estos tiempos óptimos corresponden a aquellos valores en los que una variación de C (por ejemplo ΔC) produce una mayor variación en la intensidad de fosforescencia.

Para obtener este tiempo óptimo estimaremos primero la derivada numérica de la función $f(C,t_j)$ donde $j = \{1,2,3\dots m\}$ como función de C a partir de los datos experimentales de la tabla 1.1. Para ello usaremos las expresiones de derivación siguientes:

$$g'(a) \approx [g(a+h) - g(a)]/h \quad (\text{Ec. 1.5 a})$$

$$g'(a) \approx [g(a+h) - g(a-h)]/2h \quad (\text{Ec. 1.5 b})$$

en donde $g'(a)$ es una expresión aproximada de la función $g(x)$ en un punto $x = a$ cuando se conocen los valores de g en punto próximos a $x = a$, por ejemplo $a + h$ y $a - h$, siendo h un valor muy pequeño. De estas dos expresiones la segunda de ellas (Ec. 1.5 b) es de mayor precisión que la primera cuando se trata de puntos

igualmente espaciados pero no es aplicable cuando a es el primer o el último valor de una serie de valores, en cuyo caso no disponemos de $a - h$ o de $a + h$ respectivamente, razón por la cual a veces nos veremos obligados a utilizar la primera expresión a pesar de que sea menos exacta que la segunda.

Con los datos de la tabla de valores experimentales y usando las expresiones anteriores, podremos calcular los valores de las derivadas numéricas de la función $f(C,t)$ respecto de la variable C , correspondientes a los valores (C_i, t_j) con los que podremos confeccionar una tabla en la que tendremos dichos valores de las derivadas numéricas, eligiendo como tiempo óptimo para el proceso de equilibrado aquel que presente unos mayores valores de derivada.

Obtenido el tiempo óptimo para el proceso de equilibrado podemos establecer una curva de calibrado convencional mediante regresión lineal de los valores de I y C , utilizando los procedimientos que vamos a describir brevemente a continuación. Junto a estos procesos de tratamiento estadístico de los datos de calibración univariante también incluiremos los cálculos de los parámetros analíticos de calidad de los métodos.

1.2.2. Calibración univariante.

Uno de los inconvenientes metodológicos de los métodos instrumentales de análisis, en su aspecto cuantitativo al menos, es la necesidad de establecer una curva de calibrado, a partir de disoluciones patrón de concentraciones conocidas, para comparar la señal analítica producida por la muestra en estudio, con dicha curva de calibrado y obtener así la concentración de analito presente en la muestra.

Como es sabido este proceso de calibración, cuando se trata de muestras con

un único analito, consta de dos etapas bien diferenciadas. En la primera de ellas, o etapa de calibración propiamente dicha, se pretende establecer la relación existente entre señal analítica y concentración de analito haciendo uso de una serie de patrones de concentraciones perfectamente conocidas, mientras que en la segunda etapa, o etapa de predicción, lo que hacemos es aplicar la función de calibrado obtenida con anterioridad para estimar la concentración de analito que se encuentra presente en la muestra real.

Tanto en el caso de calibración bivariante que acabamos de ver como en el caso de calibración univariante que vamos a ver a continuación, partimos de los siguientes supuestos:

- a) Los patrones contienen cantidades exactamente conocidas de analito.
- b) Dichas concentraciones no están sujetas a errores aleatorios aunque sí lo estén los valores de la propiedad analítica que midamos para cada uno de ellos.

Bajo estas condiciones, el establecimiento de la relación señal analítica-concentración, objeto de esta primera etapa del proceso de calibrado, se puede obtener aplicando una regresión lineal de señal analítica sobre la concentración y para llevar a cabo este proceso de calibración, se han utilizado una serie de recursos estadísticos de los cuales vamos a hacer un breve resumen a continuación.

1.2.3. Rechazo de valores anómalos.

Es un hecho bien conocido que al medir la propiedad analítica de una serie de alícuotas de una misma muestra, o incluso una misma alícuota varias veces seguidas, se obtiene un conjunto de valores, más o menos agrupados, cuya proximidad entre sí depende, entre otras cosas, de la naturaleza de la medida que estemos

efectuando. Como bien sabe cualquier persona que haya realizado este tipo de medidas, en numerosas ocasiones alguno o algunos de los valores obtenidos es visiblemente diferente de los restantes, con lo cual se nos plantea la duda acerca de su aceptación o rechazo. En el caso en que el número de datos anómalos no sea elevado el problema que se nos plantea es el de establecer un criterio de rechazo de los valores sospechosos y, con este propósito, en esta Memoria hemos utilizado el conocido test de la Q de Dixon (3).

1.2.4. Función de calibrado.

El establecimiento de la función de calibrado para muestras con un único componente -calibración univariante-, se llevó a cabo mediante el uso de patrones de concentración conocida, con los que se obtuvieron una serie de valores de los que, mediante una regresión lineal, se obtuvo la correspondiente función o recta de calibrado. Llamando R_i a la respuesta del instrumento para un patrón de concentración C_i , la relación entre ambos será de la forma:

$$R_i = bC_i + a + e_i \quad (\text{Ec. 1.6})$$

donde, a es la ordenada en el origen de la recta de calibrado o término independiente, b es la pendiente de dicha recta, y e_i el residual o residuo cuyo origen se encuentra en el error aleatorio que acompaña a toda medida experimental. Este residual es la diferencia entre el valor medido experimentalmente R_i y el valor obtenido \hat{R}_i al aplicar la ecuación de la recta de ajuste al valor de concentración del patrón i , o sea: $e_i = R_i - \hat{R}_i$ siendo $\hat{R}_i = bC_i + a$.

Para estimar los valores de los parámetros a y b vamos a utilizar *método de mínimos cuadrados*, consistente en minimizar la suma de cuadrados de los residuales, que presupone que la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales

es aquella para la que la sumatoria de los cuadrados de los residuales es mínima, o sea:

$$\sum e_i^2 = \sum (R_i - \hat{R}_i)^2 \rightarrow \text{Mínimo} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

La ecuación 1.7 tiene una única solución, cualquiera que sea el número de patrones y medidas realizadas, de manera que los valores de a y b se pueden obtener a partir de las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{\sum (C_i - \bar{C}_i)(R_i - \bar{R}_i)}{\sum (C_i - \bar{C}_i)^2} \quad \text{y} \quad a = \bar{R} - b\bar{C} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

donde \bar{R} es el valor medio de las señales medidas y \bar{C} el valor medio de las concentraciones de los patrones a partir de los que hemos obtenido la función de calibrado.

Los cálculos estadísticos los podemos realizar de una forma más cómoda, haciendo uso de una serie de "cantidades estadísticas" que no tienen ningún significado físico pero que simplifican el cálculo de los parámetros estadísticos que nos interesan. Estas cantidades son las siguientes:

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \quad S_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \quad S_{xy} = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

Donde x_i es la variable independiente, en nuestro caso la concentración de analito, e y_i es la variable dependiente, o sea, la señal que produce una concentración de analito C_i .

Con estas expresiones los cálculos de la pendiente de la recta de ajuste (b) y de la ordenada en el origen o término independiente (a) se pueden efectuar utilizando las siguientes expresiones:

$$b = S_{xy}/S_{xx} \quad \text{y} \quad a = \bar{R} - b \bar{C} \quad (\text{Ec. 1.9})$$

donde \bar{R} es el valor medio de las señales medidas y \bar{C} es el valor medio de las concentraciones de los patrones con los que hemos obtenido la recta de calibrado.

1.2.5. Aceptación del modelo establecido.

Una vez que hemos obtenido los parámetros a y b hay que comprobar si los residuos e_i cumplen las condiciones de normalidad, independencia, aleatoriedad y homoscedasticidad, que son las condiciones necesarias para aceptar el modelo establecido.

Para llevar a cabo este propósito, en esta Memoria hemos adoptado el criterio de representar los valores de los residuales frente a concentraciones y estudiar la forma en la que se distribuyen los puntos en dichas gráficas. Siendo más rigurosos en este aspecto deberíamos aplicar los tests estadísticos de Durbin-Watson, Barlett y D'Agostino, pero, dado el alto número de réplicas utilizado en las medidas experimentales, la aplicación de estos tests sería engorrosa y poco práctica.

Si se cumplen las condiciones de normalidad, aleatoriedad, homoscedasticidad e independencia, procederemos a calcular los parámetros estadísticos que cuantifican los errores cometidos al establecer la regresión, es decir, las desviaciones estándar de la regresión, de la pendiente y de la ordenada en el origen y los coeficientes de correlación lineal y de determinación así como los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente.

1.2.5.1. Desviación estándar de la regresión ($s_{R,C}$).

La desviación estándar de la regresión, o desviación estándar de los residuales, nos indica la mayor o menor dispersión de los valores obtenidos experimentalmente a partir de los patrones de calibración, o lo que es igual, una

estimación aproximada de la bondad del ajuste de los puntos experimentales a la ecuación de la recta. Su cálculo se hace a partir de alguna de las siguientes expresiones:

$$s_{R,C} = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \hat{R}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}} = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{N-2}} \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Si todos los valores medidos experimentalmente estuviesen alineados sobre la recta de ajuste el valor de este parámetro sería cero. Cuanto mayor sea su valor tanto más desviados estarán los puntos experimentales a uno y otro lado de la recta de calibrado.

1.2.5.2. Desviación estándar de la pendiente.

Es uno de los parámetros estadísticos de mayor importancia en esta etapa de la calibración ya que afecta a todos los cálculos que se hagan a partir de la recta de regresión. Nos indica el error cometido al estimar la pendiente de la recta y su cálculo se hace aplicando alguna de las ecuaciones siguientes:

$$s_b = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{\sum (C_i - \bar{C})^2}} = \sqrt{\frac{s_{RC}^2}{S_{xx}}} \quad (\text{Ec. 1.11})$$

donde \bar{C} es el valor medio de las concentraciones de los patrones.

1.2.5.3. Desviación estándar del término independiente.

La calcularemos a partir de una de las siguientes expresiones:

$$s_a = s_{R,C} \sqrt{\frac{\sum C_i^2}{n \sum (C_i - \bar{C})^2}} = s_{RC} \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}} \quad (\text{Ec. 1.12})$$

donde cada una de las variables tiene el significado que ya conocemos. Este

parámetro es indicativo del máximo error que se puede cometer al predecir el valor de la señal analítica que debe producir un patrón determinado de concentración conocida. Esta desviación es mínima en el centro de la recta de calibrado y máxima en los extremos y el valor de s_a es el correspondiente al extremo inferior de la recta.

1.2.5.4. Intervalos de confianza para el término independiente y la pendiente.

Conocidos los valores de las desviaciones estándar correspondientes a la ordenada en el origen (s_a) y a la pendiente de la recta (s_b) podremos calcular los intervalos de confianza de dichos parámetros y para un determinado nivel de significación $1-\alpha$ y $n-2$ grados de libertad, conociendo el valor del estadístico t de Student y empleando las ecuaciones siguientes:

$$\Delta b = b \pm s_b t_{(\alpha, n-2)} \quad \text{y} \quad \Delta a = a \pm s_a t_{(\alpha, n-2)} \quad (\text{Ec. 1.13})$$

1.2.5.5. Desviación estándar de la señal analítica.

Para conocer el grado de variabilidad de la señal analítica, obtenida a partir de un patrón de concentración conocida, vamos a utilizar la desviación estándar de la señal s_R calculada a partir de la expresión:

$$s_R = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (\text{Ec. 1.14})$$

siendo m el número de réplicas de cada patrón utilizadas para obtener la curva de ajuste y C el valor de la concentración del patrón del que queremos conocer su desviación. Los restantes símbolos tienen el significado ya conocido. Como se deduce de la anterior expresión esta desviación estándar será tanto menor cuanto mayores los valores de m y n , es decir cuantos más patrones utilicemos para

obtener la recta de calibrado y más replicados de cada uno de ellos hayamos hecho.

1.2.5.6. Desviación estándar de la concentración de la muestra.

Sin duda este es uno de los estadísticos más interesantes al expresar los resultados de un análisis ya que nos permite obtener el intervalo de confianza, dentro del cual se encuentra el valor de la concentración. Su cálculo lo podemos efectuar utilizando la expresión:

$$s_c = \frac{s_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2}} = \frac{s_{RC}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{b^2 S_{xx}}} \quad (\text{Ec. 1.15})$$

donde C_i son los valores de concentración de las réplicas utilizadas en la obtención de la función de calibrado. Como podemos apreciar, en esta expresión están implícitos los errores de la medida de la señal analítica, de la pendiente, y de la ordenada en el origen.

1.2.5.7. Coeficientes de correlación lineal y de determinación.

El coeficiente de correlación es una forma de medir el grado de correlación entre las concentraciones de los patrones y sus respectivas señales analíticas obtenidas experimentalmente, mientras que el coeficiente de determinación nos sirve como índice para expresar la calidad del ajuste de los puntos experimentales al modelo adoptado, o sea, es una medida de la fracción de la variabilidad total que puede ser explicada por la regresión. Las expresiones para el cálculo de ambos coeficientes son:

$$r = \frac{\sum (C_i - \bar{C})(R_i - \bar{R})}{\sqrt{\sum (C_i - \bar{C})^2 \sum (R_i - \bar{R})^2}} \quad (\text{Ec. 1.16})$$

siendo r el coeficiente de correlación lineal y r^2 el coeficiente de determinación que no es más que el cuadrado del coeficiente de correlación lineal.

1.2.6. Cálculo de los parámetros analíticos.

Establecido el modelo de la función de calibrado y comprobada su validez mediante los parámetros estadísticos que acabamos de ver, procederemos a validar el método analítico basándonos en sus parámetros de calidad (4,5) de carácter químico-estadístico o *parámetros de fiabilidad* (precisión, sensibilidad, selectividad, linealidad, límites superior e inferior, rango dinámico lineal y robustez).

Los parámetros de fiabilidad que vamos a utilizar en esta Memoria como forma de validación de los métodos propuestos, son los siguientes: linealidad, intervalo dinámico lineal, límites de detección y de cuantificación, sensibilidad, precisión y selectividad.

Linealidad o capacidad del método para obtener datos experimentales (señal analítica-concentración) linealmente relacionados entre sí. Esta linealidad la vamos a calcular aplicando el test de *fallo de ajuste* como indica el Analytical Methods Committee (6). Para poder aplicar este test los datos experimentales se obtienen a partir de m réplicas de cada uno de los k patrones de diferentes concentraciones C_i , que originarán n parejas de valores concentración-señal analítica. Se calculan las varianzas s_{FA}^2 y s_{EP}^2 asociadas a la falta de ajuste y al error puro respectivamente y se calcula el estadístico F_{cal} mediante la expresión:

$$F_{cal} = \frac{s_{FA}^2}{s_{EP}^2} \quad (\text{Ec. 1.17})$$

y se compara el valor calculado con el valor tabulado (F_{tab}) para un nivel de

confianza α con $k-2$ y $n-k$ grados de libertad. Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ se admite la linealidad.

Sensibilidad: Este parámetro lo podemos expresar de dos formas:

- Como recomienda la IUPAC (7), en cuyo caso se trata de la pendiente de la recta de calibrado y se denomina sensibilidad del calibrado.

$$\text{Sen. Cal.} = b$$

- Como la sensibilidad analítica, en cuyo caso se define por la expresión:

$$\text{Sen. Anal.} = b/s_R \quad (\text{Ec. 1.18})$$

y cuantifica la capacidad del método para discriminar pequeñas diferencias de concentración entre dos patrones. Este parámetro ha dado lugar a grandes controversias (8) siendo su principal inconveniente su dependencia de la concentración de la muestra. Para evitar esta dependencia vamos a utilizar la nueva definición del término:

$$\text{Sen. Anal.} = s_{R,C}/b \quad (\text{Ec.1.19})$$

en la que $s_{R,C}$ es la desviación estándar de la regresión y, en cuyo caso, el parámetro es independiente incluso del método empleado (9).

Limite de detección. En esta Memoria el límite de detección del método en estudio se ha calculado de acuerdo con la recomendación de la IUPAC (7) utilizando la expresión siguiente:

$$LD = \frac{3s_{R0}}{b} \quad (\text{Ec. 1.20})$$

siendo s_{b0} la desviación estándar obtenida a partir de 10 réplicas del blanco y b la pendiente de la recta de calibrado.

Limite de cuantificación ó determinación. El límite de cuantificación (LQ), según la IUPAC está dado por la expresión siguiente:

$$LD = \frac{10s_{R0}}{b} \quad (\text{Ec. 1.21})$$

Intervalo dinámico lineal. Definido por los límites superior e inferior del intervalo de concentraciones en el que se aplica el método, está dado por la expresión:

$$RDL = 0'1 \frac{\text{Lim}_{\text{sup}}}{\text{Lim}_{\text{inf}}} \quad (\text{Ec. 1.22})$$

Donde, Lim_{inf} y Lim_{sup} son los límites de cuantificación y superior del intervalo de linealidad calculado mediante el test de fallo de ajuste.

Precisión: Dado que la precisión de un método nos indica la influencia que ejerce el componente aleatorio de la respuesta instrumental sobre la calidad de la recta de regresión, su evaluación requiere la repetición de medidas de los patrones.

Existen varias formas de expresar este parámetro, mediante la precisión intralaboratorio o repetibilidad o bien mediante la precisión interlaboratorios o reproducibilidad del método. La primera de ellas se refiere a la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra, realizados por un mismo operador, aplicando el mismo método y en el mismo laboratorio, mientras que la segunda se refiere a la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra realizados por diferentes laboratorios. Nosotros vamos a utilizar la primera de ellas que se evalúa de la forma siguiente:

Repetibilidad del método aplicado a una muestra patrón y al blanco, para lo cual se preparan 10 réplicas de patrón idénticas, de concentración correspondiente a un punto central de la recta de calibrado y 10 blancos y se calcula la desviación estándar relativa (DER) de ambas series de la siguiente forma:

$$DER(\%) = \frac{s_{n-1}}{\bar{R}} 100 \quad (\text{Ec. 1.23})$$

donde: s_{n-1} es la desviación estándar de las respuestas de fosforescencia encontradas y \bar{R} es la media de las respuestas de las 10 medidas de los patrones en un caso y de los 10 blancos en el otro.

1.3. MEDIOS MATERIALES

En este apartado del presente capítulo vamos a describir los medios materiales usados en el trabajo experimental realizado para el desarrollo de la presente Memoria y, para una mayor claridad, los vamos a clasificar en los siguientes grupos:

- Instrumentación y material de laboratorio.
- Reactivos y disoluciones.
- Soportes sólidos ensayados en el desarrollo de los sensores.
- Material y programas informáticos.

1.3.1. Instrumentación y material de laboratorio.

- ❖ Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 provisto de los siguientes elementos:
 - Lámpara de descarga modulada de xenón con un pulso equivalente a 20 kW durante 8 μ S.
 - Monocromadores Monk-Gillieson F/3 con rangos de longitud de onda:
 - Monocromador de excitación: 200 a 800 nm.
 - Monocromador de emisión: 200 a 900 nm.
 - Fotomultiplicador Hamamatsu R289 provisto de.
 - Curva de corrección de rodamina para corregir la respuesta del fotomultiplicador de referencia.

Al comienzo de cada sesión de medida y con el objetivo de asegurar la

reproducibilidad de las medidas, el espectrofluorímetro fue chequeado en modo fosforescencia, empleando para ello un patrón P1, suministrado por Perkin-Elmer, que contiene tenoiltrifluoroacetato de europio (III) disuelto en una matriz sólida transparente de poli(metilmacrilato), en forma de prisma rectangular de dimensiones 45x12,5x12,5 mm.

Con este patrón se debe medir una intensidad de fosforescencia relativa de 430,6 unidades a $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 614$ nm, colocando rendijas de 5 nm tanto para excitación como para emisión, tiempos de apertura y retraso de $t_g = 0,1$ ms, $t_d = 1$ ms respectivamente y registrando la señal de fosforescencia emitida en el rango de longitudes de onda comprendido entre 550 y 650 nm.

- ❖ Desionizador de agua de osmosis inversa Millipore Milli-Ro 12 plus, Milli-Q.
 - ❖ Placa agitadora de múltiples posiciones SBS modelo A-13.
 - ❖ Balanza analítica Mettler AE 163.
 - ❖ Balanza granatario Mettler PJ 360 Delta-Range.
 - ❖ pH-metro digital Crison modelo 517 provisto de un electrodo combinado de vidrio y calomelanos saturado.
 - ❖ Baño de ultrasonidos Selecta.
 - ❖ Cronómetro Hanhart.
 - ❖ Centrífuga BHG, Fixette II.
 - ❖ Termostato-criostato Braun-Melsungen Frigomix.
 - ❖ Rotavapor Heidolph VVI. 40-200 rpm.
 - ❖ Bomba de vacío Büchi, modelo B-169 de laboratorios Umos-Technik.
 - ❖ Secador de pelo Braun Selencio 1600 (con potencia máxima 2000 W)
 - ❖ Micropipeta Biohit Proline (0,5-10 μL).
-

- ❖ Matraces aforados Afora clase A de distintas volúmenes.
- ❖ Pipetas aforadas y graduadas Afora clase A de distintas capacidades.
- ❖ Goteros, vasos de precipitado, pesasustancias y diverso material de vidrio habitual en cualquier laboratorio analítico.

Para el mantenimiento del material del vidrio se enjuagó varias veces con agua desionizada, y, en los casos en que fue necesario, se lavó previamente con una disolución acuosa de ácido nítrico (1:1) enjuagándose posteriormente con agua desionizada.

1.3.2. Reactivos y disoluciones.

En este apartado vamos a incluir tanto los patrones de los fármacos a estudiar como los disolventes, ácidos, bases y demás reactivos químicos usados durante la parte experimental de la Memoria.

Disolventes

- Etanol absoluto PANREAC para análisis.
- Diclorometano PANREAC.
- Acetato de etilo PANREAC.
- Cloroformo PANREAC.
- Tetrahidrofurano SIGMA.
- Agua desionizada (resistencia < 15 megahomios) obtenida en el desmineralizador reseñado anteriormente.

Patrones de fármacos

- Ácido nalidíxico suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich.
 - Ácido oxolínico suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich.
-

- Ácido piromídico suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich.
- Ácido flumequina suministrado por la casa comercial Sigma-Aldrich.

Disoluciones empleadas.

- Disolución de ácido nalidíxico de 100 mg/L que fue preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 mL de etanol absoluto.
- Disolución de ácido oxolínico de 100 mg/L preparada al disolver 0,01g del patrón en 100 ml de etanol absoluto.
- Disolución de ácido piromídico de 100 mg/L que fue preparada disolviendo 0,01 g de sustancia en 100 ml etanol absoluto.
- Disolución de flumequina de 100 mg/L que fue preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 mL de etanol absoluto.
- Disoluciones de acetato de plomo (1M), nitrato de plomo (1M), acetato de plata (0,5 M), nitrato de plata (0,5 M), nitrato de talio (0,36M) y nitrato de mercurio(II).
- Disoluciones acuosas de hidróxido sódico (Panreac) de diferentes molaridades.
- Disolución acuosa de ácido acético (Merck) al 96%.
- Disolución acuosa de ácido clorhídrico (Panreac) al 35%.
- Disoluciones de NaCl, NaBr, NaF (1M) y KI (2M)
- Cloruro de polivinilo suministrado por Sigma-Aldrich.
- Tributilfosfato Sigma-Aldrich.
- Ftalato de dioctilo Sigma-Aldrich.
- 2-Nitrofeniloctileter Sigma-Aldrich.
- Tris(2-etilhexil)fosfato Sigma-Aldrich.

- Bis(2-etilhexil)sebacato Sigma-Aldrich.

1.3.3. Soporte sólidos ensayados

Los diferentes materiales probados en esta Memoria como soportes sólidos son:

- Politereftalato de etileno (Poliéster tipo Mylar) orientado biaxialmente, transparente y de 0,25 mm de espesor suministrado por la casa comercial Goodfellow (U.K.).
- Acetato de polivinilo suministrado por la casa comercial Goodfellow (U.K.).
- Metacrilato suministrado por la casa comercial Goodfellow (U.K.).

1.3.4. Ordenadores y programas informáticos

Ordenadores

- Ordenador personal IBM modelo 330-100dx4 directamente conectado al espectrofluorímetro.
- Ordenador personal 486 DX-40, provisto de los programas informáticos necesarios para efectuar los cálculos estadísticos.
- Impresoras
 - Hewlett Packard laserjet III.
 - Hewlett Packard Deskjet 550C.

Programas informáticos.

Como soporte informático para la recogida de datos experimentales se ha utilizado el programa FLDM (Fluorescence Data Manager) suministrado por Perkin-Elmer para manejo del espectrofluorímetro, almacenando los datos experimentales en un disco flexible de 3'1/2 pulgadas, hasta su posterior

tratamiento estadístico.

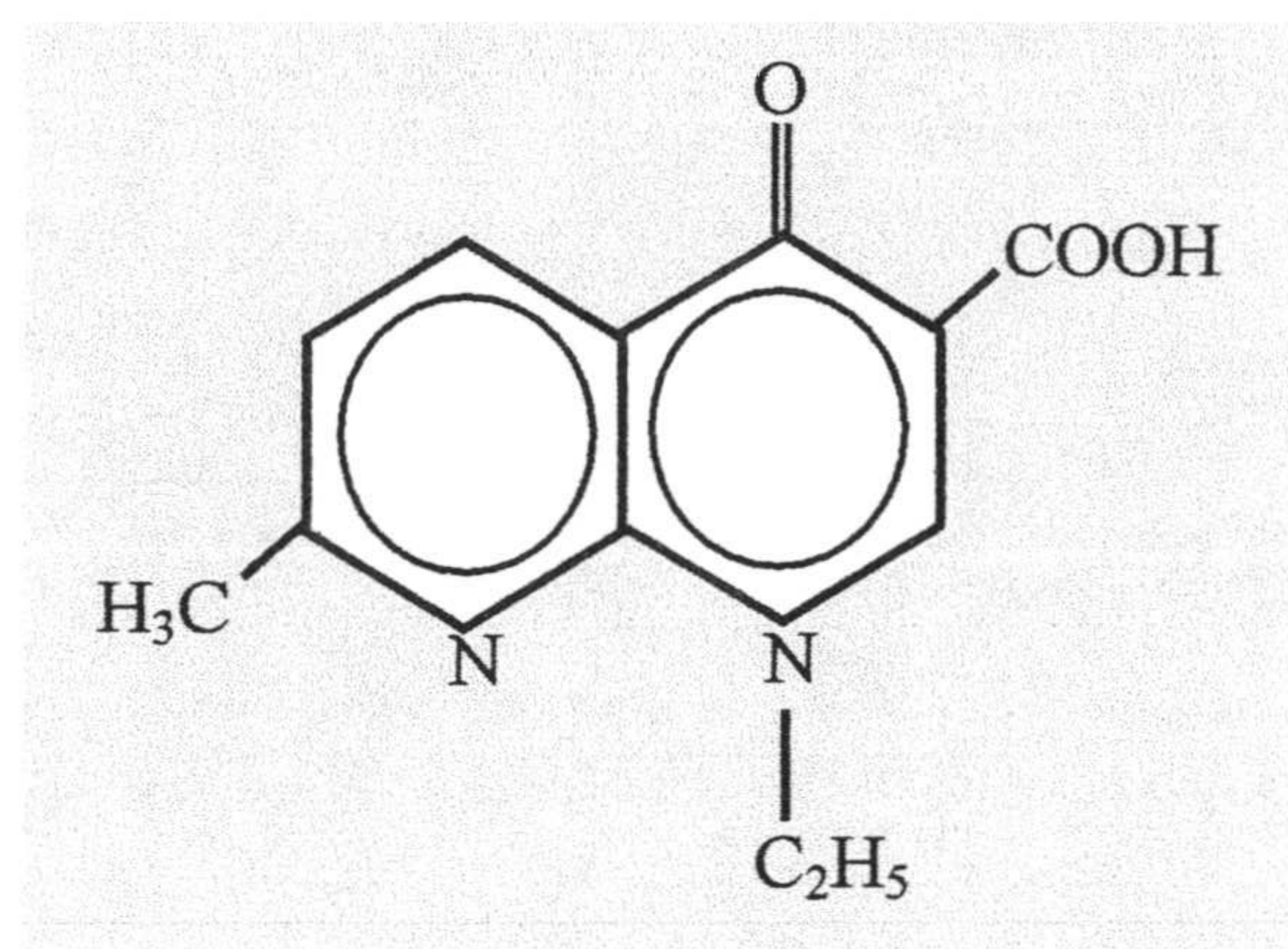
Las representaciones gráficas se han llevado a cabo con los programas Surfer V 4.13 (Golden Softwar Inc. 1989), Grafer V1.75 (Golden Softwore Inc.1988) y Harvard Graphics V 2.0 Software Publishing Corporation 1991-1993 y Statgraphics software package V. 6.0 Manugistics Inc. USA (1992).

Como programas para texto:

- Microsoft Word para Windows 2000, Microsoft Corporation.

1.4. Bibliografía

1. A. Savitzky y M. Golay, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1627.
2. K.E. Atkinson; *An Introduction to Numerical Analysis*, 2ª Ed. Jhon Wiley & Son, New York (1989) 136.
3. F.X. Rius. *Tratamiento estadístico de los datos analíticos(I). Principios básicos, en La calidad de los laboratorios analíticos*, Ed. Reverté, Barcelona, (1995) 39-69.
4. F.X. Rius, *Validación de métodos analíticos. Trazabilidad e incertidumbre*. Curso COMETT en Granada, (1994).
5. A.L. Wilson, *Talanta*, 17 (1970) 21.
6. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119 (1994) 2363.
7. IUPAC, Analytical Chemistry Division, *Spectrochim Acta B*, 33B (1978) 242.
8. J.D. Ingle Jr. *J. Chem. Ed.*, 51 (1971) 100.
9. L. Cuadros, A. García, C. Jiménez y M. Román, *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.



CAPÍTULO 2

ESTUDIO ESPECTROFOSFORIMÉTRICO DEL ÁCIDO NALIDÍXICO MEDIANTE UN SENSOR DE UN SOLO USO

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

2.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁCIDO NALIDÍXICO	99
2.1.1.	Espectros de fosforescencia en fase sólida del ácido nalidíxico	99
2.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	102
2.2.1	Optimización de variables experimentales que afectan al sensor	105
2.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	105
2.2.1.2	<i>Elección de los componentes de la membrana sensora</i>	106
2.2.1.3.	<i>Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.</i>	107
2.2.1.4.	<i>Optimización del volumen de plastificante</i>	108
2.2.1.5.	<i>Optimización del volumen de disolvente.</i>	109
2.2.1.6.	<i>Optimización del volumen del volumen de gota</i>	110
2.2.1.7.	<i>Influencia del orden de adición de los reactivos.</i>	111
2.2.1.8.	<i>Influencia de la forma y del tiempo de secado del sensor</i>	111
2.2.2.	Optimización de parámetros instrumentales	113
2.2.2.1.	<i>Influencia del ancho de la rendijas</i>	113
2.2.2.2.	<i>Optimización de los tiempos t_d y t_g</i>	114
2.2.3.	Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.	115
2.2.3.1.	<i>Optimización del tiempo de equilibrado</i>	116
2.2.3.2.	<i>Influencia del modo y velocidad de agitación.</i>	117
2.2.3.3.	<i>Influencia de la velocidad de agitación sobre la fosforescencia.</i>	118
2.2.4.	Optimización de las variables dependientes de la muestra	118
2.2.4.1.	<i>Influencia del átomo pesado.</i>	119
2.2.4.2.	<i>Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	120
2.2.4.3.	<i>Influencia de la fuerza ionica.</i>	121
2.2.5.	Influencia del uso de atmósfera de N ₂ durante la medida.	122
2.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	122
2.4	PROCESO DE CALIBRACIÓN.	123
2.4.1.	Calibración mediante procedimiento convencional.	124
2.4.2.	Calibración mediante superficie de calibrado.	125
2.4.3.	Parámetros analíticos.	131
2.5	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	132
2.6	APLICACIONES ANALÍTICAS	134
2.7	BIBLIOGRAFÍA	136

El ácido [1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico], cuyo nombre común es ácido nalidíxico, es el primero de los antibióticos del grupo de las quinolonas que fue sintetizado y cuya acción germicida se basa en la inhibición de la ADN-girasa, encargada de replicar el ADN de los gérmenes patógenos gramnegativos que pueden infectar el sistema urinario y el intestino de los animales superiores. Aunque en la actualidad sólo se utiliza en la práctica veterinaria, de ahí su posible presencia en derivados lácteos procedentes de ganado vacuno, es interesante disponer de métodos de determinación que permitan no sólo detectar y cuantificar su presencia en la leche, materia prima de dichos derivados lácteos, sino también en la orina humana donde puede estar presente por su incorporación no deseada a la cadena alimentaria.

2.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁC. NALIDÍXICO.

Los espectrómetros convencionales de fluorescencia/fosforescencia, permiten registrar varios tipos de espectros de los que nosotros vamos a utilizar dos de ellos:

- Espectros de excitación: obtenidos al registrar la variación de intensidad de fosforescencia en función de la longitud de onda del haz de excitación, mientras se mantienen constantes la longitud de onda de emisión y las demás magnitudes características del fenómeno fosforescente, como son el tiempo de apertura del detector, el tiempo de retraso en la medida, las rendijas, etc. y
 - Espectros de emisión: obtenidos en idénticas condiciones a los anteriores pero registrando en este caso la intensidad de fosforescencia en función de la longitud de onda de emisión, para una longitud de onda de excitación determinada.
-

Sin embargo, no hemos de olvidar que ambos tipos de espectros no son más que aspectos parciales de un comportamiento luminiscente integral del analito que estaría representado por su espectro de fosforescencia total. No obstante, a pesar de la mayor cantidad de información contenida en los espectros totales de fosforescencia, puesto que a nosotros sólo nos interesa conocer el valor de la intensidad de fosforescencia emitida en unas determinadas condiciones, en este estudio experimental del comportamiento analítico del ácido nalidíxico, vamos a utilizar el espectro de excitación para conocer la longitud de onda óptima para la emisión fosforescente y, una vez conocida esta obtendremos el espectro de emisión con el que determinaremos todos los parámetros analíticos que nos interesen y estableceremos la función de calibrado correspondiente.

2.1.1. Espectros de fosforescencia del ácido nalidíxico en fase sólida.

Para obtener el espectro de excitación del ácido nalidíxico se procedió como se describe a continuación: utilizando el procedimiento descrito en el capítulo anterior de esta Memoria, se preparó una serie de sensores que posteriormente se usaron para obtener los diferentes espectros de excitación y emisión del analito.

A continuación se prepararon 50 mL de disolución acuosa de nalidíxico, con una concentración de 1 mg/L en analito, partiendo de un volumen medido de disolución madre, cuyo disolvente era alcohol absoluto, y añadiendo la cantidad oportuna de agua desionizada. Siguiendo el procedimiento operatorio descrito en el capítulo anterior se equilibró el sensor con la disolución de nalidíxico y posteriormente se registró el espectro de excitación del analito fijando arbitrariamente una longitud de onda de emisión de 425 nm y bajo las siguientes condiciones instrumentales: $t_g = 10$ ms; $t_d = 0'15$ ms, intervalo de longitud de onda de excita-

ción 300-420 nm y rendija de excitación y emisión: 2,5 nm y 5 nm respectivamente. Como velocidad de barrido se escogió 240 nm/min.

En todas las medidas de intensidad de fosforescencia emitida por un determinado sensor equilibrado con analito, antes de equilibrar el sensor, se mide su fosforescencia con objeto de establecer el correspondiente valor del blanco analítico. Obviamente esta medida se realiza bajo las mismas condiciones operatorias en las que posteriormente se volverá a medir el sensor una vez que haya sido equilibrado con la disolución de analito. En este caso así se hizo y obtuvimos el espectro de excitación que podemos ver en la figura 2.1.

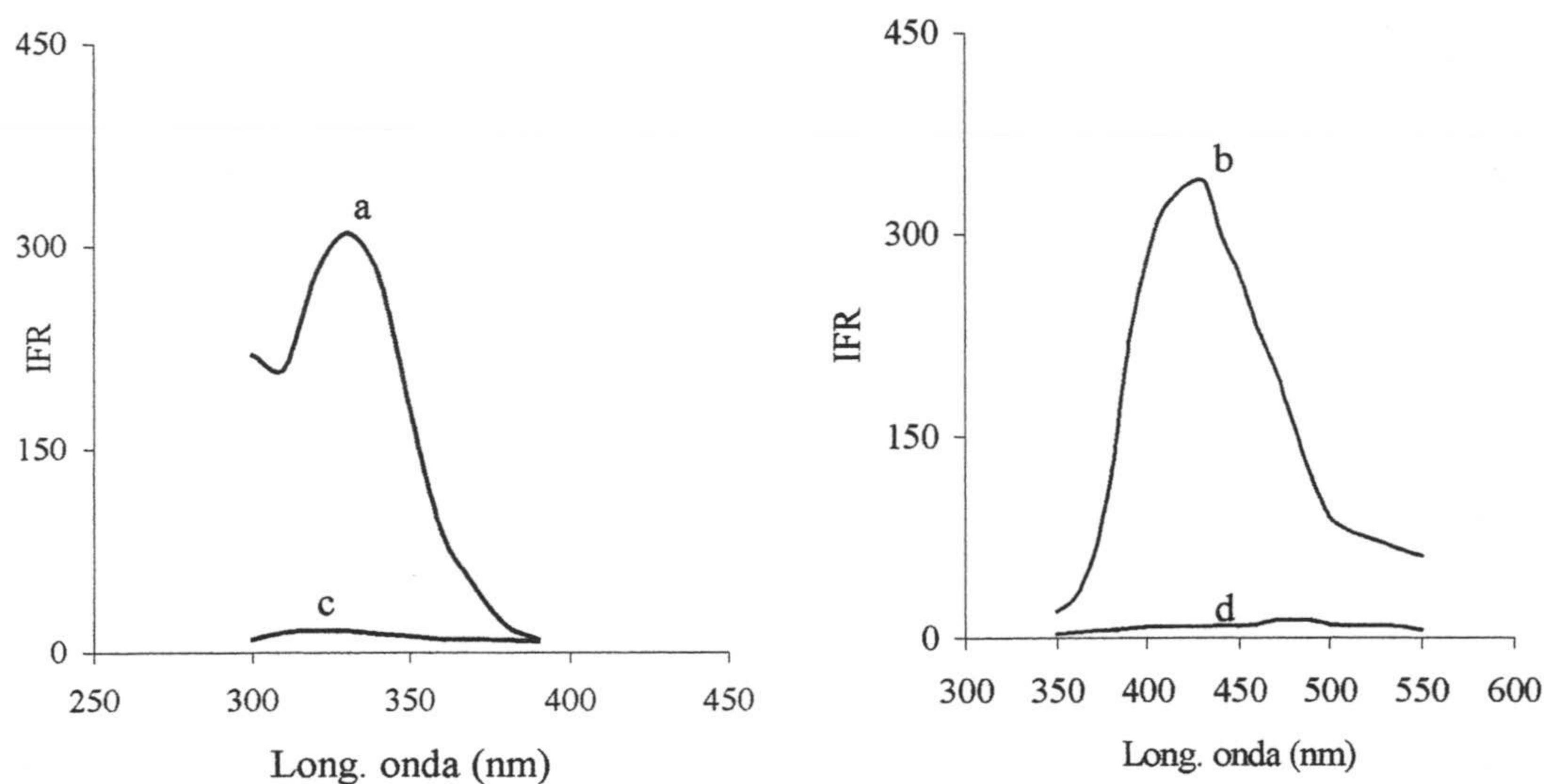


Figura 2.1. Espectros de excitación y emisión en fase sólida: (a,b) sensor con analito, (c,d) blanco.

Una vez conocida la longitud de onda óptima para la excitación del analito se procedió a obtener el espectro de emisión del mismo. Para ello, fijando como longitud de onda de excitación 332 nm y las condiciones experimentales anteriormente reseñadas, se procedió a registrar el espectro de emisión efectuando un barrido de longitud de onda de emisión comprendido entre 380 y 550 nm. Se obtuvo el espectro de emisión que podemos ver en la citada figura 2.1 que se encuentra en la página anterior.

2.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.

En el proceso de emisión fosforescente en fase sólida utilizando un sensor para fijar el analito, influyen una gran cantidad de variables experimentales relacionadas con las diferentes etapas del proceso que van desde la preparación del sensor hasta el proceso final de medida de la señal analítica. Cuando se trata de sensores de un solo uso, en los que el analito se fija sobre la zona sensora mediante un proceso de absorción, es evidente que la estructura y composición de la zona sensora es uno de los puntos clave para facilitar, o no, la posterior acción de penetración de las moléculas de analito en su interior. Por este motivo el primer grupo de variables experimentales que habremos de optimizar será el formado todas aquellas variables relacionadas con la preparación del sensor. La forma en la que veremos cuál es la influencia de estas variables será construyendo diferentes sensores, con diferentes composiciones cualitativas y cuantitativas y, midiendo bajo unas condiciones operatorias fijas, cuál es la fosforescencia producida en cada caso.

Una vez que hayamos optimizado los parámetros relativos a la construcción del sensor, proceso que se realizará para cada analito independientemente, procederemos a estudiar las variables que influyen en el proceso de fijación y que de-

penden de la composición de la disolución de muestra. La forma de proceder en este caso será la misma que en el anterior, es decir, fijando los valores de las variables experimentales, prepararemos diferentes sensores en los que lo único que varíe de uno a otro sea el valor de las variables en estudio. Junto con estas variables a las que nos acabamos de referir, en el proceso de fijación del analito sobre la zona sensora del sensor influyen otros parámetros o variables que también son propios del proceso de fijación, pero que están relacionadas con características físicas del proceso tales como tiempo o velocidad de agitación por citar algunas de ellas. Por último, estudiaremos y optimizaremos aquellas variables que influyen en el proceso de medida de la señal analítica, en donde, como sabemos, influye desde parámetros puramente instrumentales como son los tiempos de retraso en la medida o de apertura del detector, hasta parámetros no instrumentales como presencia de oxígeno o de humedad atmosférica, etc. En todos los casos la forma de determinar la influencia ejercida por el parámetro en estudio será la que ya hemos comentado anteriormente, o sea, preparar diferentes sensores manteniendo fijas todas las variables excepto aquella que estamos estudiando y eligiendo como valor óptimo de dicha variable aquél que produce una mayor intensidad de emisión fosforescente.

De acuerdo con los criterios que acabamos de establecer, los diferentes grupos de variables que vamos a optimizar, para cada uno de los analitos estudiados a lo largo de esta Memoria, son los siguientes:

1. Variables dependientes de la construcción del sensor:
 - Elección del soporte sólido.
 - Tipo de reactivos empleados en la disolución que utilizaremos para construir la zona activa del sensor.
-

- Cantidad de cloruro de polivinilo utilizada en dicha disolución.
 - Cantidad de tributilfosfato utilizada en la citada disolución.
 - Cantidad de tetrahidrofurano usado como disolvente de la anterior disolución.
 - Orden de adición de los reactivos al formar la disolución.
 - Volumen de disolución depositado sobre la tira de poliéster para formar el sensor.
 - Tiempo de secado de la gota de disolución depositada sobre la tira de poliéster.
2. Variables que dependen de la disolución de muestra:
- pH de la disolución de muestra.
 - Naturaleza y cantidad de átomo pesado que hay que añadir, en caso de ser necesario.
 - Fuerza iónica del medio.
3. Variables derivadas del proceso de equilibrado del sensor con la disolución de muestra:
- Tiempo de equilibrado entre sensor y disolución de muestra.
 - Velocidad de agitación de la disolución mientras se produce la fijación del analito sobre el sensor.
 - Tiempo de secado de la muestra una vez que se ha terminado el proceso de equilibrado.
 - Volumen de muestra que se utiliza para el equilibrado con el sensor.
4. Variables propias del proceso de medida de la señal analítica:
- Parámetros instrumentales tales como, t_g y t_d y anchura de rendijas.
 - Parámetros ambientales en los que se produce la medida entre los que
-

destacaremos la presencia de una corriente de nitrógeno seco para evitar la presencia de oxígeno y humedad ambiental.

2.2.1. Optimización de variables experimentales que afectan al sensor.

Para la optimización de estas variables se procedió a efectuar un estudio sistemático de su influencia sobre la fosforescencia emitida por un sensor expresamente preparado para ello. La medida de intensidad de fosforescencia se realizó en el máximo de emisión fosforescente ($\lambda_{em} = 412 \text{ nm}$) y bajo las condiciones instrumentales descritas para obtener los espectros de emisión y excitación.

2.2.1.1 Elección del soporte sólido.

El primer “parámetro” experimental estudiado fue la elección del soporte sólido sobre el que depositar la disolución que formará la zona activa del sensor o zona sensora.

Se seleccionaron tres tipos de láminas de material transparente a la radiación visible (acetato de polivinilo, metacrilato y poliéster) y se cortaron tiras de cada uno de estos materiales. Con estas tiras se construyeron, bajo las mismas condiciones experimentales, varios sensores que posteriormente se equilibraron con disoluciones de ácido nalidíxico todas ellas iguales entre sí.

Tras medir la fosforescencia emitida por cada sensor se eligió la lámina de poliéster (politereftalato de etileno, tipo Mylar de 0,25 mm de espesor) como el material más adecuado para soportar la zona activa del sensor ya que además de ser transparente a la radiación visible, no emite fosforescencia en las condiciones en las que se mide la muestra, con lo cual los valores de los blancos son muy pequeños o nulos.

2.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.

Puesto que el fenómeno de fijación del analito en la membrana sensora es un proceso de absorción, la elección de los componentes de dicha membrana se limita a seleccionar una matriz polimérica adecuada y un plastificante, ambos componentes, junto con el adecuado disolvente, serán los encargados de formar la zona activa del sensor. Para ello como polímero matriz se probaron los siguientes compuestos: poliuretano, acetato de polivinilo y cloruro de polivinilo y como plastificante, en el caso de los derivados del polivinilo, utilizamos los siguientes compuestos: tributilfosfato, ftalato de dioctilo y bis(2-etilhexil)sebacato. Finalmente, como disolventes se utilizaron: tetrahidrofurano y mezclas de alcohol etílico y agua en diferentes proporciones.

Tras construir diferentes sensores con todas las posibles combinaciones de componentes y equilibrarlos con disoluciones de ácido nalidíxico (de concentración 1 mg/L) en las mismas condiciones operatorias, se comprobó que el sensor formado por cloruro de polivinilo, tributilfosfato como plastificante y tetrahidrofurano como disolvente fue el que emitía una mayor intensidad de fosforescencia, razón por la cual se eligieron estos componentes como materias primas para construcción de la membrana sensora.

Las proporciones de los componentes que se utilizaron en esta experiencia fueron establecidas de acuerdo con lo descrito en bibliografía acerca de la formación de plásticos, pero ello no quiere decir que estas sean las proporciones óptimas para formar la membrana que a nosotros nos interesa, de ahí que el siguiente paso en el estudio del fenómeno sea la optimización de las cantidades de cada uno de estos compuestos que han de utilizarse para formar la disolución con la que se fabricarán las membranas.

2.2.1.3. Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.

Para conocer la influencia que la cantidad de matriz plástica pueda ejercer sobre la intensidad de fosforescencia emitida, se realizó la siguiente experiencia: en diferentes viales, de 5 mL de capacidad, conteniendo cada uno de ellos 60 mg de tributilfosfato (TBF) y 0,6 mL de tetrahidrofurano (THF) se fueron añadiendo cantidades crecientes de cloruro de polivinilo (CPV) comprendidas entre 10 y 70 mg. Tras agitar los viales durante unos minutos para homogeneizar las diferentes disoluciones, se procedió a construir varios sensores con cada una de ellas, siguiendo para ello el procedimiento descrito en el capítulo anterior de esta Memoria. Una vez contruidos los sensores se procedió a medir su fosforescencia en las condiciones experimentales en las que posteriormente trabajaremos con la muestra y los valores medidos se toman como blanco analítico de cada sensor. A continuación, utilizando el procedimiento operatorio descrito en el capítulo anterior, cada sensor se equilibró con una disolución de ácido nalidíxico de concentración 1 mg/L, y tras secar el sensor se efectuó la lectura de la fosforescencia emitida obteniéndose los resultados que tenemos en la tabla 2.1 y vemos representados en la figura 2.2.

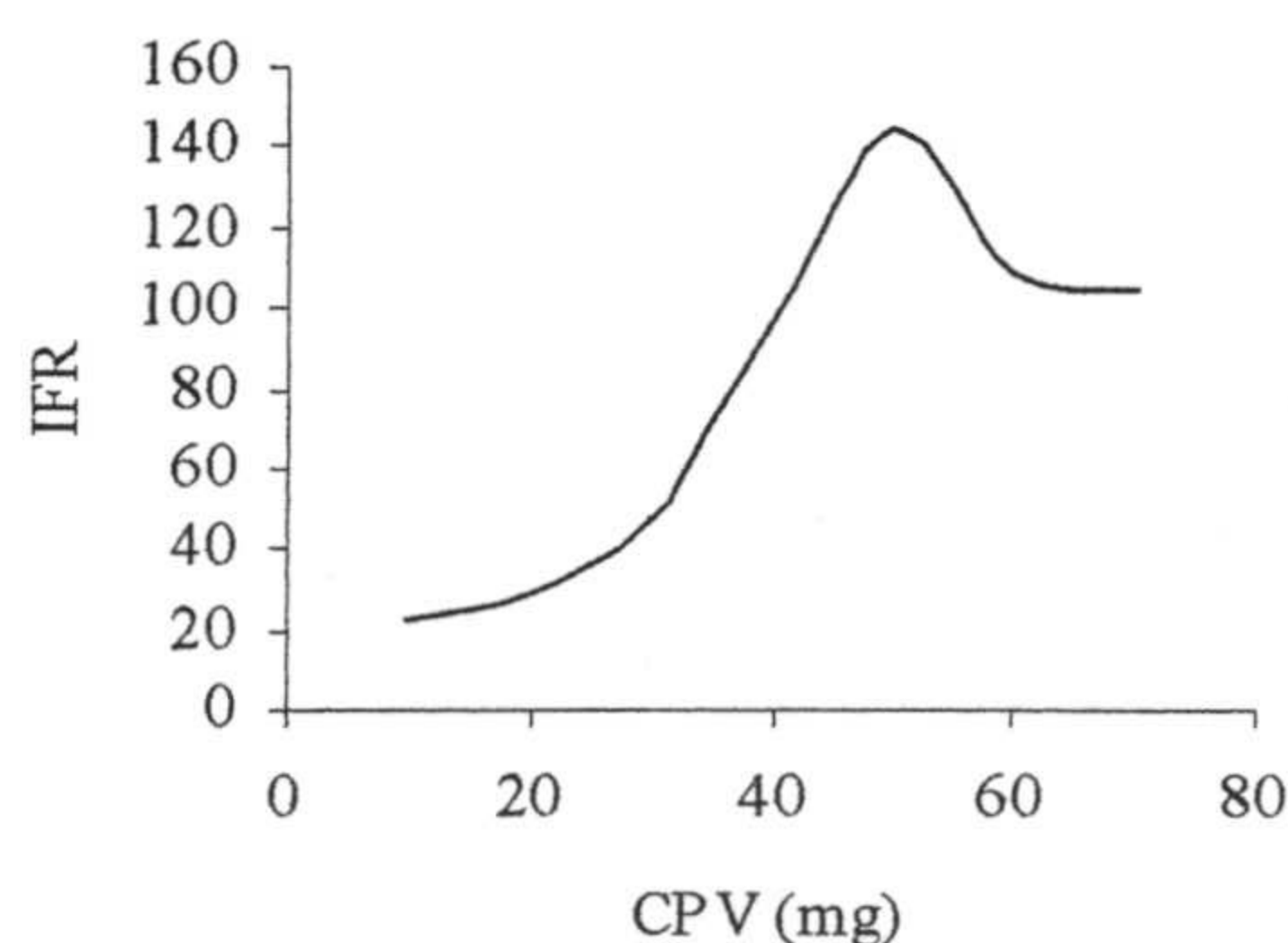


Figura 2.1. Influencia de la cantidad de CPV sobre la intensidad de fosforescencia relativa

CPV (mg)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
10	20	24	22	22,0	9,1
20	28	30	28	28,7	4,1
30	48	46	49	47,7	3,2
40	99	98	95	97,3	2,1
50	148	147	140	145,0	3,0
60	110	109	106	108,3	1,9
70	109	101	104	104,7	3,9

Tabla 2.1. Intensidad de fluorescencia relativa (IFR), en función de la cantidad de CPV. DER es la desviación relativa estándar.

De los resultados experimentales se puede deducir que la cantidad óptima de cloruro de polivinilo para el desarrollo de la fosforescencia del ácido nalidíxico es de 50 mg, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Bajo dichas condiciones la intensidad de fosforescencia emitida por el sensor es al menos un 25.3% superior a la emitida en cualquier otro caso.

2.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.

Seguidamente procedimos a optimizar la cantidad de plastificante (tributilfosfato) necesaria para desarrollar una máxima fosforescencia utilizando una cantidad de 50 mg de polímero. Para ello se prepararon varios sensores en los que la cantidad de CPV fue 50 mg, las restantes variables se mantuvieron como en la experiencia anterior y el volumen de tributilfosfato variaba entre 0,1 y 0,9 mL. Los resultados obtenidos los hemos incluido en la tabla 2.2 y los hemos representado en la figura 2.3

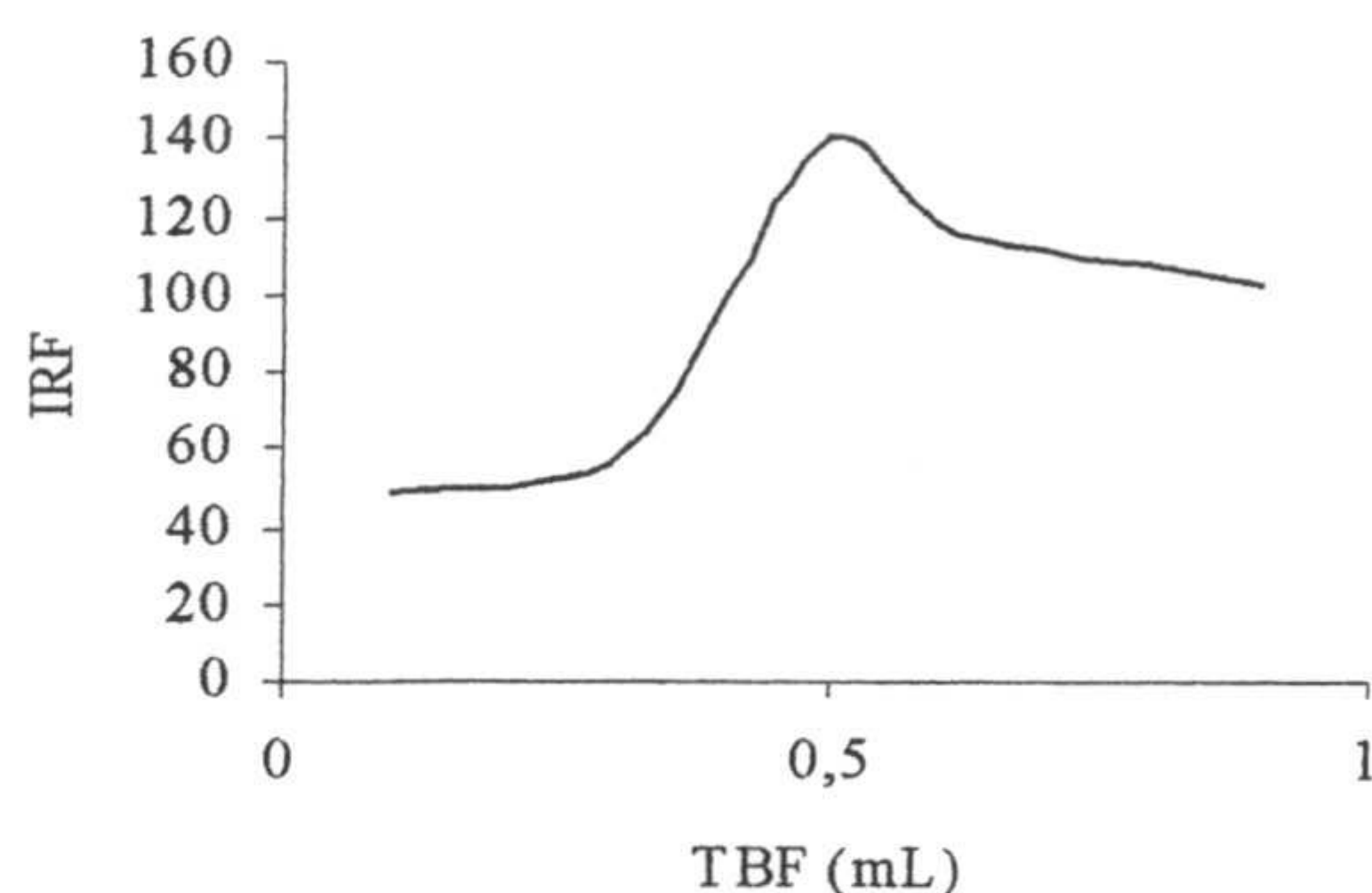


Figura 2.3. Influencia del volumen de tributilfosfato en la intensidad de fosforescencia relativa del ácido nalidíxico.

TBF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,1	48	49	47	48,0	2,1
0,3	58	56	56	56,7	2,1
0,4	98	96	99	97,7	1,6
0,5	139	141	142	140,7	1,1
0,6	120	116	117	117,7	1,8
0,7	112	109	114	111,7	2,3
0,9	100	105	102	102,3	2,5

Tabla 2.2. Intensidad de fluorescencia relativa, en función de la cantidad de TBF. DER: desviación estándar relativa en tanto por ciento.

De esta experiencia podemos deducir que un volumen de 0,5 mL de TBF es el más adecuado para el desarrollo de fosforescencia al equilibrar el sensor.

2.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.

Finalmente procedimos a la optimización de la cantidad de disolvente necesaria para la construcción del sensor. Para ello, operando en las condiciones anteriormente indicadas, preparamos varios sensores en los que la cantidad de tetrahidrofurano utilizada en la preparación de la disolución variaba entre 0,5 y 4,5 mL mientras se mantenían constantes las restantes variables. Como en anteriores ocasiones, una vez preparados los sensores se midió su fosforescencia para tomarla como blanco y posteriormente se procedió a equilibrarla con una disolución patrón de 1 mg/L de ácido nalidíxico. Tras efectuar las medidas oportunas se obtuvieron los datos experimentales que figuran en la tabla 2.3 que se encuentran representados en la figura 2.4.

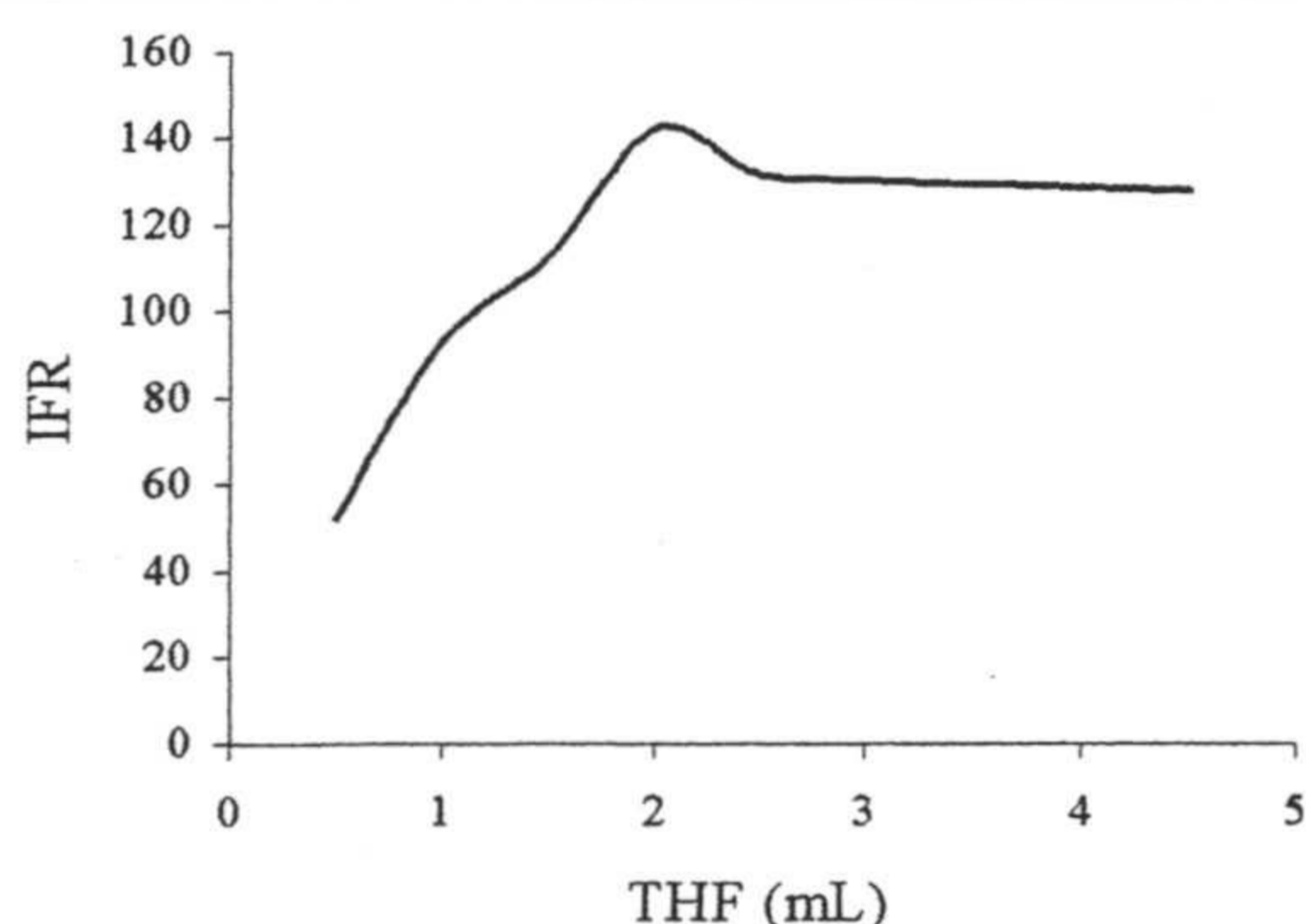


Figura 2.4. Influencia del volumen de tetrahidrofurano sobre la intensidad de fosforescencia del ácido nalidíxico.

THF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,5	50	53	54	52,3	4,2
1,0	90	88	91	93,0	4,8
1,5	112	115	110	112,3	2,2
2,0	139	142	145	142,0	2,1
2,5	130	132	132	131,3	0,8
3,0	129	130	131	130,0	0,8
4,5	130	127	121	128,0	3,0

Tabla 2.3. Intensidad de fosforescencia relativa media (IFRM) en función de la cantidad de THF.

Como podemos apreciar en la figura 2.4, el volumen más adecuado para el desarrollo de la fosforescencia es 2,0 mL, valor este que será empleado en lo sucesivo como cantidad óptima de disolvente para la construcción de los sensores.

Este resultado, junto con los obtenidos en las dos experiencias anteriores, nos

permiten decir que los valores óptimos de los componentes para la fabricación de la membrana sensora son los siguientes: cantidad de cloruro de polivinilo 50 mg, volumen de plastificante (TBF) 0,5 mL y volumen de disolvente 2,0 mL, valores estos que suponen las siguientes proporciones en peso: 26,0 % de CPV; 21,9 % de TBF y 52,1 % de THF.

Estas proporciones serán las que emplearemos en lo sucesivo para la fabricación de la disolución con la que obtendremos los sensores que utilizaremos en el estudio del ácido nalidíxico.

3.2.1.6 Optimización del volumen de gota para la preparación del sensor.

Uno de los factores que afectan al comportamiento de los sensores de gota plana es el tamaño y espesor de la gota, una vez que esta se ha solidificado. Este tamaño y forma de la gota dependen en parte del volumen de disolución que se haya depositado y en parte también de la forma en que se lleve a cabo el secado de la gota una vez depositada sobre el soporte sólido.

Para ver la influencia del volumen de disolución sobre la eficacia del sensor se

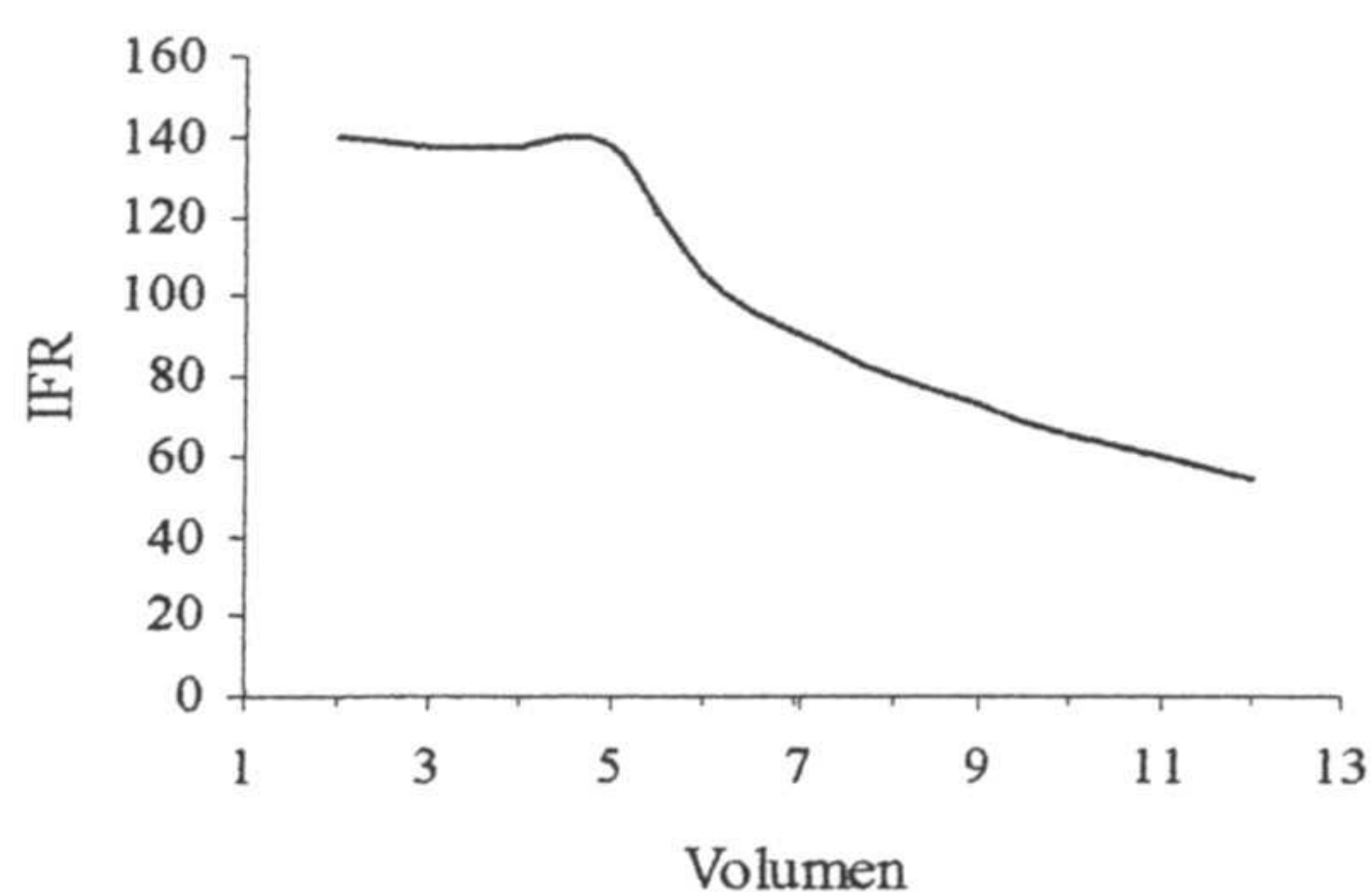


Figura 2.5. Influencia del volumen de la gota depositado para formar la zona sensora.

preparó una disolución de los reactivos CPV, TBF y THF en las proporciones óptimas y se prepararon varios sensores depositando en cada uno de ellos diferentes volúmenes de disolución comprendidos entre 2 y 12 μL . Una vez equilibrados con disoluciones de nalidíxico de 1 mg/L se procedió a la lectura de sus intensidades de fosfo-

rescencia bajo las condiciones experimentales ya indicadas con anterioridad. Los resultados experimentales se han representado en la figura 2.5 en la que podemos apreciar que volúmenes de gota comprendidos entre 2 y 5 μL producen una intensidad de fosforescencia prácticamente igual en todos los casos. Si embargo, a partir de un volumen de 5 μL la intensidad de fosforescencia relativa disminuye paulatinamente a medida que aumenta el volumen, razón por la cual seleccionamos el volumen de 5 μL como el más adecuado para la construcción del sensor ya que, al secarse, forma una película homogénea que ofrece la mayor superficie posible para la fijación del analito y no presenta puntos o zonas no transparentes, como ocurre con algunos de los sensores obtenidos con volúmenes menores.

2.2.1.7. *Influencia del orden de adición de los reactivos.*

Otro factor que en ocasiones influye sobre la fosforescencia desarrollada, es el orden de adición de los reactivos que forman la disolución para la construcción del sensor. Las pruebas realizadas para establecer dicha influencia consistieron en construir seis tipos de sensores utilizando, en todos los casos, los mismos reactivos y en las mismas proporciones y variando el orden de adición de un caso a otro. Experimentalmente se comprobó que sólo en el caso de adicionar los reactivos en el orden: CPV + TBF + THF, se obtenían membranas con las características ópticas adecuadas para su utilización como sensores. En los demás casos o los reactivos no se mezclaban bien, o las membranas no eran totalmente transparentes, o se hacían quebradizas con lo cual no son aptas para su utilización.

2.2.1.8. *Influencia de la forma y del tiempo de secado del sensor.*

Para la total plastificación del cloruro de polivinilo debe transcurrir un interva-

lo de tiempo más o menos amplio entre el momento en el que se deposita la gota sobre la tira de soporte sólido y el instante en el que el sensor queda en disposición de ser usado y, dependiendo de la duración de este intervalo y de la forma en que se efectúe el secado, las propiedades ópticas de la membrana sensora serán más o menos adecuadas para nuestros propósitos.

