



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
ANALÍTICA**

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

Facultad de Ciencias

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO, IDENTIFICACIÓN Y  
SEPARACIÓN DE ALGUNOS  
COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS,  
METABOLITOS Y COMPUESTOS CO-  
ADMINISTRADOS**

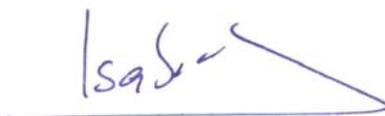
**M<sup>a</sup> José Rodríguez Gómez  
Badajoz 2004**

**ESTUDIO, IDENTIFICACIÓN Y  
SEPARACIÓN DE ALGUNOS  
COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS,  
METABOLITOS Y COMPUESTOS CO-  
ADMINISTRADOS**

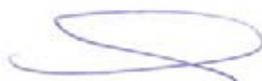
por

**María José Rodríguez Gómez**

**VISADO en Badajoz a 28 de Mayo de 2004**



Fdo. – Dra. Dña. Isabel Durán Martín-Merás  
Profesora Titular del Departamento de Química  
Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad  
de Extremadura



Fdo. – Dra. Dña. Anunciación Espinosa Mansilla  
Catedrática del Departamento de Química Analítica de  
la Facultad de Ciencias de la Universidad de  
Extremadura

Memoria de Investigación presentada para optar al  
Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado  
“Ciencias Químicas”, bienio 1998-2000, impartido por  
el Departamento de Química Analítica de la  
Universidad de Extremadura



Fdo.: M<sup>a</sup> José Rodríguez Gómez

FRANCISCO SALINAS LÓPEZ, Catedrático y Director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

INFORMA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de “ESTUDIO, IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE ALGUNOS COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS METABOLITOS Y COMPUESTOS CO-ADMINISTRADOS”, ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. **Isabel Durán Martín-Merás** y la Dra. Dña. **Anunciación Espinosa Mansilla**, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Sección de Químicas.

Badajoz, 28 de Mayo de 2004



## **AGRADECIMIENTOS**

Una vez concluída (o dada por concluída) una de las etapas más gratificante e importante de mi vida, la realización de mi Tesis Doctoral, es de agradecida obligación citar a todas las personas que han contribuído a que este trabajo vea por fin la luz.

A las Doctoras Isabel Durán Merás y Anunciación Espinosa Mansilla, Directora y co-Directora, respectivamente, por su apoyo incondicional, su paciencia y su sonrisa aunque no siempre salieran las cosas del modo esperado. He aprendido mucho de ellas, tanto de Química Analítica, objetivo de este trabajo, como de la constancia y esfuerzo por los metas que nos marcamos.

A todos los demás profesores del Departamento de Química Analítica: Dr. D. Francisco Salinas, director del mismo, Dra. Carmen Mahedero, Dra. Teresa Galeano, Dra. Agustina Guiberteau, Dra. M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez y Dra. Nielene Mora, gracias por vuestra acogida, ayuda y cariño a lo largo de estos años. Tengo que hacer una mención especial al Dr. D. Francisco Salinas a la Dra. Carmen Mahedero y a la Dra. Teresa Galeano, por su ayuda en mis inicios con la docencia frente a la cual estaba un poco asustada.

A Manolo Caro, por el tiempo que le he robado, por su ayuda siempre incondicional y alegre. Sin él esto hubiera sido demasiado complicado.

Al Dr. D. Juan José Berzas Nevado, a la Dra. Juana Rodríguez Flores y al Dr. Gregorio Castañeda Peñalvo, miembros del Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Castilla la Mancha, así como al resto de compañeros, por su acogida, su cariño y el buen recuerdo que me queda de la estancia en esas tierras manchegas.

Al Dr. Luis Constantino, profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Lisboa, por su acogimiento y su paciencia para enseñarme el complejo mundo de la química orgánica farmacéutica. También debo mencionar al resto de compañeros de dicha Facultad, en especial a Raquel, Rita y Lina por su cariño desde el primer momento el cual todavía perdura.

A mis padres, que han sido siempre lo más importante, el motor que me ha llevado a presentar esta Tesis Doctoral. Sin duda la felicidad de este momento se lo debo a ellos. Perdón por tantas horas que os he robado por llegar a esto. Por supuesto, debo mencionar a mi abuela, que aunque ya no está entre nosotros, gran parte de esto se lo debo a ella por su esfuerzo diario e incondicional.

A ti Alberto, por tu apoyo, y por tantos momentos robados a nuestra relación, por los cuales prometo compensarte.

A los compañeros del departamento, Toni, Flori, Belén, María, Santos, Lole, Manolo, David, Diego,

Antonio, Ana, con los que comparto todos los días, de los que tendría que comentar algo de cada uno de ellos pero que en mi cabeza se resume en una gran sonrisa que es lo que siempre me han transmitido. Espero teneros siempre cerca.

También debo mencionar a los amigos ajenos a la química, mi incondicional Maribel, Carlos, Belén, Miguel....que aunque no les ponga nombre a todos, siempre estarán ahí.

Por último, al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por la beca que me ha concedido y que me ha permitido culminar este trabajo

**GRACIAS A TODOS**

*A mis padres*

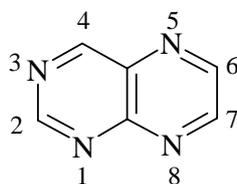
*“La ilusión despierta el empeño y solamente la  
paciencia lo termina”*

*(Anónimo)*

**The aim of this Investigation's Memory is the analytical study of antineoplastic, marked and co-administrated compounds and the establishment of new methods for applications in biological samples. Concretely, pteridin compounds, folates and anti-folates.**

## OBJETO DE LA TESIS DOCTORAL

El objeto de esta Memoria de Investigación es el estudio analítico de antineoplásicos, marcadores y compuestos co-administrados y la puesta a punto de nuevos métodos para su determinación en fluidos biológicos. La mayoría de los analitos objeto de estudio son compuestos heterociclos que presentan un esqueleto común basado en dos anillos condensados pirazino [2, 3-d] pirimidina, que reciben el nombre común de pteridinas. La pteridinas naturales presentan un grupo amino en posición 2 y uno hidroxilo en posición 4, siendo posible una gran variedad de sustituyentes en las posiciones 6 y 7.



*Estructura pteridínica*

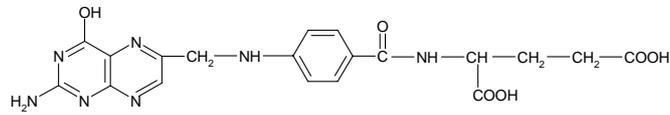
En concreto los compuestos con estructura pteridínica que estudiamos son: **ácido fólico, metotrexato, triamtereno, ácido pterín-6-carboxílico, neopterín, biopterín, xantopterín e isoxantopterín.** También se incluye el **ácido folínico o leucovorin**, que se administra en el tratamiento con metotrexato y la **creatinina**, que se utiliza como referencia en los análisis de orina.



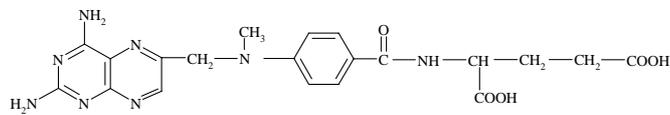
## **CAPÍTULO I**

**INTRODUCCIÓN. NATURALEZA DE LOS  
COMPUESTOS PTERIDÍNICOS Y REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA. APARATOS Y REACTIVOS**

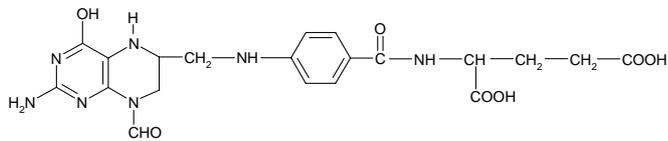
En los primeros Capítulos de esta Memoria exponemos los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades analíticas de cuatro de los principios activos con actividad farmacológica cuya estructura química deriva del anillo pteridínico. Concretamente nos referimos a los compuestos denominados **ácido fólico**, el cual actúa como precursor en la síntesis de DNA, **metotrexato**, perteneciente al grupo de los antifolatos, con actividad quimioterápica en los tratamientos antineoplásicos, **leucovorín o ácido folínico**, compuesto perteneciente al grupo de los folatos, empleado en los tratamientos de terapia de rescate de la toxicidad de los quimioterápicos, y **triamtereno**, cuya actividad diurética y dopante presenta un elevado interés clínico. Por lo que este primer capítulo lo dedicaremos a comentar las propiedades más interesantes y a hacer una revisión bibliográfica de dichos compuestos. Las estructuras de estos compuestos se presentan en la Figura I.1.



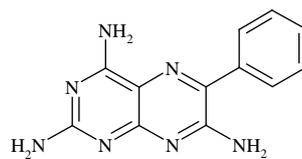
Ácido fólico



Metotrexato



Ácido folínico



Triamtereno

**Figura I.1.-** Estructura química de los diferentes compuestos

## **I.1.- CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO FÓLICO**

El ácido fólico (ácido pteroilglutámico ó ácido 4-(2-amino-4-hidroxipteridin-6-il)metilamino-benzoil-L-glutámico) es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B<sub>9</sub>) que ayuda a la formación de células saludables. Que sea vitamina “hidrosoluble” quiere decir que no permanece en el cuerpo durante mucho tiempo, por tanto, necesitamos un aporte diario de dicha vitamina.

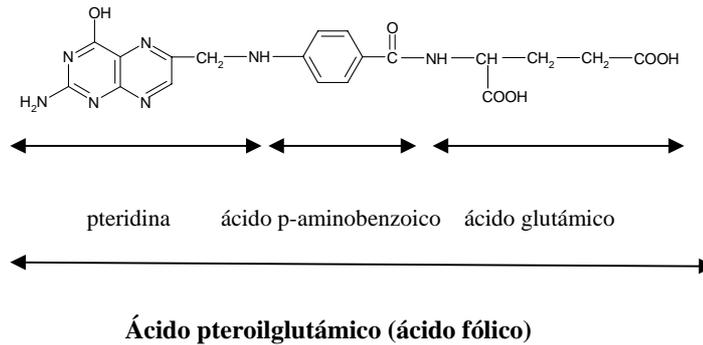
El interés en la determinación de este compuesto radica en recientes investigaciones las cuales indican que numerosos desórdenes celulares, especialmente los relacionados con malformaciones durante el embarazo. Es normalmente empleado en el tratamiento o la prevención de anemia megaloblástica, durante el embarazo, y otras situaciones clínicas a menudo asociadas con alcoholismo (1).

Hay dos forma diferentes del ácido fólico:

*1.- Forma sintética:* esta se encuentra en preparados multivitamínicos (aunque aquí no se debería incluir el ácido fólico debido a que pueden ocultar una anemia perniciosa subyacente), pan y cereales fortificados y prescripciones farmacéuticas por ejemplo en el caso de mujeres embarazadas.

2.- *Forma natural:* o también llamado “folato”. Esta forma se encuentra en alimentos tales como vegetales, frutas...

Nuestro cuerpo absorbe la forma sintética del ácido fólico más fácilmente que la forma natural.



**Figura 1.2.-** Estructura química del ácido pteroilglutámico

El ácido pteroilglutámico está formado por un anillo de pteridina, un residuo de p-aminobenzoico, unido a la pteridina por un puente metileno mediante un enlace C9 - N10 y por un residuo de ácido glutámico.

Los distintos folatos se diferencian entre sí por los sustituyentes que se pueden localizar a lo largo de su molécula y los diferentes grados de reducción que el anillo de pteridina puede presentar. Dichos folatos juegan un importantísimo papel en diversas rutas bioquímicas.

Los folatos se distribuyen en el organismo a través de la circulación, principalmente hacia los tejidos de rápida división celular, como la médula ósea o la

mucosa gastrointestinal, ya que necesitan el folato para la síntesis de ADN. En los tejidos de mamíferos, se encuentran principalmente como derivados poliglutamados, encontrándose los pteroilmonoglutamatos únicamente en plasma y orina. La poliglutamilación y las proteínas ligante de folatos son las responsables de la retención de los folatos en los tejidos (2,3).

El contenido total de folatos en el organismo se encuentra entre 5 y 10 mg, siendo los órganos más ricos en folatos el hígado (2.7 - 15.6  $\mu\text{g/g}$ ) y el cerebro.

Hay condiciones especiales como una dieta deficitaria, alcoholismo, terapia con metotrexato y otros fármacos antifolato, que se han asociado con una deficiencia de ácido fólico.

Los folatos son eliminados del organismo a través de las vías fecal y urinaria. A través de la orina se eliminan los folatos metabolizados como pteridinas y ácido benzoilglutámico, compuestos que se forman tras la ruptura del enlace C9 - N10 del ácido fólico. El rango de folatos eliminados por vía urinaria oscila entre 1 y 10  $\mu\text{g/día}$  en forma de metabolitos (4).

Los folatos participan en el metabolismo de ciertos aminoácidos, en la síntesis de S-adenosilmetionina y en la síntesis de purinas y pirimidinas. El ácido fólico participa en reacciones importantes para la síntesis de ADN. Es esencial cuando la síntesis y el recambio de

ADN es rápido, como en los tejidos hematopoyéticos, la mucosa gastrointestinal y el embrión en desarrollo.

Recientes estudios han demostrado que una ingestión diaria de 0.4 - 10 mg de ácido fólico antes del embarazo, disminuye en un 50 % la aparición de defectos del tubo neural en el feto, durante su desarrollo en el útero materno.

Algunos fármacos, como la difenilhidantoína y el triamtereno, inhiben una conjugasa intestinal que rompe la parte poliglutamato del ácido fólico natural y puede producir anemia megaloblástica. El uso prolongado de fármacos, como los anticonvulsivos, los antipalúdicos y los esteroides, también predisponen a la deficiencia de folato (5).

### **I.1.1.- Métodos más comunes para la determinación del ácido fólico**

Son muy numerosos los métodos propuestos para la determinación de esta vitamina y entre ellos los más numerosos son los que hacen uso de las técnicas cromatográficas, especialmente HPLC en modalidad inversa, siendo las columnas tipo C18 las más utilizadas. El sistema de detección más usado es el fotométrico proponiéndose diferentes longitudes de onda para su determinación tales como 254, 280, 290 y 360 nm principalmente. En menor medida es utilizada la detección fluorimétrica y la detección electroquímica. En cuanto a las muestras analizadas, comprenden gran

variedad, desde formulaciones farmacéuticas hasta fluidos biológicos pasando por alimentos tales como vegetales, leche en polvo, harina, cereales, etc. Algunos de los métodos más recientes propuestos mediante esta técnica se recogen en la Tabla I.1.

Diversas técnicas electroquímicas también han sido propuestas para la determinación de esta vitamina tal como se pone de manifiesto en los diferentes métodos que se resumen en la Tabla I.2.

En la Tabla I.3 se resumen otros métodos propuestos que utilizan otras técnicas instrumentales, como la espectrofotometría de absorción molecular (50) y la espectrofluorimetría (51, 52). Estos métodos son utilizados principalmente para determinar ácido fólico en preparados vitamínicos.

Por último, técnicas tales como el uso de sistemas de análisis de flujo interrumpido (FIA)(53) y la electroforesis capilar (54) son también aplicadas a la determinación del ácido fólico.

**Tabla I.1.- Métodos de análisis de ácido fólico mediante HPLC**

Analito	Detección	Elución	Muestra	Ref
Mezcla de vitaminas	UV: 290, 254 y 360 nm	Gradiente Fosfórico/ACN, pH 3.8	Tabletas y leche en polvo	6
Ácido fólico	-----	-----	Formulación farmacéutica	7
Ácido fólico y ácido folínico	2 detectores fluorescentes; emisión: 360 y 460 nm; excitación: 280 y 359 nm	Gradiente Fosfato/ACN, pH 2.1	Vegetales, leche en polvo y harina	8
Multivitaminas (incluido ácido fólico)	Diodo array	Gradiente KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /ACN pH 5.6	Preparado comercial multivitamínico	9
Ácido fólico	Fotométrica a 280 nm	Isocrática K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /metanol pH 6.8	Cereales fortificados	10
Ácido fólico y sus productos de fotodegradación	Fotométrica a 254 nm	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /hidróxido tetrabutil amonio/ metanol (870:15:250)	-----	11
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a diferentes $\lambda$ para cada vitamina	Ácido acético glacial/metanol	Leche infantil	12
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 290 nm	Gradiente metanol/NH <sub>4</sub> Ac	Flúidos biológicos y fármacos	13
Folatos	Fotométrica a 290 nm (para ácido fólico) Fluorescente para el resto	Gradiente ACN / fosfato, pH 2.2	Hígado y productos derivados	14

Capítulo I.- Introducción

Ácido fólico	Ensayo microbiológico con <i>Lactobacillus casei</i>	Tampón fosfato citrato pH 4.0/HAc 1%/metanol (43:42:15)	Suero sanguíneo	15
Vitaminas	Fotométrica a 272 nm	Gradiente: metanol/H <sub>2</sub> O conteniendo hexanosulfonato, HAc y trietilamina	Arroz marrón en polvo	16
Ácido fólico y sus derivados	Fluorimétrica a 439.6 nm (exc a 295.5 nm)	Disolución acuosa con 30% MeOH	Flúidos biológicos	17
Ácido fólico	Diodo-array a 300 y 340 nm	Hidrogeno sulfato de tetrametilamonio pH 8.5 / ACN	Alimentos	18

Tabla I.1.- Continuación

Analito	Detección	Elución	Muestra	Referencia
Ácido fólico	Fotométrica a 360 nm	Disolución acuosa con 9 % de ACN, pH 2.1	Dietas suplementarias	19
Ácido fólico	Electroquímica con electrodo de carbón vitreo	MeOH en tampón fosfato-acetato pH 5	Zumo de frutas	20
Vitaminas B1, B6, B12 y ácido fólico	Fotométrica a 254 nm	Tampón fosfato pH 7/ metanol (4:1)	Preparaciones multivitamínicas	21
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 254 nm	ACN/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /dietilamina (16:183:1) conteniendo octanosulfonato sódico	Líquidos tónicos orales	22
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 278 nm (para ác. Fólico)	En gradiente: tampón KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6 / MeOH	Alimentos y tabletas multivitamínicas	23
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 254 nm	Pentanosulfato sódico-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en CH <sub>3</sub> CN	-----	24

Capítulo I.- Introducción

Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 210 nm	CH <sub>3</sub> CN/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 4 (10:90)	-----	25
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 210 nm	Gradiente: ACN/ fosfato pH 4 (5:95) y ACN/fosfato pH 4 (20:80)	-----	26
Vitaminas hidrosolubles	Diodo array	En gradiente: MeOH /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7	Preparados farmacéuticos	27
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 217 o 266 nm	Hexanosulfato sódico /MeOH (17:3) a pH 3	-----	28
Folatos	Fotométrica a 290 nm para ác. fólico. Fluorescente para el resto	En gradiente: ACN/tampón fosfato pH 2.2	Pescado, carne, huevos, leche, pollo y productos de pescado y cármicos	29
Vitaminas hidrosolubles	Fotométrica a 272, 254 y 280 nm	Ggradiente MeOH/hexanosulfato sódico/tampón fosfato pH 2.8	Preparaciones multivitamínicas	30
Ácido fólico	Fotométrica a 345 nm	Gradiente lineal ACN	Fármacos nutricionales para niños y adultos	31

Tabla I.1.- Continuación

Analito	Detección	Elución	Muestra	Ref
Vitaminas hidrosolubles	Electroquímica	-----	-----	32
Folatos	LC-MS	HAc/Acetonitrilo	--	33
Mezcla de vitaminas	230 nm	Gradiente fosfato/acetoniitrilo	Preparados vitamínicos y alimentos	34
Ácido fólico	Fluorescencia	Fosfato/Acetonitrilo y ácido octanosulfónico	Plasma	35
Ácido fólico	284 nm	Gradiente	Zumos de frutas enriquecidos	36
Folatos	$\lambda_{ex}=295$ nm, $\lambda_{em}=356$ nm	Gradiente Fosfato/Acetonitrilo	Alimentos	37

Vitaminas	UV	HAc/Metanol/Trietilamina y ácido octanosulfónico	Leches infantiles	38
Folatos	MS		Plasma	39
Vitaminas hidrosolubles		Dodecilsulfato/n-propanol/ agua	Fármacos	40
Vitaminas hidrosolubles	280 nm	Fosfato/metanol pH 2.8	Fármacos	41
Folatos	LC-MS		Alimentos	42

**Tabla I.2.- Métodos de análisis de ácido fólico mediante técnicas electroquímicas**

Analitos	Técnica	Electrodo	Muestra	Ref.
Riboflavina y ácido fólico	Voltamperometría de onda cuadrada	Gota estática de Hg	Preparaciones farmacéuticas	43
Ácido fólico	Voltamperometría de redisolución adsortiva	Gota de Hg suspendida	Preparaciones farmacéuticas	44
Ácido fólico	Voltamperometría de redisolución catódica	Gota de Hg	Agua de mar	45
Ácido fólico	Polarografía diferencial de pulso	Gota de Hg	Preparaciones farmacéuticas	46
Riboflavina y ácido fólico	Voltamperometría de redisolución adsortiva	Gota de Hg suspendida	Preparaciones multivitamínicas	47
Ácido fólico	Voltamperometría	Pasta de carbón modificada	Medios biológicos y acuoso	48
TRI, MTX, dipiridamol, ác. fólico, 8-bromoguanosina, riboflavina y azafeno	Voltamperometría	Electrodo de Hg	-----	49

**Tabla I.3.- Otros métodos de análisis**

Método	Procedimiento	Ref.
Fotométrico, 8 = 655 nm	Reducción de Ce (IV) a Ce (III) por ácido fólico seguido de la formación de un complejo coloreado de Ce (III) con arsenazo (III)	50
Fluorimétrico	Reacción con fluorescamina	51
Fluorimétrico	Mezclar la muestra con algunas gotas de NH <sub>4</sub> OH, calentar a 70 °C y llevar a 100 mL. 1 mL mezclar con 4.9 mL de tampón acético/acetato pH 4.2 y KMnO <sub>4</sub> 0.1 M	52
FIA	Detección mediante fluorescencia, después de irradiar con luz UV	53
Electroforesis capilar	Utilizando como electrolito soporte 0.05 M- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /25 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pH 8, mediante detección electroquímica	54

## I.2.- CARACTERÍSTICAS DEL METOTREXATO

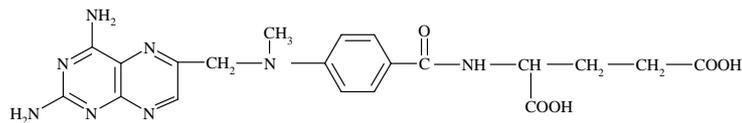
El metotrexato (MTX) es un principio activo que inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) impidiendo de esta manera la formación de tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de purinas y pirimidinas y la consecuente formación de DNA y RNA. Por tanto, el MTX se considera como un antifolato el cual ha demostrado actividad antineoplásica efectiva en el tratamiento de proliferación de desórdenes celulares.

La eficacia del MTX ha sido demostrada en el tratamiento de desórdenes neoplásicos tales como leucemia linfocítica, linfoma non-Hodgkin, carcinomas de mama, lengua, faringe, coriocarcinoma, sarcoma osteogénico, tumores de vejiga urinaria, tumores de

cerebro y neoplasmas cutáneos tales como micosis (55-57). La actividad antineoplásica del MTX es más efectiva en elevadas dosis, siendo los primeros ensayos clínicos de este fármaco de hace aproximadamente 40 años.

*Propiedades físicas y químicas del MTX:*

El MTX, antifolato típico, es un compuesto pteridínico 4-amino-sustituído de la forma:



**Figura I.3.- Estructura química del metotrexato**

De la sustitución del 4-hidroxil por un grupo amino, resulta un folato análogo con una gran afinidad por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el MTX se considera un inhibidor de este compuesto.

El MTX es insoluble a pH ácido y precipita en orina acidificada para una concentración superior a 2 mM. A pH 7.4, se ioniza, y su solubilidad es 10 veces mayor que en orina ácida. La alcalinización previene la precipitación, mejora la claridad renal y de este modo, reduce la nefrotoxicidad.

Como ocurre con la mayor parte de los folatos intracelulares, el MTX está sustituido por la adición secuencial de ácido glutámico. Los metabolitos predominantes son las formas penta y hexaglutamatos.

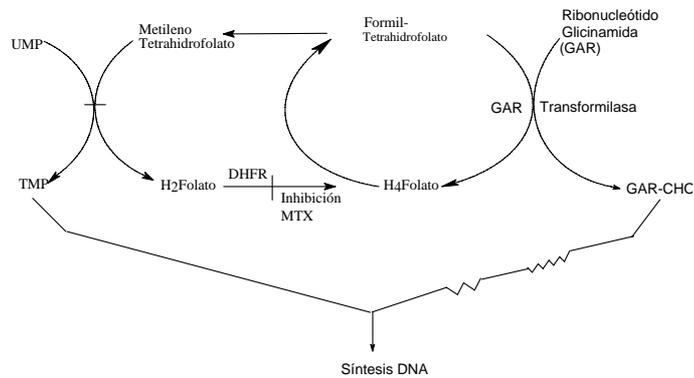
*Mecanismo de actividad quimioterapéutica:*

El MTX y sus análogos, edatrexato y trimetrexato, inhiben la enzima intracelular DHFR, la cual es esencial para la conversión del ácido fólico al folato reducido.

La concentración celular de DHFR es mucho mayor que la necesaria para mantener una cantidad adecuada de folato reducido. Si el MTX liga la enzima objeto, DHFR, la síntesis de folato continua hasta que aproximadamente el 95% de la actividad de la DHFR ha sido inhibida. Por tanto, para que el MTX pueda actuar, este debe estar en una concentración relativamente alta, para asegurar la inhibición de incluso pequeñas fracciones de DHFR.

Si el MTX inhibe la DHFR, estaremos logrando que no se de una proliferación grande de células que es lo que ocurre en un cáncer.

En la Figura I.4 se resume la acción del MTX:



**Figura I.4.- Mecanismo de acción del MTX**

El MTX actúa bloqueando dos reacciones: 1.- Reducción del dihidrofolato (H<sub>2</sub>folato) a tetrahydrofolato (H<sub>4</sub>folato); 2.- Conversión de monofosfatodeoxiuridina (UMP) a monofosfatodeoxitimidina (TMP).

*Consideraciones terapéuticas:*

Dosis bajas de MTX (<100 mg/m<sup>2</sup>) han demostrado ser efectiva en ciertos tratamientos malignos. Pero viendo las corrientes de aplicación del MTX en farmacología celular, han llegado a que el MTX debe administrarse en altas dosis (1.000 mg/m<sup>2</sup>) (58). Debido a las altas concentraciones extracelulares, el MTX entra en la célula por difusión pasiva y puede acumularse en células que son deficientes en transportadores.

La eficacia de las drogas antifolato se puede extender a la poliglutamación intracelular (58-60). En la mayoría de las células, la poliglutamación no ocurre

hasta que las células son expuestas a una concentración de MTX de  $10^{-6}$ M durante al menos 6 h. Así, la glutamación es dependiente del tiempo y la concentración (59).

Los pacientes que reciben altas dosis de MTX deben ser muy vigilados por la toxicidad del tratamiento. La nefrotoxicidad reversible es uno de los graves problemas, seguido de mucositis gastrointestinal, náusea y vómitos son señales evidentes de la toxicidad del MTX.

La toxicidad intrínseca inducida por MTX puede ser reducida si disminuimos la actividad antitumoral de la droga mediante uso de leucovorín (LV), que actúa como una estrategia de rescate en el tratamiento terapéutico (57,59). El LV es una mezcla racémica de los esteroisómeros del N<sup>5</sup>-formiltetrahidrofolato, siendo solo el isómero L el efectivo en el tratamiento de la toxicidad del MTX. El LV protege selectivamente a las células normales (no cancerígenas) de los efectos antimetabólicos del MTX, mientras que las células tumorales no son protegidas y los efectos del MTX continúan. La clave del rescate o “protección”, radica en que el LV puede desplazar al MTX de DHFR, permitiendo la reactivación de la enzima.

Nos podemos preguntar el porque las células tumorales y normales no se afectan igualmente por LV. La respuesta debe ser que las células tumorales tienen

una gran afinidad por la forma MTX-poliglutamato que las células normales no tienen. En presencia de MTX-poliglutamato, el desplazamiento competitivo por LV no ocurre y la DHFR es inactiva.

La toxicidad en los pacientes debido al MTX es difícil de predecir ya que varía de un individuo a otro. Concentraciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M a las 24, 48 y 72 h en suero, después de la administración de MTX son consideradas como tóxicas.

### **I.2.1.- Métodos más comunes para la determinación del metotrexato**

Hay varios métodos analíticos apropiados para la determinación de MTX. En el resumen que sigue podemos ver de forma esquematizada los distintos métodos utilizados, y comentarios acerca del fundamento y ensayos específicos de cada método.

La técnica de espectrofotometría UV-visible se ha aplicado a la determinación de metotrexato principalmente en preparaciones farmacéuticas (61,62). Estos procedimientos presentan intervalos de concentración cortos comparados con otras técnicas por ejemplo las cromatográficas.

Son numerosos los trabajos donde se determina metotrexato utilizando técnicas cromatográficas y más

concretamente HPLC. Principalmente se determina metotrexato en unión de su principal metabolito, el 7-hidroxi-metotrexato. Cuando se determina metotrexato, empleando detección fluorescente, es necesario un paso previo de oxidación, bien previo a la separación o utilizando un sistema de oxidación on-line acoplado con una irradiación con luz UV y principalmente utilizan una columna C18. Este analito y sus metabolitos se determinan principalmente en fluidos biológicos, Tabla I.4. Las muestras de plasma contaminadas con metotrexato son tratadas previamente antes de la inyección.

El proceso de adsorción que sufre tanto el metotrexato como su producto reducido en la cara de la gota del electrodo de Hg se estudió polarográficamente (89), dando lugar a un procedimiento selectivo y con elevada sensibilidad. Dentro del campo de las técnicas electroanalíticas, se empleó también la voltametría de redisolución catódica y con electrodo de gota estática de Hg (90) y de redisolución anódica (91) para la determinación de MTX.

Mediante electroforesis capilar y en concreto de zona se ha determinado metotrexato y sus metabolitos (86-88) en fluidos biológicos. Los capilares son principalmente de sílice fundida con electrolito conteniendo fosfato en la mayoría de los casos, y se determina en fluidos biológicos principalmente.

## *Capítulo I.- Introducción*

A continuación se incluyen tablas resúmenes sobre los principales métodos de análisis de MTX encontrados en la bibliografía.

**Tabla I.4.- Métodos de determinación de metotrexato mediante HPLC**

Analito	Detección	Elución	Calibración	Muestra	Ref
MTX y su 7-OH-metabolito	Fluorescente a 435 nm (exc 350 nm)	Tampón fosfato 0.1M (pH6.5)/ 6%DMF/30% H <sub>2</sub> O	2.5-50 ng/ml	Plasma	63
MTX y 7-OH-MTX	Fotométrica a 303 nm	ACN/tampón fosfato 50mM (pH5.3) (19:181)	5-1000 ng/ml	Orina	64
MTX y 7-OH-MTX	Fotométrica a 307 nm	12% ACN en 0.025M-tampón acetato sodio pH3.9	0.202-16.7 :g/ml (MTX) 0.084-6.83 :g/ml (7-OH-MTX)	Plasma	65
MTX y sus 2 metabolitos	Fluorescente fotoinducida a 435 nm (exc 350 nm)	0.01M-tampón fosfato(pH6.5), en 6% ACN y 0.2% de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> del 30%	0.2-500 nM	Flúidos biológicos	66
MTX y 7-OH-MTX	Fluorimétrica a 465 nm (exc 350 nm)	0.014M-tampón fosfato pH6.5 con 4%DMF, 3.3%ACN y 0.5% con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	0.1-1000 ng/ml (MTX) 6.25-400 ng/ml (7-OH-MTX)	Plasma	67
MTX y 7-OH-MTX	Fotométrica a 303 nm	Elución en gradiente 50mM-tampón fosfato/ACN	2.5-100 ng/ml	Suero	68
MTX, 7-OH-MTX, ácido-5-metil-tetra hidrofólico, LV	Fotométrica a 310 nm y fluorimétrica a 355 nm (exc 295 nm)	Elución en gradiente 5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH2.3/ACN	10-5000 ng/ml (MTX, 7-OH-MTX) 100-5000ng/mL(LV) 20-5000ng/ml (para ácido-5-metil-tetra hidrofólico)	Suero y fluido cerebrospinal	69

Capítulo I.- Introducción

MTX	Fluorimétrica a 457 nm (exc 379 nm)	25mM- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /8%ACN en tampón fosfato 25mM (pH7.0)	#100 nM (MTX) #460 nM (7- OH-MTX)	Plasma y orina	70
MTX y su metabolito	Fotométrica	tampón fosfato/metanol (4:1)		Suero y fluido cerebroe spinal	71
MTX	Fluorescente a 463 nm (exc 367 nm)	Tampón fosfato 0.05M(pH6.6)/ ACN (9:1)	50-500ng/ml	Plasma	72

Tabla I.4.-Continuación

Analito	Detección	Elusión	Calibración	Muestra	Ref
MTX	Fotométrica a 300 nm	H <sub>2</sub> O/tampón acetato amónico 0.1M(pH4) + ACN (9:1)	0.025-0.5 :g/ml	Combina dos proteicos farmaceut icos	73
MTX	Fluorescente a 463 nm (exc 367 nm)	Tampón 0.5M fosfato (pH6.6)/ACN (9:1)	50-500 ng/ml	Plasma	74
MTX	Fotométrica a 313 nm	10%ACN en 0.01M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.02M- tetrametilamoniochl oride pH2.5	0.05-1 :gM	Suero	75
MTX	Fluorescente a 459 nm (exc 280 nm)	agua 5%metanol con 5mM- tetrabutilamonio hidrogeno sulfato	0.01-1 :g/ml	Suero	76
MTX		314 mM-tampón formato amónico (pH2.7)/1%ACN	4-1000 Ng/ml	Orina	77
MTX	Fotométrica a 305 nm	0.05M- acetato amónico/ACN/meta nol (174:13:13; pH5.0)	0.2-50 :g/ml	Plasma	78

MTX	313 nm y LC-MS	Metanol/NH <sub>4</sub> Ac, pH 4	Muestras me- dioambie- ntales	79
MTX y 7- hidroxi- MTX	305 nm	Fosfato/Metanol/A CN	Suero y saliva	80
MTX			Plasma	81

**Tabla 1.5.- Otros métodos de determinación de metotrexato**

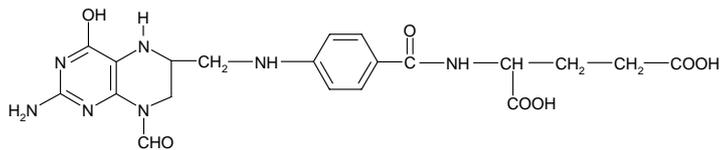
Método	Procedimiento	Ref
Fotometría	Basado en la substracción de las absorbancias a dos longitudes de onda y a dos pH. Aplicación a fármacos	82
Fotometría	Comparación de tres métodos basados en el carácter reductor del MTX Determinación en fármacos	83
Fotometría	Método diferencial usando los espectros de absorción a pH ácidos y básicos y a dos longitudes de onda Determinación en fármacos	84
Fluorescencia a 485 nm (λ <sub>ex</sub> = 405 nm)	Degradación del MTX, en medio sulfúrico. Determinación en plasma	85
Electroforesis capilar	Electrolito soporte, disolución reguladora pH 6 y detección a 200 nm 0.1-100;g/mlPlasma y orina	86
Electroforesis capilar	Electrolito soporte Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> con 30% metanol y detección mediante láser. Aplicación a suero	87
Electroforesis capilar	Tampón 90mM-fosfato (pH=5.9) con hidroxipropil-β- CD. λ = 300 nm. Plasma	88

Electroquímica	Adsorción del MTX y de su producto reducido sobre el electrodo de gota de Hg	89
Electroquímica	Voltamperometría de redisolución catódica	90
Electroquímica	Estudio de la reducción del MTX sobre un electrodo de gota de Hg. Determinación en suero	91

### I.3.- CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO FOLÍNICO O LEUCOVORÍN

El ácido folínico (LV), ( ácido 5-formil-5, 6, 7, 8-tetrahidrofólico) también denominado Leucovorín, presenta un sistema bicíclico conjugado conteniendo 4 átomos de nitrógeno.

Su estructura es de la forma:



**Figura I.5.- Estructura química del leucovorín**

El leucovorín se considera como parte de combinaciones de antineoplásicos para el tratamiento de varios desórdenes malignos. Está químicamente relacionado con el ácido fólico y actúa del mismo modo que el ácido fólico en el cuerpo.

El leucovorín se usa como terapia de rescate después de dosis intermedias-altas de metotrexato y también como modulador del antagonista de la pirimidina 5- fluoracil (5-FU) (92). El leucovorín junto con fluorouracilo se usa en el tratamiento de cáncer de colon. También se usa para el tratamiento o prevención de ciertas anemias.

El LV originado por una reducción química, no es estereoespecífico y por lo tanto resultan cantidades equivalentes de los diastereoisómeros (6R)-LV y (6S)-LV (93). La actividad biológica del LV está restringida aparentemente al diastereoisómero (6S)-LV el cual es convertido rápidamente a su metabolito (6S)-5-metiltetrahidrofolato (METHF), mientras que el diastereoisómero (6R)-LV no es metabolizado y es excretado a través de los riñones en un tiempo medio de alrededor de 7h. (94, 95).

### **I.3.1.- Métodos más comunes para la determinación del ácido folínico**

La información acerca de una fuerte interacción entre ambas formas isoméricas, y la poca eficacia del diastereoisómero (6R) hace pensar que el (6R)-LV podría inhibir la acción celular del (6S)-LV y (6S)-METHF. Este hecho ha dado una especial importancia a la capacidad de purificar el (6S)-LV. Para analizar la interacción entre ambos diastereoisómeros y analizar sus

farmacocinéticas es conveniente utilizar métodos de HPLC.

Estos métodos de HPLC, usan una columna quiral BSA (albúmina de suero bovino) para la separación y requiere un complicado proceso de evaporización (96-99).

En la revisión bibliográfica realizada se observa que los métodos de determinación más usuales son los cromatográficos.

Hay muchos estudios basados en la determinación de ácido folínico mediante técnicas cromatográficas y más concretamente mediante HPLC. Muchos de estos métodos están basados en la separación de los isómeros del ácido folínico, aunque también se determina el ácido folínico sólo, junto a sus metabolitos, o en unión con otros analitos de interés clínico.

La columna más utilizada es de fase apolar C18, con elución isocrática ó en gradiente, con fase móvil conteniendo principalmente metanol ó acetonitrilo /tampón fosfato.

Para la determinación en fluídos biológicos, la detección es en casi todos los métodos propuestos, UV-visible. En la mayoría de los casos, las muestras de plasma contaminada con ácido folínico son tratadas previamente a la inyección. Los detalles más

significativos sobre los procedimientos indicados anteriormente se resumen en la Tabla I.6.

Al análisis de este fármaco y debido a la importancia que adquiere en este caso, se ha incorporado con gran fuerza la electroforesis capilar en sus distintas variantes. Dicha técnica presenta una gran capacidad en la separación de enantiómeros. Como podemos ver en la Tabla I.7, el capilar más utilizado es el de sílice fundida recubierto con diferentes geles como poliacrilamida o poliamida y la detección es, en todos los casos, fotométrica. Se han desarrollado procedimientos para análisis de ácido folínico en preparaciones farmacéuticas y en fluidos biológicos. Mediante electroforesis capilar de afinidad (109) se pueden separar los enantiómeros del ácido folínico, también determinan el ácido folínico sólo (110) y se separa el ácido folínico de su principal metabolito, el 5-metiltetrahidrofolato (111). Las características y aplicaciones de los métodos propuestos se resumen en la citada Tabla.

También se han desarrollado métodos basados en *ensayos radioenzimáticos* e *inmunoensayos* (113, 114) y en *ensayos de inhibición enzimática* para determinar metotrexato en presencia de ácido folínico.

Las técnicas electroquímicas han sido escasamente aplicadas para la determinación de este analito habiéndose encontrado sin embargo, un procedimiento

*Capítulo I.- Introducción*

mediante polarografía diferencial de pulso para determinar la sal cálcica del ácido fólico (115).

**Tabla I.6.- Métodos de análisis de ácido fólico mediante HPLC**

Analito	Detección	Elución	Muestra	Tratamiento muestra	Ref.
Diastereoisómeros del LV y 5-metil tetrahidrofolato(I)	Electroquímica para ( $\pm$ ) LV y fotométrica a 313 nm para I	0.2 M- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /1-propanol (49:1)	Plasma	Los analitos se extraen del plasma en cartucho Bond Elut RP-18 por elución con metanol/10mM -Tris fosfato (3:1) pH=7	100
Determinación de esteroisómeros del LV	Fotométrica a 310 nm	0.1M-Nafosfato (pH= 5.1) elución en gradiente 50 mM-Nafosfato/metanol (1000:37 y 9:5)	Plasma	Plasma tratado con acetonitrilo y centrifugado	101
Resolución de esteroisómeros de LV(I) y 5-metiltetrahidrofolato (II)	Fotométrica a 282 nm	(I) 5mM-tampón fosfato Na (pH7.4) (II) 25mM-tampón fosfatoNa (pH7.4)	Plasma		102
Esteroisómeros del LV y 5-metil tetrahidrofolato	Fotométrica a 310 nm	1ªcolumna: gradiente de 0.25M tampón fosfato(pH5) en 0.25M-tampón fosfato(pH5)/metanol(1:1) 2ªcolumna: 0.25M-tampón fosfato (pH5)	Plasma	MTX como patrón interno	103

				Extracción del LV con cartucho Sep-pak C18 pretratamiento con metanol y tampón fosfato amónico	
	Amperométrica con electrodo de carbono	0.5M-tampón fosfato amónico/metanol /ACN (93:4:3)	Suero		104

Tabla I.6.- Continuación

Analito	Detección	Elusión	Muestra	Tratamiento muestra	Ref.
LV y sus metabolitos	Fluorimétrica a 365 nm (exc 308 nm)	H <sub>2</sub> O/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH=1.5)	Suero y orina	Retención de LV en cartucho C18 ODS y eluido con 5 mM-fosfato tetrabutilamonio	105
LV + fluorouracil			Plasma	Extracción líquido-líquido del plasma	106
LV y MTX	Fotométrica a 254 nm y fluorimétrica a 355 nm (exc 295 nm)	En gradiente (ACN/5mM-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2.3)	Formulaciones	-----	107
MTX+7-OH-MTX+ác-5-metiltetrahidrofólico +LV	Fotométrica a 310 nm y fluorimétrica a 355 nm (exc 295 nm)	Gradiente 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /ACN, pH 2.3	Suero y líquido cerebroes pinal	Pre-columna: Supelcosil LC-18-DB (5µm)	108

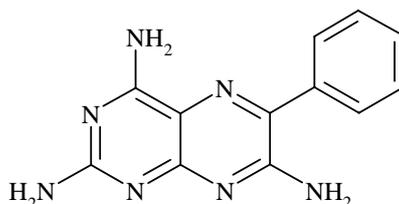
N5- metiltetra- hidrofolato, LV,MTX y 7-OH- MTX	305 nm	10mM- tampón formato amónico (pH3.5),con un gradiente de 15-95% de ACN/sol.tam pón (1:3)	Flúidos biológicos	Extracción de los analitos en columnas SPE C18	109
--	--------	---	-----------------------	---	-----

**Tabla I.7.- Métodos de determinación de ácido fólico mediante electroforesis capilar**

Analito	Electrolito soporte	Detección	Muestra	Ref
1-L-LV	Tampón fosfato 0.1 m (pH6) con 20 mM heptakis-(2,6-di-o- metil)- $\beta$ -CD como agente quiral activo	206 nm	Análisis farmacéuti co	108
Separación de enantiómeros del LV (E.C.afinidad)	Solución polímero tratada con 10mM-tampón fosfato (pH7.12)	230 nm	Análisis farmacéuti co	109
LV (E.C.afinidad)	20 mM-fosfato(pH7.2) con 1mg/ml de albúmina de suero bovino	280 nm	Albúmina de suero bovino	110
Separación de LV y 5- metiltetrahidr ofolato	CD como selectores quirales	289 nm	Plasma	111
LV y MTX	Fosfato/ $\beta$ -hidroxi- propilciclodextrina, pH 5.9	300 nm	plasma	112

#### I.4.- CARACTERÍSTICAS DEL TRIAMTERENO:

El triamtereno (TRI) , 2,4,7-triamino-6-fenilpteridina, presenta la siguiente estructura:



**Figura I.6.-** Estructura química del triamtereno

Es un agente diurético, que en la mayoría de los casos, es utilizado como sustancia dopante. En concreto, en el mundo del deporte, este diurético es tomado frecuentemente por dos razones: 1. Para obtener una rápida disminución del peso corporal y 2. Para reducir la concentración de drogas en orina, ya que se produce una elevación de la cantidad de orina, y por tanto la concentración de drogas se diluye. Si se abusa de este diurético, puede causar graves daños para la salud, debido a los posibles efectos secundarios.

El triamtereno se absorbe rápida pero incompletamente después de la administración oral. Alrededor del 30-70% de una dosis oral, se excreta en la orina (116). Cantidades variables también son excretadas por las bilis.

##### I.4.1.- Métodos más comunes para la determinación del triamtereno

Las primeras determinaciones de triamtereno se han hecho en preparaciones farmacéuticas mediante valoración ácido-base con ácido perclórico (117,118), siendo la técnica más comúnmente utilizada la espectrofotométrica UV-visible a 360 nm y a 375 nm. Guerello y Dobrezky (119) proponen un método espectrofotométrico para la determinación de triamtereno con furosemida usando un 50% de etanol a 257 y 370 nm.

Sin embargo, dada la escasa selectividad de la espectrofotometría y la necesidad de determinar el triamtereno en presencia de otros principios activos también absorbentes, son varios los trabajos encontrados donde se aplica la medida a dos longitudes de onda (120-122), o también mediante la formación de complejo con algún colorante como azul de bromofenol y azul de bromotimol (123), con objeto de aumentar su selectividad.

También se han encontrado trabajos, donde se realiza una reacción de derivatización previa con objeto de mejorar sus propiedades absorbentes, por ejemplo generando compuestos que proporcionen desplazamientos batocrómicos en el espectro de absorción. Así, se propone su derivatización con ácido p-cloroanílico y con 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (124). Con esta pre-reacción se logra aumentar el tramo de linealidad de la recta de calibrado

hasta valores de 150 µg/mL. En la Tabla I.8 se han resumido las principales características de los métodos fotométricos más destacados descritos en la bibliografía.

Las propiedades fluorescentes del triamtereno han posibilitado su determinación mediante técnicas fluorimétricas aumentando así la sensibilidad de los procedimientos propuestos. El triamtereno presenta fluorescencia nativa, así se puede determinar en formulaciones farmacéuticas en presencia de otros analitos y demás excipientes mediante fluorescencia convencional. Rao y col (126), proponen la determinación de esta droga mediante un método fluorimétrico, usando un 85% de ácido fórmico para aumentar la sensibilidad y reproducibilidad de la medida. También se ha determinado triamtereno en presencia de otras drogas en preparaciones farmacéuticas utilizando la técnica de fluorescencia sincrónica de ángulo variable (127,128). El análisis en fluidos biológicos, tales como orina, se ha llevado a cabo sin la necesidad de una separación y/o preconcentración, mediante la técnica de fluorescencia isopotencial (130). En la Tabla I.9, se han recogido las determinaciones más significativas y podemos ver que los procedimientos presentan una elevada sensibilidad respecto a las determinaciones fotométricas.

Dentro de las técnicas cromatográficas, la más utilizada es la de HPLC. Son muchos y muy variadas las citas recogidas, ya que el triamtereno se determina solo

o bien en presencia de otros principios activos. La columna más utilizada es la C18, siendo los métodos de detección más utilizados los fotométricos, y también fluorimétricos. De todos los procedimientos descritos cabe destacar la determinación en orina de triamtereno conjuntamente con diversos principios activos, tales como *acetazolamida*, *furosemida*, *hidroclorotiazida* y *amiloride* utilizando como fase móvil dodecilsulfato sódico/metanol (19:1) y detección fotométrica. También cabe mencionar debida a su elevada sensibilidad el trabajo referido a la determinación mediante detección fluorimétrica de TRI utilizando como fase móvil metanol/agua (30/70), ya que el rango lineal es el comprendido entre 1.5 y 70 ng/mL, en diversos fluidos biológicos. En la Tabla I.10, se resumen los trabajos más destacados mediante HPLC.

Otras técnicas como la electroforesis capilar de zona, principalmente con detección fluorescente, también han sido aplicadas a la determinación de TRI. González y col determinan este diurético en presencia de acebutol y bendroflumetazina en muestras de orina con buenos resultados (148) con un límite de detección de 0.31 fmol, y en presencia de bendroflumetazina y bumetanida, con un límite de detección de 17 fmol (149). La determinación de TRI en presencia de su principal metabolito, sulfato de hidroxitriamtereno, se ha realizado mediante esta técnica, comparandose los resultados obtenidos con detección UV y con fluorescencia mediante láser (150).

Por último, podemos comentar otros trabajos que determinan este analito haciendo uso de la espectroscopía Raman activada por una superficie, utilizando como adsorbente la plata (151).

**Tabla I.8.- Métodos de determinación de triamtereno mediante espectrofotometría UV-visible**

Analitos	Rango 8 (nm)	lineal	Muestra	Observaciones	Ref.
TRI y furosemida	257 y 370 nm			50% etanol:H <sub>2</sub> O	119
TRI y benzotiazida	367 y 312 nm		Preparación farmacéutica		120
TRI+ benziazida	368 (TRI) y 271 (hidroclor.)		Preparación farmacéutica	Espectrofotometría diferencial	121
TRI	417 nm	2.5-15 :g/mL	Preparación farmacéutica	Reacción con azul de bromofenol y azul de bromotímol	122
TRI	530 nm y 460 nm	25-150 :g/mL (a 530 nm)	Preparación farmacéutica	Reacción con ác. p-cloroanílico ó 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona	123
TRI e hidrocloro-tiazida	210.7 - 284.4	4 - 36 µg/mL	Fármacos	Espectrofotometría de derivadas	124
TRI e hidrocloro-tiazida			Fármacos	Quimiometría	125

**Tabla I.9.- Métodos de determinación de triamtereno mediante técnicas espectrofluorimétricas**

Analitos	$\lambda_{exc}/\lambda_{em, nm}$	Rango lineal	Muestra	Observaciones	Ref.
TRI	378.5/439.5	50-1600 (ng/mL)	Preparación farmacéutica	Benzotiazida, hidroclorotiazida y excipientes no interfieren	127
TRI	375/440	-----	Preparación farmacéutica	En presencia de benzotiazida	128
TRI, furosemina (FUR) y nirezadina	FUR 359/429 TRI 385/417	50-150 (ng/mL)	Preparación farmacéutica	Fluorescencia de ángulo variable	129
TRI	PIR 200-488/307-595	10-1000 (ng/mL)	Orina	Fluorescencia sincrónica isotopotencial	130
TRI y amiloride	365/413	20-100 ng/ml	Orina	Calibración multivariante, PLS	131
TRI	240/440		Suero y fármacos	Fluorescencia en fase sólida	132

**Tabla I.10.- Métodos de determinación de triamtereno (TRI) mediante técnicas cromatográficas**

Analito	Detección	Elución	Calibración	Muestra	Ref
TRI y metabolitos		Isocrática		Plasma y orina	133
Bemetizina, TRI y bupranolol		metanol/ACN/THF/H <sub>2</sub> O (1:1:1:7)	-----	Formulación	134
TRI+hidroclorotiazida	Fotométrica a 266 nm	THF/2-propanol/H <sub>2</sub> O (62:11:127) pH=3.8	-----	Formulación	135

Capítulo I.- Introducción

TRI y metabolitos	Fluorimétrica a $>400\text{nm}$ (exc 340-380nm)	Tampón fosfato/ACN/metanol (35:7:4)	4-100 ng/ml	Plasma y orina	136
TRI+ benzotiazida	Fotométrica a 280 nm	0.01M trihidrato acetato sódico/metanol/ACN (4:3:1)	0.3-12.2 :g/mL (TRI); 0.4-15.6:g/ml (benzotiazida)	Formulación	137
TRI	Fluorimétrica a 430 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 230\text{nm}$ )	Gradiente ACN/fosfato, pH 3	0.1-20 :g/mL	Orina	138
TRI		10mM HClO <sub>4</sub> /2mM trietilamina/0.1M acetato amónico		Orina y sangre	139
TRI+ hidroxitri	Fluorimétrica a 436 nm (exc 360nm)	ACN/tampón 20mM-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=4)(1:1)	1-100ng/ml (TRI) 20-1100 ng/ml (metabolito)	Plasma y orina	140
TRI	Fotométrica a 245 nm y fluorescente a 389 nm (exc 270nm)	30% ACN con 5mM-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 5.5)	2-100 ng/ml	Suero	141
TRI+furosemina+xantínol	Amperométrica a +1.3 V	0.05M tampón fosfato pH=3/ACN	5-10 mg/l	Formulación	142
TRI(I) o furosemina(II) o amiloride(III) o bumetanida(IV)	Fluorescente a 418, 440, 389 y 418 nm (exc 286, 365, 233 y 228 nm)		(I) 1-20 :g/ml (II) 5-100 “ (III) 2.5-25 “ (IV) 0.1-3.5 “	Orina	143

**Tabla I.10.- Continuación**

Analito	Detección	Elución	Calibración	Muestra	Ref
TRI y otros diuréticos	Fluorimétrica a 430 nm ( $\lambda_{ex}$ 270 nm)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /SDS, pH=3	0.02 - 0.1 $\mu$ g/mL	Orina	144
TRI en presencia de 17 diuréticos	Diodos array	ACN/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /triethylamina		Orina	145
TRI y otros diuréticos	Diodos array	40 mM SDS / 4% THF	0.5-20 $\mu$ g/mL	Orina	146
TRI y diuréticos	HPLC-MS	Formiato amónico /ácido fórmico, pH 3.5	6-1000 ng/mL	Orina	147

## **I.5.- APARATOS Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DE LA MEMORIA**

### **I.5.1.- Aparatos**

P pH-metro “Crison”, modelo 2001, con sensibilidad de  $\pm 0.01$  unidades de pH, provisto de electrodo combinado de vidrio y de calomelos saturado.

P Balanza Scaltec, modelo SBA 33, con sensibilidad de  $\pm 0.1$  mg

P Baño de ultrasonido, P. Selecta

P Sistema de obtención de agua ultrapura, Milli-Q, consta de dos modulos, uno es el RIOS/elix y el otro un Milli-Q.

P Espectrofotómetro UV-visible Milton Roy, modelo Spectronic 3000. Se emplean cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor. Posee un sistema de detección “Diode Array” microordenador PC 386 incorporado y software propio Rapidsan.

P Espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con dos lámparas de descarga de Xe, una continua de 150 W y otra de pulsos de 7 W. Está acoplado mediante una tarjeta GPIB (IEE-488) a un microordenador PC-38.

P Ultratermostato Selecta Mod. Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10°C y 100 °C, con una precisión de  $\pm 0.1$  °C. Este equipo se conectó al soporte de la cubeta en el espectrofluorímetro SLM Aminco para estudiar influencias de temperatura.

P Módulo SLM Aminco MilliFlow reactor de flujo detenido, que amplía el uso del SLM Aminco, permitiendo el estudio de los cambios de fluorescencia en reacciones rápidas. El reactor de flujo detenido MilliFlow consiste en dos jeringas de carga, dos jeringas de impulsión hacia el departamento de cubeta de paso óptico 2x2 mm, una jeringa de parada que cierra el circuito eléctrico, una válvula para llenar las jeringas de impulsión y otra válvula que permite el vaciado y limpieza de la celda de medida. Este reactor de flujo parado MilliFlow está diseñado de forma que todo el aparato pueda ser termostatzado de 10 a 45 °C con un baño de agua.