Para comprobar esta influencia del tiempo y forma de secado sobre la fosforescencia desarrollada al fijar el analito, se prepararon sensores, que posteriormente se equilibraron con disoluciones patrón de 1 mg/L de analito, secando la disolución de reactivos de varias formas diferentes y durante tiempos que variaban entre 10 minutos y una hora. Una serie de sensores se prepararon dejando secar la gota de disolución a temperatura ambiente y al aire libre, otra serie de ellos se secó a temperatura ambiente y en desecador a vacío y otra serie se secó calentando con una corriente de aire seco y caliente.

En este último caso los sensores obtenidos no presentaban las propiedades ópticas deseadas ya que no eran totalmente transparentes, por lo que el secado de la gota ha de efectuarse a temperatura ambiente bien a vacío o bien a presión normal. En ambos casos se obtuvieron sensores adecuados para nuestros propósitos, pero utilizando el desecador a vacío el proceso se completa en 20 minutos mientras que al aire libre se necesita esperar una hora para su total secado. En consecuencia se eligió esta última opción (secado a temperatura ambiente, a vacío, durante una hora) como procedimiento para el secado del sensor.

De esta forma, o sea, depositando 5 μ L de disolución de las proporciones señaladas con anterioridad y secando la gota depositada, durante 20 minutos, en un desecador a vacío (\approx 15 mm de Hg), las propiedades ópticas de la membrana sensora obtenida, son las siguientes: membrana plana, sólida, de forma circular, ad-

herida a la superficie del soporte sólido, transparente y homogénea, de 20 μm de espesor, parámetro este último que se determinó mediante un microscópico electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

2.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.

Una vez optimizadas los parámetros experimentales que dependen de la naturaleza y constitución del sensor, procedimos a la optimización de aquellos otros parámetros que igualmente influyen en la magnitud de la intensidad de fosforescencia medida, pero que dependen de las condiciones impuestas al instrumento durante la medida de la señal analítica. Nos referimos a los siguientes parámetros instrumentales: anchura de las rendijas tanto de excitación como de emisión, tiempo de retraso entre el pulso de la lámpara y la apertura del obturador del fotodetector (t_d) y tiempo durante el cual el fotodetector se mantiene abierto para efectuar una medida (t_g). Las longitudes de onda óptimas se habían seleccionado previamente a partir de los espectros de excitación y emisión.

Para ello, utilizando la metodología descrita anteriormente, se prepararon sensores y se equilibraron con disoluciones de analito de 1 mg/L. Tras secar los sensores, después de la fijación del analito, se procedió a la medida de la intensidad de fosforescencia desarrollada por cada uno de ellos, cambiando en cada caso una de las cuatro variables anteriormente señaladas: anchura de rendijas, t_d y t_g .

2.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.

Para establecer la influencia de estos dos parámetros se procedió como sigue: tras la preparación de la respectiva muestra patrón, se efectuó la medida de su señal analítica para $t_g = 10$ ms y $t_d = 0,1$ ms, manteniendo una rendija de emisión de

5 nm y variando la de excitación entre 2.5 y 15 nm. Se observó experimentalmente que a medida que aumenta el ancho de la rendija de excitación por encima de 3 nm, la intensidad de la fosforescencia emitida disminuye apreciablemente a la vez que la banda de emisión sufre un ligero ensanchamiento, razón por la cual se eligió el valor de 3 nm como óptimo para efectuar las medidas.

A continuación, manteniendo una rendija de excitación de 3 nm se procedió de igual forma para optimizar el valor de la rendija de emisión observándose que, en este caso, como es lógico, a medida que aumenta el ancho de rendija aumenta también la intensidad medida por el detector. Se adoptó el valor de 15 nm como óptimo para las siguientes experiencias.

2.2.2.2. *Optimización de los tiempos t_g y t_d*

Para optimizar los tiempos de retraso entre la terminación del pulso de la lámpara de excitación y el comienzo de la medida de fosforescencia, así como el tiempo de apertura del fotodetector para efectuar la medida de la fosforescencia emitida tras un pulso de la lámpara, se procedió de la siguiente forma: en primer lugar, con unas rendijas de excitación y emisión de 3 y 15 nm, respectivamente, y manteniendo un tiempo t_g constante de 10 ms, se midió la fosforescencia emitida por la muestra a diferentes tiempos de retraso t_d comprendidos entre 0,05 y 0,5 ms. Se pudo comprobar que el tiempo óptimo para efectuar la medida era $t_d = 0,15$ ms. Por lo tanto, fijando este tiempo como parámetro invariable se procedió a determinar el tiempo óptimo de apertura del detector. Para ello se fijaron las anteriores variables en los valores optimizados y se midió la fosforescencia emitida por el sensor para tiempo de apertura comprendidos entre 2 y 11 ms. Un tiempo $t_g = 10$ ms resultó ser el más adecuado para la medida de la fosforescencia emitida

ya que su intensidad era máxima para este valor.

En consecuencia, como resumen de los resultados obtenidos en estas experiencias, podemos decir que las condiciones instrumentales óptimas para la medida de la fosforescencia emitida por este analito, son las siguientes: ancho de rendija de excitación 3 nm; anchura de la rendija de emisión 15 nm; tiempo de retraso (t_d) 0,15 ms y tiempo de apertura del detector (t_g) 10 ms. Valores todos ellos que serán usados como óptimos en sucesivas experiencias.

2.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.

En el capítulo primero de esta Memoria se indicó que el proceso de fijación del analito sobre la membrana sensora es un proceso de absorción del mismo, en el que las moléculas de analito pasan desde una disolución acuosa a una fase sólida, la membrana del sensor, en la que quedan atrapadas. Por ello, si la molécula de analito presenta fosforescencia intrínseca pueden emitir radiación fosforescente si se dan las circunstancias apropiadas.

En este proceso de fijación y posterior adaptación de la membrana sensora para que se encuentre en las condiciones idóneas para emitir fosforescencia, sin que se produzca un fenómeno de desactivación no radiativa, intervienen varios factores o variables experimentales cuya influencia puede ser decisiva en el momento de la medida de la señal analítica. Estas variables son, fundamentalmente:

1. El tiempo necesario para que las moléculas puedan penetrar en la membrana, en un número suficientemente alto como para producir una radiación que pueda detectar el instrumento, o tiempo de equilibrio.
 2. Modo y velocidad de agitación de la disolución de muestra para que se favorezca el proceso de fijación.
-

3. Modo y tiempo de secado de la superficie sensora tras haber fijado sobre ella el analito.

La optimización de estos tres parámetros es decisiva ya que, por una parte, ha de producirse la fijación del analito para que se desarrolle la fosforescencia y, por otra parte, la muestra no puede contener humedad ya que su presencia desactiva las moléculas excitadas, sin emisión fosforescente en el proceso de desactivación.

2.2.3.1. Optimización del tiempo de equilibrado.

En primer lugar, siguiendo un orden lógico, procedimos a la optimización del tiempo y condiciones necesarias para la mejor fijación del analito.

Para determinar la influencia del tiempo de equilibrio entre disolución de analito y membrana sensora, sobre la fosforescencia desarrollada, procedimos de la siguiente forma: una serie de sensores, contruidos de la forma descrita anteriormente, se introdujeron en disoluciones de patrón del analito de diferentes concentraciones comprendidas entre 0,5 y 3,0 mg/L y se mantuvieron en ellas durante diferentes períodos de tiempo comprendidos entre 15 minutos y dos horas, agitando la disolución mediante un sistema de agitación magnética cuya velocidad de agitación se mantuvo constante en 30 revoluciones por minuto. Posteriormente se secaron todos ellos a vacío y bajos las mismas condiciones experimentales y se midió su fosforescencia en las condiciones instrumentales indicadas en el apartado anterior. Los resultados experimentales obtenidos son los que se incluyen en la tabla 2.4, donde podemos apreciar como la intensidad de fosforescencia relativa depende de dos variables que están relacionadas entre sí: el tiempo de equilibrio del sensor con la disolución y la concentración de analito.

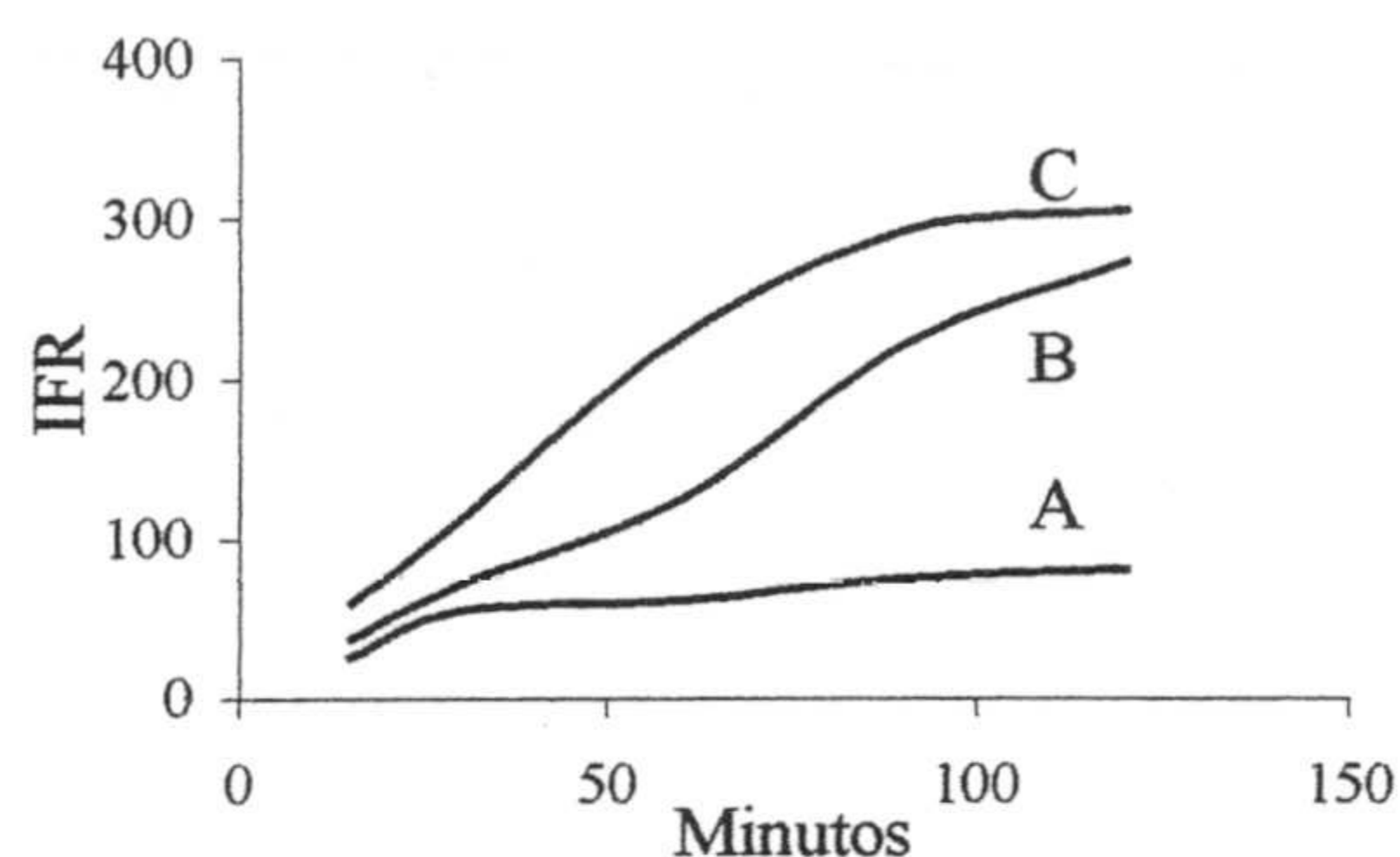


Figura 2.6. Influencia del tiempo de equilibrio y de la concentración sobre la intensidad de fosforescencia. A) 0,5 mg/L. B) 1,5 mg/L. C) 2,5 mg/L.

mg/L	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Tiempo						
15 min	26	28	38	45	60	73
30 min	55	58	72	92	112	120
60 min	62	93	125	187	227	244
90 min	75	121	221	283	292	303
120 min	81	154	273	290	305	329

Tabla 2.4. Intensidad de fosforescencia relativa en función de la concentración de analito y del tiempo de equilibrio. Velocidad de agitación 30 rpm.

De la figura 2.6, donde hemos representados tres de las series de valores de la tabla 2.4, los correspondientes a las concentraciones de analito de 0,5, 1,5 y 2,5 mg/L, se deducen dos hechos: 1º) Cuanto menor es la concentración de analito en la disolución de muestra, mayor es el tiempo necesario para que se fije una determinada cantidad de analito sobre la membrana sensora y 2º) La cantidad de analito que se fija sobre la membrana para un tiempo determinado, depende de la concentración de analito en la disolución. En resumen, no existe un tiempo óptimo de equilibrio ya que este depende de la concentración de analito en la muestra.

2.2.3.2. Influencia del modo y velocidad de agitación.

Tras los resultados de la experiencia anterior, en la que se demuestra que a bajas concentraciones de analito los tiempos de equilibrio son grandes, procedimos a estudiar la posible influencia de la forma de mantener en contacto la disolución de muestra con el sensor, con objeto de reducir, si fuera posible, el tiempo de equilibrio necesario para conseguir una fijación adecuada del analito.

Para ello, se probaron diferentes formas de colocar el sensor dentro de la diso-

lución de muestra mientras esta era agitada a una velocidad constante de 30 rpm. Pudimos constatar que, colocando el sensor de frente a la circulación de la corriente de disolución, la fosforescencia desarrollada era un 60 % superior a la que se desarrolla cuando el sensor esta colocado paralelo a dicha corriente y casi un 100% superior al caso en el que se colocó el sensor de forma que la corriente de circulación chocaba frontalmente con la parte trasera del mismo. En este último caso la fosforescencia desarrollada era prácticamente nula. Consecuentemente, en las siguientes experiencias el sensor fue colocado frontalmente a la corriente de disolución producida por el agitador.

2.2.3.3. Influencia de la velocidad de agitación sobre la fosforescencia.

Una vez que se hubo determinado el modo de agitación óptimo procedimos al estudio de la influencia que pudiera ejercer la velocidad de agitación sobre la fosforescencia desarrollada en el sensor, tras su equilibración con la disolución de analito. Para ello dispusimos varios sensores, a los que equilibramos con disoluciones idénticas de nalidíxico de concentración 1 mg/L, durante el mismo tiempo pero con velocidades de agitación comprendidas entre 30 y 90 rpm. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para una velocidad de agitación de 30 rpm la intensidad de fosforescencia relativa fue 110, para una velocidad de agitación de 60 rpm alcanza un valor máximo de 150 y para velocidades superiores a 60 rpm la intensidad que se mide no aumenta o incluso decrece ligeramente cuando la velocidad se aproxima a 90 rpm. Estos resultados son el valor medio de tres medidas diferentes para cada uno de los casos estudiados.

2.2.4. Optimización de las variables dependientes de la muestra.

Como se dijo con anterioridad, otro grupo de variables experimentales que

pueden influir decisivamente en el desarrollo de la fosforescencia del analito, cuando se fija sobre el sensor, son aquellas que están íntimamente relacionadas con las condiciones físico-químicas en las que se encuentra la disolución de la muestra durante el proceso de absorción del analito sobre el sensor.

Estas fundamentalmente son: naturaleza y cantidad de átomo pesado, pH de la disolución y fuerza iónica del medio. Comenzaremos por estudiar la influencia ejercida por la presencia de un átomo pesado, manteniendo como pH de la disolución el que ella presenta espontáneamente y posteriormente estudiaremos la influencia que puedan ejercer el pH de la disolución y la fuerza iónica del medio.

2.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia del nalidíxico.

Un hecho conocido en fosforescencia es el papel que ejercen los átomos pesados, es decir, cationes o aniones de gran volumen, sobre la intensidad de fosforescencia. En muchos casos su presencia es decisiva para que se lleve a cabo el proceso fosforescente mientras que en otros sólo supone un incremento de la intensidad de la fosforescencia, debido a que facilita el proceso de transición electrónica desde el estado singlete excitado al triplete como consecuencia de un acoplamiento espín-orbital entre ambos. Como veremos a lo largo de esta Memoria en determinados casos no es necesaria la presencia de átomo pesado.

Con el ácido nalidíxico se ensayaron una serie de metales pesados [Pb(II), Ag(I), Tl(I) y Hg(II)] en forma de nitratos y plomotetraetilo y como aniones voluminosos se estudiaron los halogenuros Cl⁻, Br⁻ y I⁻. Todos ellos, excepto el plomotetraetilo, se ensayaron incorporando la especie química a la disolución de muestra antes de proceder a la fijación del analito en el sensor, mientras que en el caso de plomotetraetilo su incorporación se hizo en la propia membrana del sensor en el momento de su construcción. En ningún caso se observó una mejora de la

fosforescencia emitida por el analito y, en determinados casos se observó un ligero decrecimiento de la misma. Por ello las sucesivas experiencias realizadas se efectuaron sin la presencia de átomo pesado.

2.2.4.2. Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.

La influencia del pH durante el proceso de fijación del analito sobre el sensor, se estudió utilizando disoluciones patrón de 1,0 mg/L con diferentes valores de pH y varios sensores para efectuar el proceso de fijación del analito. Los valores de pH de las diferentes disoluciones estaban comprendidos entre 1 y 12 y se ajustaron utilizando diversas disoluciones de NaOH y HCl de diferentes concentraciones. Los valores experimentales obtenidos son los que figuran en la tabla 2.5 y se representan en la figura 2.7

Como podemos apreciar en la figura 2.7 la intensidad de fosforescencia permanece prácticamente constante para valores de pH comprendidos entre 2 y 6, decreciendo de forma apreciable entre 6 y 8 y de forma más suave para valores de pH superiores a 8. La brusca caída de la fosforescencia entre 6 y 7 la podemos atribuir a que se produce la desprotonación del grupo ácido del nalidíxico ya que su pK_a es de 6,1 según los estudios realizados por L.F. Capitán y col.(1).

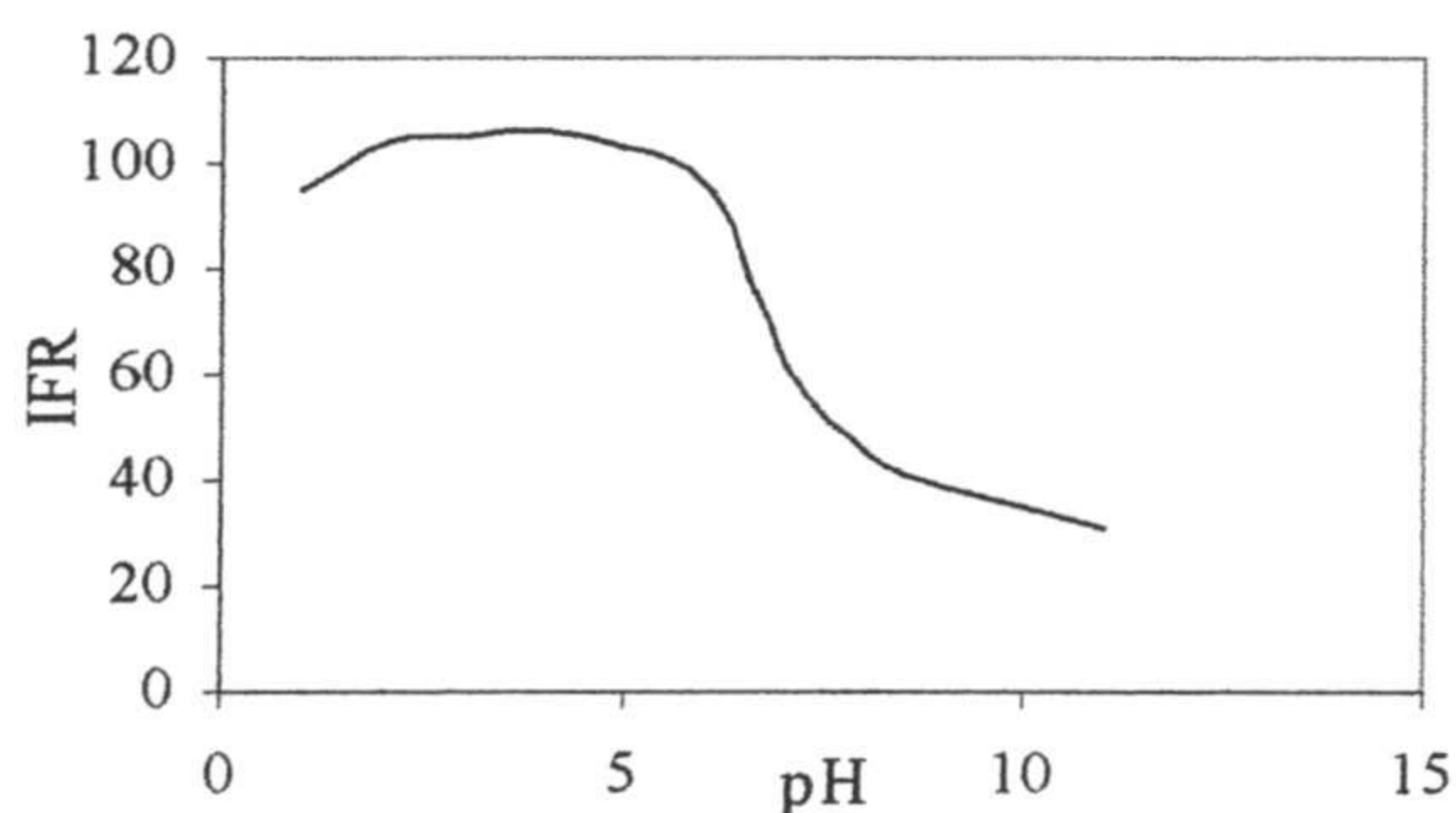


Figura 2.7. Influencia del pH de la disolución sobre la fosforescencia emitida.

pH	IFR	pH	IFR
1,4	95,1	7,1	61,1
1,9	104,4	8,0	44,9
2,9	105,4	9,2	39,0
4,5	105,7	10,4	35,5
5,3	103,2	11,6	30,5
6,1	95,1		

Tabla 2.5. Valores de la intensidad de fosforescencia en función del pH de la disolución de muestra.

A valores de pH mayores que 8,0 la fosforescencia decrece más lentamente a medida que aumenta el pH debido probablemente a que la disociación del grupo ácido del nalidíxico impide la penetración de la molécula en la membrana sensora ya que esta presenta carácter apolar, en contraste con el carácter polar de la molécula disociada.

Como consecuencia de esta experiencia se decidió seleccionar como pH de trabajo para las disoluciones de patrones y de muestras el valor de 3,0 ajustándose mediante la adición de pequeños volúmenes de disolución acuosa de HCl. Esta decisión de fijar el pH de la muestra se adoptó para evitar que, en el caso de muestras reales, sobre todo, el pH de la muestra pudiera estar fuera del intervalo en el cual la intensidad de fosforescencia se mantiene constante.

2.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica.

Para conocer la influencia que pudiera ejercer la fuerza iónica de la disolución de la muestra sobre la intensidad fosforescente hemos empleado cloruro sódico como electrolito. Las experiencias realizadas fueron las siguientes: se prepararon varias disoluciones en las que, manteniendo constantes las restantes variables, se pusieron cantidades crecientes de NaCl, comprendidas entre 0 y 1,5 M, y se equilibraron con los respectivos sensores en la forma indicada en el procedimiento descrito con anterioridad. Los resultados experimentales muestran que la intensidad de fosforescencia se mantiene constante mientras la fuerza iónica del medio se encuentra por debajo de 0,1 M y decrece de forma prácticamente lineal a medida que aumenta desde 0,1 hasta 1,5 M, de forma que para fuerza iónica $< 0,1$ M la intensidad de fosforescencia se mantiene en un valor de 121,0 y a partir de cuyo valor comienza el decrecimiento hasta llegar a 69,1 cuando la fuerza iónica es de 1,5 M, lo que supone un decrecimiento del 42,9 % de su valor inicial.

2.2.5 Influencia del uso de atmósfera de N₂ durante la medida.

Como se ha indicado en las secciones precedentes, la presencia de oxígeno o de humedad, produce una disminución de la señal de fosforescencia emitida por un fosforóforo y ello nos obliga a llevar a cabo un estudio que ponga de manifiesto dicha influencia. Para efectuar este estudio del efecto del oxígeno y la humedad atmosféricos, se diseñó el dispositivo que describimos en el capítulo primero dedicado a la metodología, instrumentación y reactivos utilizados en el desarrollo de esta Memoria.

El proceso experimental fue como sigue: se prepararon varios sensores y se equilibraron con disoluciones de ácido nalidíxico de 1,0 mg/L según el procedimiento operatorio anteriormente descrito y se midió la intensidad de fosforescencia que emitía cada uno de ellos, cuando se usaba una atmósfera inerte producida mediante una corriente de nitrógeno, secado con una trampa con cloruro cálcico, que se introducía por la parte superior del dispositivo. A continuación se midió la fosforescencia que emitían otros sensores preparados de la misma forma pero medidos en atmósfera convencional.

Los resultados experimentales nos demuestran que el uso de la corriente de nitrógeno es imprescindible para efectuar las medidas ya que la fosforescencia en ausencia de nitrógeno disminuye un 92 % de su valor, con respecto al valor que presenta en presencia de atmósfera inerte.

2.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Optimizadas las variables experimentales que pueden afectar a la intensidad de fosforescencia emitida, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio para la preparación de la muestra y condiciones de medida: a la disolución de muestra (o patrón) se le ajusta el pH a un valor de 3,0 utilizando para ello una di-

solución de HCl 2M. Una vez ajustado el pH se toman 50 mL de la misma y se colocan en un vaso de precipitado de 100 mL de capacidad y se introduce el sensor colgado de un soporte sólido, de forma que la corriente que se produzca cuando se agite la disolución, le llegue de frente a la membrana sensora que se colocará próxima a la pared del vaso para evitar los remolinos que se forman en el centro del mismo. Se mantiene el sensor en el interior de la disolución mientras se agita esta durante 60 minutos a una velocidad de 30 rpm. Terminada la operación de agitación se saca el sensor y se coloca en el interior de un desecador a vacío durante 20 minutos, transcurridos los cuales se introduce en el dispositivo de medida. El dispositivo con la muestra se introduce en el compartimiento de muestras del espectrómetro de forma que el haz de excitación forme un ángulo de 45° con la superficie sensora, se conecta la corriente de nitrógeno y se procede a la medida de la intensidad de fosforescencia transmitida a $\lambda_{exc} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 412 \text{ nm}$; $t_g = 10 \text{ ms}$ y $t_d = 0,15 \text{ ms}$.

2.4 PROCESO DE CALIBRACIÓN.

Como vimos anteriormente el proceso de absorción del analito sobre el sensor se puede considerar como un proceso de extracción sólido-líquido en el que la cantidad de analito retenido en la membrana del sensor, cuando las restantes variables se mantienen constantes, depende de dos factores íntimamente relacionados entre sí: la concentración de analito en la muestra y el tiempo de equilibrado del sensor con la disolución. Por consiguiente la señal analítica se puede considerar como una función de dos variables:

$$IFR = f(C,t)$$

En donde C es la concentración de analito, t el tiempo de equilibrado y IFR la intensidad de fosforescencia relativa, o sea, la intensidad emitida por la muestra, a la

que hemos restado el blanco, que es una función matemáticamente continua y estrictamente creciente para cada una de las dos variables.

En estas condiciones el proceso de calibración se puede efectuar de dos formas diferentes: 1º) En la forma convencional, es decir, estableciendo la relación entre concentración de analito y señal analítica para un tiempo de equilibración previamente establecido. 2º) Mediante un proceso de calibración en el que la señal analítica sea función de ambas variables a la vez, con lo cual podemos escoger el tiempo de equilibrio óptimo para cada muestra y efectuar las medidas de fosforescencia con una máxima sensibilidad.

2.4.1. Calibración mediante el procedimiento convencional.

Para establecer la zona donde la relación existente entre la concentración de analito y la señal analítica es lineal, se llevó a cabo la siguiente experiencia: en matraces aforados de 50 mL de capacidad se prepararon disoluciones patrón de ácido nalidíxico de concentraciones crecientes comprendidas entre 0,5 y 3,0 mg/L y, tras ajustar el pH y llevar a cabo la fijación del analito sobre los sensores para un tiempo de agitación de 120 minutos, se procedió a la lectura de sus respectivas intensidades de fosforescencia siguiendo en todo momento el procedimiento operativo descrito anteriormente. De cada uno de los patrones utilizados se prepararon tres replicas y se utilizó su valor medio para efectuar la representación gráfica. Los resultados obtenidos experimentalmente son los que se incluyen en la tabla 2.6 y se representan en la figura 2.8.

Como podemos apreciar en esta figura, la curva de calibrado presenta dos zonas bien diferenciadas. La primera de ellas que comprende los valores de concentración desde 0,5 hasta 1,5 mg/L, ambos inclusive, presenta una mayor pendiente y en ella existe linealidad entre concentración y señal analítica producida, mien-

tras que en la segunda porción, comprendida entre 1,5 y 3,0 mg/L la pendiente es menor y también existe linealidad entra ambas magnitudes.

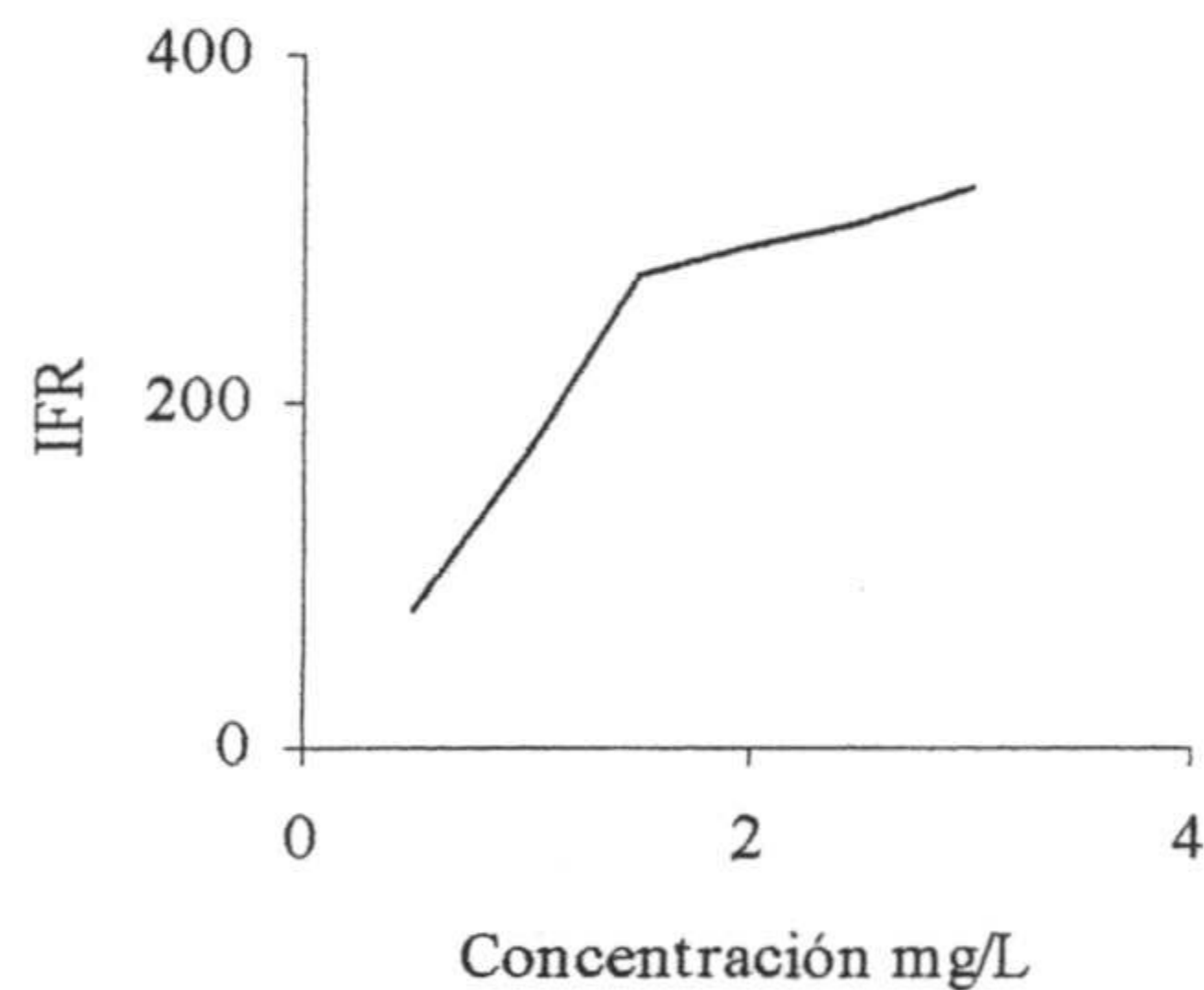


Figura 2.8. Curva de proporcionalidad entre concentración de analito e intensidad de fosforescencia.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,5	79	80	84	81	3,3
1,0	154	158	154	154	2,6
1,5	270	276	273	273	1,1
2,0	295	289	286	290	1,6
2,5	304	300	311	305	1,8
3,0	318	332	337	329	3,0

Tabla 2.6. Valores de la intensidad de fosforescencia relativa en función de la concentración de analito Tiempo de agitación 120 minutos.

2.4.2. Calibración mediante una superficie de calibrado.

Como se dijo anteriormente esta segunda opción consiste en considerar la respuesta como una función continua y creciente de las dos variables que están relacionadas entre sí, que son la concentración y el tiempo de equilibración del sensor con la disolución problema. Por lo tanto, en este caso, en lugar de una gráfica lineal obtendremos una superficie en un sistema de ejes tridimensionales en los que la intensidad de fosforescencia será función de C y t.

El problema ahora consiste en encontrar la función $IFR = f(C,t)$ mediante una forma relativamente sencilla partiendo de la tabla 2.4 de valores experimentales que reproducimos a continuación.

Como se expuso en el capítulo primero de esta Memoria, una forma simple de obtener esta función es utilizar una función de spline $s(C,t)$ para obtener una aproximación a la solución a través de la expresión matemática 1.2.

mg./L	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Tiempo						
15 min	26	28	38	45	60	73
30 min	55	58	72	92	112	120
60 min	62	93	125	187	227	244
90 min	75	121	221	283	292	303
120 min	81	154	273	290	305	329

Tabla 2.4.

Aplicando dicha ecuación y efectuando una representación espacial de los resultados, obtenemos la superficie que vemos en la figura 2.9 en la que podemos apreciar que para cada concentración tenemos un tiempo óptimo de equilibración de la disolución y a cada tiempo de equilibración obtenemos señales analíticas diferentes dependiendo de la concentración de analito. Si cortamos esta superficie mediante un plano perpendicular a la base y que sea paralelo al eje de concentraciones, obtendremos la curva de calibrado convencional correspondiente al valor de tiempo por el que hayamos efectuado el corte, mientras que si el corte lo efectuamos mediante un plano paralelo al eje de tiempos lo que obtendremos será una curva cinética del proceso de equilibración.

Para estimar el tiempo de equilibración óptimo y poder estimar la concentración de analito en esas condiciones, suponemos que este tiempo es el que produce un máximo incremento en la señal analítica para un incremento dado de la concentración de la especie que queremos determinar.

Esta suposición, desde el punto de vista matemático, implica que la derivada numérica de $f(C,t)$ en función de C debe presentar un máximo que corresponde al intervalo de máxima pendiente de la función $f(C,t)$ para un tiempo t_j , siendo j un valor cualquiera comprendido entre 1 y 120 en nuestro caso. Aplicando las ecuaciones 1.5(a) y 1.5(b) obtenemos la tabla 2.7 de valores de la derivada de $f(C,t)$ en función de C .

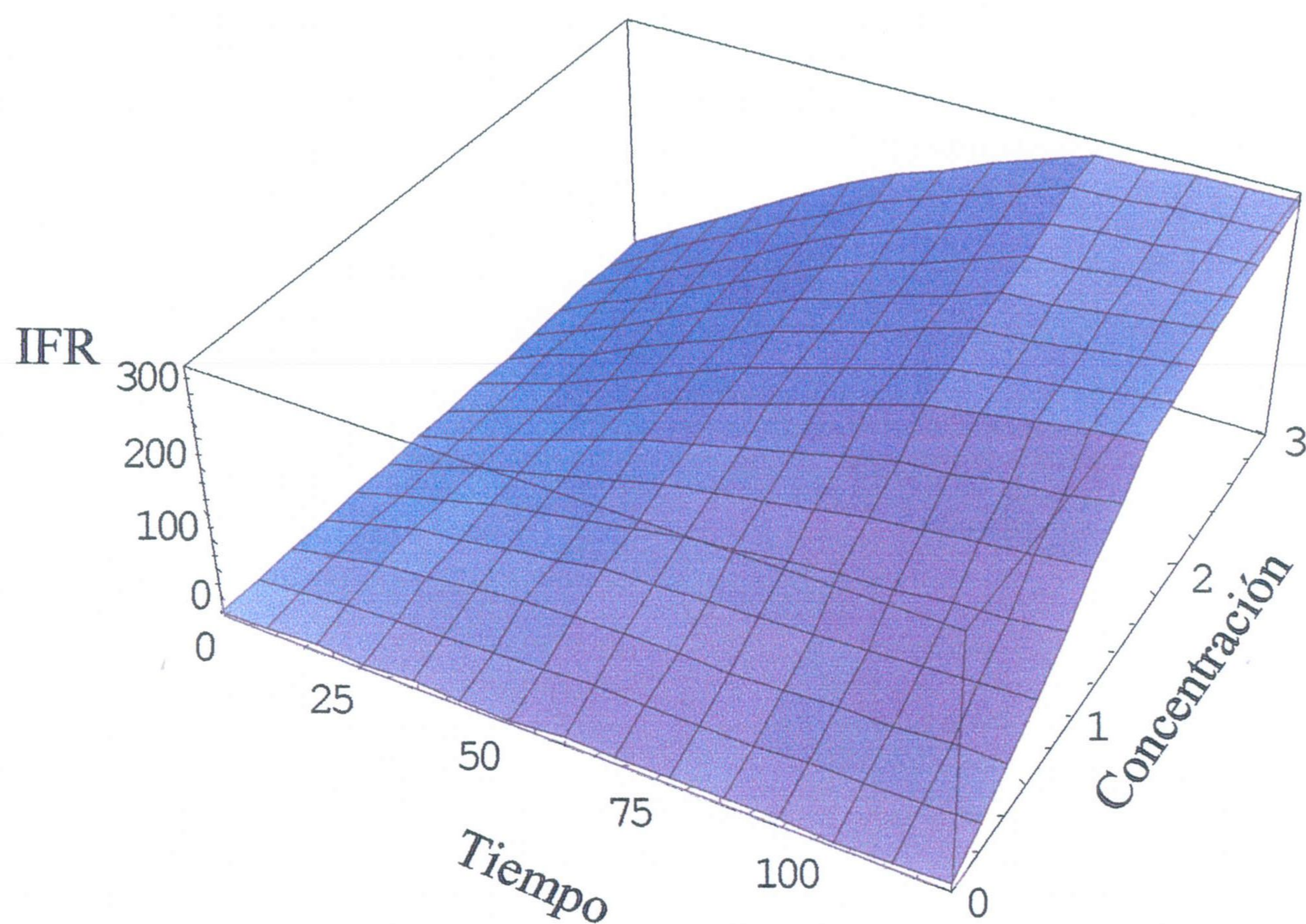


Figura 2.9. Superficie de respuesta de intensidad de fosforescencia en función de la concentración de ácido nalidíxico y del tiempo de equilibración.

En la tabla 2.7 podemos ver que el tiempo de equilibrio óptimo cuando la concentración de nalidíxico en la muestra está comprendido entre 1,25 y 1,75 mg/L es de 90 minutos ya que el valor máximo de la derivada para una concentración de 1,5 mg/L es de 162 que corresponde a 90.

mg/L	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
minutos						
15 min	4	12	17	22	28	26
30 min	6	17	34	40	28	16
60 min	62	63	94	102	57	34
90 min	92	146	162	71	20	22
120 min	146	192	136	32	39	48

Tabla 2.7. Valores de la derivada numérica de $f(C,t)$ en función de C .

Si, por el contrario, la concentración de analito estuviera comprendida entre 1,75 y 2,75 mg/L, o sea para una concentración de analito en torno a 2,5 mg/L, el tiempo óptimo sería 60 minutos por lo que utilizar un tiempo de 120 minutos para el proceso de fijación sería contraproducente ya que, a pesar de tener una respuesta mayor que para un tiempo de 60 minutos, el método perdería sensibilidad y el tiempo de análisis quedaría duplicado. Para comprobar la pérdida de sensibilidad del método al aumentar indebidamente el tiempo de retención por encima del valor óptimo vamos a representar gráficamente las curvas correspondientes a los datos experimentales de la tabla 2.7.

Curva de calibrado para $t = 120$ minutos.

En este caso, como se aprecia claramente en la figura 2.10, existen dos tramos bien diferenciados en la curva. El primero de ellos corresponde a valores de concentración comprendidos entre 0,5 y 1,5 mg/L para los cuales la curva es de gran

pendiente ($IFR = 192 C - 22$) donde IFR es la intensidad de fosforescencia relativa y C es la concentración de analito, mientras que el segundo es de pendiente cinco veces menor ya que la recta de proporcionalidad sería $IFR = 36,6 C + 216$. Por lo tanto, tomando como criterio de sensibilidad el valor de la pendiente de la recta de calibrado, podemos decir que si la concentración de analito es igual o inferior a 1,5 mg/L, el tiempo de fijación del analito debe ser de 120 minutos, pero si es superior a dicho valor, un tiempo de 120 minutos nos hace medir con una sensibilidad 5 veces inferior a la óptima.

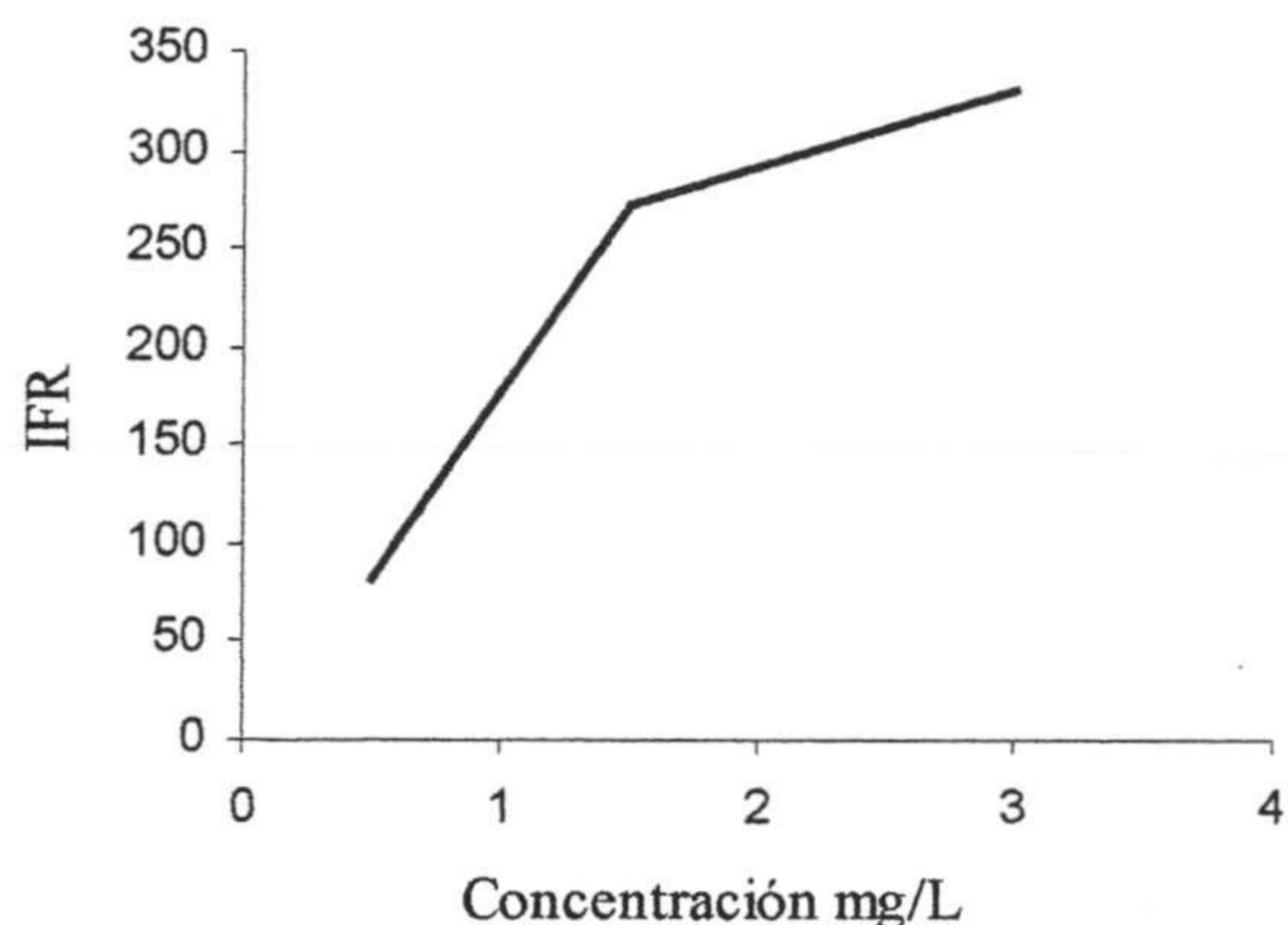


Figura 2.10. Curva de calibrado para un tiempo de equilibrado $t = 120$ minutos.

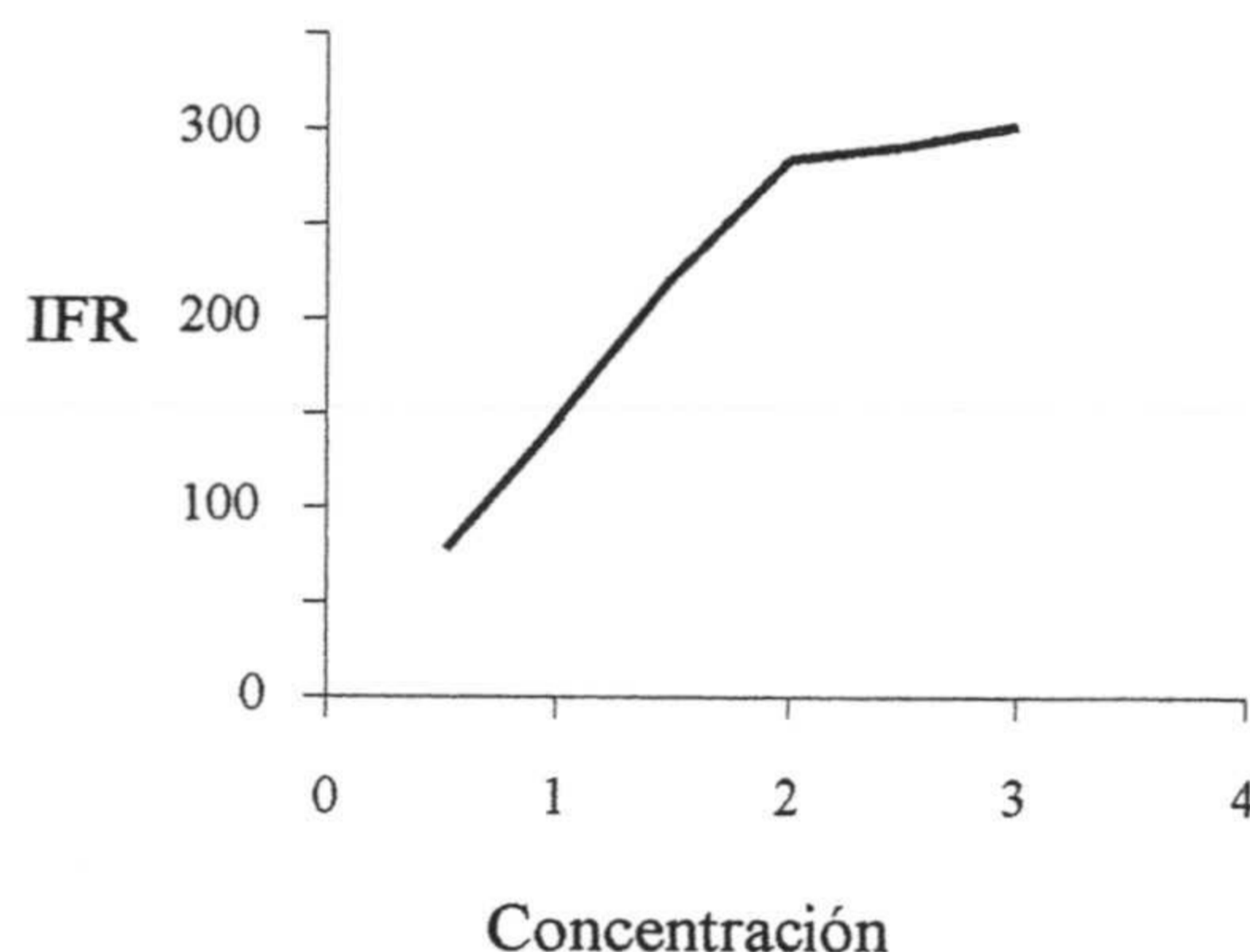


Figura 2.11. Curva de calibrado de ácido nalidíxico para un tiempo de fijación de 90 minutos.

Curva de calibrado para $t = 90$ minutos.

Si representamos gráficamente los valores de intensidad de fosforescencia relativa en función de concentración de analito para un tiempo de equilibración de 90 minutos obtenemos la gráfica que vemos en la figura 2.11, en donde de nuevo se observan dos tramos de curva bien diferenciados. El primero de ellos llega hasta una concentración de 2,0 mg/L y el segundo comprende los últimos tres valores de la tabla.

En este caso, lo mismo que en el anterior, la primera parte de la curva, cuya ecuación es $IFR = 144,8 C + 6$, es más pendiente que la segunda cuya ecuación es $IFR = 20 C + 242$, o sea, la pendiente para concentraciones menores de 2,0 mg/L es 7,2 veces mayor que la pendiente para concentraciones superiores a 2 mg/L. La sensibilidad decrece por tanto alrededor de siete órdenes si utilizamos esta recta de calibrado para concentraciones mayores de 2,0 mg/L. No obstante hay que observar que la concentración a la cual podemos llegar con un tiempo de 90 minutos es mayor que la que podíamos medir con 120 minutos, o sea, aumenta el rango dinámico lineal del método.

Curva de calibrado para $t = 60$ minutos.

Para este tiempo, la curva de dependencia entre concentración y señal analítica, tiene la forma que vemos en la figura 2.12. Como podemos observar en la citada figura los dos tramos aquí cambian de nuevo, de forma que ahora, para un tiempo

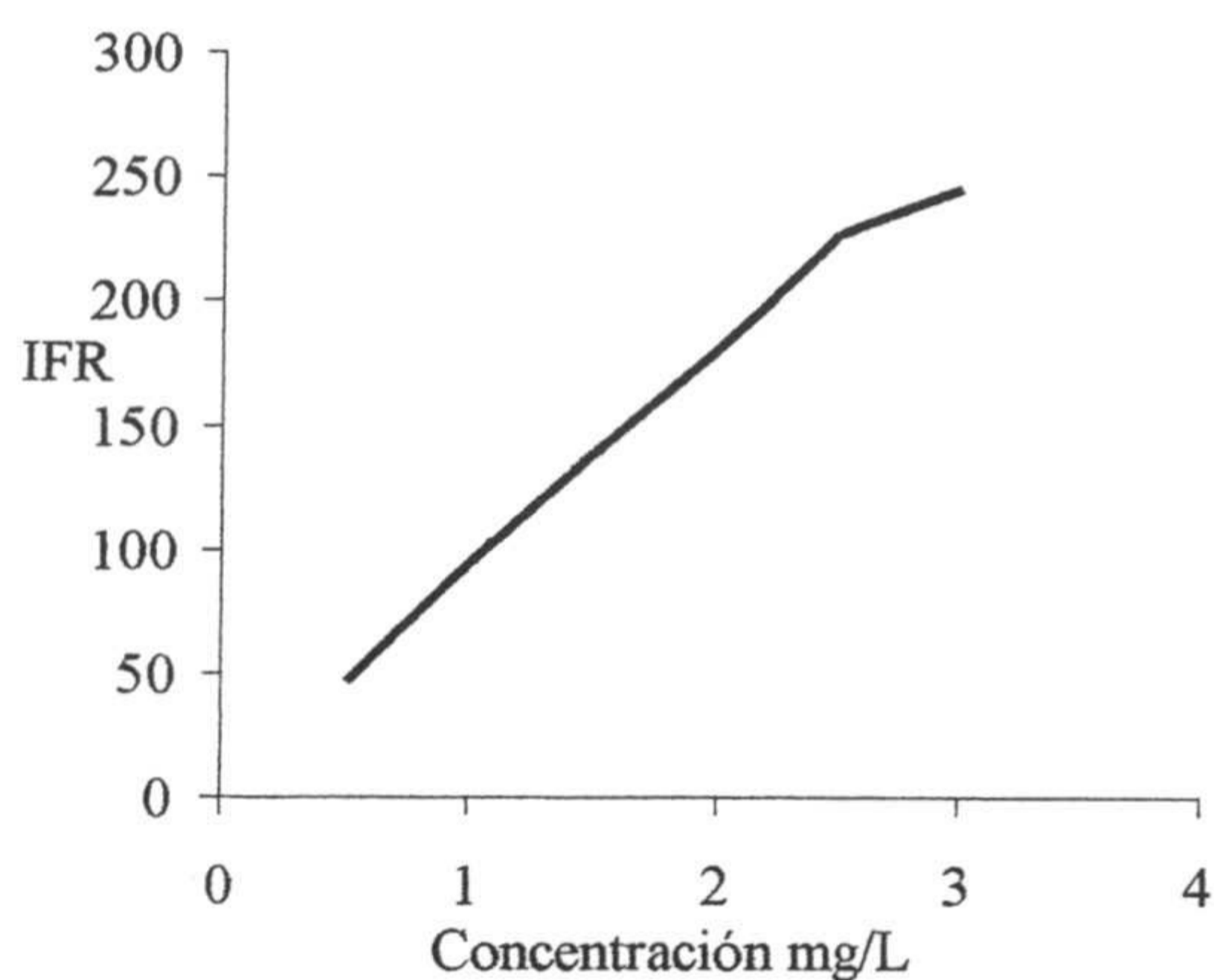


Figura 2.12. Curva de calibrado del ácido nalidíxico para un tiempo de fijación de 60 minutos.

de fijación del nalidíxico de 60 minutos, el primer tramo de la curva alcanza hasta un valor de concentración de 2,5 mg/L, o sea, se ha ampliado de nuevo el rango de linealidad del método, pero a cambio de ello disminuye de nuevo la sensibilidad del mismo entendida como la pendiente de la recta de calibrado, cuya ecuación ahora es $IFR = 84,8 C + 11$.

Curva de calibrado para $t = 30$ minutos.

La curva que obtenemos en este caso es la que vemos en la gráfica 2.13 cuya ecuación es $IFR = 32,8 C + 25$. Podemos apreciar como la sensibilidad ha disminuido respecto de las curvas anteriores ya que la pendiente de la recta tiene un valor de 32,8 frente a los valores de 84,8, 144,8 y 192 de las curvas anteriores, aunque ahora la parte lineal de la curva abarca un mayor intervalo de concentraciones ya que alcanza hasta 3,0 mg/L.

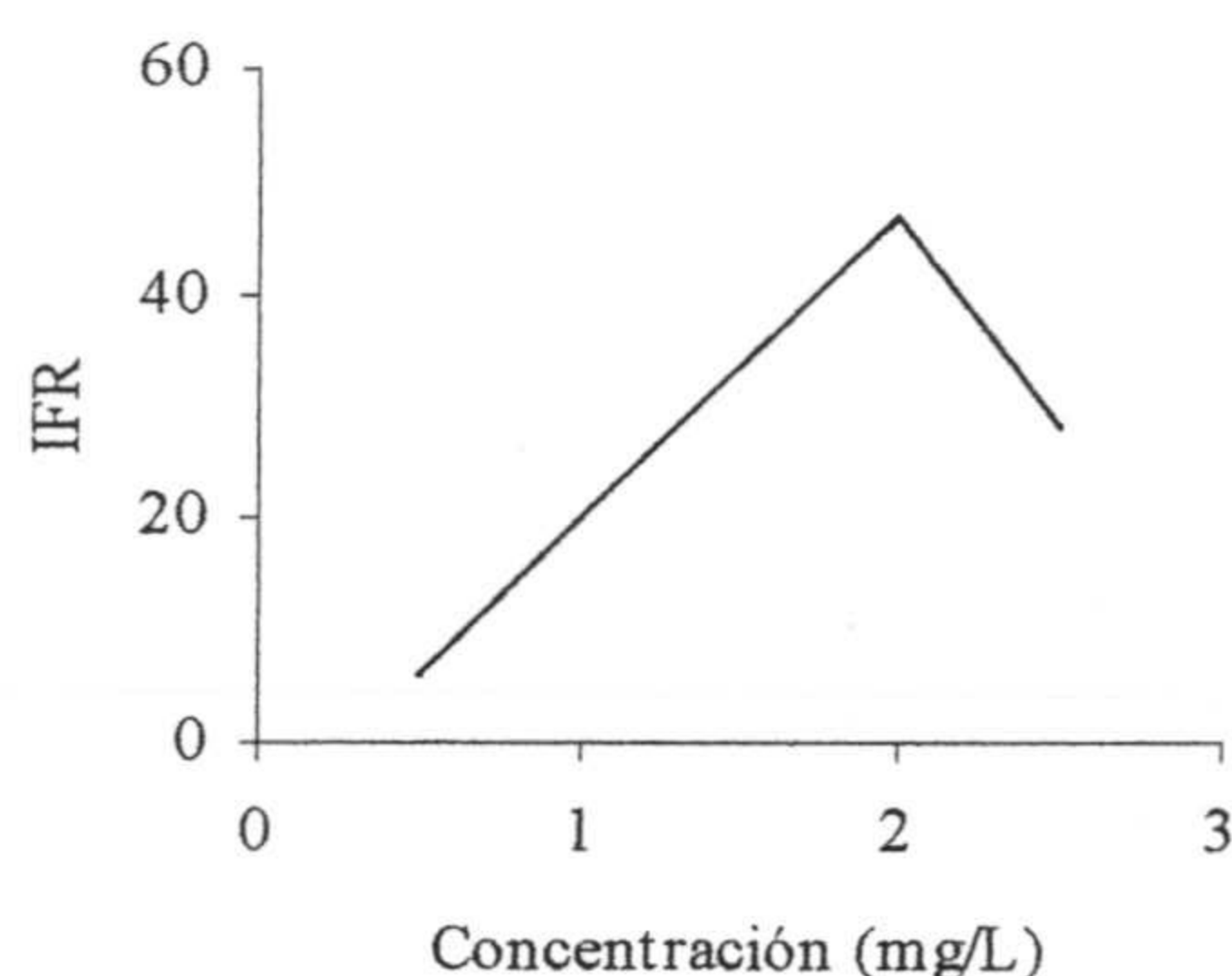


Figura 2.13. Curva de calibrado para un tiempo de equilibrio de 30 minutos.

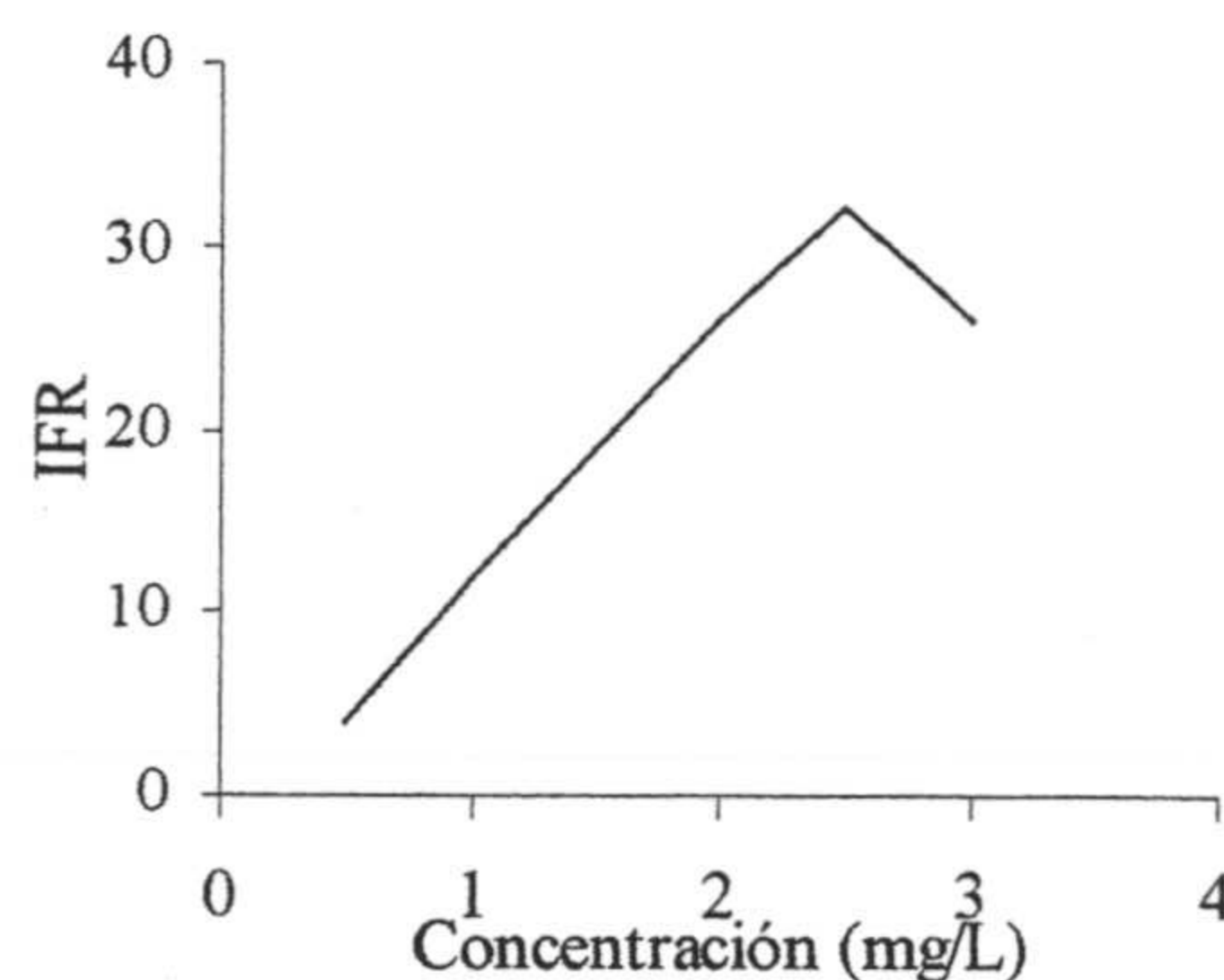


Figura 2.14. Curva de calibrado para un tiempo de equilibración de 15 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de 15 minutos.

En el caso de emplear un tiempo de equilibración de 15 minutos la curva de calibrado que obtenemos es la que podemos observar en la figura 2.14 cuya ecuación es: $IFR = 22,4 C + 4$ en la que vemos como la pendiente se ha reducido considerablemente respecto de las curvas obtenidas para tiempos mayores.

2.4.3. Parámetros analíticos.

Con los resultados experimentales obtenidos en la sección anterior podemos

confeccionar la tabla 2.8 de parámetros analíticos. En esta tabla el valor de la precisión corresponde a la repetitividad de la medida realizada, en cada caso, con una serie de diez muestras patrón de concentración intermedia del rango lineal. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de diez blancos utilizando los criterios de la IUPAC reseñados en el capítulo primero de esta Memoria.

Parámetro	Tiempo	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Pendiente (L.mg ⁻¹)		22,4	32,8	84,8	144,8	192,8
Ordenada origen		4	25,2	11,6	-6	-22,7
Lím. detección (mg/L)		0,15	0,10	0,04	0,03	0,02
Lím. cuantificación (mg/L)		0,49	0,33	0,13	0,08	0,06
Rango lineal (mg/L)		0,49-3,5	0,35-3,0	0,13-2,5	0,08-2,0	0,06-1,5
Precisión (DER %)		1,1	1,4	1,8	1,6	2,0
Valor de P (test fallo ajuste)		0,1	0,18	0,2	0,4	0,65

Tabla 2.8. Parámetros analíticos de las curvas de calibrado para diferentes tiempos de fijación del analito sobre el sensor.

En ella podemos comprobar que existe un aumento de la sensibilidad, entendida como pendiente de la recta de calibrado, a medida que aumentamos el tiempo durante el cual se efectúa la fijación del analito sobre el sensor. Paralelamente se produce una disminución de los límites de detección y cuantificación mientras que los rangos de linealidad, o intervalos en los cuales existe una relación lineal entre concentración y señal analítica, se hacen cada vez más cortos puesto que abarcan intervalos de 3,01; 2,65; 2,37; 1,92 y 1,44 mg/L para tiempos de fijación de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

2.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

Dado que uno de los objetivos de esta Memoria de Tesis es aplicar los métodos propuestos al análisis de muestras reales, se procedió a continuación a efec-

tuar un estudio de las interferencias que podrían producir algunos otros compuestos, de naturaleza semejante a la del analito en estudio, sobre la intensidad de fosforescencia medida.

En el caso del ácido nalidíxico se estudiaron como interferentes los ácidos piromídico, oxolínico, pipemídico y flumequina, ya que dichos fármacos presentan fosforescencia semejante a la del ácido nalidíxico y, además, pueden estar presentes en las muestras reales que vamos a estudiar seguidamente.

Para tal fin se preparó una serie de matraces aforados, para cada uno de los supuestos interferentes, conteniendo 1,0 mg/L de ácido nalidíxico y cantidades crecientes de la especie ensayada. Tras preparar los respectivos sensores, de acuerdo con el procedimiento propuesto, se procedió a la medida de su fosforescencia y, con la ayuda de la curva de calibrado correspondiente, se determinó, en cada caso, el error relativo que origina la presencia del compuesto interferente.

Como límite de tolerancia del fármaco extraño hemos tomado la concentración de este que produce un error relativo superior al 5% en la determinación de 1,0 mg/L de ácido nalidíxico. No interfieren, por tanto, aquellas especies que produzcan un error igual o inferior a dicho valor. Los resultados obtenidos experimentalmente son los que se recogen en la tabla 2.9.

Especie extraña	flumequina	pipemídico	oxolínico	piromídico
Tolerancia (mg/L)	>3,0	>3,0	2,5	<0,05

Tabla 2.9. Valores de tolerancia, a la presencia de especies interferentes, en la determinación de 1,0 mg/L de ácido nalidíxico.

Con estos resultados podemos decir que los ácidos pipemídico y flumequina no interfieren en la determinación de 1,0 mg/L de ácido nalidíxico si su concentración es igual o inferior a 3,0 mg/L. El ácido oxolínico interfiere si la concentra-

ción es igual o superior a 2,5 mg/L y el ácido piromídico interfiere incluso a concentraciones inferiores a 0,05 mg/L. Por esta razón, como veremos en el último capítulo de la presente Memoria, se pensó llevar a cabo un estudio para establecer un método de determinación conjunta de ambos analitos, aplicando técnicas quimiométricas a las medidas espectrofosforimétricas efectuadas con dichos analitos fijados sobre un sensor.

2.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.

Para aplicar el método al análisis de muestras reales en las que pudieran existir trazas de ácido nalidíxico se eligieron dos tipos de muestras: leche de vaca y orina humana.

2.6.1. Determinación de ácido nalidíxico en orina humana.

Aplicando la metodología propuesta a varias muestras de orina humana no se detectó la presencia de analito en ningún caso, o la cantidad presente era inferior al límite de detección del método propuesto, razón por la cual se decidió efectuar un estudio de recuperación utilizando la recta de calibrado cuyo tiempo de equilibrio era el más adecuado a la concentración de analito añadido a la muestra. Por ello se prepararon cuatro muestras, con tres replicados de cada una de ellas, cuyas concentraciones eran 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0 mg/L y se efectuaron las medidas de la señal analítica utilizando tiempo de fijación de 120 minutos para las dos primeras y 60 minutos para las dos últimas.

Trasladando los valores de la intensidad de fosforescencia medidos a las respectivas rectas de calibrado se obtuvieron los resultados que podemos ver en la tabla 2.10.

Dichos resultados son el valor medio de tres determinaciones diferentes, razón

por la que hemos incluido en la tabla el valor de la recuperación media expresada en tanto por ciento (R_m), las desviaciones estándar (s_{n-1}) y las desviaciones estándar relativas de estos valores de la recuperación, expresadas en tanto por ciento.

Como podemos apreciar las recuperaciones obtenidos se encuentran entre un 96% para las muestras más diluidas y un 103,7 % para las más concentradas siendo las desviaciones estándar relativas 0,6 para unos casos y 3,9 en el caso de mayor desviación.

Añadido (mg/L)	Encontrado * (mg/L)	Recuperado (%)	DER (%)	Tiempo fijación
0,5	0,48	96,0	3,9	120
1,0	0,98	98,0	0,6	120
2,0	2,01	100,5	2,1	60
3,0	3,11	103,7	0,6	60

Tabla 2.10. Estudio de recuperación de ácido nalidíxico en orina humana.

* Valores promedio de tres determinaciones diferentes.

2.6.2. Determinación de ácido nalidíxico en leche de vaca.

Al igual que en el caso anterior, al aplicar la metodología propuesta a la determinación de ácido nalidíxico en varias muestras de leche de vaca no se detectó la presencia de dicha especie y se procedió a efectuar un estudio de recuperación del mismo en muestras de leche en las que previamente habíamos añadido una cantidad conocida de nalidíxico. En cada caso se utilizó como recta de calibrado aquella para la cual el tiempo de fijación del analito en el sensor era el óptimo de acuerdo con la concentración de este.

En estas condiciones los resultados obtenidos, que corresponden a tres replicado para cada una de las muestras, son los que figuran en la tabla 2.11 en la que podemos apreciar que la recuperación conseguida en todos los casos es próxima al

100 %, siendo las desviaciones relativas entre un valor máximo de 2,4 y un mínimo de 0,5.

Añadido (mg/L)	Encontrado* (mg/L)	Recuperado (%)	DER (%)	Tiempo fijación
1,0	1,02	102,0	0,5	120
2,0	2,02	101,0	1,3	120
2,7	2,63	97,4	2,4	60

Tabla 2.11 Estudio de recuperación de ácido nalidíxico en leche de vaca.

Como resultados de los estudios realizados, que han sido descritos en este capítulo, se ha publicado un artículo cuyos datos son los que siguen:

Título: Sigle-use phosphorimetric sensor for the determination of nalidixic acid in human urine and milk.

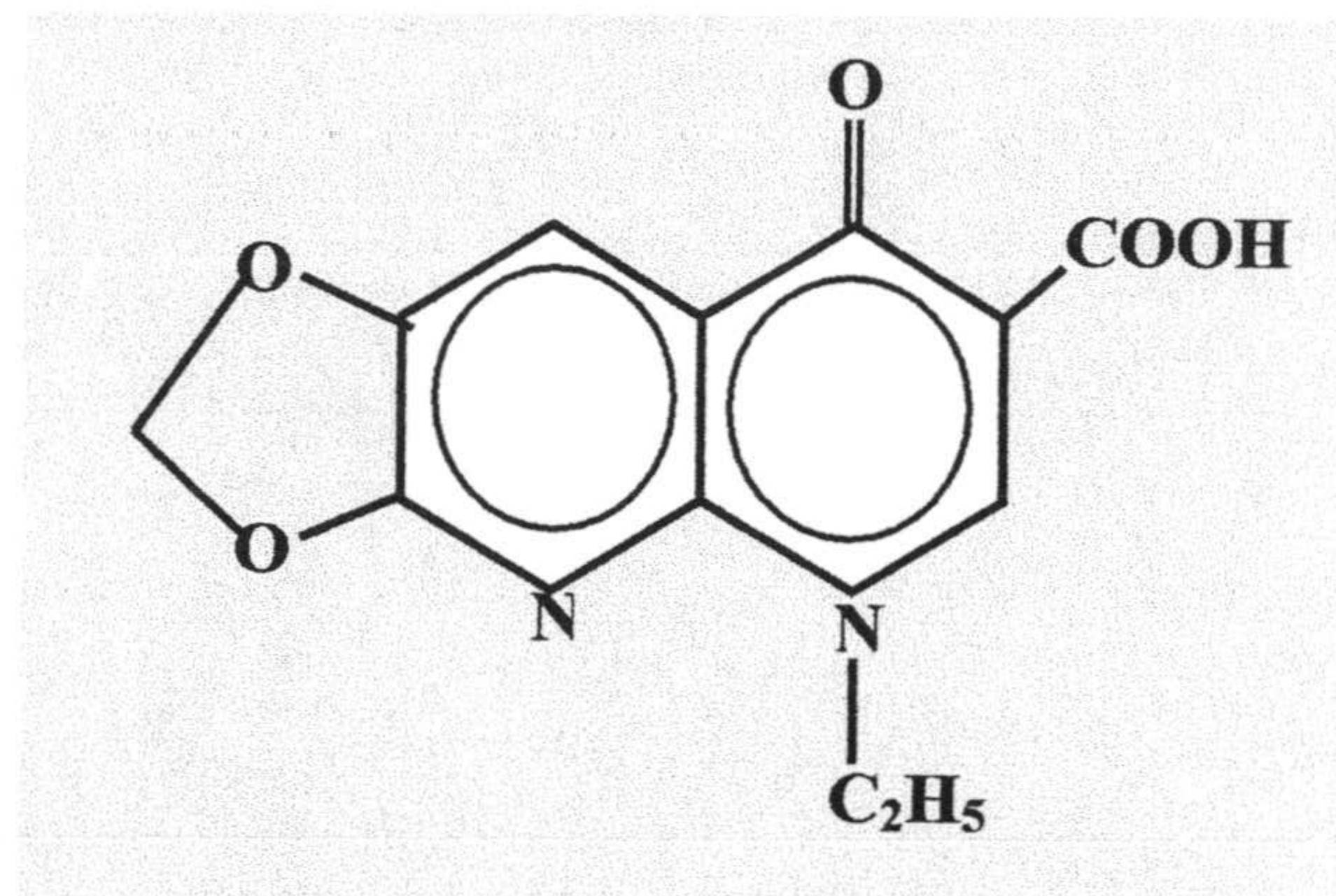
Revista: The Analyst. 125 (2000) 2000-05.

Autores: L.F. Capitán-Vallvey; Osama M. Al-Barbarawi; M.D. Fernández-Ramos; R. Avidad y V. Ramírez González.

Del que se incluye una copia en el apéndice 1 de esta Memoria.

2.7. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) L.F. Capitán-Vallvey, M.F. Ojeda, M. del Olmo, A. Navalón, R. Avidad y T. Vo-Dihn, *Appl. Spectrosc.* **52** (1998) 101.
-



CAPÍTULO 3

ESTUDIO ESPECTROFOSFORIMÉTRICO DEL ÁCIDO OXOLÍNICO MEDIANTE UN SENSOR DE UN SOLO USO

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

3.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁCIDO OXOLÍNICO.	139
3.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida.	139
3.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	141
3.2.1. Optimización de variables experimentales dependientes del sensor.	141
3.2.1.1. <i>Elección del soporte sólido.</i>	141
3.2.1.2. <i>Elección de los componentes de la membrana sensora.</i>	141
3.2.1.3. <i>Optimización de la matriz polimérica.</i>	142
3.2.1.4. <i>Optimización del volumen de plastificante.</i>	143
3.2.1.5. <i>Optimización del volumen de disolvente.</i>	144
3.2.1.6. <i>Optimización del volumen de gota para preparación del sensor.</i>	145
3.2.1.7. <i>Influencia del orden de adición de los componentes.</i>	146
3.2.1.8. <i>Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor.</i>	146
3.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.	147
3.2.2.1. <i>Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.</i>	147
3.2.2.2. <i>Optimización de los tiempos t_a y t_d.</i>	148
3.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.	148
3.2.3.1. <i>Optimización del tiempo de fijación.</i>	149
3.2.3.2. <i>Influencia de la colocación del sensor durante la agitación.</i>	150
3.2.3.2. <i>Influencia de la velocidad de agitación.</i>	150
3.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.	151
3.2.4.1. <i>Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.</i>	151
3.2.4.2. <i>Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	152
3.2.4.3. <i>Influencia de la fuerza iónica.</i>	153
3.2.5. Influencia de la atmósfera de nitrógeno sobre la fosforescencia .	154
3.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	155
3.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN.	156
3.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.	156
3.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.	160
3.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.	163
3.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.	163
3.5.1. Determinación de ácido oxolínico en muestras de orina humana.	164
3.5.2. Determinación de ácido oxolínico en muestras de leche de vaca.	165

Oxolínico es el nombre vulgar del ácido 5-etil-5,8-dihidro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinolin-7-carboxílico comercializado en la industria farmacéutica bajo diversos nombres comerciales tales como uroxin, nidantin, urotrato, etc. Es un fármaco semejante al ácido nalidíxico tanto en su composición como en su acción terapéutica y sus aplicaciones también están limitadas al tratamiento de enfermedades de tipo infeccioso, causadas por gérmenes gram-negativos, en los mamíferos.

Como su semejante, el ácido nalidíxico, en la actualidad, solo se usa en veterinaria y de ahí la necesidad de disponer de métodos de análisis para su detección y determinación en productos lácteos, así como en la orina de consumidores de tales productos donde se podrá encontrar en pequeñas cantidades.

3.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁCIDO OXOLÍNICO.

Con objeto de estudiar las características fosforescentes de este compuesto para saber si se puede detectar y determinar mediante fosforescencia en fase sólida, al igual que el caso estudiado en el anterior capítulo, procedimos en primer lugar a efectuar un estudio de las posibles características fosforescentes del ácido oxolínico, registrando para ello los espectros de excitación y emisión del compuesto.

3.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida del ácido oxolínico.

El espectro de excitación se obtuvo utilizando el procedimiento general descrito en el primer capítulo de esta Memoria, tras haber preparado una serie de sensores con los que obtuvieron los diferentes espectros de excitación y emisión.

En primer lugar se registraron los espectros de fosforescencia de los sensores, antes de someterlos al proceso de equilibrado con la disolución de analito, con lo cual dispusimos de los correspondientes espectros del blanco para cada uno de

ellos. A continuación se preparó una disolución acuosa de oxolínico, a partir de la respectiva disolución madre, siendo el volumen total preparado 50 mL y su concentración en analito 1 mg/L.

Siguiendo el procedimiento operatorio descrito en el capítulo primero dedicado a la metodología analítica, se equilibró el sensor con dicha disolución durante un tiempo de una hora y, posteriormente, se registró el espectro de excitación del analito bajo las siguientes condiciones experimentales: longitud de onda de emisión de 449 nm, intervalo de longitud de onda de excitación 300-400 nm, $t_g = 10$ ms; $t_d = 0'15$ ms y rendijas de excitación y emisión 2,5 nm y 5 nm respectivamente, siendo 240 nm/min la velocidad de barrido. Estas condiciones experimentales fueron las mismas tanto para muestras como para blancos analíticos. El espectro de excitación que se obtuvo presenta un máximo de excitación a 330 nm, siendo este valor de longitud de onda de excitación el que se utilizó posteriormente para registrar el espectro de emisión bajo condiciones similares a las anteriores. En la figura 3.1 podemos ver ambos espectros de fosforescencia del ácido oxolínico junto con los correspondientes espectros del blanco del sensor.

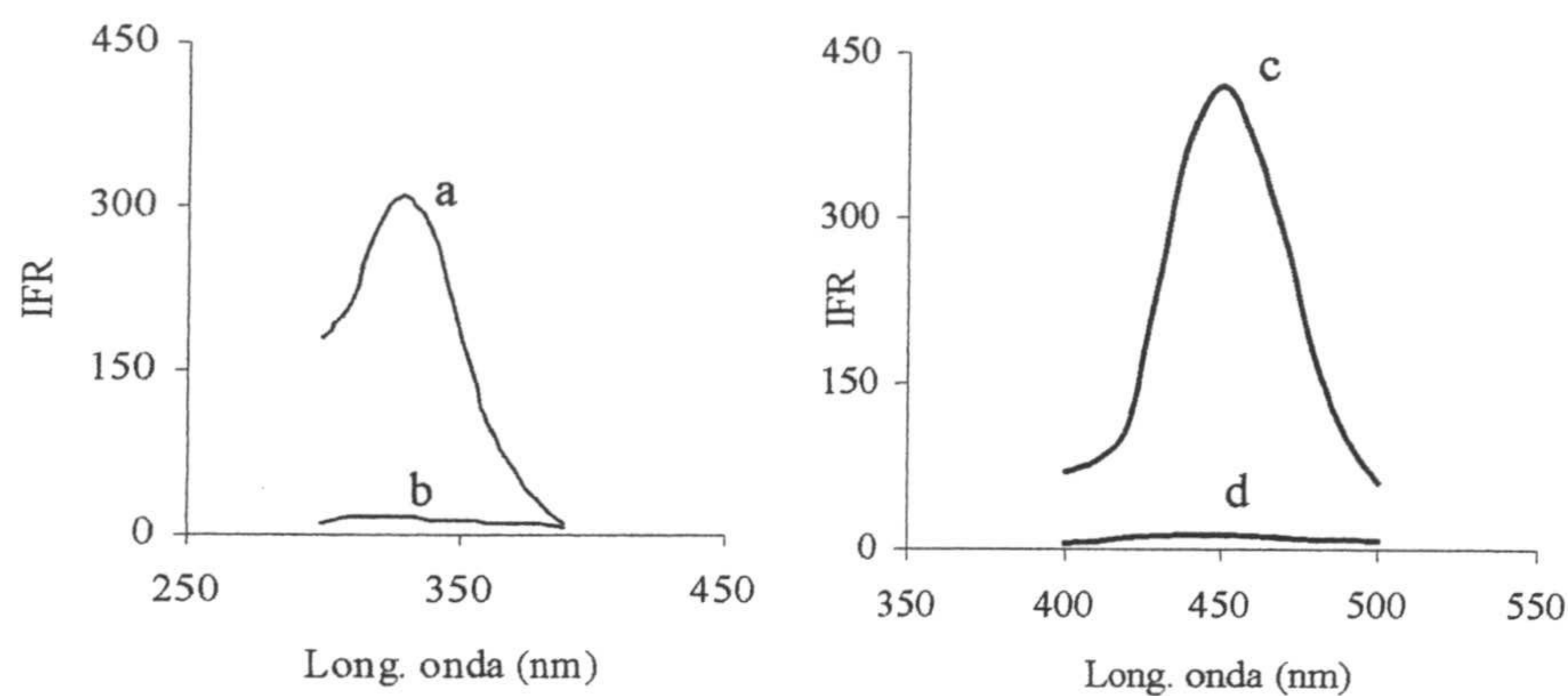


Figura 3.1. Espectros de excitación (a,b) y emisión (c,d) del ácido oxolínico y del blanco del sensor.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.

Siguiendo los criterios establecidos en la sección 2.2 del capítulo anterior, las variables experimentales que vamos a estudiar en el presente capítulo serán las mismas que vimos entonces y su estudio se efectuará con la misma metodología allí expuesta. Por ello no vamos a repetir en esta ocasión la metodología utilizada sino que nos limitaremos a exponer los resultados obtenidos y los comentarios que estimemos oportunos.

3.2.1. Optimización de variables experimentales dependientes del sensor.

La medida de intensidad de fosforescencia se realizó a la longitud de onda del máximo de emisión fosforescente ($\lambda_{em} = 449 \text{ nm}$) y bajo las condiciones instrumentales descritas para obtener los espectros de emisión y excitación.

3.2.1.1 Elección del soporte sólido.

Se seleccionaron los tres tipos de láminas utilizados con anterioridad (metacrilato, acetato de polivinilo y poliéster) y se cortaron tiras de cada uno de estos materiales, con las que se construyeron varios sensores que posteriormente se equilibraron con disoluciones de ácido oxolínico de 1 mg/L de concentración. Tras medir la fosforescencia emitida por cada sensor, se comprobó que el sensor construido con la lámina de poliéster tipo Mylar de $0,25 \text{ mm}$ de espesor, era el más adecuado dada su transparencia y su casi total ausencia de fosforescencia.

3.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.

Para seleccionar la matriz polimérica y el plastificante más adecuados, así como el disolvente, se probaron las siguientes matrices: acetato y cloruro de polivinilo y poliuretano. Como plastificante para los derivados del polivinilo se ensaya-

ron: tributilfosfato, ftalato de dioctilo y bis(2-etilhexil)sebacato y como disolventes se utilizaron: mezclas de etanol y agua en diferentes proporciones y tetrahidrofurano según el caso.

Se construyeron diferentes sensores con las posibles combinaciones de estos componentes y se equilibraron con disoluciones de 1 mg/L de ácido oxolínico, bajo las condiciones operatorias utilizadas en la obtención de los espectros de emisión y excitación. El sensor formado por cloruro de polivinilo y tributilfosfato como plastificante usando tetrahidrofurano como disolvente, fue el que emitía una mayor intensidad de fosforescencia quedando así establecida cuál debería ser la naturaleza de los componentes que formen el sensor. Para conocer las proporciones en las que deben encontrarse estos componentes en la membrana sensora, se realizaron las experiencias que describimos a continuación.

3.2.1.3. Optimización de la cantidad de matriz polimérica.

Para estudiar la influencia que pueda ejercer la cantidad de matriz polimérica sobre la intensidad de fosforescencia emitida, se prepararon diferentes viales de 5 mL de capacidad y se colocó, en cada uno de ellos, 60 mg de tributilfosfato (TBF) y 0,6 mL de tetrahidrofurano (THF) y se añadieron cantidades crecientes de cloruro de polivinilo comprendidas entre 10 y 100 mg. Se homogeneizaron las diferentes disoluciones y se construyeron sensores en la forma acostumbrada.

Se midió la fosforescencia de cada sensor antes de equilibrarlo con la respectiva disolución de patrón y se tomó como blanco analítico el valor obtenido. Siguiendo el procedimiento operatorio descrito, se equilibró cada sensor con una disolución de ácido oxolínico de 1 mg/L de concentración y, tras secar el sensor, se midió la fosforescencia emitida en las condiciones reseñadas. Los resultados obtenidos son los que tenemos en la tabla 3.1 y se representan en la figura 3.2.

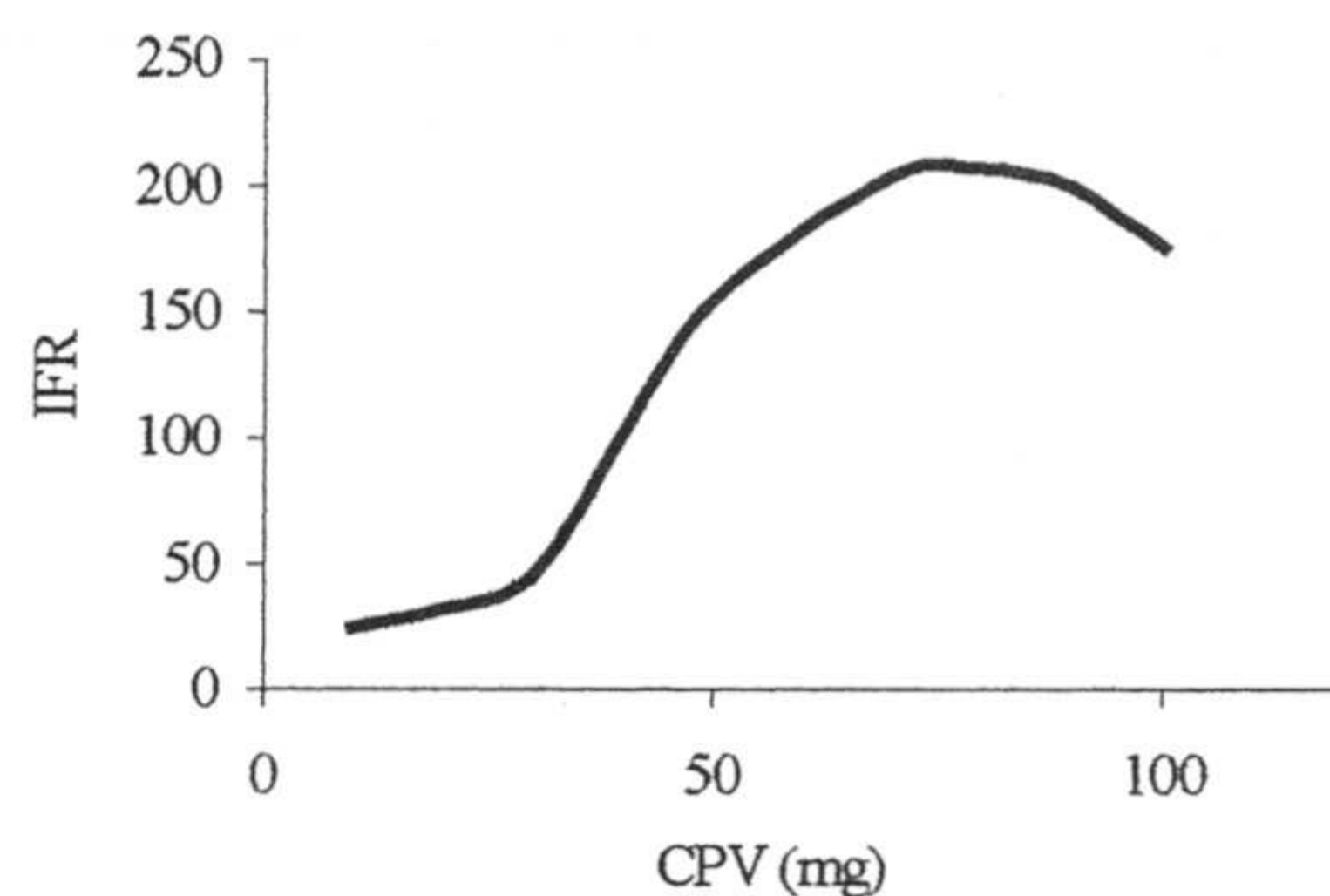


Figura 3.2. Representación gráfica de la influencia de la cantidad de CPV sobre la intensidad de fosforescencia.

CPV (mg)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
10	22	24	21	22,3	6,8
20	29	32	27	29,3	8,5
30	47	45	42	44,7	5,6
40	98	102	103	101,0	2,6
50	150	155	160	155,0	3,2
70	204	203	205	204,0	0,5
80	201	207	195	201,0	2,9
90	195	199	191	195,0	2,1
100	165	176	173	171,3	3,3

Tabla 3.1. Influencia de la cantidad de CPV sobre la intensidad de fosforescencia.

Con estos resultados podemos decir que la cantidad óptima de cloruro de polivinilo, para la formación de la membrana sensora para el ácido oxolínico, es de 70 mg cuando utilizamos las condiciones experimentales reseñadas.

3.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.

Para optimizar la cantidad de tributilfosfato se prepararon varios sensores en los que la cantidad de CPV era 70 mg, las restantes variables se mantuvieron constante y el volumen de tributilfosfato variaba entre 0,05 y 0,2 mL.

Los sensores se equilibraron con disoluciones de oxolínico de 1 mg/L, se secaron en la forma acostumbrada y se procedió a la lectura de su fosforescencia, obteniéndose los resultados que se incluyen en la tabla 3.2 y se representan en la figura 3.3.

Como resumen de esta experiencia podemos decir que el volumen de 0,14 mL de tributilfosfato es el más adecuado para el desarrollo de fosforescencia al equilibrar el sensor con la disolución de ácido oxolínico.

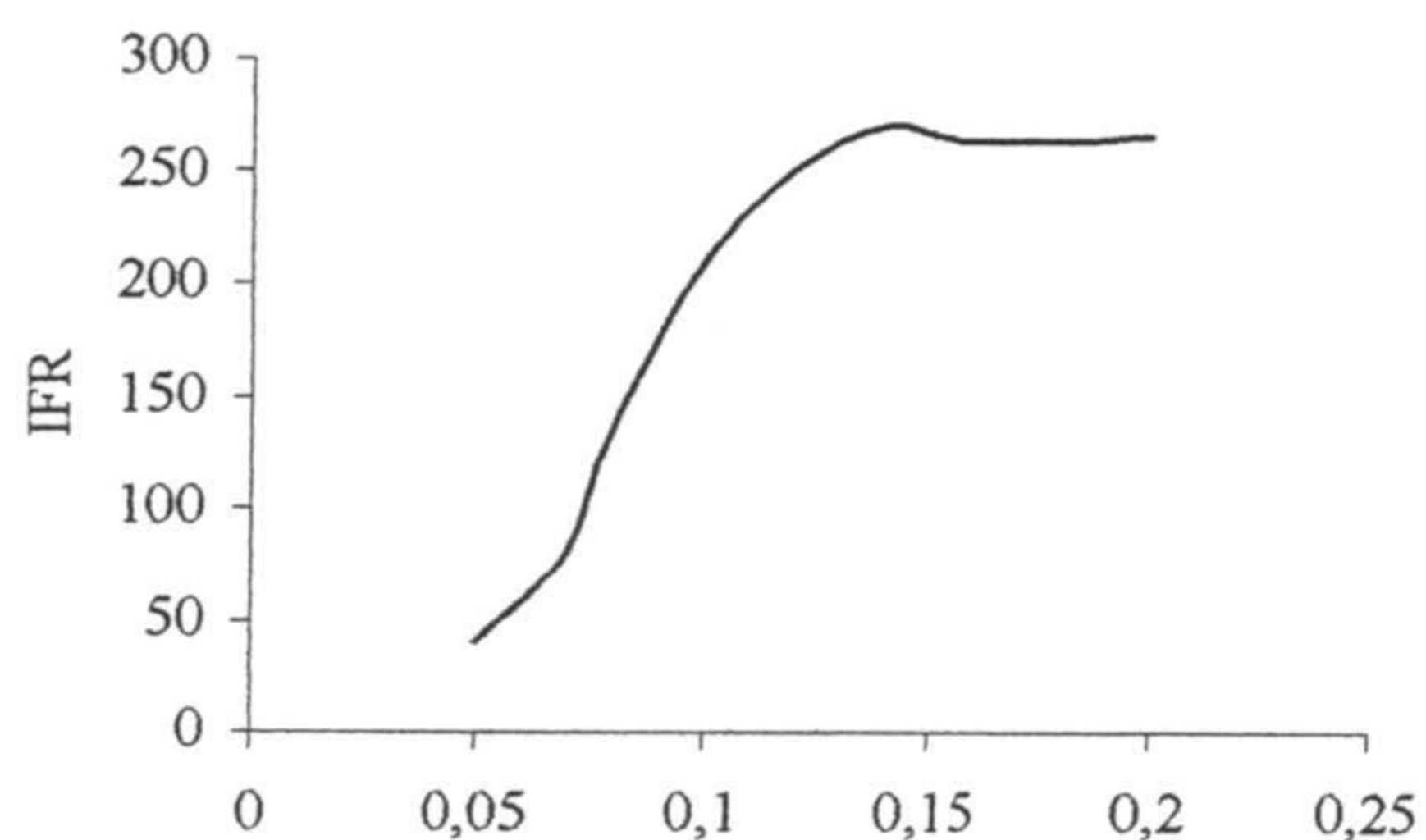


Figura 3.3. Influencia del volumen de tributilfosfato en la intensidad de fosforescencia relativa del ácido oxolínico.

TBF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,05	40	44	38	40,7	7,4
0,07	80	84	76	80,0	5,0
0,08	134	144	137	138,3	3,7
0,10	210	222	215	215,7	2,8
0,12	251	250	247	249,3	0,8
0,14	270	273	265	269,3	1,5
0,16	263	269	267	266,3	1,2
0,20	265	269	260	264,7	1,7

Tabla 3.2. Valores de la intensidad de fosforescencia relativa en función de la cantidad de tributilfosfato.

3.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.

Por último para la optimización de la cantidad de disolvente preparamos varios sensores en los que la cantidad de tetrahidrofurano variaba entre 0,5 y 3,0 mL manteniendo constantes las restantes variables. Una vez preparados los sensores se equilibraron con disoluciones patrón de 1,0 mg/L de ácido oxolínico y se procedió a la lectura de su fosforescencia. Los resultados experimentales obtenidos son los que figuran en la tabla 3.3 y se encuentran representados en la figura 3.4.

Como se aprecia en la figura 3.4, el volumen de disolvente óptimo para el desarrollo de la fosforescencia es próximo a los 2,0 mL.

Resumiendo las tres experiencias anteriores podemos decir que los valores óptimos de los componentes implicados en la construcción de la membrana sensora son los siguientes: cloruro de polivinilo 70 mg, volumen de plastificante (TBF) 0,14 mL y volumen de disolvente 2,0 mL, lo que supone las siguientes proporciones en peso: 3,6 % de CPV; 0,005 % de TBF y 96,4 % de THF, que serán las que emplearemos en lo sucesivo para la fabricación de los sensores para determinar ácido oxolínico.

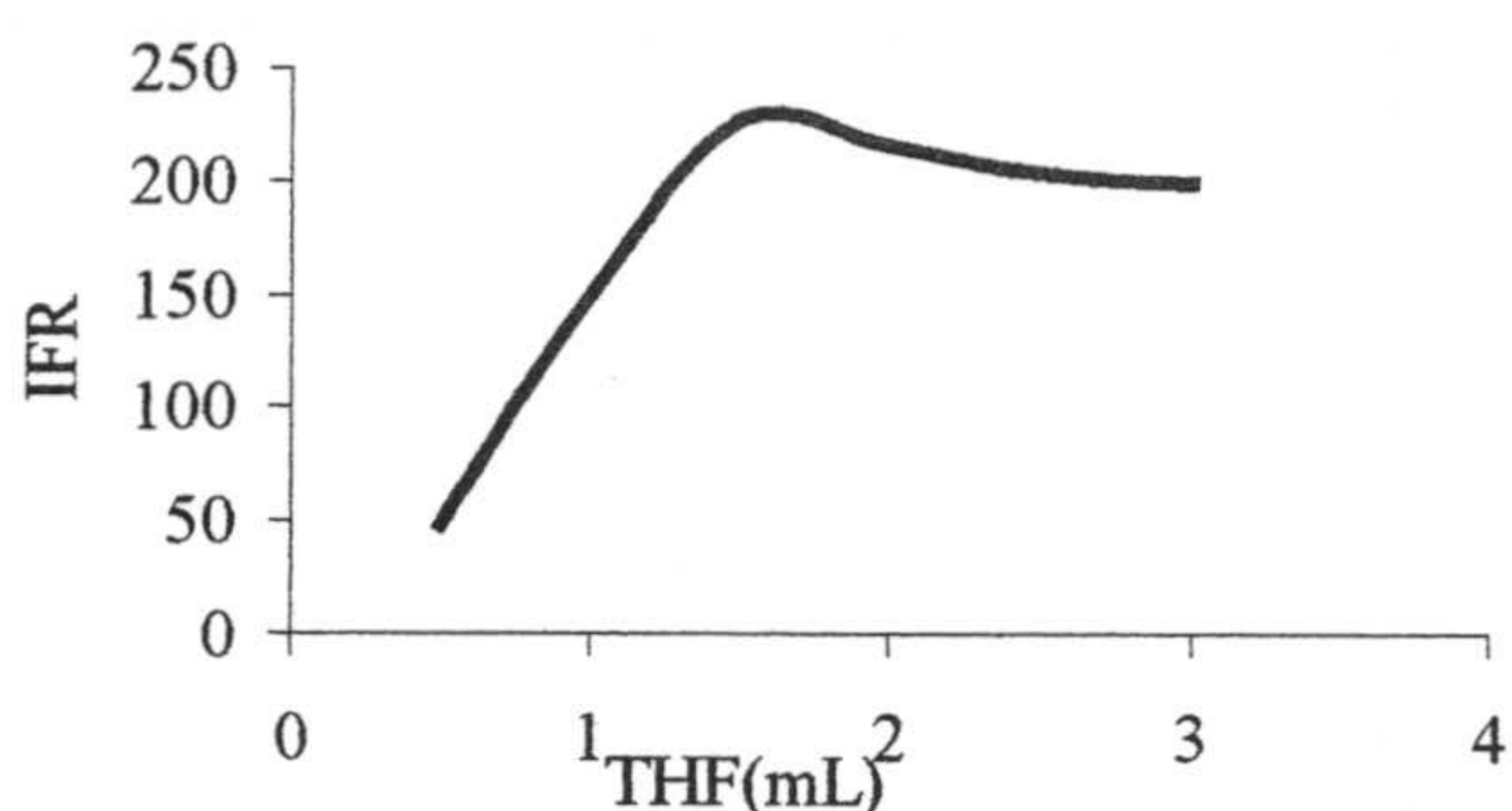


Figura 3.4. Influencia del volumen de tetrahidrofurano sobre la intensidad de fosforescencia del ácido oxolínico.

THF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,5	48	52	53	51	5,2
1,0	150	155	153	152,7	1,7
1,5	227	220	225	224,0	1,6
2,0	216	225	223	221,3	2,1
2,5	204	210	214	209,3	2,4
3,0	199	193	190	194,0	2,4

Tabla 3.3. Valores de la intensidad de fosforescencia relativa media (IFRM) y de la desviación estándar relativa de tres medidas.

3.2.1.6 Optimización del volumen de gota para la preparación del sensor.

Como se dijo en el apartado correspondiente del capítulo 2 de esta Memoria el comportamiento de los sensores de gota plana depende, en gran parte, del tamaño y espesor de la membrana, lo que, a su vez, depende del volumen de mezcla depositado. Por ello procedimos al estudio de la influencia de dicho volumen sobre la fosforescencia desarrollada en diferentes sensores equilibrados todos ellos con disoluciones de ácido oxolínico de 1,0 mg/L de concentración. Los volúmenes de disolución empleados estaban comprendidos entre 2 y 12 μL .

Los resultados obtenidos los que se encuentran en la tabla 3.4 y se representan en la figura 3.5, donde podemos apreciar como a partir de 5 μL de disolución la fosforescencia del sensor no aumenta e incluso disminuye. Por ello elegimos el volumen de 5 μL como el más adecuado para la construcción del sensor.

Los sensores preparados de esta manera son transparentes y homogéneos y de propiedades ópticas adecuadas para nuestros propósitos.

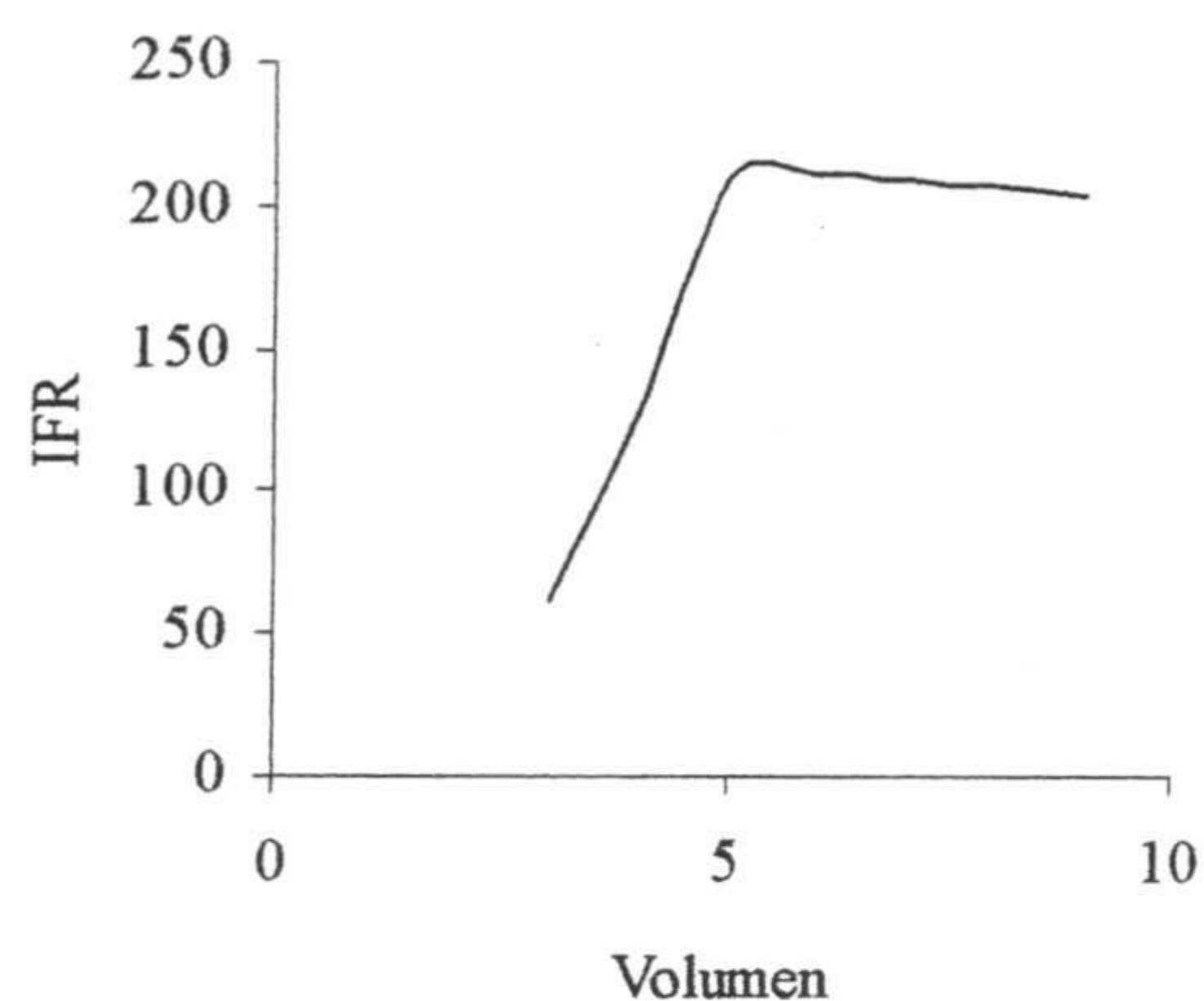


Figura 3.5. Influencia del volumen de gota medido en μL

V (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
3,0	59	63	65	62,3	4,9
4,0	120	130	128	126,0	4,2
5,0	209	210	211	210,0	0,5
6,0	208	212	214	211,3	1,4
7,0	206	210	200	208,7	3,8
9,0	200	198	210	202,7	3,2

Tabla 3.4. Influencia del volumen de gota depositado para formar el sensor.

3.2.1.7. Influencia del orden de adición de los componentes.

Para estudiar esta influencia se construyeron seis tipos de sensores, con los mismos reactivos y en las mismas proporciones todos ellos, pero variando el orden de adición en los diferentes casos. Como en el estudio realizado en el capítulo anterior, se comprobó que las membranas sensoras obtenidas adicionando los reactivos en el orden siguiente: CPV + TBF + THF, son las que permiten el desarrollo de una mayor fosforescencia ya que son las que presentan las características ópticas más adecuadas. En los restantes casos los reactivos no se mezclaban bien, o las membranas no eran totalmente transparentes y resistentes desde el punto de vista mecánico.

3.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor.

Las experiencias realizadas en este apartado fueron las mismas que se efectuaron en el apartado correspondiente del capítulo 2, por lo que sólo vamos a resumir aquí los resultados experimentales que se han obtenido.

Sólo se obtuvieron sensores ópticamente adecuados en los casos de secado a temperatura ambiente, bien a presión normal o bien a vacío (≈ 15 mm de Hg) solo que, en este último caso, el tiempo de secado era sensiblemente inferior, 20 minutos frente a una hora en el caso de secado al aire libre.

La membrana obtenida en estas condiciones es una película circular y plana, homogénea, transparente, adherida a la superficie del soporte sólido y de $20 \mu\text{m}$ de espesor, según se pudo comprobar mediante el microscópico electrónico de transmisión.

3.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.

Finalizada la optimización de parámetros relacionados con la naturaleza y constitución del sensor, se procedió a la optimización de los parámetros que dependen de las condiciones de trabajo del instrumento durante la medida de la señal analítica, es decir, anchura de las rendijas de excitación y emisión, tiempo de retraso entre el pulso de la lámpara y la apertura del obturador del fotodetector (t_d) y tiempo durante el cual el fotodetector se mantiene abierto para efectuar la medida (t_g).

3.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.

La influencia de estos dos parámetros se estableció como sigue: con unos valores de $t_g = 10$ ms y $t_d = 0,1$ ms y una vez que se hubo preparado el sensor equilibrado con una disolución patrón de 1 mg/L de concentración, se midió su señal analítica manteniendo una rendija de emisión de 5 nm y variando la de excitación entre 2.5 y 15 nm. Los resultados experimentales demostraron que al aumentar el ancho de la rendija de excitación por encima de 3 nm, la intensidad de la fosforescencia disminuye y la banda de emisión sufre un ensanchamiento. Por ello se eli-

gió el valor de 3 nm como óptimo para efectuar las medidas.

A continuación, manteniendo la rendija de excitación con un ancho de 3 nm y operando de idéntica forma a la descrita se procedió a optimizar el valor de la rendija de emisión. En este caso, a medida que aumenta el ancho de rendija aumenta también la intensidad detectada, razón por la cual tomo como óptimo el valor de 15 nm para este parámetro.

3.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_g .

La influencia del tiempo de retraso entre la terminación del pulso de la lámpara de excitación y el comienzo de la medida de fosforescencia (t_d) se midió como sigue: con un tiempo $t_g = 10$ ms, se midió la intensidad de fosforescencia a diferentes tiempos de retraso t_d comprendidos entre 0,05 y 0,5 ms y se comprobó que el tiempo óptimo era 0,15 ms.

Fijado un valor de $t_d = 0,15$ ms, operando de forma idéntica, se determinó el tiempo óptimo de apertura del detector para valores comprendidos entre 2 y 11 ms resultando un valor óptimo de $t_g = 10$ ms, para el cual la fosforescencia emitida era máxima.

Por lo tanto resumiendo los resultados obtenidos en estas experiencias podemos decir que sus valores óptimos de estas variables experimentales son los siguientes: rendija de excitación 3 nm; rendija de emisión 15 nm; tiempo de retraso (t_d) 0,15 ms y tiempo de apertura del detector (t_g) 10 ms.

3.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.

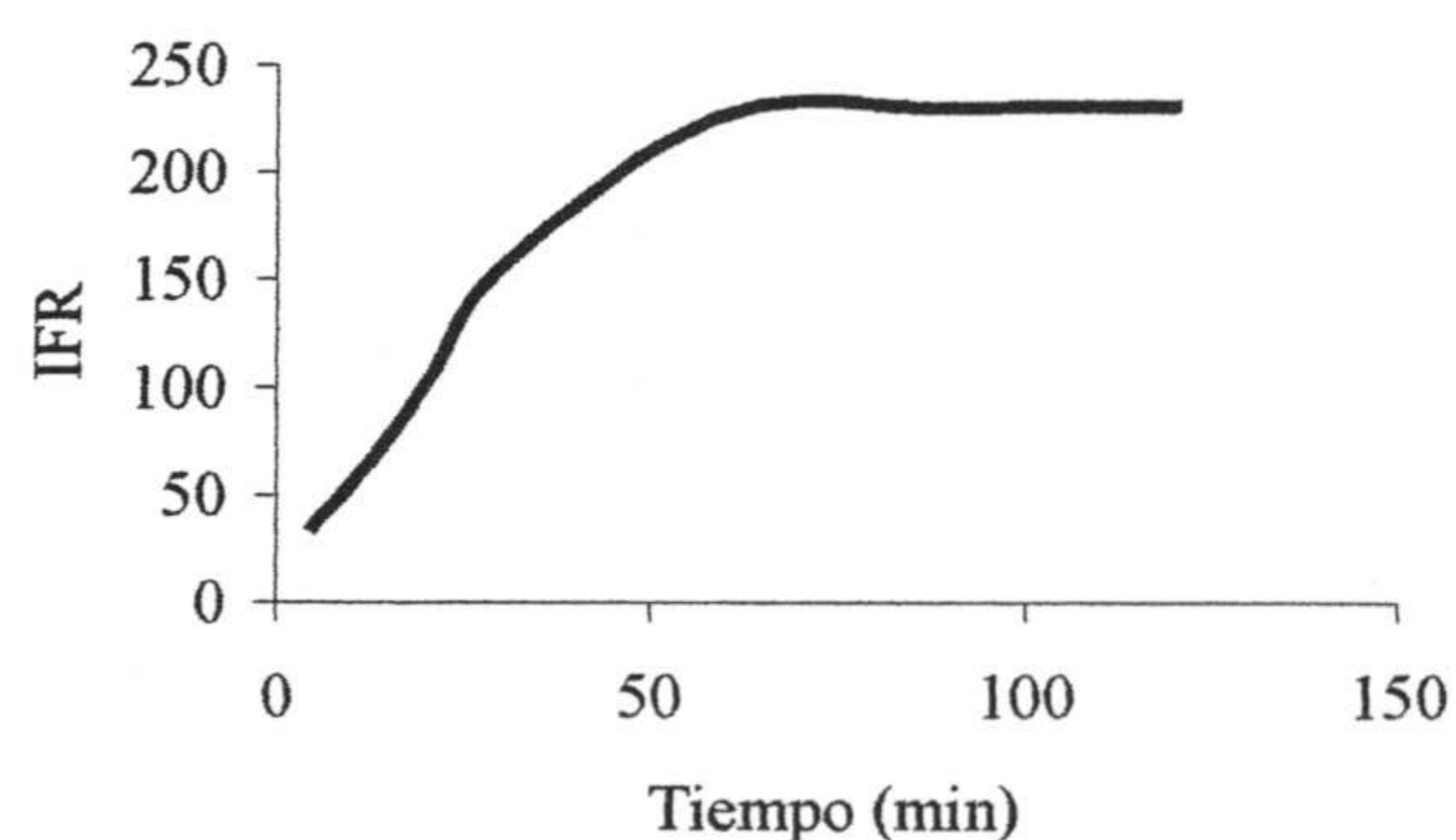
Como dijimos en el capítulo 2 de esta Memoria, vamos a considerar el proceso de fijación del analito sobre la membrana sensora como un proceso de extracción sólido-líquido en el que el analito se introduce en la membrana por un fenómeno

de absorción en el que intervienen determinadas variables experimentales cuya influencia hay que conocer. Las variables son: tiempo de equilibrio durante el cual se produce la penetración de las moléculas de analito en la membrana; modo y velocidad de agitación de la disolución durante dicho periodo de tiempo y forma y tiempo de secado del sensor tras la fijación del analito.

3.2.3.1. Optimización del tiempo de equilibrado o fijación del analito.

Para ello procedimos de la siguiente forma: se introdujo una serie de sensores en disoluciones patrón del analito, de 1 mg/L de concentración, y se mantuvieron en ellas durante diferentes periodos de tiempo comprendidos entre 5 minutos y dos horas, agitando la disolución mediante un agitador magnético girando a 30 revoluciones por minuto.

Terminado este proceso se secaron a vacío y se midió su fosforescencia en las condiciones instrumentales indicadas en apartados anteriores, obteniéndose los resultados experimentales que se incluyen en la tabla 3.5 y se representan en la figura 3.6.



Tiempo	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER
5 min	35	40	35	36,7	7,8
10 min	55	49	53	52,3	5,9
20 min	101	104	108	104,3	3,4
30 min	156	158	158	156,7	0,7
60 min	227	225	227	226,3	0,5
90 min	230	229	231	230,0	0,4
120 min	231	230	233	231,3	0,6

Figura 3.6. Influencia del tiempo de equilibrado sobre la fosforescencia emitida.

Tabla 3.5. Intensidad de fosforescencia relativa en función del tiempo de equilibrio.

De la figura 3.6 se puede deducir que la cantidad de analito que se fija sobre la membrana, para una concentración determinada, depende del tiempo de equilibración que se haya empleado, siendo 60 minutos el tiempo óptimo en el caso de disoluciones de 1 mg/L.

3.2.3.2. Influencia de la forma de colocar el sensor durante la agitación.

Como en el capítulo anterior en primer lugar se procedió a determinar la forma más adecuada de colocar el sensor dentro de la disolución de muestra, agitando a una velocidad de 30 rpm, y los resultados obtenidos demostraron que colocando el sensor de frente a la circulación de la corriente de disolución, la fosforescencia obtenida era aproximadamente un 50 % superior a la que se desarrolla cuando el sensor está colocado paralelo a dicha corriente. Si la membrana sensora se coloca contracorriente, la intensidad de fosforescencia es prácticamente nula. En consecuencia la membrana sensora se deberá colocar de frente a la corriente en posteriores experiencias, como veníamos haciendo hasta ahora.

3.2.3.3. Influencia de la velocidad de agitación.

Comprobado el modo óptimo de agitación se procedió a estudiar la influencia de la velocidad de agitación sobre la fosforescencia emitida. Para ello se prepararon varios sensores, equilibrados con disoluciones de ácido oxolínico de 1 mg/L de concentración, agitándose durante el mismo tiempo, con velocidades comprendidas entre 30 y 90 rpm. Los resultados experimentales demuestran que la velocidad óptima de agitación es 60 rpm (IFR = 230) ya que con una velocidad de agitación de 30 rpm la intensidad de fosforescencia relativa es algo menor (IFR = 200) y para velocidades superiores a 60 rpm la intensidad no aumenta llegando incluso a disminuir cuando la velocidad es 90 rpm.

3.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.

El siguiente grupo de variables experimentales que procedimos a estudiar es el de aquellas que están relacionadas con las condiciones físico-químicas de la muestra, durante el proceso de fijación del analito en el sensor, es decir, naturaleza y cantidad de átomo pesado, pH de la disolución y fuerza iónica del medio.

3.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.

Con el ácido oxolínico como analito se ensayaron los siguientes átomos pesados: Pb(II), Ag(I), Tl(I) y Hg(II) en forma de nitratos, plomotetraetilo y los halógenos: Cl⁻, Br⁻ y I⁻, incorporando la especie química a la disolución de muestra antes de la fijación del analito en el sensor, excepto en el caso del plomotetraetilo que se incorporó en la propia membrana sensora durante su fabricación.

De todas las especies ensayadas solo el Pb(II) en forma de acetato, incorporado a la disolución de analito antes de su fijación, produjo un incremento sensible de la fosforescencia, razón por la que se eligió dicho metal pesado como potenciador de la emisión fosforescente. A continuación procedimos a optimizar la cantidad de Pb(II) para el desarrollo de la fosforescencia y para ello se llevó a cabo la siguiente experiencia: se prepararon, según el procedimiento utilizado hasta ahora, diferentes sensores equilibrados con disoluciones de oxolínico de 1,0 mg/L de concentración y se añadieron cantidades diferentes de disolución de acetato de plomo, de forma que la concentración de este último en las disoluciones variaba entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $40 \cdot 10^{-3}$ M. Efectuadas las medidas correspondientes se obtuvieron los resultados que vemos representados en la figura 3.7, obtenidos a partir de los valores que figuran en la tabla 3.6.

Como se aprecia por los resultados de esta experiencia, la fosforescencia emitida por un sensor equilibrado con una disolución de ácido oxolínico (1,0 mg/L)

aumenta su intensidad cuando se encuentra en presencia de catión Pb(II) en concentración igual o superior a $2,0 \cdot 10^{-3}$ molar.

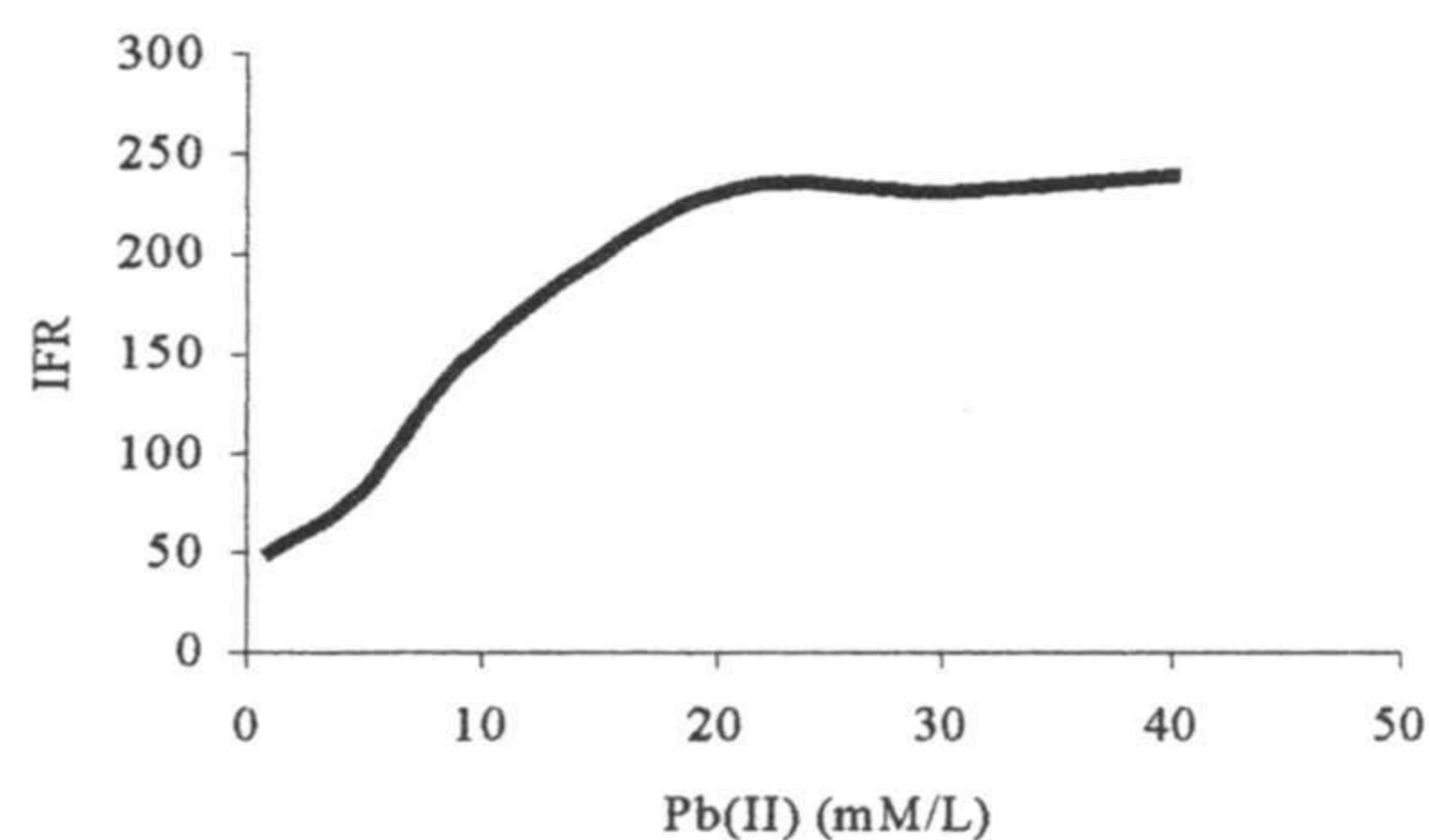


Figura 3.7. Influencia ejercida por la cantidad de Pb(II) sobre la fosforescencia del oxolínico. Las concentraciones que figuran en el eje de abscisas están multiplicadas por 10^3 .

Pb(II) (M/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
0,001	50	51	49	50,0	2,0
0,005	81	78	83	80,7	3,1
0,01	150	154	157	153,6	2,3
0,02	230	232	225	229,0	1,6
0,03	235	229	229	231,0	1,5
0,04	240	241	238	239,7	0,6

Tabla 3.6. Valores de la fosforescencia emitida por el ácido oxolínico en función de la concentración de átomo pesado.

Este aumento de la fosforescencia supone un incremento de un 220 % respecto de la fosforescencia presentada cuando no se añade ningún metal pesado a la disolución de analito antes de su equilibración con el sensor.

3.2.4.2. Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.

La influencia del pH de la disolución durante el proceso de fijación del analito sobre el sensor, se estudió utilizando disoluciones patrón de 0,5 mg/L con diferentes valores de pH comprendidos entre 1 y 12 y varios sensores para efectuar el proceso de fijación del analito. Los valores de pH se ajustaron con disoluciones de NaOH y HCl de diferentes concentraciones. Los resultados experimentales son los que figuran en la tabla 3.7 que se han representado en la figura 3.8.

Como se observa en la figura 3.8, la intensidad de fosforescencia aumenta progresivamente para valores de pH comprendidos entre 2 y 7 y, a partir de este va-

lor, la intensidad de fosforescencia permanece prácticamente constante hasta valores superiores a 11,0 donde comienza un descenso de la emisión.

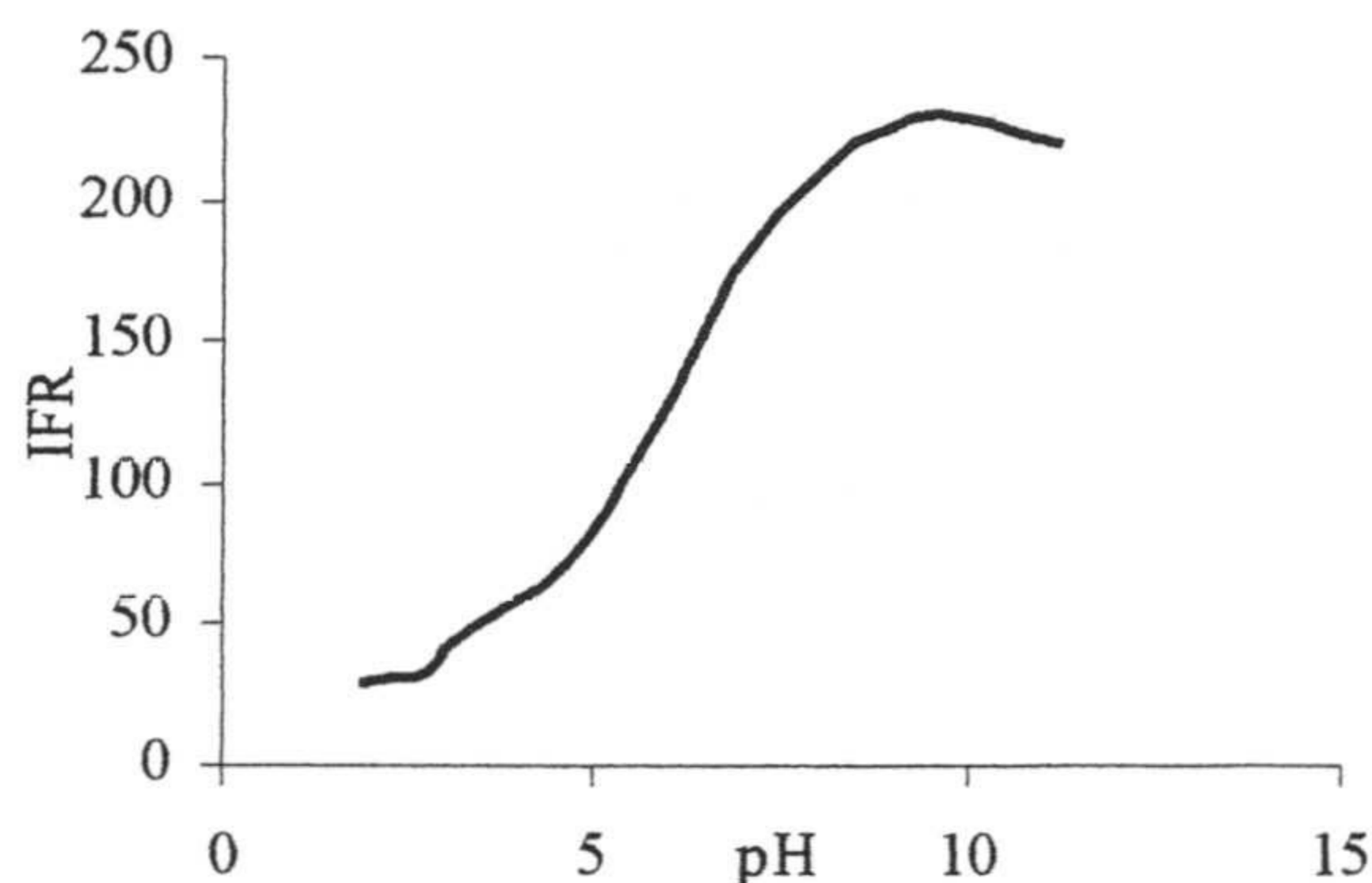


Figura 3.8. Representación gráfica de la influencia del pH sobre la fosforescencia del ácido oxolínico.

pH	IFR	pH	IFR
1,9	30	8,5	221
2,7	34	9,0	225
3,1	43	9,6	230
4,6	72	10,3	227
5,7	113	11,24	221
7,1	182		

Tabla 3.7. Valores de la intensidad de fosforescencia en función del pH de la disolución de muestra.

Este comportamiento lo podemos explicar suponiendo que la desprotonación del ácido oxolínico da lugar a una distribución electrónica de la molécula que favorece la estabilidad del estado triplete excitado, aumentando así considerablemente su posibilidad de desactivación radiativa. En consecuencia se seleccionó el valor de 9,0 como pH de trabajo para las disoluciones de patrones y de muestras utilizando para su ajuste una disolución 0,01 N de NaOH.

3.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica.

Para conocer esta influencia hemos utilizado cloruro sódico como electrolito y se han realizado las siguientes experiencias: se prepararon varias disoluciones manteniendo constantes todas las variables excepto la fuerza iónica del medio que variaba de una disolución a otra, ya que se pusieron cantidades crecientes de NaCl comprendidas entre 0,1 y 1,9 M. Una vez preparados las muestras en la forma

acostumbrada, se midieron sus intensidades de fosforescencia y se obtuvieron los resultados experimentales que podemos ver en la tabla 3.8 y que se han representado en la figura 3.9.

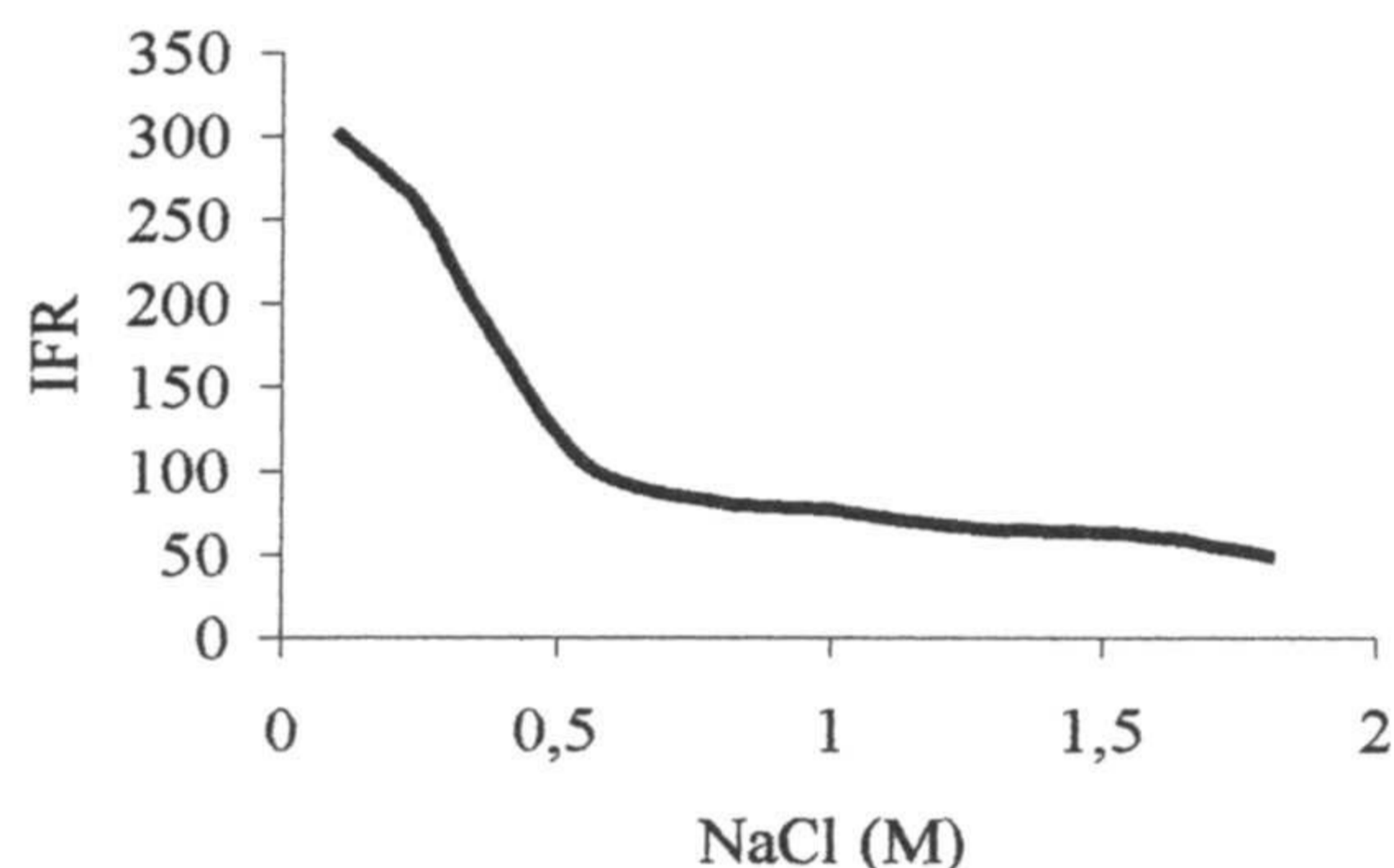


Figura 3.9. Representación gráfica de la influencia de la fuerza iónica sobre la fosforescencia de l ácido oxolínico.

NaCl (M)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,104	300	310	314	308,0	2,3
0,243	259	257	253	256,3	1,2
0,368	187	183	180	183,3	1,9
0,547	105	114	102	107,0	6,1
0,769	82	85	84	83,7	1,8
0,996	76	66	70	70,7	7,2
1,265	66	62	61	66,8	8,4
1,587	61	58	57	64,1	9,9
1,802	49	51	47	49,0	4,1

Tabla 3.8. Valores experimentales de la influencia de la fuerza iónica del medio sobre la intensidad de fosforescencia.

Como se aprecia en la figura 3.9 la fuerza iónica del medio ejerce una influencia bastante acusada sobre la fosforescencia del analito ya que se produce un fuerte descenso (un 75 % de la señal) cuando la fuerza iónica del medio aumenta desde 0,1 hasta 0,5 M, valor este a partir del cual el descenso es menos acusado ya que solo desciende un 8 % para un aumento de molaridad desde 0,5 hasta 1,8 M. En consecuencia hemos de tener presente que la fuerza iónica del medio es uno de los factores que condicionan la aplicabilidad del método propuesto.

3.2.5 Influencia de la atmósfera de N₂ durante la medida.

Con el objetivo de estudiar la influencia que pudiera ejercer la presencia de oxígeno y humedad atmosféricos sobre la señal de fosforescencia, utilizando el dispositivo descrito en el capítulo primero, se llevó a cabo la siguiente experiencia: se prepararon varios sensores, se equilibraron con disoluciones patrón de áci-

do oxolínico de 1,0 mg/L y se midió la intensidad de fosforescencia que emitía cada uno de ellos en una atmósfera inerte producida por una corriente de nitrógeno seco introducido por la parte superior del dispositivo. A continuación se midió la fosforescencia que emitían otros sensores, preparados de la misma forma, pero medidos bajo la acción de la atmósfera. Los resultados experimentales demuestran que es necesario el uso de la corriente de nitrógeno para llevar a cabo las medidas ya que la fosforescencia disminuye un 92 % de su valor inicial en ausencia de dicho gas.

3.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Una vez optimizadas las variables experimentales que pueden afectar a la intensidad de fosforescencia, podemos establecer el siguiente procedimiento operativo para la preparación y medida de la muestra: a la disolución de muestra se le ajusta el pH a un valor de 9,0 utilizando para ello una disolución de NaOH 0,1M, y se le añade la cantidad de acetato de plomo necesaria para que su concentración sea 0,02 M.

Se toman 50 mL de la misma y se colocan en un vaso de precipitado de 100 mL de capacidad. Se introduce el sensor sujeto a un soporte sólido, próximo a la pared del vaso de forma que la corriente de líquido al agitar la disolución incida frontalmente sobre la membrana sensora.

Se agita durante 60 minutos a una velocidad de 30 rpm., se saca el sensor y se coloca en el interior de un desecador a vacío (≈ 15 mm de Hg) durante 20 minutos, transcurridos los cuales el sensor se introduce en el dispositivo de medida, el dispositivo con la muestra se coloca en el compartimiento de muestras del espectrómetro, se conecta la corriente de nitrógeno y se mide la intensidad de fosforescencia transmitida a $\lambda_{exc} = 330$ nm; $\lambda_{em} = 449$ nm; $t_g = 10$ ms y $t_d = 0,15$ ms.

3.4 PROCESO DE CALIBRACIÓN.

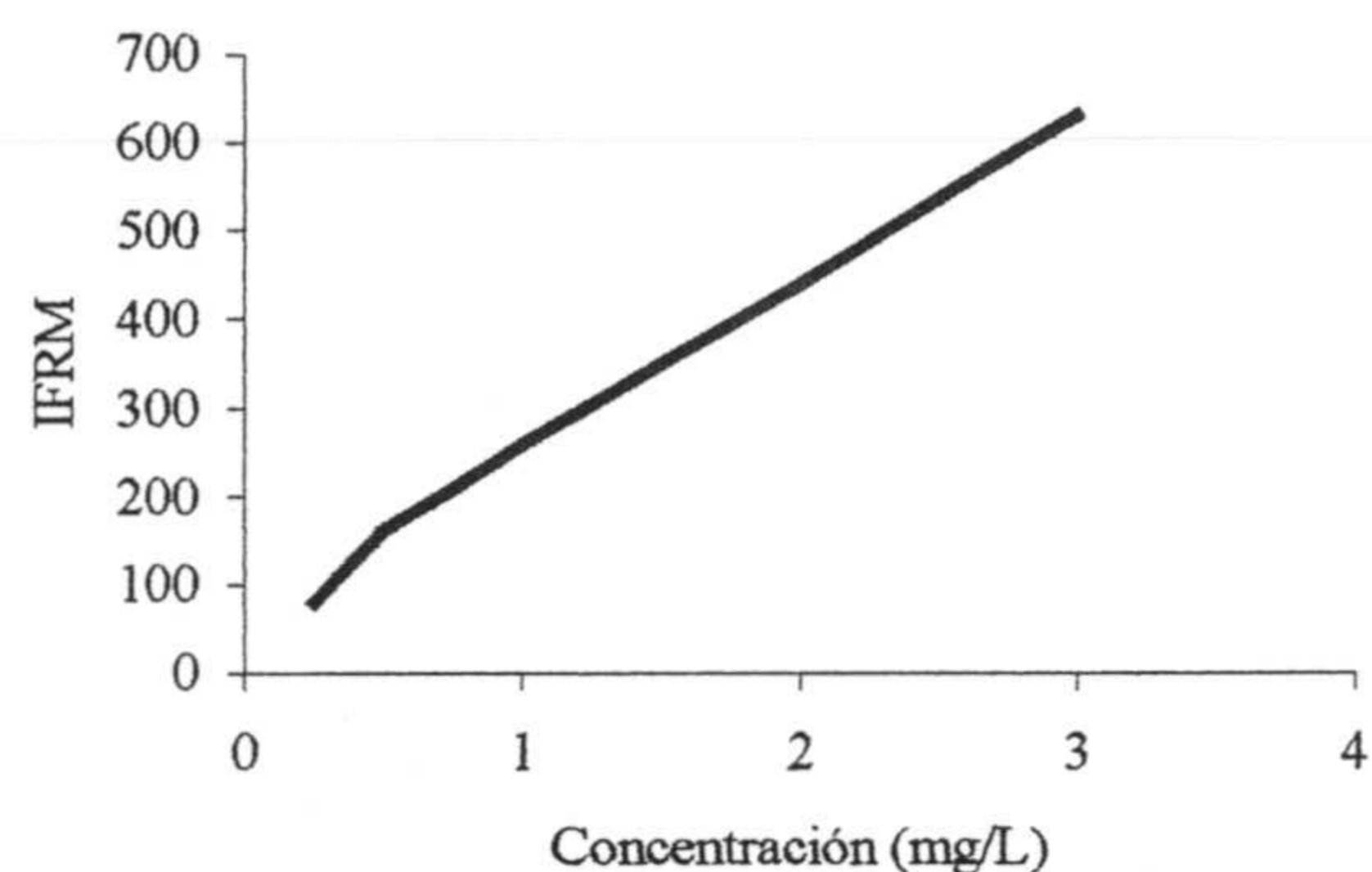
Como vimos en el capítulo anterior, la fijación de estos analitos sobre la membrana sensora es un proceso de absorción que se puede considerar como una extracción sólido-líquido en la que la cantidad de analito fijado en la membrana depende de la concentración de analito en la muestra y del tiempo de equilibrado del sensor con la disolución, suponiendo que los restantes parámetros se mantienen constantes. El proceso llevado a cabo fue un proceso de calibración convencional en el que se estableció la relación entre concentración de analito y señal analítica para diferentes tiempos de equilibración, efectuando el ajuste de las rectas de calibrado mediante el procedimiento comúnmente conocido como método de mínimos cuadrados.