P Cromatógrafo Waters 600E, equipado con una bomba cuaternaria Waters 600 y dos detectores, UV-visible, Model 486 y fluorescente Model 474. El sistema está equipado con una válvula de 6 vías, Rheodyne, bucle de 20  $\mu$ L y columna Nova-Pak C-18 (15 cm x 3.9 mm). Está acoplado a un procesador conteniendo el software Millenium versión 3.2, desde el cual se controlan todas las funciones del cromatógrafo.

P Cromatógrafo Hewlett-Packard HPLC Mod. 1100, equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, válvula de inyección de 6 vías, bucle de 20  $\mu\text{L}$  y detector “Diode Array”. El equipo está provisto de un ordenador a través del cual se controlan todas las funciones del cromatógrafo así como la adquisición y el análisis de datos. La columna utilizada fue una Nova-Pak C-18 (15 cm x 3.9 mm).

P Equipo de electroforesis capilar P/ACE System 5510 de Beckman, equipado con detector “Diode Array”, sistema de refrigeración del capilar, carrusel de 34 muestras e inyector automático. El capilar utilizado ha sido un capilar de sílice (60.2 cm (50 cm de longitud efectiva) x 75  $\mu\text{m}$ ). La ventana de detección es de 100  $\mu\text{m}$  x 800  $\mu\text{m}$ . El equipo es controlado desde un ordenador a través del cual se controla todas sus funciones y también se efectúa el tratamiento y adquisición de datos.

### **I.5.2.- Reactivos**

#### **$\eta$ Disoluciones reguladoras o tampón**

P Disolución reguladora de pH = 5.0 preparada a partir de acetato sódico y ácido acético (PANREAC) siendo su concentración final total de 0.5 M.

P Disolución reguladora de  $\text{pH} = 10.0$  y concentración  $0.5 \text{ M}$  preparada a partir de cloruro amónico y amoníaco (PANREAC).

P Disolución reguladora de Tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl)  $0.015 \text{ M}$  de  $\text{pH} = 6.80$  conteniendo  $\text{NaCl}$  ( $10^{-3} \text{ M}$ ) preparada por dilución de Tris-hidroximetil-aminometano (SIGMA) y  $\text{NaCl}$  (PANREAC) en agua y ajuste del  $\text{pH}$  mediante adición de HCl (SCHARLAU).

P Disolución reguladora de borato (PANREAC)  $100 \text{ mM}$  a partir de su correspondiente sal sódica añadiendo HCl o NaOH hasta alcanzar un  $\text{pH}$  de  $9.7$ .

P Disolución reguladora de fosfato (PANREAC)  $100 \text{ mM}$  a partir de su correspondiente sal sódica añadiendo NaOH hasta alcanzar un  $\text{pH}$  de  $12.0$ .

P Disolución reguladora de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (SCHARLAU)  $100 \text{ mM}$  ajustando el  $\text{pH}$  a  $2.25$  con trietanolamina (FLUKA).

#### **$\eta$ Disoluciones estándar**

P Disolución de ácido fólico  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .- preparada por pesada de  $0.0100 \text{ g}$  de ácido fólico (SIGMA) y dilución hasta  $100.0 \text{ mL}$  con agua desionizada.

P Disolución de ácido fólico 100 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0100 g de ácido fólico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.

P Disolución de metotrexato 100 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0100 g de metotrexato (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de triamtereno 100 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0100 g de triamtereno (ALDRICH) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.

P Disolución de ácido pterín-6-carboxílico 10 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0010 g de ácido pterín-6-carboxílico (FLUKA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de neopterín 10 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0010 g de neopterín (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de xantopterín 10 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0010 g de xantopterín (ACROS) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de isoxantopterín 10 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0010 g de isoxantopterín (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de biopterín 10 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0010 g de biopterín (FLUKA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. Necesita medio básico para su solubilización.

P Disolución de creatinina 200 mg L<sup>-1</sup>.- preparada por pesada de 0.0200 g de creatinina (ALDRICH) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.

*Disolventes orgánicos utilizados en HPLC:*

Acetonitrilo (MERCK, grado HPLC)

**η Programas informáticos**

P Data Leader, v. 2.01, Beckman Instruments

P Grapher, v. 2.17 y 3.0, Golden Inc. Co.

P Rapic Scan, V. 2.01, Milton Roy Inst. Co.

P Microsoft Qbasic, Derivadas

P El paquete de software Grams 386 Level 1, Versión 2.0, conjuntamente con el paquete de aplicaciones PLS Plus Versión 2.1G (Galactic

Industries) para la aplicación de los métodos de calibración multivariante PLS y PCR

P Software AB2 versión 1.40, OS/2 2.0,  
Luminescence Spectrometer

P Software Millenium versión 3.2, Waters  
Chromatography

P Chemstation software Chromatography

P Dell Dimension P133V con P/ACE software.

## **I.6.- BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Al-Shammary, F.J., Al-Rashood, K.A., Mian, N.A., Mian, M.S., *Anal. Profiles of Drug Sub.* **19**, 221 (1990)
- 2.- Shane, B. Folate Chemistry and metabolism. En: Folate in health and disease. Bailey, LB, ed. Marcel Dekker Inc. Nueva York, EEUU. 1 (1995)
- 3.- Varela-Moreiras, G., Selhub, J., Long term folate deficiency alters folate content and distribution differentially in rat tissues. *J. Nutr* **122**, 986 (1992)
- 4.- Le Grusse, J; Watier, B. Vitamine B9. Acide Folique. En : Les Vitamines. Donnees Biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Centre d'information sur les vitamines. Neuilly-sur-Seine Cedex, Francia., 233 (1993)
- 5.- Clark Brater, J., Farmacología médica, 13<sup>a</sup> edición.
- 6.- Huang, X.L., Lin, D.L., Chen, Y.H. y Zhang, H.Y., *Fenxi Huaxue*, **27** (7), 810 (1999)
- 7.- Akhtar, M.J., Khan, M.A. y Ahmad, I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19** (3-4), 269 (1999)
- 8.- Konings, E.J.M., *J. AOAC. Int.* **82** (1), 119 (1999)
- 9.- Chu, K.O. y Tin, K.C., *Anal. Lett.*, **31** (15), 2707 (1998)
- 10.- Osseyi, E.S., Wehling, R.L. y Albrecht, J.A., *J. Chromatogr. A.*, **826** (2), 235 (1998)
- 11.- Akhtar, M.J., Khan, M.A. y Ahmad, I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16** (1), 95 (1997)

- 12.- Albala-Hurtado, S., Veciana Nogues, M.T., Izquierdo Pulido, M. y Marine Font, A., *J. Chromatogr. A*, **778** (1-2), 247 (1997)
- 13.- Papadoyannis, I.N., Tsioni, G.K. y Samanidou, V.F., *J. Liquid. Chromatogr. Relat. Technol.* **20** (19), 3203 (1997)
- 14.- Vahteristo, L., Ollilainen, V. y Varo, P., *J. Food. Sci.*, **61** (3), 524 (1996)
- 15.- Kelly, P., McPartlin, J. y Scott, J., *Anal. Biochem.*, **238** (2), 179 (1996)
- 16.- Wu, H.J., Tang, G.Y y Wang, Y., *Sepu.* **14** (2), 140 (1996)
- 17.- Ichinose, N., Tsuneyoshi, T., Kato, M., Suzuki, T. y Ikeda, S., *Fresenius, J. Anal. Chem.*, **346** (6-9), 841 (1993)
- 18.- Gauch, R., Leuenberger, U. y Mueller, U., *Mitt.Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **84** (3), 295 (1993)
- 19.- Iwase, H., *J. Chromatogr.*, **609** (1-2), 399 (1992)
- 20.- White, D.R., Lee, H.S. y Kruger, R.E., *J. Agric. Food. Chem.*, **39** (4), 714 (1991)
- 21.- El-Gizawy, S.M., Ahmed, A.N. y El-Rabbat, N.A., *Anal. Lett.*, **24** (7), 1173 (1991)
- 22.- Maeda, Y., Owada, K., Yakamoto, M., Sano, S., Masui, T. y Kitada, Y., *Iyakuhi Kenkyu.*, **21** (3), 444 (1990)
- 23.- Cheng, Z.Q., Sun, C.J. y Li, Y.Q., *Fenxi Huaxue*, **29** (9), 1068 (2001)

- 24.- *Chrompack Application Note*, **813**- HPLC, 2001, 1
- 25.- *Chrompack Application Note*, **814**- HPLC, 2001, 1
- 26.- *Jones Chromatography Application Note*, G021, 1  
(2001)
- 27.- Li, H.B. y Chen, F., *J. Sep. Sci.*, **24** (4), 271 (2001)
- 28.- *Macherey-Nagel Application Note*, A-1830, 2  
(2001)
- 29.- Vahteristo, L.T., Ollilainen, V. y Varo, P., *J. AOAC. Int.*, **80** (2), 373 (1997)
- 30.- Blanco, D., Sánchez, L.A. y Gutiérrez, M.D., *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (7), 1525 (1994)
- 31.- Jacoby, B.T. y Henry, F.T., *J. AOAC. Int.*, **75** (5),  
891 (1992)
- 32.- Hou, W. y Wang, E., *Talanta*, **37** (8), 841 (1990)
- 33.- Stokes, P. y Webb, K., *J. Chromtogr. A*, **864** (1), 59  
(1999)
- 34.- Bandiera, B., Bottari, E., de Acutis, R. y Festa,  
M.R., *Ann. Chim.*, **90** (5-6), 335 (2000)
- 35.- Chladek, J., Sispera, L. y Martinkova, P., *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, **744** (2), 307  
(2000)
- 36.- Breithaupt, D.E., *Food Chem. Sep.*, **74** (4), 521  
(2001)
- 37.- Ndaw, S., Bergaentzle, M., Aoude-Werne, D.,  
Lahely, S. y Hasselmann, C., *J. Chromtogr. A*, **928**  
(1), 77 (2001)

- 38.- Albala Hurtado, S., Veciana Nogues, M.T., Vidal Carou, M.C. y Marine Font, A., *J. Food Sci.*, **66** (8), 1191 (2001)
- 39.- Garbis, S.D., Melse Boonstra, A., West, C.E. y van Breemen, R.B., *Anal. Chem.*, **73** (22), 5358 (2001)
- 40.- Almagro, I., San Andrés, M.P., Vera, S., *Chromatographia*, **55** (3-4), 185 (2002)
- 41.- Höller, U., Brodhag, C., Knöbel, A., Hofmann, P. Spitzer, V., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31** (1), 151 (2003)
- 42.- Pawlosky, R.J., Flanagan, V.P., Doherty, R.F., *J. Agric. Food Chem.*, **51** (13), 3726 (2003)
- 43.- Cakir, S., Atayman, I., Cakir, O., *Mikrochim. Acta*, **126** (3-4), 237 (1997)
- 44.- Szczepaniak, W. y Ren, M., *Electroanalysis*, **6** (5-6), 505 (1994)
- 45.- Le-Gall, A.C. y Van-den-Berg, C.M.G., *Anal. Chim. Acta*, **282** (3), 459 (1993)
- 46.- Zhang, J.R., Ying, Z.G., y Zhang, Z.X., *Fenxi Shiyanshi*, **12** (5), 1 (1993)
- 47.- Villamil, M.J.F., Miranda Ordieres, A.J., Costa-García, A., Tuñon Blanco, P., *Anal. Chim. Acta*, **273** (1-2), 377 (1993)
- 48.- El- Maali, N.A., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **27** (3), 465 (1992)
- 49.- Milyaev, YuF, Grigor'ev, V.I., Balyatinskaya, L.N., *Zh. Anal. Khim.*, **45** (12), 2380 (1990)

- 50.- Buhl, F. y Hachula, U., *Chem. Anal.*, **36** (1), 27 (1991)
- 51.- Cruces Blanco, C., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A. y Román Ceba, M., *Anal. Lett.*, **27** (7), 1339 (1994)
- 52.- Liu, X., Huang, H.G., *Fenxi Huaxue*, **28** (11), 1406 (2000)
- 53.- Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Reis, B.F., Santos, J.L.M. y Zagatto, E.A.G., *Anal. Chim. Acta*, **351** (1-3), 223 (1997)
- 54.- Cao, Z.G., Ding, X.H., y Ye, J.N., *Fenxi. Ceshi. Xuebao*. **18** (5), 57 (1999)
- 55.- Bleyer, W.A., *Cáncer*, **41**, 36 (1978)
- 56.- Goldman, I.D. y Matherly L.H., *Pharmacol. Ther.*, **28**, 77 (1985)
- 57.- Kamen, B.A.; Folic acid antagonist. In: Powis G, Prough RA, eds.; Metabolism and action of anti-cáncer drugs. *Philadelphia: Taylor and Francis*; 141 (1987)
- 58.- Ackland S.P. y Schilsky R.L., *J. Clin. Oncol.*, **5**, 2017 (1987)
- 59.- Covey, J.M., *Life Sci.*, **26**, 665 (1980)
- 60.- Kris, M.G., Kinaham, J.J. y Gralla, R.J., *Cáncer Res.*, **48**, 5573 (1988)
- 61.- Gandhi, R., Khopade, A.J. y Jain, N.K., *Indian Drugs*, **34** (8), 455 (1997)
- 62.- Sastry, C.S.P. y Lingeswara-Rao, J.S.V.M.; *Anal. Lett.*, **29** (10), 1763 (1996)

- 63.- McCrudden E.A. y Tett, S.E., *J. Chromatogr. B.; Biomed. Appl.*, **721** (1), 87 (1999)
- 64.- Hirai, T., Matsumoto, S. y Kishi, I., *J. Chromatogr. B.; Biomed. Appl.*, **690** (1-2), 267 (1997)
- 65.- Cociglio, M., Hillaire-Buys, D. y Alric, C., *J. Chromatogr. B.; Biomed. Appl.*, **674** (1), 101 (1995)
- 66.- Albertioni, F., Pettersson, B., Beck, O., Rask, C., Seideman, P. y Peterson, C., *J. Chromatogr. B.; Biomed. Appl.*, **665** (1), 163 (1995)
- 67.- Lu, G.W. y Jun, H. W., *J. Liq. Chromatogr.*, **18** (1), 155 (1995)
- 68.- Hirai, T., Kitamura, M. y Inoue, Y., *Yakugaku. Zasshi*, **114** (8), 602 (1994)
- 69.- Belz, S., Frickel, C., Wolfrom, C., Nau, H. y Henze, G., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, **661** (1), 109 (1994)
- 70.- Beck, O., Seideman, P., Wennberg, M. y Peterson, C., *Ther. Drug. Monit.*, **13** (6), 528 (1991)
- 71.- Brandsteterova, E., Seresova, O., Miertus, S. y Reichelova, V., *Neoplasma*, **37** (4), 395 (1990)
- 72.- Emara, S., Askal, H. y Masujima, T., *Biomed. Chromatogr.*, **12** (6), 338 (1998)
- 73.- Huang, M.M., Penn, L., Bongers, J. y Burman, S., *J. Chromatogr. A*, **828** (1-2), 303 (1998)
- 74.- Emara, S.; Razee, S.; Khedr, A. y Masujima, T.; *Biomed. Chromatogr.*, **11** (1), 42 (1997)

- 75.- Aboleneen, H., Simpson, J. y Backes, D., *J. Chromatogr. B.; Biomed. Appl.*, **681** (2), 317 (1996)
- 76.- Suzuki, T.; Hashimoto, H. y Ichinose, N.; *Fresenius, J. Anal. Chem.*, **351** (8), 806 (1995)
- 77.- Mader, R.M., Rizovski, B., Steger, G.G., Rainer, H., Proprentner, R. y Kotz, R., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*; **124** (2(J. Chromatogr., 613)), 311 (1993)
- 78.- Alkaysi, H.N., Gharaibeh, A.M. y Salem, M.A.S., *Ther. Drug Monit.*, **12** (2), 191 (1990)
- 79.- Turci, R., Micoli, G. Minoia, C., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **14** (8), 685 (2000)
- 80.- Skibinska, L. Gregorczyk, J., *Chem. Anal.*, **46** (3), 329 (2001)
- 81.- Sadray, S., Rezaee, S., Rezakhah, S., *J. Chromatogr., B: Anal. Techol. Biomed. Life Sci.*, **787** (2), 293 (2003)
- 82.- Ellaithy, M.M., Tadros, N.B. El Tarras, M.F., *Anal. Lett.*, **16** (B16), 1321 (1983)

- 83.- Sastry, C.S.P., Lingeswara-Rao, J.S.V.M.; *Anal. Lett.*, **29** (10), 1763 (1996)
- 84.- Gandhi, R., Khopade, A.J., Jain, N.K.; *Indian Drugs*, **34** (8), 455 (1997)
- 85.- Sabry, S.M., Abdel-Hady, M., Elsayed, M., Fahmy, O.T., Maher, H.M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32** (3), 409 (2003)
- 86.- Mrestani, Y. y Neubert, R.H.H.; *Electrophoresis*, **19** (16-17), 3022 (1988)
- 87.- Roach, M.C., Gozel, P. y Zare, R.N., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **70** (1(J. Chromatogr., 426)), 129 (1988)
- 88.- Sczesny, F., Hempel, G.; Boss, J. y Blaschke, G., *J. Chromatogr. B., Biomed. Appl.*, **718** (1), 177 (1998)
- 89.- Miranda-Ordieres, A.J., Costa-García, A., Fernández-Álvarez, J.M. y Blanco-Tuñón, B., *Anal. Chim. Acta.*, **233** (2), 281 (1990)
- 90.- Cataldi, T.R.I., Guerrieri, A., Palmisano, F. y Zambonin, P.G., *Analyst*, **113** (6), 869 (1988)
- 91.- Miranda, A.J., Costa, A., Arribas, S., Tunon, P., *An. Quim., Ser. B.*, **83** (3), 342 (1987)
- 92.- Bertino, J.R., *Cancer Treat. Rep.*, **65** (1), 131 (1981)
- 93.- Straw, J.A., Newman, E.M. y Dorowshow, J.H., *NCI Monogr.*, **5**, 41 (1987)
- 94.- Newman, E.M.; Straw, J.A. y Dorowshow, J.H.; *Cancer Res.*, **49**, 5755 (1989)

- 95.- Straw, J.A., Szapary, D. y Wynn, W.T., *Cancer Res.*, **44**, 3114 (1984)
- 96.- Choi, K.E. y Schilsky, R.L., *Anal. Biochem.*, **168**, 398 (1998)
- 97.- Schalhorn, A., Kiihl, M., Stupp-Poutot, G. y Nüssler, V., *Cancer chemother. Pharmacol.*, **25**, 440 (1990)
- 98.- Silan, L., Jadaud, P., Whitfield, L.R. y Wainer, I.W., *J. Chromatogr.*, **532**, 227 (1990)
- 99.- Wainer, I.W. y Stiffin, R.M., *J. Chromatogr.*, **424**, 158 (1988)
- 100.- Etienne, M.C., Speziale, N. y Milano, G., *Clin. Chem.*, **39** (1), 82-86 (1993)
- 101.- Silan, L., Jadaud, P., Whitfield, L.R. y Wainer, I.W., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **97** (2(J. Chromatogr., 532)), 227 (1990)
- 102.- Choi, K.E. y Schilsky, R.L., *Anal. Biochem.*, **168** (2), 398 (1988)
- 103.- Wainer, I.W. y Stiffin, R.M., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **68** (1 (J. Chromatogr., 424)), 158 (1988)
- 104.- Birmingham, B.K. y Greene, D.S., *J. Pharm. Sci.*, **72** (11), 1306 (1983)
- 105.- Schleyer, E., Reinhardt, J., Unterhalt, M. y Hiddemann, W., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*; **669** (2), 319 (1995)
- 106.- Vandenbosch, C., Van-Belle, S., De-Smet, M., Taton, G., Bruynseels, V., Vandenhoven, G. y

- Massart, D.L., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **123**  
(1 (*J. Chromatogr.*, 612)), 77 (1993)
- 107.- Duan, G.L., Zheng, L.X., Chen, J., Cheng, W.B.,  
Li, D., *Biomed. Chromatogr.*, **16** (4), 282 (2002)
- 108.- Cellai, L., Desiredio, C., Filippetti, R. y Fanali, S.,  
*Electrophoresis*, **14** (8), 823 (1993)
- 109.- Sun, P., Barker, G.E., Hartwick, R.A., Grinberg,  
N. y Kaliszan, R., *J. Chromatogr.*, **652** (1), 247  
(1993)
- 110.- Barker, G.E., Russo, P. y Hartwick, R.A., *Anal.  
Chem.*, **64** (23), 3024 (1992)
- 111.- Shibukawa, A., Lloyd, D.K. y Wainer, I.W.,  
*Chromatographia*, **35** (7-8), 419 (1993)
- 112.- Sczesny, F., Hempel, G., Boos, J., Blaschke, G., *J.  
Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, **718** (1), 177  
(1998)
- 113.- Priest, D.G., Bunni, M.A., Romero-Fredes, L.R.,  
Schmitz, J.C. y Whiteley, J.M., *Anal. Biochem.*,  
**196** (2), 284 (1991)
- 114.- Lagone, J.J. y Levine, L., *Anal. Biochem.*, **95** (2),  
472 (1979)
- 115.- Fijalek, Z., Szyszko, E. y Gall, M., *Acta Pol.  
Pharm.*, **42** (1), 23 (1985)
- 116.- Clarke's Isolation and Identification of Drugs. *The  
Pharmaceutical Press*, London, 1037-1038 (1986)
- 117.- Her Majesty's Stationery Office, London. *The  
British Pharmacopoeia*. **481** (1973)

- 118.- Rockville, M.D.; The United States Pharmacopoeia, XIX, *The United States Pharmacopoeial Convention*, **517**, 20852 (1975).
- 119.- Gerello, L.O. y Dobrezky, J., *Rev. Farm.*, **13**, 111 (1969)
- 120.- Zarakar, S.S. y Athalye, K., *Indian Drugs*, **28**, 103 (1990)
- 121.- Nowakowska, Z. y Miscicka, M., *Farm. Pol.*, **48**, 549 (1992)
- 122.- El-Ragehy, N.A.; Abbas, S.S. y El-Khateeb, S.Z., *Anal. Letter.*, **28**, 1799 (1995)
- 123.- El-Ragehy, N.A.; Abbas, S.S. y El-Khateeb, S.Z., *Anal. Letter.*, **30**, 2045 (1997)
- 124.- Erk, N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **20** (1-2), 155 (1999)
- 125.- Kargosha, K. y Sarrafi, A.H.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26** (2), 273 (2001)
- 126.- Rao, R.G., Geetha, K. y Mohan, R.K., *Indian J. Pharm. Sci.*, **41**, 156 (1979)
- 127.- Sastry, C.S.P., Suryanarayana, M.V., Prasad Tipirneni, A.S.R. y Satyanarayana, T., *Indian Drugs*, **26**, 651 (1989)
- 128.- Zarakar, S.S. y Athalye, K., *Indian Drugs*, **28**, 102 (1990)
- 129.- García-Sánchez, F., Fernández-Gutiérrez, A. y Cruces-Blanco, C., *Anal. Chim. Acta.*, **306**, 313 (1995)

- 130.- Murillo Pulgarín, J.A., Alañon Molina, A. y Fernández López, P., *Anal. Chim. Acta.*, **326**, 117 (1996)
- 131.- Murillo Pulgarín, J.A., Alañon Molina, A. y Fernández López, P., *Anal. Chim. Acta.*, **119** (1-2), 179 (2001)
- 132.- Domínguez Vidal, A., Ortega Barrales, P. y Molina Díaz, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28** (3-4), 721 (2002)
- 133.- Shah, V.P., Walker, M.A. y Prasad, V.K., *J. Liquid. Chromatogr.*, **6**, 1949 (1983)
- 134.- Waechter, W., Szczepanik, B., Gottmann, G. y Cordes, G., *Pharm. Ind.*, **45**, 1000 (1983)
- 135.- Korany, M.A. y Franzky, H.J., *Sci. Pharm.*, **51**, 291 (1983)
- 136.- Swart, K.J. y Botha, H.; *J. Chromatogr.*, **57**, 315 (1987)
- 137.- Sastry, C.S.P., Suryanarayana, M.V., Prasad-Tipirneni, A.S.R., Prasad, T.N.V., Murthy, D.V.N. y Reddy, K.N., *Indian Drugs*, **27**, 191 (1989)
- 138.- Campis Falco, P., Herraes Hernández, R. y Sevillano Cabeza, A., *Chromatographia*, **38** (1-2), 29 (1994)
- 139.- White, V., Canfield, D.V. y Hordinsky, J., *J. Anal. Toxicol.*, **18**, 52 (1994)
- 140.- Mascher, H. y Wasilewski, M., *J. Liquid. Chromatogr.*, **17**, 1577 (1994)

- 141.- Oertel, R., Ritcher, K., Dobrev, D., Berndt, A. y Gramtte, T., *Pharmazie*, **49**, 700 (1994)
- 142.- Barroso, M.B.; Alonso, R.M. y Jiménez, R.M.; *J. Liquid. Chromatogr.*; **19**, 231 (1996)
- 143.- Campíns Falcó, P., Herraes Hernández, R. y Pastor Navarro, M.D., *J. Liquid. Chromatogr.*, **20**, 1867 (1997)
- 144.- Carda Broch, S., Esteve Romero, J.S. y García-Álvarez Coque, M.C., *Anal. Chim. Acta*, **375** (1-2), 143 (1998)
- 145.- Guchelaar, H.J., Chandi, L., Schouten, O. y van den Brand, W.A., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363** (7), 700 (1999)
- 146.- Rosado, M.A., Gasco López, A.I., Santos Montes, A. y Izquierdo Hornillos, R., *J. Chromatogr., B*, **748** (2), 415 (2000)
- 147.- Qin, Y., Wang, X.B., Zhao, M., Wu, M.T., Xu, Y.X. y Peng, S.Q., *J. Chromatogr. B*, **794** (1) 193 (2003)
- 148.- González, E., Montes, R. y Laserna, J.J., *Anal. Chim. Acta*, **282** (2), 687 (1993)
- 149.- González, E., Montes, R. y Laserna, J.J., *J. Chromatogr., B*, **687** (1), 145 (1996)
- 150.- Horstkoetter, C., Kober, S., Spahn\_Langguth, H., Mutschler, E. y Blaschke, G., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **769** (1), 107 (2002)

151.- Ruperez, A. y Laserna, J.J., *Talanta*, **44** (2), 213  
(1997)

**CAPÍTULO II**

**ESTUDIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y  
ESPECTROFLUORIMÉTRICOS BÁSICOS DE  
ÁCIDO FOLÍNICO, METOTREXATO, ÁCIDO  
FÓLICO Y TRIAMTERENO**

En este Capítulo se ha realizado un estudio de las características espectrales de los analitos de interés desde el punto de vista de las propiedades absorbentes y fluorescentes de las moléculas.

Se ha considerado necesario el establecimiento de la influencia de la acidez del medio en las propiedades antes mencionadas, dado que todos ellos son solubles en medio acuoso.

Aunque nuestro interés estriba en el conocimiento del comportamiento de la molécula y no en el cálculo exhaustivo de los valores de pK, ya que estos están descritos en la bibliografía, hemos comparado los valores aproximados obtenidos con los encontrados en la literatura. Hay que indicar por otra parte que los valores de pK encontrados en la literatura especializada son en algunos casos, dispares y no están claramente asignados.

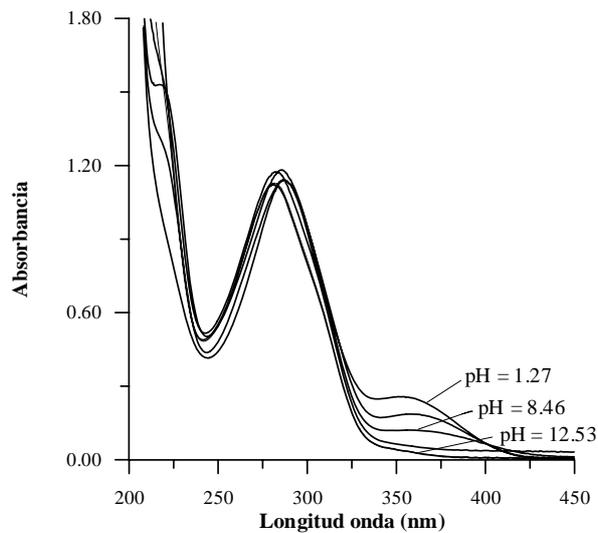
## **II.1 .- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL ÁCIDO FOLÍNICO**

### **II.1.1 .- Estudio espectrofotométrico del ácido folínico**

#### **Influencia de la acidez del medio en los espectros de absorción**

Este estudio se realizó preparando una disolución de ácido folínico (LV), en agua, conteniendo una

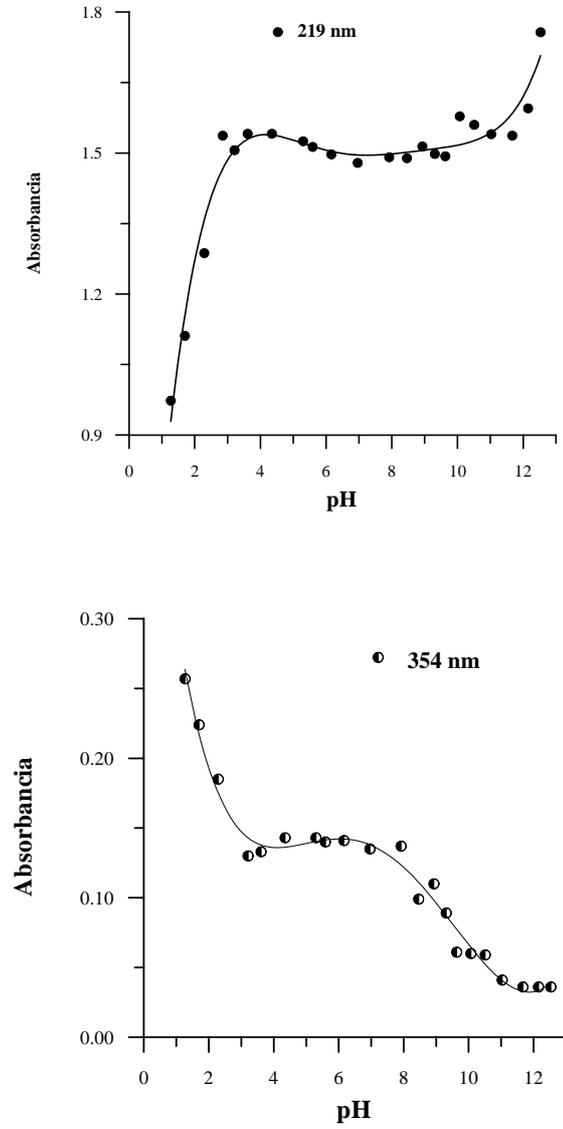
concentración de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . A esta disolución se le varió el pH y se registraron sus espectros de absorción frente a los correspondientes blancos. En la Figura II.1 se recogen los espectros obtenidos a diferentes valores de pH, observándose que los mayores cambios se producen a la longitud de onda de 354 y 219 nm. A 354 nm el máximo de absorción sufre un efecto hipocrómico a medida que aumenta el pH, mientras que a 219 nm aparece un hombro en medio ácido que sufre un efecto hipercrómico a medida que aumenta el pH. El máximo situado a 297 nm permanece prácticamente invariable en toda la zona de acidez estudiada.



**Figura II.1.-** Espectros de absorción de disoluciones acuosas de ácido fólico a diferentes valores de pH.  $[LV] = 30 \text{ mg L}^{-1}$ .

Al representar los valores de absorbancia a 219 y 354 nm frente al pH, Figura II.2, observamos que a 219

nm, la señal aumenta a medida que lo hace el pH, manteniéndose prácticamente constante entre pH 3 y 12. A 354 nm, la absorbancia disminuye a medida que aumenta el pH, no observándose variación en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 7. A partir de este último valor la señal vuelve a disminuir para prácticamente desaparecer a partir de pH 11.



**Figura II.2.-** Influencia del pH en la absorbancia del ácido folínico, a 219 y 354 nm.

Cálculo de las constantes de ionización

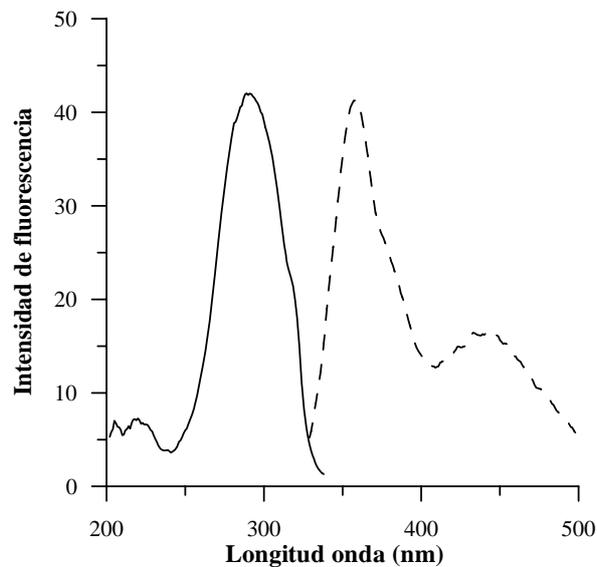
El estudio de la influencia del pH sobre la absorbancia del ácido fólico, nos permite calcular las constantes de ionización aplicando los métodos de primera y segunda derivada a los valores de absorbancia con respecto al pH, obtenidos para los diferentes valores de pH. Aplicando la primera derivada calculamos el valor de las constantes de acidez, estimándolos a partir de los mínimos de la curva, y cuando se aplica la segunda derivada, en el punto de corte con el eje de las abscisas. Estos puntos coinciden con los puntos de inflexión de la curva de absorbancia frente al pH. Los datos obtenidos, a diferentes longitudes de onda se resumen en la Tabla II.1.

**Tabla II.1 .- Determinación espectrofotométrica de los valores de pK del ácido fólico**

		<b>pK<sub>1</sub></b>	<b>pK<sub>2</sub></b>
<b>219 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	2.52	-----
	<b>2ª Derivada</b>	2.43	-----
<b>354 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	2.56	9.00
		2.43	9.20
	<b>2ª Derivada</b>	<b>pK<sub>medio</sub> = 2.48</b>	<b>pK<sub>medio</sub> = 9.10</b>

### II.1.2 .- Estudio espectrofluorimétrico del ácido folínico

Se registraron los espectros de excitación y emisión del ácido folínico, el cual presenta una apreciable fluorescencia nativa, de una disolución acuosa de 1 mg L<sup>-1</sup> a la que se le efectuó un barrido previo para seleccionar las longitudes de onda de excitación y emisión. Los espectros obtenidos se presentan en la Figura II.3.



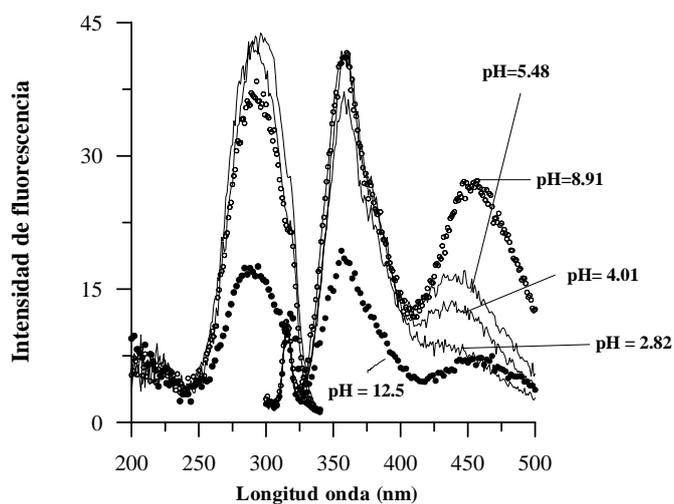
**Figura II.3 .-** Espectros de excitación (—) y emisión(-- --) del ácido folínico.  $pH = 5.48$ ;  $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$

Tal como se observa, el espectro de excitación presenta un solo máximo centrado a 285 nm y en el espectro de emisión, excitando a 285 nm, se aprecian

dos máximos a 359 y 440 nm respectivamente, siendo el de mayor intensidad el primero.

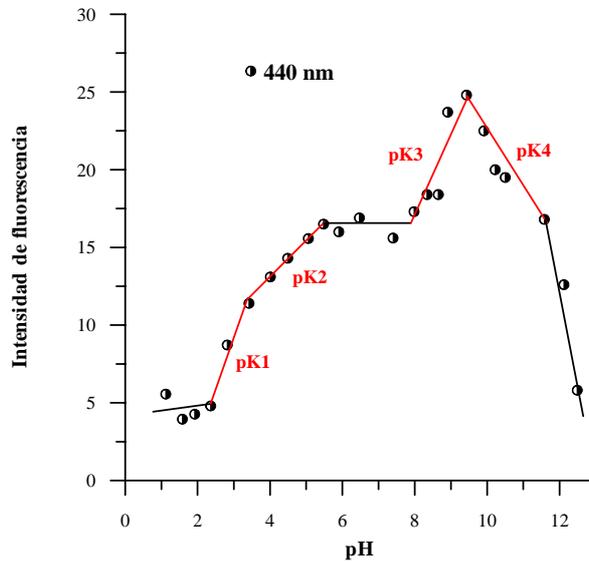
Influencia de la acidez del medio en los espectros de excitación y emisión del ácido fólnico. Cálculo de las constantes de ionización

El estudio de la influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia de este analito se ha realizado en disoluciones acuosas, manteniendo constante la concentración en  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y variando el pH mediante la adición de HCl y/o NaOH. Los espectros de excitación se registraron manteniendo constante la longitud de onda de emisión a 359 nm y los espectros de emisión utilizando como  $\lambda_{\text{exc}}$  285 nm. En la Figura II.4 se representan los espectros obtenidos, a diferentes valores de pH.



**Figura II.4.-** Espectros de excitación y de emisión del ácido folínico a diferentes pH.  $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 359 \text{ nm}$ .  $[LV] = 1 \text{ mg L}^{-1}$

Con respecto al espectro de emisión, el máximo de menor intensidad, situado a 440 nm, aumenta su señal a medida que lo hace el pH al mismo tiempo que sufre un desplazamiento batocrómico situándose a 452 nm a partir de pH 8.0. Al representar la intensidad de fluorescencia en función del pH para este máximo de 440 nm obtenemos la representación de la Figura II.5, en la que se observan como aparecen 4 zonas de diferente pendiente correspondiente a 4 posibles valores de pK.



**Figura II.5 .-** Influencia del pH sobre la fluorescencia del ácido folínico

A partir de los estudios realizados sobre la influencia del pH en la intensidad de fluorescencia de este analito y aplicando los métodos de primera y segunda derivada para 359, 440 y 452 nm calculamos los valores de  $pK_a$ . Los valores obtenidos a las diferentes longitudes de onda se resumen en la Tabla II.2.

**Tabla II.2** .- Valores de  $pK_a$  obtenidos mediante espectrofluorimetría.

		$pK_1$	$pK_2$	$pK_3$	$pK_4$
359 nm	1ª Derivada	-----	4.25	----	10.05
	2ª Derivada	-----	4.25	----	10.00
440 nm	1ª Derivada	2.70	----	8.80	10.20
	2ª Derivada	2.70	5.00	8.80	10.00
452 nm	1ª Derivada	2.60	-----	8.10	10.05
	2ª Derivada	2.60	-----	8.30	10.00
		$pK_{medio} = 2.65$	$pK_{medio} = 4.50$	$pK_{medio} = 8.50$	$pK_{medio} = 10.05$

Si comparamos los  $pK_a$  obtenidos para el ácido folínico mediante espectrofotometría y espectrofluorimetría con los encontrados en la bibliografía (1) (Tabla II.3), observamos como son valores muy comparables excepto por la obtención de un nuevo valor de  $pK_a$  aproximadamente en medio

neutro o ligeramente alcalino que no está descrito en la bibliografía.

**Tabla II.3.- Comparación de valores de pKa.**

	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	pK <sub>4</sub>
<b>Fotometría</b>	2.48	-----	9.10	-----
<b>Fluorescencia</b>	2.65	4.50	8.50	10.05
<b>Bibliografía</b>	3.10	4.80	-----	10.4

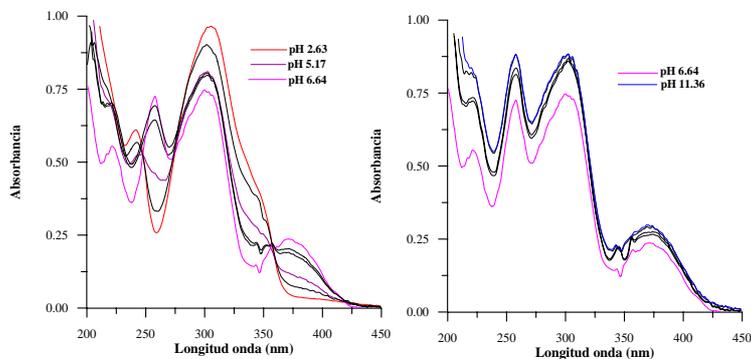
Los dos primeros valores de pK parecen corresponder a los dos grupos carboxilos situados en posición  $\alpha$  y  $\gamma$ , siendo el más ácido el achacable a la ionización del grupo  $\alpha$ -carboxílico. El pK<sub>3</sub>, no descrito en la bibliografía, conlleva un desplazamiento batocrómico del máximo situado inicialmente a 440 nm hasta localizarse a 450 nm. Dicho máximo disminuye drásticamente para pH>9. Los pK<sub>3</sub> y pK<sub>4</sub> pueden ser debidos a desprotonaciones de grupos nitrogenados, concretamente aminas alifáticas ternarias, tal como las situadas en el anillo pteridínico y la situada en el grupo de p-aminobenceno.

## **II.2 .- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL METOTREXATO**

### **II.2.1 .- Estudio espectrofotométrico del metotrexato**

#### Características de los espectros de absorción en función de la acidez del medio

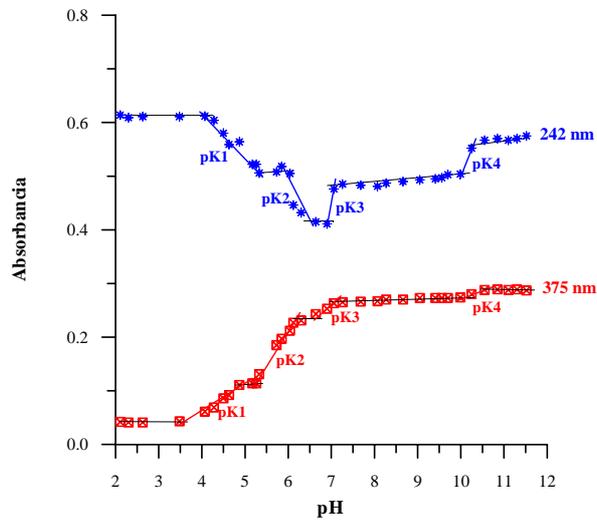
Con el fin de establecer como afecta la acidez del medio a los espectros de absorción del metotrexato, se preparó una disolución acuosa conteniendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , y se le varió el pH mediante pequeñas adiciones de HCl y/o NaOH. Se registran los correspondiente espectros de absorción para cada una de los valores de acidez fijados. Dichos espectros se han representado en la Figura II.6. Observamos que en medio aproximadamente neutro, obtenemos tres máximos de absorbancia centrados a 260, 305 y 375 nm respectivamente. A medida que disminuye el pH, el máximo situado a 260 sufre un fuerte efecto hipocrómico desapareciendo, mientras que aparece un nuevo máximo a 240 nm, también desaparece el máximo situado a 375 nm, de manera que a  $\text{pH} < 5$ , se observan sólo dos máximos a unas longitudes de onda de 240 y 305 nm. Se observan dos puntos isobésticos a 246 y 355 nm. En medio básico los espectros son similares a los obtenidos en medio neutro, solo es destacable un ligero efecto hiperocrómico a  $\text{pH} > 10$ .



**Figura II.6 .-** Espectros de absorción de metotrexato a diferentes valores de acidez.  $[MTX] = 20 \text{ mg L}^{-1}$

Si representamos gráficamente la variación de la absorbancia con el pH a las longitudes de onda de 242 y 375 nm obtenemos la Figura II.7, donde podemos observar la existencia de cuatro posibles valores de pK.

En la bibliografía (2) están descritos 3 valores de pK, los dos primeros debido a la ionización de los grupos  $\alpha$ - y  $\gamma$ -carboxílico respectivamente, y el tercero probablemente al N-1 guanadínico del anillo pteridínico. El cuarto posible valor de pK, puede ser debido a la ionización de alguno de los nitrógenos pertenecientes al anillo pteridínico. Debido a la proximidad entre ellos, hace que no podamos obtener los valores mediante primera y segunda derivada.

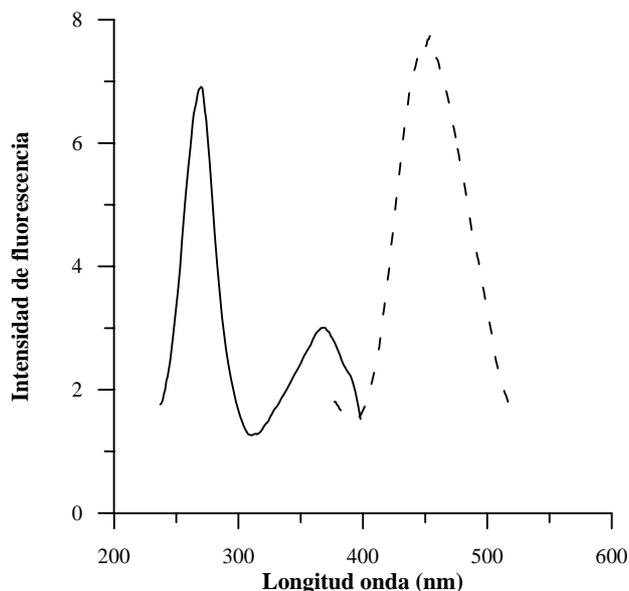


*Figura II.7 .- Influencia del pH sobre la absorbancia del metotrexato.*

### **II.2.2 .- Estudio espectrofluorimétrico del metotrexato**

Este compuesto presenta fluorescencia nativa y con objeto de localizar sus máximos de excitación y emisión, se preparan disoluciones acuosas de metotrexato conteniendo  $3 \text{ mg L}^{-1}$  y se registran los espectros de excitación y emisión, manteniendo un voltaje de 650 V y un ancho de rendija de 8 nm tanto para excitación como para emisión. Los espectros obtenidos se representan en la Figura II.8 donde se observan dos máximos de excitación situados a 270 y 368 nm y un único máximo de emisión localizado a 455 nm. Para posteriores experiencias elegimos  $\lambda_{\text{ex}} = 270$

nm y  $\lambda_{em} = 455$  nm, como longitudes de onda de medida.

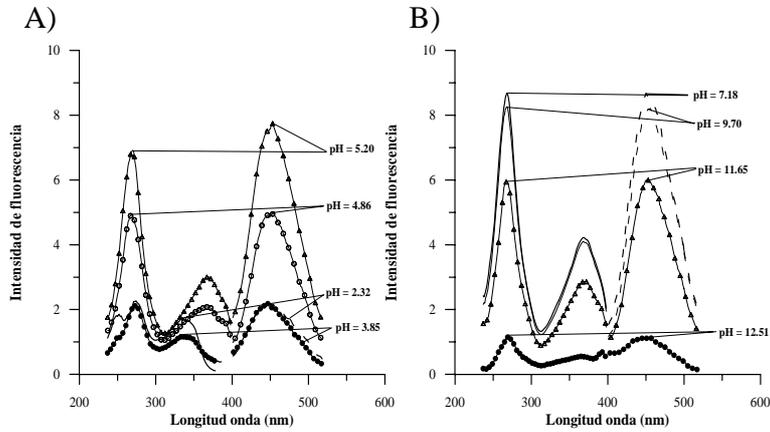


**Figura II.8** .- Espectros de excitación (—) y emisión (---) del metotrexato en medio acuoso. pH = 5.20,  $\lambda_{em} = 455$  nm,  $\lambda_{exc} = 270$  nm.

### **Influencia de la acidez del medio en la fluorescencia del metotrexato**

El estudio de esta variable se realizó preparando disoluciones acuosas de metotrexato de concentración  $3 \text{ mg L}^{-1}$  a diversos valores de pH obtenidos por la adición de HCl y/o NaOH, de manera que el pH de las muestras varía entre 2.0 y 12.7. A continuación se registran los espectros de excitación, manteniendo constante la longitud de onda de emisión en 455 nm, y los espectros de emisión, manteniendo la longitud de

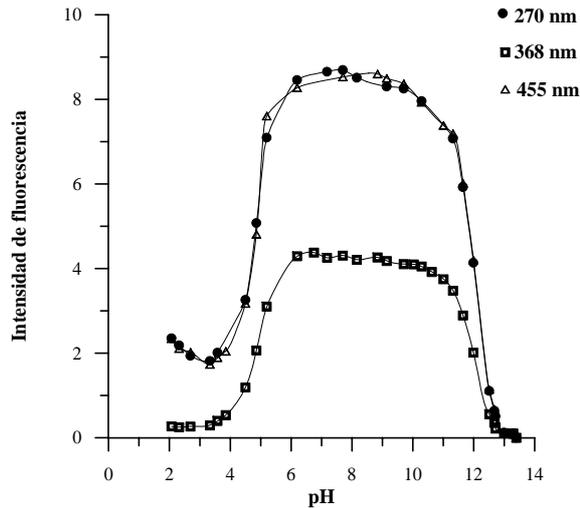
onda de excitación a 255 nm, para los diferentes valores de pH, Figura II.9.



**Figura II.9** .- Espectros de excitación y emisión de disoluciones de metotrexato. A) pH entre 2.32 y 5.20; B) pH entre 7.18 y 12.51

En medio ácido ( $\text{pH} < 4$ ) se observan 2 máximos de excitación situados a 270 y 335 nm y un único máximo de emisión localizado a 445 nm, siendo la intensidad de fluorescencia de estos máximos prácticamente constante. A medida que disminuye la acidez del medio ( $\text{pH} > 4$ ) se observa un aumento notable de la señal de fluorescencia a todas las longitudes de onda y un desplazamiento batocrómico del máximo de excitación situado a 335 nm, localizándose a 368 nm, y del máximo de emisión situado a 445 nm localizándose a 455 nm, a partir de pH 4.5. En medios muy básicos,  $\text{pH} > 11$ , la señal de fluorescencia disminuye notablemente en todas las zonas del espectro, no observándose variaciones en las situaciones de los máximos.

La variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH, a las longitudes de onda más significativas, se han representado en la Figura II.10.



**Figura II.10.-** Variación de la señal de intensidad de fluorescencia en el espectro de excitación a 270 y 368 nm ( $\lambda_{em} = 455$  nm) y en el espectro de emisión a 455 nm ( $\lambda_{ex} = 270$  nm).

Se observan cambios notables a las tres longitudes de onda, manteniéndose invariable la señal en el intervalo de pH comprendido entre 6.0 y 10.0.

Estas variaciones en la señal de fluorescencia nos permiten calcular las constantes de ionización del metotrexato mediante la primera y segunda derivada de las señales de fluorescencia con respecto al pH, a las tres longitudes de onda.

Los valores correspondientes a las constantes de ionización, a cada una de las longitudes de onda se resumen en la Tabla II.5.

**Tabla II.5.-** Valores de  $pK$  calculados mediante la derivada de la función  $I_f / pH$

		$pK_1$	$pK_2$
270 nm	1ª Derivada	5.03	12.25
	2ª Derivada	5.01	12.10
368 nm	1ª Derivada	5.03	12.25
	2ª Derivada	5.02	12.15
455 nm	1ª Derivada	5.03	12.25
	2ª Derivada	5.06	12.10
		$pK_{medio}$ = 5.03	$pK_{medio}$ = 12.18

En la bibliografía se encuentran diferentes valores para los  $pK$  del MTX. Rubino (2) indica que la molécula de MTX presenta dos ionizaciones debidas a los grupos carboxílicos: 3.36 ( $\alpha$ -carboxílico) y 4.70 ( $\gamma$ -carboxílico) y debido a la presencia de numerosos N protonables, asigna un  $pK_3 = 5.71$  a la posible desprotonación del N-1 del grupo guanidínico. No indica otras posibles desprotonaciones de aminas ternarias, por ejemplo la situada en el N-10.

La experiencia llevada a cabo en esta Memoria mediante detección fotométrica, nos muestra la posibilidad de diversos y numerosos equilibrios. Un primer equilibrio (pH: 4 - 5) que podría ser asignado a

la desprotonación de los grupos carboxílicos y un segundo cambio (pH: 5 - 6.5) debido previsiblemente al N guanadínico. Adicionalmente y a pH neutros (6.5 - 7.5) se observa un tercer cambio y a pH básicos (9.5 - 11) un cuarto cambio. Estos dos últimos se podrían asignar a la desprotonación de aminas ternarias.

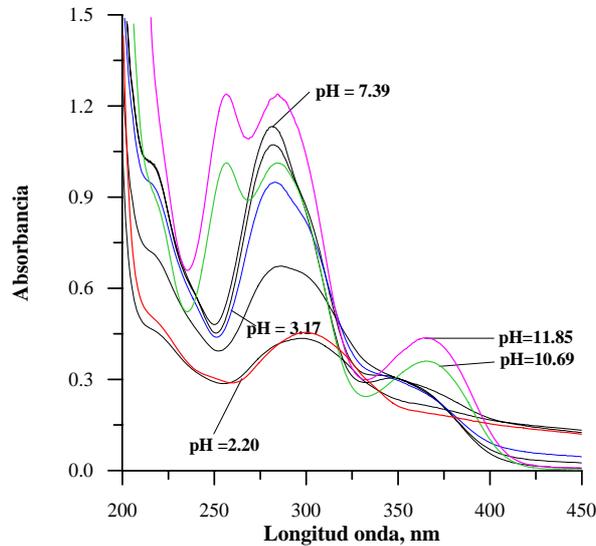
En fluorescencia solo se observan dos saltos responsables de los cambios estructurales en la molécula fluorescente, un primero a pH = 5.03 y un segundo a pH > 12. Dicho segundo equilibrio se ha comprobado que es reversible con el pH generando la forma existente a pH neutros, de donde consideramos que se trata de un posible equilibrio de desprotonación de aminas ternarias y uno causado por un proceso de hidrólisis.

### **II.3 .- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL ÁCIDO FÓLICO**

#### **II.3.1 .- Estudio espectrofotométrico del ácido fólico**

##### **Influencia de la acidez del medio en la absorción del ácido fólico**

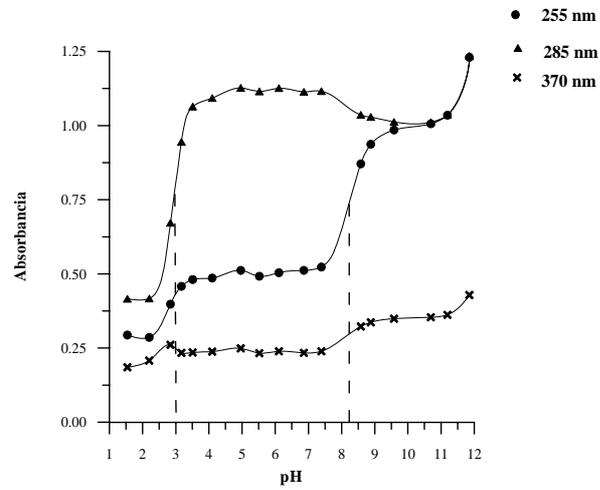
Para estudiar la influencia de la acidez, se prepararon disoluciones acuosas de ácido fólico de 18 mg L<sup>-1</sup>, y se les varió el pH entre 1.5 y 12.0, mediante la adición de HCl y/o NaOH. Se registran los espectros de absorción frente a sus correspondientes blancos. Dichos espectros aparecen representados en la Figura II.11.