3.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.

Para conocer la relación existente entre concentración de analito y señal analítica y poder delimitar la zona en la que esta relación es lineal, al igual que en el capítulo anterior, se procedió de la siguiente manera: en matraces aforados de 50 mL se prepararon varias series de disoluciones patrón de ácido oxolínico de concentraciones comprendidas entre 0,2 y 3,0 mg/L y, una vez ajustado el pH, se procedió a la fijación del analito sobre los sensores agitando la disolución a 30 rpm durante los siguientes intervalos de tiempo: 15, 30, 60, 90 y 120 min. De cada uno de los patrones utilizados se prepararon tres replicados y se utilizó su valor medio para efectuar la representación gráfica. Los resultados obtenidos experimentalmente son los que vamos a exponer a continuación, en los que veremos que el tiempo de fijación del analito está íntimamente relacionado con la concentración del mismo en la muestra.

Curva de calibrado para un tiempo de 15 minutos.

Estudiando la relación entre intensidad de fosforescencia desarrollada en función de la concentración, para un tiempo de fijación de 15 minutos nos encontramos los resultados experimentales que figuran en la tabla 3.9 y se representan gráficamente en la figura 3.10.



C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,25	80	82	79	80,3	1,9
0,50	160	167	166	164,3	2,3
0,75	206	209	201	205,3	2,0
1,00	258	260	254	257,3	1,2
1,50	350	359	342	350,3	2,4
2,00	420	410	431	417,0	1,5
3,00	640	638	656	644,7	1,5

Figura 3.10. Representación gráfica de los datos experimentales que figuran en la tabla 3.7.

Tabla 3.9. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración para un tiempo de fijación $t = 15$ minutos.

En la gráfica podemos observar que la linealidad existe hasta una concentración de 3,0 mg/L. La ecuación de la recta que obtenemos con estos datos es la siguiente: $IFR = 194,3 C + 52$.

Curva de calibrado para un tiempo de 30 minutos.

Cuando el tiempo de fijación del analito sobre el sensor fue de 30 minutos los datos obtenidos fueron los que se incluyen en la tabla 3.10 y se representan en la figura 3.11. Como se aprecia en la figura, la recta presenta dos tramos bien diferenciados, el primero de ellos abarca una rango de concentraciones comprendido entre el inicio de la recta y una concentración de 2,0 mg/L, mientras que el segundo tramo empieza en este valor de concentración y se extiende al menos hasta el valor de 3,0 mg/L. La recta correspondiente al primer tramo responde a la ecua-

ción: $IFR = 284,5 C + 95$, siendo el valor de $r^2 = 0,9909$.

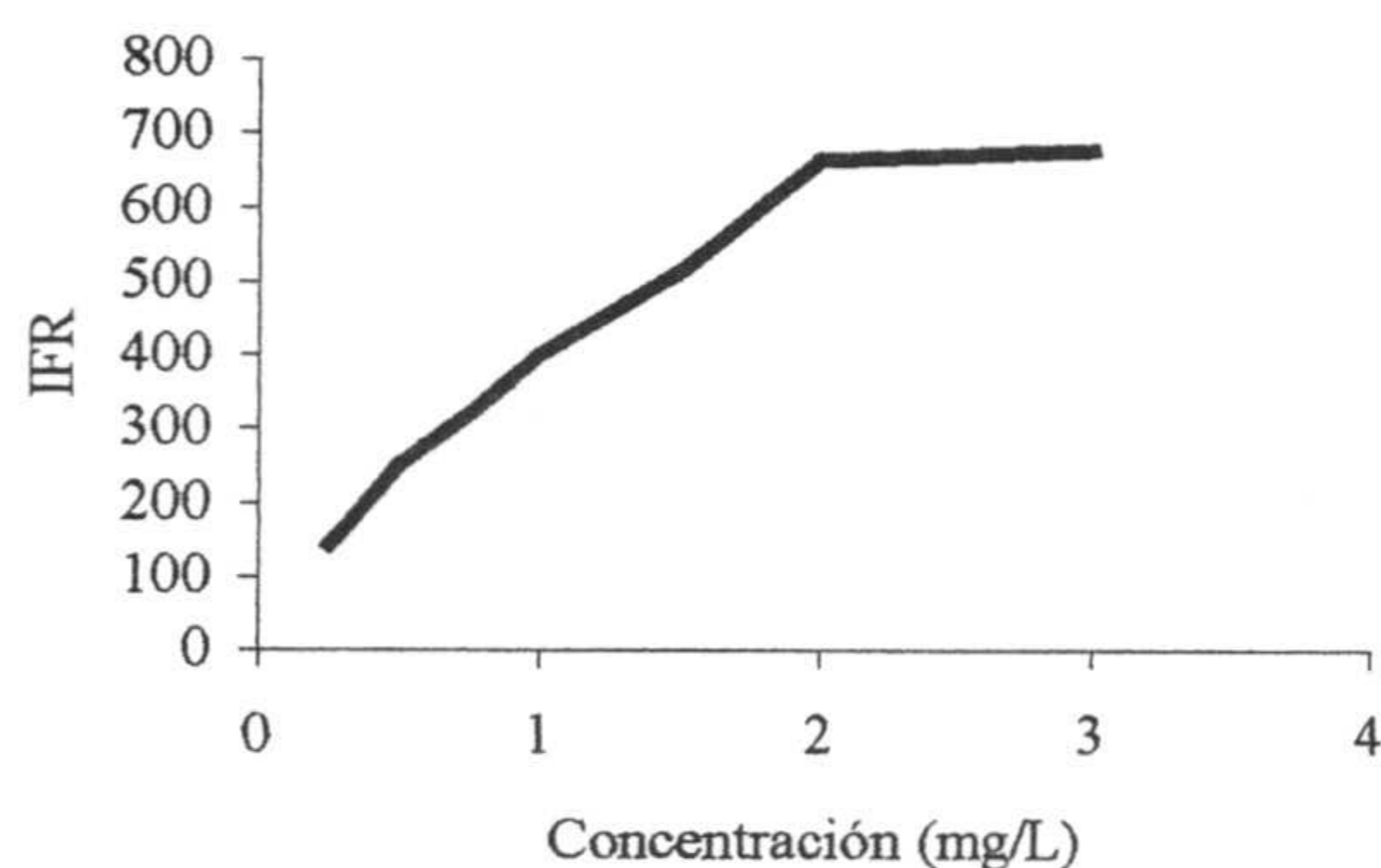


Figura 3.11. influencia de la concentración sobre la intensidad de fosforescencia. $t = 30$ minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,25	142	145	150	145,0	3,5
0,50	249	238	249	245,3	2,6
0,75	320	318	321	319,7	0,5
1,00	400	389	405	398	2,1
1,50	503	510	514	509,0	1,1
2,00	664	660	672	665,3	0,9
3,00	678	680	682	680	0,3

Tabla 3.10. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración. Tiempo de fijación de 30 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de 60 minutos.

A continuación procedimos a obtener la curva que relaciona la intensidad de fosforescencia con la concentración, utilizando un tiempo de 60 minutos para realizar la fijación del analito sobre la superficie sensora. Los datos obtenidos son los que se incluyen en la tabla 3.11 y se representan en la figura 3.12.

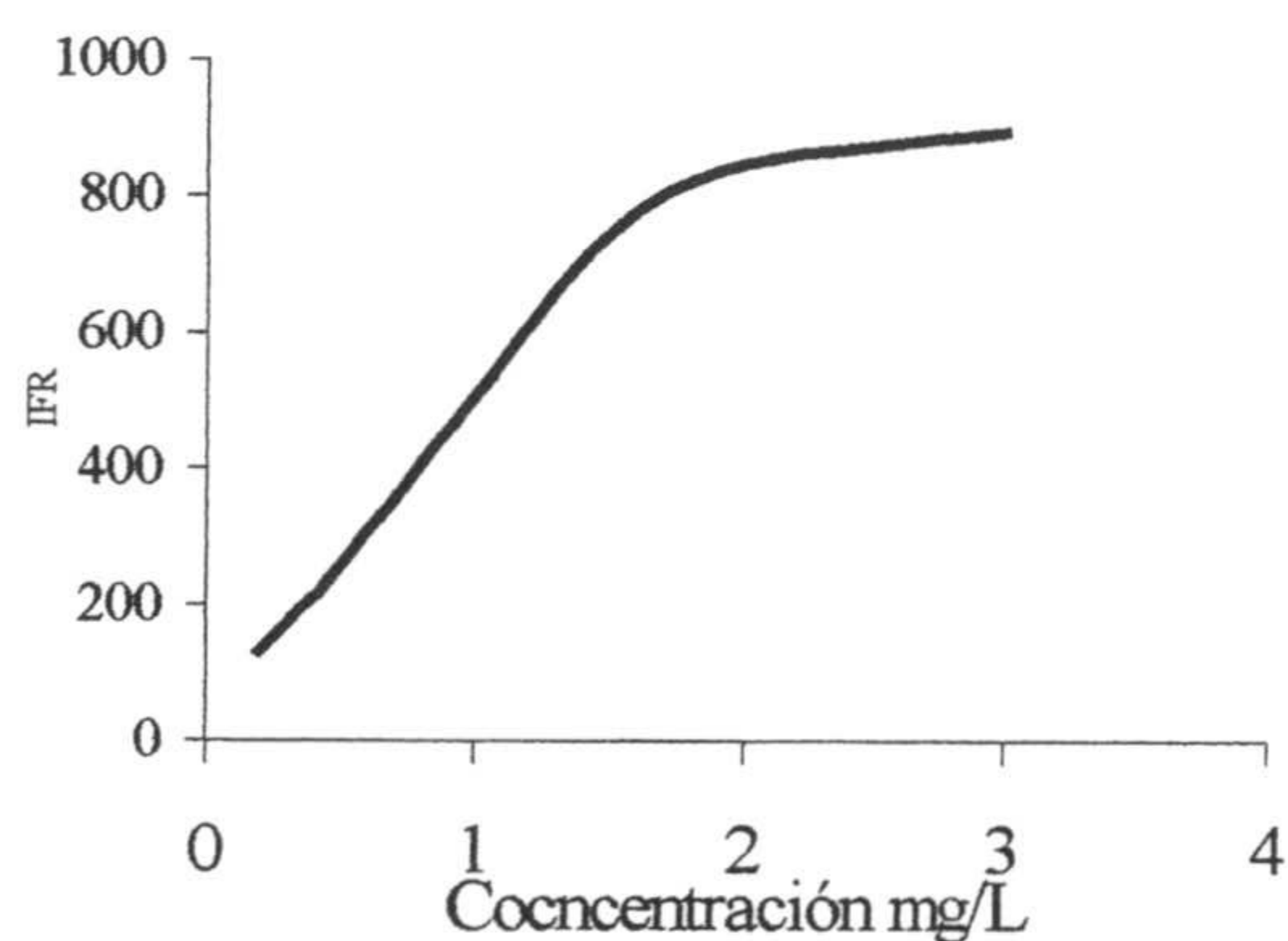


Figura 3.12. Curva de proporcionalidad entre concentración de analito e intensidad de fosforescencia.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,2	130	128	135	131,0	2,8
0,3	170	167	174	170,3	2,1
0,4	211	205	209	208,3	1,5
0,5	256	251	258	255,0	1,4
1,0	509	500	504	504,3	0,9
1,5	748	743	745	745,3	0,3
2,0	850	844	847	847,0	0,4
3,0	900	892	892	894,7	0,5

Tabla 3.11. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito y desviación estándar relativa de las tres medidas efectuadas. Tiempo de agitación 60 minutos.

En esta curva podemos observar que existe una zona de linealidad comprendida entre 0,2 y 1,5 mg/L, ambos valores incluidos, que responde a la ecuación siguiente: $IFR = 478,9 C + 24,5$. El segundo tramos de la curva tiene por ecuación: $IFR = 94 C + 629$, que como podemos apreciar presenta una pendiente mucho menor que la anterior.

Curva de calibrado para un tiempo de 90 minutos.

En el caso de utilizar 90 minutos como tiempo de fijación del analito, los valores experimentales obtenidos son los que incluimos en la tabla 3.12 y se representan en la figura 3.13.

En este caso la representación gráfica de los valores experimentales también presenta dos tramos de diferente pendiente: uno inicial cuya ecuación es: $IFR = 478,5 C + 58$ y un segundo tramos en el que la ecuación es: $IFR = 30,8 C + 740$ que como podemos apreciar presenta una menor pendiente. En el primer tramo de la curva el coeficiente r^2 tiene un valor de 0,9982.

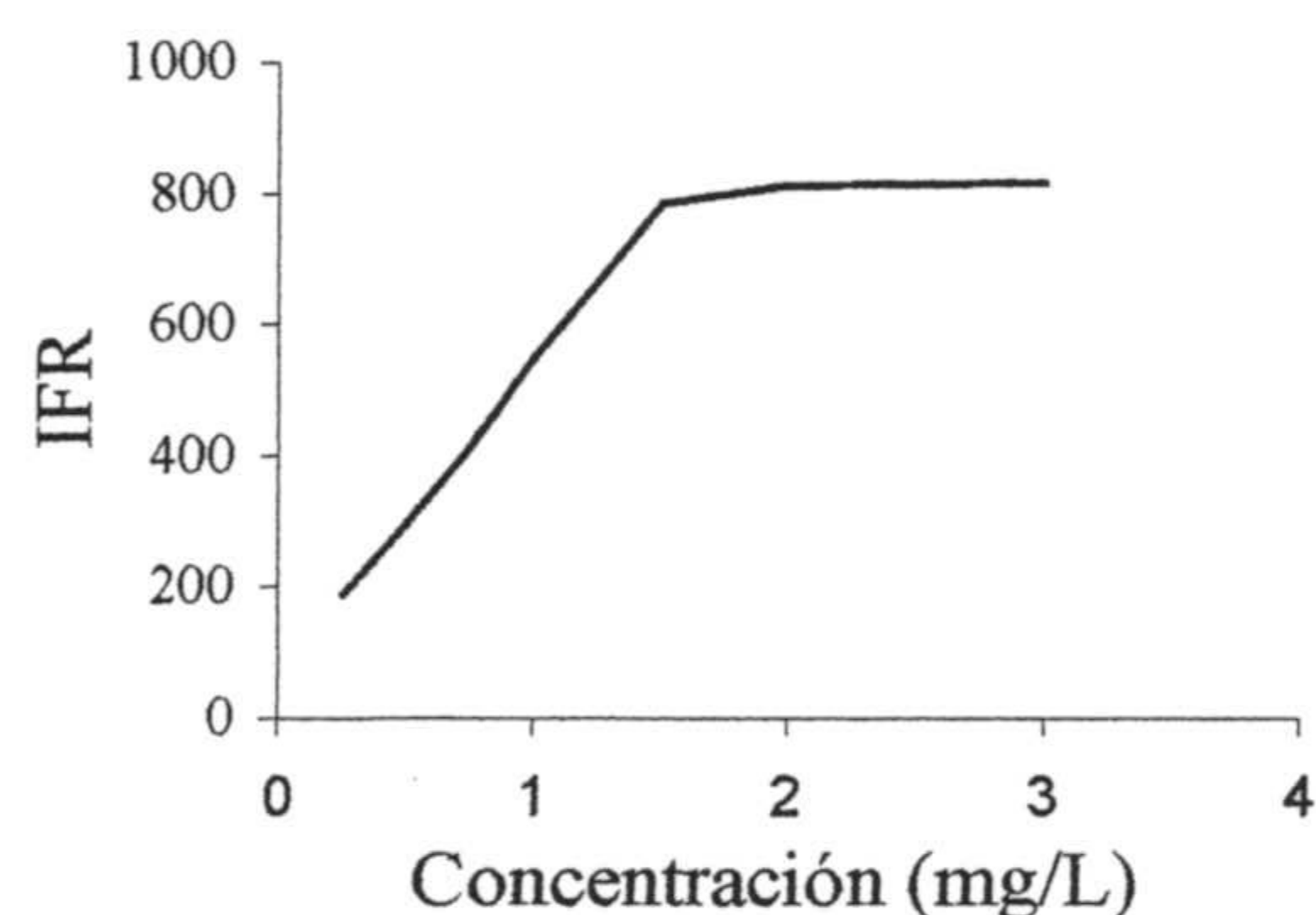


Figura 3.13. Relación entre la concentración de analito y la intensidad de fosforescencia.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,25	190	180	197	189,0	4,7
0,50	292	287	300	293,0	2,2
0,75	404	409	418	410,3	1,8
1,00	541	549	552	547,0	1,1
1,50	781	795	778	784,7	1,3
2,00	810	822	801	811,0	1,3
3,00	830	825	839	817,6	1,5

Tabla 3.12. Valores experimentales de la dependencia entre intensidad de fosforescencia y concentración de analito. $t = 90$ minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de 120 minutos.

Finalmente se estudió la relación entre concentración y señal analítica para un tiempo de fijación de 120 minutos, obteniéndose los resultados que se representan en la figura 3.14 que corresponden a los valores de la tabla 3.13.

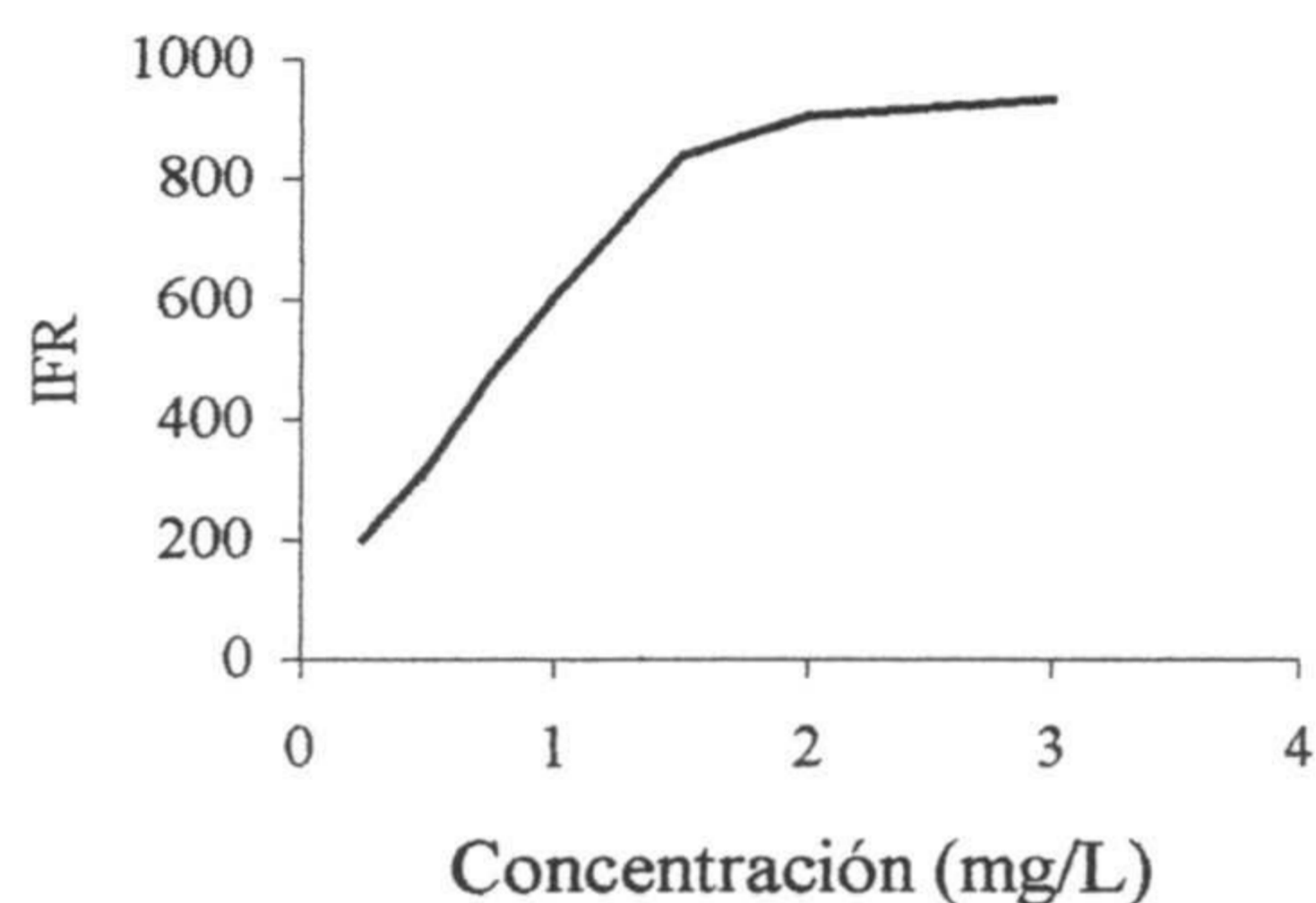


Figura 3.14. Relación entre la concentración de analito y la intensidad de fosforescencia.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,25	203	210	216	209,7	3,2
0,50	305	300	317	307,3	2,8
0,75	480	489	477	482,0	1,6
1,00	608	610	598	605,3	1,1
1,50	848	840	830	839,3	1,1
2,00	901	920	898	906,3	1,3
3,00	930	945	921	932,0	1,4

Tabla 3.13. Valores experimentales de la dependencia entre intensidad de fosforescencia y concentración de analito. $t = 120$ minutos.

El primer tramo de la curva tiene por ecuación: $IFR = 527,6 C + 67$ y su coeficiente $r^2 = 0,9951$, mientras que el segundo presenta una pendiente de 30,8.

3.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.

Con los resultados experimentales obtenidos en la sección anterior podemos hacer el siguiente estudio comparativo:

Tiempo	Pendiente	Ordenada	Lím. Superior
15 min	194,4	52	3,0
30 min	284,5	95	2,0
60 min	478,9	24	1,5
90 min	478,5	58	1,5
120 min	527,6	67	1,5

Tabla 3.14. Valores de las pendientes de los primeros tramos de las gráficas que relacionan concentración y señal analítica, para diferentes valores del tiempo de fijación del analito sobre la superficie sensora.

En la tabla 3.14 podemos ver que a medida que aumenta el tiempo de fijación del analito sobre la superficie sensora se producen dos hechos notables. Primero, aumenta paulatinamente la pendiente del primer tramo rectilíneo de la curva, excepto para los valores de tiempo de 60 y 90 minutos en los que la pendiente de dicho tramo es la misma. En segundo lugar podemos ver que, al igual que ocurriera con el ácido nalidíxico estudiado en el capítulo segundo de esta Memoria, a medida que aumenta el tiempo de fijación, el primer tramo rectilíneo de la curva se acorta pasando de un valor máximo de 3,0 para un tiempo de 15 minutos, a un valor de 1,5 para un tiempo de fijación de 120 minutos.

Para calcular otros parámetros analíticos tales como límites de detección y cuantificación, precisión del método y rango lineal procedimos como sigue:

Repetitividad del blanco. Como es sabido, según el criterio de la IUPAC, una forma de estimar los límites de detección y cuantificación así como el rango lineal, es tomando como punto de partida la desviación estándar de las medidas efectuadas con una serie de varios blancos analíticos preparados y medidos todos ellos bajo las mismas condiciones experimentales. Por ello se prepararon diez blancos y se procedió a su medida, obteniéndose los valores que figuran en la tabla 3.15.

Blanco nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	20	22	21	21	21	24	23	24	22	22

Tabla 3.15

De los valores que figuran en la tabla 3.15 obtenemos un valor medio de la fluorescencia emitida por el blanco de 22,25 y un valor de la desviación estándar de 1,2.

Límites de detección y cuantificación: Una vez calculado el valor de la desviación estándar del blanco y siguiendo con el criterio de la IUPAC, se pueden calcular los valores de los límites de detección y cuantificación.

Aplicando las expresiones reseñadas en el primer capítulo de esta Memoria a los datos de la tabla 3.15, para cada uno de los casos anteriores, obtenemos los siguientes valores para los límites de detección y cuantificación y rango dinámico del método para los diferentes tiempos de fijación:

Tiempo	L _D (mg/L)	L _C (mg/L)	Rango dinámico (mg/L)
15 min	0,02	0,06	0,06-3,0
30 min	0,01	0,04	0,04-2,0
60 min	0,01	0,02	0,04-1,5
90 min	0,01	0,02	0,04-1,5
120 min	0,01	0,02	0,04-1,5

Tabla 3.16. Valores de los parámetros analíticos: límite de detección, límite de cuantificación y rango dinámico lineal, para los diferentes tiempos de fijación del analito sobre la membrana.

Precisión del método. Como medida de la precisión del método vamos a adoptar el criterio de la repetitividad de las medidas realizadas con una serie de diez muestras patrón de concentración intermedia dentro del rango lineal. Se tomó como concentración de referencia 0,8 mg/L y se prepararon diez muestras patrón con un tiempo de fijación del analito de 60 minutos, obteniéndose los resultados que figuran en la tabla 3.17.

Blanco nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	222	227	225	225	230	227	229	224	227	226

Tabla 3.17. Repetitividad del blanco

A partir de dichos valores podemos calcular un valor medio de 226.3, una des-

viación estándar de 2,6 y una desviación estándar relativa de 1,1 %. Lo que nos permite decir que el método presenta una buena precisión (repetitividad) junto con una gran sensibilidad, dado que la pendiente de la recta de calibrado tiene un alto valor (478,9) como vimos anteriormente.

3.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

Al igual que en el capítulo anterior de esta Memoria, antes de proceder al estudio de las aplicaciones analíticas del método, se efectuó un estudio de las interferencias que pudieran producir los ácidos nalidíxico, pipemídico, promídico y flumequina en la determinación de ácido oxolínico en una disolución de 1,0 mg/L del mismo. Para ello se dispusieron diferentes series de matraces aforados, en los que se colocaron cantidades crecientes de los posibles interferentes, y se prepararon los correspondientes sensores en la forma descrita en la sección Procedimiento operatorio. Tras efectuar las medidas de fosforescencia y utilizando la curva de calibrado correspondiente (tiempo de fijación 60 minutos), se determinó el error relativo originado por la presencia de la especie interferente, tomando como límite de tolerancia de dicha especie la cantidad de la misma que produce un error superior al 5%. Los resultados experimentales demuestran que ninguna de las especies ensayadas produce interferencias si sus concentraciones son las siguientes: flumequina, nalidíxico y pipemídico $\leq 3,0$ mg/L, piromídico $\leq 0,1$ mg/L.

3.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.

Para aplicar el método al análisis de muestras reales se tomaron los dos tipos de muestras, ya utilizadas en el capítulo anterior, en las que es posible la existencia de trazas de ácido oxolínico debido a su uso en veterinaria: leche de vaca y orina humana.

3.5.1. Determinación de ácido oxolínico en muestras de orina humana.

Aplicando la metodología propuesta a diversas muestras de orina humana, no se detectó la presencia de ácido oxolínico en ningún caso, lo que podemos atribuir a la ausencia del fármaco en dichas muestras o a que la cantidad presente es inferior al límite de detección del método propuesto.

Por ello se decidió efectuar un estudio de recuperación del analito a partir de una serie de muestras en las que, previamente, se había colocado una cantidad conocida del mismo, utilizando la recta de calibrado obtenida para un tiempo de equilibrado de 60 minutos como referencia.

Se prepararon tres muestras de orina, con tres replicados de cada una de ellas, cuyas concentraciones eran 0,3, 1,0 y 1,5 mg/L de ácido oxolínico y se efectuaron las medidas de la señal analítica según la metodología expuesta. En la tabla 3.18 tenemos los resultados obtenidos así como los porcentajes de recuperación de cada caso.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,3	181	0,326	108,7
0,3	171	0,305	102,0
0,3	165	0,294	98,0
1,0	500	0,993	99,3
1,0	510	1,015	101,5
1,0	492	0,976	97,6
1,5	740	1,495	99,7
1,5	750	1,516	101,1
1,5	748	1,512	100,9

Tabla 3.18. Valores correspondientes al estudio de recuperación llevado a cabo con ácido oxolínico en orina humana.

El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 60$ min. IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

Como podemos apreciar, los valores de las cantidades de analito recuperados se encuentran entre un 97,6% y un 108,7 %, siendo las desviaciones estándar relativas: 5,0 para las muestras más diluidas, 1,9 para las muestras de concentración

intermedia y 0,8 para las muestras más concentradas.

3.5.2. Determinación de ácido oxolínico en muestras de leche de vaca.

Como en el caso anterior, se aplicó la metodología propuesta a diversas muestras de leche de vaca sin que se detectase la presencia de ácido oxolínico en ninguna de las muestras estudiadas, lo que podemos atribuir a la ausencia de dicho fármaco o a que la cantidad presente es inferior al límite de detección de nuestro método.

Por ello se procedió a efectuar un estudio de recuperación con una serie de muestras en las que, previamente, se colocó una cantidad conocida de ácido oxolínico. Con la recta de calibrado obtenida para un tiempo de fijación de 60 minutos se prepararon tres muestras de leche, con tres replicados de cada una de ellas, y se pusieron concentraciones de oxolínico de 0,3, 1,0 y 1,5 mg/L. Aplicando la metodología ya conocida, se obtuvieron los resultados que figuran en la tabla 3.19 que contiene además los porcentajes de recuperación de cada caso.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,3	181	0,324	108,0
0,3	171	0,293	97,6
0,3	165	0,299	99,6
1,0	500	0,993	99,3
1,0	510	1,011	101,0
1,0	492	1,095	109,5
1,5	740	1,576	105,1
1,5	750	1,513	100,9
1,5	748	1,500	100,0

Tabla 3.19. Valores correspondientes al estudio de recuperación de ácido oxolínico en leche de vaca. El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 60$ min. IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

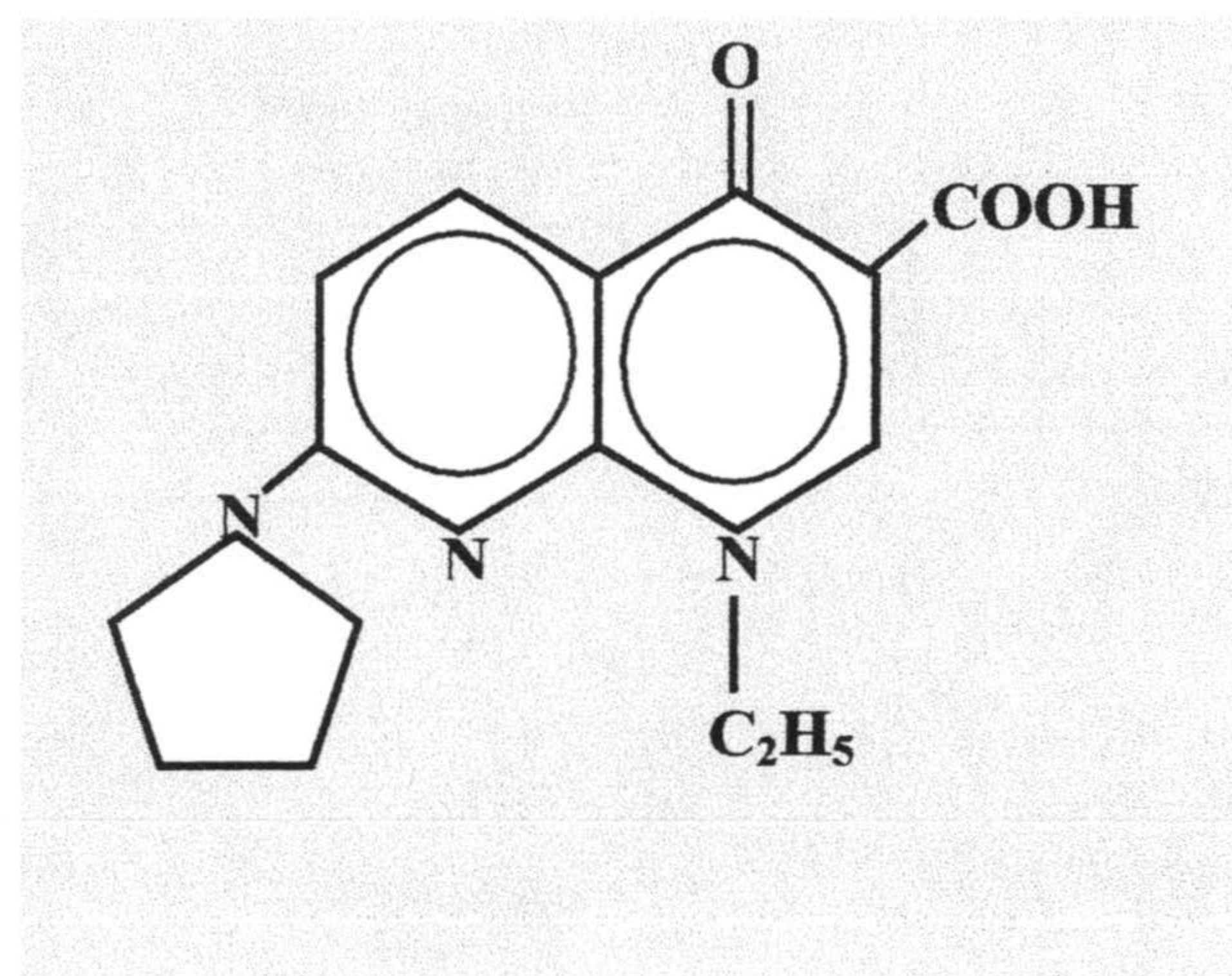
Como podemos apreciar los valores de las cantidades de analito recuperados se encuentran entre un 97,6 % y un 109,5 % siendo las desviaciones estándar relati-

vas: 5,0 para las muestras más diluidas, 2,0 para las muestras de concentración intermedia y 1,8 para las muestras más concentradas.

Como consecuencia del estudio descrito en este capítulo se ha enviado el siguiente artículo a la revista TALANTA:

Título: **Determination of oxolinic acid in milk and human urine by means of a single use phosphorimetric sensor.**

Actualmente se encuentra en trámite de aceptación.



CAPÍTULO 4

ESTUDIO ESPECTROFOSFORIMÉTRICO DEL ÁCIDO PIROMÍDICO MEDIANTE UN SENSOR DE UN SOLO USO

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

4.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁC. PIROMÍDICO.	169
4.1.1. Espectros de fosforescencia en fase sólida del ácido piromídico.	169
4.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	171
4.2.1. Optimización de variables experimentales que afectan al sensor.	171
4.2.1.1. Elección del soporte sólido.	171
4.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.	172
4.2.1.3. Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.	172
4.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.	174
4.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.	174
4.2.1.6. Optimización del volumen de disolución de componentes.	175
4.2.1.7. Influencia del orden de adición de los reactivos.	176
4.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado de la gota.	177
4.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.	177
4.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.	178
4.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_g .	178
4.2.3. Optimización de los parámetros que dependen del proceso de fijación.	179
4.2.3.1. Optimización del tiempo de fijación.	180
4.2.3.2. Optimización de la forma y velocidad de agitación.	181
4.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.	181
4.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.	182
4.2.4.2. Influencia del pH del medio.	182
4.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica del medio.	183
4.2.5. Influencia de atmósfera de N ₂ durante la medida.	184
4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	185
4.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN.	186
4.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.	186
4.4.2. Estudio comparativo de los parámetros analíticos.	190
4.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.	193
4.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.	193
4.5.1. Determinación de ácido piromídico en muestras de orina humana.	194
4.5.2. Determinación de ácido piromídico en muestras de leche de vaca.	195

El ácido 8-etil-5,8-dihidro-5-oxo-2-(1-pirrolidin)pirido[2,3-d]pirimidina-6-carboxílico, cuyo nombre comercial es ácido piromídico, se conoce bajo diferentes nombres comerciales entre los que cabe citar, enterol, bactramil, gastrurol, etc. cristaliza a partir de una disolución en etanol-cloroformo, en forma de agujas cuyo punto de fusión se encuentra entre 314 y 316 °C y su dosis letal media por vía oral es de 0,158 g/kg en ratas de laboratorio.

Aunque actualmente sólo se utiliza en veterinaria, es necesario disponer de métodos de determinación que permitan detectar y cuantificar su presencia en leche y derivados lácteos, así como en fluidos biológicos humanos en los que puede estar presente por su incorporación no deseada a la cadena alimentaria.

4.1 Características fosforescentes del ácido piromídico.

Como en ocasiones anteriores el primer paso para estudiar este compuesto fue establecer sus características fosforescentes, para lo cual comenzamos por registrar los espectros de excitación y emisión del fármaco.

4.1.1. Espectros de fosforescencia, en fase sólida, del ácido piromídico.

Para obtener el espectro de excitación del ácido piromídico se utilizó el procedimiento descrito en el capítulo anterior de esta Memoria, preparándose los sensores necesarios y equilibrándolos, en este caso con disoluciones de ácido piromídico de 0,1 mg/L de concentración. Los espectros se registraron bajo las siguientes condiciones instrumentales: $t_g = 10$ ms; $t_d = 0'15$ ms, rendija de excitación 2,5 nm y de emisión 5 nm y la velocidad de barrido fue 240 nm/min.

En todos los registros efectuados, antes de equilibrar el sensor con la disolución de ácido piromídico, se midió la fosforescencia del sensor para utilizarla como blanco analítico. El espectro de excitación obtenido es el que podemos observar en la figura 4.1, en que se aprecia que la longitud de onda óptima para la excitación del analito es 219 nm. Con esta longitud de onda de excitación y bajo las condiciones experimentales anteriormente reseñadas, se procedió a registrar el espectro de emisión efectuando un barrido entre 350 y 550 nm, con lo cual se obtuvo el espectro de emisión que podemos ver en la citada figura 4.1, donde también se han incluido los respectivos espectros del sensor sin equilibrar. En dicho espectro podemos observar que el máximo de longitud de onda de emisión se encuentra a 421 nm.

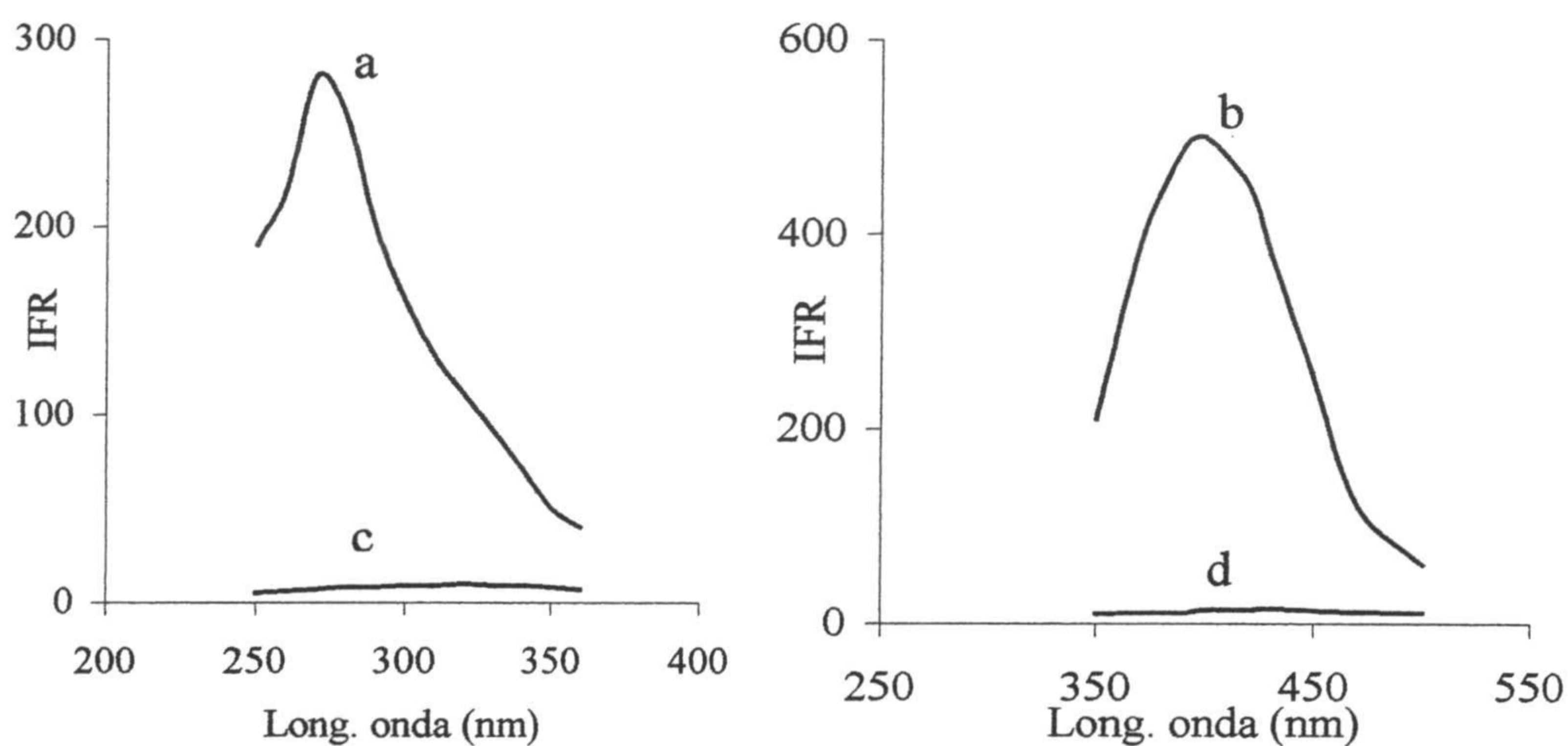


Figura 4.1. Espectros de excitación y emisión en fase sólida: (a,b) sensor con analito, (c,d) blanco.

4.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.

Como en los casos estudiados en capítulos precedentes, en este apartado vamos a estudiar la influencia que ejercen las diferentes variables experimentales sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el sensor tras la fijación del analito y para ello, vamos a considerar los mismos grupos de variables que se contemplaron en el capítulo segundo de esta Memoria.

Comenzaremos por optimizar los parámetros correspondientes a la construcción del sensor, proceso que, como es sabido, es necesario realizar para cada analito en particular dada su influencia en el proceso de fijación sobre la membrana sensora. La forma de proceder será la misma que en el caso anterior, es decir, fijando los valores de las variables experimentales, prepararemos diferentes sensores en los que lo único que varíe de uno a otro sea el valor de las variables en estudio. Junto con estos parámetros, en el proceso de fijación del analito, influyen los parámetros propios del proceso de fijación, relacionados con características físicas del proceso y, por último, estudiaremos y optimizaremos aquellos otros que influyen en el proceso de medida de la señal analítica.

4.2.1. Optimización de variables experimentales que afectan al sensor.

Para optimizar estas variables se efectuó un estudio sistemático de su influencia sobre la fosforescencia emitida por un sensor bajo las condiciones experimentales anteriores y a $\lambda_{em} = 421$ nm.

4.2.1.1 Elección del soporte sólido.

Para seleccionar el soporte de la zona sensora se probaron los tres tipos de material laminado y transparente a la radiación visible, que ya conocemos de casos

anteriores, es decir, acetato de polivinilo, metacrilato y poliéster, del que se cortaron tiras para utilizarlas como bases de la zona sensora. Se construyeron con ellas, varios sensores y se midió su fosforescencia antes y después de equilibrarlos con disoluciones de ácido piromídico de 0,1 mg/L.

Se seleccionó la lámina de poliéster (politereftalato de etileno), tipo Mylar de 0,25 mm de espesor como el material más adecuado, dado que la fosforescencia que emiten, antes de equilibrarlos con la disolución de analito, es prácticamente nula mientras que es máxima después de la fijación del ácido piromídico.

4.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.

Se probaron los siguientes componentes: poliuretano, acetato de polivinilo y cloruro de polivinilo como matriz y como plastificante, para el caso de los derivados del polivinilo: tributilfosfato, ftalato de dioctilo y bis(2-etilhexil)sebacato. Los disolventes utilizados fueron: tetrahidrofurano y mezclas etanol:agua en diferentes proporciones.

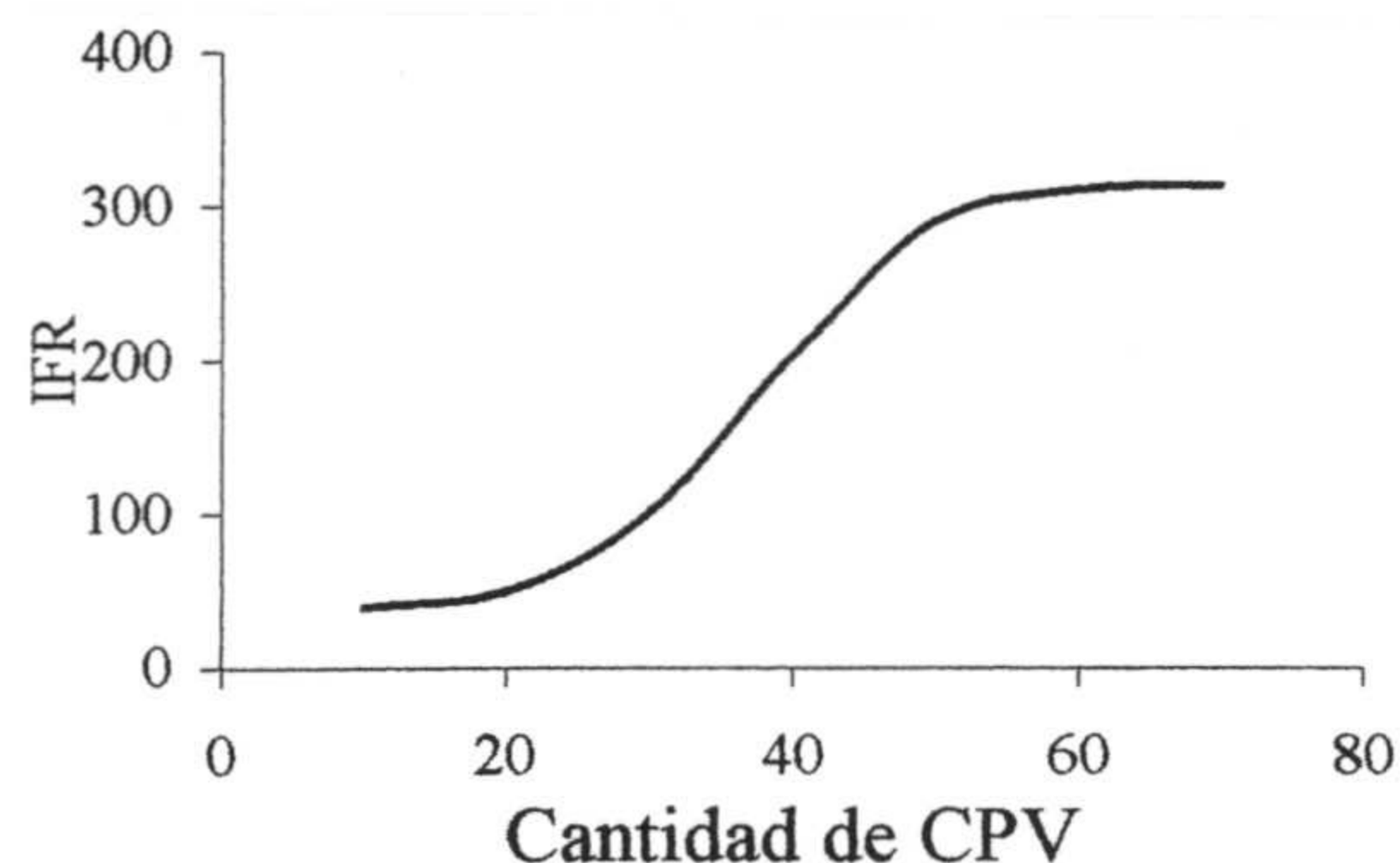
Después de fabricar diferentes sensores con las posibles combinaciones de componentes, se equilibraron con disoluciones de ácido piromídico de 0,1 mg/L de concentración y se midió su fosforescencia en las condiciones operatorias anteriormente indicadas, comprobándose que el sensor constituido por cloruro de polivinilo, tributilfosfato y tetrahidrofurano era el que emitía una mayor intensidad de fosforescencia.

4.2.1.3. Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.

Con objeto de establecer la influencia que pueda ejercer la cantidad de matriz plástica de cloruro de polivinilo sobre la fosforescencia emitida, se llevó a cabo

la siguiente experiencia: en diferentes viales de 5 mL de capacidad se colocaron, en cada uno de ellos y en este orden, 60 mg de tributilfosfato (TBF) y 0,6 mL de tetrahidrofurano (THF). Se añadieron cantidades crecientes (comprendidas entre 10 y 70 mg) de cloruro de polivinilo (CPV), se agitaron los viales durante unos minutos hasta homogeneizar las mezclas y se construyeron varios sensores con cada una de ellas, según el procedimiento descrito en el capítulo primero de esta Memoria.

Se midió su fosforescencia para utilizarla como medida del blanco analítico y seguidamente se equilibró cada sensor con su respectiva disolución de ácido piromídico de concentración 0,1 mg/L. La lectura de su fosforescencia nos proporciona los resultados que figuran en la tabla 4.1 y se representan en la figura 4.2.



CPV (mg)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
10	37	40	42	40,0	6,1
20	48	50	52	50,0	4,8
30	98	101	103	100,7	2,3
40	199	205	203	202,6	1,6
50	293	282	289	288,8	1,5
60	310	304	315	310,1	1,9
70	312	309	315	312,8	1,0

Figura 4.2. Representación gráfica de la intensidad de fosforescencia en función de la cantidad de CPV agregado al sensor.

Tabla 4.1. Intensidad de fosforescencia relativa en función de la cantidad de CPV. IFRM es la intensidad de fluorescencia relativa media y DER es la desviación relativa estándar.

De los resultados experimentales se puede estimar que 60 mg es la cantidad óptima de cloruro de polivinilo para construir el sensor sobre el que se ha de fijar el ácido piromídico, en cuyo caso la intensidad emitida es al menos un 7 % superior a los restantes.

4.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.

Para ello se prepararon varios sensores con 60 mg de CPV, las restantes variables como en la experiencia anterior y un volumen de tributilfosfato variable entre 0,1 y 1,0 mL.

Los resultados obtenidos son los que vemos en la tabla 4.2 y se representan en la figura 4.3. Como podemos apreciar, la intensidad de fosforescencia desarrollada aumenta sensiblemente a medida que se incrementa la cantidad de plastificante (tributilfosfato) que adicionamos a la mezcla inicial de componentes, hasta que alcanzamos un valor comprendido entre 0,5 y 0,6 mL, a partir del cual dicha señal se mantiene constante. Por ello hemos elegido un volumen de 0,6 mL de tributilfosfato como el más adecuado para el desarrollo de fosforescencia.

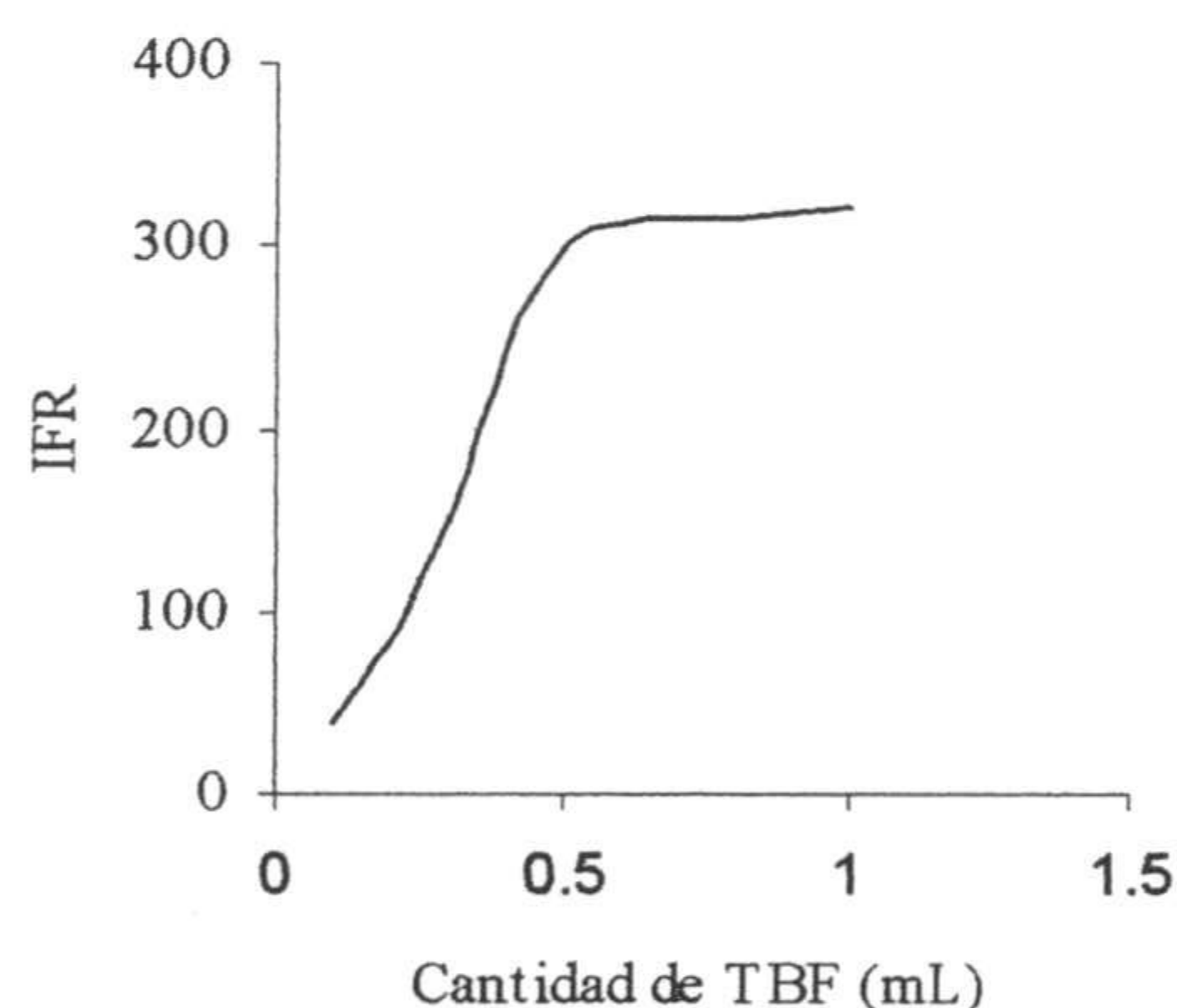


Figura 4.3. Influencia del volumen de tributilfosfato sobre la intensidad de fosforescencia relativa del ácido piromídico.

TBF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,1	40	42	36	39,4	7,7
0,2	81	85	78	81,0	4,3
0,3	151	158	149	152,7	3,0
0,4	241	253	242	244,9	2,7
0,5	291	306	294	296,9	2,6
0,6	311	312	314	312,1	0,5
0,7	313	314	315	314,0	0,5
0,8	315	316	318	316,4	0,5
0,9	318	319	321	319,3	0,5
1,0	319	321	322	320,7	0,5

Tabla 4.2. Valores de la intensidad de fosforescencia relativa, en función de la cantidad de tributilfosfato.

4.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.

Por último procedimos a la optimización de la cantidad de disolvente y para

ello, operando en las condiciones indicadas, preparamos varios sensores en los que la cantidad de tetrahidrofurano variaba entre 0,5 y 3,0 mL mientras se mantenían constantes las restantes variables.

Tras preparar los sensores y efectuar las medidas oportunas se obtuvieron los datos experimentales que se incluyen en la tabla 4.3 y se representan en la figura 4.4. Como podemos apreciar en la figura 4.4, el volumen óptimo para el desarrollo de la fosforescencia es 2,0 mL, valor que será empleado en lo sucesivo para la construcción de los sensores.

Las tres experiencias anteriores nos permiten establecer los siguientes valores óptimos de los componentes necesarios para la fabricación de la membrana sensora: cantidad de cloruro de polivinilo (CPV) 60 mg, volumen de plastificante (TBF) 0,6 mL y volumen de disolvente 2,0 mL.

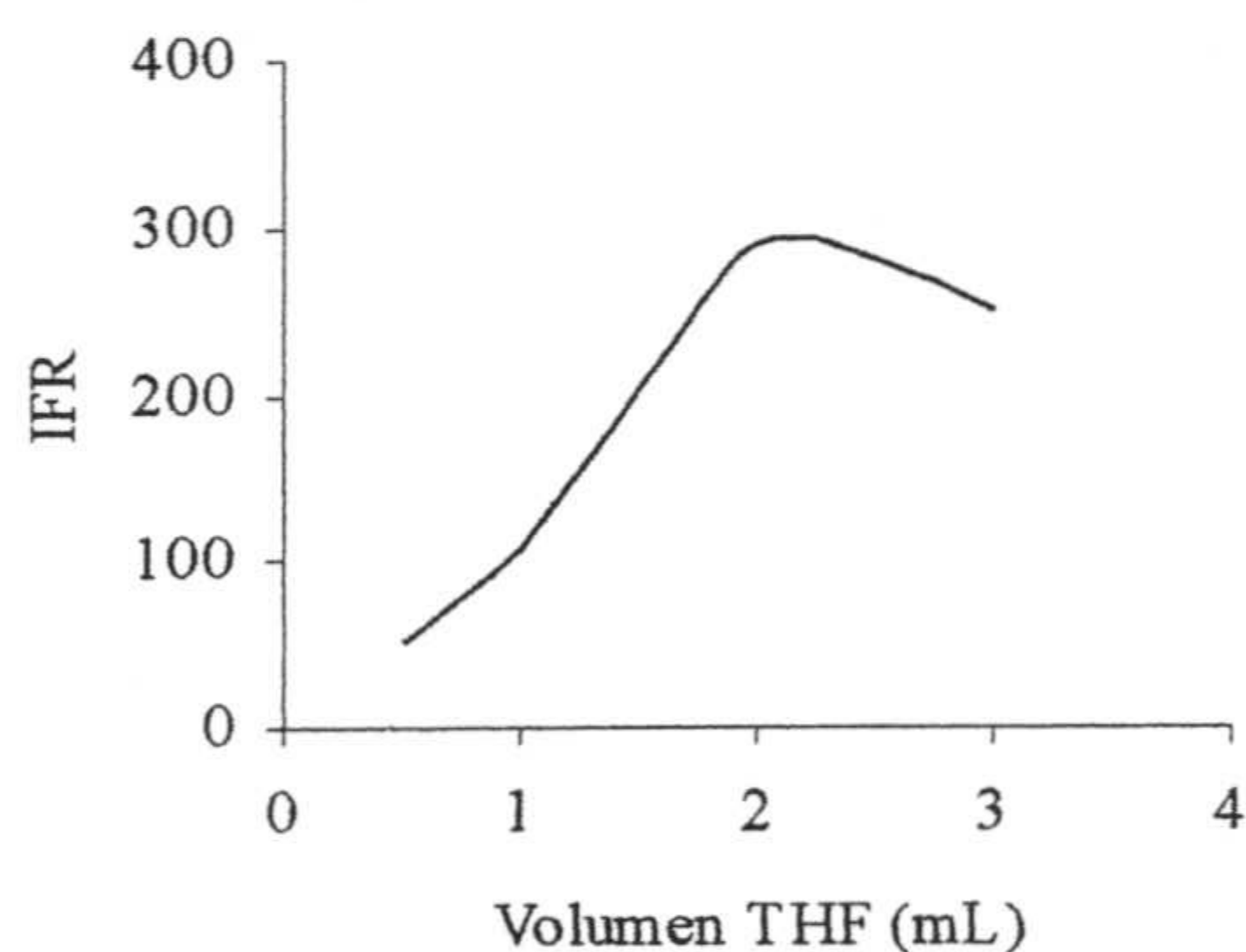


Figura 4.4. Influencia del volumen disolvente THF sobre la fosforescencia emitida por el ácido piromídico.

THF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,5	48	53	54	51,7	6,3
1,0	100	104	114	106,0	6,6
1,5	200	205	209	204,9	2,2
2,0	295	290	286	290,4	1,6
2,5	281	284	280	281,6	0,8
3,0	251	255	250	251,6	1,6

Tabla 4.3. Valores de la intensidad de fosforescencia relativa en función del volumen de disolvente añadido.

4.2.1.6. Optimización del volumen de disolución de componentes

Para estudiar la influencia que pudiera ejercer el volumen de mezcla de componentes sobre la intensidad de fosforescencia del sensor, se construyeron varios

sensores depositando diferentes volúmenes de mezcla, comprendidos entre 2 y 12 μL que se equilibraron con disoluciones de ácido piromídico de 0,1 mg/L de concentración. Los resultados experimentales conseguidos al medir la fosforescencia emitida por los citados sensores se han representado en la figura 4.5 y se incluyen en la tabla 4.4. en la que podemos apreciar que volúmenes de gota comprendidos entre 2 y 5 μL producen una intensidad de fosforescencia prácticamente igual en todos los casos, mientras que a partir de un volumen de 5 μL la intensidad de fosforescencia relativa disminuye paulatinamente a medida que aumenta el volumen. Por ello hemos seleccionado un volumen de 5 μL como el más adecuado.

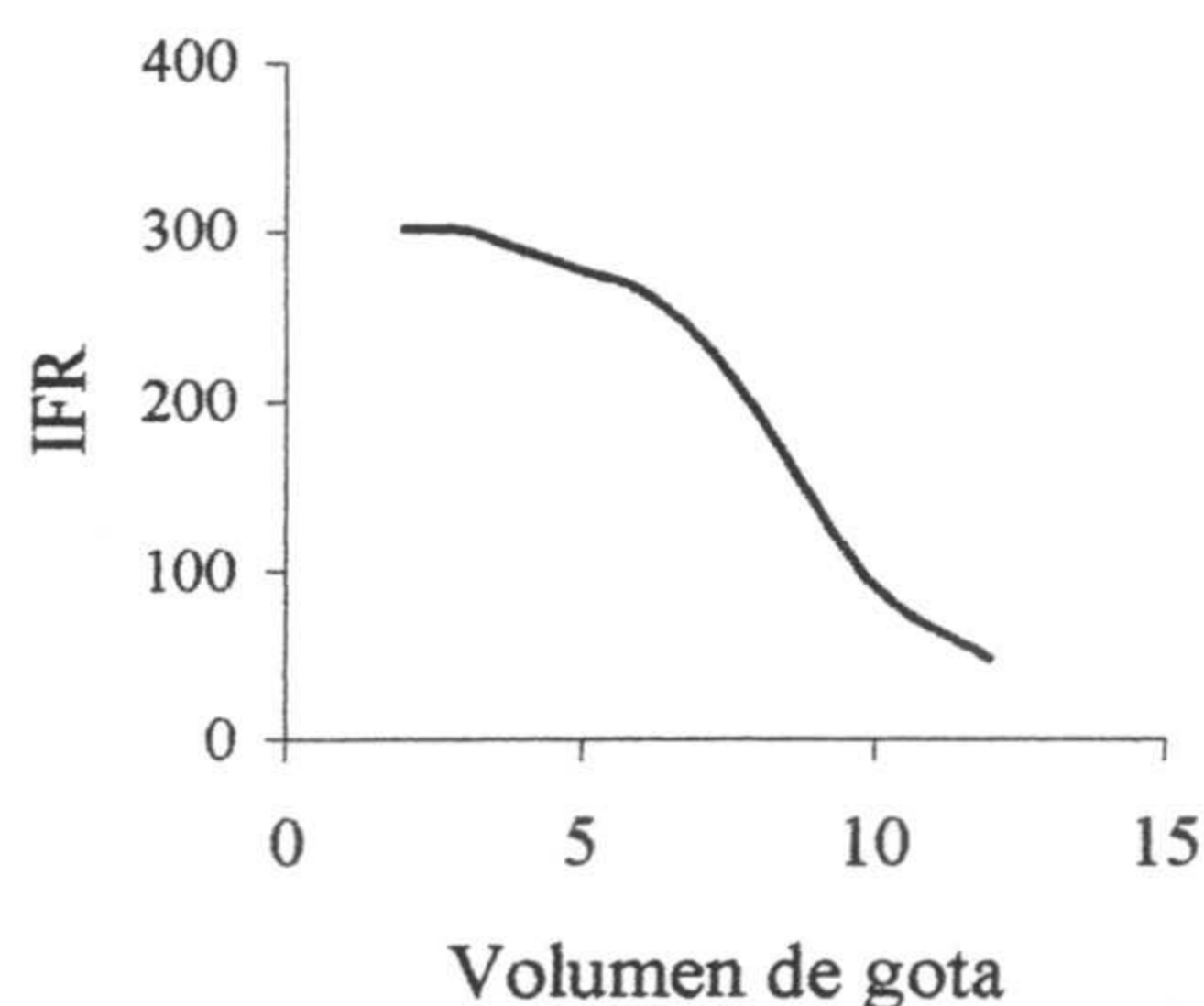


Figura 4.5. Influencia del volumen de gota de componentes al formar el sensor, sobre la fosforescencia emitida.

V (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
2,0	302	305	300	302,3	0,8
3,0	300	305	295	301,7	0,9
4,0	290	295	284	289,7	1,9
5,0	285	270	276	277,0	2,7
6,0	270	265	260	265,0	1,9
7,0	260	250	251	253,6	2,2
8,0	191	188	49	192,7	2,2
10,0	89	92	94	91,7	1,9
12,0	45	51	199	48,3	2,7

Tabla 4.4. Valores del volumen de gota de componentes sobre la fosforescencia emitida.

4.2.1.7 Influencia del orden de adición de los reactivos.

Probados todos los posibles modos de adicionar los tres componentes que forman la mezcla para obtener la membrana sensora, se comprobó que sólo en el caso de adicionar los reactivos en el orden: CPV + TBF + THF, se obtenían mem-

branas con las características ópticas adecuadas para su utilización como sensores.

4.2.1.8. Influencia de la forma y del tiempo de secado de la membrana sensora.

La influencia del tiempo y forma de secado sobre la fosforescencia se estudió utilizando disoluciones patrón de 0,1 mg/L de analito. Se probaron sensores que habían sido secados durante tiempos diferentes, comprendidos entre 10 minutos y una hora, dejando secar la gota al aire libre en una serie de ellos mientras que otra serie se secó en desecador a vacío (bajo una presión de unos 15 mm de Hg) y una última serie se secó calentando con una corriente de aire seco y caliente.

En este último caso los sensores obtenidos no eran totalmente transparentes y tuvieron que ser desechados y en los otros dos casos se obtuvieron sensores ópticamente útiles para nuestros propósitos aunque utilizando el desecador a vacío el proceso se completa en 20 minutos, mientras que a presión ambiental se necesitan 60 minutos para conseguir el secado total. Por lo tanto, se eligió esta última opción de secar el sensor a temperatura ambiente y a vacío, como la forma más adecuada para la preparación del sensor.

Los sensores obtenidos de esta forma son membranas sólidas circulares, adheridas a la superficie del soporte sólido, transparentes y homogéneas de 20 μm de espesor.

4.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.

Bajo este epígrafe vamos a estudiar los siguientes parámetros instrumentales: anchura de las rendijas (excitación y emisión), tiempo de retraso entre el pulso de la lámpara y la apertura del fotodetector (t_d) y tiempo durante el cual el fotodetec-

tor efectua una medida por permanecer abierto (t_g). Para efectuar este estudio se han utilizado las longitudes de onda óptimas seleccionadas a partir de los espectros de excitación y emisión, así como disoluciones de analito de 0,1 mg/L.

4.2.2.1. *Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.*

Para establecer la influencia de estos dos parámetros, tras la preparación de la respectiva muestra patrón, se efectuó la medida de su señal analítica bajo las siguientes condiciones: $t_g = 10$ ms, $t_d = 0,1$ ms y rendija de emisión de 5 nm variando la rendija de excitación entre 2,5 y 15,0 nm. Experimentalmente se comprueba que al aumentar el ancho de la rendija de excitación por encima de 3 nm, la intensidad de la fosforescencia emitida disminuye, fijándose este valor como óptimo para efectuar la medida.

Para el estudio de la influencia de la rendija de emisión, manteniendo los valores de t_g y t_d y con una rendija de excitación de 3 nm se midió la fosforescencia emitida al variar la anchura de la rendija de emisión entre 2,5 y 15,0 nm, observándose que a medida que aumenta el ancho de rendija, también lo hace la intensidad de fosforescencia medida, razón por la cual se adoptó el valor de 15 nm como óptimo para este parámetro experimental.

4.2.2.2. *Optimización de los tiempos t_g y t_d .*

Para optimizar los tiempos de retraso entre la terminación del pulso de la lámpara de excitación y el comienzo de la medida de la fosforescencia, así como el tiempo de apertura del fotodetector, para efectuar la medida de la fosforescencia emitida tras un pulso de la lámpara, se procedió de la siguiente forma: en primer lugar, con unas rendijas de excitación y emisión de 3 y 15 nm, respectivamente, y

manteniendo un tiempo t_g constante de 10 ms, se midió la fosforescencia emitida por la muestra a diferentes tiempos de retraso t_d comprendidos entre 0,05 y 0,5 ms. Se pudo comprobar que el tiempo óptimo para efectuar la medida era $t_d = 0,15$ ms. Por lo tanto, fijando este tiempo como parámetro invariable se procedió a determinar el tiempo óptimo de apertura del detector. Para ello se fijaron las anteriores variables en los valores optimizados y se midió la fosforescencia emitida por el sensor para tiempos de apertura comprendidos entre 2 y 11 ms. Un tiempo $t_g = 10$ ms resultó ser el más adecuado para la medida de la fosforescencia emitida ya que su intensidad era máxima para este valor.

En consecuencia, como resumen de los resultados obtenidos en estas experiencias, podemos decir que las condiciones instrumentales óptimas para la medida de la fosforescencia emitida por este analito, son las siguientes: ancho de rendija de excitación 3 nm; anchura de la rendija de emisión 15 nm; tiempo de retraso (t_d) 0,15 ms y tiempo de apertura del detector (t_g) 10 ms. Valores todos ellos que serán usados como óptimos en sucesivas experiencias.

4.2.3. Influencia de los parámetros que dependen del proceso de fijación.

Puesto que las moléculas de analito presentan fosforescencia intrínseca pueden emitir radiación fosforescente si se dan las circunstancias apropiadas, como es el caso de que sean absorbidas en la matriz sólida del sensor.

Este proceso de fijación del analito sobre la membrana está regido por una serie de variables de las cuales las más influyentes son:

1. El tiempo de penetración de las moléculas en la membrana o tiempo de fijación.
 2. Modo y velocidad de agitación de la muestra durante dicho tiempo.
-

3. Modo y tiempo de secado de la superficie sensora tras el proceso de fijación.

La optimización de estos tres parámetros es importante si queremos evitar el proceso de desactivación sin radiación.

4.2.3.1. Optimización del tiempo de fijación.

Para determinar la influencia del tiempo de fijación del analito sobre el sensor, procedimos de la siguiente forma: se prepararon una serie de sensores de la forma conocida, utilizando una disolución de ácido piromídico de 0,1 mg/L de concentración y efectuando la agitación durante diferentes intervalos de tiempo, comprendidos entre 5 minutos y dos horas. La disolución se agitó mediante un agitador magnético al que se le colocó una velocidad de 30 revoluciones por minuto. Los sensores se secaron a vacío y se midió su fosforescencia en las condiciones instrumentales indicadas en el apartado anterior.

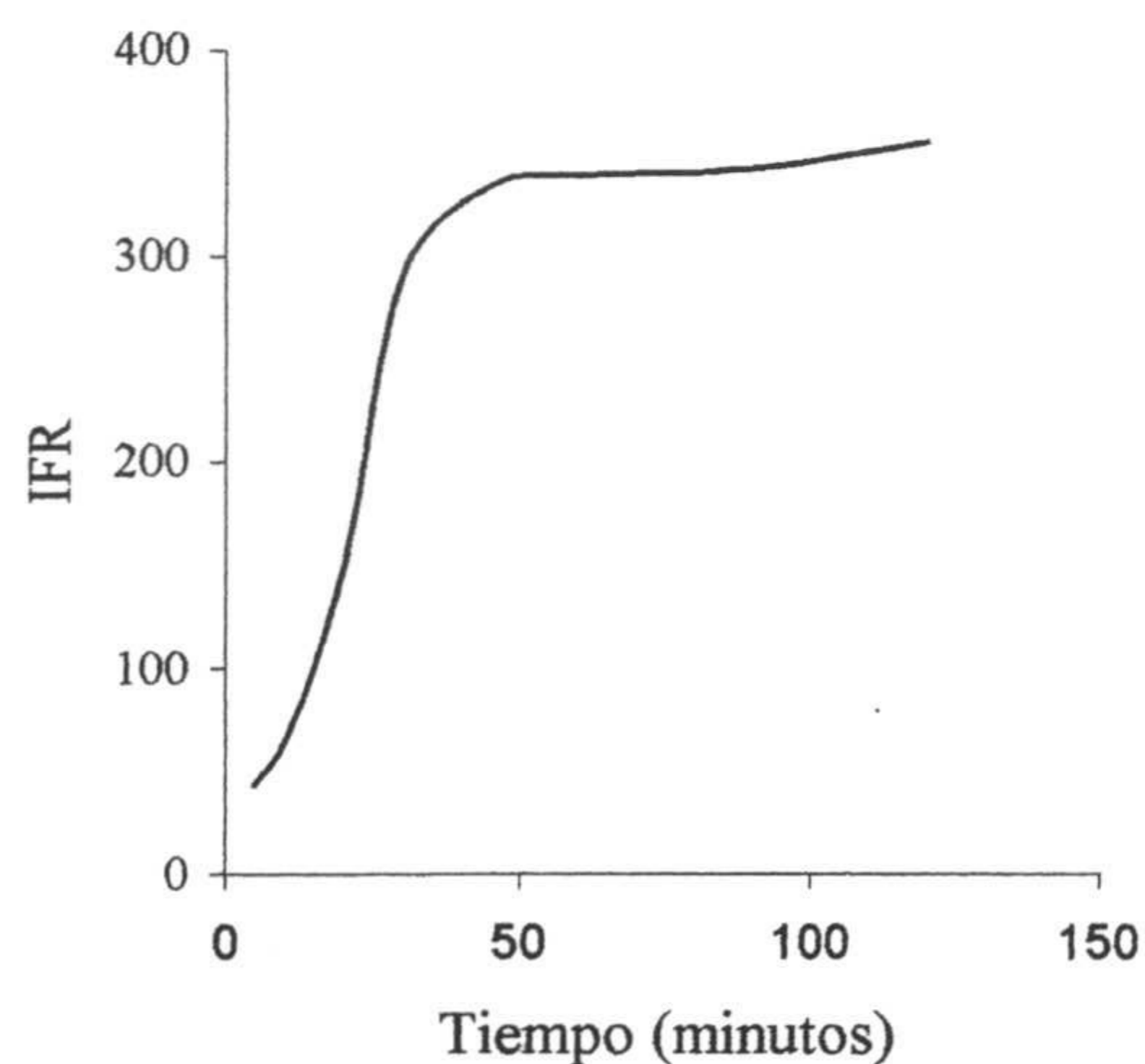


Figura 4.6. Influencia del tiempo de fijación sobre la intensidad de fosforescencia.

Tiempo	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
5 min	45	40	44	43,1	6,8
10 min	65	59	64	62,7	4,6
20 min	151	144	147	147,2	2,3
30 min	296	287	288	290,3	1,6
45 min	332	331	341	334,8	1,5
60 min	336	345	336	339,4	1,5
90 min	339	349	340	342,8	1,5
120 min	361	361	352	354,7	1,4

Tabla 4.5. Valores experimentales de la intensidad de fosforescencia en función del tiempo de fijación.

Los resultados experimentales obtenidos son los que se incluyen en la tabla 4.5 donde podemos apreciar como la intensidad de fosforescencia relativa depende de

dos variables que están relacionadas entre sí: el tiempo de equilibrio del sensor con la disolución y la concentración de analito. De la figura 4.6, se deduce la cantidad de analito que se fija sobre la membrana depende del tiempo en el que la disolución se equilibra con el sensor.

4.2.3.2. Influencia de la forma y velocidad de agitación.

Se probaron diferentes formas de colocar el sensor dentro de la disolución de muestra, mientras esta era agitada a una velocidad constante de 30 rpm. Pudimos comprobar que, como en casos anteriores, colocando la superficie sensora de frente al flujo de circulación, la fosforescencia desarrollada era un 70 % superior a la que se desarrolla cuando el sensor esta colocado paralelo a dicha corriente y casi un 100% superior al caso en el que se colocó el sensor en contra de la corriente de circulación en cuyo caso la fosforescencia desarrollada era prácticamente nula.

Por tanto, colocando varios sensores en la forma adecuada se equilibraron con disoluciones de ácido piromídico de concentración 0,1 mg/L, durante un tiempo de 60 minutos con velocidades de agitación comprendidas entre 30 y 90 rpm. Los resultados obtenidos demuestran que la velocidad de 30 rpm es la más adecuada para que se desarrolle una mayor intensidad de fosforescencia ya que, en este caso, la señal medida es, al menos, un 7% superior a los demás casos.

4.2.4. Optimización de las variables dependientes de la muestra.

Las variables que vamos a estudiar en este apartado son las siguientes: naturaleza y cantidad de átomo pesado, pH de la disolución y fuerza iónica del medio.

4.2.4.1. *Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.*

Como es sabido, la presencia de un átomo pesado ejerce una influencia, a veces decisiva, sobre la fosforescencia emitida por una determinada especie. Para estudiar esta posible influencia hemos ensayado, como átomo pesado, las siguientes especies: nitratos de Pb(II), Ag(I), Tl(I) y Hg(II), plomotetraetilo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_4$ y los halogenuros Cl^- , Br^- y I^- . Todos ellos, excepto el plomotetraetilo que se incorporó directamente en el sensor, se ensayaron incorporando la especie química a la disolución de muestra antes de la fijación del analito. En ningún caso se observó un incremento apreciable de la fosforescencia emitida observándose, en determinados casos, un ligero descenso de la misma. Por ello no se utilizó átomo pesado en sucesivas experiencias.

4.2.4.2. *Influencia del pH del medio.*

La influencia del pH de la disolución durante el proceso de fijación del analito sobre el sensor se llevó a cabo con disoluciones patrón de 0,1 mg/L a las que le pusimos diferentes valores de pH comprendidos entre 1 y 12 que se ajustaron mediante disoluciones de NaOH y HCl de diferentes concentraciones, los valores experimentales obtenidos son los que figuran en la tabla 4.6 y se representan en la figura 4.7.

Como podemos apreciar en la figura 4.7 la intensidad de fosforescencia permanece prácticamente constante para valores de pH comprendidos entre 2 y 5, decrece bruscamente entre 6 y 8 y continua decreciendo, aunque de forma más suave, para valores de pH superiores a 8, la brusca caída de la fosforescencia entre 6 y 8 la podemos atribuir a la desprotonación del grupo ácido del compuesto y la caída lenta que experimenta a valores de pH superiores a 8, podemos atribuirle

a que el carácter polar que adquiere la molécula de analito al desprotonarse le impide la penetración en la membrana, que presenta un marcado carácter apolar, en consecuencia seleccionamos como pH óptimo el valor de 3,0 utilizando para su ajuste pequeños volúmenes de disolución de HCl 0,1 M.

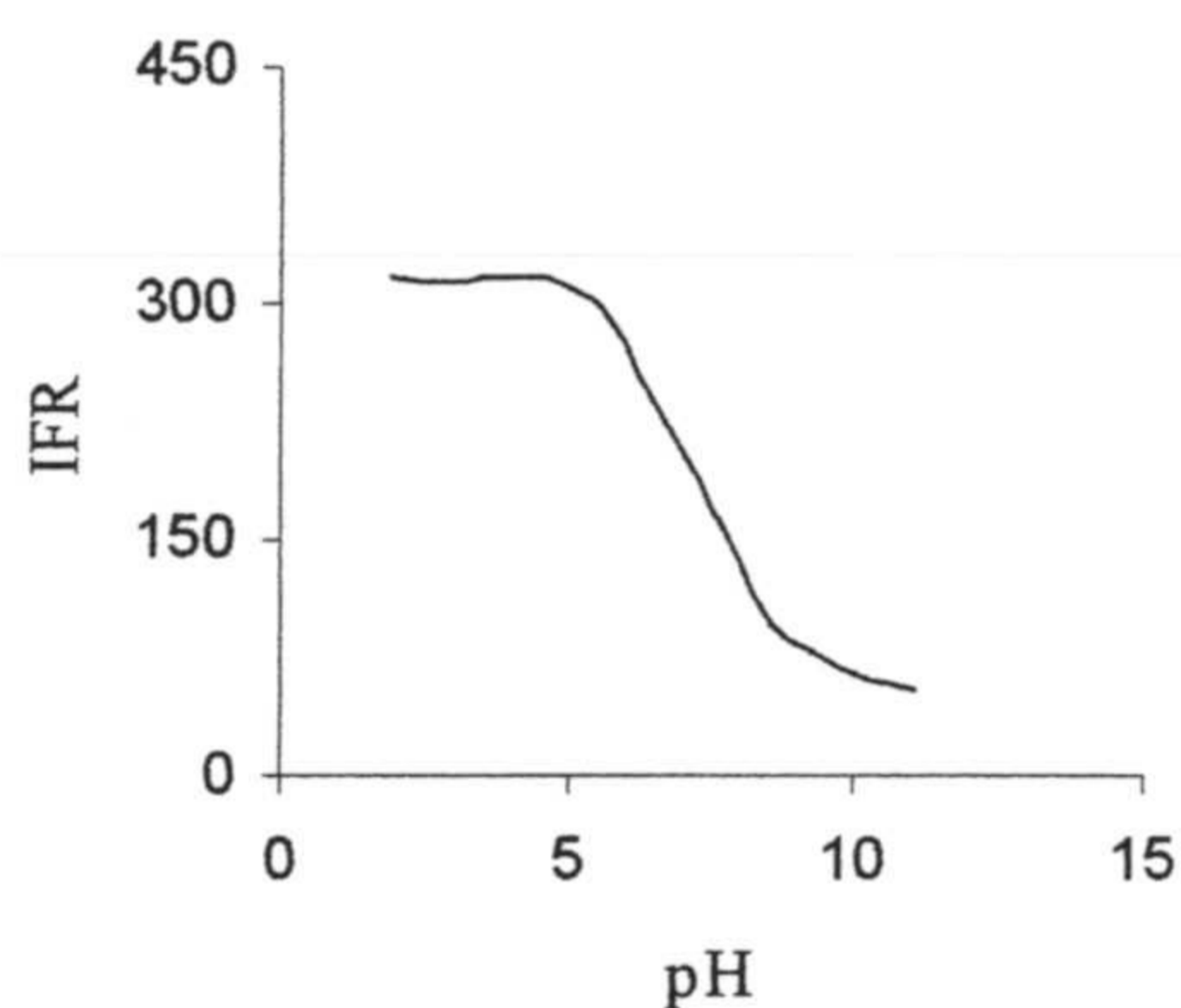


Figura 4.7. Influencia del pH de la disolución sobre la intensidad de fosforescencia

pH	IFR	pH	IFR
2,0	316	7,7	157
2,5	314	8,6	97
3,1	316	9,3	78
4,1	316	10,3	63
5,0	311	11,1	53
5,8	286		

Tabla 4.6. Valores de la intensidad de fosforescencia en función del pH de la disolución.

4.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica.

Para comprobar la influencia que pudiera ejercer la fuerza iónica de la disolución de muestra sobre la intensidad de fosforescencia emitida, hemos empleado cloruro sódico como electrolito, con el que hemos preparado disoluciones de concentración creciente en dicha sal que comprenden desde 0,1 hasta 1,8 M, siendo 0,1 mg/L la concentración de analito. Los resultados experimentales los podemos ver en la tabla 4.7 y en la figura 4.8 que es la representación gráfica de los citados datos.

Como podemos observar en la figura 4.8 a medida que aumenta la fuerza iónica del medio entre 0,1 y 0,5 M de NaCl, la intensidad de fosforescencia emitida sufre un descenso de un 20 %.

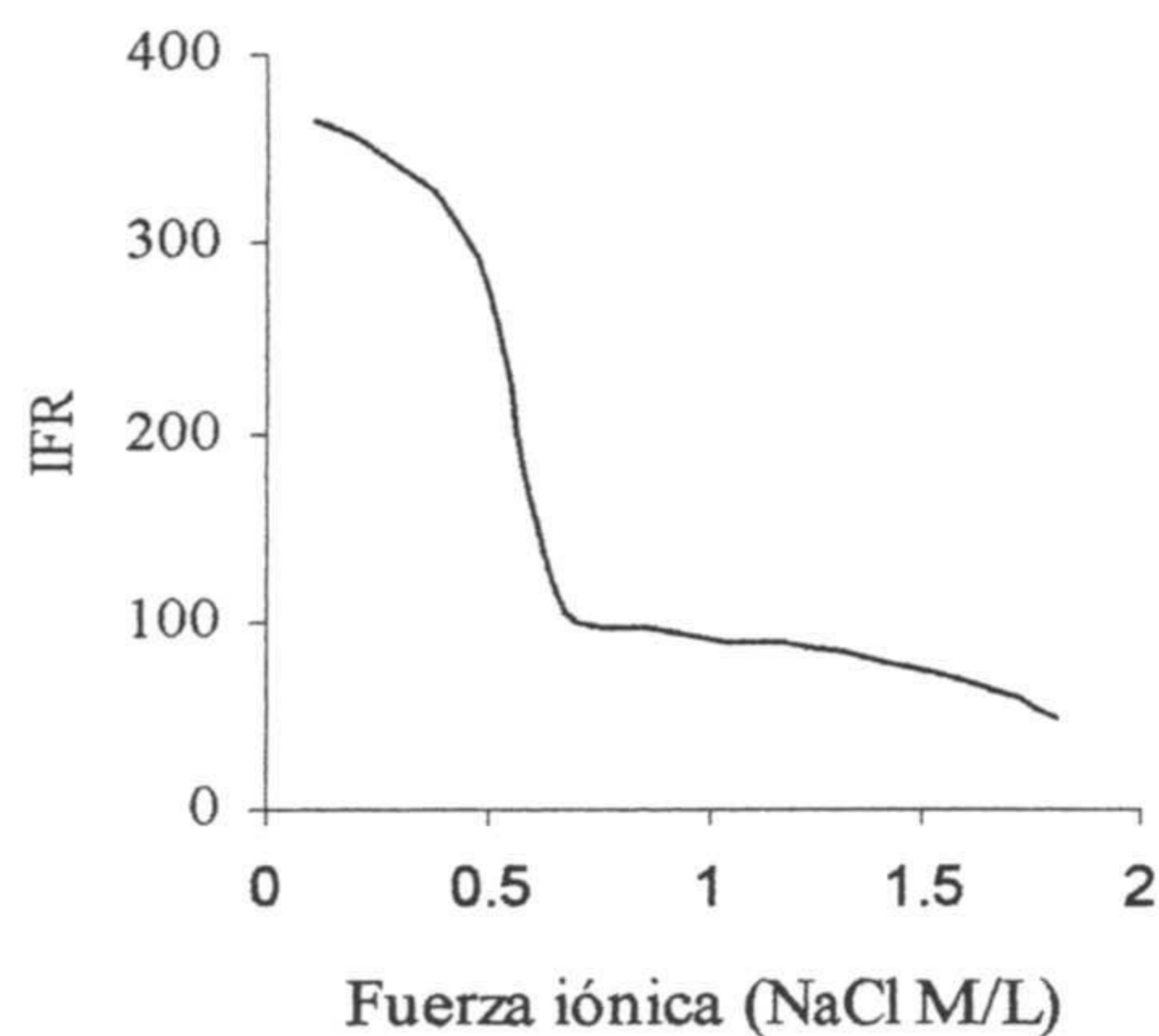


Tabla 4.8. Influencia de la fuerza iónica del medio sobre la intensidad de fosforescencia

NaCl (M)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,108	370	361	361	364,1	1,5
0,284	349	341	340	343,1	1,5
0,474	297	290	289	291,9	1,9
0,664	113	111	107	110,2	2,9
0,854	92	100	96	96,1	3,8
1,042	92	90	86	89,7	3,5
1,232	89	87	83	86,4	3,6
1,612	71	69	65	68,3	4,4
1,802	49	48	44	47,2	6,2

Tabla 4.7. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la fuerza iónica del medio.

A partir de una concentración de NaCl superior a 0,5 M la intensidad de fosforescencia sufre un brusco descenso hasta quedar en un valor del 28 % del inicial, manteniéndose prácticamente constante hasta alcanzar una molaridad de NaCl de 1,5 en cuyo caso dicha intensidad de fosforescencia queda reducida al 20% de su valor inicial.

En consecuencia, podemos decir que una concentración salina inferior a 0,2 M no afecta a la medida pero si es superior a dicho valor hemos de tener en cuenta la fuerza iónica del medio al aplicar el método a muestras reales.

4.2.5 Influencia del uso de atmósfera de N₂ durante la medida.

Como se ha indicado en los capítulos precedentes, la presencia de humedad o de oxígeno durante el proceso de medida, produce un descenso de la señal de fosforescencia emitida por el analito o incluso puede terminar en su total extinción. Por ello, siguiendo el procedimiento experimental descrito en capítulos anterior-

res, hemos efectuado un estudio de dicha influencia utilizando el dispositivo que describimos en el capítulo primero y sensores equilibrados con disoluciones de ácido piromídico de 0,1 mg/L de concentración. Los resultados experimentales demuestran claramente la necesidad de la corriente de nitrógeno para llevar a cabo las medidas ya que, en ausencia de dicha corriente, la fosforescencia llega a disminuir más del 90 % de su valor inicial, tomando como referencia el valor que presenta en presencia de nitrógeno.

4.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Finalizada la optimización de las variables experimentales que afectan al proceso fosforescente, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio para la preparación de la muestra y medida de la señal analítica: utilizando una disolución de HCl se ajusta el pH de la muestra a un valor de 3,0, se toman 50 ml de la muestra y se colocan en un vaso de precipitado de 100 ml de capacidad, introduciendo a continuación el sensor, colgado de un soporte sólido y orientado de forma que el flujo de corriente, cuando se agite la disolución, incida de frente sobre la membrana sensora, que deberá estar colocada próxima a la pared del vaso, para evitar las turbulencias que se forman en el centro del mismo como consecuencia de la agitación.

Con el sensor en el interior de la disolución, se agita esta durante 45 minutos a una velocidad de 30 rpm. Terminada la operación se saca el sensor y se coloca en un desecador a vacío durante 20 minutos a una presión de 15 mm de Hg. Cuando el sensor se encuentra seco se coloca en el dispositivo descrito anteriormente y se procede a la medida de la intensidad de fosforescencia a $t_g = 10$ ms, $t_d = 0,15$ ms, $\lambda_{exc} = 219$ nm y $\lambda_{em} = 421$ nm.

4.4 PROCESO DE CALIBRACIÓN.

Como hemos indicado en capítulos precedentes, el proceso de fijación del analito sobre el sensor se puede considerar como un proceso de extracción sólido-líquido en el que la cantidad de analito retenido en el sensor es función de dos variables, la concentración de analito (C) y el tiempo de equilibrado (t). Por consiguiente, para optimizar el rendimiento del proceso de fijación del analito hemos de tener en cuenta el tiempo durante el cual se realiza dicha fijación, lo cual nos lleva a establecer diferentes curvas de calibrado, realizadas a diferentes tiempos de fijación.

4.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.

Para establecer la relación existente entre señal analítica y concentración de analito, se realizó la siguiente experiencia: en matraces aforados de 50 mL de capacidad se prepararon disoluciones patrón de ácido piromídico de concentraciones crecientes comprendidas entre 0,01 y 0,3 mg/L y, tras ajustar el pH y llevar a cabo la fijación del analito sobre los sensores, para un tiempo de agitación de 60 min, se midieron sus respectivas intensidades de fosforescencia en las condiciones operatorias ya conocidas. Los resultados obtenidos experimentalmente son los que se incluyen en la tabla 4.8 y se representan en la figura 4.9. Como podemos apreciar en esta figura, la curva de calibrado presenta una zona inicial comprendida entre el inicio de la curva y un valor de concentración de 0,2 mg/L en la que existe linealidad entre señal analítica y concentración, mientras que a partir de una concentración de 0,2 mg/L se produce un desvío de la linealidad ya que la intensidad de fosforescencia medida es más del 5% inferior a la intensidad de fosforescencia que correspondería teóricamente si aplicamos la recta de calibrado.

Curva de calibrado para un tiempo de fijación de 15 minutos.

Siguiendo el procedimiento establecido y con un tiempo de equilibración del sensor con la muestra de 15 minutos, obtuvimos los resultados que figuran en la tabla 4.8 y hemos representado en la gráfica 4.9.

Utilizando el método de mínimos cuadrados para el ajuste lineal de los datos de tabla 4.8, obtenemos la ecuación de la recta siguiente:

$$\text{IFR} = 304,2 C + 65$$

que tiene un coeficiente $r^2 = 0,8276$ que, como podemos apreciar, nos indica claramente el mal ajuste existente entre los valores de ambas magnitudes, debido al deficiente proceso de fijación del analito causado por el corto intervalo de tiempo en el que se efectúa la fijación.

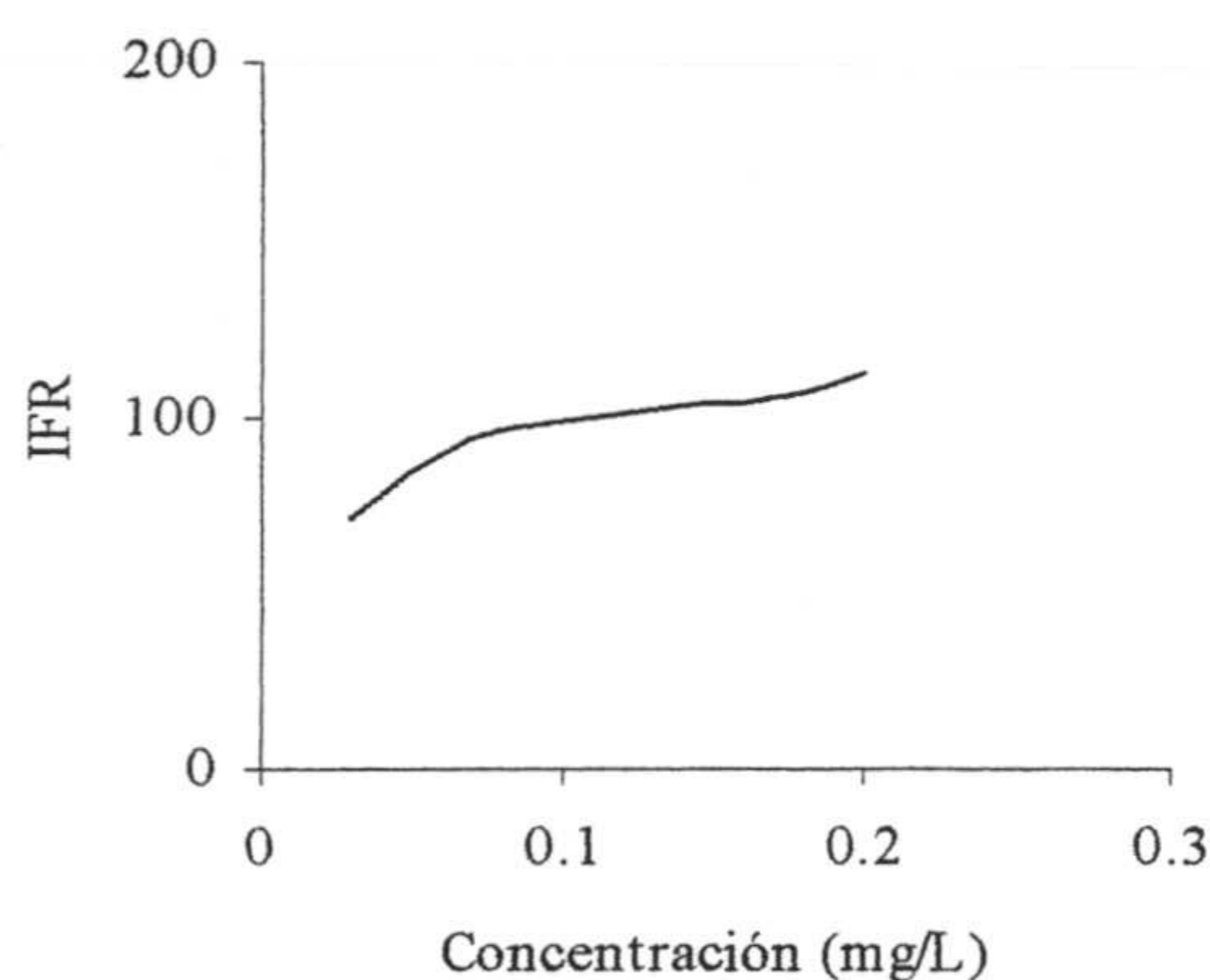


Figura 4.9. Recta de calibrado del ácido piromídico para un tiempo de fijación de 15 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,03	73	70	69	70,7	3,0
0,07	97	90	93	93,3	3,8
0,12	99	101	103	101	2,0
0,17	103	106	105	104,7	1,5
0,2	128	120	125	124,3	3,4

Tabla 4.8. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración para un tiempo de equilibrado de 15 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de fijación de 30 minutos.

En el caso de emplear un tiempo de equilibración de 30 minutos para obtener la curva de calibrado, los resultados experimentales que se obtuvieron son los que

figuran en la tabla 4.9 y se representan en la gráfica 4.10.

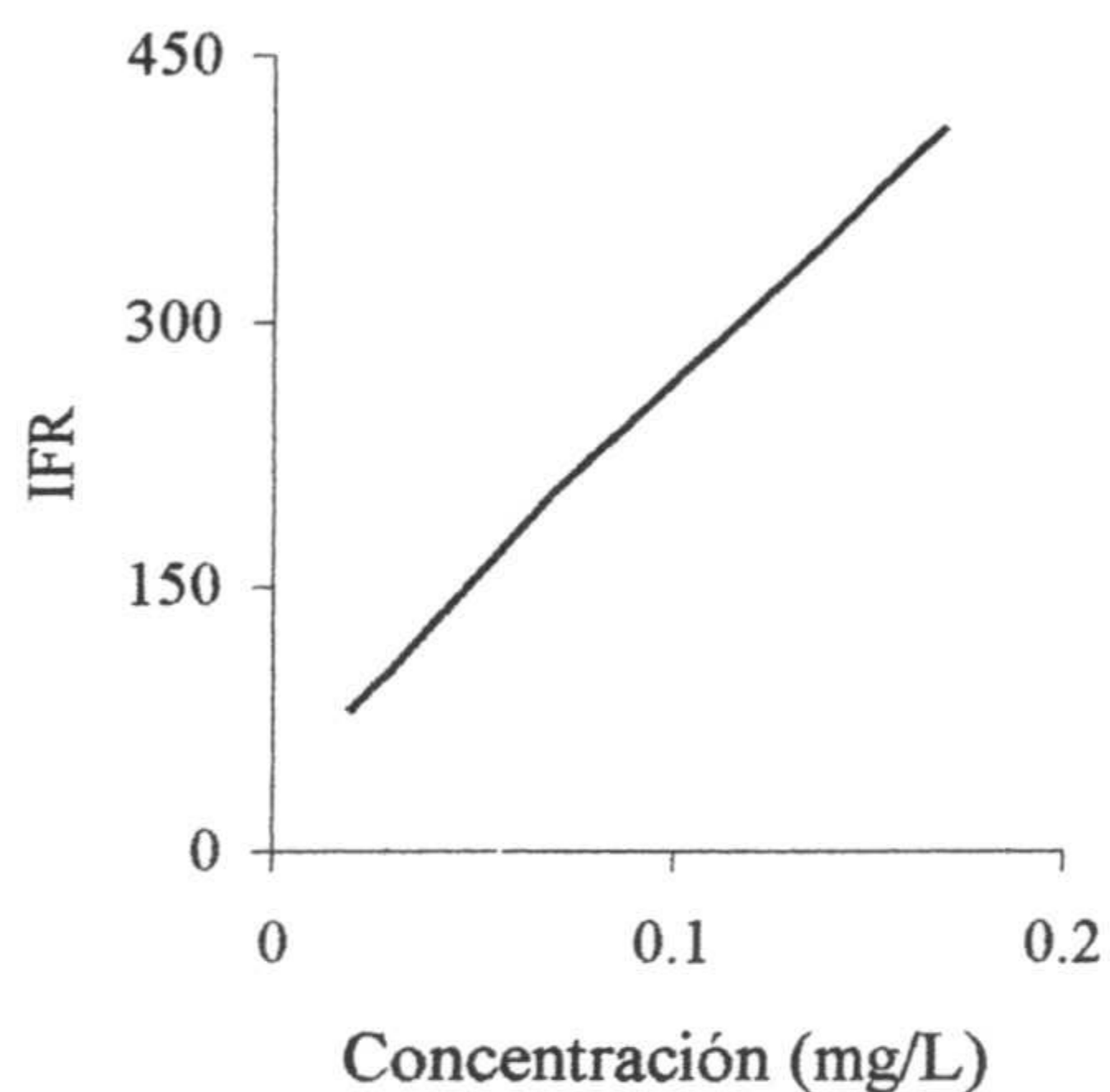


Figura 4.10. Curva de calibrado para un tiempo de equilibrado del sensor de 30 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,02	85	88	82	85,0	3,5
0,03	102	105	98	101,7	3,5
0,07	204	210	200	204,7	2,5
0,12	308	312	301	307,0	1,8
0,17	405	398	421	408,0	2,9

Tabla 4.9. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito para un tiempo de fijación de 30 minutos.

La ecuación de la recta de calibrado para un tiempo de 30 minutos de fijación del analito sobre el sensor es la que sigue:

$$\text{IFR} = 2148,75 C + 42$$

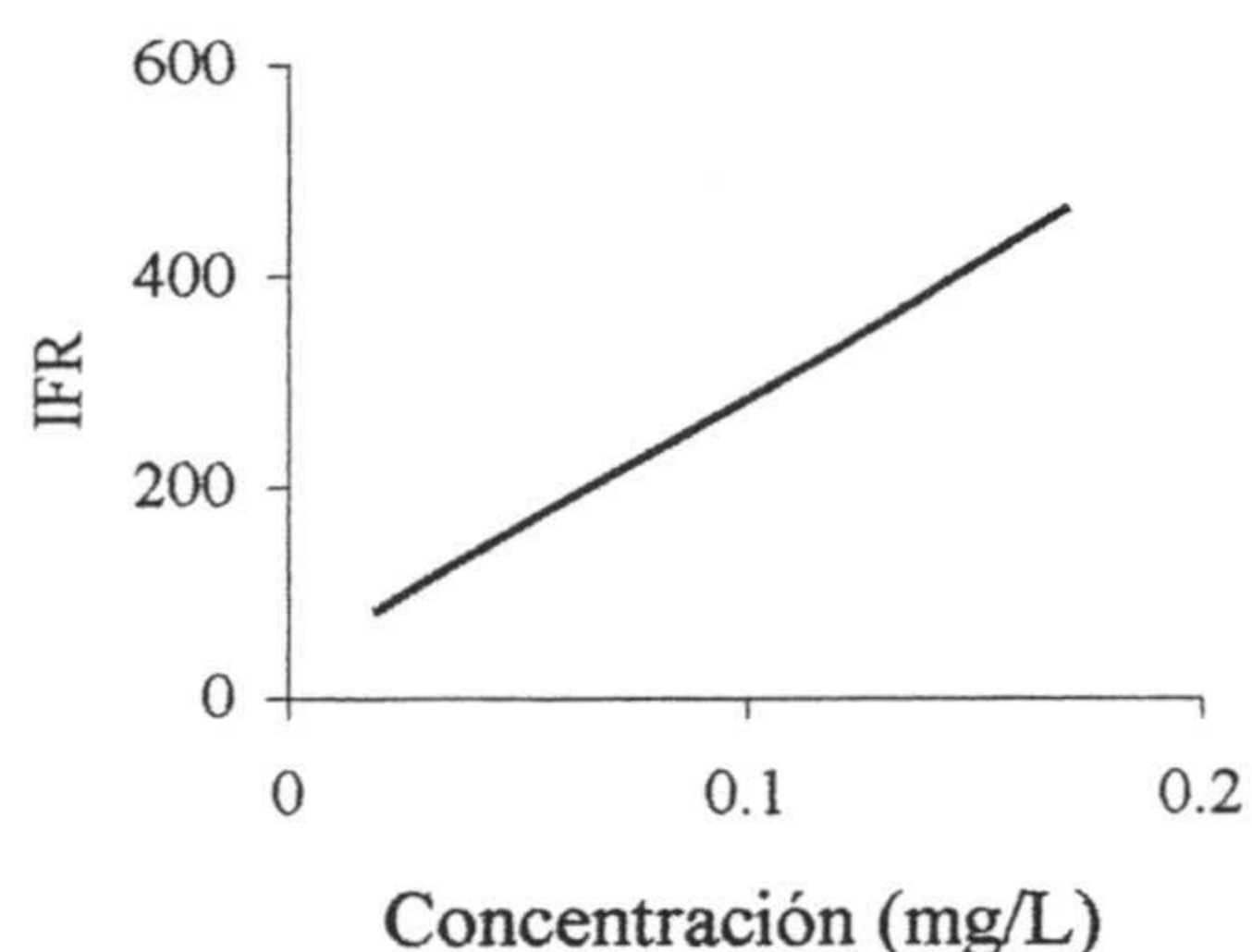
a la que corresponde un coeficiente r^2 de 0,9964. Como podemos apreciar, en este caso, el ajuste es algo mejor que en el caso anterior y la pendiente de la curva presenta un valor de $2.587,1 \text{ (mg/L)}^{-1}$ que es unas 8 veces superior al que presenta la recta de calibrado obtenida con un tiempo de equilibrio de 15 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de equilibración de 45 minutos.

En el caso de equilibrar el sensor con la disolución durante 45 minutos, los datos experimentales obtenidos son los que figuran en la tabla 4.10, que podemos ver representados gráficamente en la figura 4.11. En este caso la recta de calibrado presenta la siguiente ecuación:

$$IFR = 2.587,1 C + 24$$

siendo su coeficiente $r^2 = 0,9962$.



C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,02	83	86	81	83,3	3,1
0,03	114	110	109	111,0	2,3
0,07	212	200	203	205,0	3,1
0,12	320	315	319	318	0,8
0,17	460	470	458	462,7	1,4

Figura 4.11. Curva de calibrado del ácido piromídico, si el tiempo de equilibración es de 45 minutos.

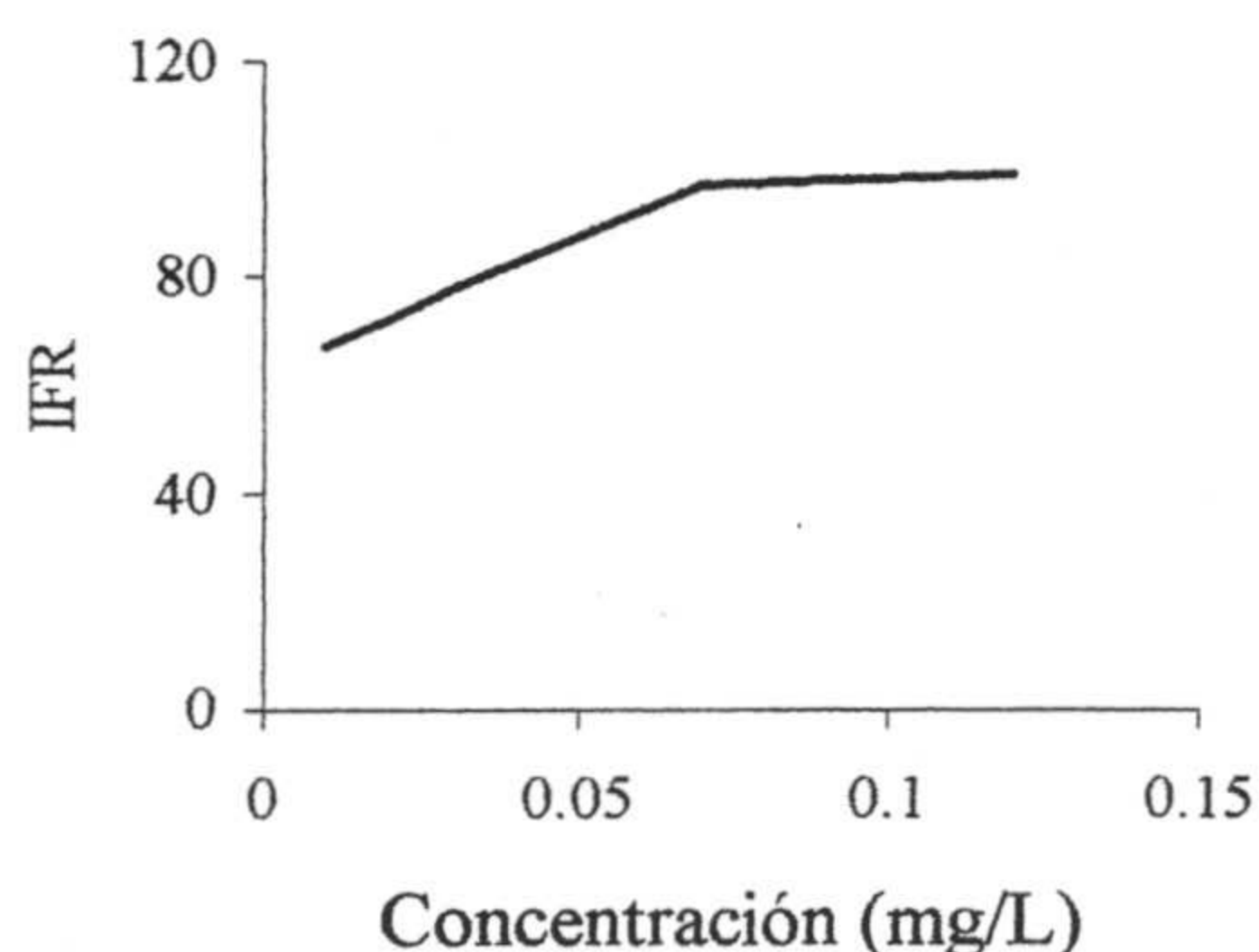
Tabla 4.10. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito para un tiempo de equilibración de 45 minutos

Curva de calibrado para un tiempo de equilibración de 60 minutos.

Utilizando los datos de la tabla 4.11 que están comprendidos entre 0,01 y 0,12 mg/L de concentración, podemos obtener la curva de calibrado que podemos ver en la figura 4.12, a la que corresponde la ecuación:

$$IFR = 2561,2 C + 35$$

$$(R^2 = 0,9998).$$



C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0.01	68	67	67	67,3	1,9
0.02	71	73	73	72,3	1,6
0.03	73	75	77	75,0	2,7
0.07	97	98	96	97,0	1,0
0.12	99	100	99	99,3	0,6

Figura 4.12. Curva de calibrado para un tiempo de equilibración de 60 minutos.

Tabla 4.11. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración para un tiempo de equilibrio de 60 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de 90 minutos.

Finalmente preparamos una serie de sensores para obtener la recta de calibrado cuando el tiempo de equilibración es de 90 minutos y obtuvimos los datos experimentales que figuran en la tabla 4.12 que, representados gráficamente, nos proporcionan la curva podemos observar en la figura 4.13.

La ecuación de la recta de calibrado correspondiente a estos valores expresados en la tabla 4.12 es la que sigue:

$$\text{IFR} = 2.798,6 C + 51$$

y el valor del coeficiente r^2 0,9986 lo que nos indica que el ajuste es aceptable.

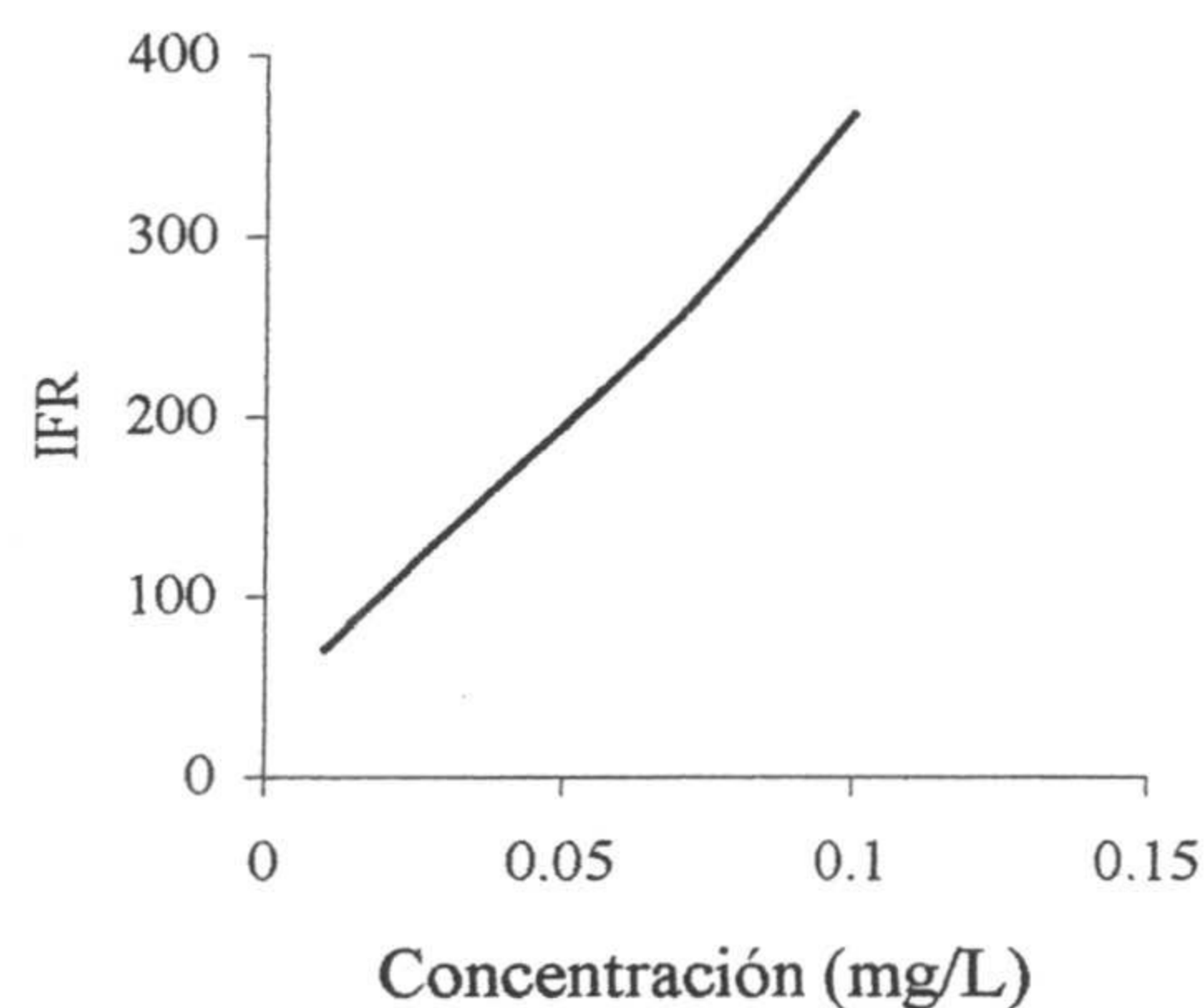


Figura 4.13. Recta de calibrado para un tiempo de fijación de 90 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,01	80	88	85	84,3	5,0
0,02	106	102	99	102,3	3,5
0,03	133	125	141	133,0	6,1
0,07	249	257	236	247,3	4,2
0,10	375	384	392	383,7	2,2

Tabla 4.12. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito para un tiempo de equilibrado de 90 minutos.

4.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.

Comparando los entre sí los resultados experimentales obtenidos en la sección anterior podemos confeccionar la tabla de valores número 4.13 ,en la que podemos observar que, a medida que aumenta el tiempo de equilibración del analito sobre el sensor, aumenta la pendiente de la recta de calibrado con excepción de los va-

lores de tiempo de 45 y 60 minutos para los que la pendiente es casi la misma.

Tiempo	Pendiente	Ordenada	Lím. Superior
15 min	304,21	65	0,20
30 min	2148,75	42	0,17
45 min	2587,17	24	0,17
60 min	2579,84	34	0,15
90 min	2798,60	51	0,10

Tabla 4.13. Valores de las pendientes de los primeros tramos de las rectas de calibrado, para diferentes valores del tiempo de fijación del analito sobre la superficie sensora.

Así mismos podemos ver como a medida que aumenta el tiempo de fijación disminuye el límite superior del rango de linealidad entre concentración y señal analítica, ya que pasa de un valor de 0,2 mg/L para un tiempo de 15 minutos a un valor de 0,10 mg/L para un tiempo de fijación de 90 minutos.

Otros parámetros analíticos.

Siguiendo el criterio de la IUPAC, vamos a calcular a continuación los restantes parámetros analíticos correspondientes a las diferentes rectas de calibrado. Para ello comenzaremos por calcular la repetitividad del blanco de los sensores

Repetitividad del blanco.

Este parámetro se calculó a partir de las medidas de diez blancos con los que se obtuvieron los valores de fosforescencia relativa que aparecen en la tabla 4.14.

Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	24,5	26,5	21,3	28,4	25,1	23,3	23,0	23,4	27,1	25,7

Tabla 4.14. Valores de la señal producida por diez blancos del sensor.

De los valores que figuran en la tabla 4.14 obtenemos un valor medio de la fos-

forescencia emitida por el blanco de 24,8; una desviación estándar de 2,2 y un valor de la desviación estándar relativa de 8,9.

Límites de detección y cuantificación:

Una vez conocido el valor de la desviación estándar del blanco y siguiendo con el criterio de la IUPAC, vamos a calcular los límites de detección y cuantificación, así como el rango lineal de los diferentes casos.

Aplicando las expresiones incluidas en el capítulo primero de esta memoria a los datos calculados a partir de la tabla 4.14, obtenemos los valores que figuran en la tabla 4.15.

Tiempo	L_D (mg/L)	L_C (mg/L)	Rango dinámico (mg/L)
15 min	$21,7 \cdot 10^{-3}$	$72,4 \cdot 10^{-3}$	0,07-0,20
30 min	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$10,2 \cdot 10^{-3}$	0,01-0,17
45 min	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$	0,008-0,17
60 min	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$	0,008-0,15
90 min	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$7,9 \cdot 10^{-3}$	0,008-0,10

Tabla 4.15. Valores de los parámetros analíticos: límites de detección, límite y de cuantificación y rango dinámico lineal, para los diferentes tiempos de fijación del analito sobre la membrana.

Precisión del método. Para calcular la precisión del método vamos a utilizar el valor de la desviación estándar de las medidas realizadas con una serie de diez muestras patrón, de concentración intermedia, es decir, 0,1 mg/L, dentro del rango lineal de la recta de calibrado correspondiente a un tiempo de equilibración de 45 minutos. Los resultados obtenidos son los que figuran en la tabla 4.16.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	280	276	279	282	281	270	275	280	281	283

Tabla 4.16. Intensidad de fosforescencia de diez replicas de 0,1 mg/L de ácido piromídico

A partir los valores que figuran en dicha tabla podemos calcular un valor medio de 278,7 una desviación estándar de 3,9 y una desviación estándar relativa de 1,4 % por lo que podemos decir que el método presenta una buena precisión expresada como repetitividad de un conjunto de medidas. Paralelamente la sensibilidad del método entendida como la pendiente de la recta de calibrado, tiene un alto valor 2587 (mg/L)^{-1} por lo que el método es muy sensible.

4.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

Por las razones especificadas en el capítulo segundo de esta Memoria, las especies, posiblemente interferentes, que se estudiaron en este caso fueron los siguientes compuestos: ácidos nalidíxico, oxolínico, pipemídico y flumequina. Para llevar a cabo este estudio se prepararon diferentes disoluciones en las que la cantidad de ácido piromídico era 0,01 mg/L en todas ellas, añadiéndose cantidades crecientes del correspondiente interferente en cada caso. Con estas disoluciones se prepararon los respectivos sensores y se midieron las intensidades de fosforescencia emitidas, bajo las condiciones experimentales ya conocidas.

Como en casos anteriores se adoptó como límite de tolerancia la cantidad de interferente que produce un error igual o menor al 5% en la determinación de los 0.01 mg/L de analito. Los resultados experimentales nos muestran que la única especie que produce serias interferencias, es el ácido nalidíxico ya que con una concentración de 0,5 mg/L, el error que se comete es superior al 7%. Los restantes compuestos ensayados no interfieren si su concentración es, al menos, 3,0 mg/L.

4.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.

Para aplicar el método propuesto al análisis de muestras reales se selecciona-

ron dos tipos de ellas en las que es posible la presencia de trazas de ácido piromídico: leche de vaca y orina humana.

4.6.1. Determinación de ácido piromídico en muestras de orina humana.

Se tomaron varias muestras de orina humana a las que se les aplicó la metodología propuesta, sin que se detectara la presencia del fármaco en ninguna de ellas, bien porque no existiese, o bien, porque la cantidad del mismo presente en la muestra fuese menor que el límite inferior del método. Por esta razón se decidió efectuar un estudio de recuperación del analito a partir de una serie de muestras, que previamente habían sido contaminadas con cantidades conocida del mismo. Tras la preparación de la muestra, cuyas concentraciones en analito eran 0,03, 0,09 y 0,15 mg/L, se procedió a la medida de sus intensidades de fosforescencia, utilizando para ello la recta de calibrado construida para un tiempo de equilibración de 45 minutos. En la tabla 4.17 tenemos los resultados obtenidos así como los porcentajes de recuperación de cada caso.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,03	99	0,029	96,7
0,03	106	0,032	106,7
0,03	109	0,033	110,0
0,09	250	0,087	96,7
0,09	248	0,086	95,5
0,09	259	0,091	101,1
0,15	409	0,149	99,3
0,15	422	0,154	102,7
0,15	416	0,154	102,7

Tabla 4.17. Estudio de recuperación llevado a cabo con muestras de orina humana manchadas con ácido piromídico.

El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 45$ min.

IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

Como se aprecia, las cantidades de analito que se han recuperado corresponden a porcentajes comprendidos entre un 95,5% y un 106,7 %, siendo las desviaciones

estándar relativas: 7,2% para las muestras más diluidas (0,03 mg/l), 2,9 % para las muestras de concentración intermedia (0,09 mg/l) y 1,9 % para las muestras más concentradas (0,15 mg/l).

4.6.2. Determinación de ácido piromídico en muestras de leche de vaca.

Como ocurrió con las muestras de orina al aplicar la metodología propuesta a varias muestras de leche de vaca, no se detectó la presencia de ácido piromídico en ninguna de ellas por lo que se procedió a realizar un estudio de recuperación, con muestras previamente contaminadas con cantidades conocidas de ácido piromídico. Utilizando la recta de calibrado obtenida para un tiempo de fijación de 45 minutos, se midieron tres replicados de cada una de las tres muestras de leche preparadas. Los resultados obtenidos son los que figuran en la tabla 4.19 en la que además se reflejan los porcentajes de recuperación de cada caso.

Como se puede apreciar los valores de las cantidades de analito recuperadas oscilan entre un 90,0 % y un 104,0 % siendo las desviaciones estándar relativas: 5,1 % para las muestras más diluidas, 1,8 % para las muestras de concentración intermedia y 3,3 % para las más concentradas.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,03	98	0,028	93,3
0,03	94	0,027	90,0
0,03	102	0,030	100,0
0,09	239	0,083	92,2
0,09	248	0,086	95,5
0,09	241	0,084	93,3
0,15	415	0,151	100,7
0,15	401	0,146	97,3
0,15	428	0,156	104,0

Tabla 4.19. Valores correspondientes al estudio de recuperación de ácido piromídico en leche de vaca.

El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 45$ min.

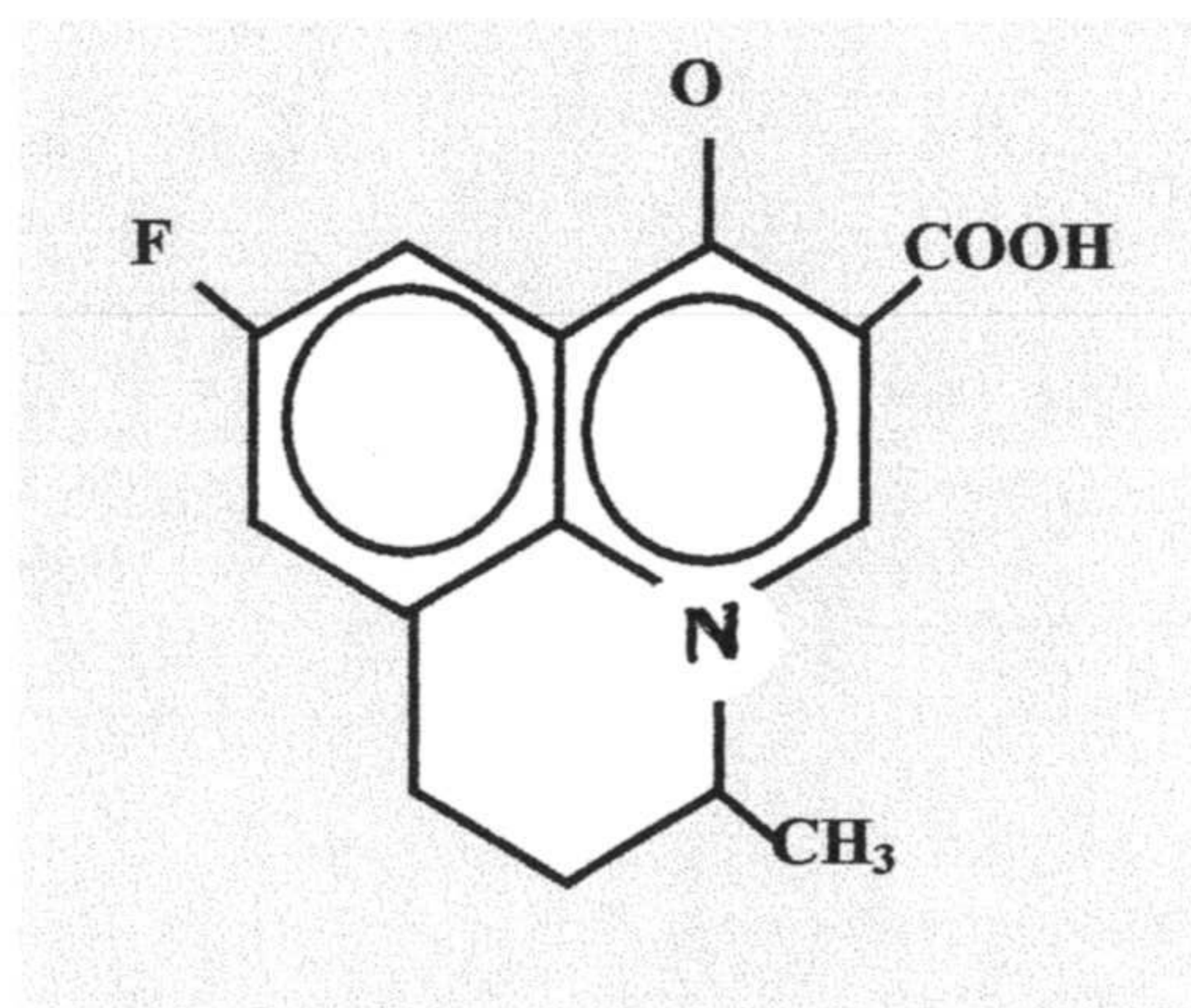
IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

Del estudio realizado en el presente capítulo se deriva un artículo enviado a la revista *Mikrochimica Acta*, cuyo título es:

Single-use phosphorimetric sensor for the determination of piromidic acid in milk and human urine

cuyos autores son:

L.F. Capitán-Vallvey, Osama M.A. Al-Barbarawi, M.D. Fernández-Ramos y R. Avidad*



CAPÍTULO 5

ESTUDIO ESPECTROFOSFORIMÉTRICO DE LA FLUMEQUINA MEDIANTE UN SENSOR DESECHABLE

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

5.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DE LA FLUMEQUINA	199
5.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida	199
5.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	201
5.2.1. Optimización de variables experimentales dependientes del sensor	
5.2.1.1. Elección del soporte sólido	
5.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora	
5.2.1.3. Optimización de la cantidad de polímero	202
5.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante	203
5.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente	204
5.2.1.6. Optimización del volumen de gota para preparación del sensor	205
5.2.1.7. Influencia del orden de adición de los componentes	205
5.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor	206
5.2.2. Optimización de parámetros instrumentales	206
5.2.2.1. Optimización del ancho de las rendijas de excitación y emisión	206
5.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_a	207
5.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación	207
5.2.3.1 Optimización del tiempo de fijación	208
5.2.3.2. Influencia de la colocación del sensor durante la agitación	209
5.2.3.3 Influencia de la velocidad de agitación	209
5.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra	209
5.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia	209
5.2.4.2. Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia	211
5.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica	211
5.2.5. Influencia de la atmósfera de nitrógeno sobre la fosforescencia	213
5.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO	213
5.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN	214
5.4.1. Relación entre señal analítica y concentración	218
5.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos	205
5.5. ESTUDIO DE LASA INTERFERENCIAS	220
5.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO	220
5.5.1. Determinación de la flumequina en muestras de orina humana	220
5.5.2. Determinación de la flumequina en muestras de leche de vaca	221

El ácido 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo-1H,5H-benzo[i,j]quinolizina-2-carboxílico, cuyo nombre vulgar es flumequina, se comercializa bajo los nombres de Apurona y R-802 y fue la primera quinolona sintetizada con un átomo de flúor en su molécula, con lo cual se dio paso a la síntesis de un importante grupo de estos fármacos al que se le dio el nombre genérico de fluoroquinolonas, cuya actividad antibacteriana es mucho más amplia que la actividad que presentan las quinolonas sin flúor.

Con la flumequina comienza la era de las quinolonas de segunda generación, cuya principal característica es la presencia del átomo de flúor en la posición seis del anillo, lo que aumenta su poder antibacteriano de forma que permite disminuir drásticamente la dosis necesaria para que el fármaco sea eficaz.

5.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DE LA FLUMEQUINA.

Para estudiar las características fosforescentes de este compuesto procedimos en primer lugar a registrar sus espectros de excitación y emisión.

5.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida de la flumequina.

El espectro de excitación se obtuvo utilizando el procedimiento general descrito en el primer capítulo de esta Memoria, tras haber preparado una serie de sensores con los que se obtuvieron los diferentes espectros de excitación y emisión. Para ello se utilizaron sensores preparados de la misma forma que en capítulos anteriores sin que ello sea óbice para que, posteriormente, se optimicen las condiciones de preparación de dichos sensores, de acuerdo con las características propias de este analito.

Como siempre, antes de efectuar la equilibración del sensor con el analito, se

registró la señal emitida por el sensor para utilizarla como valor del blanco analítico. A continuación, a partir de la respectiva disolución madre, se preparó una disolución acuosa de flumequina de 1,0 mg/L de concentración en dicho fármaco.

Siguiendo el procedimiento operatorio descrito en el primer capítulo, se equilibró el sensor con dicha disolución durante una hora y se registró el espectro de excitación, bajo las siguientes condiciones experimentales: rendijas de excitación y emisión 2,5 nm y 5 nm respectivamente, longitud de onda de emisión de 459 nm, intervalo de longitud de onda de excitación 300-400 nm, $t_g = 10$ ms, $t_d = 0'15$ ms y velocidad de barrido 240 nm/min.

En la figura 5.1 podemos ver el espectro de excitación obtenido en el que se observa que la longitud de onda óptima para la excitación del analito es de 358 nm.

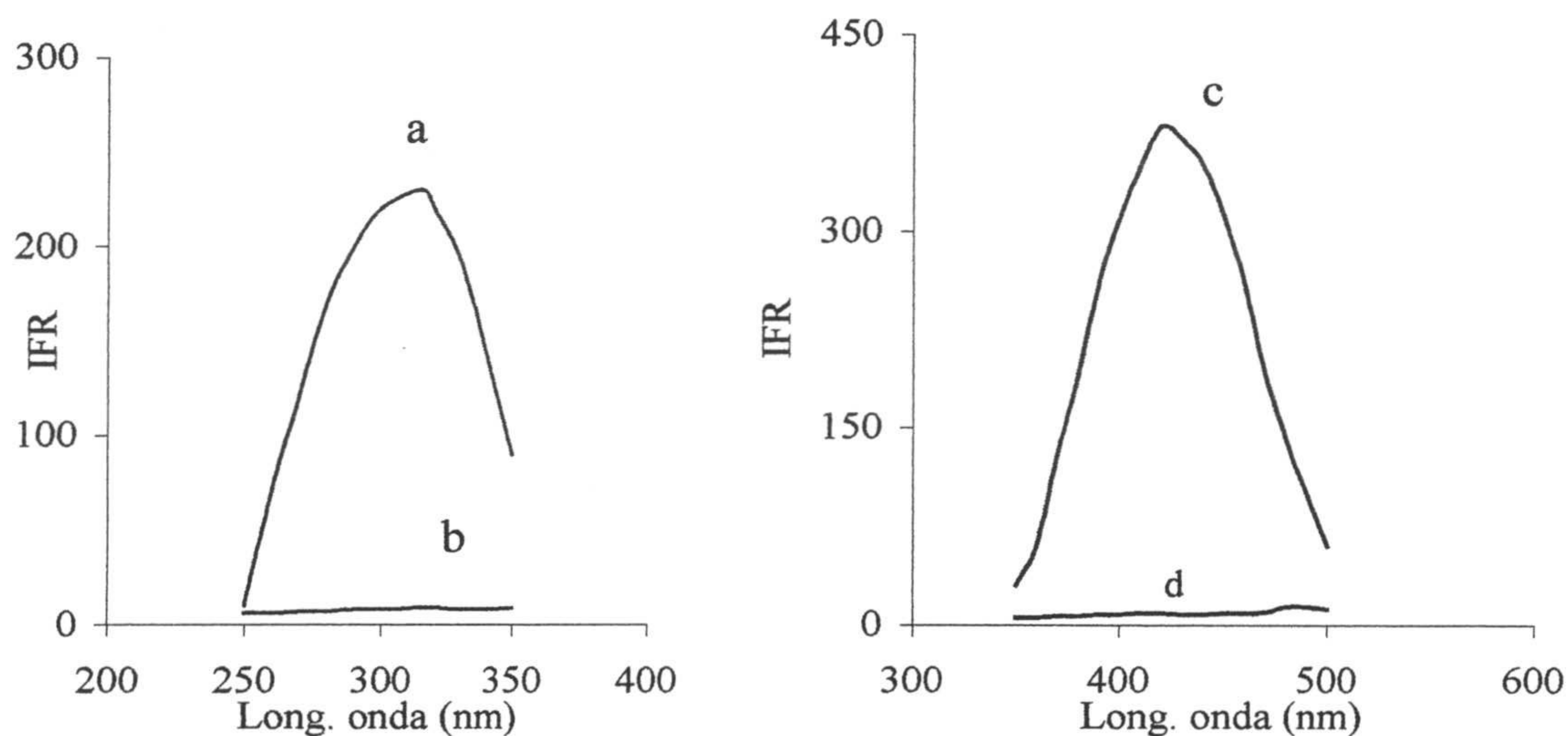


Figura 5.1. Espectros de excitación (a,b) y emisión (c,d) de la flumequina y del blanco del sensor.

El espectro de emisión se obtuvo utilizando esta longitud de onda de excitación siendo registrado bajo las mismas condiciones experimentales. En este espectro de emisión la longitud de onda óptima para la emisión de fosforescencia vemos que es 459 nm.

5.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.

Las variables experimentales que vamos a estudiar en este capítulo serán las mismas que vimos en capítulos anteriores, por lo que nos limitaremos a exponer los resultados obtenidos, comentando sólo aquellos casos que estimemos oportunos para obtener conclusiones.

5.2.1. Optimización de variables experimentales que dependen del sensor.

Bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente se efectuaron las medidas de fosforescencia a una longitud de onda de emisión $\lambda_{em} = 459$ nm.

5.2.1.1 Elección del soporte sólido.

Para elegir el soporte sólido más adecuado se cortaron tiras de láminas de metacrilato, acetato de polivinilo y poliéster y se construyeron sensores de la composición óptima obtenida para el ácido piromídico, con cada una de ellas, que posteriormente se equilibraron con disoluciones de flumequina de 1,0 mg/L de concentración. Se comprobó que el sensor construido con la lámina de poliéster tipo Mylar de 0,25 mm de espesor, era el más adecuado dadas sus características ópticas y su casi total falta de fosforescencia.

5.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.

Para seleccionar los componentes de la membrana sensora, más adecuados para

la fijación de este analito se probaron las siguientes matrices poliméricas: poliuretano cloruro de polivinilo y acetato de polivinilo. Como plastificante se ensayaron: tributilfosfato, ftalato de dioctilo y bis(2-etilhexil)sebacato y como disolventes se utilizaron, según el caso: tetrahidrofurano y mezclas de etanol y agua en diferentes proporciones.

Una vez construidos los diferentes sensores con las posibles combinaciones de estos componentes, se equilibraron con disoluciones de 0,1 mg/L de flumequina, bajo las condiciones operatorias descritas para la obtención de los espectros de emisión y excitación. El sensor que emitía una mayor intensidad de fosforescencia fue el formado por cloruro de polivinilo y tributilfosfato, usando tetrahidrofurano como disolvente.

5.2.1.3. Optimización de la cantidad de polímero.

Para optimizar la cantidad de polímero utilizada en la construcción de los sensores, en viales de 5 mL de capacidad, se prepararon diferentes mezclas de dichos componentes colocando, en cada uno de ellos, 60 mg de tributilfosfato (TBF) y 2,0 mL de tetrahidrofurano (THF), añadiéndose cantidades de cloruro de polivinilo comprendidas entre 10 y 110 mg. Una vez homogeneizadas las diferentes disoluciones se construyeron varios sensores en la forma acostumbrada.

Siguiendo el procedimiento operatorio descrito anteriormente se midió la fosforescencia de cada sensor antes de equilibrarlo con la respectiva disolución de patrón y se tomó como blanco analítico el valor obtenido. Posteriormente se equilibró cada sensor con una disolución de flumequina de 1,0 mg/L de concentración y se midió la fosforescencia emitida, obteniéndose los resultados que encontramos en la tabla 5.1 y están representados en la figura 5.2.

Con estos resultados podemos decir que la cantidad óptima de matriz poliméri-

ca (cloruro de polivinilo), para la formación de la membrana sensora en la que hemos de retener la flumequina, es de 80 mg si utilizamos las condiciones experimentales reseñadas.

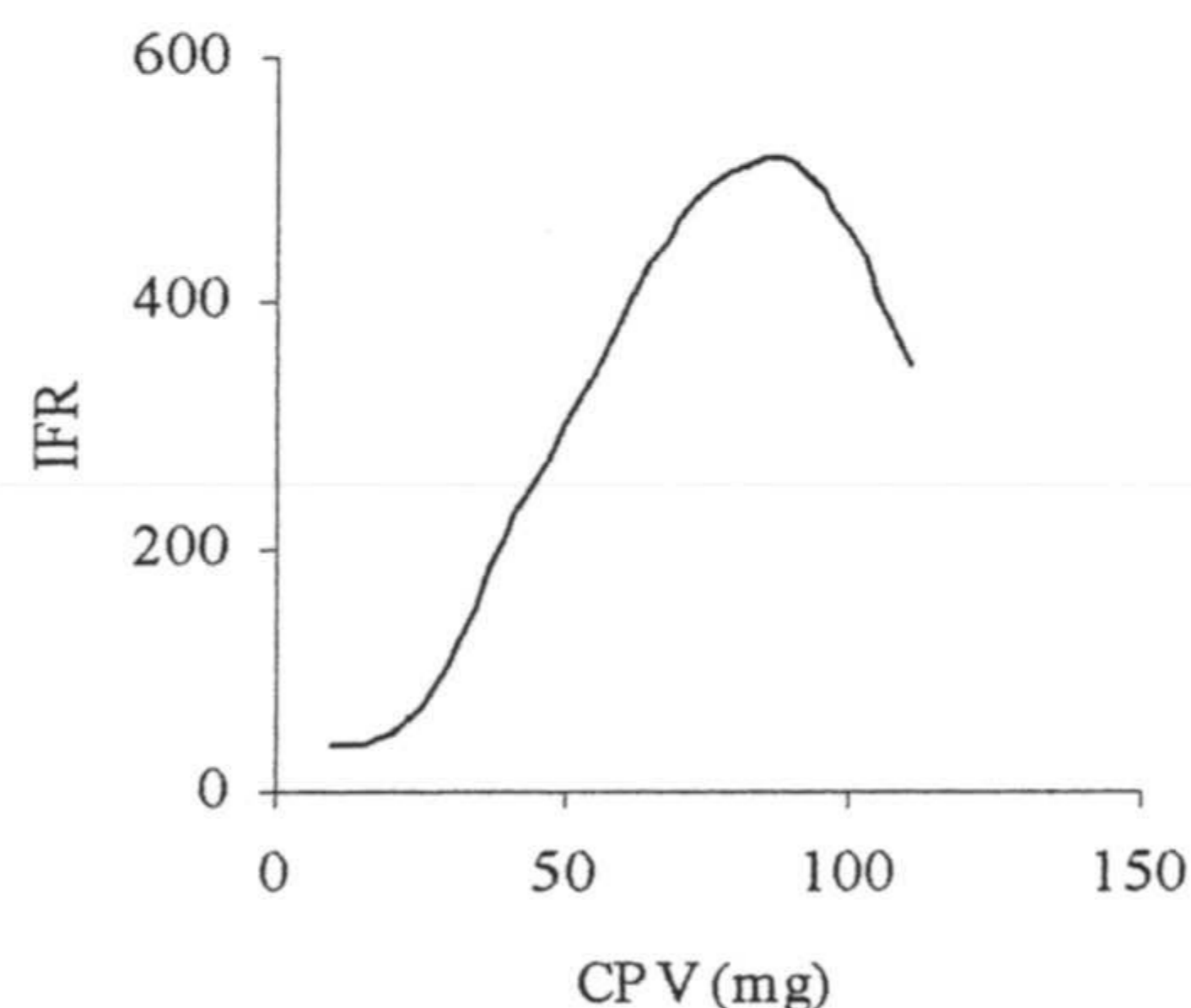


Figura 5.2. Influencia de la cantidad de CPV sobre la fosforescencia.