**Figura II.11** .- Espectros de absorción del ácido fólico para diferentes valores de acidez.

Observamos en esta figura, como a pH fuertemente ácidos aparece un solo máximo situado a aproximadamente 300 nm. A medida que aumenta el pH, aumenta la absorbancia de este máximo al mismo tiempo que sufre un ligero desplazamiento hipsocrómico situándose a 285 nm. A partir de pH 8.5 comienzan a aparecer dos nuevos máximos a 255 y 370 nm respectivamente, cuyas absorbancias aumentan a medida que lo hace el pH.

En la Figura II.12 se representan los valores de absorbancia del ácido fólico, obtenidos para aquellas longitudes de onda donde el cambio en el espectro es más notorio, concretamente 255, 285 y 370 nm y a distintos valores de pH.



**Figura II.12 .-** Influencia del pH sobre la absorbancia del ácido fólico

Los cambios más pronunciados los podemos observar a las longitudes de onda de 255 nm y 285 nm. En ambos casos, la señal se mantiene prácticamente constante en un intervalo de pH comprendido entre 3.5 y 7.0.

Con objeto de determinar el valor de pK con mayor exactitud, se ha procedido al cálculo de la primera y segunda derivada, obteniéndose los resultados de pK medios que se muestran en la Tabla II.6.

**Tabla II.6.-** Valores de pK calculados mediante la derivada de la función absorbancia / pH

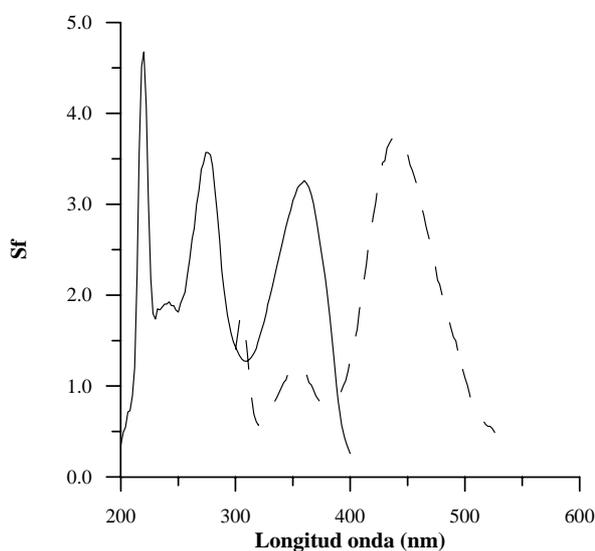
		pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
255 nm	1 <sup>a</sup> Derivada	-----	8.14
	2 <sup>a</sup> Derivada	-----	8.20
285 nm	1 <sup>a</sup> Derivada	3.00	-----
	2 <sup>a</sup> Derivada	2.92	-----
370 nm	1 <sup>a</sup> Derivada	-----	8.15
	2 <sup>a</sup> Derivada	-----	8.15
		pK <sub>medio</sub> = 2.96	pK <sub>medio</sub> = 8.16

### II.3.2 .- Estudio espectrofluorimétrico del ácido fólico

Se preparan disoluciones acuosas de ácido fólico conteniendo 5 mg L<sup>-1</sup> y se registran los espectros de excitación y emisión, manteniendo un voltaje de 650 V y un ancho de rendija de 8 nm. Los espectros de excitación y emisión se presentan en la Figura II.13, donde se observa que el espectro de excitación presenta dos máximos de excitación situados a 276 y 360 nm. El registro el espectro de emisión se lleva a cabo a estas dos longitudes de onda de excitación y en ambos casos se observa un único máximo de emisión localizado a 438 nm.

Se preparan disoluciones acuosas de ácido fólico conteniendo 5 mg L<sup>-1</sup> y se registran los espectros de excitación y emisión, manteniendo un voltaje de 650 V

y un ancho de rendija de 8 nm. Los espectros de excitación y emisión se presentan en la Figura II.13, donde se observa que el espectro de excitación presenta dos máximos de excitación situados a 276 y 360 nm. El registro del espectro de emisión se lleva a cabo a estas dos longitudes de onda de excitación y en ambos casos se observa un único máximo de emisión localizado a 438 nm.

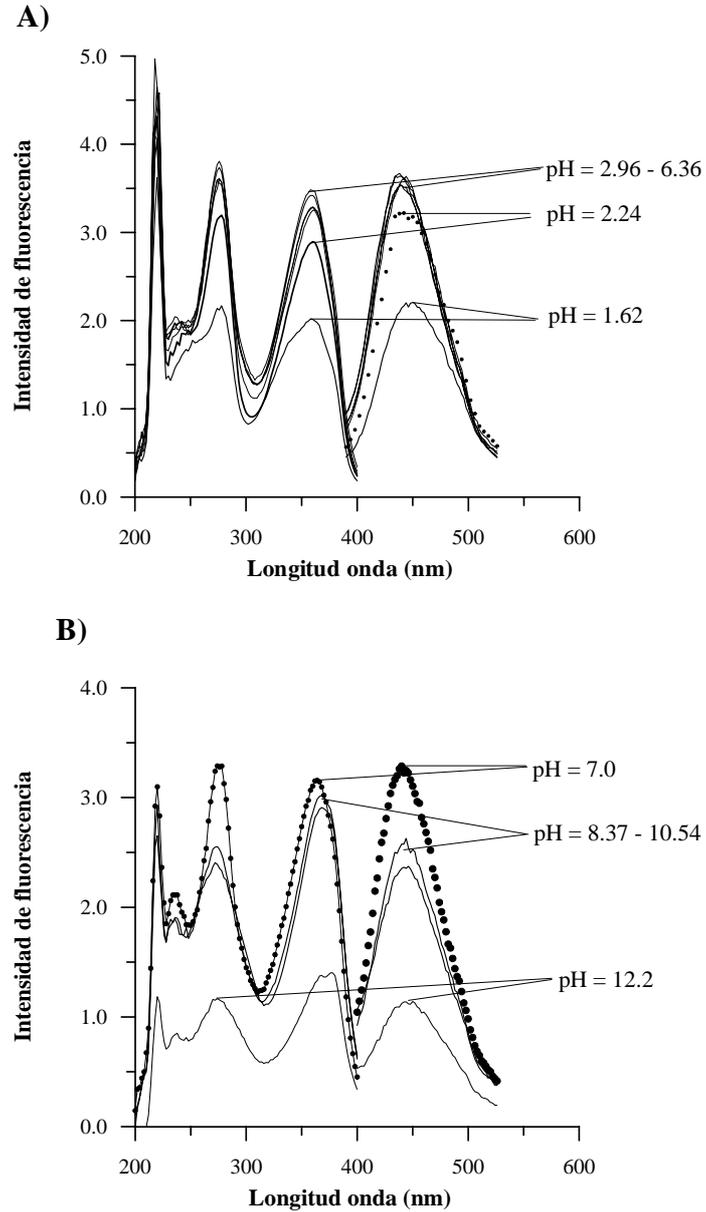


**Figura II.13 .-** Espectros de excitación (—) y emisión (- - -) del ácido fólico pH = 5.5,  $\lambda_{em} = 438$  nm,  $\lambda_{ex} = 276$  nm.

#### Influencia del pH en las propiedades fluorescentes del ácido fólico

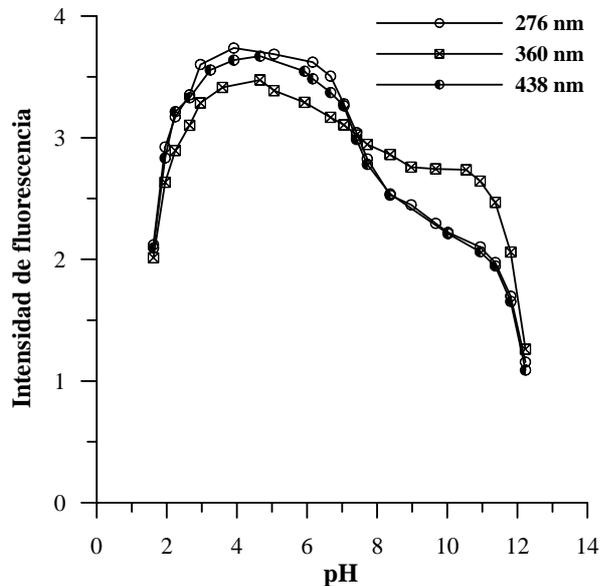
Se preparan disoluciones acuosas de ácido fólico de concentración  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a diversos valores de acidez modificada por la adición de HCl y/o NaOH, de manera

que el pH de las muestras varía entre 1.6 y 12.2. A continuación se registran los espectros de excitación y emisión que aparecen representados en la Figura II.14.



**Figura II.14** .- Espectros de excitación y emisión de disoluciones de ácido fólico para pH comprendido: A) 1.62 - 6.36; B) 7.0 - 12.2

En medio muy ácido ( $\text{pH} < 2$ ) se observan 2 máximos de excitación situados a 276 y 360 nm y un único máximo de emisión localizado a 438 nm. A medida que disminuye la acidez del medio ( $\text{pH} > 2$ ) se observa un aumento de la señal de fluorescencia notable a todas las longitudes de onda. Para  $\text{pH} > 6.3$ , se produce un desplazamiento batocrómico del máximo situado a 360 nm, localizándose a 368 nm. A partir de  $\text{pH} = 7.0$  se produce una disminución de la señal fluorescente que prácticamente desaparece a partir de  $\text{pH} = 12.2$ . En la Figura II.15 se han representado las variaciones de la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda más significativas.



**Figura II.15.-** Variación de la señal de intensidad de fluorescencia en el espectro de excitación a 276 y 360 nm ( $\lambda_{em} = 438$  nm) y en el espectro de emisión a 438 nm ( $\lambda_{ex} = 276$  nm)

**Tabla II.6 .-** Determinación del valor de pKa para el ácido fólico

		<b>pK<sub>1</sub></b>	<b>pK<sub>2</sub></b>
<b>276 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	2.70	7.55
	<b>2ª Derivada</b>	2.50	7.50
<b>360 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	2.80	7.60
	<b>2ª Derivada</b>	2.75	7.50
<b>438 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	2.80	7.35
		2.80	7.36
	<b>2ª Derivada</b>	<b>pK<sub>medio</sub> = 2.72</b>	<b>pK<sub>medio</sub> = 7.48</b>

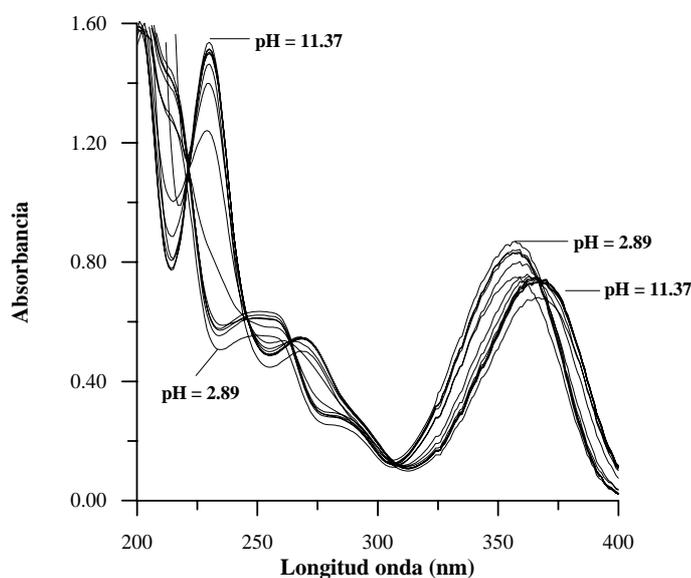
Se observa que los valores de pK obtenidos mediante espectrofotometría (2.96 y 8.16) y espectrofluorimetría (2.72 y 7.48) son similares a los descritos para la molécula base de pterín (2-amino-4-hidroxi pteridina) que forma el ácido fólico. Se describe un pK<sub>1</sub> = 2.20 asignado a la desprotonación del N-1 pteridínico y un pK<sub>2</sub> = 7.86 a la desprotonación del N-3 del mismo anillo, generando la forma aniónica. Por otra parte, el notable cambio observado en la señal de fluorescencia a pH>11, no parece consecuencia de un equilibrio de desprotonación, sino por el contrario achacable a un proceso de hidrólisis en medios alcalinos favorecido en las moléculas de pteridinas que contienen sustituyentes hidroxilo, como es el caso del ácido fólico (3).

## II.4 .- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANALÍTICAS DEL TRIAMTERENO

### II.4.1 .- Estudio espectrofotométrico de triamtereno

#### Influencia de la acidez del medio en la absorción del triamtereno.

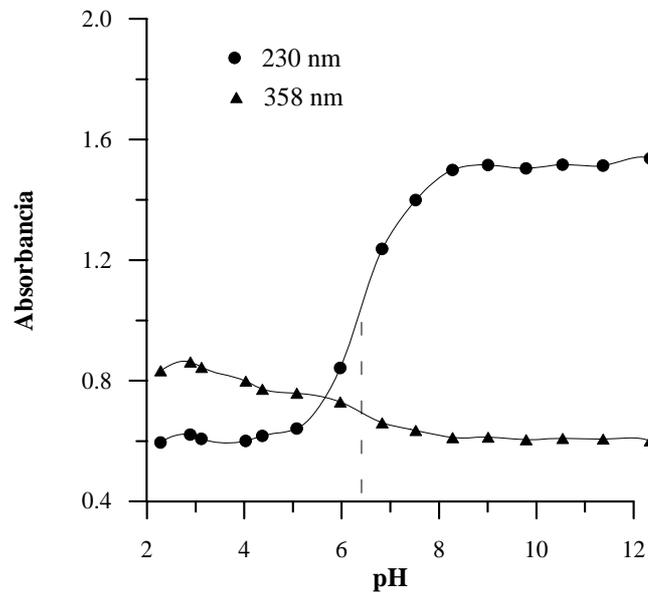
Para estudiar la influencia de la acidez, se prepararon disoluciones acuosas de triamtereno de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , y se les varió el pH entre 2 y 12, mediante la adición de HCl y/o NaOH. Se registran los espectros de absorción frente a sus correspondientes blancos. Dichos espectros aparecen representados en la Figura II.16.



**Figura II.16 .-** Espectros de absorción de triamtereno para diferentes valores de acidez.

En esta gráfica podemos observar en medio ácido dos máximos situados a 255 y 358 nm, así como un hombro mal definido a 280 nm. Al aumentar la acidez del medio se observa un fuerte efecto hipercrómico a 230 nm dando lugar a un nuevo máximo, y un efecto hipocrómico a 358nm unido a un desplazamiento batocrómico situando el máximo de absorción a 365 nm. También se puede observar la desaparición del máximo situado a 255 y la aparición de uno nuevo a 270 nm. Como consecuencia de los cambios indicados se observan claramente puntos isobésticos a 223, 248, 265 y  $\square$  360 nm.

En la Figura II.17, se han representado los valores de las absorbancias, a los distintos valores de pH fijados, para aquellas longitudes de onda donde el cambio en el espectro es más notorio, concretamente 230 y 358 nm.

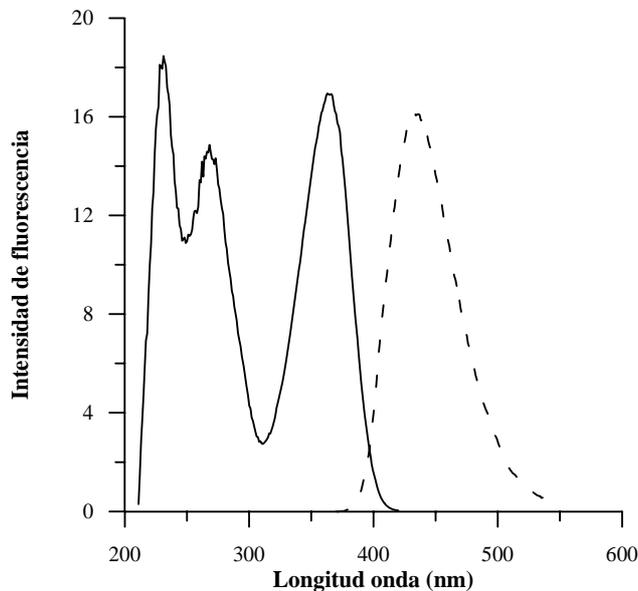


**Figura II.17** .- Representación de los valores de absorbancia frente al pH a distintas longitudes de onda

Como se puede observar el cambio más intenso se produce a 230 nm pudiéndose calcular un valor para el  $pK = 6.55$ . Con objeto de determinar el valor de  $pK$  con mayor exactitud, se ha procedido al cálculo de la primera y segunda derivada, obteniéndose a 230 nm. De dichas representaciones se obtiene un valor medio para el  $pK$  de 6.45.

#### **II.4.2 .- Estudio espectrofluorimétrico del triamtereno**

Se preparan disoluciones acuosas de triamtereno conteniendo  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  y se registran los espectros de excitación y emisión, manteniendo un voltaje de 650 V y un ancho de rendija de 4 nm. Se observan tres máximos de excitación situados a 232, 259 y 358 nm y un único máximo de emisión localizado a 445 nm.

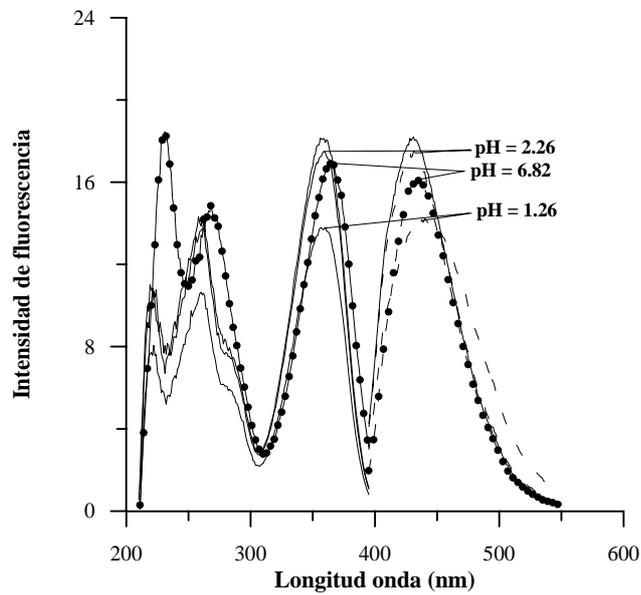


**Figura II.18 .-** Espectros de excitación (---) y emisión (----) del triamtereno en medio acuoso.  $pH = 6.82$ ,  $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 357 \text{ nm}$

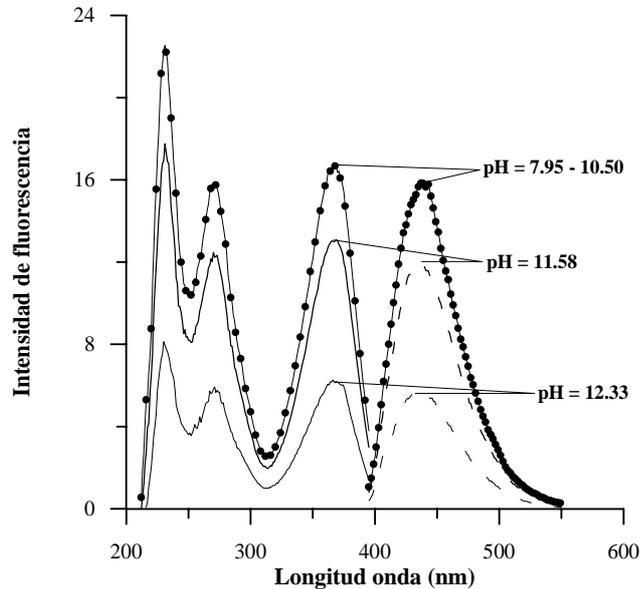
Influencia del pH sobre la fluorescencia del triamtereno

Se preparan disoluciones acuosas de triamtereno de concentración  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$  a diversos valores de acidez modificada por la adición de HCl y/o NaOH , de manera que el pH de las muestras varia entre 1.3 y 12.3. A continuación se registran los espectros de excitación y emisión que aparecen representados en la Figura II.19

A)



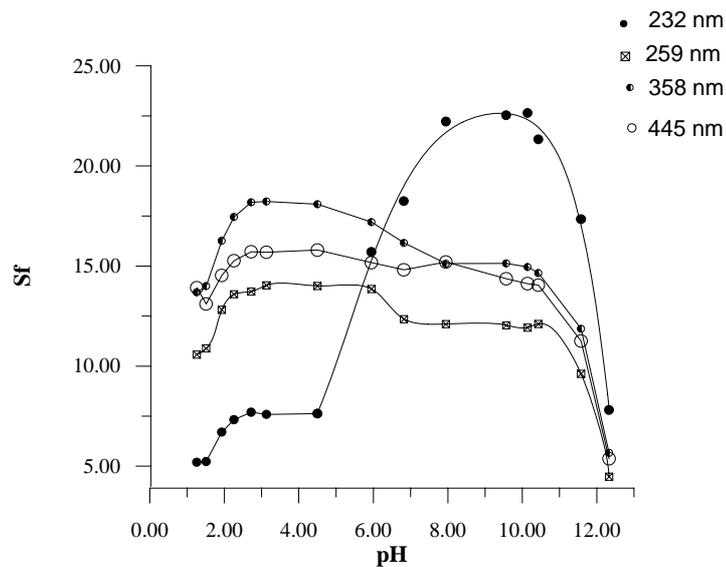
B)



**Figura II.19 .-** Espectros de excitación y emisión de disoluciones de triamtereno para pH comprendido: A) 1.26 - 6.82 ; B) 7.95 - 12.33

En medio muy ácido ( $\text{pH} < 2$ ) se observan 3 máximos de excitación situados a 220, 259 y 358 nm y un único máximo de emisión localizado a 448 nm. A medida que disminuye la acidez del medio ( $\text{pH} > 2$ ) se observa un aumento de la señal de fluorescencia notable a todas las longitudes de onda y un pequeño desplazamiento de la señal de emisión situándose a 445 nm. Para  $\text{pH} > 6.8$ , se produce un pequeño desplazamiento batocrómico del máximo situado a 259 nm, localizándose a 275 nm, además se observa la aparición de un nuevo máximo a 232 nm, no observándose cambios notables en la señal de emisión.

Para  $\text{pH} > 11$ , la señal de fluorescencia disminuye notablemente en todas las zonas del espectro. En la Figura II.20 se han representado las variaciones de la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda más significativas.



**Figura II.20.-** Variación de la señal de intensidad de fluorescencia en el espectro de excitación a 232, 259 y 358 nm ( $\delta_{em} = 445$  nm) y en el espectro de emisión a 445 nm ( $\delta_{ex} = 358$  nm).

Se observa un cambio notable cuando se miden los espectros de excitación a 232 nm, correspondientes a valores de pK próximos a 6.2. También se observa un pequeño salto en la zona de pH comprendida entre 1 y 2. Para  $\text{pH} > 10$ , la intensidad de fluorescencia desciende drásticamente no observándose cambios en los máximos de excitación o emisión.

Mediante las representaciones de la primera y segunda derivada de la función intensidad de fluorescencia /pH se obtienen los valores de los posibles pK que aparecen representados en la Tabla II.8.

**Tabla II.8.-** Valores de pK calculados mediante la derivada de la función  $I_f/pH$

		<b>pK<sub>1</sub></b>	<b>pK<sub>2</sub></b>
<b>232 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	1.97	6.39
	<b>2ª Derivada</b>	2.20	6.48
<b>259 nm</b>	<b>1ª Derivada</b>	1.94	6.39
	<b>2ª Derivada</b>	2.09	6.30
		<b>pK<sub>medio</sub>= 2.05</b>	<b>pK<sub>medio</sub>= 6.39</b>

Si comparamos los valores de pK obtenidos para el triamtereno mediante espectrofotometría (6.45) y espectrofluorimetría (2.05 y 6.39) vemos como uno de los pK coincide totalmente por ambas técnicas y también con el encontrado en la bibliografía (6.2) (4). Este valor de 2.05 es próximo al dado en la bibliografía para la desprotonación del N-1 del grupo guanadínico, en el núcleo de 4-aminopteridina (pK = 3.56) (5).

Los equilibrios ácido-base involucrados en las aminopteridinas son complejos ya que existen equilibrios entre varias especies moleculares en forma neutra (anhidras) y formas catiónicas (predominantemente hidratadas).

Por ejemplo, si el catión de la 2-aminopteridina no adicionara agua (catión formado sobre el N-1) su pK esperado debería ser 1.6, sin embargo, dependiendo del sustituyente en 7- va desplazándose hacia valores mayores, así el 2-amino-7- metil pteridina llega a presentar un pK de 4.29.

Las 4-aminopteridinas parecen comportarse como cationes anhidros fundamentalmente: las di-, tri-, tetra-aminopteridinas aumentan su basicidad de forma continua según aumentan el número de aminos sustituidos.

En el caso de la 2,4-diamino pteridina la forma tautomérica predominante parece ser la forma amino y no la imino- como en otros derivados, siendo su pK de 5.32. Por otra parte, el valor dado para la 2,4,7-triaminopteridina es de 6.30 (5).

El cambio observado en los espectros para  $\text{pH} > 11$ , no se ha asignado dado lo elevado de los valores de pH medidos, la probabilidad es de generar rotura de la molécula causante de la pérdida de fluorescencia, ya que no se observan desplazamientos de los máximos.

## II.5 .- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- The Merck Index (thirteenth edition). Reference: 4248, Pg. 749
- 2.- Rubino, F.M.; Review *J. of Chromatography B*, **764**, 217 (2001)
- 3.- Katritzky, A.R.; *Comprehensive heterocyclic chemistry*, vol.3, Edit. Pergamon Press, Pg.296
- 4.- The Merck Index (thirteenth edition). Reference: 9674, Pg. 1712
- 5.- Katritzky, A.R.; *Comprehensive heterocyclic chemistry*, vol.3, Edit. Pergamon Press, Pg.273

*Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas*

### **Capítulo III.**

## **APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE DERIVADAS AL ANÁLISIS DE TRIAMTERENO, ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO**

### **III.1.- INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE DERIVADAS**

#### **III.1.1 - Concepto, origen y desarrollo**

Con el nombre de espectro derivado se conoce a la representación gráfica, en un determinado intervalo de longitudes de onda, del cociente diferencial  $dA/d\lambda$ , donde A representa la absorbancia de un espectro normal y  $\lambda$  la longitud de onda. No es otra cosa, por tanto, que la representación gráfica de la pendiente del espectro normal a cada longitud de onda del intervalo medido.

Más exactamente, a la representación gráfica del citado cociente diferencial se le conoce como espectro de primera derivada, toda vez que cabe representar derivadas de orden superior de A respecto a  $\lambda$ , dando lugar a los espectros de segunda derivada ( $d^2A/d\lambda^2$ ) y, en general, a espectros derivados de orden n ( $d^nA/d\lambda^n$ ).

Estas representaciones gráficas resultan muy útiles en todos aquellos casos en los que el tratamiento cuantitativo de los espectros normales sea difícil, o incluso imposible, tanto en el análisis de productos naturales como en el de ciertos compuestos en mezclas, utilidad que se deriva de su mayor grado de resolución.

En efecto, las bandas de absorción que se encuentran en espectrofotometría UV-Vis son normalmente muy amplias debido al solapamiento entre

las muchas transiciones electrónicas que pueden tener lugar. Por esta razón, la determinación exacta de longitudes de onda de máxima absorción de una banda muy amplia, o la resolución de mezclas de varios componentes donde existe solapamiento de los espectros, suele presentar dificultades.

Así pues, la puesta en evidencia de la estructura fina, ya sea con fines de identificación, como criterio de pureza o para el control de calidad, puede lograrse mediante los espectros de derivadas dada su mayor capacidad de resolución. Quizá el aspecto más importante del espectro de derivadas sea que las señales son proporcionales a la concentración siempre que se cumpla la ley de Beer, de lo cual se deduce:

$$\frac{dA}{dl} = \frac{de}{dl} \cdot b \cdot c$$

donde  $d\gamma/d\delta$  es una constante para cada longitud de onda y  $b$  es el espesor de la cubeta en cm.

Otro hecho importante es que esta constante de proporcionalidad,  $d\gamma/d\delta$ , depende de la magnitud del cambio de la absorptividad molar a una longitud de onda determinada, al variar ésta, en lugar de hacerlo sobre la magnitud absoluta de  $\gamma$ . De esta forma, para espectros de absorción que presentan máximos de absorción muy pronunciados,  $d\gamma/d\delta$  alcanza valores muy elevados, lo que permite determinaciones analíticas de mayor sensibilidad.

No puede concluirse, sin embargo, que la utilización de señales derivadas aumente la sensibilidad de la determinación analítica, puesto que en los casos en que el espectro de absorción presenta variaciones suaves, con máximos poco pronunciados, el valor de  $dy/d\delta$  resulta pequeño en comparación con el anterior, y la determinación se hace, en este caso, con menor sensibilidad.

Estos métodos de resolver la estructura fina de señales eléctricas por diferenciación se empezó a aplicar hace aproximadamente 70 años. En 1920, Lord Rutherford sugirió la técnica de primera derivada para la detección de discontinuidades en estudios de espectroscopía de masa de potenciales de excitación de gases (1).

En 1953, Morrison (2) llevó a cabo por ordenador la primera y segunda derivada por curvas diferenciales. Estas se obtuvieron por sustracción en pequeños intervalos.

Pero la utilización sistemática de las indudables ventajas de esta técnica de espectroscopía de derivadas no ha sido posible hasta tiempos relativamente cercanos, pues, a pesar de haber sido introducida hace muchos años, solamente ha podido desarrollarse cuando se ha dispuesto de la instrumentación adecuada y asequible. Así, la falta de aparatos de precio razonable y la limitación de esta técnica a la obtención de la primera

derivada, restringieron su aplicación, durante un tiempo, a casos especiales.

Afortunadamente, la introducción del principio de diferenciación numérica y la calidad de los aparatos de derivación disponibles comercialmente ha hecho posible la obtención de derivadas de orden superior con una instrumentación sencilla (3) y ha abierto un amplio campo de aplicaciones a un precio asequible. Actualmente, prácticamente todos los nuevos espectrofotómetros están acomodados con al menos sistemas de derivadas de segundo orden, pero la mayoría pueden incluso llegar hasta el cuarto orden y algunos incluso hasta un sexto ó noveno orden. Esto hace posible la aplicación de estas técnicas no solo en laboratorios de investigación, sino también en operaciones de rutina.

En diferentes comunicaciones presentadas en el Joint Meeting of the Scottish, North East and North West Regions and Special Techniques and Joint Pharmaceutical Analysis Groups (Edimburgo, marzo, 1980), se reúnen distintos trabajos de interés. Así, sobre aspectos teóricos, O'Haver (4) hace referencia a detección y localización de longitudes de onda de los componentes poco resueltos de un espectro complejo (5), a la reducción del efecto de las interferencias espectrales de fondo (6) y la relación señal/ruido (7).

Gans (8), a su vez, trata aspectos relativos a los métodos numéricos (9-11) y a las aplicaciones analíticas (12).

### **III.1.2.- Instrumentación**

Diversas son las técnicas instrumentales que se han desarrollado para la obtención de espectros derivados (13-15). Así, los espectros de derivadas se pueden obtener de dos maneras según el tipo de aparatos:

, Espectrofotómetros que utilizan la señal de salida que permite la derivada mediante:

- a) diferenciación electrónica
- b) tacómetro mecánico
- c) diferenciación numérica

, Espectrofotómetros que utilizan el sistema óptico, para lo cual debe tratarse de:

- a) aparatos que emplean dos longitudes de onda
- b) mediante modulación de la longitud de onda
- c) sustracción de espectros desplazados

De todas estas posibilidades, la diferenciación numérica es la que se emplea con mayor frecuencia, las derivadas se calculan numéricamente mediante el uso de ordenadores, a partir de los datos espectroscópicos que se les hacen llegar mediante el uso de la interfase adecuada, utilizando diversos algoritmos matemáticos.

En nuestro caso, el software disponible basa su cálculo matemático en la aplicación del algoritmo de Savitzky y Golay (9).

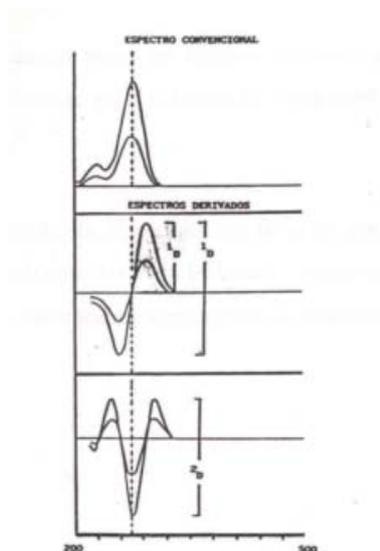
### **III.1.3 .- Registro y características de los espectros derivados**

En el caso de derivación electrónica, la velocidad de barrido del intervalo de longitud de onda influye sobre la señal de ordenadas del espectro de derivadas, así como la sensibilidad en sus diferentes posiciones (asociada a una constante de tiempo distinta). Existe, por tanto, una gran variedad de posibles ajustes instrumentales para la obtención del espectro de derivadas, no siendo posible dar a priori normas fijas que sean válidas para todos los casos.

A igual constante de tiempo, la segunda derivada proporciona una mayor sensibilidad y una información más detallada que la primera.

En los casos de bandas de absorción muy ancha debe elegirse una sensibilidad alta y una velocidad de barrido de la longitud de onda grande, mientras que si se trata de bandas estrechas, debe utilizarse una constante de tiempo pequeña y una velocidad de barrido baja.

A continuación, se muestran los espectros de primera y segunda derivada de un espectro de absorción convencional:



**Figura III.1.-** Espectros primera y segunda derivada de un espectro de absorción convencional

Observándose la figura anterior, vemos que los puntos de inflexión del espectro original dan lugar a un máximo y a un mínimo en la primera derivada, obteniéndose el valor cero para la posición del máximo de absorción.

En la segunda derivada, los puntos de inflexión del espectro original se convierten en dos máximos, y el máximo de absorción en un mínimo.

Debido al proceso de diferenciación, y según las condiciones instrumentales de registro, la posición del cero en la primera derivada, y la del mínimo en la segunda, pueden sufrir un desplazamiento más o menos apreciable respecto al máximo de absorción del espectro original

En el espectro de la primera o segunda derivada, la señal de ordenadas no es proporcional al valor de la absorción, sino a la pendiente del espectro convencional siempre que éste esté registrado en absorción. Es por esto que el espectro de derivadas puede presentar valores positivos o negativos o bien máximos y mínimos según el carácter de la pendiente.

Hay que decir, que el que un punto sea máximo o mínimo, depende del sentido en que se barra el intervalo de longitud de onda, pues el tramo de curva que resulta creciente en un sentido es decreciente en el contrario.

Para una sustancia absorbente, las posiciones de la longitud de onda para determinados puntos significativos del espectro de derivada (máximos, mínimos y valores cero), así como la distancia entre dichos puntos, representan magnitudes características.

Desde el punto de vista práctico se emplean dos métodos de análisis cuantitativo:

*1.- Medida de separación entre picos.*

Se mide la separación entre un máximo y un mínimo vecinos característicos del compuesto en estudio. Este método (en primera derivada) es apropiado especialmente para determinaciones en presencia de turbidez o cuando hay una absorción de fondo poco definida.

## *2.- Método de la tangente.*

Se utiliza para segunda derivada. Consiste en trazar la tangente entre dos máximos vecinos y se mide, en la dirección del eje de ordenadas, la distancia entre la tangente y el mínimo situado entre los dos máximos. Con este método se elimina o se rebaja la influencia de la absorción de fondo.

En cuanto a los espectros de derivadas de orden superior cabe decir que el pico de cada componente del espectro de absorción muestra un rasgo característico en el espectro de derivada en el cual es resuelto.

Podemos decir, que el espectro de derivada proporciona una mejor huella dactilar que el espectro de absorción normal. En algunos casos, también ha sido posible resolver el solapamiento de bandas de diferentes especies químicas.

### **III.1.4 .- Ventajas de la espectroscopía de derivadas**

Aún cuando ya anteriormente se han mencionado algunas de ellas, conviene expresar de manera explícita las siguientes:

#### *a) Medida exacta de $\delta_{m\acute{a}x}$ :*

La primera derivada de un espectro resulta muy útil para determinar la posición exacta de sus máximos de absorción, ya que en aquel la  $\delta_{m\acute{a}x}$  viene determinada por el punto de corte de la curva con el eje de abscisas.

*b) Mejor resolución de los espectros:*

Una ventaja importante es la mejor resolución en que aparece la estructura fina que, a veces, es complicado ver en un espectro normal.

En este caso, conviene más emplear la segunda derivada, ya que los máximos y mínimos del espectro convencional y del de segunda derivada aparecen prácticamente a las mismas longitudes de onda y la estructura fina del espectro se manifiesta mejor que en primera derivada.

*c) Análisis de muestras turbias:*

Las disoluciones turbias presentan, en general, un aumento continuo de absorbancia hacia longitudes de onda más cortas, no ocasionando ninguna variación espectral significativa en la primera y segunda derivada.

Por tanto, en el registro de espectros de derivadas en presencia de turbidez se elimina el efecto de la absorción de fondo debida a ésta. No obstante, en las determinaciones cuantitativas con diferenciación electrónicas la turbidez debe controlarse para evitar los efectos debidos a la luz dispersa.

*d) Determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes:*

Es la aplicación más importante de la espectroscopía de derivadas, y se hace imprescindible en el caso de que el componente que se desea

determinar sólo es visible en el espectro total por un pequeño pico.

En espectroscopía convencional, estos picos sólo pueden ser utilizados aceptando grandes errores sistemáticos. Por el contrario, la espectroscopía de derivadas permite su utilización con errores sistemáticos pequeños e incluso despreciables.

Se han empleado diversos métodos con objeto de resolver mezclas: en unos casos se ha propuesto medir a una longitud de onda a la cual no contribuya el compuesto interferente; en otros, se resuelve el problema planteando un conjunto de ecuaciones de cuya solución se obtengan las concentraciones deseadas.

### **III.1.5 .- Métodos para resolver mezclas**

#### *1) Técnicas de medida del “zero-crossing”:*

Esta técnica emplea el valor absoluto del espectro derivado del orden que se esté empleando, a un valor de abscisa correspondiente a una longitud de onda a la que presente valor cero el espectro derivado del componente puro cuya interferencia se desee evitar. Las medidas realizadas a esa longitud de onda en el espectro mezcla podrá ser función solamente de la concentración del componente que se analiza (16,17). Esta técnica también permite determinaciones simultaneas en dichas mezclas.

Si consideramos una mezcla de dos componentes 1 y 2, que se encuentran en concentraciones  $C_1$  y  $C_2$ . Como la absorbancia es una propiedad aditiva, se cumplirá que:

$$A_1 = \gamma_1 \epsilon C_1$$

$$A_2 = \gamma_2 \epsilon C_2$$

si  $b = 1$

$$A = \gamma_1 \epsilon C_1 + \gamma_2 \epsilon C_2$$

donde  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  son las absorptividades molares respectivas de ambas sustancias.

Si derivamos respecto a la longitud de onda, obtendremos la primera derivada del espectro suma:

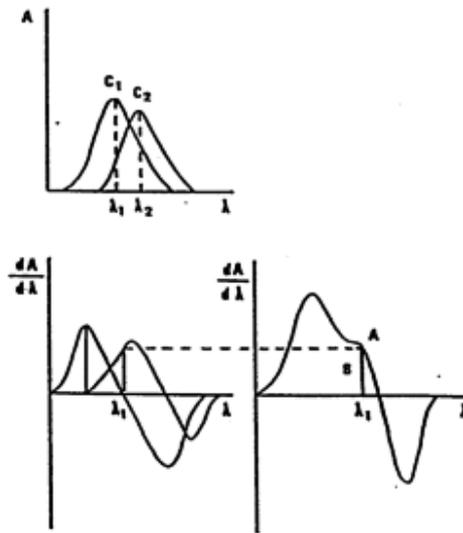
$$\frac{dA}{dl} = C_1 \frac{d\epsilon_1}{dl} + C_2 \frac{d\epsilon_2}{dl}$$

donde vemos que la pendiente de la curva espectral es suma de las pendientes individuales de cada componente.

Si se opera a una longitud de onda tal que se verifique que  $d\gamma_1/d\lambda = 0$ , esto es, a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del componente 1, podremos determinar la concentración del componente 2, ya que en este caso se cumplirá que:

$$\frac{dA}{d\lambda} = C_2 \frac{de_2}{d\lambda}$$

El único requisito para la determinación es que las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de los dos componentes estén suficientemente diferenciadas:



**Figura III.2.- Determinación de dos componentes**

Operando a la longitud de onda  $\lambda_1$ , la medida de la distancia AB permite determinar la concentración  $C_2$ . Análogamente, puede determinarse  $C_1$ .

La exactitud conseguida en la mezcla de componentes, depende de los parámetros siguientes:

- i) Relación de la altura de la banda que interfiere y de la banda de interés analítico.

- ii) Lo mismo respecto a la anchura medida.
- iii) Separación entre los máximos de absorción de los componentes.

2) Método de regresión lineal a múltiples longitudes de onda:

Para cada longitud de onda, la absorbancia de una mezcla de dos componentes se puede expresar por:

$$A_1 = \gamma_1 \epsilon b \epsilon C_1 + \gamma_2 \epsilon b \epsilon C_2$$

donde  $\gamma$  y  $C$  son las absorptividades y concentraciones respectivas de los analitos.

Las absorptividades se calculan a partir de los valores de la absorbancia de una disolución patrón. Así, para cada componente:

$$A_{pi} = \gamma_i \epsilon b \epsilon C_{pi}$$

donde  $C_{pi}$  es la concentración del componente  $i$  en el patrón.

Operando con las ecuaciones anteriores, y si  $C_1 = C_2 = 1$ , se obtiene:

$$\frac{A_1}{A_{p1}} = C_1 + \frac{A_{p2}}{A_{p1}} C_2$$

Representando  $A_1/A_{p1}$  frente a  $A_{p2}/A_{p1}$ , para cada longitud de onda, se obtiene una recta, cuya ecuación se ajusta por mínimos cuadrados, en la que las concentraciones de los dos analitos se deducen de los valores de la ordenada en el origen y la pendiente.

Los coeficientes de correlación,  $r$ , de la recta, y la desviación estándar,  $\Phi_n$ , son los parámetros que nos indicarán el grado de ajuste del espectro experimental frente al calculado.

Este método sirve, además, como criterio de selección del intervalo de longitudes de onda más apropiado para la determinación, puesto que sólo se obtendrán líneas rectas para las longitudes de onda en las que se cumpla la aditividad de las absorbancias.

### 3) Método de derivada de espectros cocientes:

Una posibilidad nueva de cálculo ha sido desarrollada por F. Salinas, J.J. Berzas y A. Espinosa-Mansilla (18) operando sobre cocientes de espectros de absorción. Si tenemos en cuenta las mismas condiciones que se tuvieron al exponer el método de regresión lineal a múltiples longitudes de onda, para dos componentes y realizando medidas de absorbancia a diferentes longitudes de onda, y tomando tantas medidas como sea posible dentro de una determinada zona del espectro, se llega a las ecuaciones antes utilizadas:

$$\frac{A_i}{A_{1_{pi}}} = C_1 + \frac{A_{2_{pi}}}{A_{1_{pi}}} C_2 \quad \text{Y} \quad \frac{A_i}{A_{2_{pi}}} = C_2 + \frac{A_{1_{pi}}}{A_{2_{pi}}} C_1$$

Si derivamos estas ecuaciones respecto a la longitud de onda,  $\lambda$ , obtenemos:

$$\frac{d}{dl} \left( \frac{A_i}{A_{1pi}} \right) = \frac{d}{dl} \left( \frac{A_{2pi}}{A_{1pi}} \right) C_2 \quad \text{Y} \quad \frac{d}{dl} \left( \frac{A_i}{A_{2pi}} \right) = \frac{d}{dl} \left( \frac{A_{1pi}}{A_{2pi}} \right) C_1$$

que indican que la derivada del cociente entre el espectro correspondiente a la mezcla de las dos sustancias y el espectro correspondiente al patrón de una de las sustancias (patrón de concentración unidad) nos da una magnitud que es proporcional a la concentración de la otra sustancia, a cualquier longitud de onda.

Lo anterior equivale a decir que cuando se toman como señales analíticas, a una determinada longitud de onda,  $\frac{d}{dl} \left( \frac{A}{A_p} \right)$  ó  $\frac{d}{dl} \left( \frac{A}{A_r} \right)$  se pueden establecer rectas de calibrado utilizables para las determinaciones del componente 2 o del componente 1, respectivamente, sin que la presencia del otro componente, en cada caso produzca interferencia.

Sean dos componentes, 1 y 2. Si se cumple la ley de Lambert-Beer y  $b = 1$ , el espectro de absorción vendrá dado por:

$$A_{1,8} = \gamma_{1,8} \cong C_1 + \gamma_{2,8} \cong C_2$$

donde  $A_{1,8}$  es la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda 8, y  $\gamma_{1,8}$  y  $\gamma_{2,8}$  son las absortividades molares a esa misma longitud de onda 8.

Si la anterior ecuación se divide por la del espectro de una disolución patrón de 1, de concentración  $C_1^0$ , se puede escribir:

$$\frac{A_{1,l}}{e_{1,l}C_1^o} = \frac{C_1}{C_1^o} + \frac{e_{2,l}C_2}{e_{1,l}C_1^o}$$

que, multiplicada por  $C_1^o$ , conduce a:

$$\frac{A_{1,l}}{e_{1,l}} = C_1 + C_2 \frac{e_{2,l}}{e_{1,l}}$$

Representado  $A_{1,8}/\gamma_{1,8}$  frente a  $\gamma_{2,8}/\gamma_{1,8}$ , se obtiene una línea recta, cuya ordenada en el origen proporciona  $C_1$ , y cuya pendiente es  $C_2$ .

También se puede calcular 2 en presencia de 1 empleando la primera derivada de la ecuación anterior:

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{A_{1,l}}{e_{1,l}C_1^o} \right) = \left( \frac{C_2}{C_1^o} \right) \frac{d}{dt} \left( \frac{e_{2,l}}{e_{1,l}} \right)$$

Ecuación que muestra que la derivada del cociente de espectros para la mezcla sólo depende de los valores de  $C_2$  y de  $C_1^o$ , siendo independiente del valor de  $C_1$  en la mezcla.

Para establecer la curva de calibración se registran y almacenan espectros de disoluciones de diferentes concentraciones de 2 y el espectro de una disolución de 1 puro de concentración  $C_1^o$ . Las amplitudes para 2 serán entonces divididas por las correspondientes de 1 para cada longitud de onda, operando como antes se ha dicho, esto es, diferenciando el cociente de espectros así obtenido y representando para una determinada longitud de onda frente a  $C_2$ . Análogamente puede calcularse el componente 1.

### **III.1.6 .- Factores que influyen en los espectros derivados**

Cuando se calcula una derivada a partir del espectro original, se debe buscar siempre un compromiso entre la fidelidad con que se calcula la derivada y la razón señal/ruido.

La disminución de la relación señal/ruido puede conseguirse promediando el cálculo de la derivada sobre una zona de longitudes de onda que sea grande comparada con la estructura del ruido, esto es, empleando un  $\Delta\lambda$  mayor para calcular la derivada; sin embargo, al aumentar el rango de longitudes de onda, la derivada estará más distorsionada. Es conveniente que comentemos los dos aspectos siguientes:

#### *Distorsión:*

Una curva derivada, calculada con un incremento de longitud de onda finito, se distorsiona debido a una disminución en la señal derivada y a una disminución en la resolución.

Existe una medida cuantitativa de la disminución de la señal derivada que se obtiene definiendo el factor de distorsión,  $F_{n,\Delta\lambda}$ , como la máxima altura medida del máximo a mínimo calculada con una longitud de onda finita ( $\Delta\lambda$ ) dividida por la calculada exactamente ( $d\lambda$ ):

$$F_{n,8} = H_{n,8} / H_{n,d8}$$

Es importante señalar que la distorsión no afecta a la linealidad de la señal derivada con la concentración, pues  $\delta^n$  es un operador lineal.

*Relación señal/ruido:*

La relación señal/ruido (S/N) va disminuyendo al aumentar el orden de la derivada.

El ruido de un espectro normal se puede expresar como la desviación estándar de la absorbancia del blanco,  $\Phi_0$ . Para una n-ésima derivada, la desviación estándar,  $\Phi_n$ , se calcula a partir de  $\Phi_0$  empleando las reglas de propagación de errores.

La relación señal/ruido de una señal derivada depende de la forma del espectro. Si la banda es gaussiana y suponemos que S/N es 1 en el espectro de orden cero: para la primera derivada sería  $2.02/M$ , para la segunda  $3.26/M^2$ , para la tercera  $8.10/M^3$ , para la cuarta  $17.8/M^4$ , etc., donde M es el número de puntos del pico a mitad de altura.

Debido a esta disminución de S/N, los métodos de derivación utilizados emplean técnicas de suavizado para controlar el incremento del ruido. Este proceso de suavizado, se hace mediante una función de suavizado la cual consiste en un conjunto de coeficientes de peso. Los diferentes métodos de suavizado existentes difieren de la forma de cálculo de los coeficientes.

El efecto de suavizado depende de dos variables:

- a) la razón de suavizado, que es el cociente de la anchura del pico suavizado por el número  $M$  de puntos de anchura a mitad de altura.
- b) el número de veces que se efectúa el suavizado

El valor de  $\delta$  debe ser del orden de la amplitud de la semianchura de la banda que el analista desea resolver o separar. Un aumento apreciable de  $\delta$  distorsiona la derivada de su forma exacta, pero aumenta la relación señal/ruido y la capacidad de obtención de derivadas de orden superior. Por el contrario, una disminución de  $\delta$  proporciona una mayor resolución, pero también un mayor ruido.

### **III.1.7 .- Selección del orden de derivada**

Como se ha indicado, la resolución y distinción de picos aumenta con el orden de derivada, mientras que la relación señal/ruido decrece. En cualquier caso, resulta que:

, La primera derivada es el orden óptimo sólo cuando el espectro de absorción es generalmente ruidoso.

, La segunda derivada proporciona mejor resolución, un rango característico más fácilmente identificable (un mínimo frente a una pendiente negativa) y una relación señal/ruido satisfactoria.

, Cuando la estructura no es muy apreciable en el espectro de absorción, es necesario obtener la tercera o cuarta derivada para una buena resolución

### **III.1.8 .- Aplicaciones**

Las aplicaciones de la espectrofotometría de derivadas son muy numerosas tanto en lo relativo a la determinación de especies inorgánicas como de especies orgánicas.

La determinación cuantitativa de mezclas de compuestos con bandas de absorción solapadas es uno de los campos de aplicación más extensamente desarrollados en los últimos años. O`Haver y Green (19) desarrollan el tratamiento de estas técnicas cuando se aplican al solapamiento de bandas y realizan un estudio de los errores sistemáticos debidos al azar y asociados a los procesos de medida (20).

Fell y Smith (21) aportan estudios relativos a espectros solapados que poseen la misma posición del máximo y la misma amplitud de la señal. Este trabajo es importante desde el punto de vista analítico, ya que pone de manifiesto la posibilidad de anular la señal correspondiente a un componente que presenta una banda muy ancha en comparación con otro compuesto que la presenta estrecha. De esta forma será posible eliminar algunas interferencias por simple derivación de los espectros.

Un caso extremo de “banda ancha” es la que origina una suspensión coloidal, una disolución turbia,

cuyo espectro es prácticamente plano y que se anula casi totalmente al realizar la primera derivada.

Estos hechos, y los indicados como base del método de medida “zero crossing” o de la anulación de la señal debida a un componente a una determinada longitud de onda, constituyen la base de numerosas aplicaciones analíticas de la espectroscopía de derivadas.

En esta Memoria, no pretendemos hacer una revisión exhaustiva sobre las aplicaciones de esta técnica por lo que solo nos ceñiremos a las publicaciones más recientes, tanto en el campo de la química inorgánica como en la determinación de compuestos orgánicos.

i) Aplicación en análisis inorgánico:

El uso de técnicas de derivadas para la determinación de constituyentes inorgánicos es escaso, quizá porque existen en la bibliografía muchos métodos selectivos para los distintos iones inorgánicos. Los elementos de las series de transición interna han sido muy estudiados por espectrofotometría de derivadas, dado que, como es bien sabido, los espectros de absorción de sus sales muestran bandas agudas muy apropiadas para resolverlas por derivadas de diferentes órdenes. Ren y col. (22) proponen el uso de la tercera derivada para la determinación rápida de pequeñas cantidades de Nd, Ho, Er y Tm en una mezcla de tierras raras, así como la mezcla de Sm y Eu (23). También se han resuelto varias tierras raras utilizando primera,

segunda, tercera y cuarta derivadas de los espectros de absorción de sus respectivos cloruros (24). Ren y Tong (25) determinan simultáneamente por segunda derivada mezclas de tierras raras conteniendo Pr, Nd, Sm, Eu, Dy, Ho, Er y Tm sin separación previa y los resultados son favorablemente comparados con los obtenidos por extracción cromatográfica y métodos de fluorescencia de rayos X.

Las publicaciones más recientes están basadas en las determinaciones de iones inorgánicos basadas en los espectros derivados de sus complejos con ligandos orgánicos. A modo de ejemplo citaremos las siguientes: Determinación de Co y Fe, en agua de río, previa formación de complejos con 3-(4-fenil-2-piridinil)-1,2,3-triazina (26), Mg (II) y Cu (II) en presencia de 1,3,8-trihidroxy-6-metilanttraquinona como reactivo complejante (27). Ferreira y col. (28) determinan Al (III) en presencia de azul de hidroxinaftol en diversas aleaciones de Fe previa formación de un complejo con 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol en materiales geológicos (29).

Otras determinaciones propuestas son la de Pd (II) y Co (II) con ácido dietilen-triaminopentaacético (30), Ni (II) y Cu (II), en aleaciones, y con diacetilmonoxima benzoilhidrazona (31).

También se han propuesto métodos para la determinación de aniones inorgánicos mediante esta técnica, previa formación de complejos coloreados. Así, se han determinado nitratos y nitritos, en muestras de carne (32), y fosfatos y silicatos en muestras de agua y

detergentes, previa formación de complejos con molibdato en presencia de ascórbico (33) y con ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (34).

ii) Aplicación en análisis orgánico:

Es en la determinación de compuestos orgánicos donde la espectrofotometría de derivadas ha encontrado su mayor desarrollo.

Actualmente, el mayor número de trabajos recogidos en la bibliografía se refiere al campo de la química farmacéutica, bien a la determinación selectiva de principios activos en presencia de otros de estructura similar, o a la determinación simultánea de varios principios activos en fármacos, o en fluidos biológicos. Como ejemplo de este tipo de análisis, tenemos la determinación de *efedrina* con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (35), la combinación *cloramida-pindolol* (36), *ácido mefenámico-paracetamol* (37), combinación muy frecuente debido a su acción analgésica y antipirético, y *ácido ascórbico-paracetamol* (38) en formulaciones farmacéuticas mediante espectros derivados de primer orden.

También se han propuesto métodos para la determinación simultánea de *hidroxocobalamina* - *cianocobalamina* como parte de venenos cianídicos en fluidos biológicos (39). *Piroxican* y su mayor metabolito *5-hidroxi-piroxican*, utilizado en afecciones que precisan acción antiinflamatoria, se han

determinado mediante espectrofotometría de primera derivada concretamente en plasma humano (40). *Cefsulodin - ácido clavulánico* (41) y *cefaloten - cefoxiten* (42) en soluciones fisiológicas, *cefuroxima* y *cefadroxil* (43) en orina y la combinación *sulfametoxazol-trimetoprima* como tratamiento en infecciones respiratorias (44), también han sido determinados mediante primera derivada.

Una combinación importante como es *rifampicina-isoniazida* (45) en el tratamiento de la tuberculosis, también ha sido resuelta mediante el uso de espectrofotometría de derivada de primer orden en formulaciones farmacéuticas.

Por espectrofotometría de derivada de segundo orden ha sido determinado *astemizol* en preparaciones farmacéuticas (46).

La espectrofotometría de derivada de primer orden también ha sido utilizada para estudios de estabilidad de compuestos tales como *omeprazol* (47) utilizado en el tratamiento de úlceras gástricas y *lorazepam* (48) perteneciente a la familia de las benzodiazepinas.

Cabe mencionar el estudio cuantitativo mediante derivada de primer orden de *metronidazol* administrado en el tratamiento de infecciones postoperatorias, en combinación con *ciprofloxacino* (49), agente bactericida perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas.

En cuanto a la determinación de antibióticos, podemos mencionar los trabajos encaminados a la resolución de mezclas de *tetraciclinas*, concretamente *oxitetraciclina* y *doxiciclina*, (50) en compuestos farmacéuticos, orina y miel, llevados a cabo en nuestro propio Departamento. También se ha resuelto la mezcla de *sulfatizaol* y *sulfanilamida* (51).

Compuestos de naturaleza antibacteriana como *trimetoprima*, *sulfametoxazol* y *sulfametoxipiridazina* (52), también han sido resueltos por primera derivada en productos vegetarianos y mezclas farmacéuticas.

Es de destacar la determinación de una mezcla binaria muy utilizada en la terapia de la enfermedad de Parkinson como es *levodopa-benserazida* resuelta recientemente por Uslu y colaboradores (53) mediante la aplicación de la espectrofotometría de primer orden en productos farmacéuticos. También es importante destacar un principio activo muy utilizado en el tratamiento de la esquizofrenia como es la *olanzapina* (54) el cual ha sido determinado por diferentes métodos analíticos entre ellos espectrofotometría de primera derivada.

*Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas*

El trabajo que presentamos ha empleado la técnica de derivada a la resolución de mezclas binarias formadas por triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico.

Los métodos optimizados se han aplicado al análisis de muestras de orina enriquecidas con los analitos de interés.

### **III.2.- RESOLUCIÓN MEDIANTE PRIMERA DERIVADA DE MEZCLAS BINARIAS DE TRIAMTERENO-ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO-ÁCIDO FOLÍNICO.**

De los estudios previos realizados referentes a los espectros de absorción de disoluciones de triamtereno, metotrexato y ácido folínico (leucovorin) podemos concluir la gran semejanza existente entre los espectros de metotrexato y de ácido folínico cuyas longitudes de onda de máxima absorción son muy parecidas. Sin embargo existe una mayor diferencia entre los espectros de triamtereno y ácido folínico.

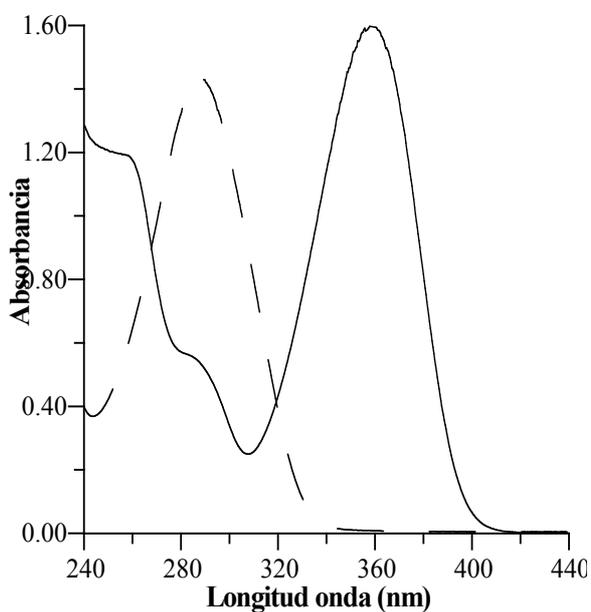
Esto nos ha llevado a estudiar las condiciones óptimas que nos permitan proponer métodos, mediante espectrofotometría UV-Visible, para determinar ácido folínico en presencia de cualquiera de los otros dos compuestos, ya que se administran conjuntamente en diferentes tratamientos médicos.

En primer lugar se han registrado los espectros de absorción de estos tres compuestos en medio acuoso entre 240 y 440 nm. En las Figuras III.3 y III.4 se muestran los espectros de absorción para ácido folínico y triamtereno y, ácido folínico y metotrexato, respectivamente. En ellos se observa que, es posible llevar a cabo la determinación de triamtereno en presencia de ácido folínico ya que existe un intervalo de

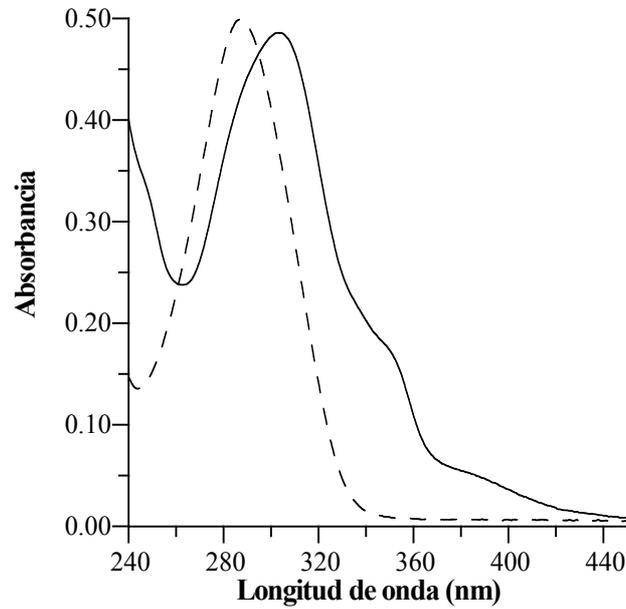
longitudes de onda donde absorbe el primero sin interferencia del segundo.

Sin embargo para determinar ácido folínico (en presencia de triamtereno), o para determinar simultáneamente ácido folínico y metotrexato previsiblemente se podrá recurrir a la espectrofotometría de derivadas.

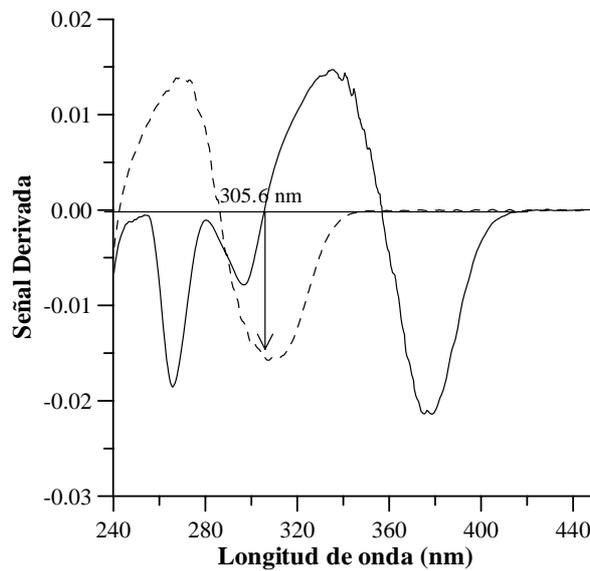
Antes de comenzar con el estudio de las variables instrumentales, a modo de observación previa, se obtuvieron los espectros derivados de primer orden de las disoluciones anteriores. Estos espectros aparecen en las Figuras III.5 y III.6.



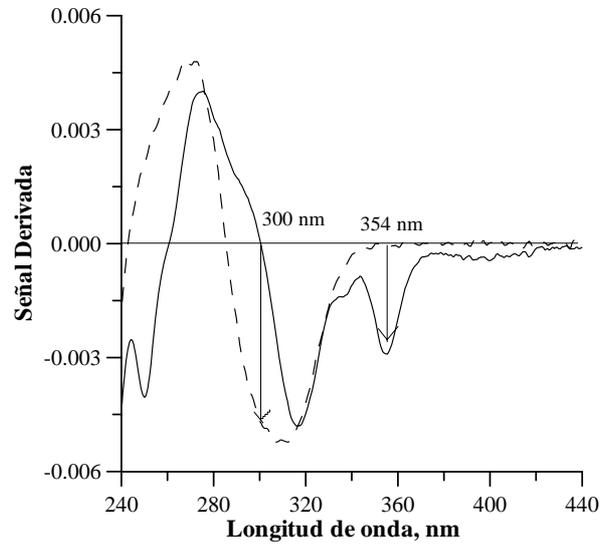
**Figura III.3** .- Espectros de absorción de triamtereno (—) ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) y de ácido folínico (----) ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**Figura III.4 .-** Espectros de absorción de disoluciones de metotrexato (—) ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y de ácido folínico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) (----)



**Figura III.5 .-** Espectros derivados de primer orden de triamtereno (—) y de ácido folínico (----)

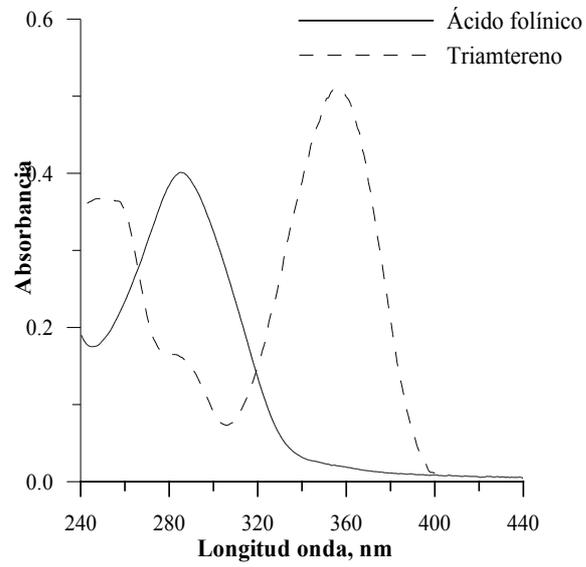


**Figura III.6** .-Espectros derivados de primer orden de metotrexato (—) y de ácido fólico (----)

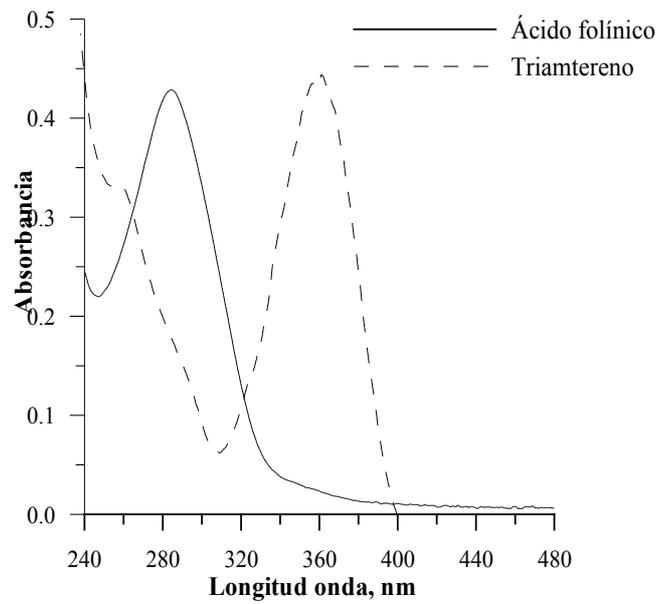
### III.2.1 .- Influencia del pH

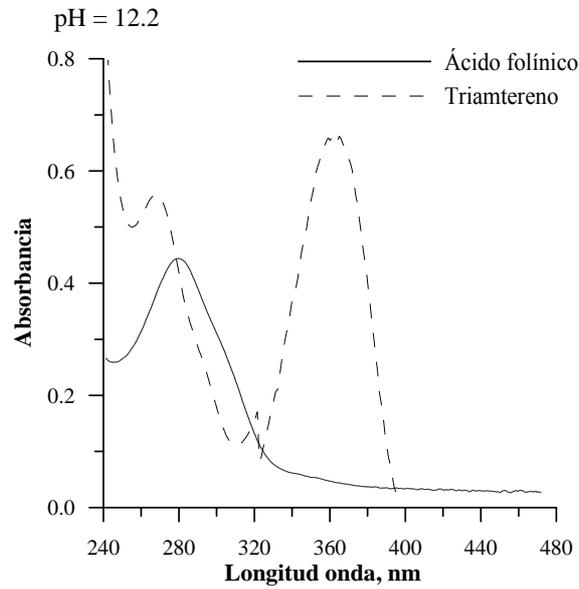
Con objeto de seleccionar el pH al cual se observen las mayores diferencias en los espectros de absorción, para resolver la mezcla triamtereno - ácido fólico, se han registrado espectros de disoluciones de ácido fólico y de triamtereno a diferentes pH. Algunos de estos espectros se recogen en la Figura III.7.

pH=3.3



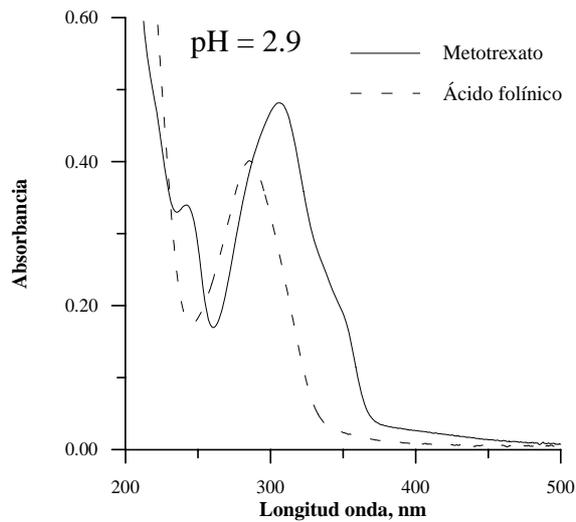
pH = 5.7

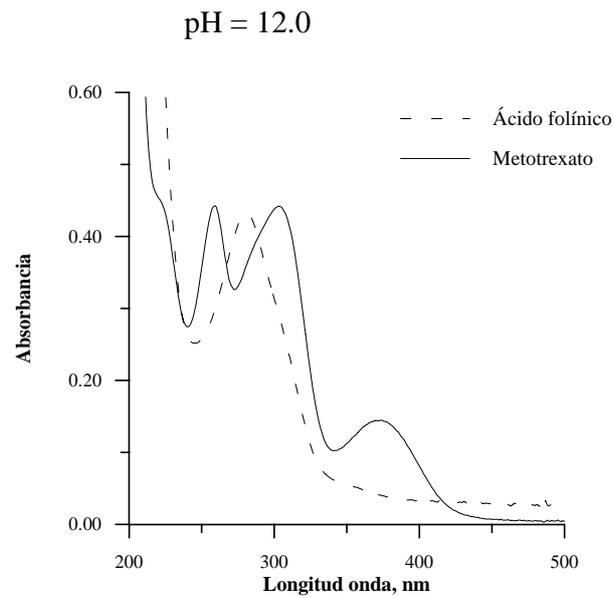
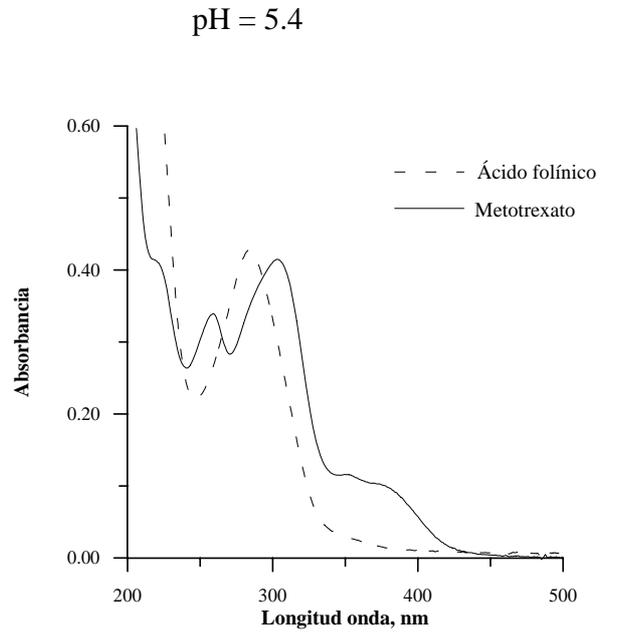




**Figura III.7** .-Espectros del ácido fólico y del triamtereno a diferente valores de pH

Un estudio similar se ha efectuado con objeto de seleccionar el pH más adecuado para resolver la mezcla de ácido fólico y metotrexato. Los espectros a diferentes pH, se recogen en la Figura III.8.





**Figura III.8** .- Espectros de absorción del ácido folínico y del metotrexato a diferentes pH.

Podemos observar que para ácido fólico y triamtereno no se observan diferencias notables a los distintos pH ensayados. Sin embargo, en el caso de ácido fólico y metotrexato, las diferencias espectrales son mayores a partir de pH ligeramente ácidos, y en medio básico.

Evitando la utilización de medios básicos que pueden inducir inestabilidad en los derivados pteridínicos, se elige como óptimo un pH 5.0 para llevar a cabo los posteriores estudios. Dicho medio se fijará con tampón HAc / NaAc.

### **III.2.2 .- Selección de las condiciones instrumentales**

Las variables instrumentales vienen determinadas por el tipo de espectrofotómetro utilizado y por la forma de obtener la derivada. En nuestro caso se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-50, conectado a un ordenador PC-286, equipado con el programa *Data Leader* para el tratamiento de datos. Este programa permite filtrar los espectros de absorción a través de diferente número de puntos experimentales y obtener los espectros derivados con diferentes )8.

Para estudiar la influencia de estos parámetros instrumentales se irá variando uno de ellos mientras se mantienen fijos los demás.

#### **III.2.2.1.- Influencia del filtrado**

Un inconveniente de la técnica de derivada es que la relación entre la señal y el ruido de fondo disminuye progresivamente a medida que aumenta el orden de la derivada. Una forma de minimizar el ruido es filtrar los espectros utilizando el método de Savitzky y Golay en una operación que el programa utilizado permite realizar.

Para seleccionar el grado de filtración de los espectros, se prepararon muestras en matraces de 25.0 mL, conteniendo: diferentes cantidades dependiendo del analito, 5.0 mL de disolución reguladora HAc/NaAc de pH 5.0 y agua desionizada hasta enrase. Se registraron los espectros de absorción entre 240 y 440 nm frente a un blanco de disolución reguladora.

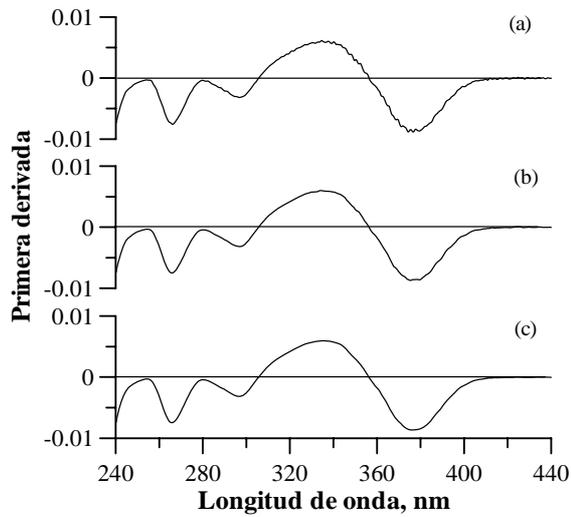
Estos espectros se filtraron a través de diferente número de puntos experimentales y de cada uno de los espectros filtrados se obtuvo la primera derivada con un  $\Delta x$  de 11 nm.

En la Figura III.9, se muestran algunos de los espectros de primera derivada de los tres compuestos en estudio, obtenidos con diferente número de puntos experimentales y comprobamos que los resultados son similares para todos los compuestos. Se observa que aunque las señales analíticas no varían de forma apreciable a medida que aumenta el número de puntos experimentales utilizados para la filtración, el ruido que presentan los espectros derivados disminuye. Por lo tanto, en sucesivas experiencias se filtraran previamente

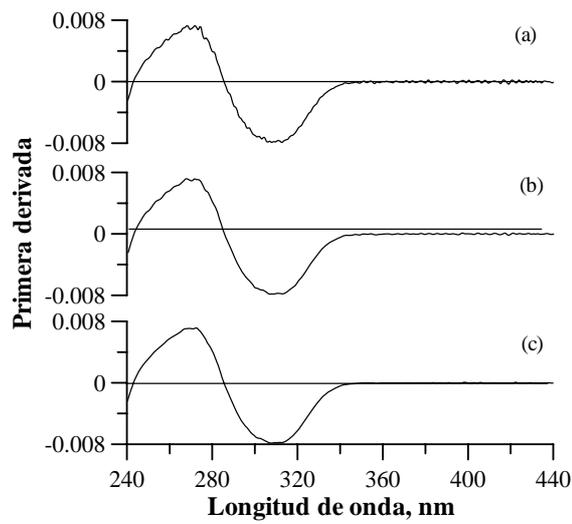
Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas

los espectros a través de 13 puntos experimentales y a partir de ellos se obtendrá los espectros de primera derivada.

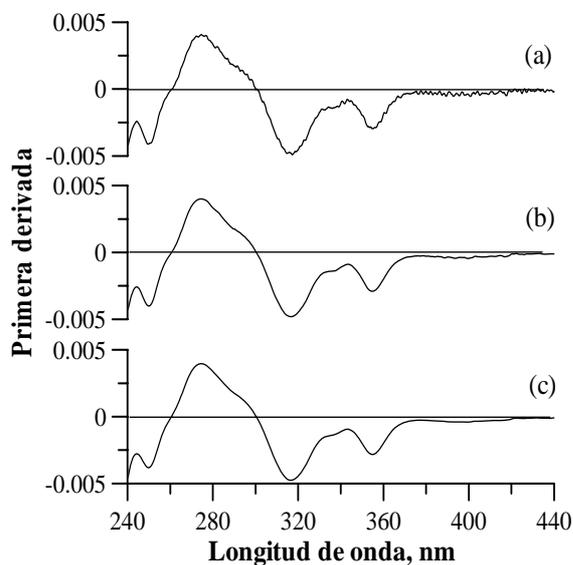
I)



II)



III)



**Figura III.9** .-Espectros derivados de primer orden ( $\delta = 11 \text{ nm}$ ) obtenidos a partir de un espectro de triamtereno (I), 8 ppm; ácido folínico (II), 15 ppm y metotrexato (III), 10 ppm y filtrados a través: (a) de 5 puntos experimentales, (b) de 13 puntos experimentales y (c) de 21 puntos experimentales.

#### III.2.2.2.- Influencia del $\delta$

Para optimizar esta variable se han obtenido los espectros derivados, filtrados a través de 13 puntos experimentales y variando sistemáticamente el valor de  $\delta$ .

En la Figura III.10 se muestran los espectros derivados de primer orden, obtenidos con diferentes valores de  $\delta$ . Se observa que estos espectros no

presentan variación en su forma, aunque a determinadas longitudes de onda se pierde algo de sensibilidad al aumentar el  $\Delta\lambda$ . Sin embargo esta pérdida de sensibilidad es muy poco importante en la zona de longitudes de onda que nos interesa. Además el ruido que presentan estos espectros derivados es mayor cuando la derivada se obtiene con pequeños valores de  $\Delta\lambda$ . Por esta razón hemos elegido un  $\Delta\lambda = 11 \text{ nm}$  para posteriores experiencias, pues con este valor el ruido desaparece sin que tengamos una pérdida apreciable de sensibilidad a la longitud de onda que nos interesa.

### **III.2.3 .- Selección de las longitudes de onda de medida**

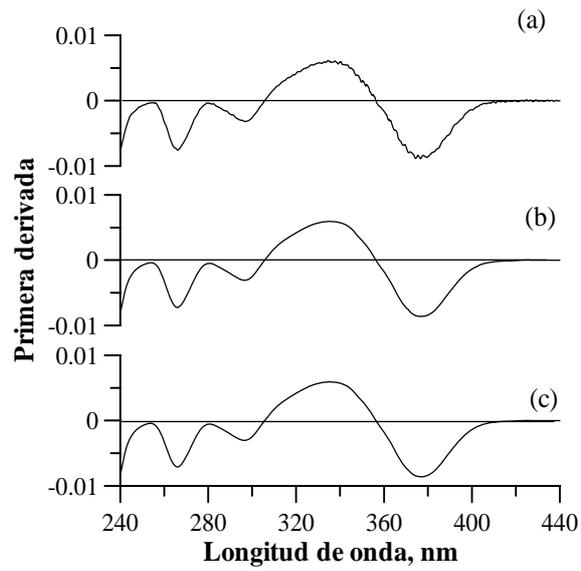
Con el fin de seleccionar las longitudes de onda más adecuadas para la determinación conjunta de triamtereno y ácido folínico y de metotrexato y ácido folínico, se registran los espectros independientes de disoluciones acuosas de pH 5.0 de triamtereno, de ácido folínico y de metotrexato.

Se filtran los espectros a través de 13 puntos experimentales y se obtuvieron los espectros derivados de primer orden con un  $\Delta\lambda = 11 \text{ nm}$ .

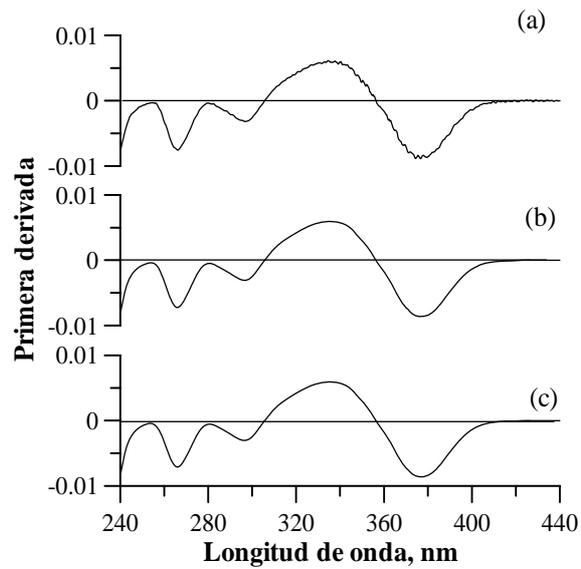
En la Figura III.11A se representan los espectros de absorción de la mezcla triamtereno-ácido folínico. Como puede observarse, el triamtereno presenta un máximo de absorción a 357 nm, longitud de onda a la

cual el ácido fólnico no presenta absorción, esto nos va a permitir determinar triamtereno en presencia de ácido fólnico midiendo directamente en su máximo de absorción.

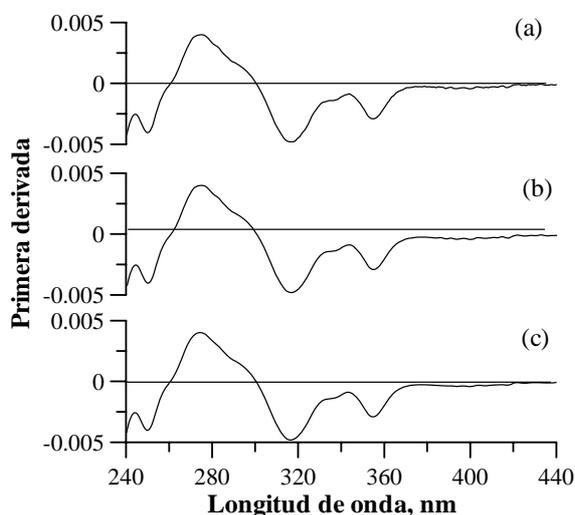
I)



II)



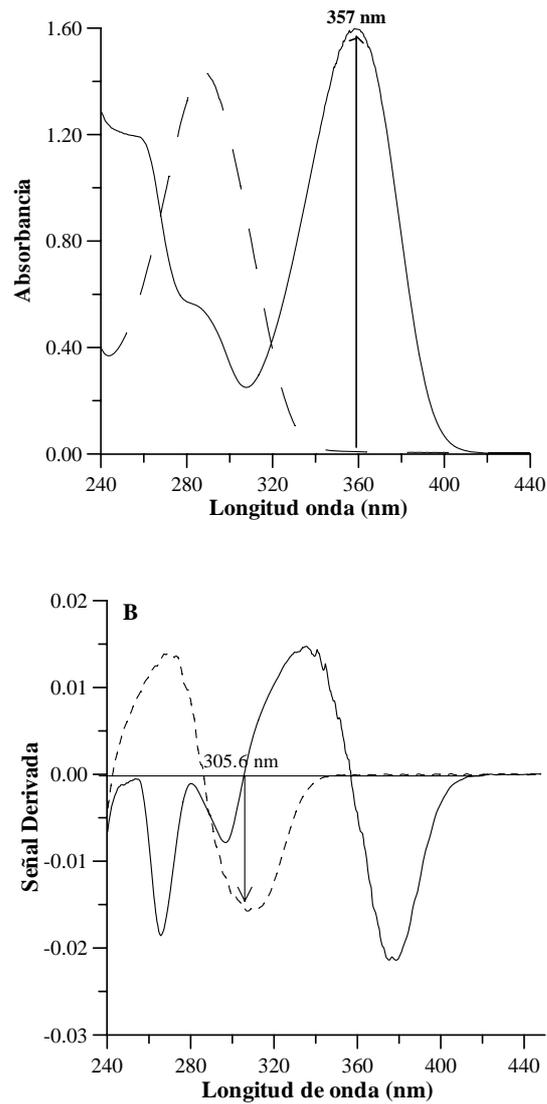
III)



**Figura III.10** .-Espectros derivados de primer orden obtenidos a partir de un espectro de triamtereno (I), 8 ppm; ácido folínico (II), 15 ppm y metotrexato (III), 10 ppm y filtrados a través de 13 puntos experimentales: (a) con  $\delta = 5$  nm, (b) con  $\delta = 11$  nm y (c) con  $\delta = 21$  nm.

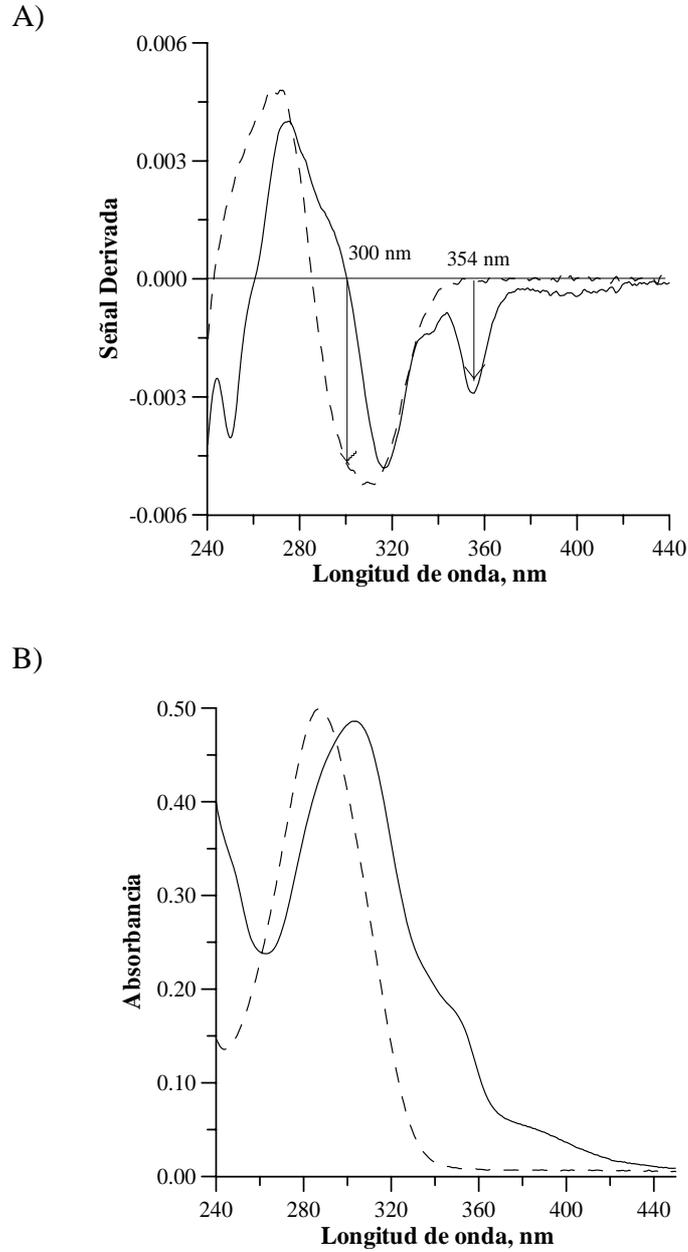
Sin embargo, el ácido folínico no puede determinarse en presencia de triamtereno puesto que no existe ninguna zona del espectro donde no se produzca interferencia. Para intentar solventar este problema, registramos la primera derivada de los espectros de ambos analitos y se representan en la Figura III.11B. Podemos observar, que existe una longitud de onda, a 305.6 nm, donde el triamtereno no presenta señal, por tanto, a esta longitud de onda podremos determinar el ácido folínico en presencia de triamtereno.

Para posteriores experiencias elegimos como longitudes de onda de medida, para la determinación de triamtereno, la absorbancia a 357 nm y para la determinación de ácido folínico la señal de la primera derivada a 305.6 nm, midiendo la amplitud de la misma.



**Figura III.11** .- (A) Espectros de absorción y (B) espectros derivados de primer orden de disoluciones de triamtereno (—) y ácido folínico(----).

En cuanto a la resolución de la mezcla metotrexato-ácido fólico, tal como se observa en Figura III.12A, los espectros de absorción de ambos compuestos están muy solapados por lo que no es posible su determinación conjunta en el espectro de orden 0. Para intentar resolver esta mezcla, registramos los espectros derivados de primer orden, con las variables instrumentales previamente optimizadas, Figura III.12B. En esta figura se observa que utilizando la técnica del zero-crossing se pueden determinar los dos compuestos ya que existen dos longitudes de onda donde se anula la señal de alguno de los compuestos y no la del otro. Así a 300 nm, se anula la señal debida al metotrexato, por lo que a esta longitud de onda podemos determinar el ácido fólico. Por contra, la señal de este último se anula a 354 nm, longitud de onda que nos permite poder determinar el metotrexato.



**Figura III.12** .- (A) Espectros de absorción y (B) espectros derivados de primer orden de disoluciones de ácido folínico (----) y metotrexato (—).

### **III.2.4.-Influencia de la concentración. Calibración lineal univariante. Parámetros analíticos.**

Una vez establecidas las condiciones químicas e instrumentales para la determinación de estos compuestos y de sus mezclas por espectrofotometría de derivadas, se realizó el siguiente estudio con objeto de comprobar si existe una buena relación lineal entre las concentraciones de analito y las señales previamente seleccionadas.

Para ello preparamos patrones, en matraces de 25.0 mL, que contenían:

- Cantidades variables de disolución patrón de triamtereno, comprendidas entre 2 y 16 mg L<sup>-1</sup>, de ácido folínico comprendidas entre 5 y 30 mg L<sup>-1</sup> o de metotrexato, comprendidas entre 2 y 10 mg L<sup>-1</sup>.
- 5.0 mL de disolución reguladora ácido acético/acetato sódico de pH 5,0 y 0,5 M
- Agua desionizada hasta completar los 25.0 mL

Se registran los espectros de absorción de estas disoluciones frente a un blanco de disolución reguladora.

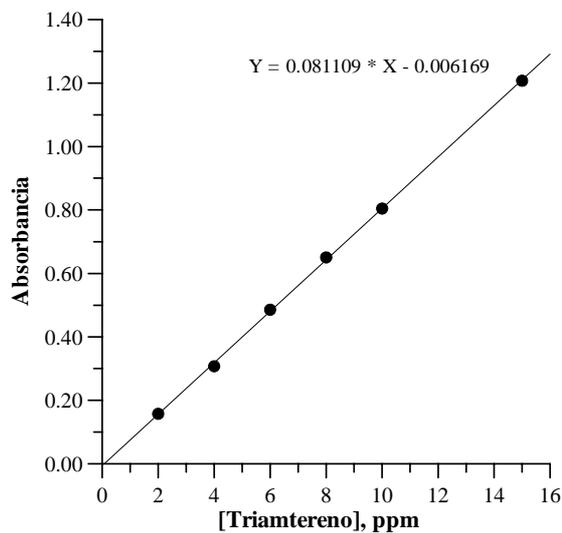
La determinación de triamtereno se lleva a cabo directamente en los espectros de absorción midiendo su absorbancia a 357 nm. Para determinar el ácido folínico en presencia de triamtereno, es necesario filtrar los espectros a través de 13 puntos experimentales y

obtener los espectros derivados de primer orden con  $\delta = 11$  nm, midiéndose la señal a 305.6 nm.

La determinación de ácido fólico en presencia de metotrexato, implica el tener que medir la señal de los espectros derivados, en las mismas condiciones anteriores, a 300 nm. La determinación de metotrexato, en presencia de ácido fólico, se realiza midiendo la amplitud de la derivada a 354 nm.

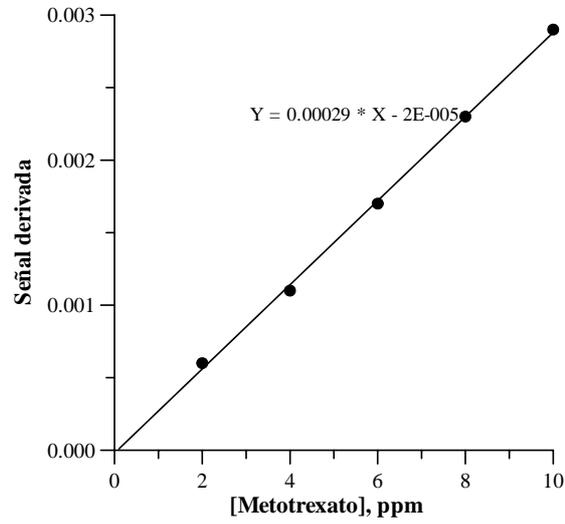
Las rectas de calibrado obtenidas se representan en la Figura III.13 y en todos los casos se observa una buena linealidad, tal como se pone de manifiesto en los datos recogidos en la Tabla III.1, donde además se presentan los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de regresión de las rectas.

$$\lambda = 357 \text{ nm}$$

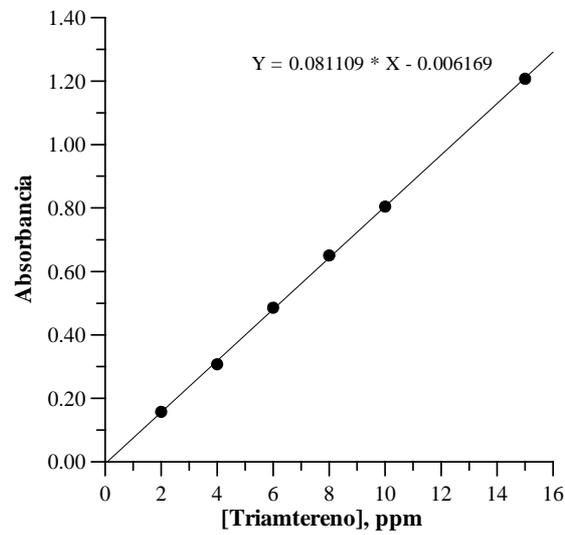


Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas

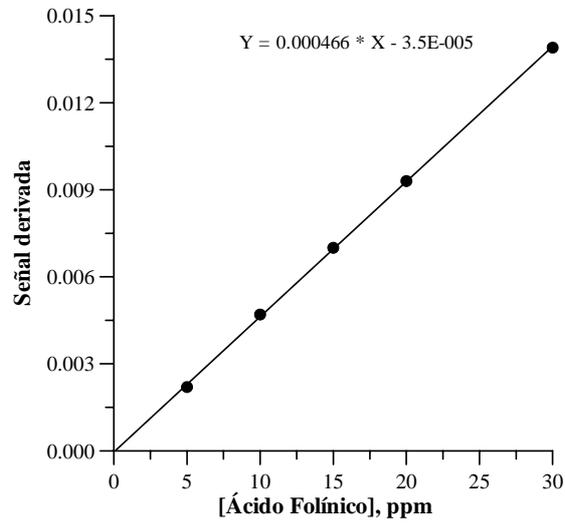
$\lambda = 305.6 \text{ nm}$



$\lambda = 354 \text{ nm}$



$\lambda = 300 \text{ nm}$



**Figura III.13 .-** Rectas de calibrado de triamtereno, ácido fólico y metotrexato a las longitudes de onda seleccionadas para la resolución de las mezclas.

**Tabla III.1 .- Parámetros analíticos correspondientes a la calibración de ácido folínico - triamtereno y ácido folínico - metotrexato.**

	Triamtereno $\lambda = 357 \text{ nm}$	Ácido folínico $^1D_{305.6}$ (TRI)	Ácido Folínico $^1D_{300}$ (MTX)	Metotrexato $^1D_{354}$
Rango de linealidad ( $\text{mg L}^{-1}$ )	2.0 - 16.0	5.0 - 30.0	5.0 - 30.0	2.0 - 10.0
Ecuación de la recta	$Y = 8.11 \times 10^{-2} X - 6.17 \times 10^{-3}$	$Y = 5.07 \times 10^{-4} X + 4.32 \times 10^{-5}$	$Y = 4.66 \times 10^{-4} X - 3.50 \times 10^{-5}$	$Y = 2.90 \times 10^{-4} X - 2.00 \times 10^{-5}$
$\sigma$ pendiente	$7.14 \times 10^{-4}$	$5.39 \times 10^{-6}$	$4.13 \times 10^{-6}$	$5.77 \times 10^{-6}$
$\sigma$ orden. origen	$6.15 \times 10^{-3}$	$9.79 \times 10^{-5}$	$7.49 \times 10^{-5}$	$3.83 \times 10^{-5}$
$\sigma$ típica estimada	$7.40 \times 10^{-3}$	$1.04 \times 10^{-4}$	$7.94 \times 10^{-5}$	$3.65 \times 10^{-5}$
Coefficiente de regresión	0.9997	0.9996	0.9998	0.9989
LD (Winerfordner y Long) $\text{mg L}^{-1}$	0.227	0.579	0.483	0.396
LD (Clayton, $\alpha = \beta = 0.05$ ) $\text{mg L}^{-1}$	0.482	1.257	1.044	0.813
$s_B$	$4.96 \times 10^{-3}$	$4.83 \times 10^{-5}$	$8.23 \times 10^{-5}$	$1.47 \times 10^{-4}$
% Error	0.43	0.71	1.37	0.60
Sensibilidad analítica <sup>1</sup>	0.09	0.20	0.17	0.13

1.- Definido según referencia 55

En la Tabla III.1 también se recogen los valores relativos a la desviación estándar encontrados al

examinar la repetitividad de los métodos descritos, que se realizó preparando, en matraces de 25.0 mL tres series de muestras independientes conteniendo  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de triamtereno,  $9 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido folínico y  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de metotrexato respectivamente.

### **III.3.-RESOLUCIÓN DE MEZCLAS DE TRIAMTERENO - ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO - ÁCIDO FOLÍNICO**

Una vez establecidas las condiciones para la resolución de mezclas binarias de triamtereno y ácido folínico y de metotrexato y ácido folínico, se procedió al análisis de muestras binarias preparando disoluciones que contengan cantidades diferentes de ambos compuestos en el intervalo de concentraciones establecido.

Para ello se preparan, en matraces de 25.0 mL, muestras independientes que contienen:

- Cantidades de triamtereno y ácido folínico y metotrexato y ácido folínico en diferentes proporciones.
- 5.0 mL de disolución reguladora HAc/AcNa, de pH 5.0
- Agua desionizada hasta completar los 25.0 mL.

Se registran los espectros de absorción de dichas muestras entre 240 y 440 nm, se filtran a través de 13 puntos experimentales y se obtiene el espectro derivada de primer orden, ( $\Delta = 11 \text{ nm}$ ).

La determinación de triamtereno se ha llevado a cabo directamente en los espectros de absorción midiendo a 357 nm y la determinación de ácido folínico, en esta mezcla, se realiza en los espectros derivados midiendo la señal a 305.6 nm. Los diferentes valores obtenidos se sustituyen en las correspondientes ecuaciones de las rectas de calibrado. La composición de las muestras y los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla III.2.

La resolución de la mezcla metotrexato-ácido folínico, se realiza midiendo las señales en los espectros derivados a 354 nm y a 300 nm, para la determinación de metotrexato y ácido folínico respectivamente. Con los resultados obtenidos en cada caso y con las rectas de calibrado obtenidas, se calculan las concentraciones respectivas. La composición de las muestras y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.3.

Para la mezcla triamtereno y ácido folínico los porcentajes de recuperación fueron 97-110 y 95-100 %, respectivamente.

En el caso de metotrexato y ácido folínico oscilaron entre 93-102 y 92-99%, respectivamente. Se pueden considerar como resultados satisfactorios para ambas determinaciones.

**Tabla III.2 .-** Determinación de triamtereno y de ácido folínico en sus mezclas sintéticas

Relación (p/p) TRI: LV	Puesto, mg L <sup>-1</sup>		Encontrado, mg L <sup>-1</sup>		% Recuperación	
	TRI	Lv	TRI	Lv	TRI	Lv
5	10	2	9.91	1.90	<b>99.1</b>	<b>95.0</b>
2	10	5	9.99	4.84	<b>99.9</b>	<b>96.8</b>
1	10	10	10.20	9.77	<b>102.0</b>	<b>97.7</b>
0.66	10	15	10.02	14.9	<b>100.2</b>	<b>99.3</b>
0.5	10	20	11.02	19.8	<b>110.2</b>	<b>99.1</b>
1.25	10	8	10.01	8.00	<b>100.1</b>	<b>100.0</b>
0.2	2	10	2.08	9.57	<b>104.0</b>	<b>95.7</b>
0.5	5	10	5.14	9.57	<b>102.8</b>	<b>95.7</b>
1.8	18	10	17.76	9.97	<b>98.7</b>	<b>99.7</b>
1.2	12	10	11.68	9.97	<b>97.3</b>	<b>99.7</b>

**Tabla III.3 .-** Determinación de metotrexato y ácido folínico en sus mezclas sintéticas

Relación (p/p) MTX: LV	Puesto, mg L <sup>-1</sup>		Encontrado, mg L <sup>-1</sup>		% Recuperación	
	MTX	LV	MTX	LV	MTX	LV
1	10	10	9.72	9.73	<b>97.2</b>	<b>97.3</b>
0.8	10	12	9.72	11.45	<b>97.2</b>	<b>95.4</b>
0.7	10	14	9.72	13.81	<b>97.2</b>	<b>98.6</b>
0.62	10	16	10.06	15.74	<b>100.6</b>	<b>98.4</b>
0.55	10	18	9.72	17.24	<b>97.2</b>	<b>95.8</b>
0.50	10	20	9.72	19.39	<b>97.2</b>	<b>96.9</b>
0.2	2	10	2.14	9.73	<b>107.0</b>	<b>97.3</b>
0.4	4	10	3.86	9.73	<b>96.5</b>	<b>97.3</b>
2.25	18	8	16.73	7.36	<b>93.0</b>	<b>92.0</b>
4.0	20	5	18.62	4.29	<b>93.1</b>	<b>95.6</b>
3.33	10	3	9.78	2.86	<b>97.8</b>	<b>95.3</b>
1.12	9	8	9.15	7.56	<b>101.6</b>	<b>94.5</b>
2	10	5	9.78	4.70	<b>97.8</b>	<b>94.0</b>

### **III.4.- APLICACIONES**

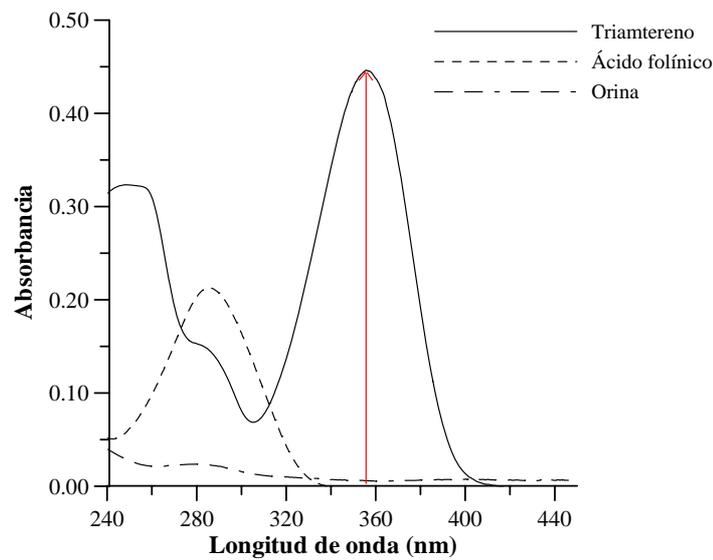
Una vez establecidos los métodos de determinación para cada uno de los compuestos se procedió a su aplicación en muestras de orina donde, en caso de administración conjunta, se van a encontrar. En el caso del triamtereno, aproximadamente entre un 30-70 % de la dosis oral, va a ser excretada a través de la orina. El metotrexato, se administra por vía oral en elevadas concentraciones con objeto de aumentar su actividad antineoplásica, lo que conlleva que deba ser cuidadosamente controlado. Todo esto hace que sus concentraciones en orina sean relativamente elevadas.

Para llevar a cabo la determinación de estos analitos en muestras de orina, se recogieron orinas de diez personas distintas y se reunieron con el fin de originar una única muestra problema. Esta orina se contamina con diferentes cantidades de los analitos en estudio. Para llevar a cabo las cuantificaciones tomamos 1.0 mL de orina y lo diluimos hasta un volumen final de 100.0 mL. A partir de esta disolución de orina, tomamos 0.5 mL y la sometemos al procedimiento general establecido.

Se registra el espectro de absorción de una muestra de orina diluida en las mismas condiciones y se compara con los espectros de disoluciones de ácido folínico y triamtereno, Figura III.14. Se observa, que la orina no presenta señal a la longitud de onda a la cual

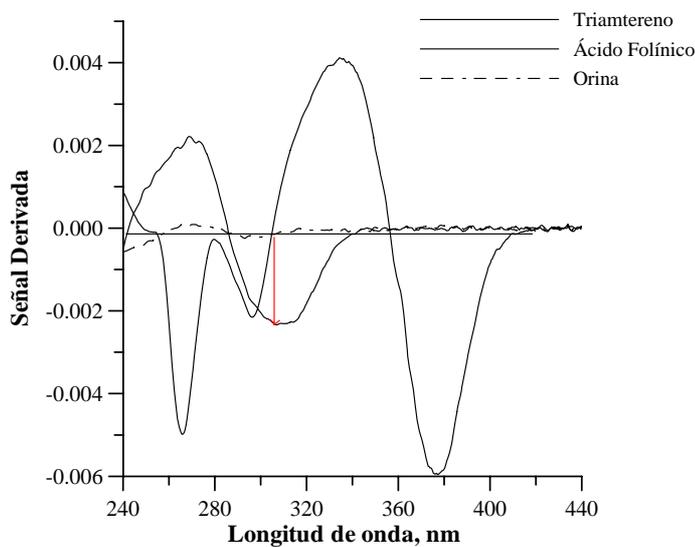
determinamos el triamtereno, 357 nm y que en la zona de absorción del ácido folínico (240-320 nm) se observa una señal debida a la orina.

Cuando se representa el espectro primera derivada, Figura III.15 se elimina la señal que origina la orina y vemos como también es posible determinar el ácido folínico en presencia de orina a una  $\lambda = 305.6$  nm, utilizando la señal de primera derivada.



**Figura III.14 .-** Espectro de absorción de muestras de orina, triamtereno y ácido folínico

Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas



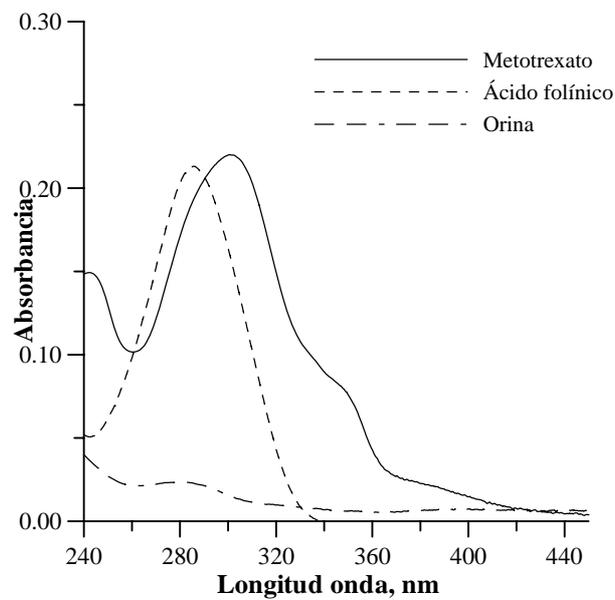
**Figura III.15** .- Espectro derivado de orina, ácido fólnico y triamtereno

Para la determinación de ácido fólnico y de metotrexato en orina, registramos en primer lugar los espectros de absorción, Figura III.16 y podemos observar como la orina presenta señal en el mismo intervalo de longitudes de onda que los analitos en estudio. Esta señal de la matriz de la muestra se disminuye al realizar la primera derivada de los espectros, Figura III.17, lo que nos permite la cuantificación de ácido fólnico y metotrexato a las longitudes de onda previamente seleccionadas, utilizando la técnica del zero-crossing.

A continuación se preparan diferentes muestras de orina a las que se adicionan diferentes cantidades de los analitos en estudio. Los resultados obtenidos referentes a las mezclas ácido fólnico - triamtereno y ácido

folínico - metotrexato, se recogen en las Tablas III.4 y III.5, y se han representado en forma de diagramas de barras, Figuras III.18 y III.19 donde se observa que las recuperaciones oscilan, en todos los casos, entre el 95 y el 101%.

De todo lo anterior, podemos concluir la posibilidad de llevar a cabo la determinación simultánea de metotrexato, triamtereno y ácido folínico en muestras de orina.



**Figura III.16** .- Espectro de absorción de metotrexato, ácido folínico y orina.

Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas

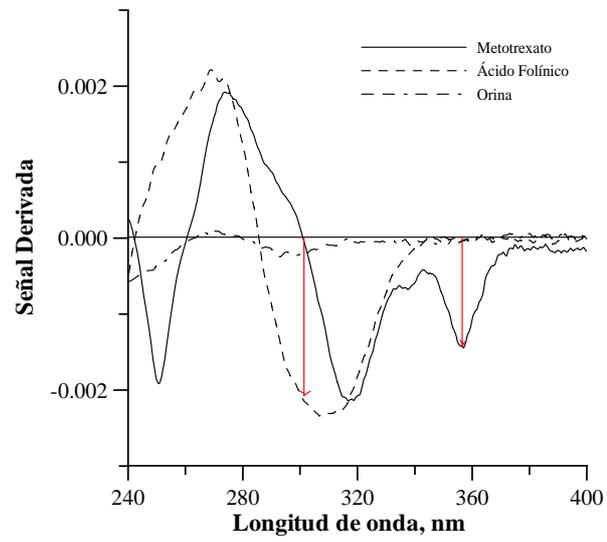
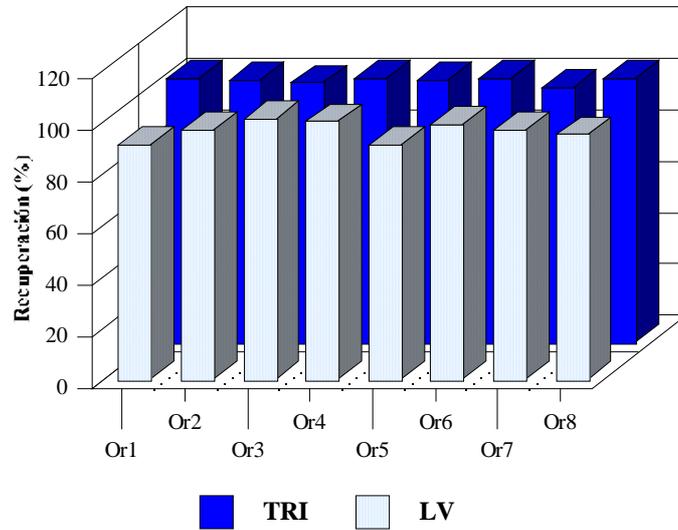


Figura III.17 .- Espectros derivados de primer orden de metotrexato, fólico y orina.

**Tabla III.4 .-**Recuperaciones de triamtereno y de ácido folínico en orina enriquecida, mediante espectrofotometría y espectrofotometría derivada de primer orden.