CPV (mg)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
10	37	35	41	37,8	7,4
20	46	50	47	47,6	4,4
30	108	103	104	104,9	2,7
40	209	205	211	208,6	1,5
50	297	306	301	301,6	1,5
70	472	463	467	467,9	0,9
80	506	511	515	510,7	0,9
90	505	516	516	512,1	1,3
100	450	460	458	456,1	1,1
110	350	346	354,5	350,3	1,2

Tabla 5.1. Influencia de la cantidad de CPV sobre la intensidad de fosforescencia.

5.2.1.4. Optimización del volumen del plastificante tributilfosfato.

La optimización de la cantidad de tributilfosfato se realizó con sensores en los que la cantidad de CPV era 80 mg, el volumen de disolvente (tetrahidrofurano) era 2 mL y el volumen de tributilfosfato variaba entre 0,02 y 0,2 mL.

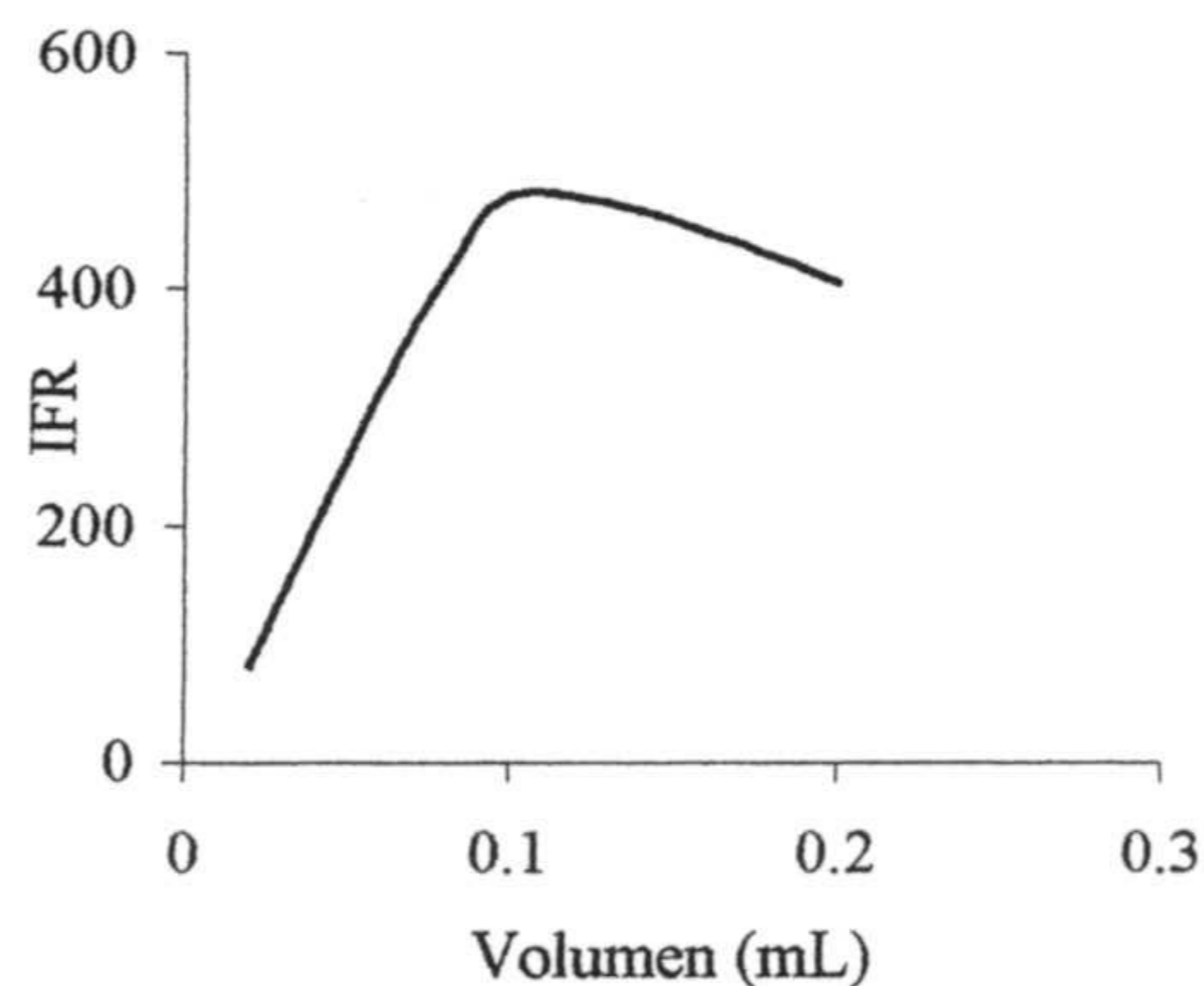


Figura 5.3. Influencia del volumen de TBF en la fosforescencia de flumequina.

TBF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,02	82	78	85	81,7	4,4
0,06	314	309	319	313,7	1,7
0,08	385	391	388	388,1	0,8
0,10	483	487	478	482,8	0,9
0,14	460	465	469	465,0	1,1
0,18	430	437	443	436,9	1,5
0,20	407	410	400	405,6	1,2

Tabla 5.2. Intensidad de fosforescencia en función de la cantidad de tributilfosfato.

Se equilibraron los sensores con disoluciones de flumequina de 1,0 mg/L y se midió su fosforescencia, obteniéndose los resultados de la tabla 5.2. Con los resultados de esta experiencia podemos decir que 0,10 mL de tributilfosfato es el volumen más adecuado para construir los sensores en los que se produzca la fijación de la flumequina.

5.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.

Finalmente, para optimizar la cantidad de disolvente se prepararon varios sensores en los que la cantidad de tetrahidrofurano variaba entre 0,5 y 3,0 mL manteniendo constantes, en sus valores óptimos, las cantidades de los restantes componentes. Una vez preparados los sensores y equilibrados con disoluciones de 1,0 mg/L de flumequina, se midió su fosforescencia. Los resultados obtenidos son los que figuran en la tabla 5.3 y se representan en la figura 5.4 en la que podemos apreciar que el volumen óptimo de disolvente para el desarrollo de la fosforescencia es 2,0 mL.

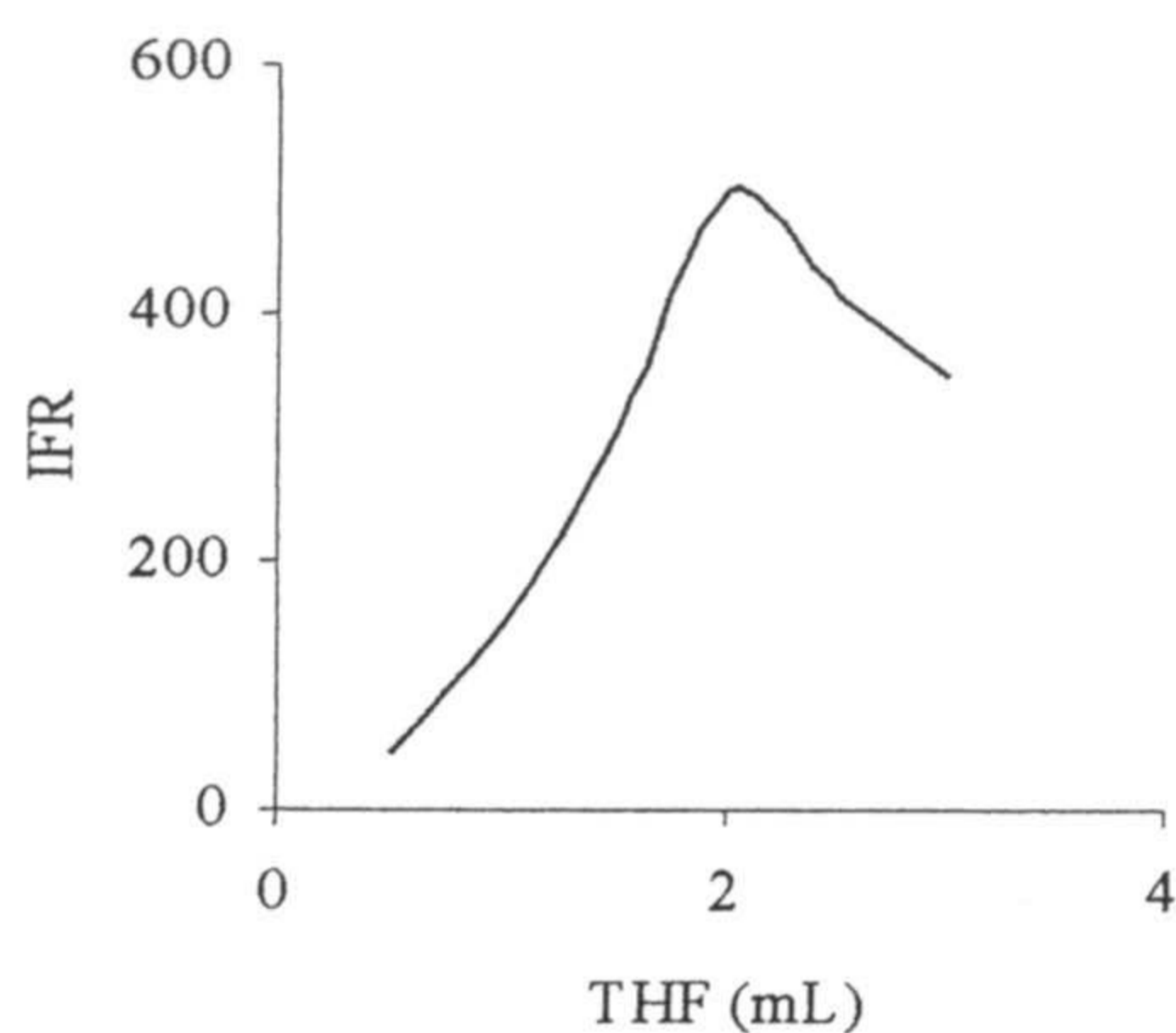


Figura 5.4. Influencia del volumen de tetrahidrofurano sobre la intensidad de fosforescencia de la flumequina.

THF (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,5	48	49	45	47,1	4,9
1,0	150	153	139	147,5	4,9
1,5	308	302	314	307,9	2,0
2,0	495	504	490	496,5	1,4
2,5	411	406	418	411,8	1,4
3,0	351	357	345	350,9	1,7

Tabla 5.3. Intensidad de fosforescencia y de la desviación estándar relativa de tres medidas.

Como resumen de las experiencias anteriores podemos decir que la membrana

sensora para la fijación de la flumequina, debe estar formada por 80 mg de cloruro de polivinilo, 0,1 mL de plastificante tributilfosfato y 2,0 mL de tetrahidrofurano como disolvente.

5.2.1.6 Optimización del volumen de gota para la preparación del sensor.

Los cantidades de mezcla de componentes ensayadas en este caso fueron volúmenes comprendidos entre 3 y 9 μL siendo los resultados obtenidos los que figuran en la tabla 5.4 y se representan en la figura 5.5. Como podemos observar a partir de un volumen de gota de 5 μL la fosforescencia del sensor no aumenta e incluso disminuye, por lo que se eligió este valor de 5 μL como el más idóneo para la construcción del sensor.

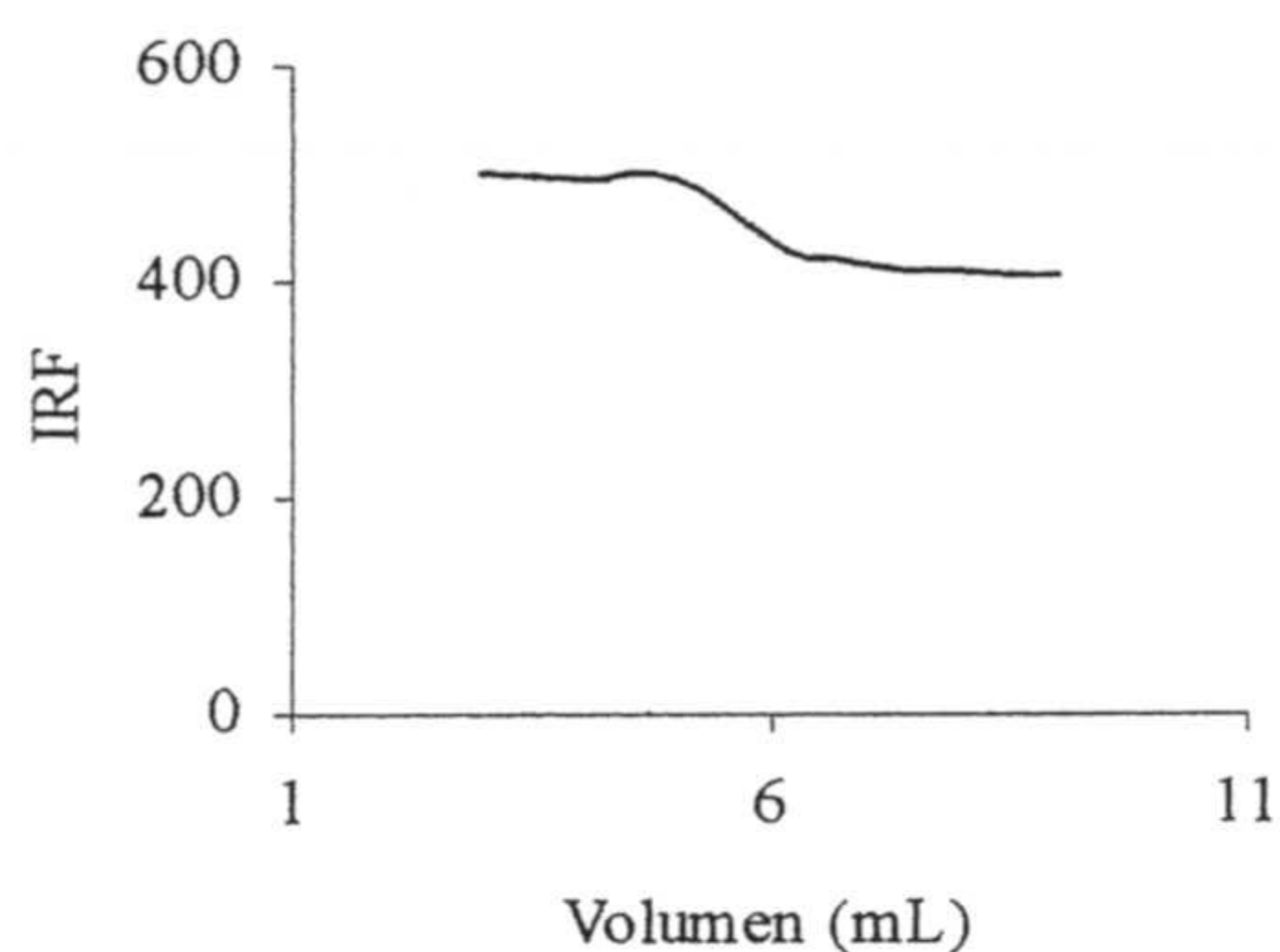


Figura 5.5. Influencia del volumen de gota depositado, sobre la intensidad de fosforescencia.

V (mL)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
3,0	500	498	510	502,7	1,3
4,0	498	502	490	496,7	1,2
5,0	501	509	490	497,7	1,3
6,0	436	440	429	435,0	1,3
7,0	420	418	410	416,0	1,3
9,0	409	399	401	403,0	1,3

Tabla 5.4. Influencia del volumen de gota depositado para formar el sensor.

5.2.1.7. Influencia del orden de adición de los componentes.

Para comprobar esta influencia se construyeron diferentes sensores, con los mismos reactivos y en las mismas proporciones, pero variando el orden de adición en los diferentes casos. El orden: cloruro de polivinilo + tributilfosfato + tetrahidrofurano, es el que permite el desarrollar una mayor fosforescencia y presentar

las características ópticas más adecuadas.

5.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor.

Las experiencias realizadas en este caso fueron las mismas que se efectuaron en los apartados correspondientes de capítulos anteriores, por lo que sólo expon-dremos los resultados obtenidos.

Sólo los sensores secados a temperatura ambiente presentan las características ópticas adecuadas, puesto que las membranas obtenidas en estas condiciones son circulares, planas, homogéneas y transparentes. Puesto que utilizando un deseca-dor a vacío el tiempo de secado pasa de una hora a 20 minutos, dicho proceso se efectuó en un desecador a vacío a una presión de 15 mm de Hg.

5.2.2. Optimización de los parámetros instrumentales.

Optimizados los parámetros dependientes de la naturaleza y constitución de la membrana sensora, procedimos a optimizar los parámetros instrumentales: anchu-ras de las rendijas de excitación y emisión, tiempo de retraso entre el pulso de la lámpara y la apertura del fotodetector (t_d) y tiempo durante el cual el fotodetector permanece abierto (t_g).

5.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.

La influencia de estos dos parámetros se estudió variando la rendija de excita-ción entre 2.5 y 15 nm, mientras la rendija de emisión se mantuvo en 5 nm y los valores de t_g y t_d fueron 10 ms y 0,1 ms, respectivamente.

Los resultados experimentales nos demuestran que al aumentar el ancho de la rendija de excitación por encima de 3 nm, la intensidad de la fosforescencia dis-minuye, por lo que se eligió el valor de 3 nm como óptimo para efectuar las medi-

das.

A continuación, con un ancho de la rendija de excitación de 3 nm y operando en idénticas condiciones a las descritas se estudió la influencia de la anchura de la rendija de emisión, variando su valor entre 2 y 15 nm, comprobándose que a medida que aumenta la rendija aumenta también la intensidad de fosforescencia, por lo que 15 nm se tomó como valor de trabajo.

5.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_g .

Para medir la influencia del tiempo de retraso entre la finalización del pulso de la lámpara y el inicio de la medida de fosforescencia (t_d), procedimos como sigue: fijamos un tiempo arbitrario $t_g = 10$ ms y los valores óptimos de las anchuras de rendijas de excitación y emisión y se midió la intensidad de fosforescencia a diferentes tiempos (t_d) comprendidos entre 0,05 y 0,5 ms. Experimentalmente se comprobó que la mayor fosforescencia se emitía cuando $t_d = 0,15$ ms.

Seguidamente con un valor de $t_d = 0,15$ ms y operando de idéntica forma, se determinó el tiempo óptimo de apertura del detector (t_g), ensayando valores comprendidos entre 2 y 11 ms. La fosforescencia emitida era máxima cuando $t_g = 10$ ms, siendo este el valor elegido para próximas experiencias.

Como resumen de lo anterior podemos decir que los valores óptimos de las variables instrumentales son: rendija de excitación 3 nm; rendija de emisión 15 nm, tiempo de apertura del detector (t_g) 10 ms y tiempo de retraso (t_d) 0,15 ms.

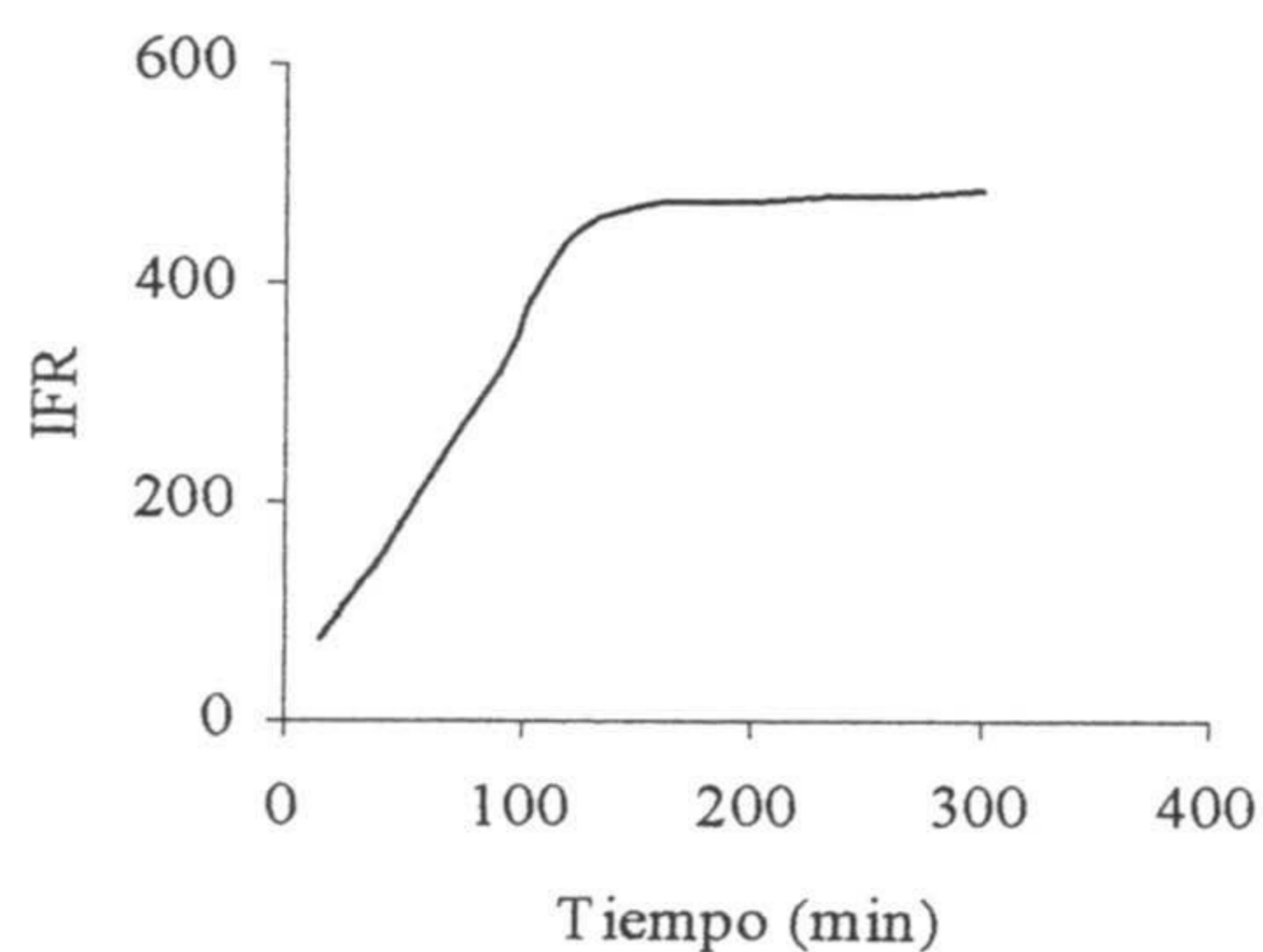
5.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.

A continuación vamos a estudiar la influencia de las variables propias del proceso de fijación sobre la intensidad de fosforescencia emitida. Estas variables son: tiempo de equilibrio, en el que las moléculas de analito se introducen en la mem-

brana sensora; forma y velocidad de agitación de la disolución durante dicho tiempo y forma y tiempo de secado del sensor, una vez finalizada la fijación del analito.

5.2.3.1. Optimización del tiempo de fijación del analito.

Para el estudio de la influencia de este parámetro se introdujo una serie de sensores en disoluciones patrón del analito, de 1,0 mg/L de concentración y se mantuvieron en ellas durante períodos de tiempo comprendidos entre 15 y 300 minutos, agitando la disolución a 30 rpm con una placa agitadora magnética. Los resultados experimentales obtenidos se incluyen en la tabla 5.5 y se representan en la figura 5.6.



Tiempo	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER%
15 min	70	76	80	75,2	7,0
30 min	141	149	147	145,5	2,5
60 min	220	229	217	222,0	2,9
90 min	327	317	321	321,8	1,4
120 min	433	440	437	436,7	0,8
150 min	465	467	475	469,3	1,1
180 min	472	475	480	475,9	0,9
300 min	482	488	491	486,7	0,9

Figura 5.6. Influencia del tiempo de equilibrio sobre la fosforescencia emitida.

Tabla 5.5. Intensidad de fosforescencia relativa en función del tiempo de equilibrio.

En la figura 5.6 se puede observar que la cantidad de analito fijada sobre la membrana, para una concentración dada, depende del tiempo de empleado en la fijación, siendo 120 minutos el tiempo mínimo para que se produzca la máxima intensidad de fosforescencia, cuando la concentración de analito es de 1,0 mg/L.

5.2.3.2. *Influencia de la forma de colocar del sensor durante la agitación.*

Como en capítulos anteriores, se comprobó que la forma más adecuada de colocar el sensor dentro de la disolución, es de manera que al agitar la disolución el flujo incida frontalmente sobre la superficie sensora.

5.2.3.3. *Influencia de la velocidad de agitación.*

Colocando los sensores en la forma indicada en el apartado anterior, se procedió a estudiar la influencia de la velocidad de agitación sobre la fosforescencia emitida. Se prepararon varios sensores y se equilibraron con disoluciones de flumequina de 1,0 mg/L de concentración, agitándose durante 120 minutos a velocidades comprendidas entre 30 y 90 rpm. Los resultados experimentales demuestran que la velocidad óptima de agitación es 30 rpm puesto que a velocidades de agitación superiores la intensidad no aumenta y puede incluso disminuir ligeramente cuando la velocidad es 90 rpm.

5.2.4. **Optimización de las variables que dependen de la muestra.**

Las variables experimentales relacionadas con las condiciones físico-químicas de la muestra durante el proceso de fijación del analito son fundamentalmente: naturaleza y cantidad de átomo pesado, pH de la disolución y fuerza iónica del medio.

5.2.4.1. *Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.*

Para comprobar la necesidad de utilizar átomo pesado, como inductor del proceso fosforescente de la flumequina, se ensayaron las siguientes especies: nitratos de Pb(II), Ag(I), Tl(I) y Hg(II), plomotetraetilo y Cl⁻, Br⁻ y I⁻ como aniones voluminosos. El estudio se efectuó añadiendo la especie química estudiada a la disolu-

ción de muestra, antes de la fijación del analito en el sensor. En el caso del plomo-tetraetilo, este se incorporó previamente en la propia membrana sensora durante su fabricación. El acetato de Pb(II), incorporado a la disolución de analito antes de su fijación, es el único que produjo un incremento de la fosforescencia y, por ello, se eligió esta especie como potenciador de la emisión fosforescente y procedimos al estudio de la influencia que ejercerá la concentración de Pb(II) sobre la fosforescencia emitida.

Para ello se llevó a cabo la siguiente experiencia: se prepararon diferentes sensores equilibrados con disoluciones de flumequina de 1,0 mg/L de concentración, añadiéndose cantidades diferentes (entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $20 \cdot 10^{-3}$ M) de disolución de acetato de plomo. Los resultados obtenidos son los que se incluyen en la tabla 5.6 y se representan en la figura 5.7.

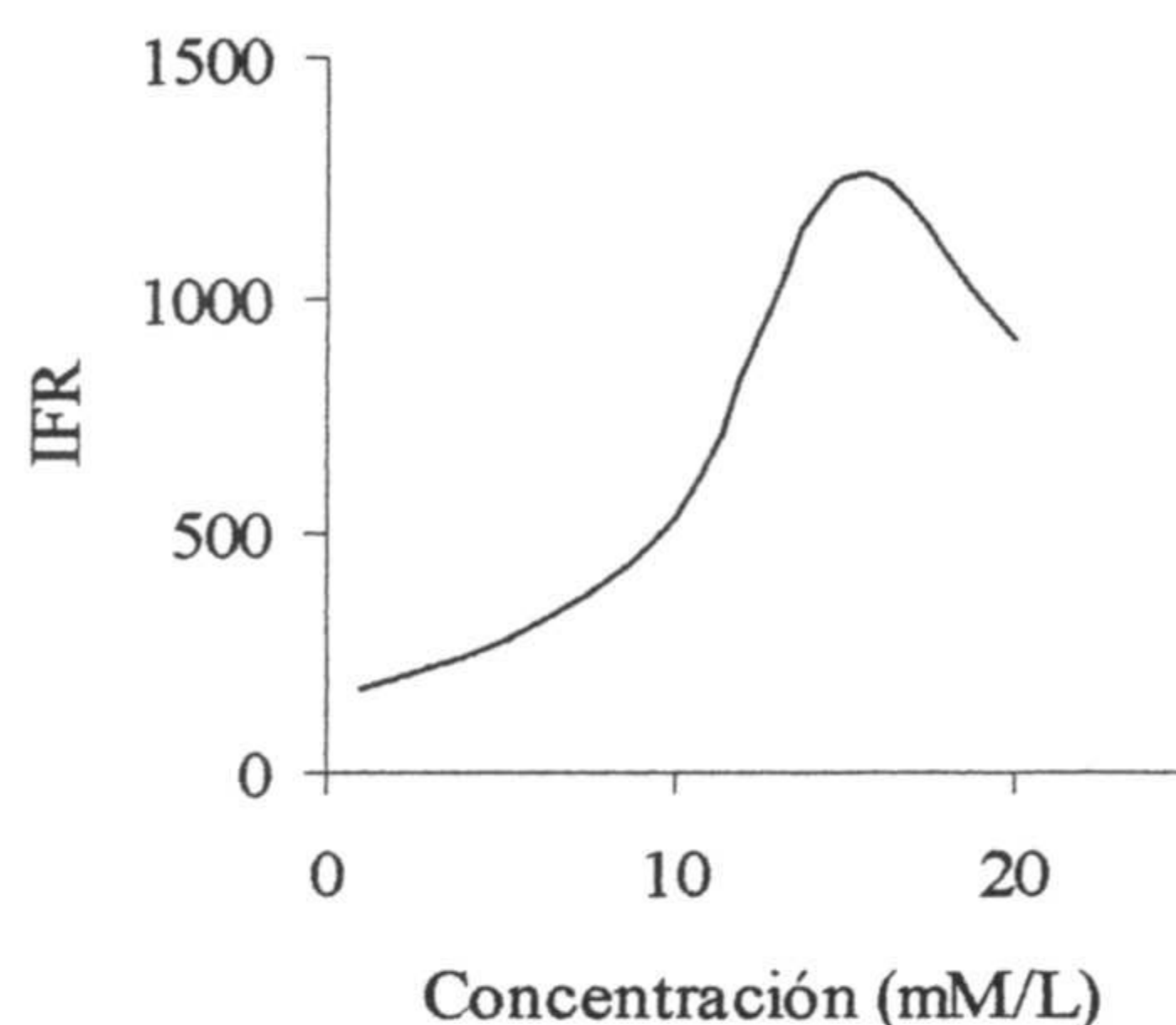


Figura 5.7. Influencia ejercida por la cantidad de Pb(II) sobre la fosforescencia del oxolínico.

Pb(II) (M/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER
$1 \cdot 10^{-3}$	168	173	169	170,1	1,7
$5 \cdot 10^{-3}$	270	267	274	270,6	1,3
$10 \cdot 10^{-3}$	540	530	544	538,1	1,3
$15 \cdot 10^{-3}$	1250	1248	1256	1251,6	0,4
$20 \cdot 10^{-3}$	914	909	920	914,7	0,6

Tabla 5.6. Valores de la fosforescencia emitida por la flumequina en función de la concentración de átomo pesado.

Como podemos ver la presencia de Pb(II) en una concentración de $15 \cdot 10^{-3}$ M, aumenta la intensidad de la fosforescencia emitida al menos en un 36% respecto del valor más próximo y casi un 400 % respecto al valor de intensidad emitida por otra muestra idéntica a la anterior a la que no pusimos átomo pesado.

5.2.4.2. Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.

Este estudio se llevó a cabo utilizando disoluciones patrón de 1,0 mg/L con diferentes valores de pH, comprendidos entre 2,8 y 10,1, ajustados con disoluciones de NaOH y HCl de diferentes concentraciones. Los resultados experimentales son los que figuran en la tabla 5.7 y se representan en la figura 5.8.

Como se observa en la figura 5.8, la intensidad de fosforescencia aumenta rápidamente para valores de pH comprendidos entre 3 y 7. A partir de este valor, la intensidad de fosforescencia sufre una variación prácticamente inapreciable. La brusca subida de la señal analítica que experimenta entre valores del pH de 4 a 7 la podemos atribuir al cambio de distribución electrónica que experimenta la molécula al sufrir el proceso de desprotonación. En consecuencia, se tomó el valor de 9,0 como pH de trabajo, utilizando para su ajuste una disolución 0,1 N de NaOH.

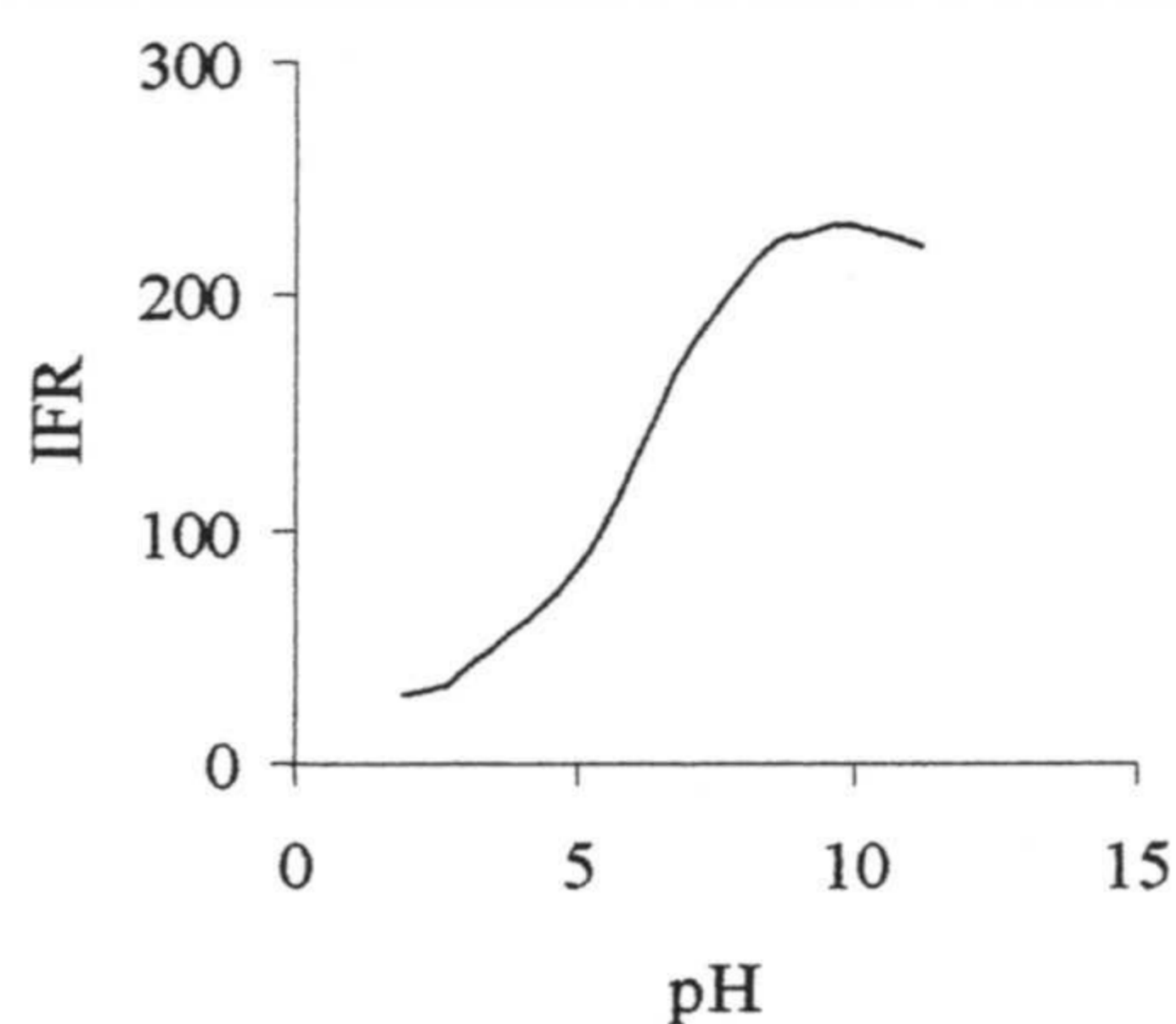


Figura 5.8. Representación gráfica de la influencia del pH sobre la fosforescencia de la flumequina.

pH	IFR	pH	IFR
1,9	30	8,5	221
2,7	34	9,0	225
3,1	43	9,6	230
4,6	72	10,3	227
5,7	113	11,24	221
7,1	182		

Tabla 5.7. Intensidad de fosforescencia en función del pH de la disolución de muestra.

5.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica.

Esta influencia la hemos estudiado utilizando cloruro sódico como electrolito y preparando varias disoluciones en las que la fuerza iónica del medio variaba entre la que corresponde a disoluciones 0,1 y 1,9 M, siendo la concentración de analito

en todas ellas de 1,0 mg/L. Los resultados experimentales que podemos ver en la tabla 5.8 y en la figura 5.9.

En la figura 5.9 se aprecia que la fuerza iónica del medio ejerce una influencia muy acusada sobre la fosforescencia del analito. En efecto, para una concentración de NaCl igual o superior a 0,6 M la fosforescencia emitida sólo es el 24,6% de la fosforescencia emitida cuando la concentración es igual o menor a 0,1 M. A partir del valor de 0,6 M la intensidad se mantiene constante hasta que la concentración de NaCl es 1,5 M en cuyo momento inicia un nuevo descenso hasta quedar extinguida cuando la concentración de NaCl es 1,9 M.

Podemos suponer que esta influencia se debe a la competencia que se establece entre los iones salinos (Cl^-) y los aniones de la especie flumequina, una vez que esta se ha desprotonado, por ocupar los espacios existentes en el entramado formado por el polímero que constituye la membrana sensora.

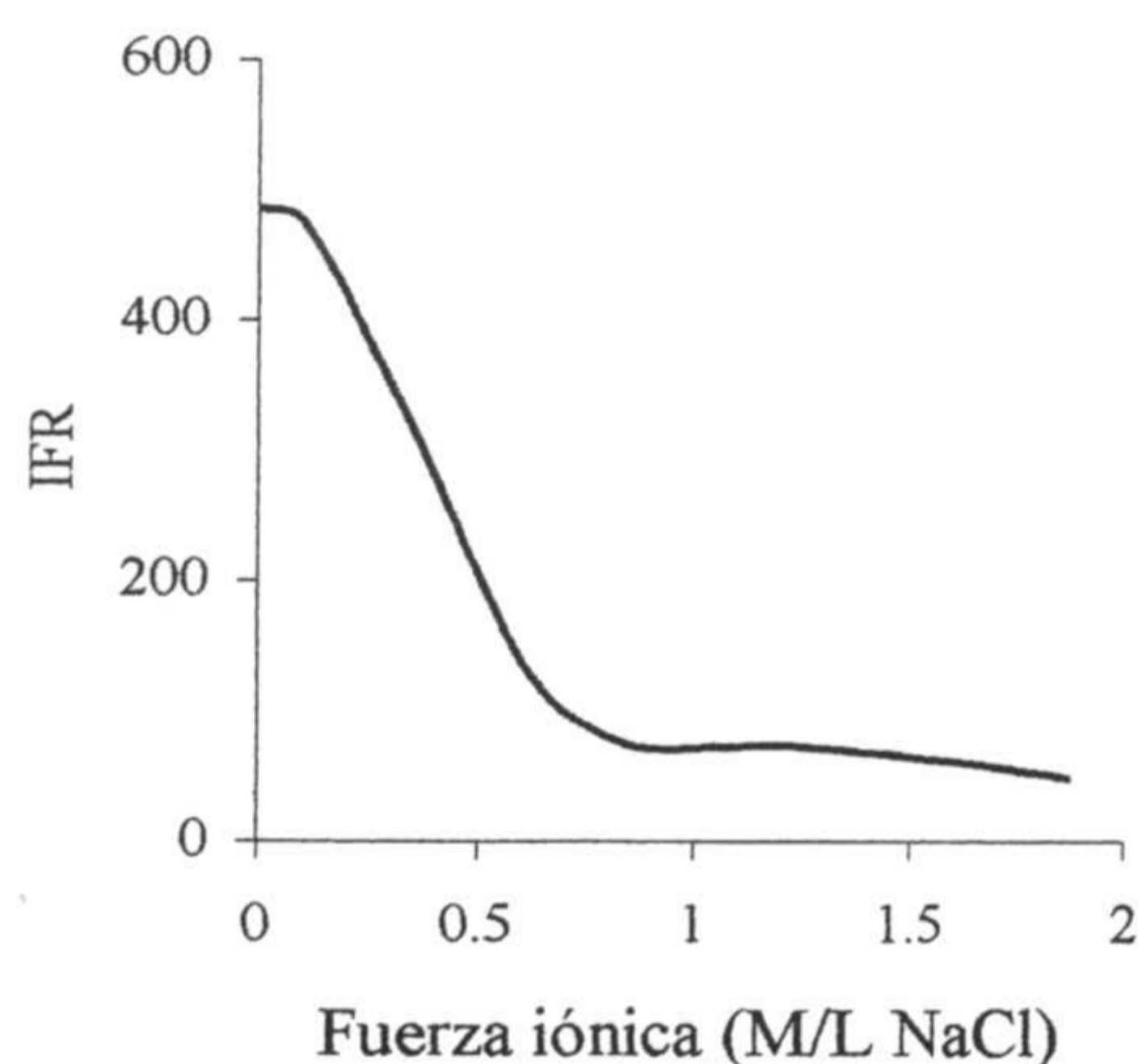


Figura 5. 9. Influencia de la fuerza iónica sobre la fosforescencia emitida por la flumequina.

NaCl (M/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,0	480	491	487	486,0	1,1
0,103	470	478	480	475,9	1,0
0,305	349	354	344	349,2	1,5
0,492	217	211	209	212,2	2,1
0,649	123	115	113	117,1	4,7
0,850	72	74	76	74,1	2,6
1,046	72	76	68	72,1	5,1
1,253	77	80	72	72,1	5,1
1,638	64	62	56	60,4	7,1
1,870	48	50	45	48,0	5,3

Tabla 5.8. Influencia de la fuerza iónica sobre la intensidad de fosforescencia de la flumequina.

5.2.5 Influencia de la atmósfera de N₂ durante la medida.

Este estudio se llevó a cabo equilibrando varios sensores con disoluciones patrón de flumequina, de 1,0 mg/L de concentración, y midiendo la intensidad de fosforescencia que emitían primero en corriente de nitrógeno seco y, seguidamente, bajo la acción atmosférica.

Los resultados experimentales confirman una vez más la necesidad de usar una corriente de nitrógeno durante la medida de la señal ya que la fosforescencia disminuye casi el 90% de su valor inicial cuando se mide con el sensor expuesto a la acción del oxígeno y la humedad atmosféricos.

5.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Finalizada la optimización de las variables experimentales que afectan a la intensidad de fosforescencia, podemos establecer el siguiente procedimiento operativo: a la disolución de muestra se le ajusta el pH a un valor de 9,0 utilizando para ello una disolución de NaOH 0,1M, se le añade la cantidad de acetato de plomo necesaria para que la concentración en metal sea $15 \cdot 10^{-3} \text{M}$ en Pb(II) y se toman 50 mL de la misma que se depositan en un vaso de precipitado de 100 mL.

Introducimos el sensor, sujeto a un soporte sólido, próximo a la pared del vaso y de forma que la corriente de líquido durante la agitación le llegue perpendicularmente y, mediante un agitador magnético, se agita la disolución a una velocidad de 30 rpm durante 120 minutos.

Terminada la operación se coloca el sensor en el interior de un desecador a vacío (≈ 15 mm de Hg) durante 20 minutos y posteriormente se procede a la medida de la fosforescencia transmitida a $\lambda_{\text{exc}} = 358 \text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 459 \text{ nm}$; $t_g = 10 \text{ ms}$ y $t_d = 0,15 \text{ ms}$, bajo una corriente de gas nitrógeno seco.

5.4 PROCESO DE CALIBRACIÓN.

Como hemos dicho anteriormente la fijación de este analito sobre la membrana sensora es un proceso de absorción que podemos considerarlo como una extracción sólido-líquido en la cual la cantidad de especie fijada en la membrana, si las restantes variables se mantienen constantes, es función de la concentración de analito en la disolución y del tiempo de equilibrado.

Por ello, como en casos anteriores, vamos a establecer en primer lugar la dependencia de la señal fosforescente con la concentración, para un tiempo de 120 minutos y, posteriormente, estableceremos las rectas de calibrado, durante diferentes tiempos de equilibrado, con objeto de saber así los rangos lineales de concentración en los que podemos establecer el método.

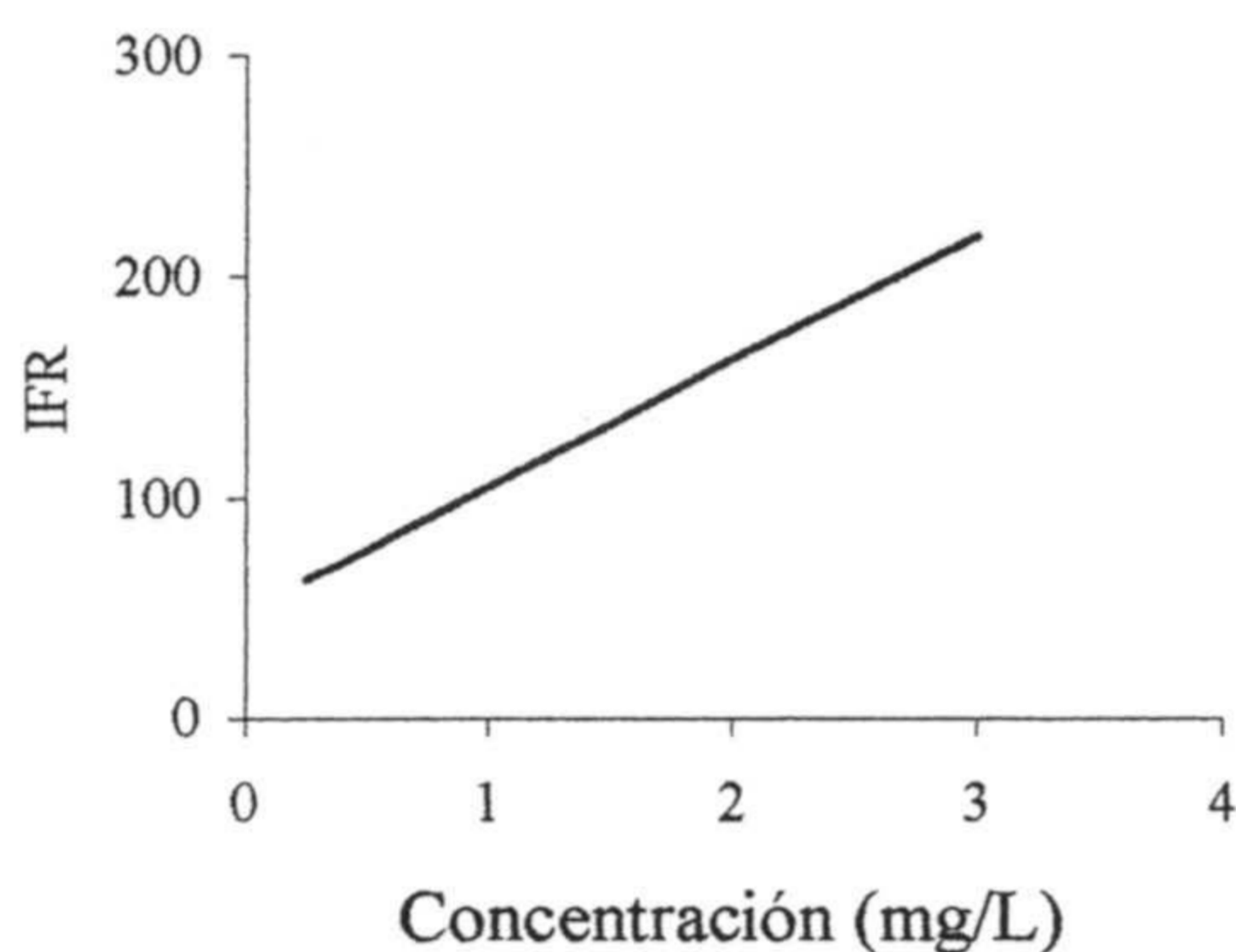
5.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.

Con objeto de establecer la relación concentración-señal analítica se procedió como sigue: en matraces aforados de 50 mL se prepararon varias series de disoluciones patrón de flumequina cuyas concentraciones estaban comprendidas entre 0,1 y 3,0 mg/L. Una vez ajustado el pH y, tras añadir el átomo pesado, se procedió a la fijación del analito sobre los sensores, agitando la disolución a 30 rpm durante diferentes tiempos que variaban entre 15 y 120 minutos. De cada uno de los patrones utilizados se prepararon tres replicados y se utilizó su valor medio para efectuar la representación gráfica. Los resultados experimentales son los que vamos a exponer a continuación. Solo expondremos los resultados obtenidos y las conclusiones que de ellos se puedan derivar.

Curva de calibrado para un tiempo de 15 minutos.

Para un tiempo de fijación de 15 minutos los resultados experimentales son los

que figuran en la tabla 5.9 y se representan en la figura 5.10.



C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,25	78	76	69	74,3	6,1
0,50	77	80	85	80,7	5,1
0,75	88	90	96	91,3	4,6
1,00	93	96	101	96,7	4,2
1,50	136	129	134	133,0	2,8
2,00	160	171	159	163,3	4,1
3,00	219	222	214	218,3	1,8

Figura 5.10. Curva de calibrado de la flumequina para un tiempo de 15 minutos.

Tabla 5.9. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración para un tiempo de fijación de 15 minutos.

En la gráfica de la figura 5,10 podemos comprobar que, exceptuando el primer valor de concentración (0,25 mg/L), existe una cierta linealidad entre concentración y señal analítica, pero la pendiente de la recta es muy pequeña lo que nos indica que el proceso de fijación no ha sido satisfactorio, sobre todo para aquellos patrones de menor concentración. La ecuación de la recta es:

$$IFR = 58,4C + 43$$

y el coeficiente r^2 tiene un valor de 0,9923.

Curva de calibrado para un tiempo de 30 minutos.

Cuando el tiempo de fijación es de 30 minutos los datos obtenidos son los que se incluyen en la tabla 5.10 y en la figura 5.11. En la figura podemos apreciar que el último punto, es decir el de mayor concentración, se encuentra desviado de la recta por lo que no lo hemos incluido en el cálculo de la ecuación de la recta de calibrado que es la siguiente:

$$IFR = 103,4 C + 57 \quad (r^2 = 0,9876).$$

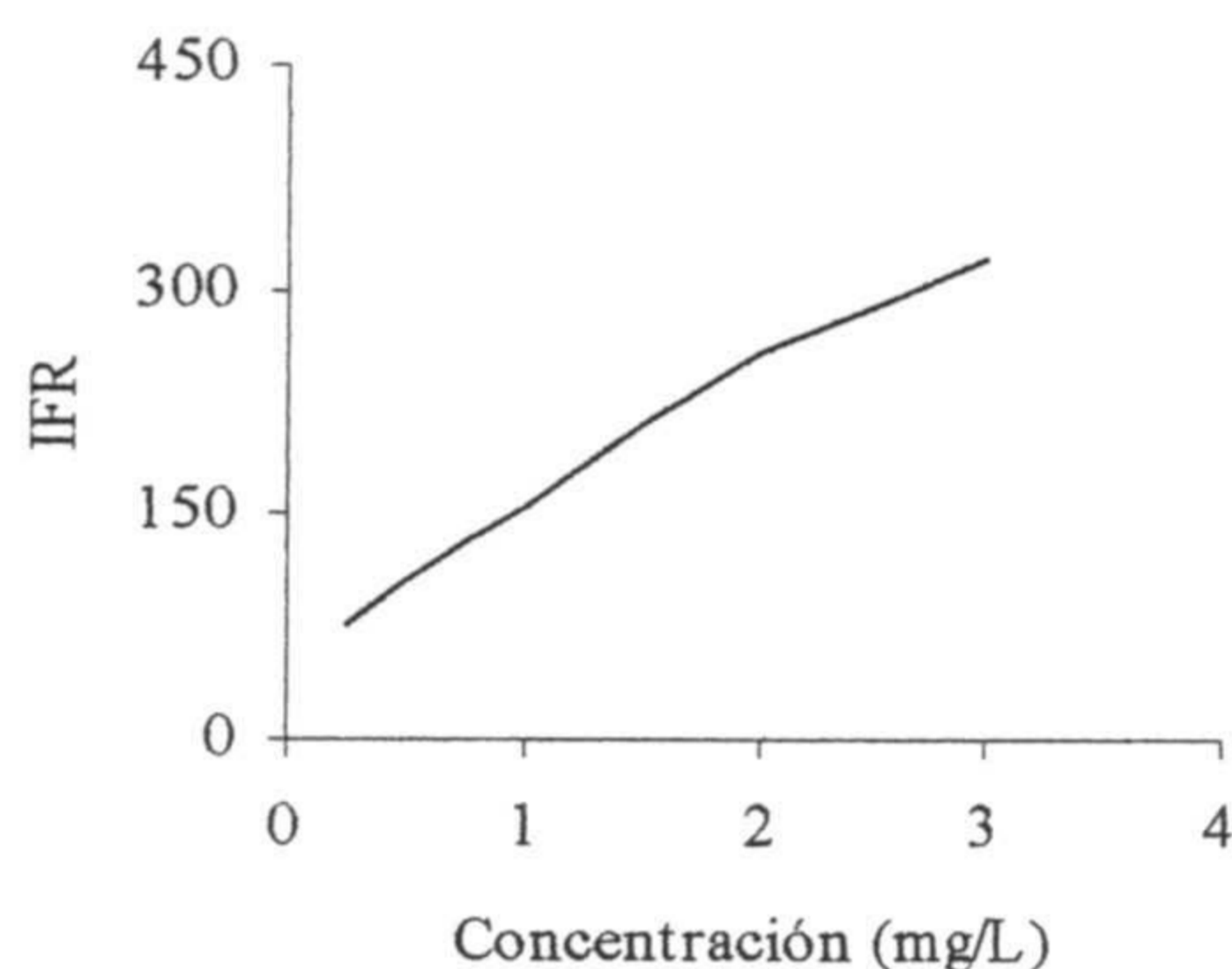


Figura 5.11. Curva de calibrado para un tiempo de fijación de $t = 30$ minutos.

C(mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0.25	82	79	85	82,0	3,6
0.50	118	107	110	111,7	5,2
0.75	130	135	139	134,7	3,4
1.0	156	149	164	156,3	4,8
1.5	216	210	223	216,3	3,0
2.0	260	251	249	253,3	2,3
3.0	312	297	301	303,3	2,6

Tabla 5.10. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito, para un tiempo de fijación de 30 minutos.

Curva de calibrado para un tiempo de 60 minutos.

Los valores de la intensidad de fosforescencia medidos cuando el tiempo de equilibración es de 60 minutos son los que tenemos en la tabla 5.11 que se han representado en la figura 5.12.

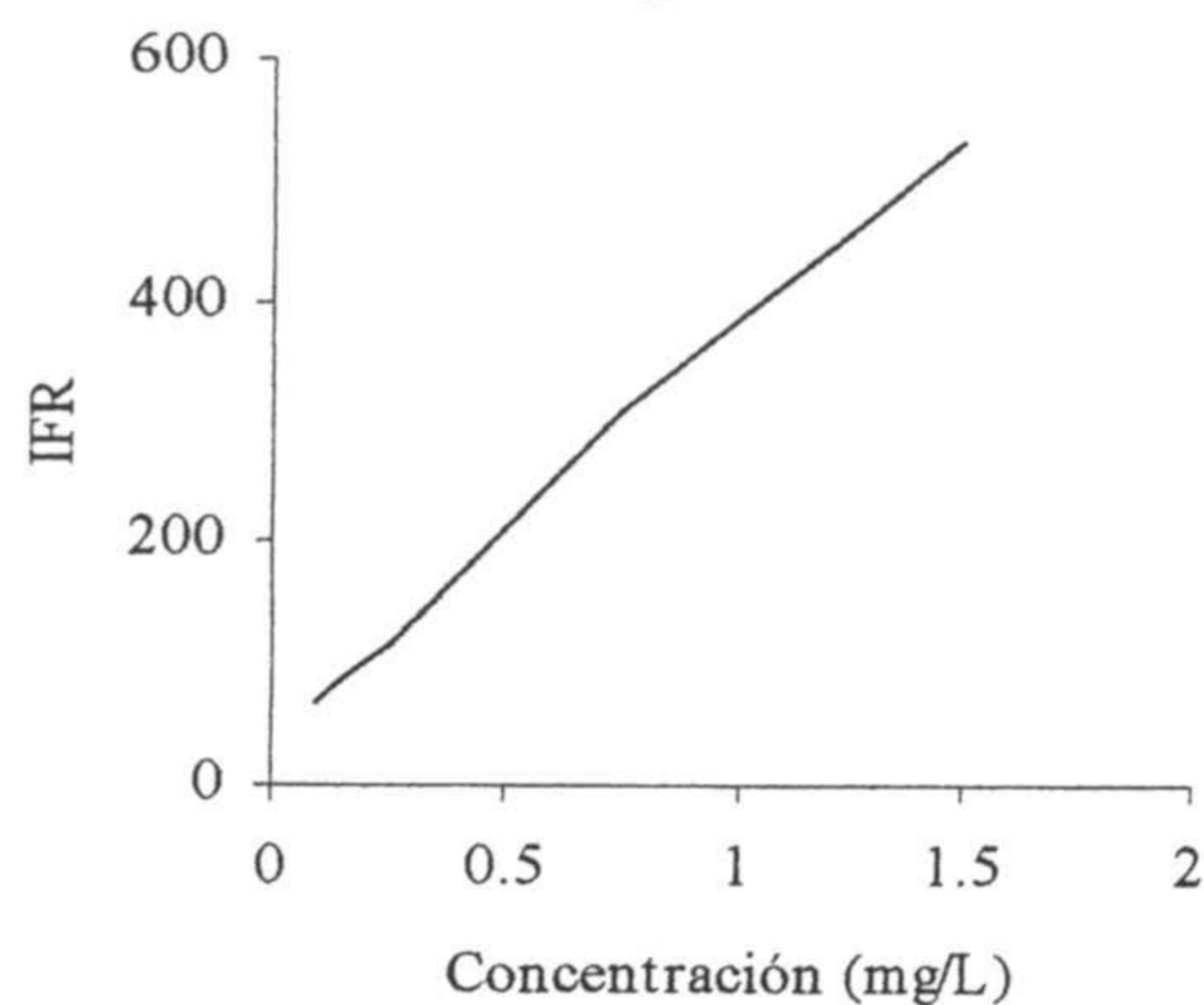


Figura 5.12. Recta de calibrado de la flumequina para un tiempo de equilibración de 60 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER %
0,15	62	59	67	62,7	6,4
0,25	85	88	79	84,0	5,2
0,50	146	139	151	145,3	4,1
0,75	208	200	213	207,0	3,3
1,00	272	281	268	273,7	2,4
1,50	385	378	380	381,0	0,9
2,00	506	501	488	498,3	1,8

Tabla 5.11. Valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito. Tiempo de agitación 60 minutos.

Utilizando los datos de la tabla 5.11 podemos calcular una ecuación de la recta de ajuste: $IFR = 241,0 C + 26$ ($r^2 = 0,9993$).

Curva de calibrado para un tiempo de 90 minutos.

Cuando utilizamos 90 minutos como tiempo de fijación, los valores experimentales son los de la tabla 5.12 que se representan en la figura 5.13. La ecuación de la recta de ajuste es: $IFR = 327,3 C + 45$ ($r^2 = 0,9958$).

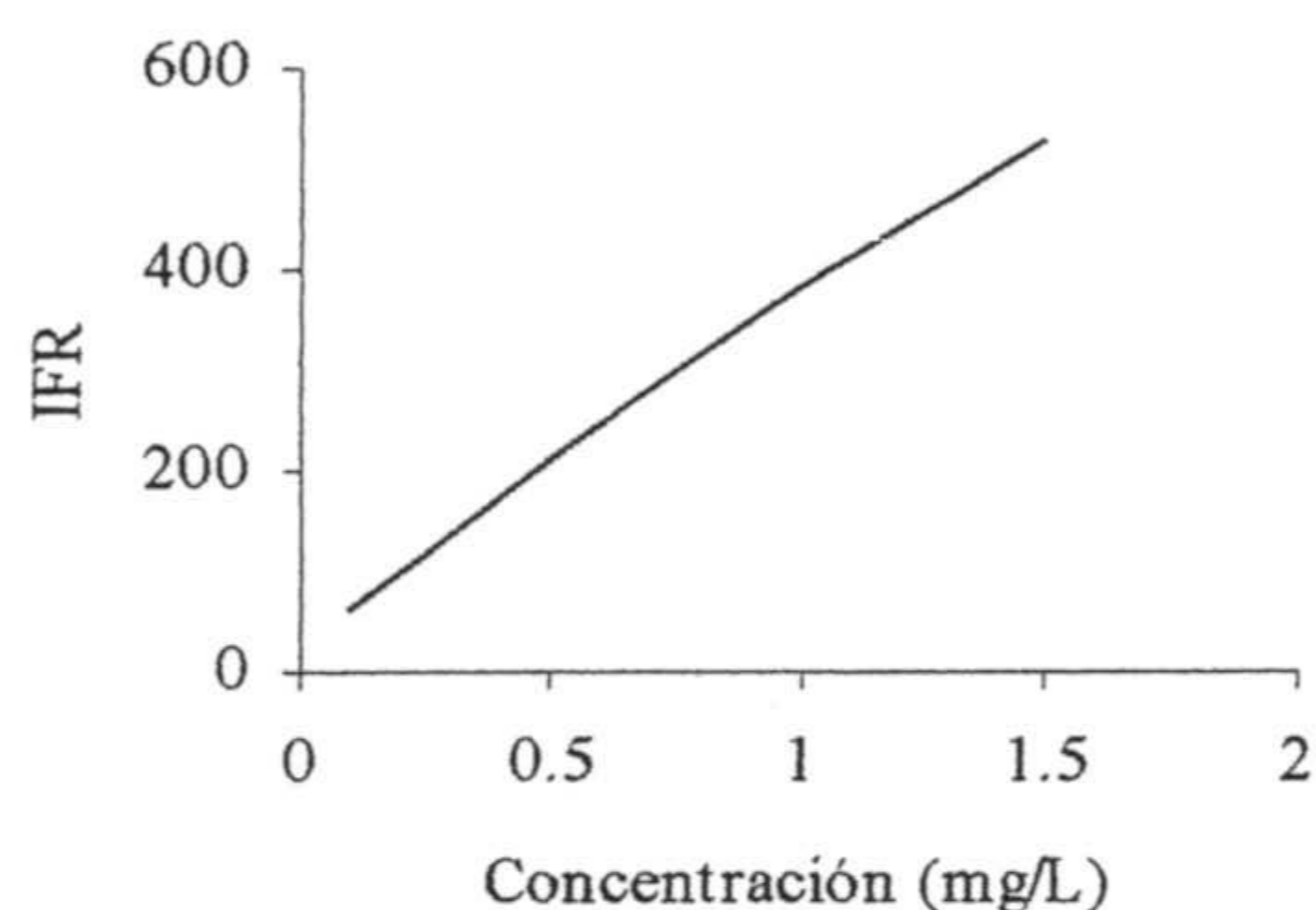


Figura 5.13. Recta de calibrado de la flumequina para un tiempo de equilibrio de 90 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,10	78	71	69	72,7	6,6
0,15	93	98	89	93,3	4,8
0,25	119	110	121	116,7	5,1
0,50	205	214	218	212,3	3,1
0,75	302	320	299	307,0	3,7
1,00	383	378	391	384,0	1,7
1,50	526	510	517	517,7	1,6

Tabla 5.12. Relación entre intensidad de fosforescencia y concentración para $t = 90$ minutos

Curva de calibrado para un tiempo de 120 minutos.

En el caso de un tiempo de fijación de 120 minutos se obtuvieron los resultados que se representan en la figura 5.14 que corresponden a los valores incluidos en la tabla 5.13.

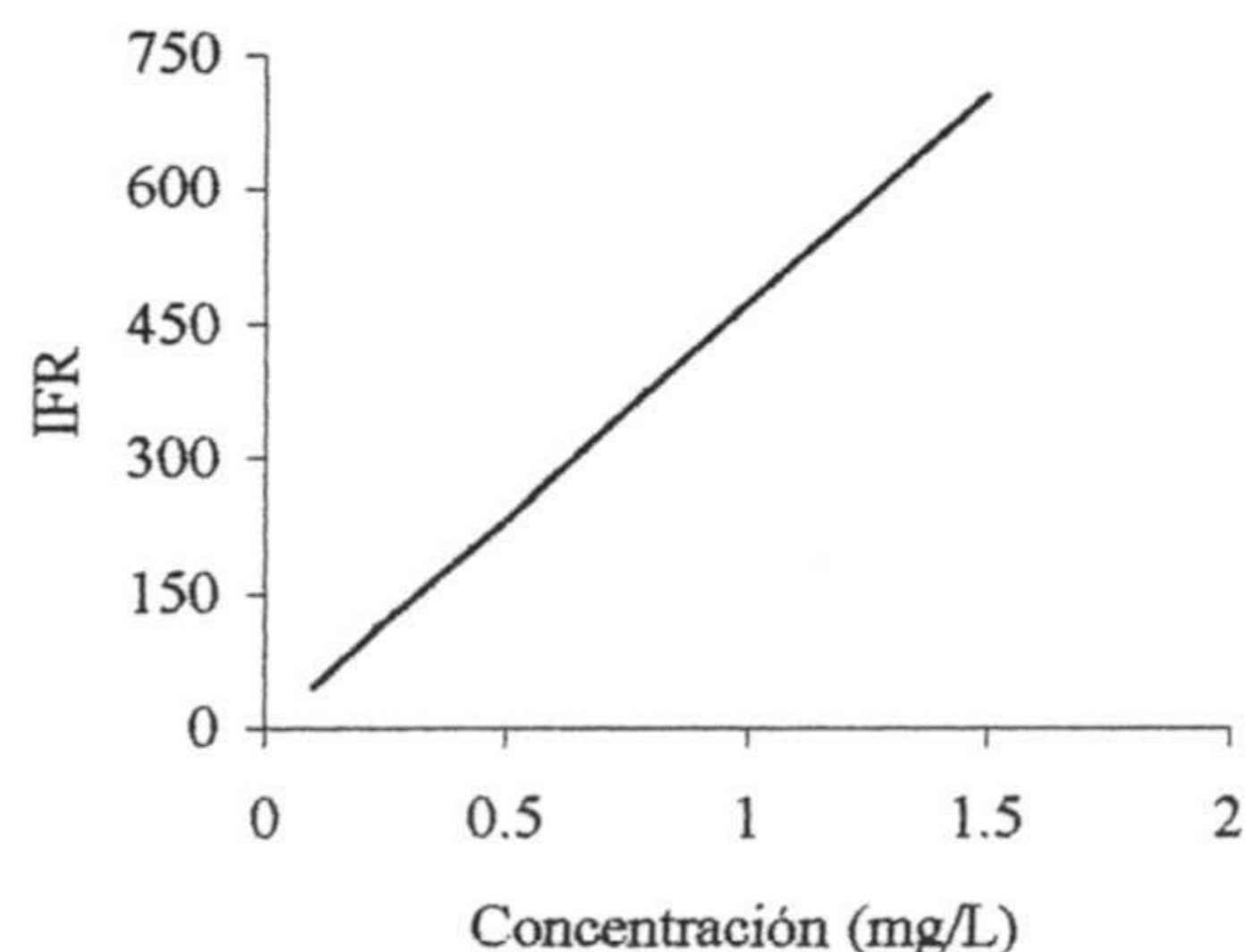


Figura 5.14. Recta de calibrado para un tiempo de 120 minutos.

C (mg/L)	IFR1	IFR2	IFR3	IFRM	DER (%)
0,10	48	53	41	47,3	12,8
0,25	121	115	120	118,7	2,7
0,50	230	221	241	230,7	4,3
0,75	351	348	362	353,7	2,1
1,00	472	463	485	473,3	2,4
1,50	700	689	721	703,3	2,3

Tabla 5.13. Relación entre intensidad de fosforescencia y concentración ($t = 120$ minutos).

El ajuste de los datos de la tabla 5.13 nos proporciona una recta de ajuste cuya ecuación es la siguiente: $IFR = 466,3 C + 2$ ($r^2 = 0,9997$).

5.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.

Con los resultados del apartado anterior podemos confeccionar la siguiente tabla comparativa:

Tiempo	Pendiente	Ordenada	Lím. Superior (mg/L)
15 min	54,8	43	3,0
30 min	103,4	57	2,5
60 min	241,0	26	2,0
90 min	327,3	45	1,5
120 min	466,3	2	1,5

Tabla 5.14. Valores de las pendientes, ordenadas en el origen y límites superiores de la distintas rectas de calibrado para diferentes tiempos de equilibrado.

En la que podemos observar que al aumentar el tiempo de fijación del analito sobre el sensor se incrementa la pendiente de la recta de calibrado a la vez que disminuye el límite superior donde dicha recta pierde la linealidad.

Otros parámetros analíticos

Repetitividad del blanco. Se prepararon diez blancos y se procedió a su medida, obteniéndose los valores que figuran en la tabla 5.15, de los que obtenemos un valor medio de señal emitida de 31,08, una desviación estándar de 2,44 y un valor de la desviación estándar relativa (expresada como porcentaje) de 7,7 %.

Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	32,0	33,0	35,7	29,8	30,6	27,7	29,6	33,7	30,0	28,9

Tabla 5.15. Valores de la señal emitida por diez blancos del sensor.

Límites de detección y cuantificación:

Conocida la desviación estándar del blanco y según el criterio de la IUPAC, los límites de detección y cuantificación y el rango dinámico del método para los diferentes tiempos de fijación, son los que figuran en la tabla 5.16 que insertamos a continuación.

Tiempo	L _D (mg/L)	L _C (mg/L)	Rango dinámico (mg/L)
15 min	0,124	0,416	0,5-3,0
30 min	0,071	0,273	0,3-2,5
60 min	0,030	0,101	0,1-2,0
90 min	0,022	0,075	0,1-1,5
120 min	0,015	0,052	0,1-1,5

Tabla 5.16. Valores de los parámetros analíticos: límite de detección, límite de cantificación y rango dinámico lineal, para los diferentes tiempos de fijación de la flumequina sobre la membrana sensora.

Precisión del método.

La precisión del método la vamos a calcular como la desviación estándar de una serie medidas realizadas con disoluciones patrón de una concentración intermedia del rango lineal. Concretamente, la desviación estándar se calculó en una serie de medidas de diez patrones cuya concentración era en todos los casos 0,75 mg/L empleando un tiempo de equilibración de 120 minutos para efectuar la fijación del analito. Los resultados encontrados son los que figuran en la tabla 5.17, con los que podemos calcular un valor medio de la medida de 471,3, una desviación estándar de 2,1 y una desviación estándar relativa de 0,5 %, por lo que podemos decir que el método presenta una buena precisión.

Patrón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	475	471	470	473	470	473	469	472	468	472

Tabla 5.17. Intensidad de fosforescencia de una serie de diez medidas efectuadas con patrones de flumequina de 0,75 mg/L⁻¹ de concentración y un tiempo de equilibración de 120 minutos.

5.5 ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

El estudio de las interferencias producidas por otros fármacos en la determinación de la flumequina se efectuó de forma similar a la utilizada en capítulos anteriores, es decir, se prepararon disoluciones de flumequina de 1,0 mg/L en las que, además de los reactivos necesarios para el desarrollo de la fosforescencia, se añadieron cantidades crecientes de la especie potencialmente interferente, equilibrando posteriormente dichas disoluciones con los respectivos sensores, según el procedimiento descrito con anterioridad.

Actuando de esta forma pudimos comprobar que la interferencia más acusada es la producida por el ácido piromídico ya que una cantidad superior a 0,1 mg/L produce un error superior a 8% en la determinación de 1,0 mg/L de flumequina. Las restantes especies ensayadas: ácidos nalidíxico, pipemídico y oxolínico no producen errores estando presentes en concentraciones de, al menos, 3,0 mg/L.

5.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.

Para la aplicación del método al análisis de casos reales se tomaron muestras de leche de vaca y orina humana, en las que es posible la existencia de trazas de flumequina debido al uso del fármaco en veterinaria.

5.5.1. Determinación de flumequina en muestras de orina humana.

En las muestras utilizadas no se detectó la presencia del fármaco en ningún caso, o bien la cantidad presente es inferior al límite de detección del método propuesto. Por ello decidimos realizar un estudio de recuperación del analito en muestras previamente manchadas con una cantidad conocida del mismo. Las concentraciones de analito en las tres series de muestras fueron 0,25, 0,75 y 1,50 mg/L y el tiempo de equilibración 120 minutos.

En la tabla 5.18 hemos incluido los resultados obtenidos experimentalmente, así como los porcentajes de recuperación de cada caso.

Como vemos en la citada tabla, las cantidades recuperados son todas ellas muy próximas al 100%.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,25	128,7	0,26	104,0
0,25	125,0	0,25	100,0
0,25	129,0	0,26	104,0
0,75	355,5	0,75	100,0
0,75	359,7	0,76	101,3
0,75	358,5	0,76	101,3
1,50	698,0	1,49	99,3
1,50	703,5	1,50	100,0
1,50	705,5	1,51	100,7

Tabla 5.18. Estudio de recuperación llevado a cabo con flumequina en orina humana.

El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 120$ min.

IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

5.5.2. Determinación de flumequina en muestras de leche de vaca.

En las muestras de leche de vaca ocurrió lo mismo que en las de orina humana, es decir, no se detectó analito en ellas o la cantidad presente era inferior al límite de detección del método, razón por la que procedimos a efectuar un estudio de recuperación, utilizando muestras en las que previamente habíamos colocado cantidades conocidas de flumequina. Estas cantidades fueron 0,25, 0,75 y 1,5 mg/L, siendo 120 minutos el tiempo empleado en la equilibración de los sensores con las disoluciones de muestra. Aplicando la metodología ya conocida, se obtuvieron los resultados que figuran en la tabla 5.19.

Como podemos apreciar las cantidades de analito recuperados se encuentran entre un 99,5 % y un 103,9 % siendo las desviaciones estándar relativas: 1,9 (1,7%) para las muestras de menor concentración en analito, 2,2 (0,6%) para las muestras de concentración intermedia y 3,8 (0,5%) para las más concentradas.

Añadido (mg/L)	IFRM	Encontrado (mg/L)	Recuperado (%)
0,25	129,3	0,26	103,9
0,25	125,6	0,25	100,8
0,25	126,6	0,26	104,3
0,75	356,4	0,75	100,2
0,75	359,0	0,76	101,4
0,75	359,7	0,76	101,0
1,50	698,8	1,49	99,5
1,50	702,2	1,51	100,3
1,50	709,3	1,51	100,6

Tabla 5.19. Valores correspondientes al estudio de recuperación de flumequina en muestras de leche de vaca.

El valor que figura como encontrado es el calculado a partir de la recta de calibrado para $t = 120$ min.

IFRM corresponde a la media de tres medidas replicadas.

CAPÍTULO 6

***ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS NALIDÍXICO Y PIROMÍDICO
MEDIANTE ESPECTROFOSFORIMETRÍA SINCRÓNICA
USANDO UN SENSOR DESECHABLE***

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

6.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES	226
6.1.1. Espectros de fosforescencia total	226
6.1.2. Topograma de curvas de fosforescencia	227
6.1.3. Elección del intervalo de longitudes de onda del espectro sincrónico	228
6.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	229
6.2.1. Optimización de los componentes de la membrana.	230
6.2.2. Optimización del tiempo y velocidad de agitación de la disolución	230
6.3. PROCESO DE CALIBRADO	232
6.3.1. Parámetros analíticos	235
6.3.2. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado	235
6.3.3. Rectas de calibrado del ácido piromídico	236
6.3.4. Parámetros analíticos.	238
6.3.5. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado.	238
6.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO	239
6.5.1. Determinación de piromídico y nalidíxico en orina humana	239
6.5.2. Determinación de piromídico y nalidíxico en leche de vaca	243

Los dos fármacos que vamos a estudiar conjuntamente en este capítulo, han sido estudiados por separado en capítulos anteriores y, por ello, aquí no vamos a hacer una descripción de sus características como hemos hecho en anteriores casos.

Hemos de aclarar que el estudio que vamos a realizar en el presente capítulo no obedece a un problema analítico de los que pudiéramos llamar reales, ya que no existe ningún preparado farmacéutico, que nosotros sepamos, para uso médico o veterinario que contenga ambos fármacos, por lo que, en principio, no parece ser necesaria su determinación conjunta. No obstante, dado que en veterinaria en general, y más concretamente en el caso del ganado vacuno, está bastante extendido el uso de ambos antibióticos y, por otra parte, el control realizado sobre dicho uso no es todo lo deseable que debería ser, es posible que al mezclar leches de diferente procedencia en cualquier planta de derivados lácteos, se nos presente el problema de la existencia de pequeñas cantidades de ambos analitos.

A pesar de todo, nuestro interés en este estudio también presenta un aspecto teórico ya que intentamos demostrar la posibilidad de usar métodos quimiométricos tales como la espectrofosforimetría sincrónica, a la resolución de problemas analíticos, derivados del solapamiento de espectros de fosforescencia en matrices especiales como son los sensores de absorción que venimos estudiando a lo largo de esta Memoria. En efecto los ácidos nalidíxico y piromídico, como hemos visto en capítulos anteriores de esta Memoria, presentan espectros muy semejantes y se interfieren mutuamente en la determinación que de ellos hacemos usando los sensores desechables que hemos descrito.

6.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

Para conocer las características espectrales de estos dos analitos y obtener los espectros sincrónicos de cada uno de ellos por separado así como de la mezcla de ambos, se registraron sus espectros de fosforescencia total de los que, posteriormente, se obtuvieron los respectivos topogramas o mapas de curvas de isofosforescencia.

6.1.1. Espectros de fosforescencia total.

Los espectros de fosforescencia total de los ácidos nalidíxico y piromídico, tanto de la mezcla como los dos espectros individuales, fijados sobre la membrana del sensor, se obtuvieron bajos las siguientes condiciones instrumentales:

	NA.	PIR.	MEZ.
Intervalo de longitudes de onda de exc.	280-360	260-330	250-360
Intervalo de longitudes de onda de emis.	350-460	350-600	350-500
Espaciado entre barridos de excitación (nm)	10	10	10
Rendija de excitación (nm)	2,5	2,5	2,5
Rendija de emisión (nm)	15	15	15
Velocidad de barrido (nm/min)	240	240	240

Los resultados obtenidos, nos permiten observar que el ácido nalidíxico presenta un máximo de emisión situado a una longitud de onda $\lambda_{\max} = 449$ nm siendo su longitud de onda de excitación 330 nm. Por su parte el ácido piromídico presenta un máximo de emisión a 421 nm cuando se excita a 219 nm, mientras que la mezcla de ambas especies presenta los dos máximos correspondientes a ambos analitos, sin que varíen sus valores, pero con un cierto grado de solapamiento.

6.1.2. Topograma de curvas de isofosforescencia.

El topograma de curvas de isofosforescencia (figura 6.1) es una representación plana de las características fundamentales de los espectros tridimensionales de luminiscencia total, lo que nos permite establecer la forma más idónea de obtener espectros bidimensionales con los que determinar uno cualquiera de los analitos, en presencia del otro, sin que se produzcan interferencias.

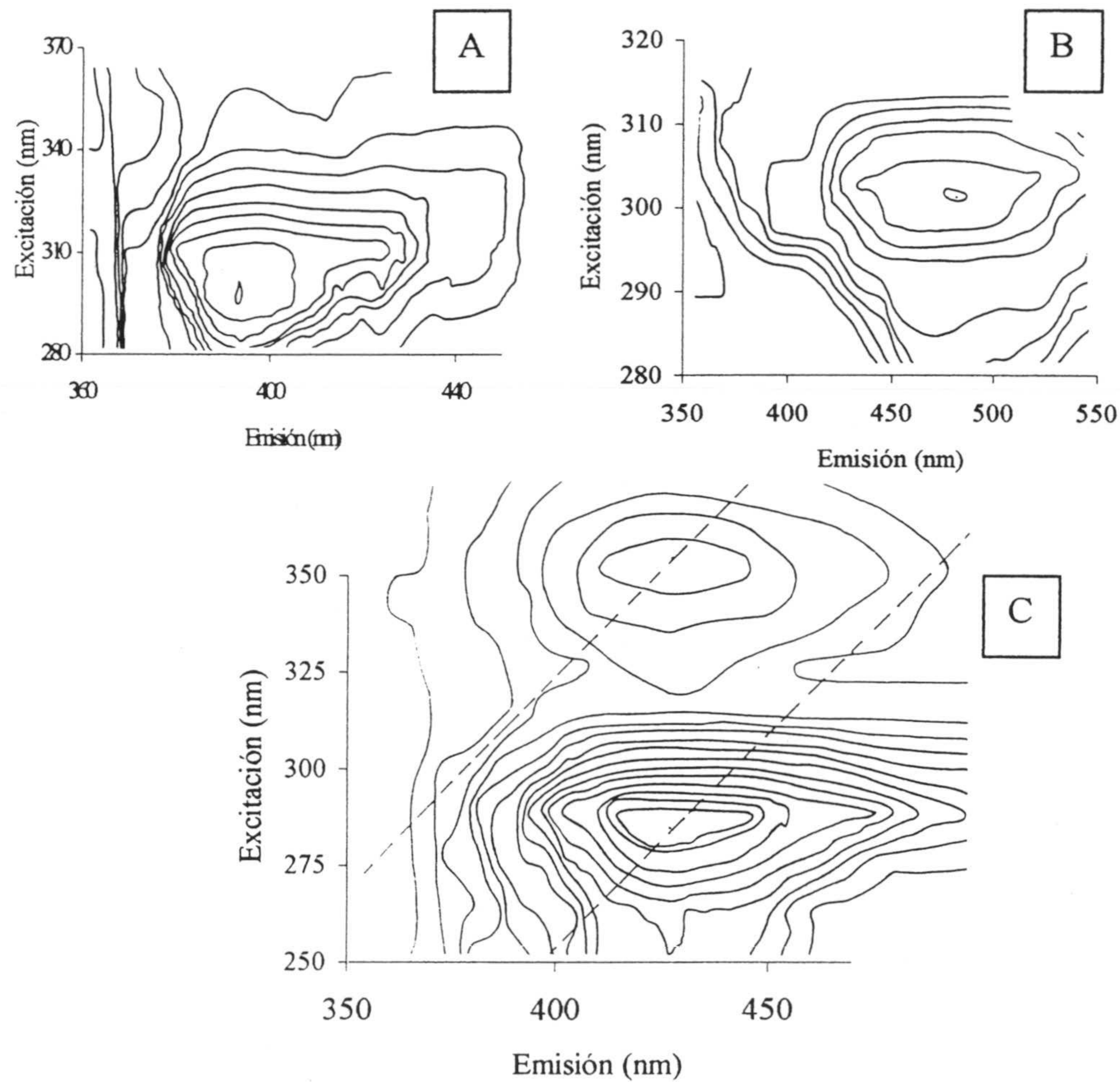


Figura 6.1 Topogramas de fosforescencia total de los ácidos nalidíxico (A), piromídico (B) y de su mezcla (C)

6.1.3. Elección del intervalo de longitudes de onda del espectro sincrónico.

En el topograma correspondiente a la mezcla de los dos analitos (Figura 6.1 C) podemos observar que trazando una línea recta que forme un ángulo de 45° con los ejes coordenados y que pase por el máximo de emisión correspondiente al ácido nalidíxico, a los puntos de corte de dicha recta con las líneas del topograma, incluido el máximo de emisión, le corresponden longitudes de onda de excitación y emisión que se diferencian en 90 nm, por lo que un espectro sincrónico del ácido nalidíxico en presencia de ácido piromídico, deberá realizarse con un intervalo en las longitudes de onda de 90 nm, para que no exista solapamiento espectral que origine interferencias al analizar ambas especies. Por consiguiente, el espectro sincrónico del ácido nalidíxico, en presencia de ácido piromídico, deberá realizarse efectuando un barrido sincrónico desde el punto 280/370 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) hasta el

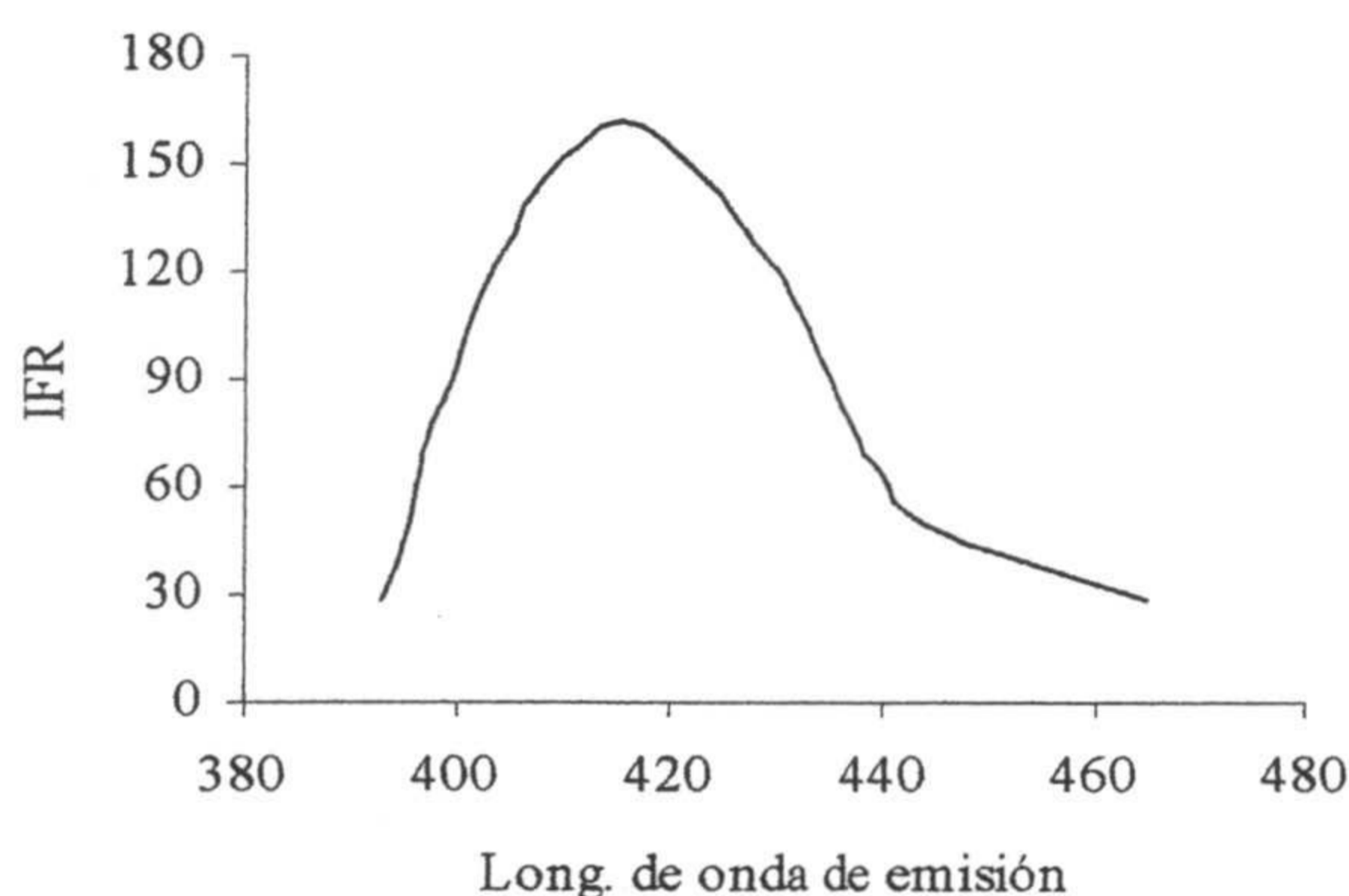


Figura 6.2. Espectro sincrónico del ácido nalidíxico. En el eje de abscisas sólo se ha representado la longitud de onda de emisión.

punto 300/390 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) con un intervalo de longitudes de onda $\Delta\lambda = 90$ nm.

En el caso del ácido piromídico, actuando de forma idéntica, podemos calcular la diferencia entre las longitudes de onda de excitación y emisión, para registrar su espectro sincrónico, que será $\Delta\lambda = 140$ nm, dando comienzo en el punto

250/390 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$) y finalizando en el 360/500 nm ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$).

Los espectros sincrónicos obtenidos con los incrementos de longitudes de onda que acabamos de calcular, son los que podemos ver en la figura 6.2 donde se aprecia que ambos espectros se encuentran totalmente separados entre sí, por lo

que podremos determinar cualquiera de los dos analitos en presencia del otro, si usamos su correspondiente espectro sincrónico.

6.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.

En este apartado vamos a estudiar la influencia que ejercen las diferentes variables experimentales sobre la intensidad de fosforescencia de la mezcla de ambos analitos al utilizar sus espectros sincrónicos.

Como en capítulos anteriores, las variables que potencialmente pueden influir sobre la intensidad de fosforescencia emitida, las vamos a clasificar en tres grandes grupos: el primero de ellos estará formado por variables instrumentales tales como, anchura de rendijas y velocidad de barrido. En segundo lugar tenemos las variables que afectan al proceso de fijación de los analitos, donde estudiaremos la influencia que ejercen la forma y velocidad de agitación de la disolución y el tiempo durante el cual se realiza la fijación de los analitos y, finalmente, estudiaremos la influencia de variables que dependen de las características fisicoquímicas de la disolución de muestra que se equilibra con el sensor, en cuyo grupo estudiaremos variables tales como pH y fuerza iónica del medio. No vamos a estudiar el efecto que pudiera producir la presencia de átomo pesado ya que, como vimos en los correspondientes capítulos, estos analitos no necesitan la presencia de especies químicas pesadas o voluminosas para desarrollar su fosforescencia.

Tampoco vamos a estudiar la influencia de aquellas variables experimentales cuyos valores óptimos son los mismos para ambos analitos como son los casos de las variables: volumen de gota de mezcla depositada para construir el sensor, orden de adición de dichos reactivos, tiempo de secado de la membrana, tiempo de retraso (t_d) y de apertura del detector (t_g), anchura de las rendijas de excitación y emisión o pH y fuerza iónica de la disolución ya que, en este último caso, como

vimos en su momento, la fuerza iónica debe ser inferior a 0,1 M en NaCl para que la medida no esté afectada.

En consecuencia, únicamente nos quedan por estudiar las influencias que ejerzan las siguientes variables: composición de la membrana y tiempo y velocidad de agitación de la disolución para que se produzca el proceso de fijación de los analitos sobre la membrana sensora.

6.2.1. Optimización de los componentes de la membrana.

Como vimos en los capítulos 2 y 4 de esta Memoria, las membranas sensoras utilizadas para retener los ácidos nalidíxico y piromídico por separado tienen las siguientes composiciones óptimas: Cantidad de CPV 50 mg para nalidíxico y 60 para piromídico y las cantidades de tributilfosfato fueron 0,5 mL para nalidíxico y 0,6 mL para piromídico, siendo idénticos los valores de las restantes variables propias de la membrana sensora.

Para la optimización de estas variables se decidió estudiar el comportamiento de ambos analitos con cada una de las membranas cuya composición era la correspondiente al otro analito, para conocer así cuál de los dos tipos de membrana era más eficaz en la retención de ambas especies.

Experimentalmente pudimos comprobar que el comportamiento de ambas membranas era muy similar aunque utilizando la membrana propia del ácido nalidíxico los resultados obtenidos eran ligeramente mejores que los obtenidos con la membrana correspondiente al ácido piromídico.

6.2.2. Optimización del tiempo y velocidad de agitación de la disolución.

En primer lugar se estudió la influencia del tiempo de agitación de la disolución de muestra, durante el proceso de fijación de los analitos, sobre la fosfores-

cencia emitida y, para ello, se utilizaron disoluciones que contenían 1,50 mg/L de ácido nalidíxico y 0,125 mg/L de ácido piromídico y se procedió a su equilibración con sensores, durante diferentes intervalos de tiempo, manteniendo en todos los casos una velocidad de agitación de 60 r.p.m. Las medidas se efectuaron utilizando los espectros sincrónicos de ambas especies obtenidos bajo las condiciones experimentales que anteriormente hemos estudiado. Los resultados obtenidos son los que figuran en la tabla 6.1.

Tiempo (min)	15	30	45	60	90	120
Nalidíxico	37	75	114	120	122	119
Piromídico	103	280	320	318	308	296

Tabla 6.1. Valores de la intensidad de fosforescencia en función del tiempo de fijación de los dos analitos sobre el sensor.

Como podemos apreciar en la tabla 6.1 al aumentar el tiempo de equilibración entre la disolución de muestra y el sensor, aumenta paralelamente la señal emitida por cualquiera de los dos analitos, hasta llegar al tiempo de 45 minutos en cuyo momento la intensidad de fosforescencia no sigue aumentando sino que se mantiene constante, en el caso del ácido nalidíxico, o disminuye ligeramente como es el caso del ácido piromídico. Por lo tanto, hemos seleccionado el tiempo de 45 minutos como valor óptimo para efectuar la fijación de ambas especies sobre las superficies sensoras.

Seguidamente se procedió al estudio de la influencia de la velocidad de agitación de la disolución de muestra, durante el proceso de fijación, sobre la fosforescencia emitida. Para ello realizamos una serie de experiencias, similares a las efectuadas en capítulos anteriores, en las que manteniendo una velocidad de agita-

ción de 45 minutos y utilizando, en este caso, los espectros sincrónicos de las especies en estudio, se equilibraron diferentes sensores a velocidades comprendidas entre 15 y 90 rpm. Los resultados obtenidos nos demuestran una vez más que la velocidad de agitación óptima es 60 rpm, ya que a velocidades superiores a este valor la intensidad de fosforescencia no aumenta e incluso disminuye ligeramente si la velocidad de agitación alcanza el valor de 90 rpm.

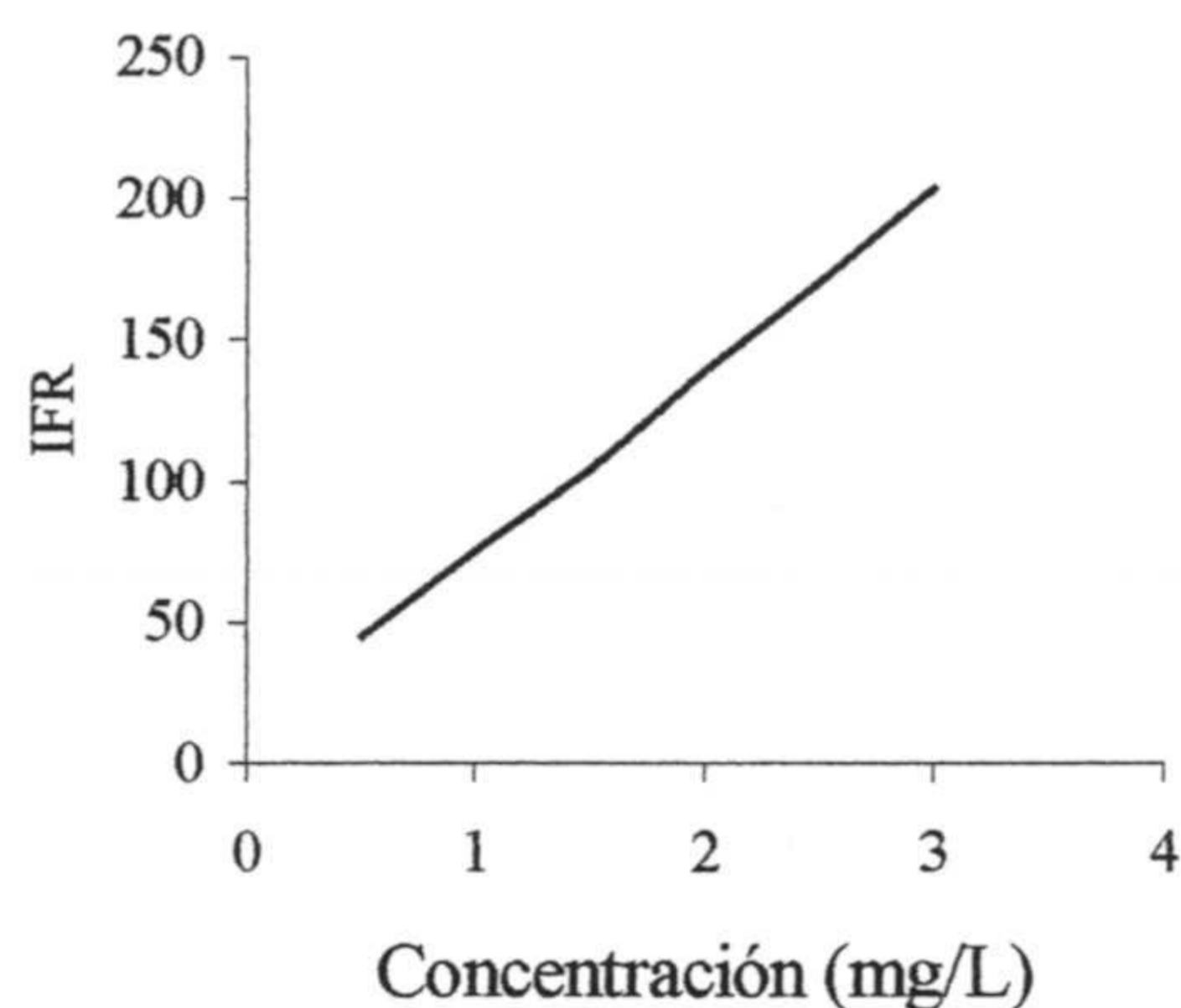
6.3. PROCESO DE CALIBRADO.

El proceso de obtención de las respectivas rectas de calibrados de ambos analitos fijados sobre los correspondientes sensores se llevó a cabo utilizando los respectivos espectros sincrónicos de fosforescencia, registrados bajo las condiciones instrumentales reseñadas anteriormente, y utilizando para ello disoluciones de ambos analitos en concentraciones variables. Las condiciones experimentales de preparación de los sensores, equilibración de los mismos con las disoluciones de patrones y medida de la fosforescencia fueron las que anteriormente hemos utilizado.

La forma de proceder para la preparación de las disoluciones patrón fue la siguiente: En el caso del ácido nalidíxico se obtuvieron tres rectas de calibrado a partir de sensores equilibrados con disoluciones de ácido nalidíxico cuya concentración variaba entre 0,5 y 3,0 mg/L. En la primera recta todos los patrones llevaban, además del correspondiente ácido nalidíxico, 0,03 mg/L de ácido piromídico, cantidad esta que corresponde a una concentración baja del rango lineal de este analito. En la segunda recta la concentración de ácido piromídico correspondía a un valor intermedio de dicho rango, 0,13 mg/L y en la tercera la concentración de piromídico era 0,17 mg/L que corresponde a un valor alto del rango lineal.

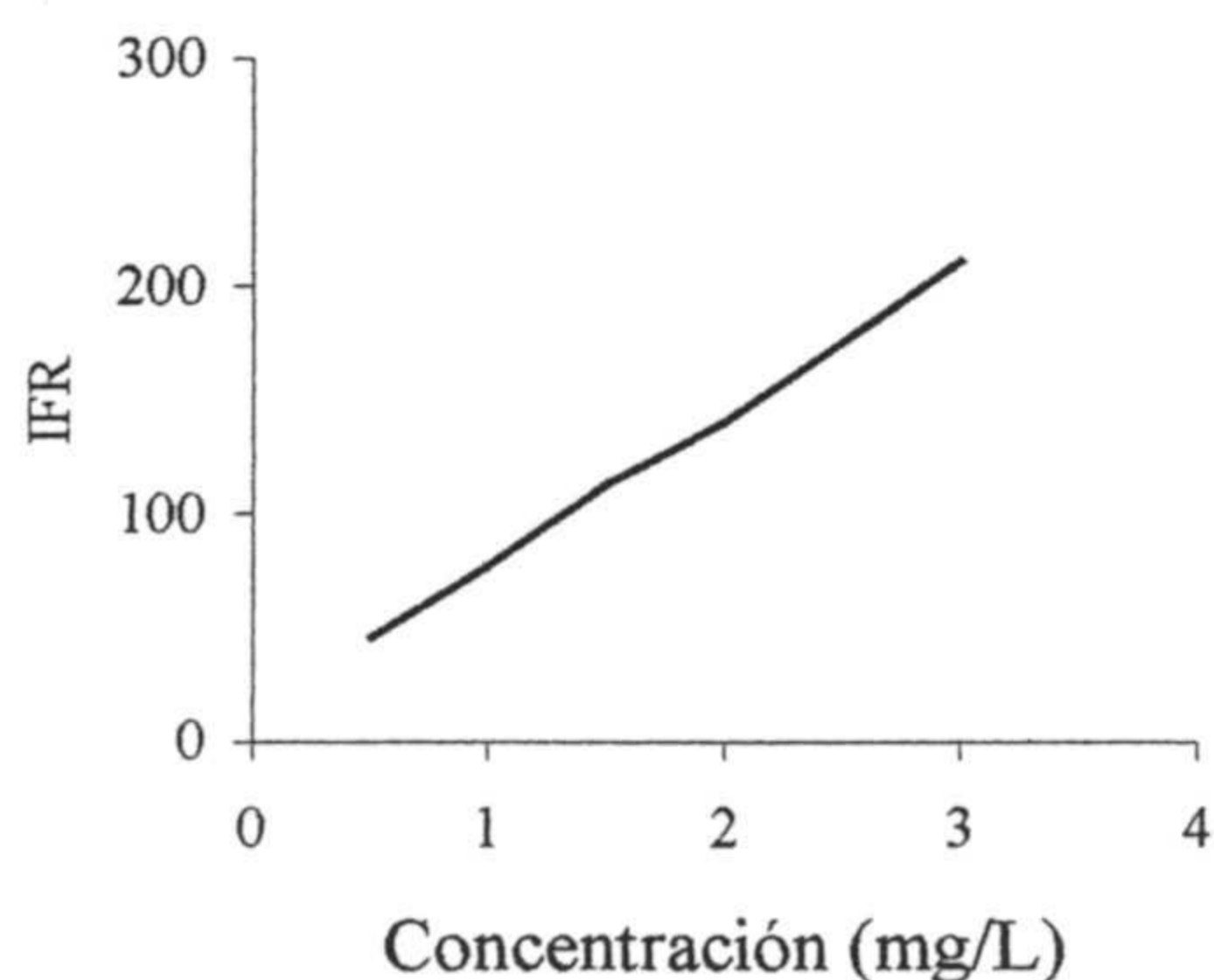
En el caso de obtener las tres rectas de calibrado del ácido piromídico, las

forma de proceder fue la misma y se prepararon patrones de ácido piromídico de concentración comprendida entre 0,03 y 0,15 mg/L, añadiéndole cantidades de ácido nalidíxico de 0,5, 1,5 y 2,0 mg/L, que corresponden a concentraciones baja media y alta de su rango lineal. Una vez obtenidos los valores de la intensidad de fosforescencia correspondiente a cada patrón las rectas de calibrado se obtuvieron ajustando los puntos experimentales mediante el método de mínimos cuadrados. Los resultados obtenidos son los que podemos ver en la tablas y figuras que insertamos a continuación:



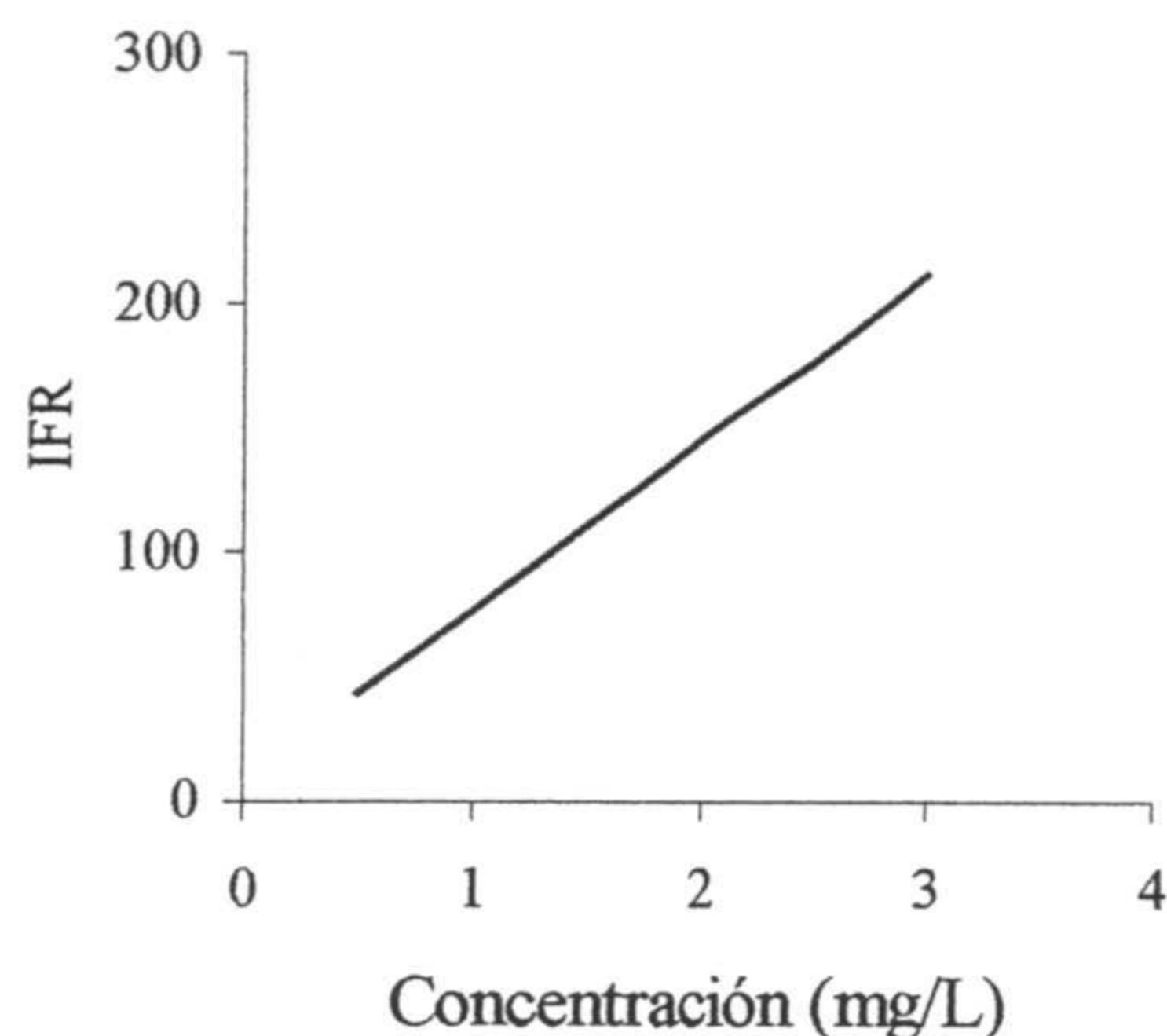
NA (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,5	44,9	2,8
1,0	75,1	3,2
1,5	112,3	3,2
2,0	139,9	2,2
2,5	178,3	1,8
3,0	209,6	3,9

Tabla 6.2. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de ácido nalidíxico en presencia de 0,03 mg/L de PIR.



NA (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,5	46,8	4,8
1,0	77,3	3,9
1,5	113,1	3,8
2,0	140,2	1,3
2,5	175,4	2,4
3,0	211,2	3,1

Tabla 6.3. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de ácido nalidíxico en presencia de 0,13 mg/L de PIR.



NA (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,5	47,2	5,1
1,0	76,4	3,8
1,5	115,1	3,2
2,0	138,6	1,9
2,5	176,3	0,9
3,0	211,1	2,3

Tabla 6.4. Intensidad de fosforescencia en función de la concentración de ácido nalidíxico en presencia de 0,17 mg/L de ácido piromídico.

Los datos que figuran en las tablas 6.2, 6.3 y 6.4, corresponden al valor medio de tres determinaciones idénticas entre sí, siendo IFRM la intensidad de fosforescencia relativa media y DER la desviación estándar relativa de estas tres medidas.

Una vez obtenidos los valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito, procedimos a obtener los valores de los blancos analíticos correspondientes, con objeto de obtener los restantes parámetros analíticos de cada una de las rectas de calibrado. Los blancos se prepararon a partir de diez disoluciones que contenían todos los componentes (incluido el ácido piromídico) excepto el analito. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Blanco correspondiente a 0,03 mg/L de ácido piromídico:

IFRM 31,6; desviación estándar 1,01; DER 3,2.

Blanco correspondiente a 0,13 mg/L de ácido piromídico:

IFRM 32,3; desviación estándar 1,5; DER 4,6.

Blanco correspondiente a 0,17 mg/L de ácido piromídico:

IFRM 35,8; desviación estándar 1,7; DER 4,7.

6.3.1. Parámetros analíticos.

Teniendo en cuenta los valores de los respectivos blancos y sus correspondientes valores de desviación estándar, podemos calcular los parámetros analíticos de cada una de las rectas de calibrado del ácido nalidíxico. En el caso de la precisión del método se midieron, para cada una de las rectas de calibrado, diez muestras patrón conteniendo una concentración intermedia de ácido nalidíxico (1,5 mg/L) de cuya medida se obtuvo la correspondiente desviación estándar relativa que hemos tomado como medida de la precisión del método, para la correspondiente concentración de ácido piromídico. Todos estos parámetros los hemos incluido en la tabla 6.5 que se expone a continuación.

Parámetro/cantidad de PIR	0,03 (mg/L) de PIR	0,13 (mg/L) de PIR	0,17 (mg/L) de PIR
Pendiente (mg/L) ⁻¹	66,3	65,3	65,3
Ordenada origen	10,6	13,0	13,1
Límite detección (mg/L)	0,046	0,069	0,078
Límite cuantificación (mg/L)	0,16	0,23	0,26
Rango lineal (mg/L)	0,16-3,0	0,3-3,0	0,3-3,0
Precisión (DER %)	4,8	5,0	5,1

6.3.2. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado:

Para una concentración de 0,03 mg/L de ácido piromídico:

$$\text{IFR} = 66,3 C + 10,6 \quad (r^2 = 0,9987)$$

Para una concentración de 0,13 mg/L de ácido piromídico:

$$\text{IFR} = 65,3 C + 13,0 \quad (r^2 = 0,9987)$$

Para una concentración de 0,17 mg/L de ácido piromídico:

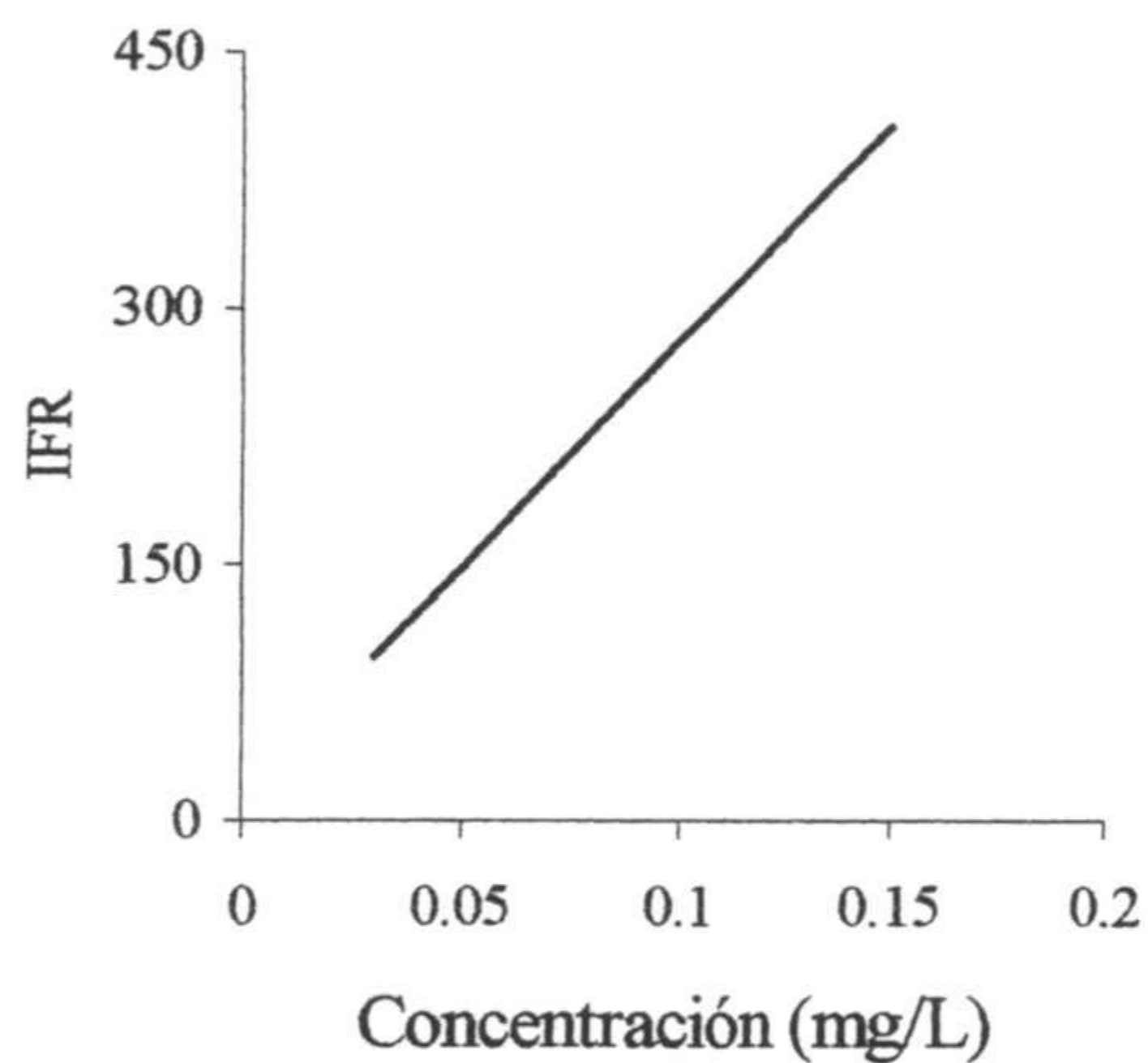
$$\text{IFR} = 65,3 C + 13,1 \quad (r^2 = 0,9987)$$

Como podemos apreciar las tres pendientes de las rectas son similares, lo que nos indica la independencia de las medidas de la señal analítica respecto de la

concentración del otro analito (piromídico en este caso) y las coeficientes r^2 presentan valores aceptables, lo que nos indica un buen ajuste de los puntos experimentales a la recta obtenida.

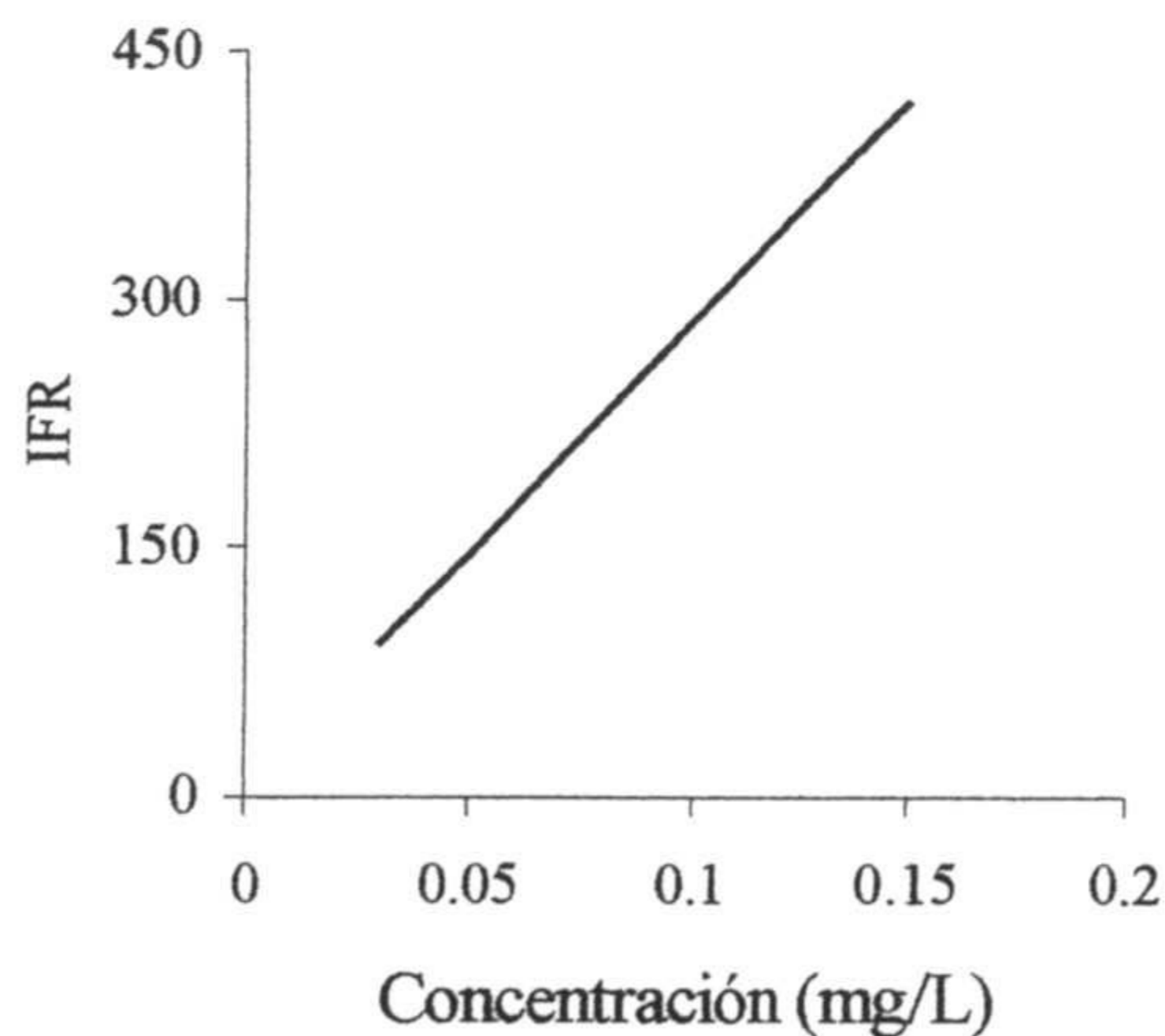
6.3.3. Rectas de calibrado para el ácido piromídico:

En el caso del ácido piromídico los valores experimentales son los que podemos ver en las tablas 6.5, 6.6 y 6.7 cuyas representaciones gráficas son las que vemos en las figuras 6.8, 6.9 y 6.10 que insertamos a continuación.



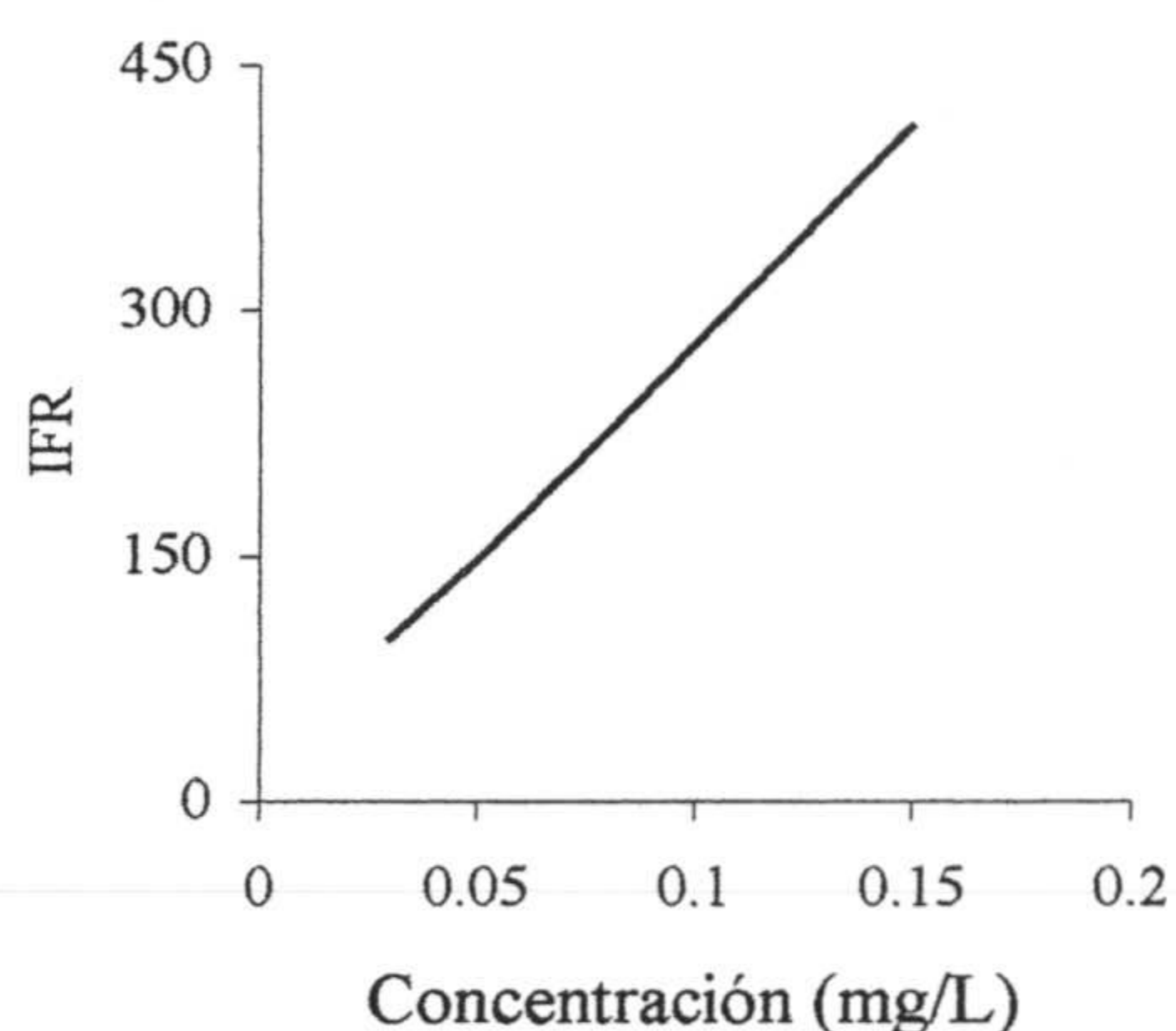
PIR (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,03	96,4	5,2
0,05	142,0	4,9
0,08	228,3	3,2
0,10	281,2	2,1
0,12	329,6	2,19
0,15	406,9	4,3

Tabla 6.5. Intensidad de fosforescencia relativa del ácido piromídico en función de su concentración, en presencia de 0,5 mg/L de nalidíxico.



PIR (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,03	99,2	6,1
0,05	145,3	5,4
0,08	230,8	2,3
0,10	292,6	2,1
0,12	333,7	2,0
0,15	418,9	3,1

Tabla 6.6. Intensidad de fosforescencia relativa del ácido piromídico en función de su concentración en presencia de 1,5 mg/L de nalidíxico.



PIR (mg/L)	IFRM	DER (%)
0,03	99,2	4,8
0,05	147,3	3,2
0,08	225,7	2,8
0,10	289,6	1,6
0,12	311,9	1,2
0,15	412,4	3,1

Tabla 6.7. Intensidad de fosforescencia del ácido piromídico en función de su concentración, en presencia de 2,0 mg/L de NA.

Los datos que figuran en las tablas 6.5, 6.6 y 6.7, corresponden al valor medio de tres determinaciones llevadas a cabo con muestras idénticas entre sí, siendo IFRM la intensidad de fosforescencia relativa media y DER la desviación estándar relativa de esas tres medidas.

Como en el caso anterior, una vez obtenidos los valores de la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de analito, vamos a obtener los valores de los correspondientes blancos analíticos para poder obtener así los restantes parámetros analíticos relativos a cada una de las rectas de calibrado. Los resultados que exponemos a continuación son los que se obtuvieron a partir de diez disoluciones (blancos) que contenían todos los componentes excepto el analito.

Blanco correspondiente a 0,5 mg/L de ácido nalidíxico:

IFRM 28,6; desviación estándar 1,5; DER 5,2.

Blanco correspondiente a 1,5 mg/L de ácido nalidíxico:

IFRM 26,3; desviación estándar 1,7; DER 6,4.

Blanco correspondiente a 0,17 mg/L de ácido piromídico:

IFRM 30,1; desviación estándar 1,8; DER 5,9.

6.3.4. Parámetros analíticos.

Con los valores de los blancos y sus correspondientes valores de desviación estándar vamos a calcular los parámetros analíticos de cada una de las rectas de calibrado del ácido piromídico. La precisión del método, para cada una de las rectas de calibrado, se determinó a partir de diez muestras patrón que contenían una concentración de ácido piromídico de 0,10 mg/L.

Todos estos parámetros los hemos incluido en la tabla que incluimos a continuación.

Parámetro/cantidad de NA	0,5 (mg/L) de NA	1,5 (mg/L) de NA	2,0 (mg/L) de NA
Pendiente (mg/L) ⁻¹	2616,9	2684,6	2567,2
Ordenada origen	16,2	16,3	20,9
Límite detección (mg/L)	0,002	0,002	0,002
Límite cuantificación (mg/L)	0,006	0,007	0,007
Rango lineal (mg/L)	0,006-0,15	0,007-0,15	0,07-0,15
Precisión (DER %)	4,8	5,2	5,0

6.3.5. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado:

Para una concentración de 0,5 mg/L de ácido nalidíxico:

$$\text{IFR} = 2616,9 C + 16,2 \quad (r^2 = 0,9993)$$

Para una concentración de 1,5 mg/L de ácido nalidíxico:

$$\text{IFR} = 2684,6 C + 16,3 \quad (r^2 = 0,9984)$$

Para una concentración de 2,0 mg/L de ácido nalidíxico:

$$\text{IFR} = 2567,2 C + 20,9 \quad (r^2 = 0,9926)$$

Los valores de las tres pendientes nos indican que las señales analíticas medidas son independientes de la concentración del ácido nalidíxico añadido y los valores de los coeficientes r^2 nos indican que el ajuste de los puntos experimentales a la recta es aceptable.

6.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.

Con objeto de aplicar el método propuesto a muestras reales se han seleccionado los dos tipos de muestras que hemos utilizado en capítulos anteriores, en las que existe la posibilidad de encontrar trazas de estos analitos. Estos dos tipos de muestras son: leche de vaca y orina humana.

6.5.1. Determinación de los ácidos piromídico y nalidíxico en orina humana.

Al aplicar la metodología propuesta a varias muestras de orina humana, no se detectó la presencia de ninguno de los dos fármacos investigados. Por ello se procedió a efectuar un estudio de recuperación de ambos analitos a partir de una serie de muestras en las que previamente habíamos colocado unas cantidades conocidas de ambos fármacos. Las cantidades puestas fueron las siguientes:

- 1ª muestra: 1,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,03 mg/L de ácido piromídico.
- 2ª muestra: 2,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,03 mg/L de ácido piromídico.
- 3ª muestra: 3,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,03 mg/L de ácido piromídico.
- 4ª muestra: 1,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,13 mg/L de ácido piromídico.
- 5ª muestra: 2,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,13 mg/L de ácido piromídico.
- 6ª muestra: 3,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,13 mg/L de ácido piromídico.
- 7ª muestra: 1,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,17 mg/L de ácido piromídico.
- 8ª muestra: 2,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,17 mg/L de ácido piromídico.
- 9ª muestra: 3,0 mg/L de ácido nalidíxico y 0,17 mg/L de ácido piromídico.

Utilizando los espectros sincrónicos y los valores de los parámetros experimentales que hemos visto anteriormente, se obtuvieron los resultados que figuran en las tablas 6.10, 7,11 y 7,12, donde se ha incluido el valor medio (IFRM) correspondiente a tres medidas efectuadas cada una de ellas sobre cada uno de los

tres replicados correspondientes a las tres concentraciones de analito en estudio. Así mismo se han incluido los valores de la cantidad recuperada y el porcentaje.

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,03	1,0	74,2	0,959	95,9
0,03	1,0	73,8	0,953	95,3
0,03	1,0	75,9	0,985	98,5
0,03	2,0	140,2	1,955	97,7
0,03	2,0	136,8	1,903	95,2
0,03	2,0	144,2	2,015	100,7
0,03	3,0	212,6	3,046	101,6
0,03	3,0	214,1	3,069	102,3
0,03	3,0	209,1	2,992	99,7

Tabla 6.10. Recuperación de ácido nalidíxico en orina humana mediante espectrometría sincrónica, en presencia de 0,03 mg/L de ácido piromídico.

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,13	1,0	77,1	0,981	98,1
0,13	1,0	73,2	0,922	92,2
0,13	1,0	75,3	0,954	95,4
0,13	2,0	145,3	2,026	101,3
0,13	2,0	149,2	2,086	104,3
0,13	2,0	150,1	2,099	104,9
0,13	3,0	215,8	3,106	103,5
0,13	3,0	214,3	3,083	102,8
0,13	3,0	216,9	3,122	104,1

Tabla 6.11. Recuperación de ácido nalidíxico en orina humana, en presencia de 0,13 mg/L de ácido piromídico, utilizando espectrometría sincrónica.

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,17	1,0	78,2	0,997	99,7
0,17	1,0	76,4	0,969	96,9
0,17	1,0	80,1	1,026	102,6
0,17	2,0	140,2	1,946	97,3
0,17	2,0	150,3	2,101	105,1
0,17	2,0	146,4	2,041	102,1
0,17	3,0	212,3	3,049	101,6
0,17	3,0	206,4	2,960	98,7
0,17	3,0	208,2	2,988	99,6

Tabla 6.12. Recuperación de ácido nalidíxico en orina humana, en presencia de 0,17 mg/L de ácido piromídico, mediante espectrometría sincrónica.

NA (mg/L)	PIR (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,5	0,03	93,2	0,029	97,9
0,5	0,03	90,1	0,028	94,1
0,5	0,03	98,3	0,031	104,6
0,5	0,08	221,4	0,078	98,0
0,5	0,08	229,5	0,081	101,9
0,5	0,80	219,8	0,078	97,2
0,5	0,10	284,2	0,102	102,4
0,5	0,10	289,3	0,104	104,4
0,5	0,10	276,4	0,099	99,4

Tabla 6.13. Recuperación de ácido piromídico en muestras de orina humana, en presencia de 0,5 mg/L de ácido nalidíxico.

NA (mg/L)	PIR (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
1,5	0,03	99,2	0,031	102,9
1,5	0,03	95,4	0,029	98,2
1,5	0,03	89,8	0,027	91,3
1,5	0,08	227,3	0,079	98,2
1,5	0,08	231,6	0,080	100,2
1,5	0,08	232,9	0,081	100,8
1,5	0,10	299,7	0,106	105,6
1,5	0,10	292,6	0,103	102,9
1,5	0,10	288,7	0,101	101,5

Tabla 6.14. Recuperación del ácido piromídico en muestras de orina humana, en presencia de 1,5 mg/L de ácido nalidíxico, mediante espectrometría sincrónica

NA (mg/L)	PIR (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
2,0	0,03	91,9	0,028	92,2
2,0	0,03	96,3	0,029	97,9
2,0	0,03	90,2	0,027	90,0
2,0	0,08	230,1	0,081	101,9
2,0	0,08	240,2	0,085	106,8
2,0	0,08	231,9	0,082	102,7
2,0	0,10	278,9	0,100	100,5
2,0	0,10	286,3	0,103	103,4
2,0	0,10	290,1	0,104	104,9

Tabla 6.15. Recuperación del ácido piromídico en muestras de orina en presencia de 2,0 mg/L de ácido nalidíxico, mediante espectrometría sincrónica.

6.5.2. Determinación de los ácidos piromídico y nalidíxico en leche de vaca.

Se aplicó la metodología propuesta a diferentes muestras de leche de vaca y, afortunadamente, no se detectó la presencia de ninguno de los fármacos en estudio. Por esta razón se llevó a cabo un estudio de recuperación de las dos especies, en una serie de muestras que previamente habían sido dopadas con cantidades conocidas de ambos fármacos. Estas cantidades fueron las mismas que se utilizaron en el caso de recuperación de ambos analitos en muestras de orina.

Los resultados obtenidos experimentalmente son los que figuran en las tablas 6.16, 6,17 y 6,18, donde también hemos incluido el valor medio (IFRM) así como los valores de la cantidad recuperada y el porcentaje que representa dicha recuperación.

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	%Recuperado
0,03	1,0	76,2	0,989	98,9
0,03	1,0	75,1	0,973	97,3
0,03	1,0	78,3	1,021	102,1
0,03	2,0	148,2	2,075	103,8
0,03	2,0	141,0	1,967	98,3
0,03	2,0	146,7	2,053	102,6
0,03	3,0	210,2	3,010	100,3
0,03	3,0	220,1	3,160	105,3
0,03	3,0	218,3	3,132	104,4

Tabla 6.16. Recuperación de ácido nalidíxico en muestras de leche de vaca en presencia de 0,03 mg/L de ácido pirimídico, mediante espectrometría sincrónica

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,13	1,0	75,2	0,952	95,2
0,13	1,0	79,4	1,017	101,7
0,13	1,0	78,5	1,003	100,3
0,13	2,0	141,3	98,3	98,3
0,13	2,0	150,1	104,9	104,9
0,13	2,0	140,8	97,8	97,8
0,13	3,0	210,1	100,6	100,6
0,13	3,0	208,3	99,7	99,7
0,13	3,0	215,8	103,5	103,5

Tabla 6.17. Recuperación de ácido nalidíxico en presencia de 0,13 mg/L de ácido piromídico, en muestras de leche de vaca, mediante espectrometría sincrónica

PIR (mg/L)	NA (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,17	1,0	82,1	1,056	105,6
0,17	1,0	80,4	1,031	103,1
0,17	1,0	79,8	1,021	102,1
0,17	2,0	148,3	2,070	103,5
0,17	2,0	156,2	2,191	109,6
0,17	2,0	147,9	2,064	103,2
0,17	3,0	201,2	2,880	96,0
0,17	3,0	200,4	2,868	95,6
0,17	3,0	205,6	2,948	98,3

Tabla 6.18. Recuperación de ácido nalidíxico en presencia de 0,17 mg/L de ácido piromídico, en muestras de leche de vaca, mediante espectrometría sincrónica.

NA (mg/L)	PIR(mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
0,5	0,03	92,1	0,029	96,7
0,5	0,03	96,3	0,031	102,1
0,5	0,03	89,2	0,028	93,0
0,5	0,08	216,4	0,076	95,6
0,5	0,08	212,1	0,075	93,6
0,5	0,08	226,3	0,080	100,4
0,5	0,10	291,0	0,105	105,0
0,5	0,10	286,4	0,103	103,2
0,5	0,10	271,1	0,097	97,4

Tabla 6.19. Recuperación de ácido piromídico en presencia de 0,5 mg/L de ácido nalidíxico en muestras de leche de vaca, mediante espectrofotometría sincrónica

NA (mg/L)	PIR (mg/L)	IFRM	Recuperado	% Recuperado
1,5	0,03	95,2	0,029	97,9
1,5	0,03	92,3	0,028	94,4
1,5	0,03	90,4	0,028	92,0
1,5	0,08	218,5	0,075	94,1
1,5	0,08	230,4	0,080	99,7
1,5	0,08	226,7	0,078	98,0
1,5	0,10	289,7	0,102	101,8
1,5	0,10	284,3	0,099	99,8
1,5	0,10	280,2	0,098	98,3

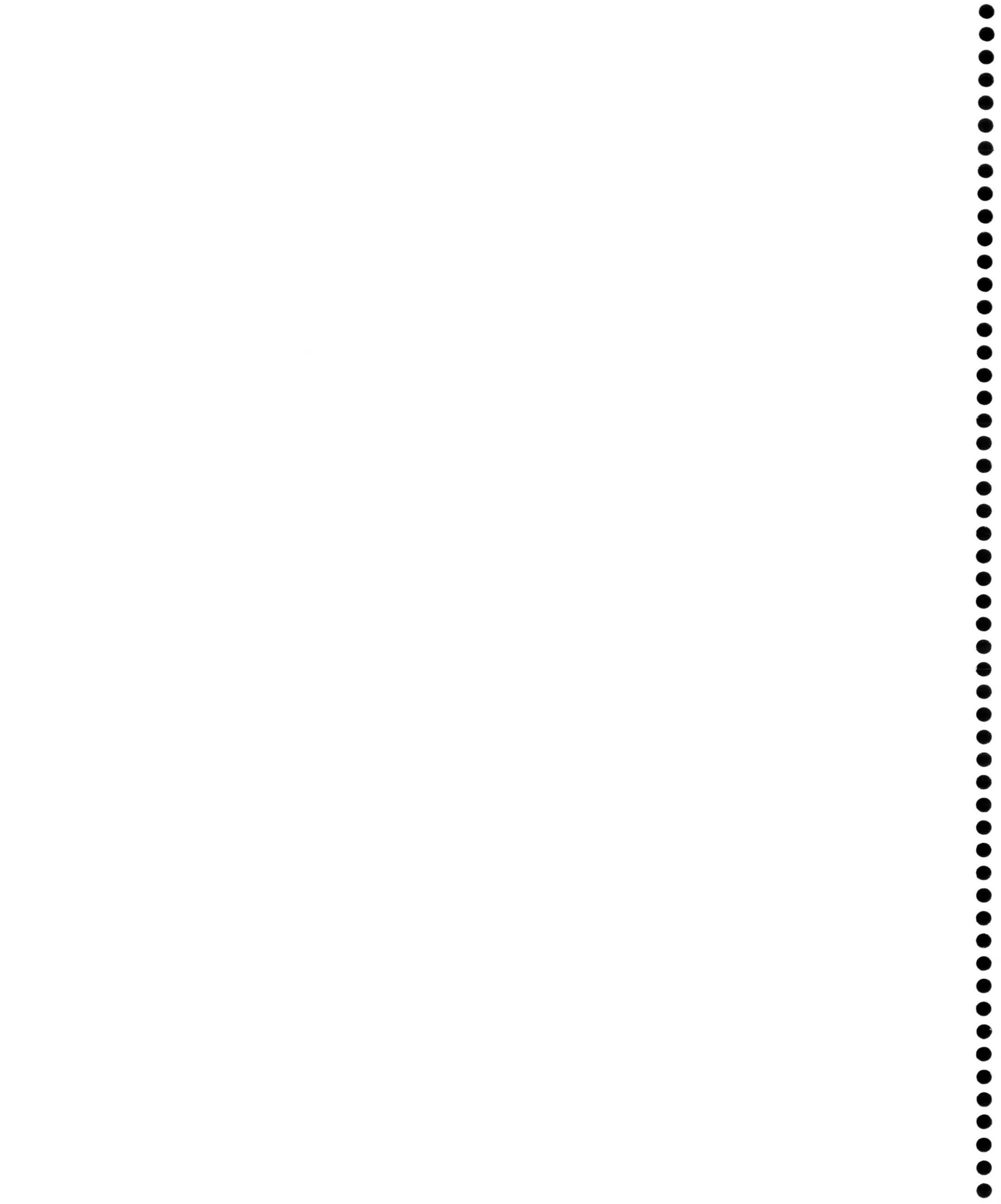
Tabla 6.20. Recuperación de ácido piromídico en muestras de leche de vaca en presencia de 1,5 mg/L de ácido nalidíxico, mediante espectrofotometría sincrónica

NA (mg/L)	PIR(mg/L)	IFRM	Recuperado	%Recuperado
2,0	0,03	93,2	0,028	93,8
2,0	0,03	95,6	0,029	96,9
2,0	0,03	98,4	0,030	100,6
2,0	0,08	228,3	0,080	100,9
2,0	0,08	221,6	0,078	97,7
2,0	0,08	230,0	0,081	101,8
2,0	0,10	280,2	0,101	101,1
2,0	0,10	291,5	0,105	105,4
2,0	0,10	289,5	0,105	104,6

Tabla 6.21. Recuperación de ácido piromídico en muestras de leche de vaca en presencia de 2,0 mg/L de ácido nalidixico, mediante espectrofotometría sincrónica

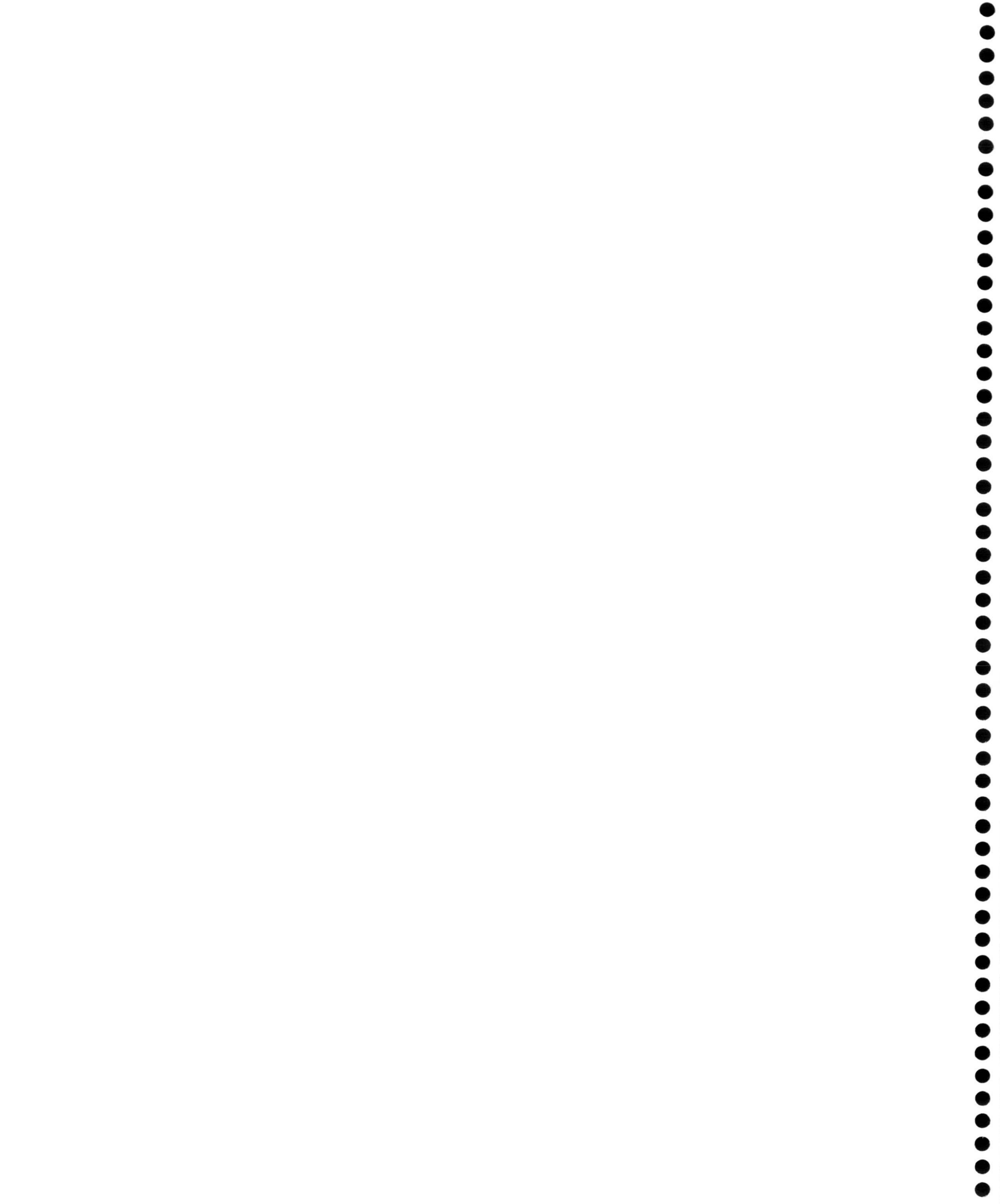
De los valores de las tablas 6.10 a 6.21 se deduce que la recuperación tanto en las muestras de leche de vaca como de orina humana, es prácticamente completa ya que todos los porcentajes de recuperación se encuentran entre un mínimo de 91,3 y un máximo de 109,6 que no son significativamente distintos de 100.