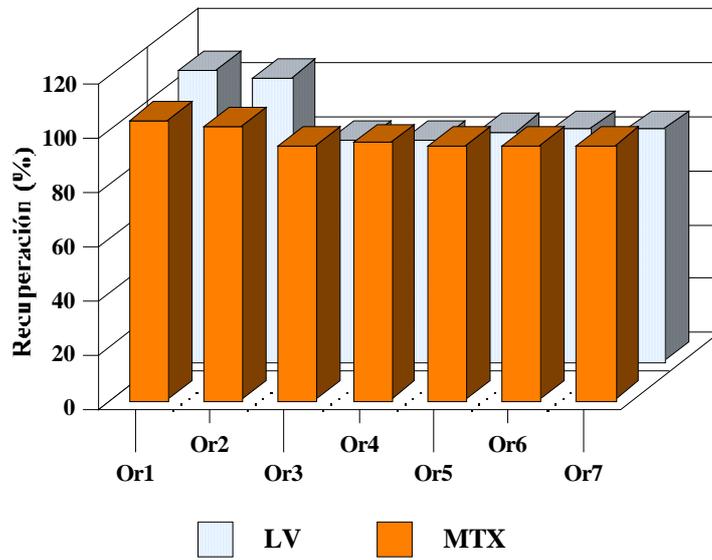
Añadido, mg L <sup>-1</sup>		Encontrado, mg L <sup>-1</sup>			
TRI	LV	TRI	% Rec.	LV	% Rec.
10	5	10.27	<b>102.7</b>	4.55	<b>91.0</b>
10	10	10.19	<b>101.9</b>	9.74	<b>97.4</b>
10	15	10.12	<b>101.2</b>	15.13	<b>100.8</b>
10	20	10.30	<b>103.0</b>	19.90	<b>99.5</b>
10	8	10.17	<b>101.7</b>	7.25	<b>90.6</b>
5	10	5.17	<b>103.4</b>	9.94	<b>99.4</b>
18	10	17.73	<b>98.5</b>	9.74	<b>97.4</b>
12	10	12.38	<b>103.2</b>	9.53	<b>95.3</b>



**Figura III.18 .-** Diagrama de barras correspondiente a las recuperaciones obtenidos en la determinación simultanea de triamtereno y ácido fólnico en muestras de orina

**Tabla III.5 .-** Recuperaciones de metotrexato y de ácido fólnico en orina, mediante espectrofotometría derivada de primer orden.

Añadido, mg L <sup>-1</sup>		Encontrado, mg L <sup>-1</sup>			
MTX	LV	MTX	% Rec.	LV	% Rec.
5	20	5.41	<b>108.2</b>	20.6	<b>103.0</b>
10	15	10.46	<b>104.6</b>	15.13	<b>100.8</b>
5	10	4.10	<b>82.0</b>	9.40	<b>94.0</b>
5	8	4.10	<b>82.0</b>	7.56	<b>95.0</b>
10	10	8.52	<b>85.2</b>	9.40	<b>94.0</b>
7	10	6.00	<b>85.7</b>	9.40	<b>94.0</b>
15	5	12.94	<b>86.3</b>	4.70	<b>94.0</b>



*Figura III.19 .- Diagrama de barras correspondiente a los valores de recuperación obtenidos en la determinación simultánea de metotrexato y ácido folínico en orina.*

### III.5.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dymond, E. G. Proc. Cambridge, *Phil. Soc.*, **22**, 405-408 (1924)
- 2.- Morrison, J. D., *J. Chem. Phys.*, **21**, 1767-1772 (1953)
- 3.- Martin, A. E., *Spectrochim. Acta*; **14**, 97 (1959)
- 4.- O'Haver, T.C.; *Anal. Proc.*; **19**, 22 (1982)
- 5.- Butler, W.L., *Methods Enzymol*, **56**, 501 (1979)
- 6.- Talsky, G., Mayring, L. y Krenzer, H., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*; **17**, 785 (1978)
- 7.- Cahill, J.E., *Am. Lab.*; **11**, 79 (1979)
- 8.- Gans, P., *Anal. Proc.*; **19**, 33 (1982)
- 9.- Savitzky, A. y Golay, M.J.E., *Anal. Chem.*; **36**, 1627 (1964)
- 10.- Steiner, J., Termonia, Y. y Deltour, J., *Anal. Chem.*; **44**, 1906 (1972)
- 11.- Gans, P., Gill, J.B., Griffin, M. y Cahill, P.C., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*; 968 (1981)
- 12.- Cottrell, C. T., *Anal. Proc.*; **19**, 43 (1983)
- 13.- O'Haver, T.C. y Green, G.L., *Int. Lab.*; **6** (5), 11 (1975)
- 14.- Talsky, G., Mayring, H. y Krenzer, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **17**, 783 (1978)
- 15.- Gunders, E. y Kaplan, B., *J. Opt. Soc. Am.*; **55**, 1094 (1965)
- 16.- Morelli, B., *Analyst*, 113, 1077 (1988)
- 17.- O'Haver, T.C., *Clin. Chem.*; **25**, 1548 (1979)
- 18.- Salinas, F., Berzas Nevado, J.J. y Espinosa Mansilla, A., *Talanta*, **37**, 347 (1990)

*Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas*

- 19.- O'Haver, T.C. y Begley, T., *Anal. Chem.*; **53**, 1876 (1981)
- 20.- O'Haver, T.C. y Green, G.L., *Anal. Chem.*; **48**, 312 (1976)
- 21.- Fell, A. F. y Smith, G., *Anal. Proc.*, **19**, 28 (1982)
- 22.- Y. Ren, Z. Lin y H.Zhou., *Fenxi Huaxue.*; **13**, 6 (1985)
- 23.- Kucher, A.A., Powektov, N.S., Mishchenko, V.T. y Alesandrova, N.N., *Zavodske. Lab.*; 49, n°10, 11 (1983)
- 24.- Spitsyn, P.K. y L'vov, O.N., *Zh. Anal. Khim.*; **40** (7), 1241 (1985)
- 25.- Ren, Y y Tong, Y., *Yingyong Huaxue.*; **2**, 12 (1985); *Chem. Abstr.*; 104, 81062n (1986)
- 26.-Toral, M.I., Richter, P., Silva,\_L. y Salinas, A., *Microchem. J.* **48** (2), 221 (1993)
- 27.- Pal, T. y Jana, N.R., *Talanta* **40** (10), 1519 (1993)
- 28.- Ferreira, S.L.C., Leite, N.O., Dantas, A.F., De\_Andrade, J.B. y Spinola\_Costa, A.C., *Talanta* **41** (10), 1631 (1994)
- 29.- Ferreira,S.L.C. y Nano, R.M.W., *Talanta* **41** (11), 1937 (1994)
- 30.- Pérez Iglesias, J.; Seco Lago, H.; Fernández Solís, J.; Castro Romero, J. y González Rodríguez, V., *Ann. Chim.* **88** (7\_8), 597 (1998)
- 31.- Reddy, K.H. y Chandrasekhar, K.B., *Indian J. Chem. (Inorg. Bio. Inorg. Phys.)* **40A** (7), 727 (2001)
- 32.- Cui, S.R. y Liu, C.N., *Fenxi Shiyanshi*, **13** (1), 72 (1994)

- 33.- El Sayed, A.Y., Hussein, Y.Z. y Mohammed, M.A., *Analyst* **126 (10)**, 1810 (2001)
- 34.- El Sayed, A.Y., Hussein, Y.Z. y Mohammed, M.A., *Anal. Sci.*;. **17 (12)**, 1461 (2001)
- 35.- Campins Falco, P., Sevillano Cabeza, A. y Molins Legua, C., *Anal-Lett.* **27 (3)**, 531 (1994)
- 36.- Panderi, I. y Parissi Poulou, M., *J. Pharm.Biomed.Anal.* **12 (2)**, 151 (1994)
- 37.- Toral, M.I., Richter, P., Araya, E. y Fuentes, S., *Anal-Lett.* **29 (15)**, 2679 (1996)
- 38.- Dimitrovska, A., Trajkovic Jolevska, S.y Stojanoski, K., *Anal. Lab.* **7 (1)**, 32 (1998)
- 39.- Houeto, P., Buneaux, F., Galliot Guilley, M., Baud, F.J. y Levillain, P., *J. Anal. Toxicol.* **18 (3)** 154 (1994)
- 40.- Klopas, A., Panderi, I. y Parissi Poulou, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17 (3)** 515 (1998)
- 41.- Murillo, J.A., Lemus, J.M. y García, L.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13 (6)** 769 (1995)
- 42.- Murillo, J.A., Lemus, J.M. y García, L.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14 (3)** 257 (1996)
- 43.- El-Gindy, A., El-Walily, A.F.M. y Bedair, M.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23 (2-3)** 341 (2000)
- 44.- Hassouna, M.E.M., *Anal-Lett.* **30 (13)** 2341 (1997)
- 45.- Benetton, S.A., Kedor Hackmann, E.R.M., Santoro, M.I.R.M. y Borges, V.M.; *Talanta* **47 (3)** 639 (1998)
- 46.- Gungor, S. y Onur, F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25 (3-4)** 511 (2001)

*Capítulo III.- Aplicación al estudio de espectrofotometría de derivadas*

- 47.- Castro, D., Moreno, M.A., Torrado, S. y Lastres, J.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21 (2)** 291 (1999)
- 48.- Archontaki, H.A., Atamian, K., Panderi, I.E. y Gikas, E.E., *Talanta* **48 (3)** 685 (1999)
- 49.- Vega, E. y Sola, N., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25 (3-4)** 523 (2001)
- 50.- Salinas, F., Berzas Nevado, J.J. y Espinosa Mansilla, A., *Analyst* **114** 1441(1989)
- 51.- Berzas Nevado, J.J., Salinas, F., De Orbe Payá, I. y Capitán, L.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9 (2)** 117 (1991)
- 52.- López Martínez, L., López de Alba, P.L., de León Rodríguez, L y Yopez Murrieta, M.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30 (1)** 77 (2002)
- 53.- Uslu, B. y Ozkan, S.A., *Anal-Lett.* **35 (2)** 303 (2002)
- 54.- Biryol, I. y Erk, N., *Anal-Lett.* **36 (11)** 2497 (2003)
- 55.- Cuadros Rodríguez, L., García Campaña, A.M., Jiménez Linares, C. y Román Ceba, M., *Anal. Lett.*, **26**, 1243, (1993)

**Capítulo IV**

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE  
TRIAMTERENO, ÁCIDO FOLÍNICO Y  
METOTREXATO MEDIANTE ANÁLISIS  
MULTIVARIANTE PLS**

## **IV.1.- INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

La implantación de la quimiometría, herramienta que utiliza las matemáticas, la estadística y otros métodos de lógica formal, es relativamente reciente, pero es tal el impacto que ha tenido entre otros, por ejemplo en el campo de la espectroscopía, que la introducción de programas quimiométricos en los laboratorios de espectroscopía se considera hoy día una herramienta básica.

El vocablo, quimiometría, fue introducido en 1971 por Svante Wold (1) y en 1997, Kowalski publica el primer libro sobre diversos procedimientos quimiométricos (2), al mismo tiempo que la revista *Analytica Chimica Acta* introduce una nueva sección dedicada a la quimiometría y que recibió el nombre de “Técnicas de Computación y Optimización”. A partir de aquí el desarrollo de estas nuevas metodologías es muy rápido y se consideran consolidadas, aunque en continua evolución, a partir de mediados de la década de los ochenta.

En general, vamos a obtener una serie de variables o medidas multivariantes, medidas en función de dos o más variables controladas, relacionadas con la composición química de las sustancias de interés y estas variables se van a relacionar con algunas propiedades de interés a través de una adecuada relación matemática. Si el número de variables es elevado y el número de

analitos es igualmente elevado, las relaciones matemáticas que permiten relacionar unas con otras pueden llegar a ser complejas y muy difíciles de manejar. Si el número de variables medidas es  $K$  y el número de objetos  $I$ , se obtienen matrices de datos de dimensiones  $I \times K$  y aplicando diversos procedimientos quimiométricos podemos extraer a partir de ellas solo la información interesante sobre las variables y los objetos.

Mediante métodos quimiométricos (3-5) es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas (6-11). Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, determina tiempos de análisis más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas.

Cuando se trata de llevar a cabo cuantificación, se relaciona la concentración con las variables medidas dando lugar a los denominados métodos de calibración multivariante, que como veremos más adelante son los de mayor aplicación en la actualidad. Una de las principales ventajas de la calibración multivariante es la minimización de la manipulación de las muestras. Los métodos univariantes requieren en la mayoría de los casos complejos procesos previos a la adquisición de la

señal que generalmente conllevan procesos de separación, con el consiguiente consumo de tiempo, posible contaminación de las muestras y en muchos casos pérdida de sensibilidad, posibilitando en la mayoría de los casos la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja. Sin embargo, la utilización de métodos de calibración multivariante posibilita el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales de forma más directa.

El gran número de monografías y trabajos sobre el tema, pone de manifiesto el especial interés que los métodos quimiométricos han suscitado en las épocas más recientes. El desarrollo de instrumentos analíticos que permiten adquirir un gran conjunto de señales en periodos cortos de tiempo, así como la popularización de la utilización de ordenadores y potentes paquetes de software han permitido el gran auge de dichos métodos de calibración.

Los métodos de calibración multivariante de mayor implantación en el análisis en la actualidad, son los siguientes:

- Aplicables a sistemas lineales:

- a) Regresión lineal múltiple (**MLR**)
- b) Análisis multicomponente clásico (Classical Least Squares, **CLS**)
- c) Regresión inversa por mínimos cuadrados (Inverse Least Squares, **ILS**)

- Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales
  - a) Regresión por componentes principales (Principal Component Regression, **PCR**)
  - b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, **PLS**)

Otros de más reciente incorporación son: a) ACE (Alternating Conditional Expectations); b) LWR (Locally Weighted Regression); c) MARS (Multivariante Adaptive Regression Splines); d) PPR (Projection Pursuit Regression); e) Redes neuronales (Neural Networks, NN) de aplicación en sistemas no lineales.

En todos los casos, los procedimientos utilizados se basan en la obtención y almacenamiento de las señales correspondientes a un conjunto de muestras patrón, compuestas por mezclas de los componentes a determinar, optimización del modelo de cálculo mediante el uso de las variables apropiadas que afectan al sistema y posterior predicción de las muestras problemas de concentración desconocida.

Las señales analíticas utilizadas pueden ser de diversos tipos tales como: espectros de absorción, emisión o excitación molecular, señales voltamperométricas, señales cromatográficas, etc... e incluso señales de tipo cinético. Dichas señales se manipulan matemáticamente con el objeto de obtener la información necesaria acerca de la concentración de los

componentes. Este proceso se conoce con el nombre de **calibración**.

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir y la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe elegir la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez creada el modelo (o matriz) de calibración, se pueden resolver muestras de concentración desconocida. No es necesario especificar el contenido, ni la naturaleza, de aquellas sustancias que acompañando a los componentes en estudio pudieran estar presentes como potenciales interferencias, aunque su influencia sobre las correspondientes señales analíticas quedarán implícitamente recogidas en el modelo de cálculo, siendo posible por tanto la modulación de las mismas si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar.

Durante la etapa de calibración se busca en primer lugar un modelo de comportamiento entre dos grupos de variables,  $y = f(x)$ , con objeto de obtener la relación entre ellas, mediante un modelo matemático que se debe de ajustar al conjunto de muestras patrón que recibe el nombre de **set o matriz de calibración**. Dicho set de calibración debe generar resultados de confianza y para ello debe contener al menos tantas muestras como componentes queremos determinar y normalmente muchas más. El hecho de emplear mezclas de componentes para la construcción de la matriz de

calibración hace que determinadas interacciones en disolución se puedan modular mediante el modelo PLS y similares.

Para que un modelo de cálculo cubra las expectativas de predicción sobre muestras reales esperadas, debe apoyarse sobre un adecuado set de calibración, es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender en gran manera del diseño del set de calibración. Dicho set de calibración debe estar compuesto por muestras patrón de mezclas de componentes en concentraciones tales que engloben a los posibles problemas y por otra parte, distribuidas de forma estadísticamente correcta. Se emplean diversos procedimientos de diseño de experimento con este objeto. Diseños tales como los denominados central, central compuesto, factorial etc. son ampliamente utilizados. La colinealidad es un hecho no deseable dentro de un modelo, ya que complica el sistema de cálculo sin aportar información útil. También es necesario recordar la necesidad de que la información analítica referente a posibles interferencias esté recogida en el modelo, con objeto de su modulación en muestras reales, generando así un procedimiento robusto. La etapa de **predicción**, consiste en predecir el valor de las variables independientes de un conjunto de muestras (set de predicción), tras obtener las correspondientes variables dependientes.

La necesidad de obtener una representación simplificada de los datos que sea representativa de la información englobada en ellos, se puede llevar a cabo mediante un proceso denominado *descomposición espectral*, aunque de forma general dicho procedimiento pueda ser aplicado a cualquier tipo de señal, y pudiéramos denominarlo descomposición voltamperométrica, descomposición cromatográfica, etc... Esta descomposición de la información se puede llevar a cabo mediante los denominados métodos de análisis multivariante.

Uno de los objetivos principales de los métodos de análisis multivariante es extraer la información realmente importante de una matriz de datos, desechando todos aquellos datos que no tengan trascendencia y sean redundantes y como consecuencia se produce una disminución de los datos originales, obteniéndose una matriz de datos más manejable. Existen varias formas de realizar esta exploración de los datos, que lógicamente cada una de ellas requiere de herramientas quimiométricas diferentes. Existe una amplia bibliografía sobre estos métodos algunos de los cuales se basan bien en la exploración de los datos o en el análisis discriminatorio. Nosotros, a continuación, vamos a describir uno de los procedimientos más utilizados, basado en la exploración de datos que es el denominado Análisis por Componentes Principales (PCA).

### **Análisis por Componentes Principales (PCA)**

Este método realiza un proceso de descomposición espectral basado en el algoritmo NIPALS (non linear iterative partial least-squares).

El proceso de descomposición se puede esquematizar indicando los pasos que el algoritmo matemático realiza sobre el set de calibración. En primer lugar, calcula el espectro medio, con los espectros de las muestras que componen la matriz de calibración, a continuación lo compara con cada uno de los espectros individuales de esta matriz y crea un espectro nuevo que es la diferencia entre el espectro medio y el individual a cada longitud de onda, este espectro diferencia recibe el nombre de *vector loading*. Posteriormente, calcula la cantidad de vector loading que le corresponde a cada espectro individual en la calibración y al valor resultante se le denomina *score*. Calcula la contribución del *loading* a cada espectro de la calibración y la sustrae de cada espectro individual. Los espectros obtenidos los sustituye en los datos originales, y a continuación vuelve al paso primero y repite el proceso.

Así, cualquier espectro de una mezcla se puede reconstruir a partir de un mismo número de *loadings* y se diferencian unos de otros en las cantidades de los mismos que se adicionan, es decir, en los *scores*, y en definitiva, en lugar de los datos de absorbancia, los

espectros pueden representarse mediante sus respectivos *scores*.

El método PCA (14-16) se puede matemáticamente desglosar como una descomposición de la matriz **I** de rango **r**, en una suma de matrices, **M**<sub>1</sub>, **M**<sub>2</sub>,.... de rango **1**:

$$\mathbf{I} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \mathbf{M}_3 + \dots + \mathbf{E}$$

donde **E** indica la matriz residual que contiene datos acerca del ruido y aquellos que se consideran indeseables. Cada una de estas matrices de rango 1 se puede escribir como el producto de dos vectores: un vector *score* **t**<sub>A</sub> y un vector *loading* **p**<sub>A</sub>, correspondientes al componente A:

$$\mathbf{M}_1 = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A\mathbf{p}_A^T + \mathbf{E}$$

o bien en la forma equivalente:  $\mathbf{I} = \mathbf{T}.\mathbf{P}^T + \mathbf{E}$

Es decir, la matriz **I** se expresa en un nuevo sistema ortogonal de variables en el que los *scores* representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema, y los *loadings*, los cosenos directores de los nuevos ejes respecto a los anteriores. Las nuevas variables referidas a este sistema ortogonal reciben el nombre de *variables principales*.

El objetivo es que el sumatorio de los cuadrados de las nuevas matrices, se aproxime lo más posible a la matriz inicial de datos con el menor número posible de

componentes principales. Otro aspecto a considerar es que las componentes principales se eligen de tal forma que la primera de ellas recoge la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda recoge la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. De manera que normalmente la suma de los cuadrados de las dos primeras componentes principales describa aproximadamente el 90% de las variaciones.

Una vez seleccionado el número óptimo de componentes principales, factores, se puede realizar una etapa posterior que corresponde a una calibración multivariante, que nos permite determinar la concentración de los analitos. Los métodos de calibración multivariante más utilizados, en el campo de la Química Analítica son el método de Regresión de Componentes Principales (PCR) y el método de Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS), siendo este último el más utilizado debido a la buena calidad de los modelos de calibración y otra ventaja a su favor es la disponibilidad de softwares, de manejo relativamente sencillo, que lo hacen asequible.

### **Método PLS**

Durante la etapa de calibración el método de regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS), utiliza no sólo la información contenida en la matriz **A**, sino también la contenida en la matriz de concentraciones (matriz **C**) de manera que, al mismo tiempo, se utilizan

las columnas de **C** para estimar los *loadings* de **A** y las columnas de **A** para estimar los *loadings* de **C**.

$$\begin{aligned} \mathbf{I} &= \mathbf{T}_I \cdot \mathbf{P}_I^T + \mathbf{E}_I \\ \mathbf{C} &= \mathbf{T}_C \cdot \mathbf{P}_C^T + \mathbf{E}_C \end{aligned}$$

donde  $\mathbf{T}_I$  y  $\mathbf{T}_C$  son las matrices de los *scores* de la matriz de medida **I** y de la matriz de concentraciones **C**, respectivamente,  $\mathbf{P}_I$  y  $\mathbf{P}_C$  son las respectivas matrices de *loadings*, y  $\mathbf{E}_I$  y  $\mathbf{E}_C$  representan las matrices residuales de **I** y de **C** del modelo.

En un modelo simplificado, los *scores* de cada matriz se calculan por separado y si las fuentes de variación de **A** y de **C** fuesen idénticas, también lo serían las correspondientes matrices de *scores*, pero en la mayoría de los casos se encuentra que los *scores* de ambas matrices están relacionados por la llamada relación interna (**r**):  $t_C = r t_I + e$ .

Esto indica que los *scores*  $t_A$  no son los óptimos para estimar **I** al haber sufrido cierta rotación para describir simultáneamente la matriz **C**.

La descomposición y regresión se puede realizar de forma conjunta para todos los componentes, optimizándose lo que se podría considerar como un valor medio del número de factores, mediante la aplicación de la modalidad **PLS2**. Sin embargo, en el caso de que la optimización y descomposición se haga para cada componente individualmente el método se designa **PLS1**. Teniendo en cuenta la rapidez de cálculo

actual mediante los ordenadores habituales la aplicación de **PLS2** no tiene grandes ventajas frente a la aplicación de **PLS1**. Por otra, parte hay que tener en cuenta que cuando el número de factores optimizado para los distintos componentes es el mismo ambos tratamientos son idénticos y arrojan los mismos resultados. **PLS2** se puede considerar como un algoritmo global cuya aplicación más interesante puede ser el reconocimiento de modelos, mientras **PLS1** resulta más adecuado para análisis cuantitativo.

Un problema es la selección del número más adecuado de factores (loadings) para modelar los datos ya que este número de factores debe ser tal que garantice la adecuada resolución del problema con la menor complejidad matemática (menor tiempo de cálculo). Si se emplea un número inferior al óptimo se obtendría un empobrecimiento de las predicciones, y si por otra parte se incluyen demasiados, se podría estar modelando el denominado ruido del sistema, lo que conllevaría a un *sobreajuste* y la consiguiente pérdida de exactitud en los resultados.

Se emplean diversos criterios estadísticos con el objeto de evitar los inconvenientes mencionados. Uno de los más usados es el denominado parámetro **PRESS** (Prediction Residual Error Sum of Squares), que proporciona una medida de la corrección del modelo en la predicción. Su cálculo se realiza siguiendo la técnica de cross-validation, sobre un grupo de calibración de  $n$  patrones y mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- De todas los patrones del conjunto de calibración, se prescinde de un cierto número, generalmente solo una, y con las restantes se realiza la descomposición espectral con un solo factor. Se calcula la matriz de calibración mediante regresión.
2. Con dicha matriz, se determina la concentración de la muestra (o las muestras) anteriormente desechadas.
3. Se calcula la diferencia entre la concentración predicha con dicha matriz, y la que teóricamente tiene la muestra (concentración actual), y se obtiene la raíz cuadrada de esta diferencia (residuo sin modular).
4. A continuación deja fuera otra muestra distinta y repite el proceso. Así, sobre cada una de las muestras que constituyen el set de calibración.
5. Como cada muestra es dejada fuera, se añade la raíz cuadrada del error residual calculado a todos los errores previos.
6. Se repite el mismo proceso tantas veces como factores se ensayan.

Para un componente dado con un número de factores determinado se tendrá:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (\bar{c}_i - c_i)^2$$

donde  $n$  / número total de muestras empleadas en la calibración;  $c_i$  / concentración calculada con ese número de factores, y  $c_i$  / concentración de referencia.

Para todos los componentes ( $m$ ), el PRESS se define como:

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2$$

Como alternativa, en lugar del PRESS, puede utilizarse el denominado **SEP** (Standard Error of Prediction), que para un componente viene dado por la expresión:

$$\text{SEP} = [\text{PRESS}/m]^{1/2}$$

Efectuados los cálculos, se observa que a medida que se van añadiendo más factores, disminuye el error de predicción hasta alcanzar un mínimo a partir del cual dicho error, y por tanto el PRESS vuelve a aumentar. La explicación de este aumento estriba en el hecho de que en ese momento comienza a producirse un sobreajuste del modelo por incorporación de vectores “ruido”. De acuerdo con esto parecería conveniente adoptar como número de factores óptimos aquel para el que se alcanzara el mínimo valor de PRESS, sin embargo, ya que para este número sea óptimo en la predicción de las muestras del grupo de calibración proporcione malos resultados en muestras problemas, Haaland y Thomas (12, 13) proponen comparar los valores de PRESS

calculados con aquellas matrices que utilizan un número de factores inferior al modelo que proporciona un mínimo PRESS con este mismo. Se calcula la razón entre estos valores, es decir:

$$F(a) = \frac{\text{PRESS del modelo con } a \text{ factores}}{\text{PRESS del modelo con } a^* \text{ factores}}$$

siendo  $a^*$  el número de factores para el que se alcanza el mínimo PRESS. Como número óptimo se elige aquel número de factores para el cual se cumple que la razón anterior se hace inferior a un valor cuyo nivel de significancia se ha definido previamente. Esto es  $F(a) < F_{\forall; n, n}$ , donde  $F_{\forall; n, n}$  presenta el  $(1 - \forall)$  por ciento de la distribución con  $n$  muestras y  $n$  grados de libertad. Haaland y Thomas proponen 0.25 como valor de  $\forall$ , estableciendo un compromiso entre valores demasiado pequeños, con lo que se originaría infraajustes, y demasiado grandes que darían lugar a sobreajustes.

#### IV.1.1.- Antecedentes bibliográficos

Como ya hemos indicado anteriormente, el desarrollo de los métodos quimiométricos y sus aplicaciones al campo de la química analítica ha tenido su mayor desarrollo desde finales de los años ochenta y son muy numerosos los trabajos publicados. De hecho al realizar una búsqueda, utilizando la base de datos Analytical Abstracts, en los últimos 20 años se encuentran casi 1000 trabajos relacionados con estas

técnicas. Por lo que en este capítulo solo nos ceñiremos a comentar los trabajos realizados en este departamento de Química Analítica.

El primer trabajo publicado por nosotros, data de 1992 y en el se comenzó con la aplicación de PLS a espectros de absorción para la determinación de pesticidas (14). A partir de aquí, los métodos PLS se han aplicado tanto a señales espectroscópicas, como a curvas cinéticas, cromatogramas y a señales voltamperométricas. En cuanto a las matrices utilizadas para realizar las cuantificaciones son tanto fluidos biológicos como muestras agroalimentarias y mediambientales.

### ***Métodos que utilizan datos espectrales como matriz de calibración***

#### *Datos referentes a espectros de absorción UV-Vis*

Como hemos indicado, el primer trabajo referente al uso de técnicas de calibración multivariante (principalmente PLS) realizado en este departamento data de 1992 y a partir de aquí hemos desarrollado una serie de investigaciones basadas en el uso de estas herramientas. Una comparación entre tres métodos de calibración multivariante, PLS1, PLS2 y PCR, se realizó en la determinación simultánea de mezclas de tres saborizantes, obteniéndose mejores resultados cuando se aplicaba PLS2 (15). Después de este primer

trabajo, se realizaron otros con analitos semejantes con pesticidas, y utilizando como matrices de datos experimentales las conformadas por espectros de absorción. Así se ha llevado a cabo la determinación de clorpirifos y carbaril en una formulación comercial (16) aplicando PLS2 y de naptalan y sus metabolitos, en agua de río (17). Se ha realizado una comparación entre los métodos de derivadas y diferentes métodos de calibración multivariante como CLS, PCR y PLS en la resolución de una mezcla de tres pesticidas formada por carbofurano, carbaril y fenamifos (18).

Otra área en la que hemos aplicado los métodos de calibración multivariante es en el análisis de compuestos de interés farmacológico y clínico. Así, se ha realizado un estudio comparativo entre los resultados obtenidos en la determinación simultánea, previa derivatización con ácido tiobarbitúrico, de 2-furfuraldehído, 5-hidroximetilfurfuraldehído y malonaldehído, mediante técnicas de derivadas y PLS, obteniéndose resultados significativamente mejores mediante el uso de mínimos cuadrados parciales (19). Los mismos autores (20) llevan a cabo la determinación simultánea de malonaldehído, 2-furfuraldehído y 5-hidroximetilfurfuraldehído, en presencia de glioxal y biliverdina, mediante PLS1 y PLS2.

La determinación simultanea de mezclas de sulfamidas tales como, doxiciclina, sulfadiacina, furaltadona y trimetropin o mezclas de sulfametazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol y sulfamerazina (21, 22), se

realiza mediante PLS1. Estos métodos se han aplicado, con buenos resultados al análisis de muestras de leche.

Mezclas de diversas pteridinas, de interés clínico se han resultado utilizando PLS1 (23) y la determinación de teofilina en suero ha sido posible aplicando esta misma técnica (24). La resolución de mezclas ternarias de nitrofurantoína, furaltadona y furazolidona, se lleva a cabo registrando los espectros de absorción, después de someter las mezclas a un proceso de fotodescomposición (25).

La determinación de diversos iones inorgánicos mezclas de hierro, vanadio y molibdeno, previa complejación con un ácido hidroxámico cíclico (26, 27), mezclas de hierro y manganeso, previa complejación con el ácido 3-indolacetohidroxámico (28).

#### *Datos fluorescentes*

Es de destacar los trabajos relacionados con la aplicación de técnicas fluorescentes en conjunción con los métodos de calibración multivariante, así se compararon los métodos PCR, PLS1 y PLS2 para la determinación simultánea de ácido salicílico, salicilúrico y gentísico, indicando la conveniencia de utilizar las matrices de excitación-emisión para seleccionar las longitudes de onda más adecuadas (29). Los espectros de emisión correspondientes a los complejos de inclusión entre (-ciclodextrina y agentes quimioterápicos como el ácido nalidíxico y su principal

metabolito 7-hidroximetilnalidíxico han sido utilizados para la determinación de estos analitos en muestras de orina (30). La determinación de acetilsalicílico y sus metabolitos, en orina, se llevó a cabo utilizando como matriz de datos la compuesta por la suma de los espectros de excitación y emisión (31). Utilizando los espectros sincrónicos, registrados manteniendo una diferencia constante entre las longitudes de onda de excitación y emisión, como conjunto de datos para efectuar la calibración y posterior cuantificación de los analitos, se han determinado simultáneamente ácido salicílico y diflunisal en suero humano (32), mezclas de pteridinas tales como la formada por xantopterin e isoxantopterin (33) y se ha resuelto la mezcla formada por nafcilina y meticilina, realizandose en este último caso una comparación entre los resultados obtenidos al aplicar PLS a los espectros sincrónicos y a los espectros sincrónicos obtenidos a energía constante (34). Recientemente hemos propuesto un método para la determinación de pigmentos, clorofilas *a* y *b* y feofitinas *a* y *b*, en aceites de oliva, utilizando los espectros de excitación como matriz de datos. Este método permite la cuantificación de los pigmentos en diversos tipos de aceites de oliva sin tratamiento previo de las muestras (35). La determinación del pesticida glifosato y su principal metabolito también se ha llevado a cabo, previa derivatización con NBD-Cl y utilizando los espectros de emisión como matriz de datos (36).

***Métodos que utilizan datos electroquímicos como matriz de calibración***

La combinación de las señales electroquímicas con métodos de calibración multivariante ha permitido proponer métodos para la determinación de nitrofurantoina, furazolidona y furaltadona, que presentan procesos de reducción irreversibles, utilizando como matriz de datos la formada por los voltamperogramas obtenidos mediante diferencial de pulso (37, 38). La resolución de mezclas ternarias de sulfamidas, cuyas señales obtenidas mediante diferencial de pulso no eran aditivas, se resolvió favorablemente utilizando PLS (39). Otros tipos de analitos, de interés agroquímico, también han sido objeto de estudio mediante la aplicación de técnicas de calibración multivariante, así se ha propuesto un método que permite la determinación indirecta de carbaril y carbofurano (40), mezclas de pesticidas, pertenecientes al grupo de las triazinas, tales como simazina-atrazina y terbutrin-prometrin han sido bien resueltas, utilizando, para efectuar la calibración, los voltamperogramas obtenidos mediante diferencial de pulso, después de hacer un estudio comparativo entre las ondas obtenidas mediante DC, DPP y onda cuadrada. (41); y fungicidas tales como captan, captafol y folpet han sido determinados, con buenos resultados, en agua de río (42). La determinación de antioxidantes, con propiedades redox, en productos alimentarios, se ha llevado a cabo con buenos resultados. Así se han

determinado mezclas de antioxidantes sintéticos, compuestas por propil galato y butilatos de hidroxianisol e hidroxitolueno, en sobres de sopas, utilizando las ondas registradas mediante voltamperometría de corriente continua, DC y aplicando PLS1 (43), otro antioxidante, como es el ácido nordihidroguaiarético, ha sido determinado en presencia de otros antioxidantes fenólicos, utilizando un electrodo de carbono y realizando PLS1 con las ondas registradas mediante, DC (44). Antioxidantes naturales, como la vitamina E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol), presentes en aceites vegetales, han sido determinados, después de su oxidación en electrodo de carbón vitrificado, y en medio hexano-etanol, ajustando la acidez del medio con ácido sulfúrico y utilizando disolución etanólica de tetrametila amonio como electrolito soporte, utilizando los voltamperogramas obtenidos mediante DPP y aplicando PLS1 (45).

***Métodos que utilizan datos cinéticos como matriz de calibración***

El uso de reacciones cinéticas, que originan las correspondientes curvas cinéticas nos han permitido combinarlas con estas técnicas quimiométricas. Los pesticidas carbaril y clorpirifos, sufren un proceso degradación en medio alcalino y en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que se traduce en una variación en los espectros de absorción en función del tiempo. La proyección bidimensional de la evolución

del espectro total de mezclas de ambos analitos, con el tiempo, se utiliza como señal analítica determinándose ambos componentes aplicando PLS2 (46). Aldehídos furánicos, como el 2-furfuraldehído y 5-hidroximetil-2-furfuraldehído, originan en presencia de p-toluidina y ácido barbitúrico, compuestos inestables que pueden determinarse registrando sus correspondientes curvas cinéticas. La determinación de mezclas de estos dos aldehídos, presentes en vinos dulces, licores, zumos, etc, se ha realizado utilizando las curvas cinéticas, registradas a 550 nm para efectuar la calibración (47). La amoxicilina y el ácido clavulánico sufren procesos de oxidación en presencia de Ce (IV) y en medio sulfúrico que pueden monitorizarse mediante fluorescencia. Estos procesos son lo suficientemente rápidos como para tener que utilizar la técnica de flujo detenido (stop-flow) para registrar las curvas cinéticas que se utilizan como matriz de calibración para aplicar posteriormente PLS1 (48).

Estas técnicas de calibración multivariante también se han aplicado a otros tipos de señales, como a la resolución de picos solapados en HPLC (49).

En este Capítulo hemos abordado la resolución de las mezclas triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico mediante análisis multivariante (PLS).

En la parte experimental de este Capítulo, se exponen los resultados obtenidos en la optimización de

los modelos de cálculo basado en la aplicación del algoritmo de mínimos cuadrados parciales (PLS), así como el análisis de las variables que le afectan.

Los modelos optimizados se aplican a la determinación de las mezclas en muestras de origen fisiológicas tales como orina y suero humano, sin tratamiento previo y realizando la mínima dilución necesaria para modelar la señal de fondo con objeto de obtener la máxima sensibilidad.

## **IV.2.-RESOLUCIÓN DE LAS MEZCLAS TRIAMTERENO-ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO-ÁCIDO FOLÍNICO MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

Con anterioridad se ha optimizado la resolución de mezclas binarias formadas por metotrexato-ácido folínico y triamtereno-ácido folínico, mediante el empleo de la técnica de espectrofotometría de derivadas. Como ya hemos indicado en la Introducción de este capítulo una herramienta poderosa de análisis multivariante lo constituyen los métodos denominados PLS. Hemos abordado la determinación simultánea de metotrexato-ácido folínico y triamtereno-ácido folínico mediante PLS y se comparan los resultados con los obtenidos mediante espectrofotometría de derivadas.

El software utilizado ha sido el paquete GRAMS 386, v. 3.04 -PLSplus Versión 2.1 provisto de, entre otros, los programas **Convert**, para la transformación de los archivos de registro de los espectros del formato MRD, obtenidos mediante el Spectronic 3000 (Diode Array) al formato SPC correspondiente, y **PLSplus** conteniendo el algoritmo PLS en sus dos modalidades PLS-1 y PLS-2.

#### **IV.2.1.- Diseño y optimización de la matriz de calibrado para la determinación de triamtereno-ácido folínico**

Se procede a diseñar un grupo de calibración conteniendo los analitos en estudio. El diseño de dicho grupo es el paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es fundamental evitar la colinealidad, emplear un número suficientemente bajo de patrones y abarcar, por otra parte, todo el rango de concentraciones, así como las relaciones entre las concentraciones de los componentes en los problemas reales.

El grupo de calibración consta de 10 muestras formadas por mezclas patrón de ambos compuestos en concentraciones comprendidas entre 0 y 15 :g mL<sup>-1</sup> de ácido folínico, y 0 y 12 :g mL<sup>-1</sup> para triamtereno. En una serie de ellas se mantiene constante la concentración de triamtereno a 10 :g mL<sup>-1</sup> y se varía la de ácido folínico y en una segunda serie se mantiene constante la concentración de ácido folínico en 10 :g mL<sup>-1</sup> y se varía la de triamtereno entre los límites anteriormente mencionados. Se ha optado por este diseño con el objeto de evitar la colinealidad, a la vez que poder hacer análisis cluster sobre muestras donde una variable (la concentración de cada componente en cada serie) se mantiene constante con lo cuál se puede encontrar con más facilidad la dependencia de los valores de scores

con la concentración del componente que varía, así como con la relación entre las concentraciones si la hubiera.

Se preparan diez muestras acuosas, tamponadas a pH = 5.0 con disolución tampón HAc/NaAc 0.5 M . La composición del grupo de calibración se ha resumido en la Tabla IV.1.

**Tabla IV.1** .- Grupo de calibración para la mezcla triamtereno-ácido folínico

<b>Muestra</b>	<b>[Ácido folínico]</b> :g mL <sup>-1</sup>	<b>[Triamtereno]</b> :g mL <sup>-1</sup>
M1	2	10
M2	10	10
M3	15	10
M4	8	10
M5	10	3
M6	10	12
M7	0	5
M8	0	3
M9	10	0
M10	2	0

Se registraron los espectros de absorción de las mismas en un intervalo comprendido entre 200 y 450 nm. Se han aplicado PLS en sus dos modalidades PLS1 y PLS2.

#### **IV.2.2.- Aplicación de PLS-1 a la mezcla triamtereno-ácido fólico**

Se calculan los valores de PRESS utilizando como número máximo de factores un valor de 6, dejando fuera cada vez una única muestra. La región espectral seleccionada para el análisis ha sido la comprendida entre 230 y 403 nm (número de puntos experimentales totales 476), zona en la cuál se encuentra incluida toda la información espectral para ambos componentes. En la Tabla IV.2. se han resumido los valores de los parámetros estadísticos obtenidos mediante PLS1.

Como se puede observar el número óptimo de factores, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas, es dos. Es de destacar, que para este número de factores también se obtiene el mínimo valor del parámetro PRESS.

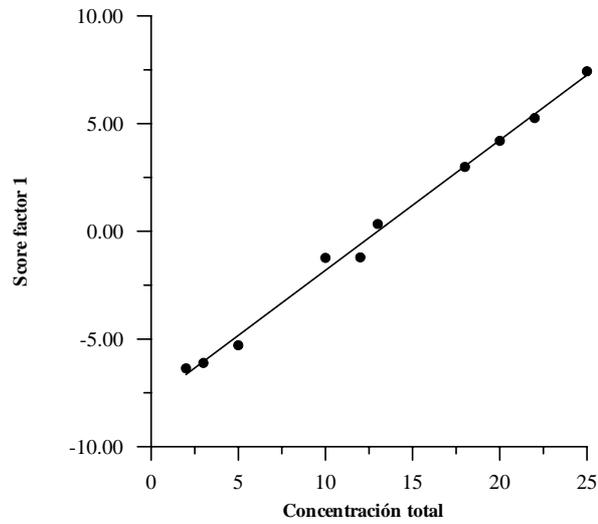
Al ser el número de factores el mismo para ambos componentes la aplicación de PLS2 es equivalente a la de PLS1. Se comprueba este hecho, comparando los parámetros estadísticos para ambos métodos, y se procede en los pasos posteriores, únicamente a la aplicación de PLS2.

Hemos procedido a analizar los correspondientes valores de los scores 1 y 2 en función de las concentraciones de los componentes con objeto de poder relacionarlos y asignar su naturaleza.

**Tabla IV.2 .-** *Parámetros estadísticos obtenidos mediante PLS1 para el modelo triamtereno-ácido folínico.*

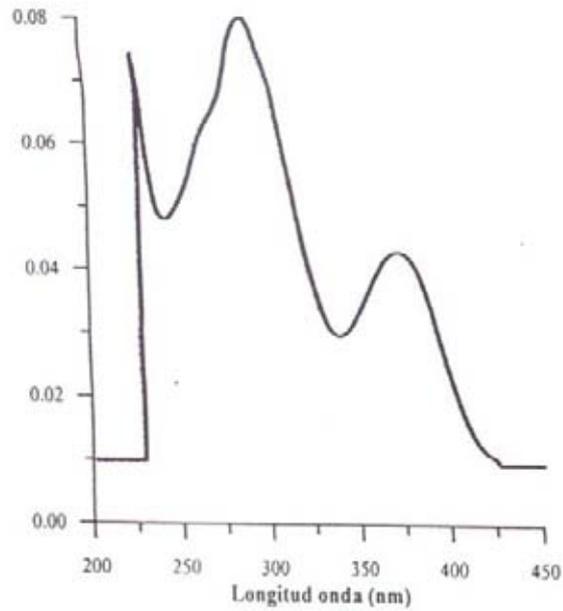
<b>Componente ácido folínico</b>				
<b>Factor</b>	<b>PRESS</b>	<b>SEP</b>	<b>F Ratio</b>	<b>Probabilidad</b>
0	248.1	5.2504	1040.6	1
1	57.128	2.5194	239.61	0.99999
2	0.23842	0.16276	1	0.5
3	0.42334	0.21688	0	0
<b>Componente triamtereno</b>				
0	190.1	4.5959	304.77	1
1	87.036	3.1098	139.54	0.99999
2	0.62374	0.26326	1	0.5
3	0.66489	0.2718	0	0

Cuando se representa la variación del score 1 con respecto a la concentración total ([triamtereno]+[ácido folínico]) en las muestras que componen el grupo de calibración (Figura IV.1) se observa una relación lineal de manera, que el valor del score 1 aumenta a medida que aumenta la concentración total. El score 1 presenta un valor próximo a cero para aquellos objetos del grupo de calibración cuya concentración total es próxima al valor de la concentración total media del set de calibración, dicho comportamiento es el lógicamente esperado teniendo en cuenta el mecanismo de la descomposición espectral realizada.



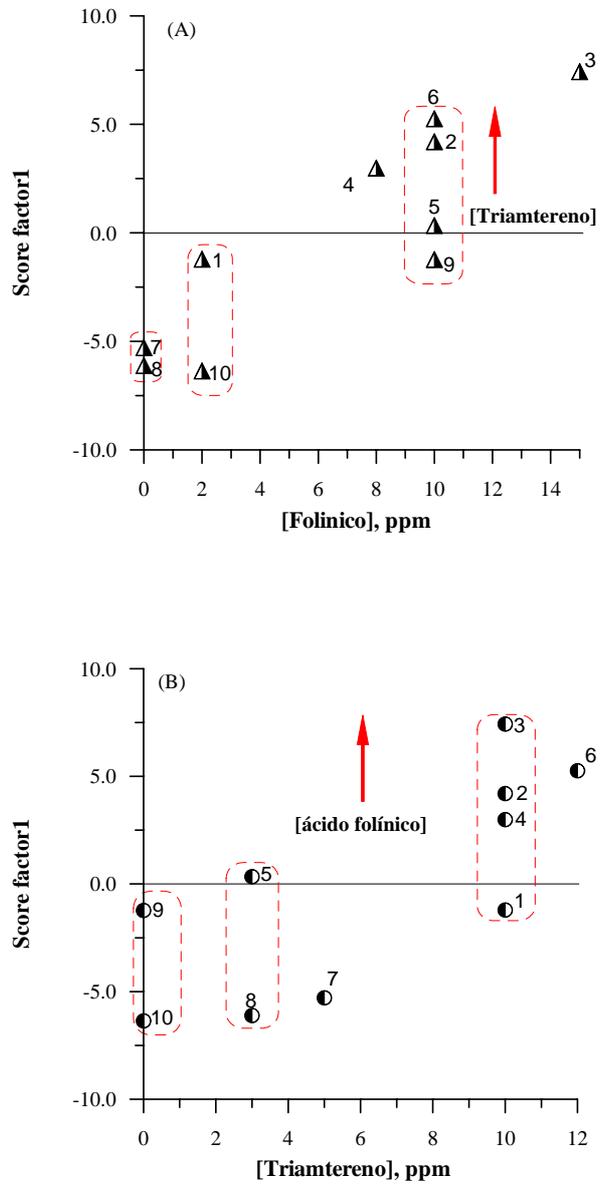
**Figura IV.1** .- Evolución del score 1 en función de la concentración total de las muestras del grupo de calibración.

Este comportamiento está de acuerdo con la forma del factor loading 1 (Figura IV.2) que como podemos observar corresponde al espectro suma de los correspondientes a ambos componentes individuales.



**Figura IV.2** .- Factor loading 1 para el modelo triamtereno - ácido folínico

En la Figura IV.3. podemos observar la evolución del score 1 con respecto a las concentraciones individuales de los componentes del set de calibración.



**Figura IV.3** .- Influencia de las concentraciones de ácido folínico (a) y triamtereno (b) en los valores del score 1.

Los objetos correspondientes al conjunto de calibración se distribuyen en grupos de manera que cada grupo está compuesto por aquellas muestras que tienen

la misma concentración del componente en estudio. Dentro de cada grupo el score 1 aumenta a medida que aumenta la concentración del segundo componente. Si comparamos entre los diferentes grupos podemos observar como presentan mayores valores de score 1 las muestras con mayor concentración total, en coincidencia con lo deducido anteriormente.

Por otra parte, cuando se estudia la evolución del valor del score 2 frente a los valores obtenidos para el score 1, se obtienen los resultados representados en la Figura IV.4. Se sitúan en grupos verticales aquellos objetos que presentan el mismo valor de score 1, es decir aquellos objetos que presentan la misma concentración total.

Si se comparan los objetos situados dentro de cada grupo, se puede observar que valores del score 2 próximo a cero para aquellos objetos que presentan la misma concentración de ambos componentes, o expresado como relación de concentraciones  $[\text{ácido folínico}]/[\text{triamtereno}] = 1$ . Presentan valores positivos del score 2, aquellos objetos en los cuales se cumple que la concentración de ácido folínico es mayor que la concentración de triamtereno, es decir  $[\text{folínico}]/[\text{triamtereno}] > 1$ , aumentando el valor del score 2 cuando aumenta dicha relación. Presentan valores de score 2 negativos, aquellos objetos cuya concentración de folínico es menor que la concentración de triamtereno, es decir  $[\text{ácido folínico}]/[\text{triamtereno}] <$

1. Luego podemos concluir, que el valor del score 2 depende fundamentalmente de la relación entre las concentraciones de los componentes.

Cuando se observa la forma del factor loading 2, se puede comprobar como el espectro de absorción resultante es similar al espectro diferencia generado por sustracción entre el espectro de absorción del ácido folínico y del triamtereno (Figura IV.5).

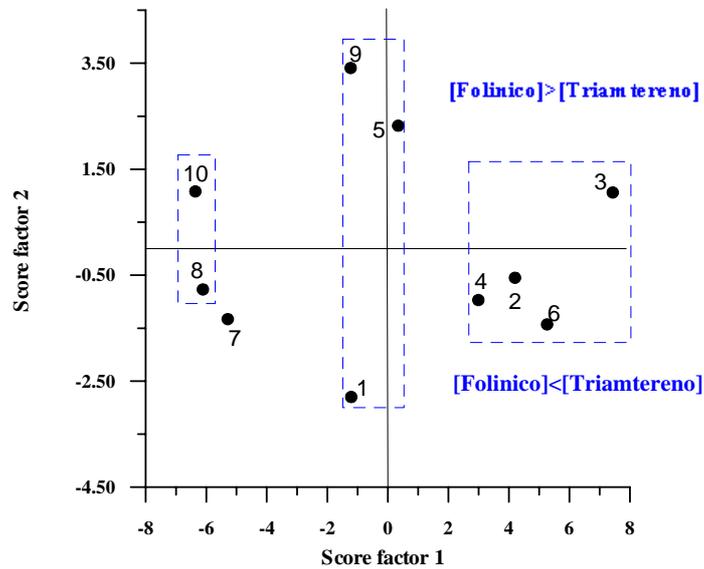
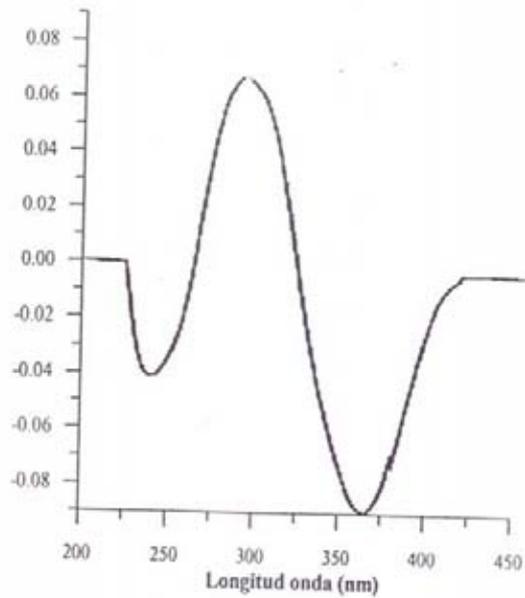


Figura IV.4.- Variación del valor del score 2 frente al score 1



**Figura IV.5** .- Factor loading 2 para el modelo triamtereno-ácido folínico

Aplicando como número óptimo de factores el de dos, se predicen las concentraciones de ambos componentes y se comparan con las concentraciones teóricas. Mediante el cálculo del parámetro RMSD y  $R^2$  se analiza la capacidad de predicción del modelo (Tabla IV.3).

**Tabla IV.3** .- Valores de RMSD y  $R^2$  para el modelo PLS para la resolución triamtereno - ácido folínico

Componente	Factor	RMSD	$R^2$
Acido folínico	2	0.15441	0.9990
Triamtereno		0.24975	0.9967

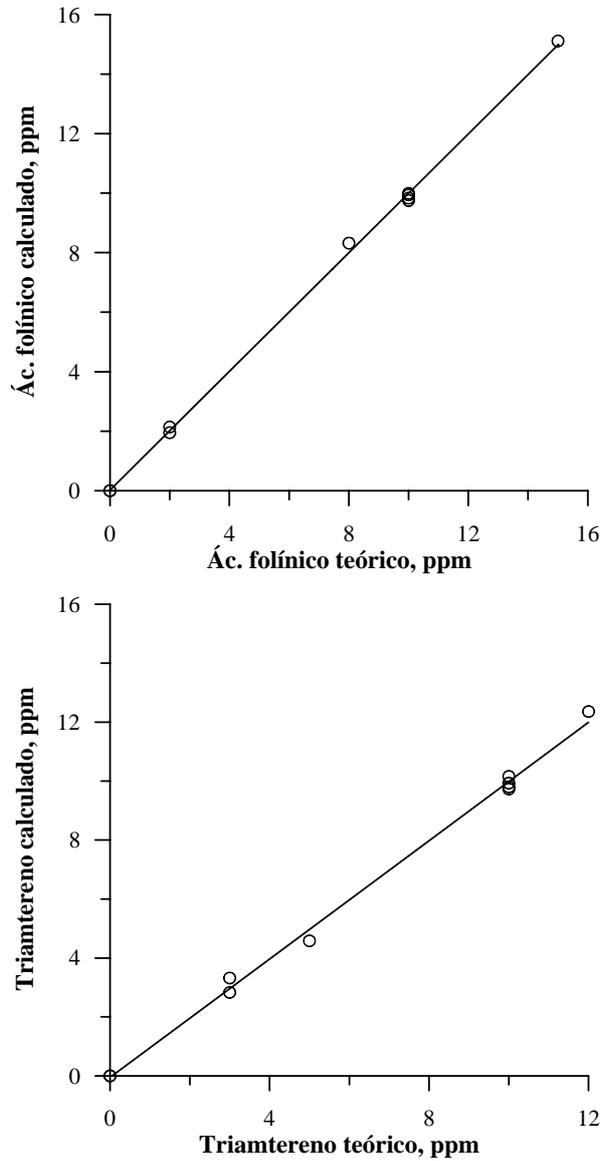
Los valores de coeficiente de determinación son aceptables y las concentraciones calculadas con el modelo aparecen recogidas en la Tabla IV.4.

**Tabla IV.4.-** Concentraciones teóricas y calculadas del set de calibración mediante el modelo triamtereno-ácido folínico.

Muestra	[Ácido folínico]		[Triamtereno]	
	Teórica mg L <sup>-1</sup>	Calculada mg L <sup>-1</sup>	Teórica mg L <sup>-1</sup>	Calculada mg L <sup>-1</sup>
1	2.00	1.95	10.00	9.80
2	10.00	9.94	10.00	10.16
3	15.00	15.11	10.00	9.73
4	8.00	8.32	10.00	9.93
5	10.00	9.99	3.00	2.83
6	10.00	9.75	12.00	12.36
7	0	-----	5.00	4.58
8	0	-----	3.00	3.32
9	10.00	9.83	0	-----
10	2.00	2.14	0	-----

La Figura IV.6 representa los valores calculados para las concentraciones de los analitos (concentraciones encontradas) frente a los valores teóricos (concentraciones actuales) en las muestras patrón mediante PLS1. La linealidad conseguida entre

ambas variables es adecuada como se pone de manifiesto por los respectivos coeficientes de regresión indicados anteriormente.



**Figura IV.6** .- Representación de concentraciones calculadas vs teóricas mediante el modelo optimizado para la resolución de la mezcla LV-TRI

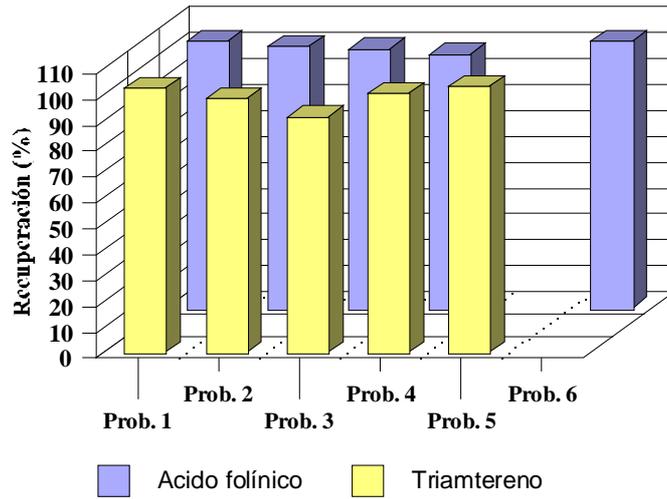
A continuación se construye un grupo de predicción compuesto por seis muestras, aleatoriamente distribuidas, dentro de los intervalos de concentración establecidos en la matriz de calibrado y se predicen utilizando el modelo optimizado anteriormente. En la Tabla IV.5 se muestran las concentraciones teóricas de ácido folínico y de triamtereno fijadas, la relación entre sus concentraciones así como los valores de recuperación calculados.

**Tabla IV.5** .- Aplicación del modelo optimizado a las mezclas binarias de ácido folínico y triamtereno.

Relación aproximada triamtereno/ ácido folínico	[ácido folínico]		Rec (%)	[triamtereno]		Rec. (%)
	Teórica	Calculada		Teórica	Calculada	
2/1	5.00	5.15	103	10.00	10.19	102
1/2	20.00	20.11	101	10.00	9.82	98
1/2	10.00	10.00	100	5.00	4.52	91
2/1	10.00	9.85	98	18.00	18.03	100
10/0	0	-----	----	10.00	10.29	103
0/5	5.00	5.14	103	0	-----	---

Los resultados obtenidos resultan ser adecuados en todos los casos presentando valores de recuperación entre 98 y 103 % para ácido folínico y entre 91 y 103 % para triamtereno.

En la Figura IV.6 se han representado los valores de recuperación para ambos componentes en las muestras ensayadas.



**Figura IV.6** .- Diagrama de barras correspondiente a los valores de recuperación obtenidos en la determinación simultánea de triamtereno y ácido folínico.

**IV.2.3.-Diseño y optimización de la matriz de calibrado para la determinación de metotrexato - ácido folínico**

Se prepararon nueve muestras conteniendo mezclas de ácido folínico y metotrexato tamponadas a pH = 5.0 por adición de disolución tampón HAc/NaAc 0.5 M. Siguiendo la sistemática descrita en el apartado anterior se construye el set de calibración de acuerdo con las composiciones resumidas en la Tabla IV.6, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0-14 :g mL<sup>-1</sup> para ácido folínico, y de 0-20 :g mL<sup>-1</sup> para metotrexato.

**Tabla IV.6 .-** Set de calibración para la mezcla metotrexato-ácido folínico

<b>Muestra</b>	<b>[ácido folínico] :g mL<sup>-1</sup></b>	<b>[metotrexato] :g mL<sup>-1</sup></b>
M1	1	10
M2	4	10
M3	10	10
M4	14	10
M5	10	1
M6	10	2
M7	10	8
M8	10	10
M9	10	20

Se registran los espectros de absorción de las mismas en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 450 nm.

^ **Aplicación de PLS a la mezcla metotrexato-ácido fólico:**

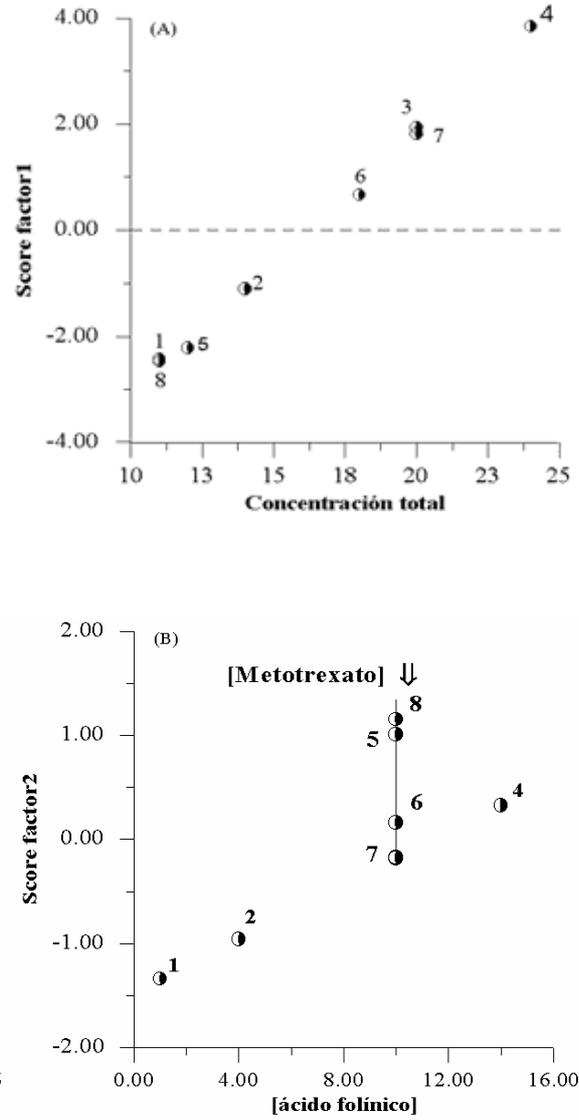
La matriz de calibración se ha optimizado utilizando la estadística habitual mediante el cálculo del valor del PRESS y comparación usando el parámetro F cuando se usa como número máximo de factores 5 y se realiza la descomposición espectral dejando fuera cada vez una única muestra con objeto de disponer de la máxima capacidad de predicción. La región espectral seleccionada ha sido la comprendida entre 230 a 403 nm (puntos experimentales totales = 476). Se aplican tanto PLS1 como PLS2. Al igual que en la determinación descrita en el apartado anterior ambos métodos resultan ser equivalentes al optimizarse mediante PLS1 un número de factores de dos para ambos componentes. Así, en los estudios posteriores nos referimos exclusivamente a la aplicación de PLS2. En la Tabla IV.7 se han resumido los principales parámetros estadísticos para el modelo tales como PRESS, F ratio y la probabilidad calculada.

**Tabla IV.7** .- *Parámetros estadísticos obtenidos mediante PLS2 para el modelo metotrexato-ácido folínico.*

<b>Factor</b>	<b>PRESS</b>	<b>SEP</b>	<b>F Ratio</b>	<b>Probabilidad</b>
0	221.75	5.6284	425.3	0.99999
1	268.69	6.1955	515.32	0.99999
<b>2</b>	<b>0.62138</b>	<b>0.29794</b>	<b>1.1917</b>	<b>0.58875</b>
3	0.5214	0.27292	1	0.5

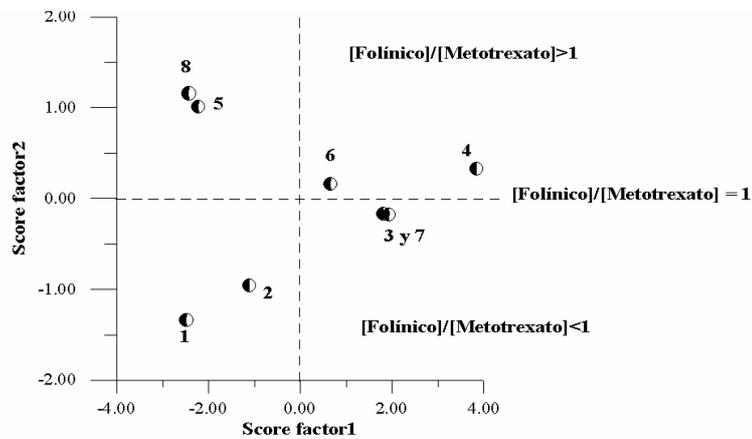
Como se puede observar en la tabla anterior el número óptimo es de dos factores de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas (17).

El análisis correspondiente a la evolución de los scores 1 y 2 con respecto a la concentración de los componentes pone de manifiesto que el score 1 presenta una relación lineal con respecto a la concentración total de cada muestra del set de calibración. El score 2 aumenta de forma lineal cuando aumenta la concentración de folínico, y para aquellas muestras que presentan la misma concentración de folínico, aumenta de forma drástica al disminuir la concentración de metotrexato (Figura IV.7).



**Figura IV.7.-** Influencia de la concentración total en el score 1 (a) Influencia de la concentración de ácido folínico en el valor del score 2 (b).

Estos hechos parecen indicar que el score 2 se puede relacionar con la proporción de ácido fólico /metotrexato en las muestras. Mediante la representación global de la evolución del score 2 frente al score 1 (Figura IV.8) llegamos a las siguientes conclusiones:



**Figura IV.8 .-** Variación del valor del score 2 frente al score 1 para el modelo ácido fólico - metotrexato.

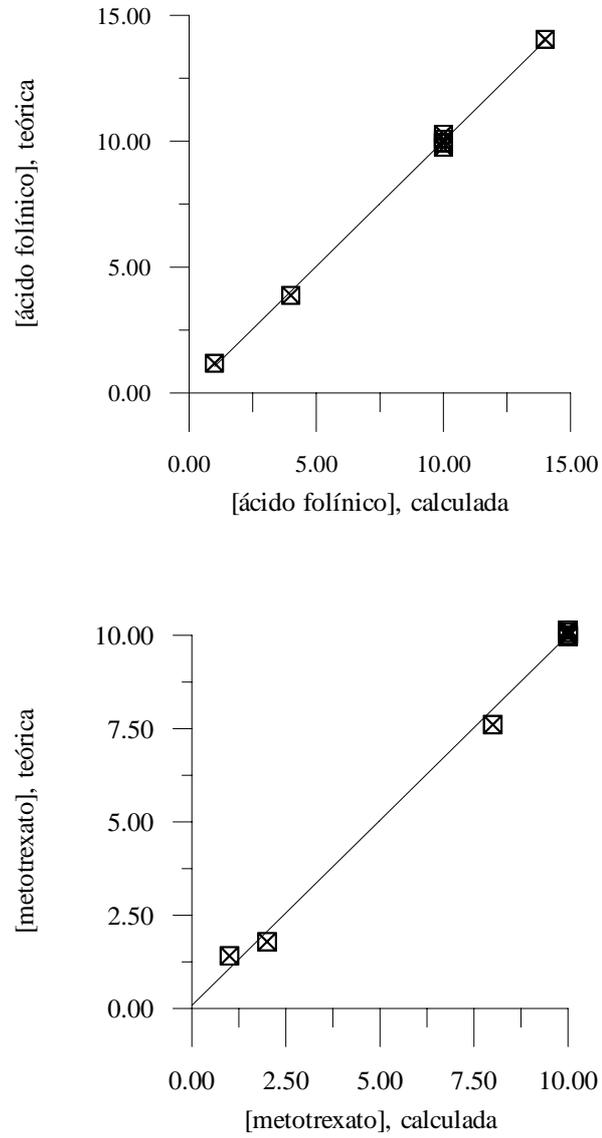
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el valor del score 1 viene determinado fundamentalmente por la aportación global de los componentes de la muestra mientras que el score 2 aumenta de forma drástica cuando aumenta el exceso de ácido fólico respecto al metotrexato, luego el loading 2 va a venir fundamentalmente determinado por la diferencia espectral entre ambos componentes.

Aplicando como número óptimo de factores el de dos, se evalúa la capacidad de predicción del modelo mediante el cálculo de los parámetros RMSD y  $R^2$

obtenidos a partir de la comparación entre las concentraciones teóricas y calculadas por el modelo optimizado. En la Figura IV.9 se han representado dichas concentraciones para ambos componentes resumiéndose los parámetros estadísticos correspondientes en la Tabla IV.8.

**Tabla IV.8** .- Parámetros estadísticos para el modelo ácido folínico- triamtereno

<b>Componente</b>	<b>RMSD</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Folínico</b>	0.15535	0.9984
<b>Metotrexato</b>	0.23138	0.9960



**Figura IV.9** .- Concentraciones teóricas del set de calibración frente a las concentraciones calculadas mediante el modelo optimizado.

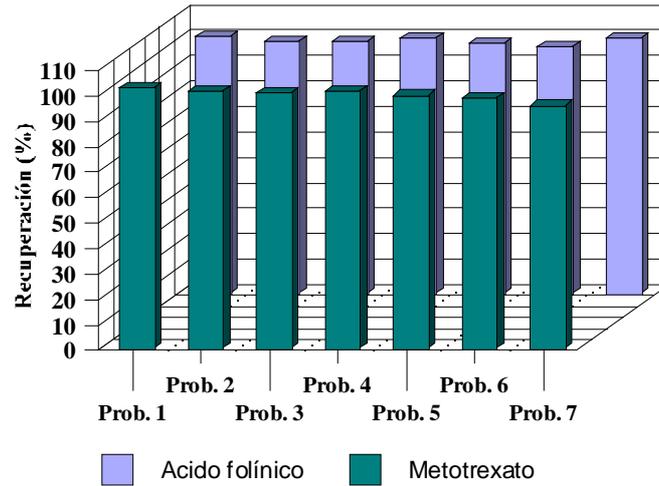
A continuación se construye un conjunto de predicción compuesto por siete problemas con concentraciones aleatoriamente distribuidas dentro de los intervalos de concentraciones establecidos en la matriz de calibración. Dichas muestras problemas se predicen utilizando el modelo optimizado para ácido folínico-metotrexato empleando PLS.

**Tabla IV.9 .- Determinación simultánea de metotrexato y ácido folínico en mezclas binarias problema**

Relación aproximada metotrexato/ácido folínico	[ácido folínico]		Recup (%)	[metotrexato]		Recup (%)
	Teórica	Calculada		Teórica	Calculada	
<b>5/1</b>	2.00	2.02	<b>101</b>	10.00	10.19	<b>102</b>
<b>10/8</b>	8.00	7.96	<b>100</b>	10.00	10.13	<b>101</b>
<b>10/12</b>	12.00	11.91	<b>99</b>	10.00	10.05	<b>100</b>
<b>10/16</b>	16.00	16.05	<b>100</b>	10.00	10.11	<b>101</b>
<b>10/18</b>	18.00	17.70	<b>98</b>	10.00	9.85	<b>98</b>
<b>1/2</b>	20.00	19.51	<b>98</b>	10.00	9.80	<b>98</b>
<b>4/10</b>	10.00	10.00	<b>100</b>	4.00	3.81	<b>95</b>

Los resultados obtenidos resultan ser adecuados en todos los casos presentando valores de recuperación entre 98 y 101 % para ácido folínico y entre 95 y 102 % para metotrexato.

En la Figura IV.10, se ha representado mediante un diagrama de barras los valores de recuperación para ambos componentes.



**Figura IV.10** .-Diagrama de barras correspondientes a los valores de recuperación obtenidos en la determinación simultánea de ácido folínico y metotrexato.

#### **IV.2.5.- Aplicación de los modelos PLS optimizados.**

Se han realizado las validaciones de los métodos optimizados al análisis de fluidos biológicos tales como orina y suero. Para ello se han construido matrices de calibración compuestas por patrones que contenían los componentes en estudio, así como una cantidad prefijada de orina o de suero, exentos de estos analitos con objeto de modelar la señal debida a los mismos. En ningún caso se ha aplicado a las muestras tratamientos previos de separación, simplemente han sido diluidas.

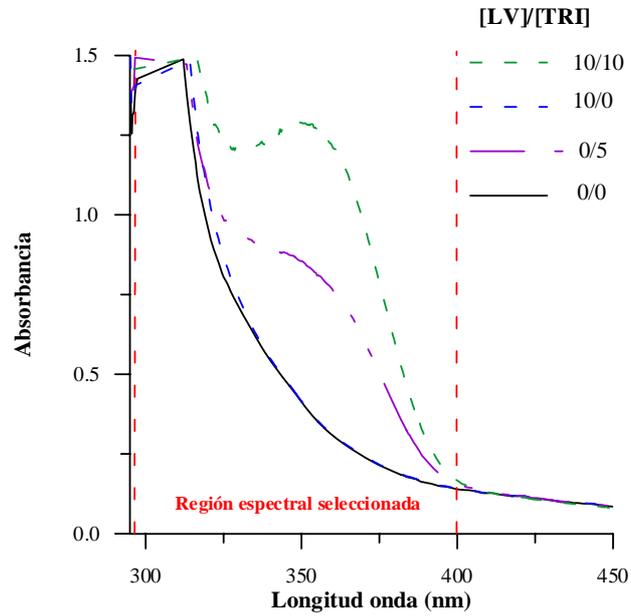
##### **IV.2.5.1.- Determinación de triamtereno (TRI) y ácido fólico (LV) en muestras de orina**

Se han preparado 11 muestras de calibración, a un pH fijo de 5.0, y con una cantidad constante de orina de 5.0 mL en un volumen final de 25.0 mL. Las concentraciones de los analitos están comprendidas entre 0 y 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para TRI y entre 0 y 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LV. La composición de la matriz de calibración se expone en la Tabla IV.10.

**Tabla IV.10** .- Composición de la matriz de calibración para la determinación de TRI y LV en orina.

Muestra	[Acido folínico], :g mL <sup>-1</sup>	[Triamtereno], :g mL <sup>-1</sup>
M1	2	10
M2	10	10
M3	15	10
M4	8	10
M5	10	3
M6	10	12
M7	0	5
M8	0	3
M9	10	0
M10	2	0
M11	0	0

La región espectral seleccionada para el análisis ha sido la comprendida entre 296 y 400 nm, debido a que a longitudes de onda menores de 296 nm se observa una gran señal debida a la orina. En el intervalo seleccionado podemos localizar los máximos correspondientes a los analitos con la menor interferencia posible por parte de la orina. En la Figura IV.11 podemos observar los espectros de absorción para muestras de orina conteniendo diversas proporciones de ambos analitos.



**Figura IV.11** .- Espectros de absorción a distintas concentraciones de analitos en orina

En la Tabla IV.11, se pueden observar los valores de parámetros estadísticos tales como PRESS y SEP para diferentes número de factores cuando se aplica PLS1, para ambos componentes.

**Tabla IV.11** .- Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de calibración mediante PLS1 para la determinación de TRI y LV en orina.

	<i>Componente ácido fólico</i>			
<b>Factor</b>	<b>PRESS</b>	<b>SEP</b>	<b>F Ratio</b>	<b>Probabilidad</b>
0	288.91	5.375	77.48	0.99999
1	311.76	5.5835	83.608	0.99999
2	6.7237	0.81998	1.8032	0.81689
3	6.8034	0.82483	1.8245	0.82155
<b>4</b>	<b>4.8171</b>	<b>0.69405</b>	<b>1.2918</b>	<b>0.65388</b>
5	4.0965	0.64004	1.0986	0.55757
6	3.7288	0.61064	1	0.5
7	3.9629	0.62951	0	0
	<i>Componente triamtereno</i>			
0	226.18	4.7558	1776.7	1
1	0.52426	0.22897	4.1181	0.98196
<b>2</b>	<b>0.1273</b>	<b>0.11283</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>
3	0.19636	0.14013	0	0
4	0.16626	0.12894	0	0
5	0.16666	0.12909	0	0
6	0.17969	0.13405	0	0
7	0.19526	0.13973	0	0

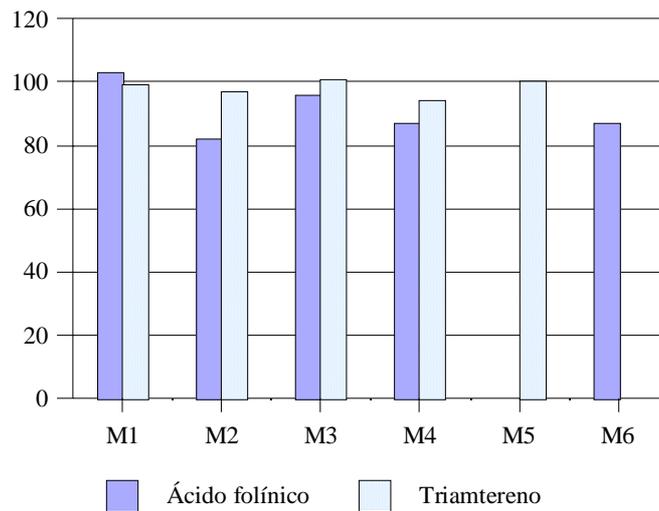
Como se puede observar el número óptimo de factores, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas, es 4 para el LV y 2 para el TRI.

Una vez optimizados el número de factores, se procedió a validar el modelo sobre un conjunto de

predicción, formado por mezclas de ambos componentes en concentraciones comprendidas en el intervalo recogido por la matriz. Los porcentajes de recuperación obtenidos para distintas concentraciones de analito se pueden observar en la siguiente Tabla IV.12.

**Tabla IV.12** .- Valores de recuperación obtenidos en la determinación de TRI y LV en orina

Muestra	Ácido fólico, mg L <sup>-1</sup>			Triamtereno, mg L <sup>-1</sup>		
	Añadido	Encontrado	Recup (%)	Añadido	Encontrado	Recup (%)
M1	5	5.12	<b>103</b>	10	9.94	<b>99</b>
M2	20	16.44	<b>82</b>	10	9.69	<b>97</b>
M3	10	9.62	<b>96</b>	5	5.05	<b>101</b>
M4	10	8.68	<b>87</b>	18	16.97	<b>94</b>
M5	0	0	---	10	10.01	<b>100</b>
M6	5	4.34	<b>87</b>	0	0.01	---



*Recuperaciones de triamtereno - ácido fólico en orina*

Los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 82-103 % y 94-101 % para LV y TRI respectivamente, pudiéndose considerar como satisfactorios dada la elevada señal de la orina y la escasa diferenciación espectral entre ambos componentes. Cuando se realiza la representación de los contenidos puesto en función de los encontrados se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$[\text{LV}] \text{ encont.} = 0.82 [\text{LV}] \text{ puesto}; R^2 = 0.9893; \Phi^2 = 0.43$$

$$[\text{TRI}] \text{ encont.} = 0.94 [\text{TRI}] \text{ puesto}; R^2 = 0.9977; \Phi^2 = 0.09$$

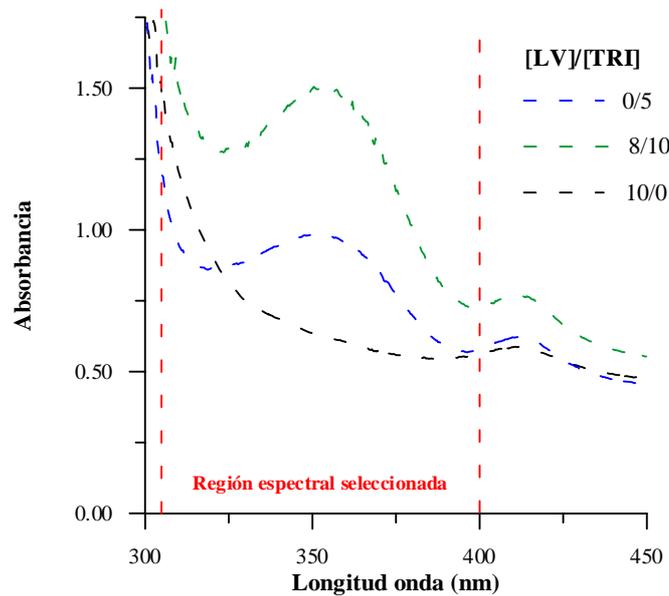
Se puede observar un mejor ajuste por regresión en la determinación de TRI.

#### **IV.2.5.2.- Determinación de TRI y LV en muestras de suero**

De forma similar a la anterior aplicación, se han preparado 11 muestras de calibración a un pH fijo de 5.0 y con una cantidad constante de suero de 2.0 mL en un volumen final de 10.0 mL. Este set de calibración tiene la misma distribución de concentraciones de ambos componentes que el set de calibración en el caso de muestras de orina.

La región espectral seleccionada, en este caso, ha sido la comprendida entre 305 y 400 nm. El máximo de absorción del ácido fólico situado a aproximadamente 300 nm está interfiriendo con la señal máxima que presenta el suero, por eso hemos delimitado un poco

más a longitudes de onda cortas, situando su límite a 305 nm para eliminar la máxima señal posible del suero. En cuanto a seleccionar el límite superior de longitudes de onda a 400 nm, es debido a que a esa longitud de onda, podemos observar el máximo de absorción del TRI y sin embargo estamos eliminando las señales que se obtienen a longitudes de ondas mayores de 400 nm que son debidas a la matriz biológica.



**Figura IV.12.-** Espectros de absorción con distintas concentraciones de analitos en suero.

En la Tabla siguiente se han resumido los valores de los parámetros estadísticos:

**Tabla IV.13** .- Parámetros estadísticos obtenidos para la determinación de LV y TRI en suero

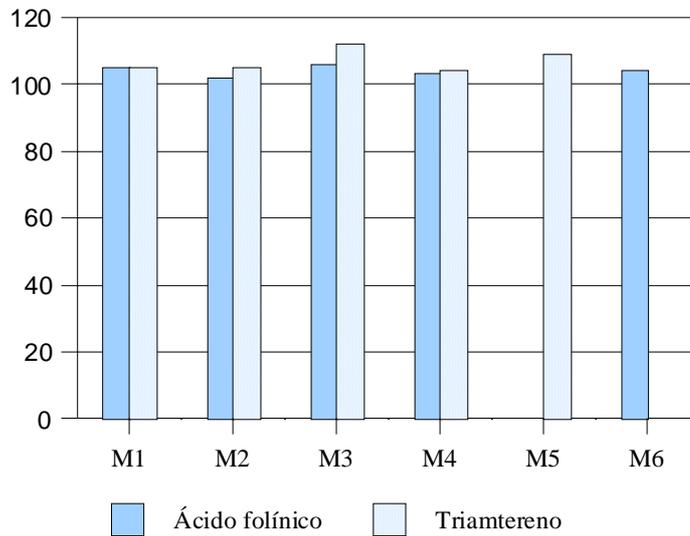
<b>Componente ácido fólico</b>				
<b>Factor</b>	<b>PRESS</b>	<b>SEP</b>	<b>F Ratio</b>	<b>Probabilidad</b>
0	288.91	5.375	333.33	1
1	315.37	5.6158	363.86	1
2	182.68	4.2741	210.77	1
3	12.829	1.1326	14.801	0.99972
4	2.9955	0.5473	3.4561	0.96824
5	1.9287	0.4392	2.2252	0.88833
<b>6</b>	<b>1.1609</b>	<b>0.3407</b>	<b>1.3394</b>	<b>0.6742</b>
7	0.86674	0.2944	1	0.5
<b>Componente triamtereno</b>				
0	226.18	4.7558	237.26	1
1	27.688	1.664	29.044	0.99995
2	9.011	0.94926	9.4523	0.99889
<b>3</b>	<b>0.95331</b>	<b>0.30876</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>
4	1.0428	0.32293	0	0
5	1.1484	0.33888	0	0
6	1.0522	0.32438	0	0
7	1.0117	0.31807	0	0

Como se puede observar, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas, el número de factores óptimos para el LV es de 6 y para el TRI son 3. Seis es un número demasiado elevado para modelar solo 2 componentes pero con un número inferior la probabilidad aumenta notablemente.

En las condiciones establecidas, los porcentajes de recuperación obtenidos para distintas concentraciones de analitos, están expuestos en la siguiente tabla:

**Tabla IV.14 .-** Valores de recuperación obtenidos para TRI y LV en suero mediante PLS

Muestra	Ácido folínico, mg L <sup>-1</sup>			Triamtereno, mg L <sup>-1</sup>		
	Añadido	Encontrado	Rec (%)	Añadido	Encontrado	Rec (%)
M1	5	5.22	<b>105</b>	10	10.47	<b>105</b>
M2	20	20.38	<b>102</b>	10	10.55	<b>105</b>
M3	10	10.6	<b>106</b>	5	5.62	<b>112</b>
M4	10	10.25	<b>103</b>	18	18.66	<b>104</b>
M5	0	0.42	---	10	10.88	<b>109</b>
M6	5	5.18	<b>104</b>	0	---	---



*Recuperaciones de triamtereno - ácido folínico en suero*

El ajuste de regresión puesto encontrado nos permitió calcular las ecuaciones siguientes:

$$[\text{LV}] \text{ encont.} = 1.00 [\text{LV}] \text{ puesto}; R^2 = 0.9969; \Phi^2 = 0.1839$$

$$[\text{TRI}] \text{ encont.} = 1.03 [\text{TRI}] \text{ puesto}; R^2 = 0.9987; \Phi^2 = 0.06$$

Valores de regresión adecuada para la determinación simultánea de ambos analitos en suero.

#### **IV.2.5.3.- Determinación de MTX y LV en muestras de orina**

Cuando se plantea la determinación de la mezcla formada por el metotrexato y ácido folínico en suero y orina la principal dificultad, al igual que en el caso de los otros dos componentes, es la elevada señal proporcionada por orina y suero sin tratar y el notable solapamiento observado entre el fondo de este tipo de muestras y los componentes. En el caso de la orina se ensayaron diferentes volúmenes de orina, estableciéndose la viabilidad de la resolución con 3.0 mL de orina sin tratar en un volumen final de 25.0 mL.

El método operatorio ha sido el siguiente: se han preparado 10 muestras de calibración a un pH fijo de 5.0 y con una cantidad constante de orina de 3.0 mL en un volumen final de 25.0 mL. Las concentraciones de analitos están comprendidas entre 0 y 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para MTX y 0 y 14  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LV. La composición de la matriz de calibración esta resumida en el Tabla IV.15.

**Tabla IV.15.-** Composición de la matriz de calibración para la determinación de LV y MTX en presencia orina.

Muestra	[Ácido folínico] :g mL <sup>-1</sup>	[Metotrexato] :g mL <sup>-1</sup>
M1	2	10
M2	4	10
M3	12	10
M4	14	10
M5	10	4
M6	10	2
M7	10	8
M8	10	10
M9	0	0

Como se puede observar en la Figura IV.13, el solapamiento es extremadamente elevado. La región espectral más apropiada para determinar ambos analitos en muestras de orina, se ha establecido analizando exhaustivamente los parámetros estadísticos de la calibración, así como el número de factores en diversas zonas espectrales.

En la Tabla IV.16 podemos observar los resultados obtenidos.

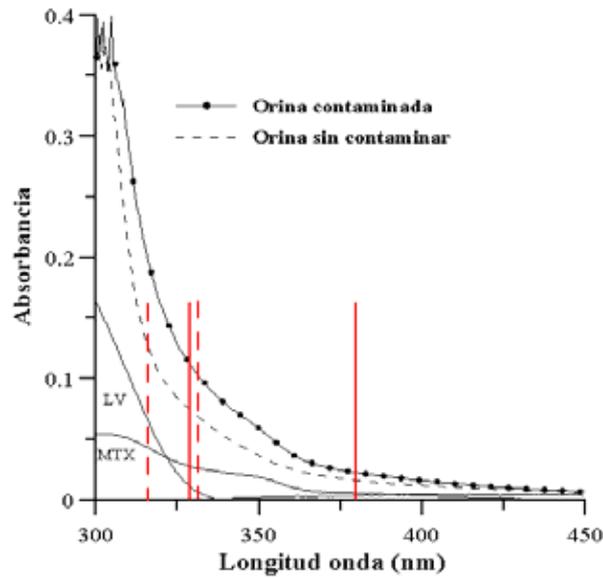
**Tabla IV.16.-** Número óptimo de factores y parámetros de calibración para el análisis de orina mediante PLS

**Leucovorín**

Longitud de onda (nm)	Número factores	R <sup>2</sup>	PRESS	REP (%)
304-336	7	0.9292	13.3	14.05
313-336	5	0.9866	2.51	6.11
315-336	4	0.9876	2.32	5.87
<b>318-336</b>	<b>2</b>	<b>0.9886</b>	<b>1.95</b>	<b>5.39</b>
322-336	3	0.9883	2.19	5.71

**Metotrexato**

Longitud de onda (nm)	Número factores	R <sup>2</sup>	PRESS	REP (%)
315-380	5	0.9989	0.293	2.04
315-383	5	0.9886	1.95	5.39
322-336	3	0.9883	2.19	5.71
333-384	4	0.9993	0.19	1.67
<b>333-390</b>	<b>4</b>	<b>0.9994</b>	<b>0.18</b>	<b>1.59</b>
333-420	4	0.9993	0.19	1.62



**Figura IV.13 .-** Espectros de absorción de muestras de orina sin contaminar y contaminada con MTX ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) y LV ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), soluciones patrón de MTX ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) y LV ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las líneas verticales discontinuas indican el rango óptimo de longitudes de onda para LV. Las líneas verticales sólidas indican el rango óptimo de longitudes de onda para MTX.

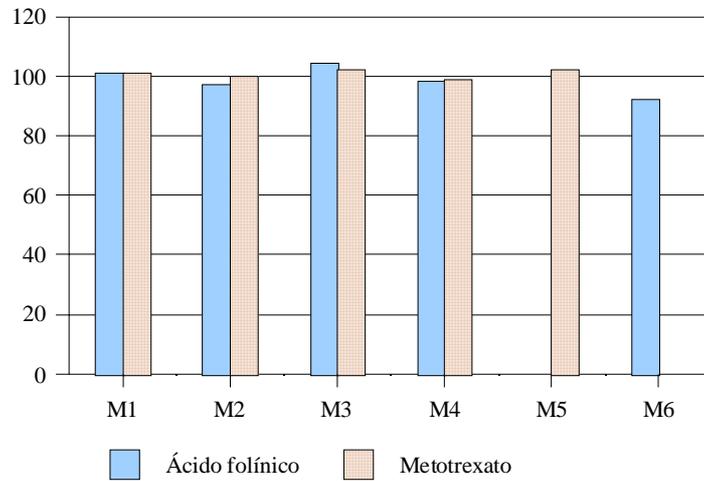
Se puede observar que el número óptimo de factores para LV es 2 en el intervalo comprendido entre 318-336 nm; sin embargo para MTX es 4 en el intervalo 333-390 nm, zonas en las cuales se obtienen los mejores parámetros estadísticos.

Una vez obtenido el número de factores óptimos, se procedió como en el caso anterior a validar el modelo sobre un conjunto de predicción, al cual aplicamos el método optimizado. Los porcentajes de recuperación

obtenidos para distintas concentraciones de analito se pueden observar en la Tabla IV.17.

**Tabla IV.17** .- Valores de recuperación obtenidos en la determinación de LV y MTX en orina.

Muestra	Ácido fólnico			Metotrexato		
	Teórico	Encontrado	% Rec	Teórico	Encontrado	% Rec
M1	6	6.04	<b>101</b>	10	10.1	<b>101</b>
M2	20	19.4	<b>97</b>	10	9.97	<b>99.7</b>
M3	10	10.4	<b>104</b>	6	6.13	<b>102</b>
M4	10	9.82	<b>98.2</b>	18	17.9	<b>99.4</b>
M5	0	---	---	10	10.2	<b>102</b>
M6	4	3.84	<b>92.3</b>	0	---	---



*Recuperaciones de metotrexato - ácido fólnico en orina*

[LV] encontrado = 0.98 [LV] puesto;  $R^2 = 0.9979$ ,  $\sigma^2 = 0.78$

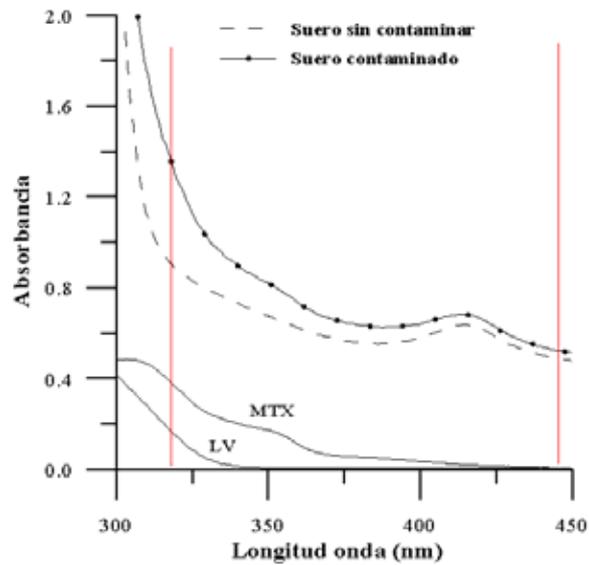
[MTX] encontrado = 0.99 [MTX] puesto;  $R^2 = 0.9975$ ;  $\sigma^2 = 0.1081$

#### **IV.2.5.4.- Determinación de LV y MTX en muestras de suero**

En el caso de la aplicación en muestras de suero el método operatorio ha sido similar al descrito anteriormente. En este caso solo se pudieron añadir hasta 2.0 mL de suero en un volumen final de 10.0 mL.

Se han preparado 10 muestras de calibración a un pH fijo de 5.0 y con una cantidad constante de suero de 2.0 mL en un volumen final de 10.0 mL. Este grupo de calibración tiene la misma distribución de concentraciones de ambos componentes que el grupo de calibración en el caso de muestras de orina.

Como se puede observar en la Figura IV.14, la región espectral seleccionada para el análisis de ambos componentes mediante PLS es la comprendida entre 318 y 446 nm, ya que ahí eliminamos gran parte de las interferencias posibles por parte de la matriz biológica.



**Figura IV.14** .- Espectros de absorción de muestras de suero sin contaminar y contaminadas con LV ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) y MTX ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), soluciones patrón de MTX ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) y LV ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las líneas verticales indican el rango óptimo de longitudes de onda para MTX y LV

En la Tabla IV.18 se han resumido los valores de los parámetros estadísticos obtenidos para la calibración, en las diferentes zonas espectrales estudiadas.

**Tabla IV.18.-** Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de LV y MTX en suero

**Leucovorín**

Longitud de onda (nm)	Número factores	R <sup>2</sup>	PRES S	REP (%)
307-446	4	0.9948	0.9630	4.09
311-446	4	0.9954	0.8390	3.82
315-446	4	0.9967	0.606	3.24
<b>318-446</b>	<b>4</b>	<b>0.9969</b>	<b>0.576</b>	<b>2.68</b>
326-446	4	0.9904	1.77	5.55

**Metotrexato**

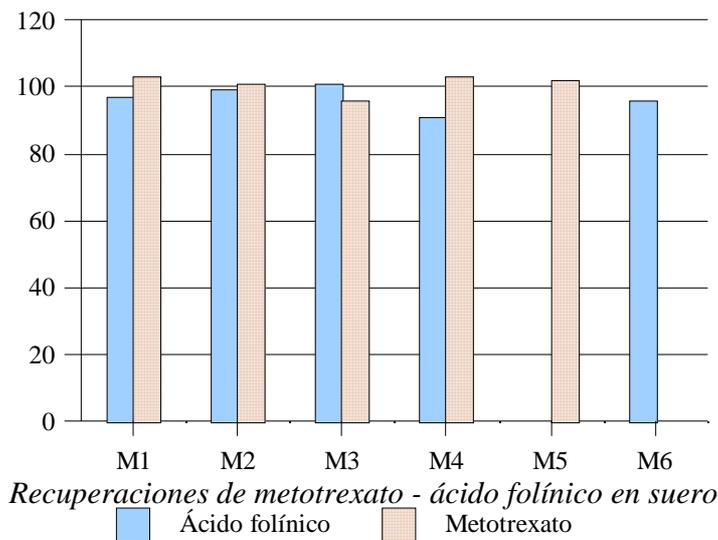
Longitud de onda (nm)	Número factores	R <sup>2</sup>	PRE SS	REP (%)
307-446	4	0.9901	1.27	5.28
311-446	3	0.9913	1.13	4.98
315-446	3	0.9914	1.12	4.95
<b>318-446</b>	<b>3</b>	<b>0.9907</b>	<b>1.11</b>	<b>4.93</b>
326-446	3	0.9912	1.19	5.11

Como se puede observar, el número de factores óptimos es de 4 para LV y 3 para MTX en la región espectral de 318-446 nm.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para distintas concentraciones de analitos, están expuestos en la siguiente Tabla IV.19.

**Tabla IV.19** .- Valores de recuperación para la determinación de LV y MTX en suero.

Muestra	Ácido folínico			Metotrexato		
	Teórico	Encontrado	Rec (%)	Teórico	Encontrado	Rec (%)
M1	6	5.8	<b>97</b>	10	10.3	<b>103</b>
M2	20	19.8	<b>99</b>	10	10.1	<b>101</b>
M3	10	10.1	<b>101</b>	6	5.8	<b>96</b>
M4	10	9.1	<b>91</b>	18	18.5	<b>103</b>
M5	0	---	---	10	10.2	<b>102</b>
M6	4	3.8	<b>96</b>	0	---	---



*Recuperaciones de metotrexato – ácido folínico en suero*

A pesar de las dificultades mencionadas debido a las indeseables características espectrales de ambos componentes en presencia de suero sin tratar, los valores de recuperación se pueden considerar como

aceptables en la mayoría de los casos, siendo las características de la regresión las siguientes:

[LV] encont. = 0.99 [LV] puesto ;  $R^2 = 0.9975$ ;  $\Phi^2 = 0.71$

[MTX]encont =1.10 [MTX] puesto;  $R^2 = 0.9979$ ;  $\Phi^2 = 0.11$

Cuando comparamos los resultados obtenidos mediante PLS con los calculados mediante espectrofotometría de derivada (Capítulo anterior) podemos concluir que aunque la técnica de espectrofotometría de derivada es más simple de emplear, se necesita una dilución notable (1:100) en la orina con objeto de poder eliminar su señal. Las muestras de suero que presentan un fondo más complejo, necesitan para su análisis procedimientos más selectivos.

Cuando aplicamos PLS, la predicción de LV y MTX, tanto en suero como en orina arroja resultados satisfactorios siendo necesario una dilución 1:5 para suero y 1:8 para orina. Teniendo en cuenta la complejidad de las muestras, y aunque el análisis de regresión ofrece resultados satisfactorios, sin embargo, somos conscientes de lo limitado del análisis y creemos conveniente profundizar en estas determinaciones a través de algoritmos más potentes a la hora de discriminar y diferenciar información espectral compleja.

### IV.3.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Shepherd, P., *J. Chemometr.*, **1**, 3 (1987)
- 2.- Kowalski, B.R., *Chemometrics: Theory and Application*, American Chemical Society, Washington, Dc, (1977)
- 3.- Martens, H. y Naes, T., "Multivariate calibration"; John Wiley and Sons. Chichester, (1989)
- 4.- Beebe, K. R. y Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, **59**, 1007A (1989).
- 5.- Thomas, E. V. y Haaland, D. M., *Anal. Chem.*, **62**, 1091 (1990).
- 6.- Ketterer, M. E., Rescht, J. J. y Peters, M. J., *Anal. Chem.*, **61**, 2031 (1989).
- 7.- Janatch, G., Kruse-Jarres, J.D., Marbach, R. y Heise, H.M., *Anal. Chem.*, **61**, 2016 (1989).
- 8.- Otto, M. y Thomas, J.D.R., *Anal. Chem.*, **57**, 2647 (1985).
- 9.- Lindberg, W., Ohman, J., Wold, S. y Martens, H., *Anal. Chim. Acta.*, **174**, 41 (1985).
- 10.- Carey, W.P., Wangen, L.E. y Dyke, J. T., *Anal. Chem.*, **61**, 1667 (1989).
- 11.- Otto, M. y Wegscheider, W., *Anal. Chem.*, **57**, 63 (1985).
- 10.- Stark, E., Luchter, K. y Margoshes, M., *Appl. Spectrosc. Rev.*, **22**, 335 (1986).
- 11.- Tauler, R., Casassas, E., *Anal. Chem. Acta*, **223**, 257 (1989).
- 12.- Haaland, D.M., Thomas, E. V., *Anal. Chem.*, **60**, 1193 (1988).

- 13.- Haaland, D. M. y Thomas, E. V., *Anal. Chem.*, **60**, 1202 (1988).
- 14.- Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F. y Zamoro, A., *Anal. Chim. Acta*, **258**, 47 (1992).
- 15.-Durán-Merás, I., Muñoz de la Peña, A., Espinosa-Mansilla, A. y Salinas, F., *Analyst*, **118**, 807 (1993)
- 16.- Espinosa-Mansilla, A., Salinas, F y Zamoro, A., *Analyst*, **119**, 1183 (1994).
- 17.-Galeano Díaz, T., Acedo Valenzuela, M.I. y Salinas, F., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 692 (1994).
- 18.-Galeano Díaz, T., Guiberteau Cabanillas, A., Ortiz Burguillos, J.M. y Salinas, F., *Analyst*, **122**, 513 (1997).
- 19.- Espinosa Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F. y Martínez Galera, M., *Anal. Chim. Acta*, 347, 371 (1993).
- 20.-Espinosa Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F. y Martínez Galera, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **347**, 371 (1993).
- 21.- Espinosa Mansilla, A., Salinas, F. y de Orbe Payá, I., *Anal. Chim. Acta*, **313**, 103 (1995).
- 22.- Espinosa Mansilla, A., Salinas, F. y de Orbe Payá, I., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**, 245 (1996).
- 23.-Espinosa Mansilla, A., Durán-Merás, I. y Salinas, F., *J. of Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 1325 (1998).
- 24.- Goicoechea, H.C., Olivieri, A.C. y Muñoz de la Peña, A., *Anal. Chim. Acta*, **384**, 95 (1999).
- 25.-Mahedero, M.C., Galeano Díaz, T. y Galán Pascual, S., *J. of Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 477 (2002)

- 26.- Salinas, F., Espinosa Mansilla, A. y López de Alba, P.L., *Analisis*, **22**, 188 (1994).
- 27.- Salinas, F., Espinosa Mansilla, A. y López de Alba, P.L., *Anal. Letters*, **28**, 193 (1995).
- 28.- Jiménez Arrabal, M., Valiente González, P., Muñoz de la Peña, A., Caro Gómez, C. y Sánchez Misiego, A., *Analyst*, **119**, 1537 (1994).
- 29.- Muñoz de la Peña, A., Durán Merás, I., Moreno, M.D., Salinas, F. y Martínez Galera, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 571 (1995).
- 30.- Durán Merás, I., Muñoz de la Peña, A., Rodríguez Cáceres, M.I. y Salinas, F., *Talanta*, **45**, 899 (1998).
- 31.- Muñoz de la Peña, A., Durán Merás, I., Moreno, M.D., Salinas, F. y Martínez Galera, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **353**, 211 (1995).
- 32.- Muñoz de la Peña, A., Moreno, M.D., Durán Merás, I. y Salinas, F., *Talanta*, **43**, 1349 (1996).
- 33.- Murillo Pulgarín, J.A., Alañón, A., Fernández, P., Muñoz de la Peña, A. y Espinosa\_Mansilla, A., *Analyst*, **123**, 1073 (1998)
- 34.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Galián, R., *Applied Spectrosc.*, **55** (6), 701 (2001)
- 35.- Galeano Díaz, T., Durán\_Merás, I., Correa, C.A., Roldán Murillo, B. y Rodríguez Cáceres, M.I., *J. Agric. Food Chem.*, **51** (24), 6934 (2003)
- 36.- Galeano Díaz, T., Durán\_Merás, I. y Alexanfre Franco, M.F., *Talanta*, en prensa

- 37.- Guiberteau Cabanillas, A., Galeano Díaz, T., Espinosa Mansilla, A. y Salinas López, F., *Talanta*, **41**, 1821 (1994).
- 38.- Guiberteau Cabanillas, A., Galeano Díaz, T., Espinosa Mansilla, A., López de Alba, P.L. y Salinas López, F., *Anal. Chim. Acta*, **302**, 9 (1995).
- 39.- Guiberteau, A., Galeano Díaz, T., Salinas, F y Ortiz, J.M., *Anal. Chim. Acta*, **305**, 219 (1995)
- 40.- Galeano Díaz, T., Guiberteau Cabanillas, A., Acedo Valenzuela, M.I. y Salinas, F., *Analyst*, **121**, 547 (1996)
- 41.- Galeano Díaz, T., Guiberteau Cabanillas, A., Alexandre Franco, M.F., Salinas, F. y Viré, J.C., *Electroanalysis*, **10 (7)**, 497 (1998)
- 42.- Guiberteau Cabanillas, A., Galeano Díaz, T., Mora Diez, N., Salinas, F., Ortiz, J.M. y Viré, J.C., *Analyst*, **125**, 909 (2000)
- 43.- Guiberteau Cabanillas, A., Galeano Díaz, T., Mora Diez, N., Salinas, F., Ortiz, J.M. y Viré, J.C., *Computers & Chemistry*, **25**, 459 (2001)
- 44.- Galeano Díaz, T., Espinosa\_Mansilla, A., Roldán Murillo, B. y Salinas, F., *Electroanalysis*, **15 (7)**, 646 (2003)
- 45.- Galeano Díaz, T., Durán Merás, I. y Alexandre Franco, M.F., *Anal. Chim. Acta*, en prensa
- 46.- Espinosa Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F. y Zamoro, A., *Quim. Anal.*, **13**, 106 (1994)
- 47.- Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A. y Salinas, F., *Analyst*, **120**, 2567 (1995)

*Capítulo IV.- Aplicación al análisis multivariante (PLS)*

- 48.-Muñoz de la Peña, A., Acedo Valenzuela, M.I., Espinosa Mansilla, A. y Sánchez Maqueda, R., *Talanta*, **56**, 635 (2002).
- 49.-Gil García, M.D., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J.L., Martínez Galera, M., Muñoz de la Peña, A. y Salinas, F., *Anal. Chim. Acta*, **348**, 177 (1997).

**Capítulo V.**

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE  
ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO  
MEDIANTE ANÁLISIS MULTIVARIANTE  
HLA**

## **V.1.- INTRODUCCION**

### **V.1.1.- HLA (Hybrid Linear Analysis) como un nuevo algoritmo en análisis multivariante**

Como ya hemos comentado un objetivo común en Química Analítica es calcular la concentración de especies presentes de interés en muestras complejas formadas por diversos componentes. Generalmente estos componentes dificultan y a veces impiden la determinación utilizando métodos univariantes. La utilización de los métodos multivariantes, como los indicados en esta Introducción, en muchos casos permiten realizar el análisis de interés modulando las interferencias de los otros componentes presentes, pero a veces no. Los resultados obtenidos dependen del algoritmo utilizado, y la elección de este algoritmo, depende de muchos factores, tales como, el número de medidas que pueden llevarse a cabo y de la naturaleza de dichas medidas.

Recientemente, se dispone de un nuevo algoritmo denominado “Análisis Lineal Híbrido (HLA)” que aporta diferencias sustanciales en cuanto al tratamiento de las señales globales proporcionadas por una muestra compleja. Este método combina las ventajas de los ya discutidos métodos que utilizan el espectro del componente puro, tal como CLS, con las ventajas de los modelos que ignoran todas las especies presentes sin interés para el análisis. De ahí el nombre de “híbrido”. Dicho método, trata de sacar de toda la señal aquella

parte que aporta información concreta con respecto al componente de interés diferenciándolo del resto.

Se trata de un método basado en análisis factorial, que elimina la necesidad de elegir un número de factores óptimo durante la calibración. Este método está basado en el concepto de señal del analito neto (net analyte signal, NAS) descrito por Lorber y col (1).

### **V.1.2.- Concepto de señal neta del analito (NAS)**

Se considera la señal neta del analito, como la parte de su espectro ortogonal al subespacio formado por los espectros de los demás componentes, y solamente el NAS de un componente conlleva la información necesaria para su cuantificación. El subespacio obtenido de esta manera contiene la información espectral que no está relacionada con el componente de interés. La parte ortogonal del espectro del componente se calcula como su proyección ortogonal (1). El NAS del componente en cada muestra está relacionado con la concentración a través de un modelo de calibración basado en mínimos cuadrados. En el trabajo de Xu y col (2) se destaca el hecho de que se puede llevar a cabo un modelo de calibración adecuado para un determinado componente, sin necesidad de elegir un número de factores óptimo. Esta característica abriría un campo amplio en cuanto a la posibilidad de automatizar los procedimientos

Fundamento teórico.- Empleamos la siguiente notación para realizar la discusión teórica del algoritmo;

las letras mayúsculas en negrilla se emplean para definir las matrices, las minúsculas para las columnas del vector, y las normales en itálica para los escalares. El superíndice T indica la traspuesta del vector o matriz y el superíndice +, la pseudoinversa de una matriz no cuadrada de un sistema sobreajustado. El espectro digitalizado se considera como un un “vector espectral o simplemente como un vector”, mientras que el vector espectral de un componente puro se denomina “vector componente”. El número de componentes de una mezcla se denomina  $n$  ; el tamaño del set de calibración, es decir el número de muestras de calibración diseñado es  $I$  y la dimensión del vector espectral, es decir el número de elementos del vector espectral se denomina  $J$ .

En regresión de componentes principales, la predicción de la concentración de  $k$  componentes en una mezcla desconocida se puede llevar a cabo mediante la ecuación:

$$c_{\text{desconocida}} = \mathbf{d}_{\text{desconocido}}^T \mathbf{D}^+ \mathbf{c}$$

donde  $\mathbf{d}_{\text{desconocido}}$  es el vector de respuesta de la muestra desconocida, la matriz  $\mathbf{D}^+$  es la pseudoinversa de la matriz de calibración  $\mathbf{D}$  ( $I \times J$ ), y  $\mathbf{c}$  es el vector de la concentración del componente  $k$  en el set de calibración (3, 4). De acuerdo con PCR, el término  $\mathbf{D}^+ \mathbf{c}$  de la ecuación anterior es normalmente conocido como el “vector de regresión” y nombrado por  $\mathbf{b}_k$  para el componente  $k$ .

$$\mathbf{b}_k = \mathbf{D}^+ \mathbf{c}$$

La señal del analito neto de un componente  $k$ ,  $\mathbf{r}_{\text{NAS}}$  se puede determinar como la proyección ortogonal siguiente :

$$\mathbf{r}_k^{*} = [\mathbf{I} - (\mathbf{R}_{-k})^+(\mathbf{R}_{-k})] \mathbf{r} = \mathbf{P} \mathbf{r} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector componente de un componente  $k$  de concentración unidad;  $\mathbf{I}$  es una matrix unitaria  $J \times J$ ;  $\mathbf{R}_{-k}$  es una matriz,  $J \times A$ , que contiene las sensibilidades para todos los componentes excepto la del componente  $k$ , siendo  $A$  el número de factores usados para construir el modelo,  $\mathbf{P}$  es la matriz de proyección  $J \times J$  la cuál proyecta un vector dado en el espacio NAS. El NAS del componente  $k$  se puede usar para predecir la concentración de muestras desconocidas.

Muy recientemente, el cálculo de  $\mathbf{R}_{-k}$  se ha definido por la siguiente expresión:

$$\mathbf{R}_{-k} = \hat{\mathbf{R}} - \lambda_k \hat{\mathbf{r}} \hat{\mathbf{r}}^T \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $\hat{\mathbf{R}}$  es la matriz de respuesta reconstruida usando el primer factor de  $\mathbf{R}$ ,  $\hat{\mathbf{r}}$  es la proyección del vector concentración de la calibración en el espacio de dimensión  $A$ , es una combinación lineal de las líneas de que contienen una contribución del espectro del componente  $k$ , y  $\lambda_k$  es un escalar definido como:

$$c_k = 1/\hat{r}^T \hat{R} \hat{c}_k$$

Ecuación 3

el cuál puede ser entendido como la inversa de la concentración estimada para  $k$  en . Un espectro Se puede usar para calcular  $R_k$  usando las ecuaciones 2 y 3 y no necesariamente el espectro puro  $s_k$ . Sin embargo, es admisible usar un espectro que contenga la máxima información en cuanto a los analitos de interés. Una buena elección es utilizar un espectro medio de los de la calibración, donde ninguno sea 0 de concentración. Por otra parte, en el algoritmo HLA la contribución del analito puro  $k$  se elimina de la matriz de respuesta antes del cálculo de los factores. Este hecho genera que se trabaje con un número menor de factores que PCR o PLS. (2,3).