CONCLUSIONES

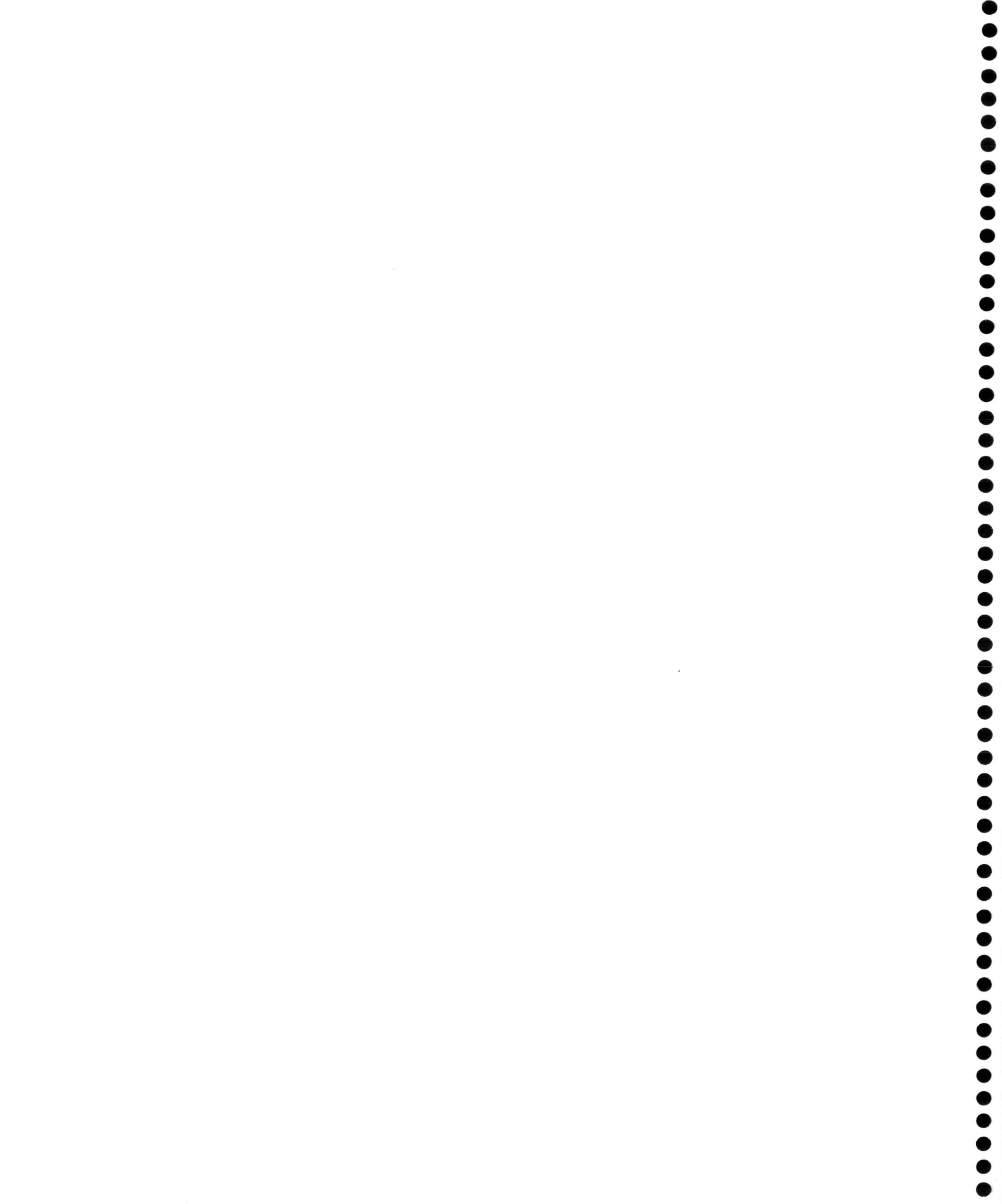


Como resultado de los trabajos de investigación llevados a cabo en la presente Memoria de Tesis Doctoral podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1^a Se han desarrollado sensores de un solo uso para la determinación de diferentes fármacos, mediante el uso de fosforescencia en fase sólida a temperatura ambiente. Estos sensores retienen el analito mediante un proceso de absorción de este en la membrana sensora.
 - 2^a Con el proceso de absorción de los analitos se produce una preconcentración de los mismos que nos permite la determinación de cantidades traza de las especies ensayadas. En algún caso, como es el del ácido piromídico, el límite de detección llega a ser de unos pocos $\mu\text{g/L}$.
 - 3^a La selectividad de los métodos propuestos es aceptable ya que sólo hemos encontrado interferencias dignas de tener en cuenta, en el caso de los ácidos nalidíxico y piromídico, no existiendo en ningún otro caso de los estudiados.
 - 4^a Con la metodología propuesta hemos podido desarrollar una nueva forma de calibración que nos permite elegir el tiempo de fijación del analito sobre el sensor, en función de la concentración del mismo en la muestra.
 - 5^a Se ha simplificado la metodología de medida de fosforescencia a temperatura ambiente y la de preconcentración de las trazas de analito sobre la superficie sensora.
-



PUBLICACIONES



Single-use phosphorimetric sensor for the determination of nalidixic acid in human urine and milk

L. F. Capitán-Vallvey,^a Osama M. A. Al-Barbarawi,^a M. D. Fernández-Ramos,^a R. Avidad*^a and V. Ramírez González^b

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada 18071, Spain.
E-mail: lcapitan@goliat.ugr.es

^b Department of Applied Mathematics, University of Granada, Granada 18071, Spain

Received 19th July 2000, Accepted 14th September 2000
First published as an Advance Article on the web 25th October 2000

A single-use phosphorimetric sensor to determine the germicide nalidixic acid is proposed. The sensing action is based on the absorption of the analyte into the sensing zone and the subsequent measurement of the phosphorescence intensity emitted by the analyte fixed in the sensor. This plane drop sensor is made up of a 3×1.6 cm sheet of the polyester Mylar as solid support, and a circular film 5 mm in diameter and 20 μm in thickness, formed by poly(vinyl chloride) and tributyl phosphate as the plasticizer, adhered to its surface. The sensor is introduced for 2 h into the sample solution, after which it is dried and the phosphorescence intensity is measured directly at $\lambda_{\text{ex}} = 332$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 412$ nm, with a delay time of 0.15 ms and a gate time of 10 ms, under a dry nitrogen stream. The characteristic parameters of the construction of the sensing zone and of the processes of fixing the analyte along with the emission of phosphorescence were studied. The applicable concentration range was from 60 to 1500 ng ml^{-1} , with a detection limit of 20 ng ml^{-1} and a precision of 2% expressed as relative standard deviation. The method was applied to the determination of nalidixic acid in milk and human urine with recoveries ranging between 96.0 and 103.7%. The calibration process was carried out by applying a mathematical method of finite elements that expresses the analytical signal as a function of the analyte concentration and equilibration time between the sensor and the sample solution.

Introduction

Over the last few years, one of the goals of analytical chemistry has been the determination of small amounts of biological or clinical analytes by means of a rapid, simple, and inexpensive analytical procedure that can be carried out, if possible, *in situ* by persons without analytical training. These express tests can take various forms: in solution or in a solid phase, in flow-through mode or by means of probes, single-use or reversible, operated by immersion or by placing a drop of sample on the surface of a sensor. Preferably, the analytical signal should be an optical property (absorbance, fluorescence, or phosphorescence) developed in the sensing zone in the presence of the analyte. The main problems that can be found in the design of these devices are: complex composition of sample matrix, low amount of analyte (at trace levels) and the need for high sensitivity, selectivity, simplicity of handling and rapidity of the response.

Room temperature phosphorescence (RTP) in the solid phase is a sensitive and selective analytical technique that is very appropriate for the development of optical sensors with application in probes or in flow-through devices. Campiglia and Vo-Dinh¹ have proposed an intrinsic phosphorescent sensor for the determination of PAH fixed on filter-paper, using fiber optic and laser-induced RTP as an analytical signal. However, the phosphorimetric sensors most frequently used are of an extrinsic type, where the analytical signal is the phosphorescence that originates as a consequence of a complexation process between an organic reagent and a metallic species. Such is the case with the sulfonic derivatives of 8-hydroxyquinoline (oxine), retained in an anion-exchange resin, for the determination of aluminium² and lead,³ an organosilicon polymer for the determination of uranyl,⁴ 1,4-bis-(1'-phenyl-3'-methyl-5'-pyrazolone-4'-)butanedione for the determination of gadolinium⁵

or thenoyltrifluoroacetone in Chelex-100 resin to determine europium.⁶

Similarly, organic compounds such as tetracyclines or anthracyclines can be determined through their complexation with Chelex-100-Eu(m)⁷ or Amberlite XAD-2-Eu(m),⁸ respectively. In these cases the immobilization of metallic ions in the resins, used as a sensing phase, allows for the determination of the analytes.

A second type of phosphorimetric sensor is made up of the RTP quenching-based sensors. Here, the analytical signal is the quenching of phosphorescence that phosphorescent species such as PAH⁹ or transition metal chelates¹⁰⁻¹² suffer intrinsically in the presence of the analyte. As representative examples of these sensors, we can cite the oxygen sensor that indirectly can also be used to determine cholesterol by means of an enzymatic oxidation¹³ or the sensors for the determination of sulfite¹⁴ or nitrogen oxides.¹⁵

Nalidixic acid [1-ethyl-1,4-dihydro-7-methyl-4-oxo-1,8-naph-tiridine-3-carboxylic acid] is a germicide for infections of the intestine and urinary system produced by Gram-negative germs of the type *Salmonella*. Nalidixic acid is easily absorbed by the intestine and excreted in the urine, between 0.5 and 1.5 h after its ingestion, as nalidixic acid (84–90%) and as hydroxynalidixic acid (16–10%). However, a dilated treatment with nalidixic acid can produce vomiting, allergies, and nervous upset in the patient, if the concentration level in urine is > 200 mg l^{-1} .^{16,17} Nalidixic acid, jointly with other quinolones, such as oxolinic acid or flumequine, is a germicide frequently used in veterinary practice against infections of cows, pigs, chickens, etc. produced by colibacillus, the recommended dose being 0.6 g kg^{-1} .

Traditionally, nalidixic acid has been determined by volumetric titration with NaOH (in ethanolic solution), or with NaOCH_3 in CHCl_3 or gravimetrically through the formation of a silicotungstic-nalidixic (8:3) derivative.¹⁸ Vieira da Silva and

Nogueira¹⁹ have proposed a spectrophotometric method to determine nalidixic acid by extraction of the analyte with CHCl_3 and subsequent measurement of the absorbance at 259 nm. Fluorimetrically, nalidixic acid has been determined in chicken,²⁰ and human urine with a detection limit of 5 mg l^{-1} .²¹ However, the most common methodology for the determination of nalidixic acid has been chromatography. There are several HPLC methods for the determination of nalidixic acid in human plasma and urine,^{22,23} human blood,²⁴ or human urine,²⁵ and a GC method for the determination of nalidixic acid in human plasma.²⁶

The main inconvenience of the non-chromatographic methods is their lack of selectivity, which requires the carrying out of a previous extraction process of the analyte from the matrix using organic solvents; with the chromatographic methods, the main inconvenience is their laborious nature and extensive sample handling.

Our research group is attempting to establish a new analytical methodology for phosphorescent sensors based on fixation of the analyte by absorption, ionic change, or complexation processes, which makes possible the rapid, inexpensive, simple, selective and sensitive determination of analytes which are of interest clinically (drugs) or environmentally (pollutants). With this aim, we propose here an intrinsic phosphorescent sensor for the determination of trace amounts of nalidixic acid.

Experimental

Apparatus and software

In order to perform the measurements of phosphorescence intensity, a Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) LS-50 luminescence spectrometer was used. The apparatus, interfaced to an IBM PC330-100Dx4 microcomputer through an RS232C connection, was equipped with a xenon discharge lamp with a power equivalent to 20 kW during $8 \mu\text{s}$ and pulse width at half peak height $< 10 \mu\text{s}$, two Monk-Gillieson F/3 monochromators and a Hamamatsu R298 photomultiplier. A P1 solid standard ($12.5 \times 12.5 \times 45 \text{ mm}$) containing europium(III) thenoyltrifluoroacetate dissolved in a transparent matrix of poly(methyl methacrylate), supplied by Perkin-Elmer, was used to check the spectrometer daily. Other apparatus and laboratory materials used were the following: a $10 \mu\text{L}$ micropipette (Biohit Proline, Helsinki, Finland), a digital pH-meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain), with a combined glass-calomel saturated electrode, a magnetic multi-agitator (SBS Instrument, Selecta, Barcelona, Spain) and an ultrasonic bath (Selecta). The thickness of the sensing zone was measured by means of a Zeiss (Oberkochen, Germany) EM 10C transmission electron microscope.

As software for the acquisition, manipulation and statistical and numerical treatment of the spectral data, the Perkin-Elmer FL Data Manager software package, Statgraphics Plus for Windows 3.1 software package (Statistical Graphics, USA, 1994-97), Excel software package from Microsoft Office 97, ver. 8.0, 1997, and Mathematica 4.0 (Wolfram Research, UK) were used.

Reagents and materials

A (200 mg l^{-1}) stock solution of nalidixic acid (NA) was prepared by exact weighing of the reagent (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) and subsequent dissolution in absolute ethanol. This solution, stored in a dark glass bottle at 4°C , remained stable for 3 months. Daily working solutions were prepared by dilution with reverse osmosis quality water (Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore, Bedford, MA, USA) maintaining a 4% v/v ethanol-water composition to avoid

potential precipitation of the analyte. Saturated stock solutions of Pb(II) acetate, Ag(I) nitrate, Tl(I) nitrate, and KI (Merck, Darmstadt, Germany) were also used. Poly(vinyl chloride) (PVC) of high molecular weight, tetrahydrofuran (THF) as solvent, and tributyl phosphate (TBP), dioctyl phthalate (DOP), 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE), tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP), and bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS) (all supplied by Sigma-Aldrich Química) as plasticizers were tested. Sheets of the polyester Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as solid supports. All reagents were of analytical-reagent grade unless stated otherwise.

Preparation of the sensor

The active zone of the sensor was obtained by mixing, in this order, 50 mg of PVC, 490 mg of TBP and 2.0 ml of THF and shaking the mixture for 2 min. On a $32 \times 16 \text{ mm}$ sheet of Mylar, $5 \mu\text{l}$ of the cocktail were placed and the sheet was then placed in a vacuum dryer for 20 min at room temperature. After the drop of the cocktail has dried, the sensor is obtained as a homogeneous, colourless, transparent circular solid film 6 mm in diameter and $20 \mu\text{m}$ thick adhered to the polyester sheet.

Phosphorescence measurements

Fig. 1 shows the home-made accessory used to introduce the sensor with the sample into the holder of the spectrometer and to obtain the transmitted phosphorescence spectra. In this way, both excitation and emission beams form angles of 45° with the plane of the sensor. This accessory is formed by two triangular prisms (44 mm high and 13 mm at the base) constructed with stainless steel and painted with black paint. Both prisms have a circular hole (6 mm diameter) for the passage of the beam of light and the exit of the nitrogen flow introduced through the superior hole of one of the two prisms. The transmitted phosphorescence emission spectra were recorded between 380 and 450 nm with a gate time of $t_g = 10 \text{ ms}$ and a delay time of $t_d = 0.15 \text{ ms}$. The excitation and emission slit-widths were 3 and 10 nm, respectively, and the scan speed was 240 nm min^{-1} . The phosphorescence measurements were carried out at $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 412 \text{ nm}$ under a stream of dry nitrogen that flows through the sample holder as indicated in Fig. 1.

Procedure for samples

In a 100 ml glass vessel, 50 ml of standard or sample solution, containing between 60.0 and $1500.0 \text{ ng ml}^{-1}$ of NA, were added. Next, the sensor, suspended from a support, was introduced into the solution and this was mechanically stirred at 300 rpm for 2 h. Then, the sensor was placed in a vacuum dryer for 20 min and, at the end of the drying process, the RTP was measured as described above.

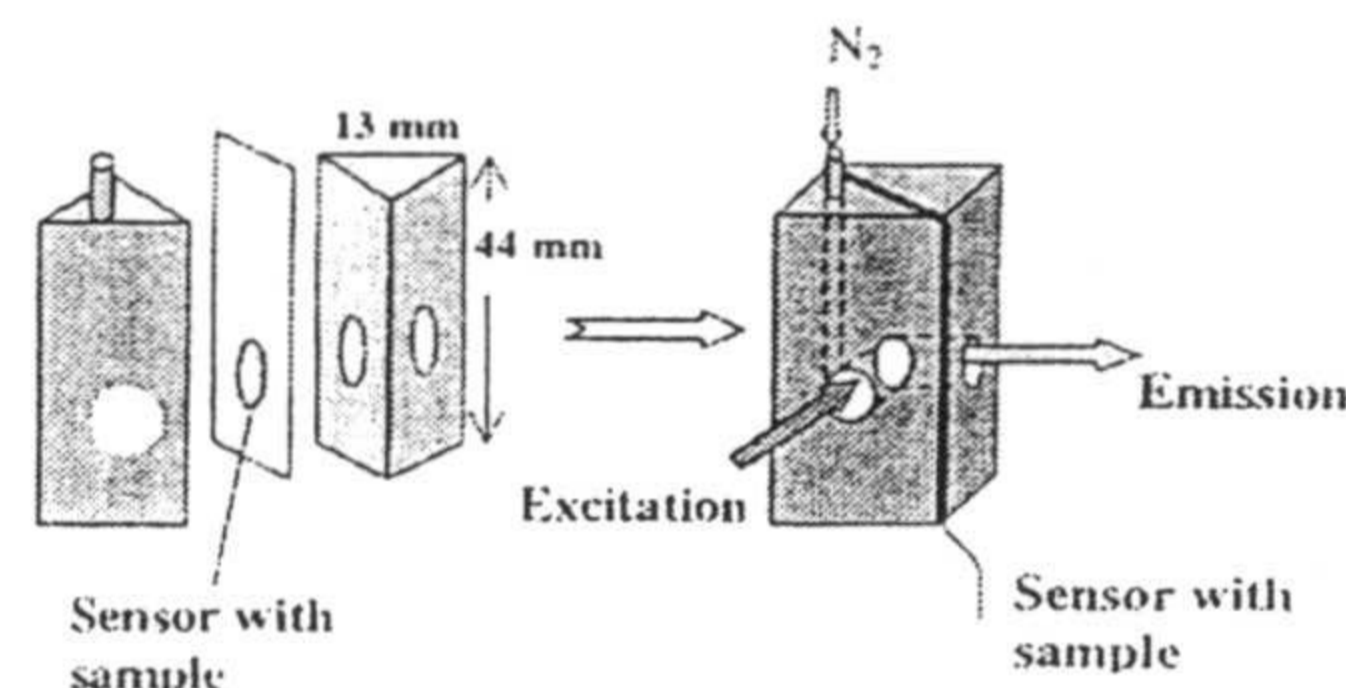


Fig. 1 Accessory for placing the sample in the instrument holder.

Preparation of real samples

The preparation of real samples of milk or human urine was carried out as follows: a measured volume of standard solution of NA was added to 200 ml of sample (milk or human urine) and, after stirring, the mixture was stored at 4 °C for 24 h. After this time had passed, 12.5 ml of 1.0 M ZnSO₄ and 12.5 ml of 0.23 M K₄[Fe(CN)₆] were added to precipitate the proteins (in urine if necessary). The mixture was filtered through a filter-paper and the liquid fraction was used to prepare the different samples as described under Procedure for samples.

Results and discussion

Spectral characteristics

The maximum excitation is located at 332 nm and the emission spectrum of NA fixed in the sensor shows only a peak at 412 nm where the phosphorescence intensity is about ten times greater than the intensity shown by the blank. Using paper as a solid support, these peaks were located at 330 and 417 nm, respectively.²⁷

Experimental parameters

The experimental parameters that influence the analytical signal can be classified into three groups. (1) Membrane parameters, related to the construction and composition of the sensing membrane. (2) Parameters of the process of fixation of the analyte in the membrane. (3) Instrumental parameters, that influence the phosphorescence intensity during the measurements of the analytical signal.

Selection and optimisation of the sensing membrane components

In order to obtain the optimum design of the sensor, the nature of the components, amount of PVC, THF and TBP, volume of the drop deposited on the solid support and drying time of the sensor in a vacuum desiccator, were studied. Poly(vinyl acetate), polyurethane, and PVC as polymers and TBP, DOP, NPOE, and TEHP as plasticizers, if necessary, were tested using THF or aqueous alcoholic mixtures as solvents depending on the polymer tested. At the same time, methacrylate, poly(vinyl acetate), and poly(ethylene terephthalate) sheets were tested as solid supports for the sensing membranes. Using polyurethane or poly(vinyl acetate) as polymers and aqueous mixtures as solvents to form the membrane, the phosphorescent signals, emitted after equilibration of the sensors with NA solutions, were between 5 and 10% higher than the signal emitted by the blank. However, using PVC as a polymer, the phosphorescent signal increases, more or less in proportion, depending on the reagent used as a plasticizer. With DOP and NPOE as plasticizers, the increase in the signal was about 10% with respect to the blank. Using TEHP, the increase was 80%, and using TBP the signal produced by the sample was five times higher than the signal of the blank. As a consequence of these experiments, we selected PVC and TBP as components of the membrane using THF as the solvent. As an inert support for the sensor, polyterephthalate (polyester type Mylar) was selected because this material produces a phosphorescent background lower than methacrylate or poly(vinyl acetate).

Sensor composition

In order to optimise the composition of the sensor, the influence of the amounts of PVC, TBP and THF on the phosphorescence

signal was studied. For this purpose, diverse sensors were constructed with different amounts of one of the components and constant amounts of the other two. Amounts of PVC between 10 and 70 mg, volumes of TBP between 0.1 and 0.9 ml, and volumes of THF between 0.5 and 4.5 ml were tested. The optimum analytical signal was obtained when the composition of the cocktail was 50 mg of PVC, 0.5 ml of TBP and 20 ml of THF. This composition was used as optimum in subsequent experiments.

In order to test the influence of the volume of the cocktail, several sensors were prepared by employing different volumes of the cocktail between 2 and 12 µl. Fig. 2 shows the results obtained when these sensors were equilibrated with solutions of NA of 1.0 µg ml⁻¹. We selected 5 µl as an appropriate volume to carry out further experiments.

To perform the RTP measurements the sensor must be totally dry to avoid the quenching effect produced by the presence of water in the sample. Consequently, the influence of the form and time of the drying must be studied. Different sensors were dried at atmospheric pressure and under vacuum. It was found that diminishing the pressure decreases the time necessary to dry the sensor. Hence, at atmospheric pressure, the time needed was 60 min while 20 min was sufficient when the sensor was dried at about 15 mmHg in a vacuum desiccator.

Fixation process of NA into the sensor

The time and speed of shaking during the equilibration process, the drying time of the membrane after the equilibration process, ionic strength and pH of the sample solution, and the presence of a heavy atom are the experimental parameters of concern in this process. As can be seen in Table 1, the analytical signal increases when the equilibration time increases from 15 to 120 min. For this reason, *a priori* we selected the latter time as the optimum value for the study of the rest of the experimental parameters. Next, using a time of 120 min, several sensors were prepared at different shaking speeds ranging between 30 and 120 rpm. Experimentally, an increase in the analytical signal

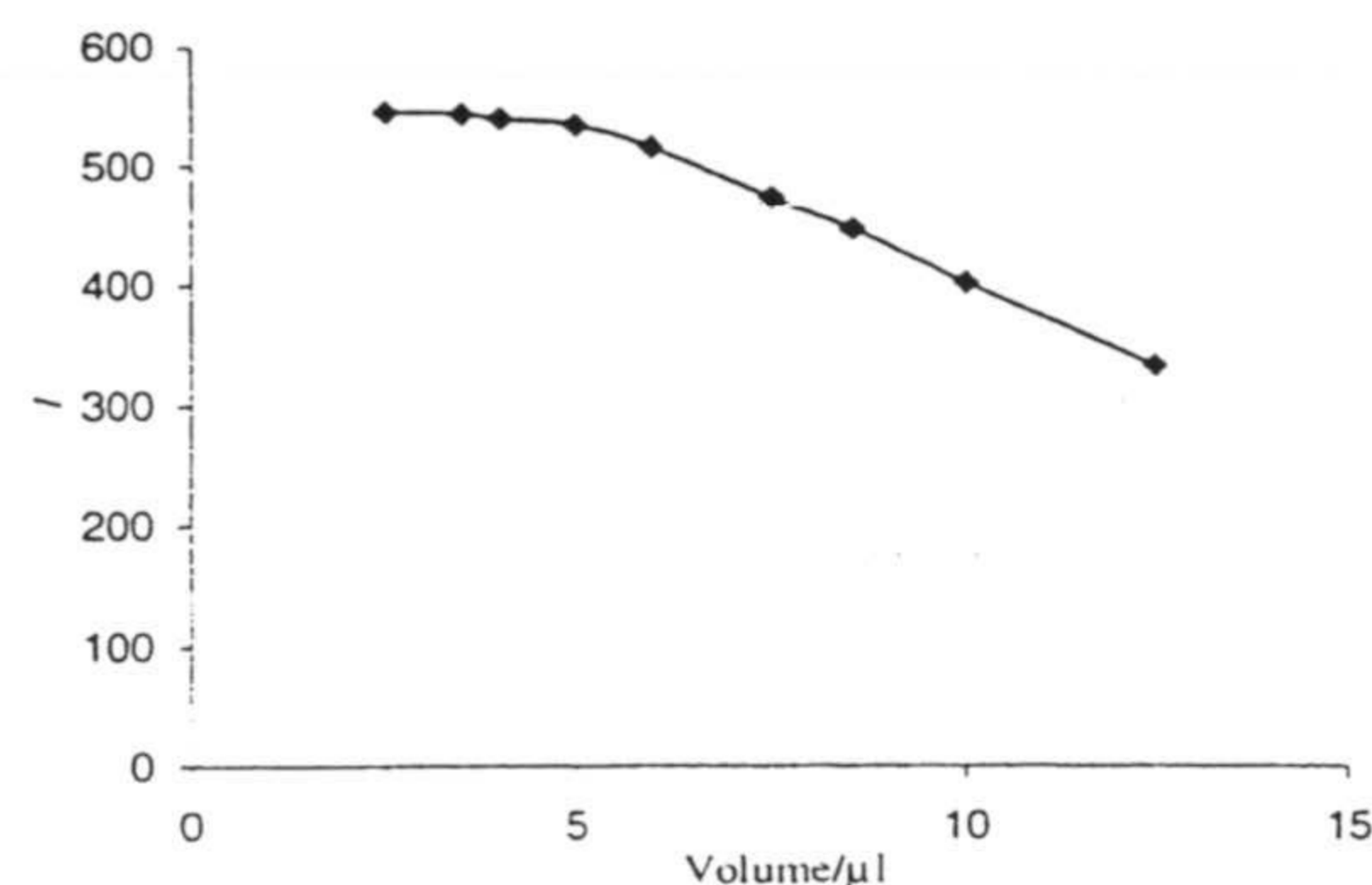


Fig. 2 Influence of drop volume of cocktail on the phosphorescence intensity.

Table 1 Relative phosphorescence intensity as a function of the analyte concentration and equilibration time

Concentration/µg ml ⁻¹	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	
Time/min	15	26	28	38	45	60	73
	30	55	58	72	92	112	120
	60	62	93	125	187	227	244
	90	75	121	221	283	292	303
	120	81	154	273	290	305	329

emitted by the different sensors, after their equilibration with $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ samples of NA, was observed when the shaking speed increased from 30 to 60 rpm. Hence, the phosphorescence intensity was 110 units for 30 rpm and 150 units for 60 rpm, remaining constant at shaking speeds higher than 60 rpm.

It was observed experimentally that when the sensor is not totally dry, it does not emit the maximum phosphorescence intensity. This fact can be attributed to the quenching of phosphorescence produced by the water freely dissolved in the PVC membrane as proved by Li *et al.*^{28,29} In order to avoid this quenching effect, the sensor was dried after equilibration using a desiccator over CaCl_2 under vacuum (about 15 mm). It was found that 20 min was the optimum time to dry the sample because, if the drying time is less than 20 min, the sample does not dry and the phosphorescence emission spectrum does not show the spectral characteristics of NA, whereas if it is greater than 20 min, the results do not improve.

The influence of pH on the fixation process of NA was studied using standard solutions of NA ($1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) with different pH values ranging between 1.0 and 9.0 adjusted with NaOH or HCl solutions. As can be seen in Fig. 3, the phosphorescence intensity is almost constant for pH values ranging between 2.0 and 6.0, decreasing suddenly between 6.0 and 7.0 because the $\text{p}K_a$ of NA is 6.1.²⁷ At pH values higher than 8.0, the phosphorescence intensity emitted by the sample decreases slowly as the pH of the solution increases. This behaviour could be due to the presence of the acid group in the molecule of NA. The dissociation of this group, as the pH value increases, impedes the absorption process of NA into the sensor because the sensing membrane presents a non-polar character.

The influence of the ionic strength was tested by using standard solutions ($1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) of NA with different NaCl concentration levels. Experimental data showed that the phosphorescence intensity decreases linearly from 121.0 to 69.1 units, when the ionic strength increases from 0.1 to 1.5 M. If the NaCl concentration is lower than 0.1 M, the analytical signal is not influenced by the ionic strength.

In order to test the influence of a heavy atom on the RTP two procedures were evaluated: (i) adding the corresponding salt to the solution before fixation of the analyte and (ii) introducing the heavy atom, as a lipophilic compound, into the sensing membrane. For the addition of the salt into a solution of the analyte, the species tested were: Ag(I), Pb(II), Tl(I), Hg(I), Cl^- , I^- and Br^- , and $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4$ was tested as an enhancer incorporated in the PVC matrix. It was observed that the presence of heavy atoms does not affect the phosphorescence intensity emitted by the analyte, and, consequently, the phosphorescence measurements were carried out without a heavy atom.

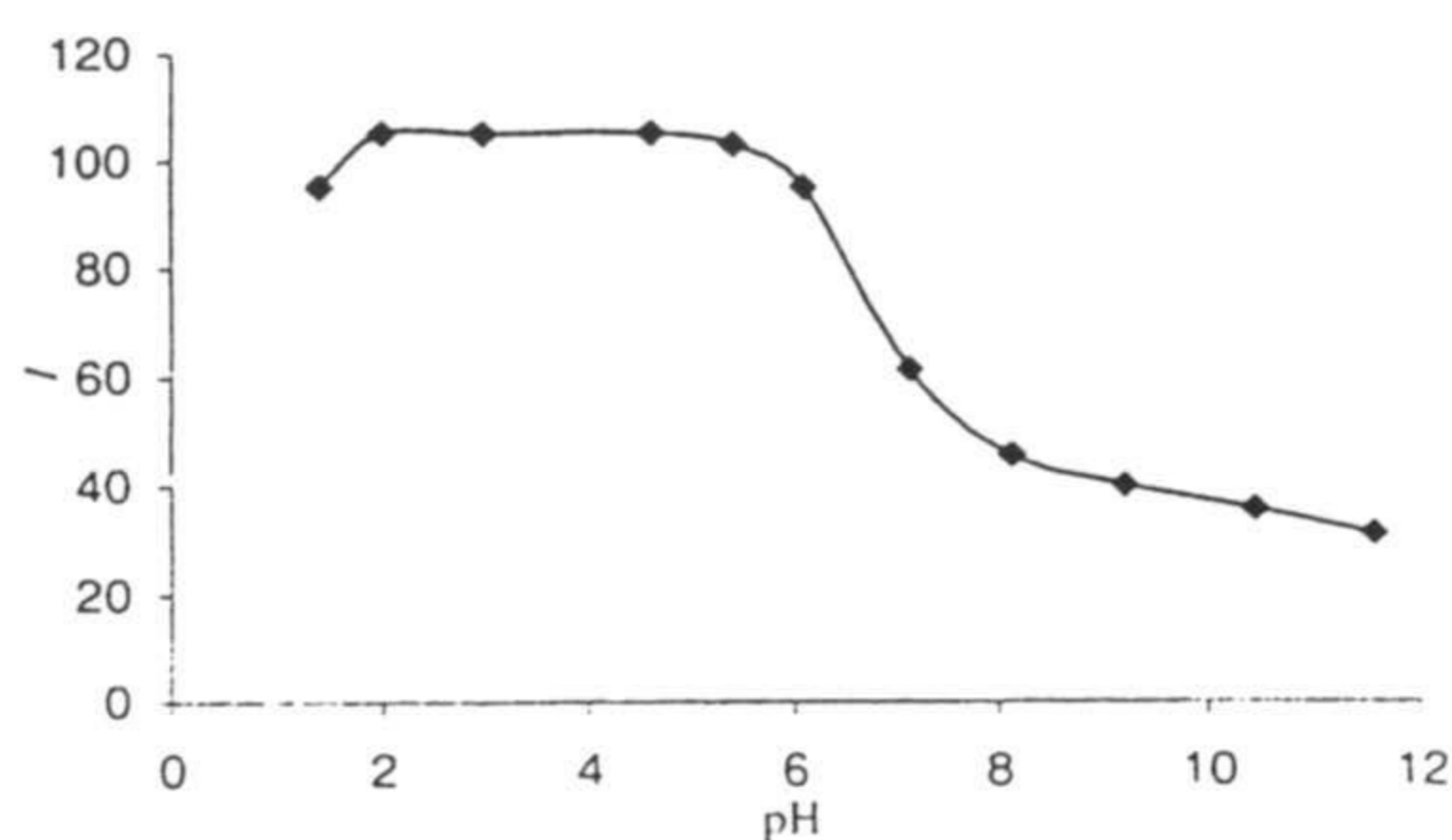


Fig. 3 Influence of the pH of the solution on the relative phosphorescence intensity.

Instrumental parameters

Excitation and emission slit-widths, and delay and gate times were tested as instrumental parameters. The influences of the delay and gate times on the phosphorescence intensity were checked between 0.05 and 0.5 ms for the gate time and between 2 and 11 ms for the delay time and the influence of the slit-widths between 2.5 and 15 nm in both cases. The highest values of phosphorescence intensity were obtained by using excitation and emission slits of 3 and 15 nm, respectively, with a 0.15 ms delay time and a 10 ms gate time.

Calibration process

The absorption process of NA into the sensor can be considered as a solid-liquid extraction. In this process, the amount of analyte retained in the membrane of the sensor depends on two closely connected factors: (i) concentration of analyte in the sample and (ii) equilibration time of the sensor in the sample solution. Consequently, the analytical signal must be expressed as a function of two variables: $I = f(C, t)$, where C is the concentration of analyte in the solution, t the equilibration time, and I the relative phosphorescence intensity, that is a continuous and strictly increasing function in each of the two variables. This calibration process can be carried out in two different forms: (a) by means of a conventional calibration process that consists in establishing the relationship between the analytical signal and the analyte concentration, having fixed previously a constant equilibration time; (b) by means of a calibration process where the analytical signal is simultaneously expressed as a function of the two variables, time and concentration. The second way allows for the choice of the optimum equilibration time for each sample and, therefore, permits one to carry out the phosphorescence measurements with maximum sensitivity. Obviously, the calibration function obtained according to (a) must be a particular case of the calibration function obtained in (b).

In order to obtain an approximation, $s(C, t)$, to the function $f(C, t)$, after obtaining the experimental data (relative phosphorescence intensity for determined C_i and t_j values, where $i = 1 \dots n$ and $j = 1 \dots m$) these data are arranged in a crescent order to form a matrix of $n \times m$ dimensions. From this matrix we can obtain the expression of an interpolate $s(C, t)$ by means of the following equation:

$$s(C, t) = I_{ij} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_{j+1})}{(C_i - C_{i+1})(t_j - t_{j+1})} + I_{i,j+1} \frac{(C - C_{i+1})(t - t_j)}{(C_i - C_{i+1})(t_{j+1} - t_j)} + I_{i+1,j} \frac{(C - C_i)(t - t_{j+1})}{(C_{i+1} - C_i)(t_j - t_{j+1})} + I_{i+1,j+1} \frac{(C - C_i)(t - t_j)}{(C_{i+1} - C_i)(t_{j+1} - t_j)} \quad (1)$$

where: $(C, t) \in [C_i, C_{i+1}] \times [t_j, t_{j+1}]$; I_{ij} is the experimental value of the relative phosphorescence intensity corresponding to $C = C_i$ and $t = t_j$; $I_{i,j+1}$ is the value corresponding to $C = C_i$ and $t = t_{j+1}$, and so on.

To obtain this expression we have adopted a mathematical procedure, named the method of finite elements, that consists in interpolating the experimental data to obtain an approximation of the value of I_i whatever the values of C and t . In this form a spline function in two variables, $s(C, t)$, continue and strictly increasing in each of the two variables, can be obtained. The finite elements used were of the rectangular type-I for the lagrangian data in the vertices of the rectangle. Hence, the value of the phosphorescence intensity for any concentration value C ($C_i \leq C \leq C_{i+1}$) and any equilibration time t ($t_j \leq t \leq t_{j+1}$) can be obtained by means of eqn. (1).

Fig. 4 shows a spatial plotting, formed by 20 parts calculated as indicated above, from the interpolate spline function $s(C, t)$ corresponding to the experimental data of Table 1.

In order to select the optimum equilibration time to estimate the analyte concentration, we assume that this time is that which produces a maximum increase of the analytical signal as a consequence of a determinate increase of the analyte concentration. To assume this fact means mathematically that the numerical derivative of $f(C, t_j)$ as a function of C must present a maximum that corresponds to the interval of the maximum slope of the function $f(C, t_j)$ for a time t_j where j is any value between 1 and m . To calculate this numerical derivative, we have applied a known form of numerical derivation that allows for approximation of the derivative $g'(a)$ of a function $g(x)$ in a point $x = a$, when the values of the near points to $x = a$ are known.³⁰ To obtain the numerical derivative we can use either of two equations:

$$g'(a) \equiv \frac{g(a+h) - g(a)}{h} \quad (2a)$$

and

$$g'(a) \equiv \frac{g(a+h) - g(a-h)}{2h} \quad (2b)$$

with $h \neq 0$, where $g(a+h)$ and $g(a-h)$ are, respectively, the values of the function in the point $a+h$ and $a-h$ (near to a). The second expression (2b) gives better results than the first expression (2a) but its application requires that the data of the table are symmetrically distributed with respect to a , i.e. $C_{i+1} - C_i = C_i - C_{i-1} = \Delta C$ must be constant for any value of i . On the other hand, this equation is not applicable at the concentrations C_1 and C_m because in these cases we do not have values lower than C_1 or higher than C_m . Consequently, for C_1 and C_m we must use eqn. (2a) and in the rest of the cases we use eqn. (2b).

By applying these expressions to the experimental data of Table 1, we have obtained the data summarised in Table 2. In Table 2 we observe that the optimum equilibration time is not the same for different values of concentration. Hence, if the concentration is near 1.5 (for example, between 1.25 and 1.75) mg l^{-1} the optimum equilibration time is 90 min and the value of the numerical derivative that corresponds to the maximum value for $C = 1.5$ is 162. In the same way, for values of

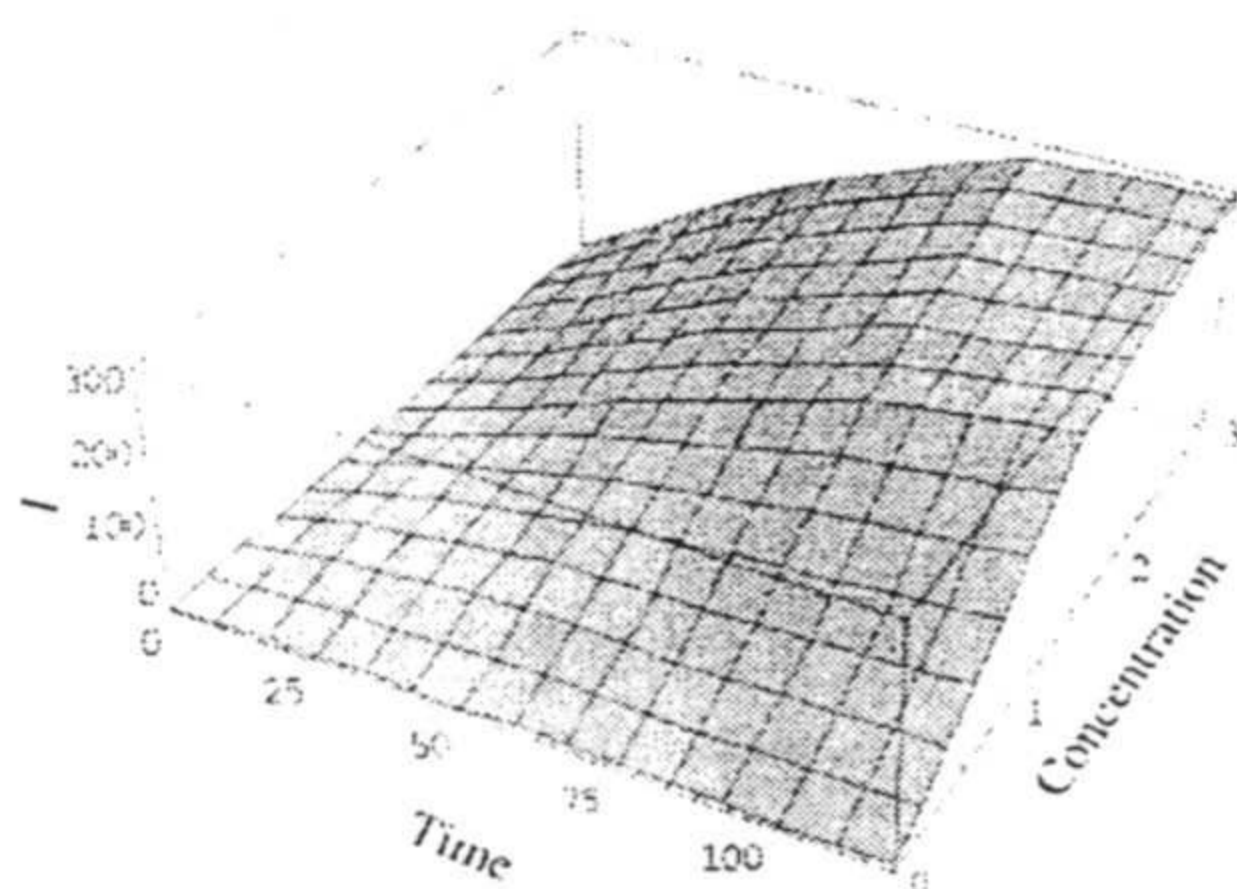


Fig. 4 Spatial plotting of the interpolate spline function $s(C, t)$ corresponding to the experimental data of the Table 1.

Table 2 Values of the numerical derivative of $f(C, t)$ as a function of C

Concentration/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Time/min	15	4	12	17	22	28
	30	6	17	34	40	28
	60	62	63	94	102	57
	90	92	146	162	71	20
	120	146	192	136	32	39
						48

concentration lower than 1.25 mg l^{-1} the optimum time is 120 min, and for values of concentration ranging between 1.75 and 2.75 mg l^{-1} the optimum time is 60 min. This last value, 60 min, is acceptable for all ranges of concentration although it is not the optimum value for low concentration values. However, the value $t = 15$ min is only acceptable for high analyte concentrations and can produce an error when the concentration is low.

In the prediction step of the results, the estimation of the analyte concentration in a real sample can be carried out as follows: initially we select the optimum equilibration time for the intermediate concentration of the linear range of concentrations and we measure the phosphorescence intensity of the sample $I(C_s, t_s)$, where C_s is the concentration of the sample and t_s is the time *a priori* selected. In our case the intermediate concentration is $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ and the optimum time for this concentration is 90 min.

With the aid of the $s(C, t)$ spline [because $s(C, t) \equiv f(C, t)$] we can obtain an approximate value of C_s and in Table 2 we can check whether the equilibration time initially selected to measure $I_s = I(C_s, t_s)$ is the most appropriate for this concentration value. In this case the estimation of the concentration C_s is carried out by means of the following expression:

$$C_s = \frac{I_s(C_i - C_{i+1}) + I_{ij} + I_{ij}C_{i+1,j}C_i}{I_{ij} - I_{j+1,j}} \quad (3)$$

If the equilibration time initially selected is not the most appropriate for the measurement of the analytical signal, we select the optimum time and measure the analytical signal of a replicate of the sample.

In short, the calibration process consists of the following steps:

(1) Obtaining the table of experimental data $I = (I_{ij})$, where $I_{ij} = f(C_i, t_j)$ is the relative phosphorescence intensity emitted by a standard when it has been equilibrated during a time t_j with a solution of concentration C_i .

(2) Obtaining the numerical derivative of $f(C, t_j)$ by application of eqn. (2a) and eqn. (2b) to the experimental data, and the choice of the optimum time for the equilibration of the sensor for the intermediate concentration value previously selected.

(3) Estimation of the sample concentration using eqn. (3) for the optimum time previously selected. If the C_s obtained does not correspond to the optimum value of the equilibration time, a replicate of the sample can be measured using an optimum time that corresponds to the concentration obtained in the first approximation.

Analytical figures of merit

In this work, taking an equilibration time of 120 min, the relationship between the relative phosphorescence intensity and the concentration of NA was linear from 0.06 to $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Under these experimental conditions a calibration graph was obtained by means of ten standards, with three replicates of each standard, and the lack-of-fit test was applied to check its linearity as suggested in ref. 31 and 32. The linear model obtained for $t_j = 120$ min was $I = -5.1 + 192.8C$, with a linear range $0.06\text{--}1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, where I represents the relative phosphorescence intensity (difference between phosphorescence intensity of the sample or standard and phosphorescence intensity of the respective blank), and C the concentration of NA in the sample or standard expressed in $\mu\text{g ml}^{-1}$. The repeatability of the method, expressed as the relative standard deviation (RSD), was obtained from ten standards of NA whose concentration level was $0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$, and was found to be 20%, and the IUPAC detection and quantification limits^{33,34} were determined from ten blanks and were calculated to be 20 and 60

Table 3 Analytical parameters obtained for an equilibration time of 120 min with seven standards and three replicates for each standard

Intercept	-5.1
Slope	192.8
Lack-of-fit test (<i>P</i> -value)	0.65
Linear range/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.06–1.5
Detection limit/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.02
Quantification limit/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.06
Precision (RSD) (%)	2.0

Table 4 Recovery study of NA in actual samples

	Added/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	Found ^a / $\mu\text{g ml}^{-1}$	Recovery (%)	RSD (%)	Equilibration time/min
Human urine	0.5	0.48	96.0	3.9	120
	1.0	0.98	98.0	0.6	120
	2.0	2.01	100.5	2.1	60
	3.0	3.11	103.7	0.6	60
Milk (cow)	1.0	1.02	102.0	0.5	120
	2.0	1.02	102.0	1.3	120
	2.7	2.63	97.4	2.4	60

^a These data are the average of three independent determinations using an equilibration time of 120 or 60 min.

ng ml^{-1} , respectively. Table 3 shows these and other analytical parameters.

Applications

The proposed method was applied to the determination of NA in human urine and milk. As the analysed samples did not contain NA (or the amount of NA contained was not detectable by the method) a recovery study was carried out after the addition of appropriate amounts of the analyte. The results obtained are summarised in Table 4. As can be seen, the recovery, as the average of three independent determinations, ranges between 96.0 and 103.7%.

Conclusions

An intrinsic single-use phosphorimetric sensor to measure the transmitted phosphorescence of NA after its absorption in a sensing membrane has been designed. By means of the proposed calibration method, it is possible to adapt the analytical method to the needs of the problem since, by selecting an appropriate equilibration time, we can obtain a linear dynamic range of the method appropriate for the concentration level of the actual analytical problem. The sensor can be considered as an inexpensive and simple alternative for obtaining analytical information about pollutants at trace levels. The time necessary to analyse a sample can vary between 15 and 120 min depending on the analyte concentration in the sample and the preparation of the sensor, which takes about 60 min.

Acknowledgements

This study was funded by the General Subdirectorate for Training and Knowledge sharing of the Spanish Ministry of Education and Culture (Project No. PB98-1302).

References

- 1 A. D. Campiglia and T. Vo-Dinh, *Talanta*, 1996, 43, 1805.
- 2 R. Pereiro García, Y. Liu, M. Díaz García and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1759.
- 3 B. San Vicente de la Riva, J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 395, 1.
- 4 A. F. Arruda, A. D. Campiglia, B. P. S. Chauhan and P. Boudjouk, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 396, 263.
- 5 Z. Gong and Z. Zhang, *Mikrochim. Acta*, 1997, 126, 117.
- 6 J. Lu and Z. Zhang, *Analyst*, 1995, 120, 2585.
- 7 F. Alava-Moreno and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 281, 367.
- 8 F. Alava-Moreno, M. J. Valencia-González and M. E. Díaz-García, *Analyst*, 1998, 123, 151.
- 9 S. M. Ramasamy and R. J. Hurtubise, *Talanta*, 1998, 47, 971.
- 10 P. Hartmann and W. Ziegler, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4512.
- 11 Y. M. Liu, R. Pereiro-García, M. J. Valencia-Gonzalez, M. E. Díaz-García and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 836.
- 12 J. M. Costa-Fernández, M. E. Díaz-García and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 360, 17.
- 13 M. J. Valencia-González and M. E. Díaz-García, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2726.
- 14 D. Papkovsky, M. A. Uskova, G. V. Ponomarev, T. Korpela, S. Kulmala and G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 374, 1.
- 15 D. Papkovsky, I. V. Desyaterik, G. V. Ponomarev, I. L. Kurochkin and T. Korpela, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 310, 233.
- 16 E. W. McChesney, E. J. Froelich, G. Y. Leshner, A. V. R. Crain and D. Rossi, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1964, 6, 292.
- 17 A. Goodman, L. S. Goodman, T. W. Rall and F. Murad, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Panamericana, Mexico D.F., 7th edn., 1986, pp. 1059–1060.
- 18 G. Dondi and M. di Marco, *Boll. Chim. Farm.*, 1966, 105, 491.
- 19 M. J. J. Vieira da Silva and M. T. C. Nogueira, *Rev. Port. Farm.*, 1965, 15, 290.
- 20 R. S. Browning and E. L. Pratt, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1970, 53, 464.
- 21 R. Staroscik and J. Sulkowska, *Acta Pol. Pharm.*, 1973, 30, 499.
- 22 L. Shargel, R. F. Koss, A. V. R. Crain and V. J. Boyle, *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62, 1452.
- 23 G. Cuisinaud, N. Ferry, M. Seccia, N. Bernard and J. Sassard, *J. Chromatogr.*, 1980, 181, 399.
- 24 R. H. A. Sorel and H. Roseboom, *J. Chromatogr.*, 1979, 162, 461.
- 25 K. Mawatari, F. Iunuma and M. Watanabe, *Jpn. J. Clin. Chem.*, 1992, 21, 13.
- 26 H. Roseboom, R. H. A. Sorel, H. Lingeman and R. Bouwman, *J. Chromatogr.*, 1979, 163, 92.
- 27 L. F. Capitán-Vallvey, F. Ojeda, M. Del Olmo, R. Avidad, A. Navalón and T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.*, 1998, 52, 101.
- 28 Z. Li, X. Li, S. Petrović and J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1717.
- 29 Z. Li, X. Li, S. Petrović and J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1726.
- 30 K. E. Atkinson, *An Introduction to Numerical Analysis*, Wiley, New York, 2nd edn., 1989, p. 316.
- 31 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1994, 119, 2363.
- 32 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1988, 113, 1469.
- 33 Guidelines for Data Acquisition, *Anal. Chem.*, 1980, 52, 2242.
- 34 Nomenclature, Symbols, Units, and their Usage in Spectrochemical Analysis, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1978, 33, 242.

ÍNDICE GENERAL



INTRODUCCIÓN.

I. Resumen histórico del uso médico de las quinolonas.	13
II. Análisis de quinolonas.	24
Métodos clásicos.	25
Métodos espectrofotométricos.	25
Métodos espectrofluorimétricos.	26
Métodos con separaciones cromatográficas.	27
III. Espectrofosforimetría.	31
Los fenómenos fotoluminiscentes.	33
IV Bibliografía.	59

CAPÍTULO 1

1.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA.	66
1.1.1. Fosforimetría en fase sólida.	66
1.1.2. Preparación de los sensores.	66
1.1.3. Preparación de la muestra.	67
1.1.4. Medida de la intensidad de fosforescencia.	68
1.1.5. Tratamiento previo de las muestras reales.	69
1.1.6. Optimización de los parámetros experimentales.	71
1.1.6.1. <i>Espectros de excitación y emisión.</i>	71
1.1.6.2. <i>Parámetros instrumentales</i>	72
1.1.6.3. <i>Parámetros de la muestra.</i>	72
1.1.6.4. <i>Parámetros propios del proceso de fijación.</i>	73
1.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	74
1.2.1. Proceso de calibrado.	74
1.2.2. Calibración univariante.	80
1.2.3. Rechazo de valores anómalos.	81
1.2.4. Función de calibrado.	82
1.2.5. Aceptación del modelo establecido.	84
1.2.5.1. <i>Desviación estándar de la regresión.</i>	84
1.2.5.2. <i>Desviación estándar de la pendiente.</i>	85
1.2.5.3. <i>Desviación estándar del término independiente.</i>	85
1.2.5.4. <i>Intervalos de confianza.</i>	86
1.2.5.5. <i>Desviación estándar de la señal analítica.</i>	86
1.2.5.6. <i>Desviación estándar de la concentración de la muestra.</i>	87

1.2.5.7. <i>Coefficientes de correlación lineal y de determinación.</i>	87
1.2.6. Cálculo de los parámetros analíticos.	88
1.3. MEDIOS MATERIALES.	91
1.3.1. Instrumentación y material de laboratorio.	91
1.3.2. Reactivos y disoluciones.	93
1.3.3. Soportes sólidos para los sensores.	95
1.3.4. Ordenadores y programas informáticos	95
1.4. BIBLIOGRAFÍA .	96
CAPÍTULO 2º	
2.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁCIDO NALIDÍXICO	99
2.1.1. Espectros de fosforescencia en fase sólida del ácido nalidíxico	99
2.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	102
2.2.1 Optimización de variables experimentales que afectan al sensor	105
2.2.1.1 <i>Elección del soporte sólido</i>	105
2.2.1.2 <i>Elección de los componentes de la membrana sensora</i>	106
2.2.1.3. <i>Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.</i>	107
2.2.1.4. <i>Optimización del volumen de plastificante</i>	108
2.2.1.5. <i>Optimización del volumen de disolvente.</i>	109
2.2.1.6. <i>Optimización del volumen del volumen de gota</i>	110
2.2.1.7. <i>Influencia del orden de adición de los reactivos.</i>	111
2.2.1.8. <i>Influencia de la forma y del tiempo de secado del sensor</i>	111
2.2.2. Optimización de parámetros instrumentales	113
2.2.2.1. <i>Influencia del ancho de la rendijas</i>	113
2.2.2.2. <i>Optimización de los tiempos t_d y t_g</i>	114
2.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.	115
2.2.3.1. <i>Optimización del tiempo de equilibrado</i>	116
2.2.3.2. <i>Influencia del modo y velocidad de agitación.</i>	117
2.2.3.3. <i>Influencia de la velocidad de agitación sobre la fosforescencia.</i>	118
2.2.4. Optimización de las variables dependientes de la muestra	118
2.2.4.1. <i>Influencia del átomo pesado.</i>	119
2.2.4.2. <i>Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	120
2.2.4.3. <i>Influencia de la fuerza ionica.</i>	121
2.2.5. Influencia del uso de atmósfera de N ₂ durante la medida.	122
2.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	122

2.4 PROCESO DE CALIBRACIÓN.	123
2.4.1. Calibración mediante procedimiento convencional.	124
2.4.2. Calibración mediante superficie de calibrado.	125
2.4.3. Parámetros analíticos.	131
2.5 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	132
2.6 APLICACIONES ANALÍTICAS	134
2.7 BIBLIOGRAFÍA	136

CAPÍTULO 3

3.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁCIDO OXOLÍNICO.	139
3.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida.	139
3.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	141
3.2.1. Optimización de variables experimentales dependientes del sensor.	141
3.2.1.1. Elección del soporte sólido.	141
3.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.	141
3.2.1.3. Optimización de la matriz polimérica.	142
3.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.	143
3.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.	144
3.2.1.6. Optimización del volumen de gota para preparación del sensor.	145
3.2.1.7. Influencia del orden de adición de los componentes.	146
3.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor.	146
3.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.	147
3.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.	147
3.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_a .	148
3.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.	148
3.2.3.1. Optimización del tiempo de fijación.	149
3.2.3.2. Influencia de la colocación del sensor durante la agitación.	150
3.2.3.2. Influencia de la velocidad de agitación.	150
3.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.	151
3.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.	151
3.2.4.2. Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.	152
3.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica.	153
3.2.5. Influencia de la atmósfera de nitrógeno sobre la fosforescencia.	154
3.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	155
3.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN.	156

3.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.	156
3.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.	160
3.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.	163
3.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.	163
3.5.1. Determinación de ácido oxolínico en muestras de orina humana.	164
3.5.2. Determinación de ácido oxolínico en muestras de leche de vaca.	165
CAPÍTULO 4º	
4.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL ÁC. PIROMÍDICO.	169
4.1.1. Espectros de fosforescencia en fase sólida del ácido piromídico.	169
4.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	171
4.2.1 Optimización de variables experimentales que afectan al sensor.	171
4.2.1.1. Elección del soporte sólido.	171
4.2.1.2. Elección de los componentes de la membrana sensora.	172
4.2.1.3. Optimización de la cantidad de cloruro de polivinilo.	172
4.2.1.4. Optimización del volumen de plastificante.	174
4.2.1.5. Optimización del volumen de disolvente.	174
4.2.1.6. Optimización del volumen de disolución de componentes.	175
4.2.1.7. Influencia del orden de adición de los reactivos.	176
4.2.1.8. Influencia de la forma y tiempo de secado de la gota.	177
4.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.	177
4.2.2.1. Influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión.	178
4.2.2.2. Optimización de los tiempos t_d y t_g	178
4.2.3. Optimización de los parámetros que dependen del proceso de fijación.	179
4.2.3.1. Optimización del tiempo de fijación.	180
4.2.3.2. Optimización de la forma y velocidad de agitación.	181
4.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.	181
4.2.4.1. Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.	182
4.2.4.2. Influencia del pH del medio.	182
4.2.4.3. Influencia de la fuerza iónica del medio.	183
4.2.5. Influencia de atmósfera de N ₂ durante la medida.	184
4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	185
4.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN.	186
4.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.	186
4.4.2. Estudio comparativo de los parámetros analíticos.	190

4.5. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.	193
4.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.	193
4.5.1. Determinación de ácido piromídico en muestras de orina humana.	194
4.5.2. Determinación de ácido piromídico en muestras de leche de vaca.	195
CAPÍTULO 5°	
5.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DE LA FLUMEQUINA	199
5.1.1 Espectros de fosforescencia en fase sólida	199
5.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	201
5.2.1. Optimización de variables experimentales dependientes del sensor.	201
5.2.1.1. <i>Elección del soporte sólido.</i>	201
5.2.1.2. <i>Elección de los componentes de la membrana sensora.</i>	202
5.2.1.3. <i>Optimización de la cantidad de polímero .</i>	202
5.2.1.4. <i>Optimización del volumen de plastificante.</i>	203
5.2.1.5. <i>Optimización del volumen de disolvente.</i>	204
5.2.1.6. <i>Optimización del volumen de gota para preparación del sensor.</i>	205
5.2.1.7. <i>Influencia del orden de adición de los componentes.</i>	205
5.2.1.8. <i>Influencia de la forma y tiempo de secado del sensor.</i>	206
5.2.2. Optimización de parámetros instrumentales.	206
5.2.2.1. <i>Optimización del ancho de las rendijas de excitación y emisión.</i>	206
5.2.2.2. <i>Optimización de los tiempos t_a y t_d</i>	207
5.2.3. Influencia de los parámetros dependientes del proceso de fijación.	207
5.2.3.1 <i>Optimización del tiempo de fijación.</i>	208
5.2.3.2. <i>Influencia de la colocación del sensor durante la agitación.</i>	209
5.2.3.3 <i>Influencia de la velocidad de agitación.</i>	209
5.2.4. Optimización de las variables que dependen de la muestra.	209
5.2.4.1. <i>Influencia del átomo pesado sobre la fosforescencia.</i>	209
5.2.4.2. <i>Influencia del pH sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	211
5.2.4.3. <i>Influencia de la fuerza iónica.</i>	211
5.2.5. Influencia de la atmósfera de nitrógeno sobre la fosforescencia.	213
5.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO.	213
5.4. PROCESO DE CALIBRACIÓN.	214
5.4.1. Relación entre señal analítica y concentración.	218
5.4.2. Estudio comparativo de los diferentes parámetros analíticos.	205
5.5. ESTUDIO DE LASA INTERFERENCIAS.	220

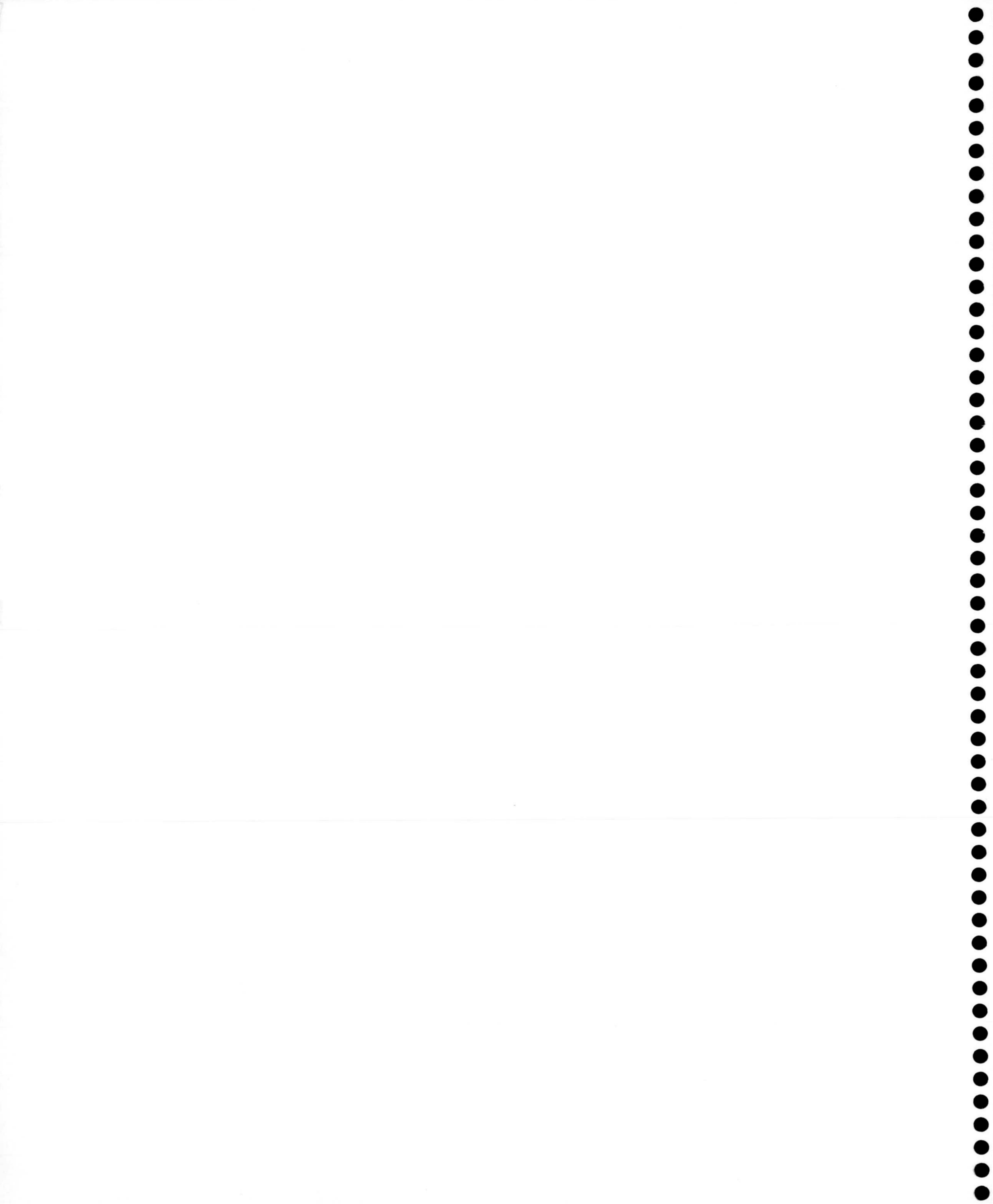
5.6. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO.	220
5.5.1. Determinación de la flumequina en muestras de orina humana.	220
5.5.2. Determinación de la flumequina en muestras de leche de vaca.	221

CAPÍTULO 6°

6.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES	226
6.1.1. Espectros de fosforescencia total	226
6.1.2. Topograma de curvas de fosforescencia	227
6.1.3. Elección del intervalo de longitudes de onda del espectro sincrónico	228
6.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.	229
6.2.1. Optimización de los componentes de la membrana.	230
6.2.2. Optimización del tiempo y velocidad de agitación de la disolución	230
6.3. PROCESO DE CALIBRADO	232
6.3.1. Parámetros analíticos	235
6.3.2. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado	235
6.3.3. Rectas de calibrado del ácido piromídico	236
6.3.4. Parámetros analíticos.	238
6.3.5. Ecuaciones de las tres rectas de calibrado.	238
6.5. APLICACIONES ANALÍTICAS DEL MÉTODO	239
6.5.1. Determinación de piromídico y nalidíxico en orina humana	239
6.5.2. Determinación de piromídico y nalidíxico en leche de vaca	243

CONCLUSIONES	247
---------------------	-----

PUBLICACIONES	251
----------------------	-----





Biblioteca Universitaria de Granada



01066926