El método HLA necesita construir una matriz de datos  $R_k = [R - c_k s_k^T]$  y usando el primer factor de  $(R_k^T R_k)$  definir la matriz de proyección  $P$ . La concentración del componente  $k$  en una muestra desconocida se obtiene a partir de su espectro  $r$  como:

$$c_k = \frac{s_k^T P r}{s_k^T P s_k} = \frac{s_k^T P P r}{s_k^T P P s_k} = \frac{(s_k^*)^T r_k^*}{\|s_k^*\|^2}$$

la ecuación anterior es la base de la capacidad de predicción de los métodos basados en NAS.

Recientemente Xu y Schechter han descrito un procedimiento similar al HLA (2) el cuál no necesita el conocimiento del espectro del componente puro  $\mathbf{s}_k$ . Para obtener la matriz  $\mathbf{R}_{-k}$ , se obtiene el espectro medio de la matriz de calibración :

$$\bar{\mathbf{r}} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I \mathbf{r}_{i,\text{cal}}$$

donde  $\mathbf{r}_{i,\text{cal}}$  es el espectro para una muestra  $i$  de la calibración. Entonces, la contribución del analito  $k$  es sustraída de la matriz de datos  $\mathbf{R}$  de la siguiente manera:

$$\mathbf{R}_{-k} = \mathbf{R} - \frac{\mathbf{c}_k \bar{\mathbf{r}}_{\text{cal}}^T}{\bar{c}_{k,\text{cal}}}$$

donde  $\bar{c}_{k,\text{cal}}$  es la media de las concentraciones de calibración del analito  $k$ . La aproximación por mínimos cuadrados a  $\mathbf{s}_k$  es a continuación aplicada para calcular  $\mathbf{s}_k^*$ :

$$\mathbf{s}_k^* = \mathbf{P} \mathbf{s}_{k,\text{MC}} = \mathbf{P} \frac{\mathbf{R}^T \mathbf{c}_k}{\mathbf{c}_k^T \mathbf{c}_k}$$

*Ecuación 4*

Xu y Schechter sugieren usar todos los  $I$  factores de  $\mathbf{R}_{-k}$  para la predicción, y así construir un método libre de la necesidad de optimizar el número de factores. Más

tarde, Goicoechea y Olivieri (4) proponen el denominado HLA/GO donde sí realizan una selección del número óptimo de factores mediante una validación cruzada (cross-validation). Este procedimiento trabaja de una forma similar a HLA, siendo una variante del original, y puede ser usado cuando el número de muestras excede el límite recomendado de una tercera parte del número de sensores.

Hay que destacar que cuando se producen pequeñas no linealidades en el set de calibración, solamente la parte lineal es utilizada para generar la  $\mathbf{R}_k$ . Para poder realizar esta transformación serán necesarios un número de factores extras.

### **V.1.3.- Selectividad, sensibilidad y límites de detección**

La determinación de los parámetros de calidad de un método multivariante han sido una de las lagunas más importantes a la hora de la aplicación y comparación de los resultados obtenidos entre varias técnicas. En la literatura existen varios intentos para determinarlos en análisis multivariante, la denominación de figuras de merito se ha impuesto en la bibliografía actual para denominar estos parámetros de calidad (5,6). Existe un método basado en NAS de forma similar a la propuesta por Boqué y Rius para CLS y que fué extendido posteriormente a regresión inversa por Lorber (7). Se define un límite de detección con respecto a la señal como:

$$LOD = t(\alpha, \beta) \cdot r$$

donde  $t(\alpha, \beta)$  es el parámetro no centralizado de una distribución t no-central, el cuál puede ser calculado numéricamente (5) o tomado de tablas (8) y  $r$  es una estimación de la desviación estándar de las medidas.

El cálculo del NAS también permite estimar otras figuras de merito tales como la selectividad y la sensibilidad.

La selectividad (6) se puede expresar como

$$SEL = \frac{\|s_k^*\|}{\|s_k\|}$$

donde  $\|s_k^*\|^2$  es la norma del espectro del componente puro y  $\|s_k\|^2$  la norma del espectro total de la muestra. La sensibilidad (6) se puede calcular como

$$SEN = \frac{1}{\|b\|}$$

siendo  $b$  el vector del coeficiente de regresión que se puede calcular mediante los métodos multivariante.

Quizás el término más controvertido en análisis multivariante sea el límite de detección. Se puede definir como  $LOD = 3.22 \sqrt{b^2}$ , donde 3.22 es una medida del ruido instrumental y  $b$  es la norma del vector coeficiente de regresión. Existe una amplia polémica en cuanto a la aplicación de esta ecuación, ya que la cantidad de analito que puede ser detectada

depende de las concentraciones presentes de cada interferente (6). En principio una posibilidad es calcular el valor de  $2,2$  mediante el registro de varios espectros de las muestras usadas como blanco, calcular la norma del NAS para cada una de ellas y la correspondiente desviación estándar.

Como una alternativa para obviar la influencia de la presencia de otras especies interferentes en la señal del blanco se puede construir un set de predicción del blanco, de manera que, siendo blanco en el componente de interés, contenga a las otras especies presentes en un intervalo de concentraciones similares a las incluidas en la matriz, de esta manera la predicción del cero y su correspondiente desviación estándar, englobaría a todas las posibles muestras problemas (9).

La sensibilidad analítica, ( se considera como un parámetro más útil a la hora de comparar resultados. Aquí se define de forma similar a la realizada en análisis univariante como:  $(= SEN/*r$ , donde  $*r$  es una estimación de la desviación estándar de la medida. El valor de  $*r$  se calcula como el vector NAS obtenido a partir de numerosos blancos para la muestra en estudio, o como ya hemos indicado antes, blancos para el componente de interés.

#### **V.1.4.- Aplicaciones**

En cuanto a las aplicaciones del algoritmo HLA al análisis, hemos de destacar que actualmente los trabajos

publicados son escasos, dado lo novedoso del mismo. La mayoría de las citas relacionadas han sido ya recogidas en la discusión teórica de dicho procedimiento, ya que se refieren fundamentalmente a tratamiento matemático y descripción de los diversos parámetros del citado algoritmo.

Desde el punto de vista de la aplicación analítica cabe destacar el trabajo publicado por Olivieri y col. (4) referido al análisis de *tetraciclinas* en suero donde se lleva a cabo la optimización mediante HLA, con aportación de cuantiosa y calificada información teórica y comparación con PLS. También queremos destacar el publicado por estos mismos autores(10) donde utiliza el compuesto denominado *bromhexina* para llevar a cabo un estudio de optimización de la selección de longitudes de onda mediante la utilización del mínimo error indicador (EI) . Los resultados obtenidos se estudian comparativamente sobre muestras reales y simuladas por aplicación de HLA y PLS.

Recientemente, se ha publicado la aplicación de HLA a la determinación simultánea de *pteridinas marcadoras* mediante la utilización como señales de entrada de los espectros sincrónicos de fluorescencia, y se realiza una comparación entre los resultados obtenidos con el algoritmo mencionado y el más clásico PLS (11).

También por nuestro equipo de investigación se han determinado los pesticidas *carbendazin*, *tiabendazol* y

*fuberidazol* por métodos basados en la señal neta del analito (12) y una mezcla muy usual de antibióticos, *amoxicilina* y *ácido clavulánico* (13), comparando los métodos basados en la señal neta del analito con PLS y utilización de señales cinéticas obtenidas de forma semiautomática.

Como conclusión podemos decir que dentro de los que podíamos ya denominar métodos multivariantes clásico, el método de regresión dominante en los últimos años, es la regresión por PLS, debido probablemente a su robustez, simplicidad de uso y a que se trata de una herramienta de diagnóstico bien desarrollada.

Actualmente la investigación en análisis multivariante va encaminada por una parte a la aplicación de métodos de análisis para sistemas no lineales, o sistemas lineales en los cuáles se generen interacciones de diversa naturaleza entre los componentes de las mezclas. Se emplean dos herramientas básicas, optimización de modelos PLS, HLA, así como diseño y aplicación de redes neuronales. En segundo lugar, y de forma creciente en interés, la investigación está focalizada en la utilización de señales tridimensionales y de ordenes superiores, en estos casos, aplicables a sistemas complejos donde se incorpora al menos una tercera variable como discriminatorio, se aplican fundamentalmente N-PLS y PARAFAC (14,15).

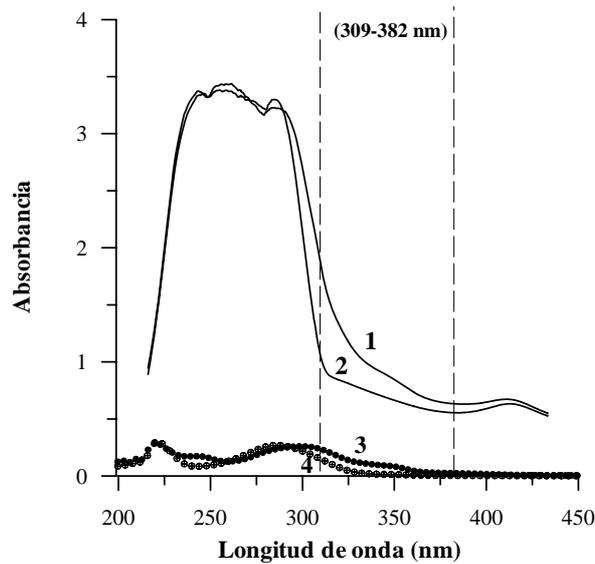
En esta Memoria se resumen los resultados obtenidos por aplicación de HLA al análisis del antineoplásico metotrexato (MTX) y del ácido folínico (LV) en muestras de suero y orina.

La dificultad encontrada en las determinaciones anteriores mediante PLS nos han animado a tratar este problema mediante el nuevo HLA mediante la utilización de la metodología NAS.

## **V.2.- DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO EN SUERO MEDIANTE HLA.**

Como ya hemos indicado en el Capítulo anterior LV y MTX presentan un elevado solapamiento entre sus espectros de absorción de manera que los métodos de análisis univariantes no se pueden aplicar para llevar a cabo la resolución de ambos componentes en sus mezclas.

En la Figura V.1, podemos observar los espectros de absorción de ambos componentes en disolución a pH = 5 y también los espectros de absorción de una muestra de suero a la cuál se ha adicionado LV y MTX.



**Figura V.1.-** Espectros de absorción de muestras conteniendo 1) suero humano (2 mL/25mL) conteniendo 10 :g/mL de MTX y 10 :g/mL de LV; 2) suero humano sin los componentes; 3) 10 :g/mL de MTX y 1 :g/mL de LV y 4) 10 :g/mL de LV y 1 :g/mL de MTX.

Los máximos de absorción están localizados a 297 y 305 nm para LV y MTX, respectivamente. El suero humano presenta una extremadamente alta absorción a valores de longitud de onda inferiores a 300 nm, y para longitudes de onda superiores, también se observa una absorción notable con un máximo situado a 410 nm. Luego, en presencia de MTX y LV, el intervalo de longitudes de onda que parece más útil es el comprendido entre 300 y 400 nm, en el cuál se encuentra toda la información espectral de los componentes en estudio y se elimina el pico a 410 nm del suero. En el intervalo anteriormente descrito, el

solapamiento entre LV, MTX y suero se muestra en la Figura V.1.

Con el objeto de llevar a cabo la determinación simultánea de LV y MTX en suero sin separaciones previas, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, hemos diseñado una matriz de calibración conteniendo suero como interferencia, ya que pensamos de esa manera poder modelar la interferencia del mismo. Además, creemos necesario llevar a cabo una selección del intervalo de longitudes de onda de manera que aseguremos la información espectral con el mínimo error. Para ello se desarrolla un método basado en la denominada señal neta del analito (NAS) comentado en la introducción.

### **V.2.1.- Optimización de la matriz de calibración**

Se construyó un grupo de calibración formado por nueve muestras y un grupo de predicción compuesto por seis, conteniendo concentraciones comprendidas en la matriz, y suero en las mismas cantidades que las incluidas en la matriz (2 mL de suero en un volumen final de 25 mL). Todas las muestras por tanto, contenían un volumen de 2 mL de suero sin diluir y sin tratar con el objeto de modelar la interferencia del mismo. Por otra parte, este suero está constituido realmente por una mezcla de ocho sueros de diferentes individuos, con objeto de tener en cuenta la variabilidad del suero entre individuos. En la Tabla V.1, se muestra la composición de ambos grupos de muestras.

**Tabla V.1.- Composición del conjunto de calibración y de predicción**

<i>Conjunto de calibración<sup>a</sup></i>	<b>Concentración teórica ( :g/mL)</b>	
	<b>LV</b>	<b>MTX</b>
M1	2	10
M2	4	10
M3	12	10
M4	14	10
M5	10	4
M6	10	2
M7	10	8
M8	10	10
M9	0	0
<i>Conjunto de predicción</i>		
suero 1	6	10
suero 2	20	10
suero 3	10	6
suero 4	10	18
suero 5	0	10
suero 6	4	0

<sup>a</sup>En presencia de suero ( 2mL/25 mL)

Con la dilución elegida se obtienen muestras con absorbancias de 1 unidad, y como consecuencia la selección del intervalo de longitudes de onda parece necesario.

### V.2.2.- Selección del intervalo de longitudes de onda y del número de factores del modelo.

La selección del número de factores se ha realizado mediante el algoritmo HLA/GO utilizando varios intervalos de longitudes de onda comprendidos entre 290 y 450 nm. Para ello se ha empleado un método de validación cruzada.

Usando el número óptimo de factores seleccionados en cada región se ha calculado el valor del denominado error indicador (EI) para las predicciones sobre las muestras problemas. Se emplea la información generada por la regresión de la representación de  $r^*$  en función de  $s^*$ , denominada NASRP, en donde  $r^*$  representa la señal neta del componente  $i$  en presencia de otros analitos en la muestra problema y  $s^*$  es la norma del vector unitario correspondiente al componente  $i$  puro. Las desviaciones de la linealidad que existen entre la señal neta del analito en la muestra y cuando está puro pueden medirse cuantitativamente mediante un error indicador (EI)<sup>11</sup>.

La ecuación que define el error indicador (EI) es la siguiente:

$$EI = \frac{\left[ s^2 \left( 1 + \frac{N^2 s^2}{4 \|r^*\|^2} \right) \right]^{1/2}}{\|r^*\|}$$

en la cual  $S$  es la desviación estándar de la línea que presenta mejor ajuste por regresión para la representación NASRP, en una determinada región espectral. El valor de EI será mínimo para un determinado componente, en aquella región espectral donde se pueda considerar la no interferencia de otras especies presentes en el suero. Entonces la representación NASRP para el componente determinado será una línea de recta y su pendiente corresponderá a la concentración teórica del componente en las muestras.  $N$  es el número de puntos incluidos en la representación anterior.

Para investigar el valor de EI es necesario, realizar la calibración, estimar el valor óptimo del número de factores mediante validación cruzada y calcular  $r^*$  y  $s^*$  para cada región espectral ensayada. Se emplea el número óptimo de factores en cada región espectral, para realizar la calibración y calcular el valor del EI. Por tanto para la selección de la región espectral más adecuada se tiene en cuenta tanto la predicción de las muestras problemas como el mínimo error indicador obtenido. En la Tabla V.2, se han resumido los parámetros indicados en cada región espectral, el número óptimo de factores, así como los valores de EI y los valores calculados para dos muestras de suero contaminadas con LV y MTX.

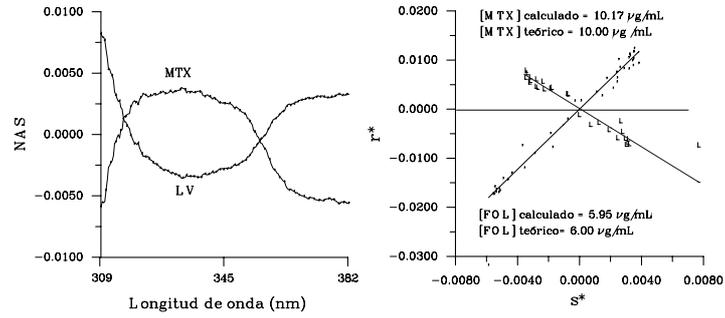
El valor de EI aumenta cuando el intervalo de longitudes de onda utilizado es próximo al fondo de absorción del suero (longitudes de onda menores de 286

nm), y disminuye para longitudes de onda superiores. Por otra parte, no parece adecuado el empleo de longitudes de onda superiores a 390 nm. El mínimo El parece corresponder con el intervalo comprendido entre 309 y 382 nm para ambos componentes. En la Figura V.2A se representa el NAS de una muestra de suero conteniendo ambos analitos en función de la longitud de onda. Una vez que se ha calculado el NAS para una muestra, podemos construir el NASRP, por representación de los elementos  $r^*$  como una función de los  $s^*$ . Hay que indicar que la concentración incógnita  $C_i$  para una muestra problema y para un componente determinado se puede calcular como la pendiente de la recta NASRP que de el mejor ajuste lineal empleando datos centrados. Teniendo en cuenta lo anterior la mejor concordancia se obtuvo para las muestras analizadas en el intervalo 309 a 382 nm.

En la Figura V.2B se representa la mejor recta NASRP para un problema conteniendo suero, LV (6 µg/mL) y MTX (10 µg/mL). En ella se indican los valores de la pendiente en cada caso que serán las concentraciones calculadas para la muestra problema.

Se analizó la homocedasticidad del error en la zona de longitudes de onda seleccionada mediante la representación de los valores residuales  $(r^* - C_i s^*)$  vs.  $s^*$ , y se observa una distribución homogénea de los mismos en todo intervalo ensayado.

Capítulo V.- Aplicación del análisis multivariante (HLA)



**Figura V. 2.-** (a) NAS correspondiente a una muestra de suero humano conteniendo 6  $\mu\text{g/mL}$  de LV y 10  $\mu\text{g/mL}$  de MTX; (b) representación de  $r^*$  vs.  $s^*$  para la misma muestra en el intervalo de mínimo EI

**Tabla V.2.- Optimización del intervalo de longitudes de onda en la predicción de Leucovorin (LV) y Metotrexato (MTX) en suero humano por aplicación del NAS y evaluación del error indicador (EI)**

Muestra	Contenido	Intervalo de longitudes de onda	Leucovorín			Metotrexato		
			EI	Teórico (:g mL <sup>-1</sup> )	Calculado (:g mL <sup>-1</sup> )	EI	Teórico (:g mL <sup>-1</sup> )	Calculado (:g mL <sup>-1</sup> )
Suero 1	Suero humano (2 mL/25 mL) + LV y MTX		0.2478			0.1983		5.65
			0.1153			0.0673		5.82
		280-470 (3F)			9.90			
		290-479 (3F)	0.0691		10.05	0.0488		5.95
		300-479 (2F)	0.0641		9.87	0.0450		5.94
		300-489 (2F)			9.90			
		300-500 (2F)	<b>0.0598</b>		<b>9.91</b>	<b>0.0430</b>		<b>5.95</b>
300-550 (2F)	0.0750	10.00	9.74	0.0435	6.00	5.91		
Suero 2	Suero humano (2 mL/25 mL) + LV y MTX					0.0438		10.47
						0.0196		10.28
		280-470 (3F)	0.1022		5.53	0.0210		10.19
		290-479 (3F)	0.0673		5.82			
		300-479 (2F)	0.0488		5.95	0.0220		10.18
		300-489 (2F)	0.0450		5.94			
		300-500 (2F)	<b>0.0340</b>		<b>5.95</b>	<b>0.0120</b>		<b>10.17</b>
300-550 (2F)	0.0425	6.00	5.91	0.0164	10.00	10.21		

El número de factores calculado mediante validación cruzada en cada región espectral se indica entre paréntesis. La región espectral que presenta un valor mínimo de EI y la mejor predicción se indica en letra *itálica y negrilla*

Una vez que se seleccionó la región de longitudes de onda, se procedió a calcular los parámetros estadísticos relacionados con el modelo HLA/GO optimizado.

### **V.2.3.- Parámetros estadísticos optimizados para el modelo HLA/GO**

Mediante el cálculo de las concentraciones de la matriz de calibración y su comparación con las teóricas empleadas podemos establecer el denominado PRESS (Prediction error sum of squares):

$$PRESS = \sum (C_{teorica} - C_{calculada})^2$$

usando dos factores para componente y el criterio de Haaland y Thomas, comentado en el capítulo anterior.

También se calcularon otros parámetros tales como el error relativo de predicción (REP)

$$REP = \left(100 / \bar{C}\right) \left[ (1/I) \sum_i (C_{teorica} - C_{calculada})^2 \right]^{1/2}$$

y el coeficiente de determinación  $R^2$ :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (C_{teorica} - C_{calculada})^2}{\sum_i (C_{teorica} - \bar{C}_{calculada})^2}$$

siendo la concentración media en las I muestras de calibración.

En la Tabla V.3 podemos observar los resultados obtenidos para los parámetros indicados y ambos componentes.

**Tabla V.3** .- Parámetros estadísticos referentes a la calibración de LV y MTX en suero mediante HLA/GO.

Parámetros estadísticos	LV	MTX
Intervalo de longitudes de onda (nm)	309- 382	309-382
PRESS <sup>a</sup>	0.5196	1.2939
REP (%)	3	5.33
R <sup>2</sup>	0.9972	0.9900

<sup>a</sup> Se han empleado para el cálculo 2 factores

Como se puede observar los valores de PRESS son menores para LV que para MTX y en ambos casos los valores son muy favorables. En cuanto a la linealidad se puede considerar como muy aceptable, encontrándose los errores dentro de límites adecuados para ambos componentes.

#### V.2.4.- Parámetros de calidad del modelo

Se pueden considerar como parámetros de calidad fundamentales de un método multivariante la selectividad, sensibilidad analítica y el límite de detección. Estos parámetros son especialmente útiles cuando se desean realizar estudios de comparación entre métodos de análisis.

El límite de determinación se puede expresar en modo señal de acuerdo con Lorber (8)  $LOD = t_{(\alpha, \beta)} \Phi_r$  donde el término  $t_{(\alpha, \beta)}$  es el parámetro de una distribución t-no central (6,9), y  $\Phi_r$  es una estimación de la desviación estándar de los errores asociados.  $\Phi_r$  se puede calcular a través de las muestras blancos de suero calculando su norma del NAS en las condiciones de las determinaciones y su correspondiente desviación estándar. Dicha desviación estándar puede ser aproximarse al ruido instrumental. El parámetro  $t_{(\alpha, \beta)}$  en este caso es 3.54 para  $\alpha = \beta = 0.05$ . El número de factores usados fue de dos y el intervalo de longitudes de onda entre 309 y 382 nm. De acuerdo con la expresión anteriormente mencionada se calculan valores de señal de 50 y 167 mAU para LV y MTX.

La utilización del NAS también permite el cálculo de otros parámetros tales como la selectividad, la sensibilidad analítica y el límite de detección expresado en concentración.

La selectividad se puede definir como la fracción de la señal global que corresponde al analito, se puede expresar como (7,8):

$$SEL = \frac{\|s^*\|}{\|s\|}$$

en esta expresión  $\|s^*\|^2$  representa la norma del vector del analito  $i$  y  $\|s\|^2$  la del vector de la muestra

La sensibilidad se expresa como  $SEN = 1/ \sqrt{b^2}$  donde  $b$  es el coeficiente de regresión.

El límite de detección en análisis multivariante se ha calculado según la expresión:

$$LOD = 3.22 \sqrt{b^2}$$

donde 3.22 representa el ruido instrumental y se aproxima a  $\Phi_{\text{blanco suero}}$ . Finalmente la sensibilidad analítica,  $($ , se define de forma análoga al análisis multivariante como:

$$(\text{ = } SEN/ \Phi_r$$

La sensibilidad analítica se puede considerar como el parámetro de comparación más útil, aunque es más práctico expresarlo como  $(^{-1}$ , es decir la mínima diferencia de concentración que puede ser discernible por un método. En la Tabla V.4 podemos observar los parámetros anteriormente indicados.

**Tabla V.4.-** Parámetros de calidad del método

Parámetros	LV	MTX
202 <sup>a</sup>	4.75 x 10 <sup>-3</sup>	1.58 x 10 <sup>-2</sup>
SEL	0.202	0.146
SEN	0.042	0.051
( <sup>-1</sup> (:g/ mL)	0.11	0.31
LOD ( :g/ mL)	0.34	0.93

<sup>a</sup> 202 .  $\Phi_r$  de diez blancos de suero.

El método más sensible es el optimizado para LV, presentando también una mejor selectividad.

#### V.2.5.- Análisis de muestras de suero

El método utilizado para el análisis de suero se esquematiza en los siguientes pasos:

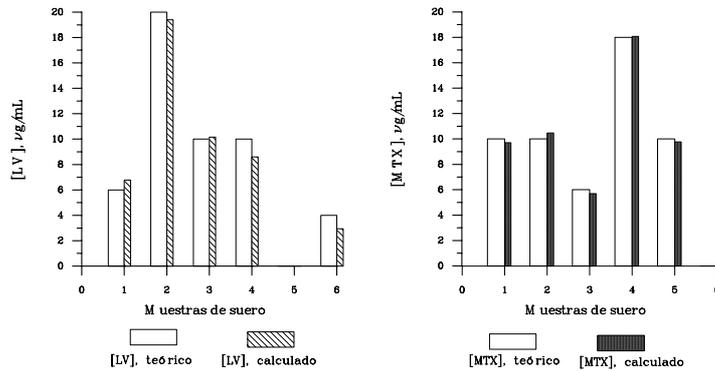
Se adicionan a 2 mL de suero humano sin desproteinizar, cantidades de variables de LV y MTX de manera que la concentración final este comprendida en los límites fijados por la matriz de calibración, se homogenizan las muestras y se añaden 5 mL de tampón acético acetato (0.5 M) de pH = 5.0, diluyendo a 25 mL con agua desionizada. Se registran los espectros de absorción entre 200 y 450 nm (tomando un valor de absorbancia cada 0.36 nm) utilizando como blanco disoluciones de tampón pH = 5.0. Los espectros se analizan mediante el modelo HLA/GO optimizado usando 2 factores en el intervalo de longitudes de onda 309 a 382 nm.

En las condiciones antes mencionadas se analizan seis muestras distintas de suero ( formadas por mezclas de distintos individuos).

En la Tabla V.5, podemos observar los valores de recuperación obtenidos en cada caso.

**Tabla V.5 .- Valores de recuperación para LV y MTX en suero mediante HLA/GO**

LV, mg L <sup>-1</sup>		Rec (%)	MTX , mg L <sup>-1</sup>		Rec (%)
puesto	Encontrado		puesto	encontrado	
6.0	5.94	<b>99</b>	10	10.18	<b>102</b>
20	19.24	<b>96</b>	10	9.82	<b>98</b>
10	9.91	<b>99</b>	6	5.51	<b>92</b>
10	9.43	<b>94</b>	18	18.6	<b>103</b>
0	----	---	10	9.56	<b>96</b>
4	3.82	<b>96</b>	0	---	---
<sup>1</sup> [LV]p= 0.97 [LV] enc.; R <sup>2</sup> = 0.9993			[MTX]p = 1.03[MTX]enc.; R <sup>2</sup> = 0.9963		



**Figura V.3** .- Gráficas de valores de concentración teórica y calculado para problemas de suero usando el modelo optimizado HLA/GO

De los valores de recuperación obtenidos, así como del análisis de regresión de la representación puesto - encontrado podemos deducir que los resultados son muy satisfactorios, en ambos casos.

Por último se han comparado los resultados obtenidos con los dos métodos de análisis multivariante tratados en esta Memoria PLS y HLA/GO al analizar las mismas muestras de suero.

Los resultados son bastante parecidos aunque son ligeramente mejores para HLA/GO, tanto en los valores de pendiente de la regresión puesto - encontrado para ambos compuestos, como en el valor del coeficiente de determinación y en menor dispersión para LV.

A modo de resumen se exponen los resultados obtenidos en ambos métodos:

**Tabla V.6** .- Resultados comparativos de la regresión puesto encontrado por los métodos PLS y HLA/GO aplicados al análisis de suero.

Método	Suero					
	LV			MTX		
	pendiente	R <sup>2</sup>	Φ <sup>2</sup>	pendiente	R <sup>2</sup>	Φ <sup>2</sup>
PLS	0.96	0.9869	0.71	1.1	0.9979	0.11
HLA/GO	0.97	0.9993	0.04	1.03	0.9963	0.17

### V.3.- DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO EN ORINA MEDIANTE HLA

Utilizando la misma sistemática que en la aplicación indicada anteriormente se ha puesto a punto un método para el análisis de LV y MTX en orina y se ha aplicado al análisis de muestras de orina contaminadas con los analitos en estudio.

El modelo HLA/GO optimizado presenta los parámetros estadísticos resumidos en la Tabla V.7.

**Tabla V.7 .-** Parámetros estadísticos para la calibración de LV y MTX en orina mediante HLA /GO.

Parámetros estadísticos	LV <sup>a</sup>	MTX <sup>b</sup>
Intervalo de longitudes de onda (nm)	320- 336	332-391
PRESS <sup>a</sup>	1.9506	0.1796
REP (%)	5.39	1.59
R <sup>2</sup>	0.9882	0.9994

<sup>a</sup> utiliza 2 factores; <sup>b</sup> utiliza 4 factores

Por otra parte los parámetros de calidad del método son:

**Tabla V.8.-** Parámetros de calidad del método

Parámetros	LV	MTX
202 <sup>a</sup>	$5.10 \times 10^{-3}$	$1.30 \times 10^{-2}$
SEL	0.153	0.172
SEN	0.022	0.031
( <sup>-1</sup> (:g/ mL)	0.11	0.42
LOD ( :g/ mL)	0.33	1.25

El método utilizado para el análisis de orina ha sido el siguiente:

Se adicionan a 3 mL de orina humana sin tratar y recién tomada cantidades variables de LV y MTX de manera que la concentración final esté comprendida en los límites fijados por la matriz de calibración, se homogeneizan las muestras, y se añaden 5 mL de

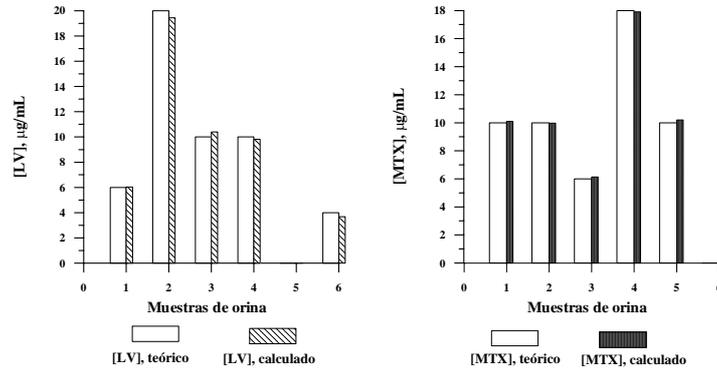
tampón HAc/NaAc (0.5 M) de pH = 5.0, diluyendo a 25 mL con agua desionizada. Se registran los espectros de absorción entre 200 y 450 nm (tomando un valor de absorbancia cada 0.36 nm) utilizando como blanco disoluciones de tampón pH = 5.0. Los espectros se analizan mediante el modelo HLA/GO optimizado usando 2 factores en el intervalo de longitudes de onda 318 a 336 nm para el LV y 4 factores para el MTX en el intervalo de 332 a 391 nm.

En las condiciones indicadas se han analizado seis muestras de orina con los resultados que se muestran en la Tabla V.9.

**Tabla V.9** .- Valores de recuperación para LV y MTX en orina mediante HLA/GO

LV, mg L <sup>-1</sup>		Rec (%)	MTX, mg L <sup>-1</sup>		Rec (%)
puesto	Encontrado		puesto	encontrado	
6.0	6.04	<b>101</b>	10	10.1	<b>101</b>
20	19.44	<b>97</b>	10	9.97	<b>100</b>
10	10.4	<b>104</b>	6	6.13	<b>102</b>
10	9.82	<b>98</b>	18	17.9	<b>99</b>
0	----	---	10	10.2	<b>102</b>
4	3.69	<b>92</b>	0	---	---
<sup>l</sup> LV]p= 0.98 [LV] enc.; R <sup>2</sup> = 0.9981; Φ <sup>2</sup> = 0.11			[MTX]p = 0.99 [MTX]enc.; R <sup>2</sup> = 0.9997; Φ <sup>2</sup> = 0.01		

Capítulo V.- Aplicación del análisis multivariante (HLA)



**Figura V.4 .-** Gráficas de valores de concentración teórico y calculado para problemas de orina usando el modelo optimizado HLA/GO

De forma similar a la aplicación anteriormente descrita en suero, se ha procedido a realizar una comparación con los resultados obtenidos mediante PLS que aparecen resumidos en la Tabla V.10.

**Tabla V.10 .-** Resultados comparativos de la regresión puesto encontrado por los métodos PLS y HLA/GO aplicados al análisis de orina.

Método	Orina					
	LV			MTX		
	pendiente	R <sup>2</sup>	Φ <sub>2</sub>	pendiente	R <sup>2</sup>	Φ <sup>2</sup>
PLS	0.97	0.9861	0.78	1.01	0.9975	0.11
HLA/GO	0.98	0.998	0.11	0.99	0.9997	0.01

Como se puede observar los resultados son ligeramente mejores cuando se aplica HLA, de manera que en el caso de LV aumenta considerablemente el

valor de  $R^2$  presentando por otra parte una menor dispersión. En cuanto a la resolución de MTX se obtienen similares resultados por ambos métodos, observándose sin embargo una menor dispersión de nuevo por aplicación de HLA.

Como consecuencia de los resultados mostrados en el Capítulo IV y los mostrados en este Capítulo, podemos concluir que las calibraciones HLA y PLS nos permiten determinar de forma simultánea el antineoplásico MTX y el agente de rescate, LV tanto en muestras de orina como en suero humano. Los parámetros estadísticos obtenidos mediante HLA son ligeramente mejores que mediante PLS, pudiendo considerar que el cálculo del EI mediante la regresión del NAS nos permite una más adecuada selección del intervalo útil de longitudes de onda.

En esta aplicación, la selección del intervalo de longitudes de onda es especialmente importante dada la elevada absorción del suero ya que no se aplica ningún tratamiento previo.

#### V.4.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Lorber, A., *Anal. Chem.*, **58**, 1167 ( 1986)
- 2.- Xu, L. y Schechter, I., *Anal. Chem.*, **69**, 3722 (1997)
- 3.- Berger, A. J., Koo, T., Itzkan, I. y Feld, M. S., *Anal. Chem.*, **71**, 623 ( 1998)
- 4.- Goicoechea, H. C. y Olivieri, A. C., *Anal. Chem.*, **71**, 4361 (1999)
- 5.- Boqué, R. y Rius, F. X., *Chemom. Intell. Lab., Syst.*, **32**, 11, (1996)
- 6.- Booksh, K. S. y Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, **66**, 782 A (1994)
- 7.- Lorber, A., Faber, K. y Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, **69**, 1620 ( 1997)
- 8.- Clayton, C. A., Hines, J. W. y Elkins, P. D., *Anal. Chem.*, **59**, 2506 (1987)
- 9.- Espinosa Mansilla, A., Salinas, F. y De Orbe Paya, I., *Anal. Chim. Acta*, **313**, 103 (1995)
- 10.- Goicoechea, H. C. y Olivieri, A. C., *The Analyst*, **124**, 725 (1999)
- 11.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Galián, R., *Applied Spectroscopy*, **55**, 701, (2001)
- 12.- Martínez Galera, M.; Picón Zamora, D., Martínez Vidal, J.L.; Garrido Frenich, A.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A. y Salinas López, F.; *Talanta*, **59**, 1107, (2003)
- 13.- Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; Acedo Valenzuela, M.I.; Goicoechea, H.C. y Olivieri, A.C.; *Anal. Chim. Acta.*, **463**, 75, (2002)
- 14.- Bro, R. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998

- 15.- Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.;  
González Gómez, D.; Olivieri, A.C. y Goicoechea,  
H.C.; *Anal. Chem.*, **75**, 2640, (2003)

**Capítulo VI.**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA OXIDACIÓN  
DE LOS ÁCIDOS FOLÍNICO Y FÓLICO**

## VI.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISIS

Los métodos cinéticos de análisis son aplicados a sistemas químicos durante el transcurso de una reacción, y muchas veces lo son solamente durante el periodo que sigue inmediatamente al inicio de la misma. Ello les confiere unas características especiales que les diferencian de otros métodos de análisis basados en mediciones realizadas en el estado de equilibrio, y por ello llamados métodos termodinámicos de análisis.

Los métodos cinéticos no requieren la medición del valor absoluto del parámetro elegido para seguir la reacción, sino sólo la medición de la variación de este parámetro en función del tiempo. Con ello, los métodos cinéticos pueden resultar exentos de muchas interferencias que contribuyen al valor absoluto de aquel parámetro (como por ejemplo la presencia de sustancias fluorescentes, absorbentes, etc) pero que no intervienen en la reacción y que, por lo tanto, no modifican la ley de variación del parámetro.

Los métodos cinéticos permiten utilizar analíticamente una gran cantidad de reacciones químicas que tradicionalmente no podían serlo por no cumplir las condiciones exigidas por los métodos de equilibrio: las de ser *rápidas*, ser *completas*, y tener lugar con una *estequiometria definida*.

Estos métodos cinéticos se pueden basar sin dificultades en reacciones lentas o no cuantitativas porque para medir la velocidad de la reacción basta que reaccione sólo una fracción de la sustancia, fracción que puede ser muy pequeña si los métodos de medida son lo bastante sensibles, con la condición que dicha reacción sea repetitiva.

Sin embargo, no todas las reacciones son susceptibles de utilización como base de un método cinético de análisis. Deben ser lo bastante lentas para que su tiempo de semi-reacción supere el tiempo necesario para obtener la mezcla homogénea de los reaccionantes y permita realizar las lecturas con exactitud aceptable.

Por otro lado, las reacciones no pueden ser excesivamente lentas si el método de análisis tiene que poseer algún valor práctico. Así, las reacciones con tiempos de semi-reacción de algunas horas no resultan ya interesantes para el análisis de rutina, ya que las medidas requieren un tiempo excesivo o, si se desea realizarlas en un tiempo más corto, requieren instrumentos de medida de extrema sensibilidad, dadas las pequeñísimas variaciones de concentración que se producirán en dicho tiempo.

La velocidad de algunas reacciones que son demasiado lentas o demasiado rápidas se puede modificar y llevar dentro de los límites indicados

mediante diversas técnicas de trabajo o artificios, como los siguientes:

- a) por modificación de la temperatura
- b) por modificación de la concentración de los reaccionantes
- c) por variación de la naturaleza del disolvente o de la fuerza iónica de la solución del problema.

Una característica desfavorable de los métodos cinéticos, viene determinada por el hecho de que, realizándose las mediciones sobre un sistema dinámico, la calidad de los resultados depende de la precisión en la determinación del tiempo. Depende, además, de todos aquellos factores que influyen sobre la velocidad de transformación del sistema.

Si se desea obtener resultados reproducibles es necesario controlar rigurosamente los múltiples factores de los que depende la velocidad de reacción: la temperatura, la presencia de impurezas, la composición global del sistema, el pH, la fuerza iónica, la naturaleza de los disolventes... Es precisamente la dificultad de este control lo que ha motivado en el pasado que la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos por estos métodos distaran muchas veces de ser satisfactorias.

Actualmente, esto ha dejado de ser un problema importante gracias a la introducción y generalización de la instrumentación y de las técnicas modernas de

control. La incorporación de los microordenadores a los laboratorios permite el uso en condiciones de rutina de procedimientos cinéticos totalmente automatizados. Los aparatos de análisis automáticos en flujo continuo ya existentes comercialmente, y se adaptan perfectamente también a los procedimientos cinéticos de análisis.

Los métodos cinéticos han encontrado aplicación analítica principalmente en dos campos:

a) en determinación de cantidades muy pequeñas (trazas) de sustancias que pueden presentar actividad catalítica (o que pueden modificar la actividad catalítica de otra)

b) en análisis de mezclas de sustancias muy análogas químicamente, sin separaciones previas, sacando partido de las diferencias de su reactividad frente a un reactivo común.

### **VI.1.1.- Instrumentación en los métodos cinéticos de análisis:**

#### ***Introducción***

La consolidación de los métodos analíticos basados en la medida de la velocidad de reacción ( sistemas dinámicos ) y su creciente grado de competitividad con los métodos analíticos basados en las medidas efectuadas en el equilibrio ( sistemas estáticos ) se deben al desarrollo alcanzado por la instrumentación analítica. Hay que destacar los avances en los últimos

años en los instrumentos de detección de la señal analítica con la incorporación de sistemas electrónicos que garantizan mayores grados de exactitud y precisión.

En los últimos años, los métodos cinéticos de análisis han ganado en exactitud, precisión, seguridad, accesibilidad instrumental y bajo costo, de tal manera que han pasado de ser unos métodos analíticos meramente académicos a ocupar un puesto cada vez más relevante en los análisis de rutina, especialmente en ciertas áreas como la Química Clínica.

### *Características diferenciales*

Vamos a hacer un breve repaso de aquellos aspectos generales que diferencian a los métodos cinéticos de las demás metodologías analíticas.

La instrumentación para llevar a cabo un método cinético presenta varias peculiaridades que deben resaltarse: el control del tiempo, la medición relativa de la señal, los sistemas de toma y tratamiento de datos y el control de la temperatura.

El **tiempo** es la característica diferenciadora esencial en los métodos cinéticos y los de equilibrio. Es una variable que debe ser estrictamente controlada en todas y cada una de las operaciones de un método cinético. No solo es clave medir con precisión el tiempo en que se originan las señales analíticas (tiempo de medida) sino que es imprescindible controlar la duración de las operaciones iniciales (tiempo previo). También debe

conocerse con rigor la influencia de esta variable en el sistema de adquisición de datos.

La **temperatura** es una variable crítica en los métodos cinéticos, pues afecta mucho más a la cinética que al equilibrio de la reacción siempre que la constante que rige a éste último sea lo suficientemente alta. En los métodos cinéticos esta variable debe controlarse con gran precisión ( $\pm 0.01$  ó  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) para conseguir resultados reproducibles.

Una importante cualidad de los métodos basados en la velocidad de reacción es que se basan en **medidas relativas de la señal**. Por tanto el valor absoluto inicial de absorbancia, intensidad de fluorescencia, potencial, etc., no tiene relevancia. Solo es preciso medir con precisión la velocidad de cambio de la señal, que no es afectada por la turbidez, coloración, fluorescencia iniciales, celdas sucias, etc. Un buen número de interferencias se eliminan, por lo que la selectividad es mayor.

La **adquisición y tratamiento de datos** es una etapa fundamental en esta metodología. Por una parte la toma de la señal transducida debe hacerse con precisión en función del tiempo. Por otra parte, al no existir una relación matemática simple entre estos datos y la concentración del analito, son precisos procesos de cálculo más o menos complejos según se trate de la determinación de una especie o de análisis cinético

diferencial y el tipo de método cinético aplicado (tiempo fijo, tiempo variable, de la tangente...).

El espectrofluorimétero que hemos utilizado ha sido un SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con dos lámparas de descarga de Xe, una continua de 150 W y otra de pulsos de 7 W. Está acoplado mediante una tarjeta GPIB (IEE-488) a un microordenador PC-386. La adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron realizados con el paquete de software AB2 versión 1.40, bajo el sistema operativo OS/2 2.0

#### **VI.1.2.- Precisión en los métodos cinéticos de análisis**

La precisión en las medidas de la velocidad de reacción depende fundamentalmente de tres factores:

- a) Del ruido de fondo.
- b) De la irreproducibilidad en las variables físico-químicas que influyen sobre la reacción; esto es, en la falta de constancia en las condiciones experimentales (mezcla, pH, temperatura, fuerza iónica, etc.)
- c) De los errores cometidos en la medición del tiempo en los sistemas de toma de datos.

Con los sistemas actuales de adquisición de datos mediante microordenador la tercera causa de irreproducibilidad puede despreciarse ya que la varianza en la medición de  $\epsilon t$  es prácticamente nula.

### VI.1.3.- Aplicaciones

En cuanto a las aplicaciones de estos métodos, durante los últimos años han sido numerosos los trabajos publicados. En esta Memoria no se pretende hacer una revisión exhaustiva, por lo que solo haremos referencia a los trabajos publicados en los últimos cinco años, que se resumen a continuación.

Gran variedad de compuestos han sido determinados mediante métodos cinéticos-fluorimétricos; así, tenemos desde la determinación de *hidrógeno cianida* en aire (1) utilizando filtros adecuados para su impregnación, determinación de pesticidas como *paraquat* en leche, agua y vino blanco (2), *etilentiourea* haciendo uso de la técnica de flujo interrumpido, stopped-flow, en agua, leche y fruta (3), hasta la simple determinación de *ácido ascórbico* en preparaciones farmacéuticas, orina y vegetales (4).

Muchos iones inorgánicos han sido determinados mediante métodos cinéticos-fluorimétricos; así, tenemos la determinación de trazas de *oxalato* (5), determinación de trazas de ión *fluoruro* en pasta dentrífica (6),  $Pd^{2+}$  en muestras sintéticas (7), ión *bromuro* en agua y cabellos (8), así como la determinación recientemente de trazas de *vanadio* en muestras de agua (9).

En cuanto a compuestos orgánicos determinados mediante estos métodos, podemos citar algunos ejemplos como son la determinación de *adrenalina*

(10), trazas de *resorcina* en muestras sintéticas (11), determinación de *taninos* en muestras de té (12) y trazas de *anilina* en aguas de desecho (13).

También cabe citar como trabajo realizado por nuestro equipo investigador la determinación reciente del antineoplásico objeto en esta memoria, *metotrexato*, mediante métodos cinéticos-fluorimétricos en suero humano (14).

## **VI.2.- DETERMINACIÓN CINÉTICA-FLUORIMÉTRICA DE ÁCIDO FOLÍNICO**

Como ya se estudió en el Capítulo II de esta memoria, el ácido folínico presenta fluorescencia, en disolución acuosa, en todo el rango de pH. Sin embargo, hemos comprobado que cuando este compuesto se somete a un proceso de oxidación suave con permanganato potásico en medio básico, el producto que se genera es más fluorescente que el ácido folínico de partida, lo que nos permitiría llevar a cabo una determinación indirecta de ácido folínico midiendo la intensidad de fluorescencia del producto generado.

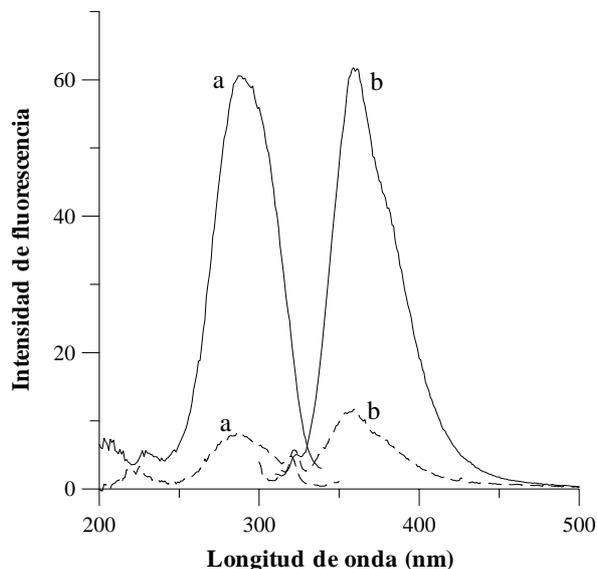
Por otro lado, se ha comprobado que la oxidación del ácido folínico no tiene lugar de manera instantánea, sino que ocurre al cabo de un cierto tiempo. En este capítulo vamos a estudiar y optimizar tanto las variables instrumentales como las químicas con objeto de proponer un método para la determinación cinética del ácido folínico.

Con objeto de seleccionar las longitudes de onda a las cuales vamos a registrar las curvas cinéticas, se preparan dos disoluciones de ácido folínico, una de las cuales se somete al proceso de oxidación, y se registran los correspondientes espectros de excitación y emisión que se representan en la Figura VI.1. Se observa que los máximos de excitación y de emisión no varían del producto sin oxidar al producto oxidado, por lo que las curvas cinéticas las registraremos a 360 nm, excitando a 290 nm.

#### **VI.2.1.- Influencia del pH en la determinación cinética de ácido Folínico**

Comenzamos el estudio de las variables químicas viendo como influye el pH sobre la cinética de la reacción de ácido folínico en presencia de permanganato potásico.

Para llevar a cabo esta experiencia se preparan disoluciones directamente en la cubeta de medida (3 mL) en las cuales se mantiene constante la concentración de ácido folínico y de permanganato y se varia el pH mediante pequeñísimas adiciones de HCl y/o NaOH.

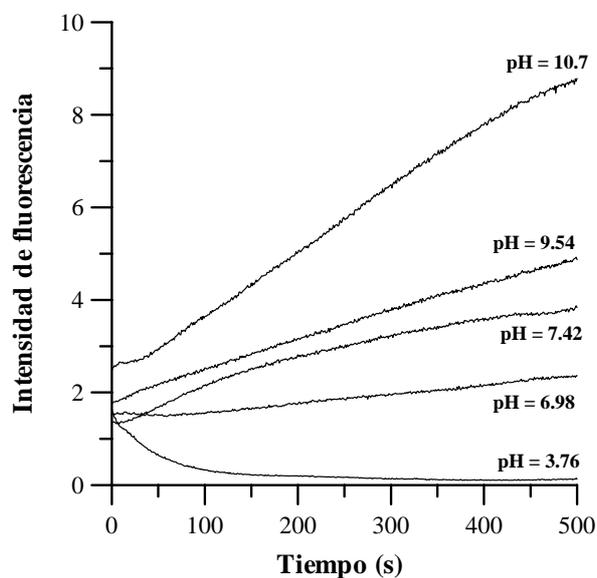


**Figura VI.1** .-Espectros de excitación (a) y emisión (b) del ácido fólico (-----) y del producto resultante de la oxidación (—).

El método operatorio que seguimos es el siguiente: en la cubeta de medida y sobre disoluciones de ácido fólico de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , adicionamos  $1.00 \text{ mL}$  de disolución de  $\text{KNO}_3 \text{ } 10^{-4} \text{ M}$ , la cantidad de  $\text{HCl}$  o  $\text{NaOH}$  necesarios para alcanzar el pH deseado y agua ultrapura hasta completar  $2.00 \text{ mL}$ . A esta disolución se le mide el pH mediante un micro electrodo combinado, y finalmente se añade  $1.00 \text{ mL}$  de disolución  $10^{-4} \text{ M}$  de permanganato potásico. A continuación se registran las curvas cinéticas, excitando a  $290 \text{ nm}$  y manteniendo el monocromador de emisión a  $360 \text{ nm}$ , durante un tiempo de  $500$  segundos.

En la Figura VI.2 se representan algunas de las curvas cinéticas registradas a diferentes pH.

Observamos que en medios ácidos la reacción de oxidación presenta pendientes negativas y que solo a partir de valores de pH neutros se puede medir una velocidad de la reacción apreciable. Podemos comprobar que la velocidad aumenta a medida que lo hace el pH, alcanzándose los valores máximos a pH superiores a 10. Esto nos indica la conveniencia de realizar el estudio de oxidación del ácido folínico en presencia de NaOH.



**Figura VI.2 .-**Representación de las curvas cinéticas de la oxidación del ácido folínico a distintos pH.  $[Folínico] = 5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[KMnO_4] = 3.33 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

### VI.2.2.- Influencia de la concentración de NaOH

Para ello se preparan disoluciones directamente en la cubeta que contienen:  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido folínico,  $1.00 \text{ mL}$  de disolución de  $\text{KNO}_3$   $10^{-4} \text{ M}$ , volúmenes variables de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ M}$ , agua ultrapura hasta completar  $2.00 \text{ mL}$ ,  $1.00 \text{ mL}$  de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4} \text{ M}$  y se registran las curvas cinéticas en las mismas condiciones instrumentales. Los valores correspondientes a las velocidades de reacción, medidas entre  $50\text{-}150 \text{ s}$ , para las diferentes concentraciones de  $\text{NaOH}$  ensayadas, se recogen en la Figura VI.3. Observamos que la velocidad aumenta a medida que lo hace la concentración de  $\text{NaOH}$ , hasta que se alcanzan valores de  $\text{NaOH}$  de  $0.13 \text{ M}$ , concentración a partir de la cual la velocidad de la reacción de oxidación se mantiene prácticamente constante.

Para posteriores experiencias, elegimos como concentración óptima de  $\text{NaOH}$   $0.17 \text{ M}$ , que se consigue con la adición de  $0.5 \text{ mL}$  de disolución de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ M}$ .

Mediante análisis logarítmico, podremos calcular el orden parcial de reacción, respecto a la concentración de hidróxido sódico, teniendo en cuenta que la concentración del analito y del resto de los reactivos se mantiene constante.

La ecuación de velocidad de esta reacción cinética de oxidación del ácido folínico la podríamos escribir:

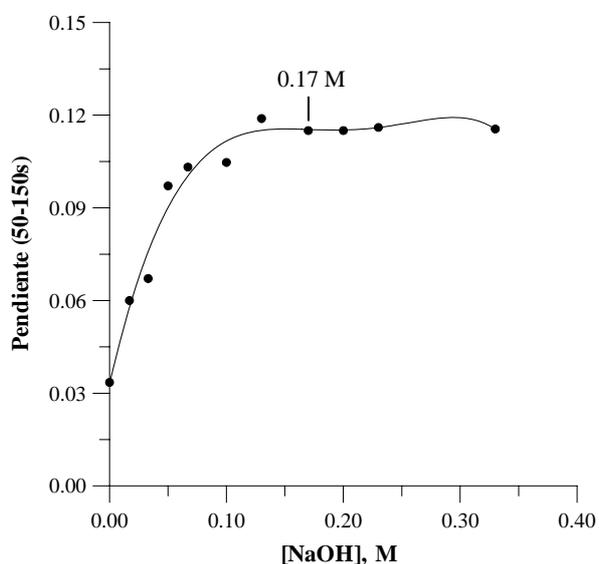
$$v = K[NaOH]^a [KMnO_4]^b [Folinico]^c$$

Al mantener constante todas las otras variables, la ecuación anterior la podemos simplificar:

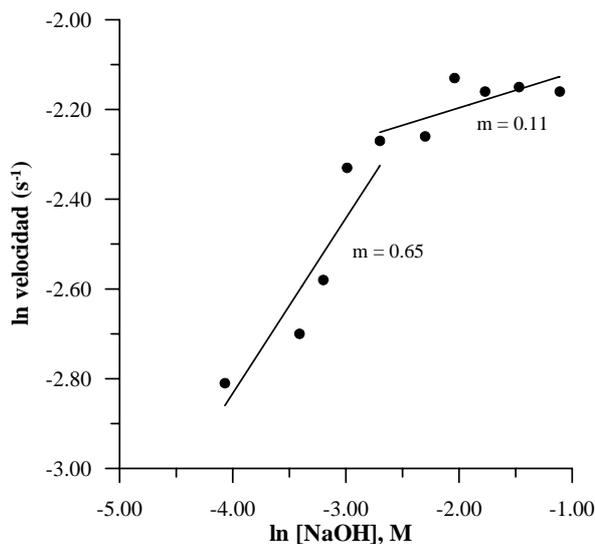
$$v = K' [NaOH]^a$$

donde K' engloba a la constante de velocidad de la reacción y a todas las concentraciones que se mantienen constantes. Tomando logaritmos a esta expresión, nos quedaría:

$$\ln v = \ln K' + a \ln [NaOH]$$



**Figura VI.3** .-Influencia de la concentración de NaOH sobre la pendiente de las curvas cinéticas. [Folínico] =  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[KMnO_4] = 3.33 \times 10^{-5} \text{ M}$



**Figura VI.4** .- Representación logarítmica de la velocidad de reacción en función de la concentración de NaOH.

Al representar ln [NaOH] frente a ln velocidad, Figura VI.4, podemos calcular el valor de  $a$  a partir de las pendientes de los tramos rectos. Observamos que existen dos tramos con diferentes pendientes por lo que podemos deducir que con respecto a la concentración tenemos dos órdenes de reacción:

$$[\text{NaOH}] < 0.13 \text{ M} \quad \Psi \quad a = 1/2 \quad \Psi \quad v = K' [\text{OH}^-]^{1/2}$$

$$[\text{NaOH}] > 0.13 \text{ M} \quad \Psi \quad a = 0 \quad \Psi \quad v = K'$$

Con la concentración de NaOH seleccionada como óptima, nos aseguramos un orden de reacción 0 con lo que pequeñas variaciones en la basicidad del medio, no afectarán, de forma apreciable a la velocidad de la reacción de oxidación.

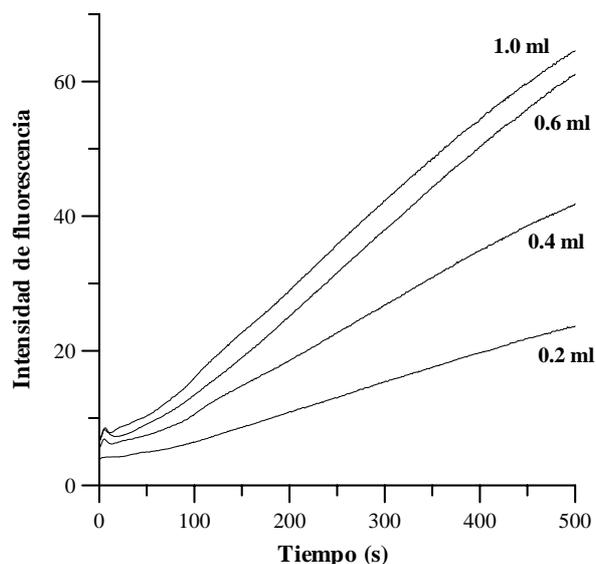
### **VI.2.3.- Influencia de la concentración de permanganato potásico sobre la cinética de oxidación del ácido folínico en medio NaOH**

El estudio de esta variable se lleva a cabo sobre disoluciones que en un volumen final de 3.00 mL contienen:

- 0.3 mL de ácido folínico de  $50 \text{ mg L}^{-1}$
- 0.5 mL de disolución de NaOH 1 M
- volúmenes variables de agua ultrapura
- volúmenes variables de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4} \text{ M}$

Los volúmenes de agua ultrapura y  $\text{KMnO}_4$  deben conjugarse de tal manera que el volumen final en la cubeta de medida sea 3.00 mL.

A estas disoluciones se les registra las curvas cinéticas manteniendo los monocromadores de excitación y emisión en 290 nm y 360 nm respectivamente. Algunas de las curvas cinéticas se representan en la Figura VI.5, donde se observa que la velocidad de la reacción aumenta a medida que lo hace la concentración de  $\text{KMnO}_4$ .



**Figura VI.5** .-Curvas cinéticas correspondientes a la oxidación del ácido fólico obtenidas con distintas concentraciones de  $KMnO_4$   $10^{-4}$  M.  $[Folínico] = 5$  mg  $L^{-1}$ ;  $[NaOH] = 0.17$  M

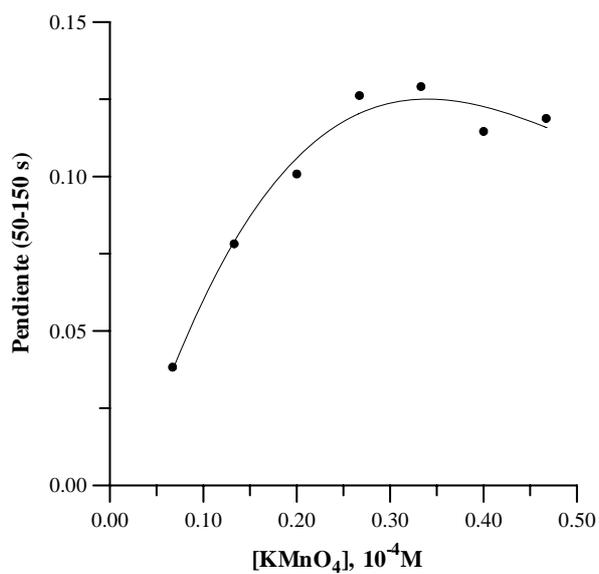
Las pendientes de las curvas cinéticas se miden entre 50-150 s, y los resultados obtenidos se representan en la Figura VI.6. Observamos que la señal aumenta a medida que lo hace la concentración de  $KMnO_4$  hasta alcanzarse una concentración de  $2.67 \times 10^{-5}$  M a partir de la cual la pendiente de las curvas cinéticas se mantiene prácticamente constante. Para posteriores experiencias se elige como concentración óptima de  $KMnO_4$  la que se obtiene con la adición de 1.00 mL de disolución  $10^{-4}$  M que resulta ser  $3.33 \times 10^{-5}$  M.

El cálculo del orden de reacción con respecto a esta variable, se realiza con los datos recogidos de la representación logarítmica de la Figura VI.7, donde

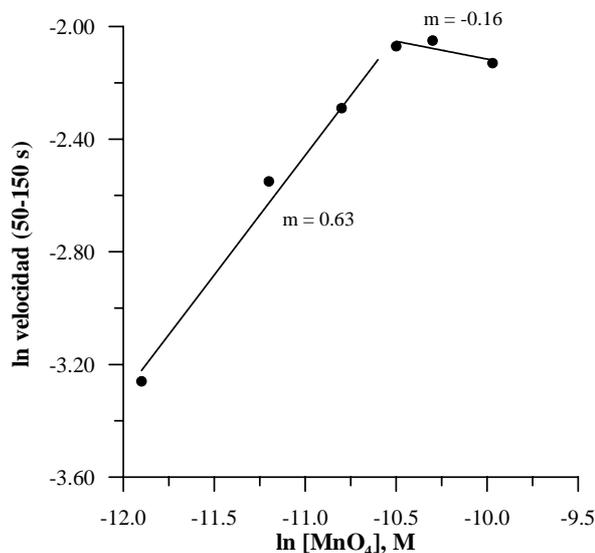
observamos la existencia de dos tramos con diferentes pendientes:

$$[\text{KMnO}_4] < 2.66 \times 10^{-5} \text{ M} \quad \Psi \quad b = -1/2 \quad \Psi \quad v = K [\text{KMnO}_4]^{1/2}$$

$$[\text{KMnO}_4] > 2.66 \times 10^{-5} \text{ M} \quad \Psi \quad b = 0 \quad \Psi \quad v = K'$$



**Figura VI.6** .-Representación de la concentración de  $\text{KMnO}_4$  frente a la pendiente de las curvas cinéticas.  $[\text{Folínico}] = 5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[\text{NaOH}] = 0.17 \text{ M}$



**Figura VI.7** .- Representación logarítmica de la velocidad de reacción en función de la concentración de  $\text{KMnO}_4$ .

La concentración elegida como óptima está situada en el tramo donde la pendiente de la representación logarítmica es cero por lo que la ecuación cinética de la reacción de oxidación del ácido fólico será independiente de la concentración de  $\text{KMnO}_4$ .

#### VI.2.4.- Influencia de la Temperatura

El estudio de esta variable instrumental se lleva a cabo con disoluciones que en un volumen final de 3.00 mL contienen:

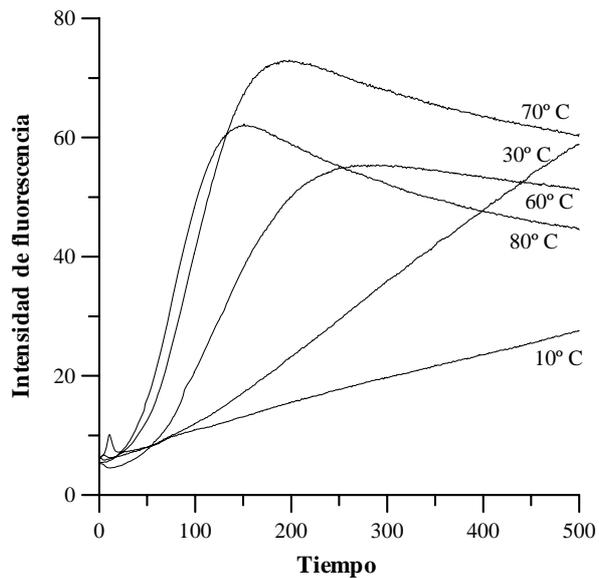
- 2.00 mL de disolución de ácido fólico de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  en medio NaOH 0.17 M
- 1.00 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4}$  M

A cada una de estas disoluciones se les registra su curva cinética al mismo tiempo que se varia la temperatura entre 10 y 80° C. Las curvas cinéticas obtenidas en este rango de temperatura se representan en la Figura VI.8.

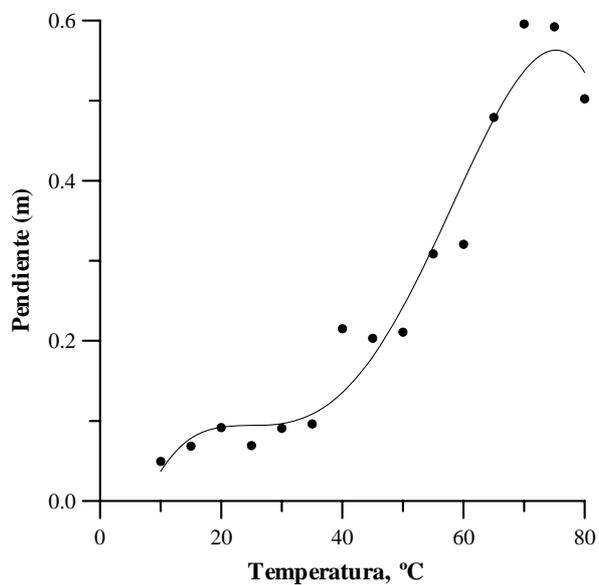
Las velocidades de reacción, medidas entre 50 y 150 s, para las diferentes temperaturas se representan en la Figura VI.9, donde observamos que la mayores velocidades se obtienen entre 70 y 80° C, y que disminuye a temperaturas superiores.

Por otra parte, se puede observar que el compuesto formado como consecuencia de la oxidación del ácido folínico es inestable. La intensidad de fluorescencia del compuesto oxidado disminuye con el tiempo a temperaturas elevadas. Este hecho parece indicar que el derivado intensamente fluorescente es realmente un producto intermedio.

Para posteriores experiencias elegimos como temperatura óptima 70 °C.



**Figura VI.8** .- Curvas cinéticas correspondientes a la oxidación del ácido fólico a distintas temperaturas  $[Folínico] = 5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[NaOH] = 0.17 \text{ M}$ ;  $[KMnO_4] = 3.33 \times 10^{-5} \text{ M}$



**Figura VI.9** .- Influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción de oxidación

### VI.2.5.- Rectas de calibrado del ácido Folínico

Una vez estudiadas y optimizadas tanto las variables químicas como las instrumentales para la determinación cinética de ácido folínico, se realizó el siguiente estudio con objeto de comprobar si existe una buena relación lineal entre la concentración de ácido folínico y las pendientes de las curvas cinéticas. Para ello, preparamos disoluciones que en un volumen final de 3.00 mL contienen:

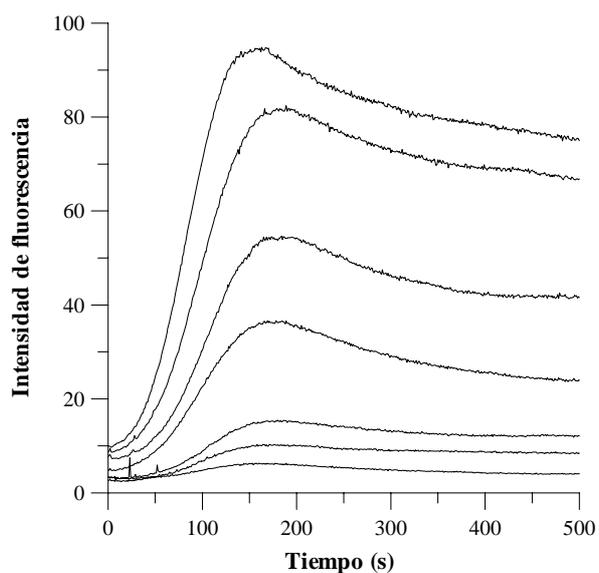
- Cantidades variables de ácido folínico
- 0.5 mL de disolución de NaOH 1.0 M
- agua ultrapura hasta completar 2.00 mL.
- 1.0 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4}$  M

Las muestras se preparan por triplicado y a cada una de estas disoluciones se le registra la curva cinética entre 0-500 s y manteniendo el voltaje de la lámpara continua del espectrofluorímetro a 850 V. El registro de las curvas se hace manteniendo los monocromadores de excitación y emisión a 290 y 360 nm respectivamente y termostalizando a 70° C.

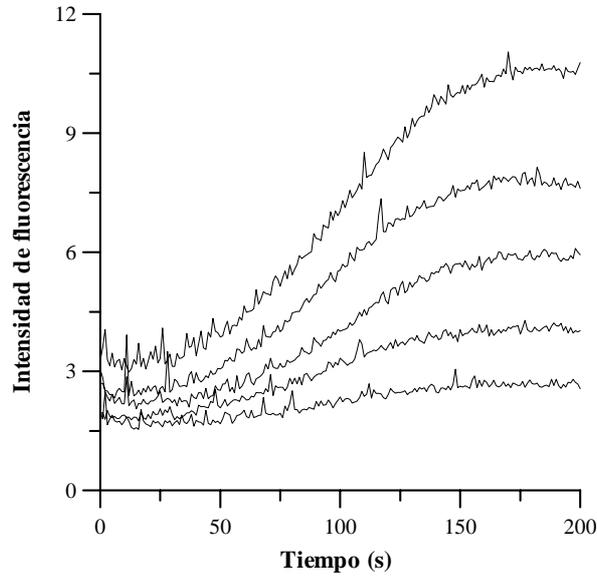
Estas condiciones, nos permiten poder establecer dos rectas de calibrado con distintos rangos de concentración de ácido folínico, una de ellas entre 0 y 1 mg L<sup>-1</sup> y la otra entre 0 y 100 µg L<sup>-1</sup>. Las curvas cinéticas se han representado en las Figuras VI.10. y VI.11., y las correspondientes rectas de calibrado en las Figuras VI.12 y VI.13. Los parámetros estadísticos que

se derivan del análisis de las rectas obtenidas se han resumido en la Tabla VI.1.

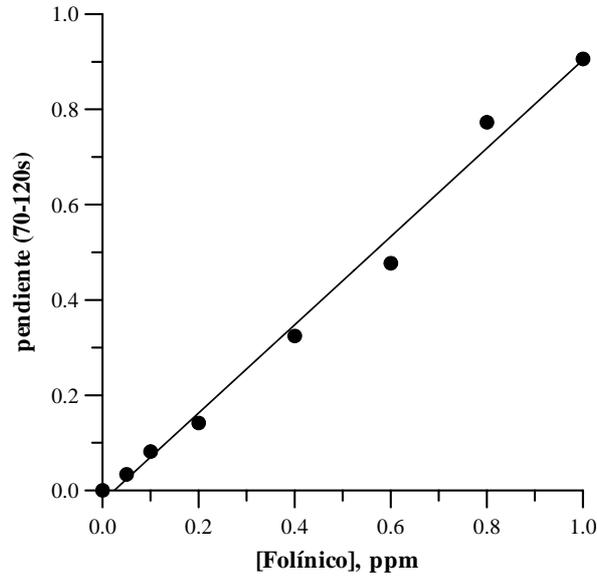
Se comprueba que en ambos casos los coeficientes de regresión que se obtienen son muy aceptables.



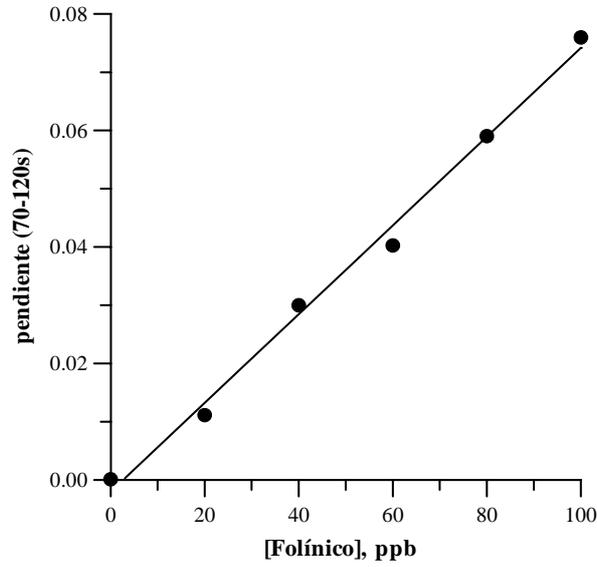
**Figura VI.10** .- Curvas cinéticas para distintas concentraciones de ácido fólico comprendidas entre 0.05 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura VI.11** .- Curvas cinéticas para distintas concentraciones de ácido fólico comprendidas entre 20 y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura VI.12** .- Influencia de la concentración de ácido fólico (0.05 - 1  $\text{mg L}^{-1}$ ) sobre la velocidad de reacción



**Figura VI.13 .-** Influencia de la concentración de ácido fólico (20-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) sobre la velocidad de reacción

**Tabla VI.1.-**Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración lineal univariante en la determinación cinética de ácido fólico con detección fluorescente.

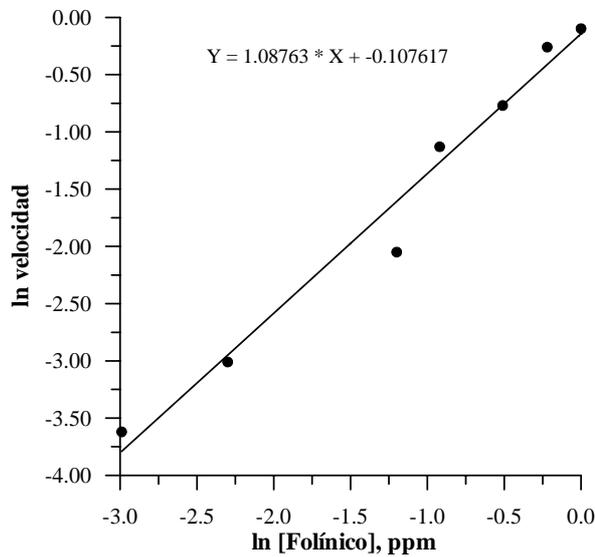
	Rango lineal 0 -1 mg L <sup>-1</sup>	Rango lineal 0 -100 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>Ecuación de la recta</b>	$Y = 0.934 [C] - 2.79 \times 10^{-2}$	$Y = 7.90 \times 10^{-4} [C'] - 4.61 \times 10^{-3}$
$\Phi_{\text{pendiente}}$	$2.509 \times 10^{-2}$	$2.081 \times 10^{-5}$
$\Phi_{\text{ordenada}}$	$1.378 \times 10^{-2}$	$1.336 \times 10^{-3}$
$\Phi_{\text{típica estimada}}$	$4.029 \times 10^{-2}$	$2.58 \times 10^{-3}$
<b>Coefficiente de regresión</b>	0.9929	0.9989
<b>LD (Winerfordner y Long)</b>	0.044 mg L <sup>-1</sup>	5.09 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>LD (Clayton, <math>\forall = \exists = 0.05</math>)</b>	0.10 mg L <sup>-1</sup>	9.5 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>Sensibilidad analítica, (<math>\gamma^{-1}</math>)</b>	0.043 mg L <sup>-1</sup>	3.266 $\mu\text{g L}^{-1}$

C: expresado como mg L<sup>-1</sup> ; C': expresado como  $\mu\text{g L}^{-1}$

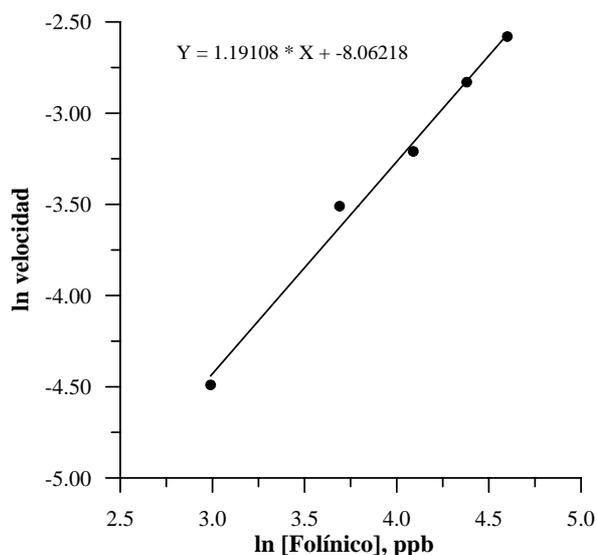
El análisis logarítmico de ambas rectas de calibrado, Figuras VI.14 y VI.15, indican una pendiente próxima a 1 en los dos intervalos de concentraciones estudiados, lo que nos permite decir que con respecto a la concentración de ácido folínico el orden parcial de reacción más probable es 1.

Este resultado, junto con los obtenidos en los estudios realizados acerca de la influencia de la concentración de NaOH y de  $\text{KMnO}_4$ , permite establecer, a  $70^\circ \text{C}$  y para concentraciones de NaOH  $> 0.13 \text{ M}$  y de  $\text{KMnO}_4 > 2.66 \times 10^{-5} \text{ M}$ , la siguiente ecuación cinética:

$$V (\text{s}^{-1}) = K [\text{ácido folínico}]$$



**Figura VI.14** .- Representación logarítmica de la influencia de la concentración de ácido folínico sobre la velocidad de reacción.



**Figura VI.15** .- Representación logarítmica de la influencia de la concentración de ácido fólico sobre la velocidad de reacción.

### VI.2.6.- Cálculo de la energía de activación

La utilización de la ecuación anterior nos permite calcular el valor de K a las diferentes temperaturas ensayadas en el estudio de la influencia de la temperatura y por tanto calcular la energía de activación a través de la ecuación de Arrhenius:

$$K = Ae^{-E_a/RT}$$

K = constante de velocidad

A = factor de frecuencia

$E_a$  = energía de activación

R = constante de los gases perfectos

T = temperatura absoluta

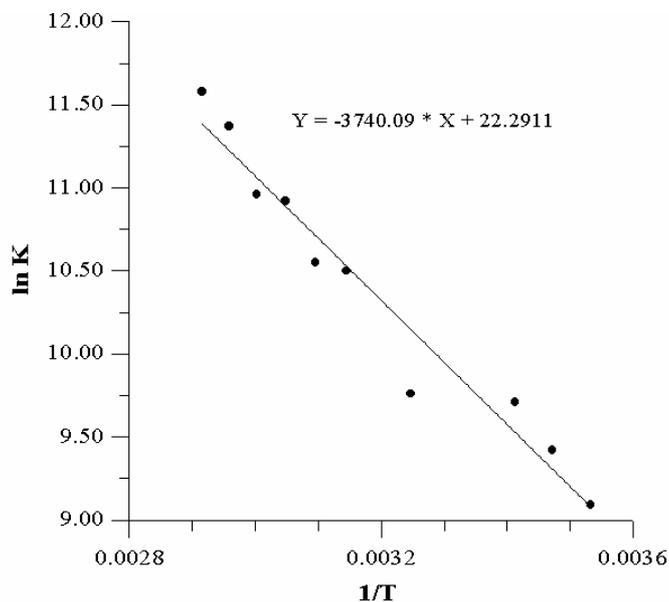
Cuando se mantienen constantes todas las variables, excepto la temperatura, se puede relacionar  $\ln K$  con la temperatura absoluta a través de la siguiente expresión:

$$\ln K = -\frac{E_a}{RT} + \ln A + cte$$

$$\ln K = cte' - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T}$$

En las reacciones en las que se cumple esta ecuación, al representar  $\ln K$  frente a  $1/T$  ( $k^{-1}$ ) se obtiene una recta cuya pendiente es  $-E_a/R$ , lo que nos permite poder calcular la energía de activación.

En la Figura VI.16, se ha representado  $\ln K$  frente a  $1/T$ , donde  $K$  se ha calculado teniendo en cuenta que al concentración de ácido folínico es  $5.54 \times 10^{-6}$  M.



**Figura VI.16** .-Cálculo de la energía de activación de la reacción de oxidación del ácido folínico.  $[folínico] = 5.54 \times 10^{-6}$  M.

Al realizar la representación de  $\ln k$  frente a  $1/T$ , se obtiene la línea recta representada en la Figura VI.16 . La pendiente de esta recta resulta ser:

$$-E_a/R = -3740.09$$

de donde calculamos el valor de la energía de activación,  $E_a$ , que resulta ser:

$$E_a = 7.4 \text{ Kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

#### VI.2.7.- Repetitividad y seguridad del método

La reproducibilidad del método descrito se estudió sobre 11 disoluciones independientes de ácido folínico, que en un volumen final de 3.00 mL contenían 0.4 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido folínico.

Condiciones de las medidas:  $V = 850 \text{ V}$

$$\delta_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$$

$$\delta_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$$

$$T^a = 70 \text{ }^\circ\text{C}$$

De esta forma se obtiene los datos para las diferentes pendientes y los parámetros estadísticos que se resumen en la Tabla VI.3.

**Tabla VI.3** .- *Parámetros estadísticos de la repetitividad del método*

<b>Valor medio de la velocidad (s<sup>-1</sup>)</b>	0.387
<b>Desviación estándar (S<sub>n-1</sub>)</b>	0.01395
<b>Intervalo de confianza</b>	0.387 ± 9.378 x 10 <sup>-3</sup>
<b>% Error</b>	2.4 %

### VI.2.8.- Método propuesto

Teniendo en cuenta los estudios y resultados expuestos con anterioridad, se propone el siguiente método operatorio para la determinación cinética con detección fluorescente de ácido fólnico.

Directamente, en la cubeta de medida, se adicionan:

- S alícuotas de la disolución problema, de tal manera que la concentración de ácido fólnico este comprendida entre 0 y 100 µg L<sup>-1</sup> o entre 0 y 1 mg L<sup>-1</sup>,
- S 0.5 mL de disolución de NaOH 1.0 M
- S agua ultrapura hasta completar 2.00 mL
- S 1.0 mL de disolución de KMnO<sub>4</sub> 10<sup>-4</sup> M

El portacubetas se mantiene a 70° C mediante un baño termostatzado.

En estas condiciones se registran las curvas cinéticas durante 500 segundos manteniendo los

monocromadores de excitación y emisión a 290 y 360 nm respectivamente. Las pendientes se miden entre 50 y 120 segundos.

La aplicación de la ecuación de calibración nos permite obtener la concentración de ácido folínico presente en la muestra.

### **VI.2.9.- Estudios de distintos interferentes en la determinación cinética del ácido Folínico**

La selectividad del método propuesto se ha estudiado analizando el efecto de diferentes especies que pueden acompañar al ácido folínico. Entre estos compuestos se encuentran las pteridinas, que se excretan en la orina (como productos de degradación del ácido fólico), metotrexato (agente antineoplásico administrado conjuntamente con el ácido folínico), ácido ascórbico (utilizado para conservar las muestras de orina) y triamtereno (compuesto fuertemente fluorescente con actividad de diurético).

Para investigar el grado de interferencia de estos compuestos, en la oxidación de LV con  $\text{KMnO}_4$ , se preparan disoluciones que en un volumen final de 3.0 mL contienen:

- 0.4 mg L<sup>-1</sup> de ácido folínico
- cantidades variables del interferente en estudio
- 0.5 mL de disolución de NaOH 1.0 M
- agua ultrapura hasta completar 2.00 mL
- 1.0 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$  10<sup>-4</sup> M

Las concentraciones de las especies interferentes se variaron en un intervalo comprendido entre 50 y 2400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (relación 16:1 - 1:10, interferente:LV (p/p)). Los resultados obtenidos que se resumen en la Tabla VI.4, nos indican que en la determinación de ácido folínico no interfieren, metotrexato en al menos una relación 6:1 y el ácido ascórbico en relación 8:1. Es notable que las pteridinas, componentes normalmente presentes en la orina, no interfieren en una proporción 4:1. La interferencia más seria es la provocada por el triamtereno ya que interfiere incluso en concentraciones inferiores a las de ácido folínico en estudio.

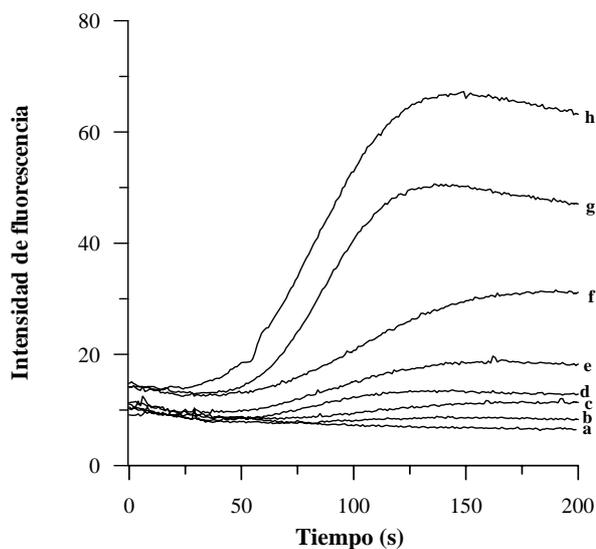
**Tabla VI.4.-** Recuperaciones obtenidas en la determinación de ácido fólico ( $0.400 \text{ mg L}^{-1}$ ) en presencia de distintos interferentes

Interferente	Relación Interferente /LV	Ác. fólico encontrado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Recup %
<b>Metotrexato</b>	6	0.389	97
	4	0.392	98
	1	0.396	99
<b>Ácido ascórbico</b>	16	0.304	76
	8	0.396	99
	4	0.420	105
	1	0.396	99
<b>Biopterin</b>	4	0.428	107
	2	0.352	88
	1	0.412	103
<b>Xantopterin</b>		0.396	
	4	0.392	99
	2	0.396	98
	1		99
<b>Neopterin</b>	4	0.388	97
	2	0.376	94
	1	0.364	91
<b>Isoxantopterin</b>	4	0.392	98
	2	0.400	100
	1	0.396	99
<b>Triamtereno</b>	1	0.240	60
	0.5	0.260	65
	0.1	0.288	72

### **VI.2.10.- Análisis de ácido folínico en orina humana**

El método propuesto se ha aplicado a la determinación de ácido folínico en orina humana proveniente de personas sanas. Las muestras de orina se contaminan con ácido folínico y se diluyen 25 veces (1.0 mL de orina enriquecida en un volumen final de 25.0 mL). A partir de esta disolución de orina diluida, tomamos 0.1 mL y la sometemos al procedimiento general. Aplicamos el método de la adición patrón contaminando la orina con diferentes cantidades de ácido folínico para concentraciones entre 0.5 y 15.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la Figura VI.17 se presentan las curvas cinéticas de las muestras de orina contaminadas así como de una muestra de orina sin contaminar.



**Figura VI.17 .-** Curvas cinéticas de muestra de orina (dilución 1/25) no contaminadas (a) y contaminadas con diferentes cantidades de LV: 0.5 :g mL<sup>-1</sup> (b), 1.0 :g mL<sup>-1</sup> (c), 1.5 :g mL<sup>-1</sup> (d), 2.5 :g mL<sup>-1</sup> (e), 5.0 :g mL<sup>-1</sup> (f), 10.0 :g mL<sup>-1</sup> (g), 15.0 :g mL<sup>-1</sup> (h)

En la Tabla VI.5 se resumen las recuperaciones obtenidas así como las desviaciones estándar calculadas al realizar tres réplicas de cada muestra aplicando el método de la adición patrón. Se observa que los porcentajes obtenidos son muy aceptables en todos los casos y que la pendiente del método de la adición patrón y la pendiente de la recta de calibrado son estadísticamente indistinguibles para un 95 % de probabilidad, según el método de Fisher ( $F_{cal} = 1.2809$  y  $F_{tab} = 3.444$ ;  $F_{cal} < F_{tab}$ ).

**Tabla VI.5 .-** Resultados obtenidos en el análisis de muestras de orina conteniendo ácido folínico

LV (ng/mL)		Recup <sup>b</sup> (%)	Pendiente (mL/ng s)
añadido <sup>a</sup>	encontrado <sup>b</sup> (RSD, %)		
40	32 (2.9)	<b>82</b>	En presencia de orina  1.041   Recta de calibrado de referencia:  1.068
60	66 (2.1)	<b>110</b>	
80	75 (0.5)	<b>94</b>	
100	104 (5.2)	<b>97</b>	
200	188 (1.8)	<b>94</b>	
400	393 (5.1)	<b>98</b>	
600	581 (1.7)	<b>97</b>	
		<b>Recuperación media: 96</b>	

<sup>a</sup> Concentración referida a la dilución final de la muestra.

<sup>b</sup> Valor medio de tres determinaciones individuales; RSD: desviación estándar relativa (n = 3).

Los resultados obtenidos parecen indicar la no interferencia de la matriz de la orina en la determinación cinético fluorimétrica de ácido folínico.

### **VI.3.- DETERMINACIÓN CINÉTICA DE ÁCIDO FÓLICO MEDIANTE FLUJO INTERRUMPIDO**

#### **VI.3.1.- Técnica de flujo detenido o stopped-flow**

El estudio y aplicación de la cinética de reacciones rápidas requiere el control estricto de la mezcla de los reaccionantes y del tiempo de operación para conseguir resultados reproducibles y fiables. El desarrollo de los sistemas de mezcla ha venido impulsado, por una parte, por la vida media de la reacción, y por otra, por la necesidad de reducir los volúmenes de muestra (y de reactivo), además de mejorar el sistema de control de la operación.

De los diferentes tipos de sistemas de mezcla descritos (de flujo continuo, acelerado, pulsado, etc.), el más popular y más fiable para llevar a cabo reacciones rápidas es la mezcla con flujo interrumpido (*stopped-flow mixing*). Este método consiste esencialmente en la mezcla de muestra y reactivos por medio de dos jeringas impulsoras que son accionadas manual o automáticamente (por medio de un dispositivo neumático) dentro de una célula de flujo o cámara de mezcla que puede actuar también como célula de detección. El flujo es parado bruscamente por medio de una tercera jeringa (jeringa de parada) y la señal analítica se registra en función del tiempo.

Esta técnica es la exigida para reacciones con vidas medias de unos pocos milisegundos a varios segundos.

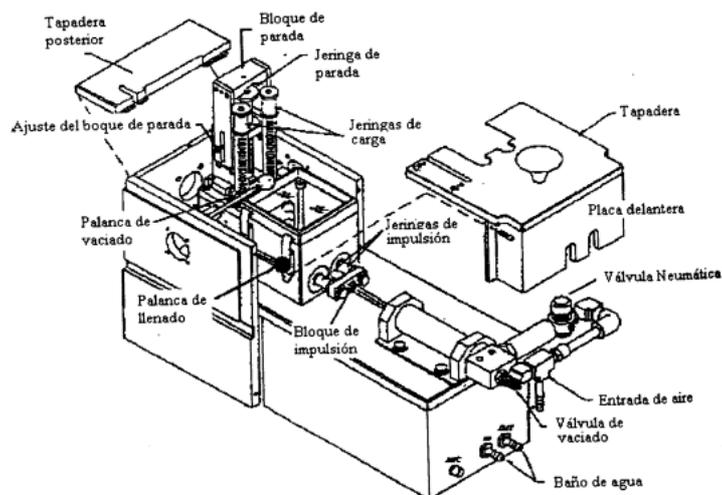
Sus prestaciones dependen marcadamente del tiempo muerto, que es el tiempo que transcurre desde que un elemento del fluido alcanza al mezclador hasta que llega al punto de observación. El tiempo muerto viene determinado por la eficiencia de la mezcla (tiempo de mezcla) y los tiempos de transporte y parada del flujo. Desde el punto de vista práctico, el tiempo muerto del instrumento debe ser alrededor de dos órdenes de magnitud menor que la vida media de la reacción. El objeto es acercarse lo más posible a esa velocidad inicial teórica.

Algunas de las principales características de esta técnica son:

- a) utilización de pequeños volúmenes de muestra y reactivos
- b) mezcla rápida y completa de los reaccionantes
- c) obtención rápida de resultados
- d) mejora de la precisión y exactitud de los resultados y de la selectividad frente a la técnica convencional
- f) aprovechamiento de todas las ventajas inherentes a los métodos cinéticos.

En cuanto al módulo de stopped-flow, hemos utilizado un módulo SLM-Aminco MilliFlow reactor de flujo detenido, que amplía el uso del SLM Aminco, permitiendo el estudio de los cambios de fluorescencia en reacciones rápidas. El reactor de flujo detenido

MilliFlow (Figura VI.18) consiste en dos jeringas de carga, dos jeringas de impulsión hacia el departamento de cubeta de paso óptico 2x2 mm, una jeringa de parada que cierra el circuito eléctrico del bloque de parada, una válvula para llenar las jeringas de impulsión y otra válvula que permite el vaciado y limpieza de la celda de medida. Este reactor esta diseñado de forma que todo el aparato puede ser termostatzado de 10 a 45 °C con un baño de agua.



**Figura VI.18** .- Reactor de Flujo parado: MilliFlow  
*Stopped Flow Reactor*

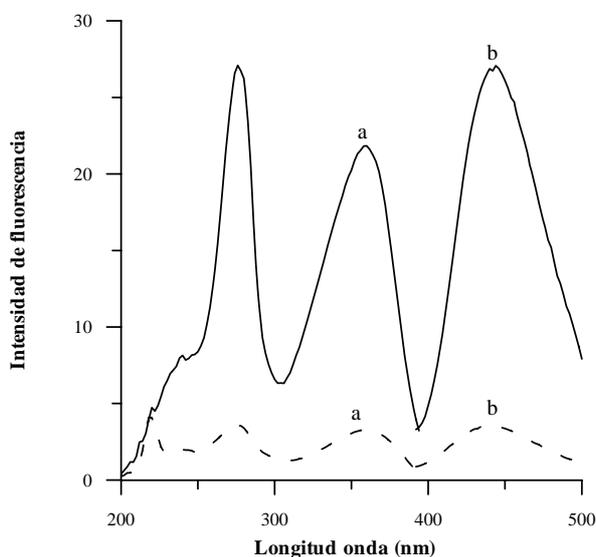
La forma de operar en el reactor de flujo detenido es como se explica a continuación: se parte con las jeringas inyectoras llenas de reactivo y de muestra. Se abre la válvula de llenado accionando su palanca hasta la posición de llenado y los reactivos se transfieren al interior de las jeringas de impulsión, llenándolas con el

volumen deseado. Se vuelve a cerrar la válvula de llenado y a continuación manualmente se presionan las jeringas de impulsión, haciendo que el reactivo y la muestra pasen al mezclador, donde se mezclan, e inmediatamente pasan a la celda de observación. La mezcla de la reacción pasa luego a la jeringa de paro, que se llena al chocar su émbolo con el bloque de paro. De esta forma el flujo cesa casi instantáneamente, quedando llena la celda de observación con una porción de disolución recién mezclada. De esta forma se puede seguir el proceso de la reacción. Después de que se haya observado completamente la reacción, se deben expulsar de la jeringa de parada los reactivos que se hayan consumido en la reacción. Para ello, se abre la válvula de vaciado moviendo su palanca hasta la posición de vaciado y, manualmente, se empuja el pistón de la jeringa de parada, y posteriormente, se cierra esta válvula poniendo su palanca en la posición de funcionamiento.

El reactor MilliFlow utiliza jeringas Hamilton Gastight. Dichas jeringas están constituídas con un diámetro interno controlado. La punta del émbolo es de precisión y está fabricada con teflón. El cilindro de la jeringa es de vidrio de borosilicato. La combinación de este vidrio y el teflón proporciona un entorno inerte al flujo para la mayoría de las aplicaciones.

### VI.3.2.- Estudio cinético-fluorimétrico de la reacción de ácido fólico con permanganato potásico mediante la técnica de flujo detenido

El ácido fólico, en presencia de permanganato potásico y en medio ácido, genera un producto con una fluorescencia más intensa que la del ácido fólico, de forma similar a lo descrito en el apartado anterior para el ácido folínico.



**Figura VI.19** .- Espectros de excitación (a) y emisión (b) del ácido fólico (----) y del producto resultante de la oxidación (—)

En este apartado vamos a estudiar y optimizar las variables tanto químicas como instrumentales, con objeto de proponer un método cinético-fluorimétrico para la determinación de ácido fólico, basado en la medida de la intensidad de fluorescencia del producto

formado. Se registran los espectros de excitación y emisión antes y después de la oxidación (Figura VI.19).

Se fijan los máximos del producto oxidado a :  $\lambda_{exc} = 276$  nm y  $\lambda_{em} = 438$  nm. (Paso de luz de 8 nm en el monocromador de excitación y 16 nm en el de emisión).

Cuando se comparan los espectros del ácido fólico y del producto de su oxidación se observa como no existe un desplazamiento apreciable de los máximos de excitación y emisión.

Teniendo en cuenta la velocidad elevada con que tiene lugar la reacción se cree conveniente llevar a cabo el estudio cinético-fluorimétrico mediante un módulo de flujo interrumpido que aumenta la exactitud y precisión de las medidas de velocidad.

Las concentraciones en la cámara de mezcla (celda de medida) de todos los componentes, es la mitad que en la jeringa, siempre que se mezclen volúmenes iguales de ambas jeringas.

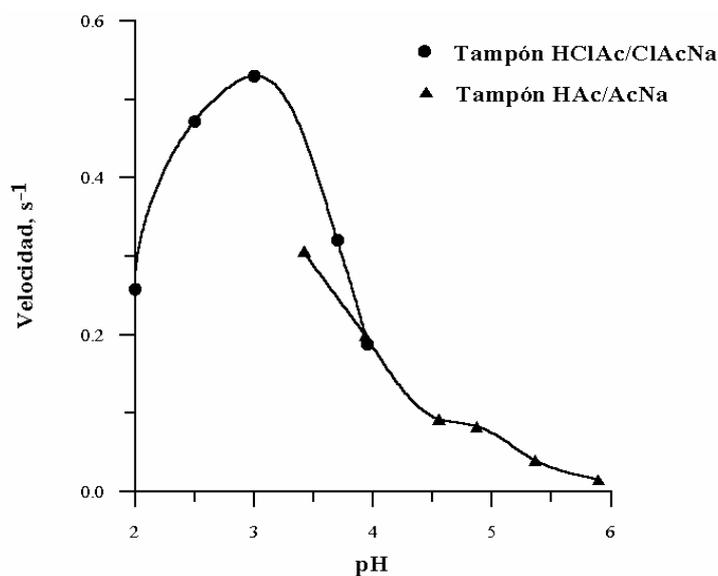
### **VI.3.2.1 .- Influencia del pH**

En estudios anteriores ya vimos que las máximas señales de fluorescencia para el ácido fólico se obtenían a valores de pH comprendidos entre 3 y 5, por lo que hemos registrados curvas cinéticas utilizando dos tampones; tampón ácido cloroacético/cloroacetato sódico que nos permite registrar curvas con valores de

pH comprendidos entre 2.00 y 3.95 y tampón ácido acético/acetato sódico que nos permite tener valores de pH comprendidos entre 3.93 y 5.89.

En la Figura VI.20 podemos observar como cuando se utiliza tampón ácido cloroacético/ cloroacetato sódico se obtienen las máximas pendientes de las curvas cinéticas. Las pendientes de dichas curvas cinéticas se han calculado efectuando la correspondiente regresión lineal en los 15 primeros segundos de reacción.

Se selecciona como óptimo un pH de 3.0 ya que coincide con un máximo valor de la pendiente.



**Figura VI.20 .-** Variación de la velocidad de reacción a diferentes valores de pH

### VI.3.2.2 .- Influencia de la concentración de tampón

Para ello se preparan disoluciones que contienen una concentración en jeringa de:

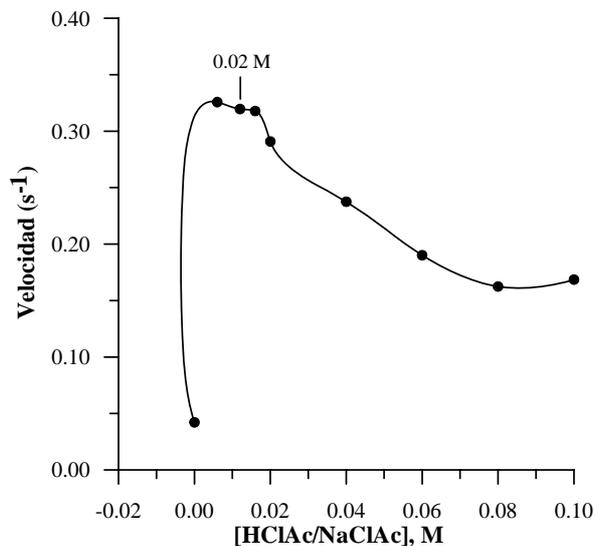
Jeringa 1:

- 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido fólico
- Cantidades variables de tampón HClAc/NaClAc 0.5 M (pH = 3.0)
- Agua ultrapura hasta completar 25.0 mL

Jeringa 2:

- Cantidades variables de tampón HClAc/NaClAc 0.5 M (pH = 3.0)
- 20.0 mL de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-4}$  M
- Agua ultrapura hasta completar 25.0 mL.

Así se registran las curvas cinéticas en las mismas condiciones instrumentales. Los valores correspondientes a las velocidades de reacción, medidas utilizando un intervalo de regresión de 15 s, para las diferentes concentraciones de tampón ensayadas, se recogen en la Figura VI.21. Observamos una pequeña meseta a concentraciones bajas de tampón, y a medida que aumenta la concentración de tampón disminuye la pendiente de las curvas cinéticas, por lo que vamos a elegir como concentración óptima de tampón la de 0.02 M.



**Figura VI.21** .- Influencia de la concentración de tampón HClAc/NaClAc en las pendientes de las curvas cinéticas. [Fólico] = 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$

### VI.3.2.3 .- Influencia de la concentración de permanganato potásico sobre la cinética de oxidación del ácido fólico en medio ácido

Para el estudio de esta variable se preparan disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contienen:

Jeringa 1:

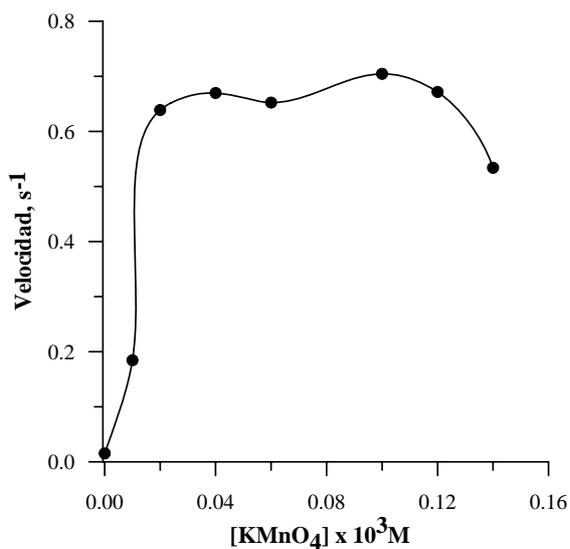
- 6.0 mL de ácido fólico de 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$
- 1.0 mL de tampón HClAc/NaClAc 0.5M (pH = 3.0)
- Agua ultrapura hasta completar 25.0 mL

Jeringa 2:

- 1.0 mL de tampón HClAc/NaClAc 0.5 M (pH = 3.0)

- Cantidades variables de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-3}$  M
- Agua ultrapura hasta completar 25.0 mL

Así se registran las curvas cinéticas, manteniendo los monocromadores de excitación y emisión a 276 y 438 nm respectivamente y un voltaje de 850 V. La temperatura la mantenemos en 35 °C. Las pendientes de las curvas cinéticas se miden tomando un intervalo de regresión de 15 s, y los resultados obtenidos se representan en la Figura VI.22. Observamos que la pendiente aumenta a medida que lo hace la concentración de  $\text{KMnO}_4$  hasta alcanzarse una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M a partir de la cual la pendiente de las curvas cinéticas se mantiene prácticamente constante. Para posteriores experiencias se elige como concentración óptima de  $\text{KMnO}_4$  la que se obtiene con la adición de 4.0 mL de disolución  $10^{-3}$  M que resulta ser  $8 \times 10^{-5}$  M.



**Figura VI.22.-** Representación de la concentración de  $KMnO_4$  frente a la pendiente de las curvas cinéticas.  $[Fólico] = 4 \mu g mL^{-1}$  (en célula)

#### VI.3.2.4 .- Influencia de la temperatura

El estudio de esta variable instrumental se lleva a cabo con disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contienen:

Jeringa 1:

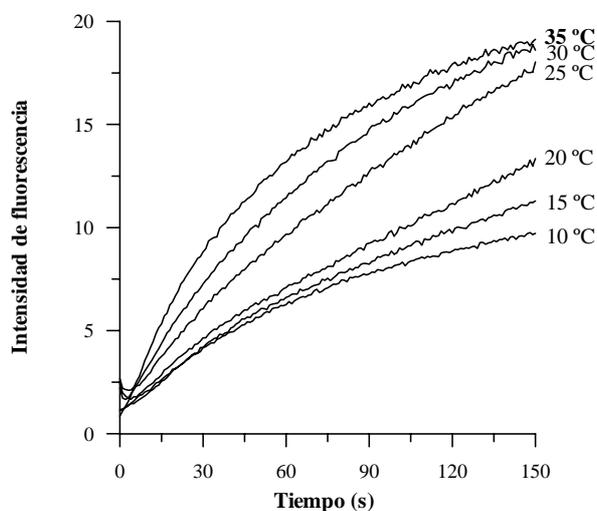
- 6.0 mL de ácido fólico de  $15 \mu g mL^{-1}$
- 1.0 mL tampón HClAc/ClAcNa, 0.5 M (pH = 3.0)
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Jeringa 2:

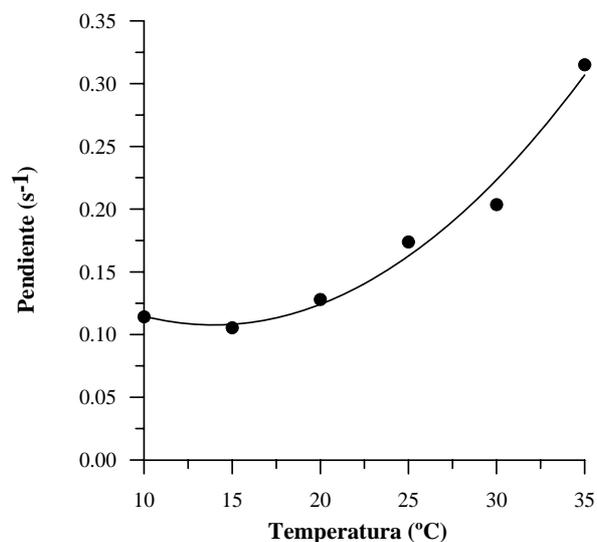
- 1.0 mL tampón HClAc/ClAcNa, 0.5 M (pH = 3.0)
- 4.0 mL  $KMnO_4$ ,  $10^{-3}$  M
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

A estas disoluciones se les registra su curva cinética al mismo tiempo que se varía la temperatura entre 10 y 35 °C, pues a temperaturas superiores el módulo SLM-aminco Milliflow no puede trabajar. Las curvas cinéticas obtenidas en este rango de temperatura se representan en la Figura VI.23.

Las velocidades de reacción medidas utilizando un intervalo de regresión de 15 s, para las diferentes temperaturas se representan en la Figura VI.24, donde observamos que las mayores pendientes se obtienen entre 30 y 35 °C. Para posteriores experiencias elegimos como temperatura óptima 35 °C, ya que es la máxima que nos permite utilizar el módulo SLM.



**Figura VI.23 .-** Curvas cinéticas correspondientes a la oxidación del ácido fólico a distintas temperaturas.  $[Fólico] = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $[KMnO_4] = 8 \times 10^{-5} \text{ M}$  (en célula)



**Figura VI.24** .- Influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción de oxidación.

#### VI.3.2.5 - Recta de calibrado del ácido fólico

Una vez estudiadas y optimizadas tanto las variables químicas como las instrumentales para la determinación cinética del ácido fólico, se realizó el siguiente estudio con objeto de comprobar si existe una buena relación lineal entre la concentración de ácido fólico y las pendientes de las curvas cinéticas. Para ello, preparamos disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contienen:

Jeringa 1:

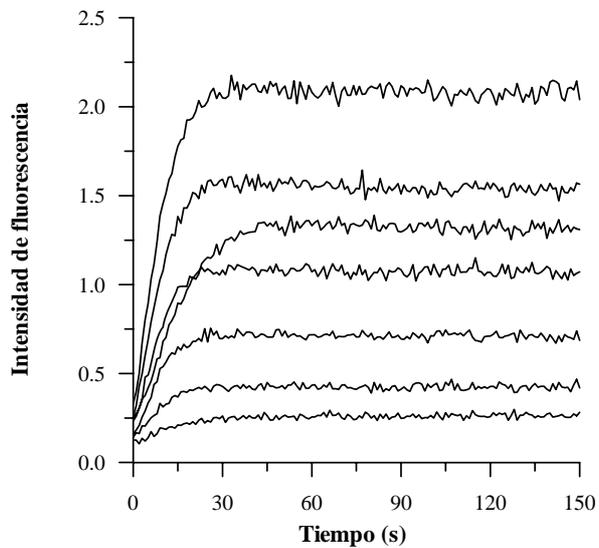
- Cantidades variables de ácido fólico
- 1.0 mL tampón HClAc/ClAcNa, 0.5 M pH = 3.0
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Jeringa 2:

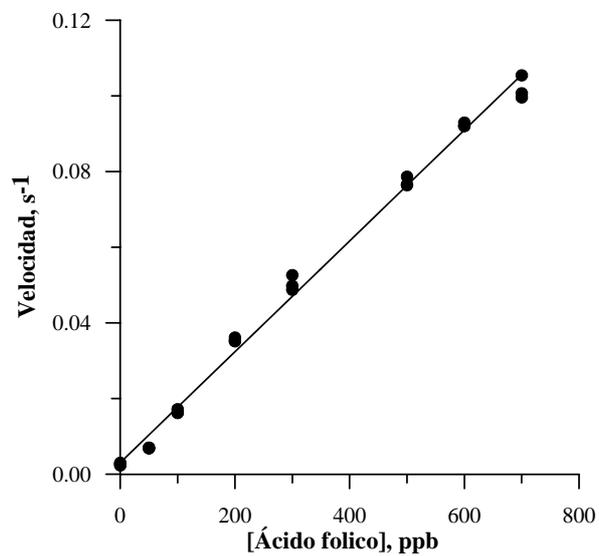
- 1.0 mL tampón HClAc/ClAcNa, 0.5 M pH = 3.0
- 4.0 mL  $\text{KMnO}_4$ ,  $10^{-3}$  M
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Las muestras se preparan por triplicado y a cada una de estas disoluciones se les registra su curva cinética entre 0-150 s y manteniendo el voltaje de la lámpara continua del espectrofluorímetro a 850 V. El registro de las curvas se hace manteniendo los monocromadores de excitación y emisión a 276 y 438 nm respectivamente y con un ancho de rendija de 8 y 16 nm respectivamente. Se termostatiza a 35 °C.

En estas condiciones se ensayaron diversos intervalos de concentración y se estableció la recta de calibrado entre 0 y 700  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ácido fólico. Las curvas cinéticas se han representado en la Figura VI.25, y la correspondiente recta de calibrado en la Figura VI.26. Los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de la recta obtenida se han resumido en la Tabla VI.7 y como se puede observar se obtiene un adecuado coeficiente de regresión.



**Figura VI.25** .- Curvas cinéticas para distintas concentraciones de ácido fólico comprendidas entre 50 y 700  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



**Figura VI.26** .- Influencia de la concentración de ácido fólico (50-700  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) sobre la velocidad de reacción.

**Tabla VI.7 .-** *Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración lineal univariante en la determinación cinética de ácido fólico mediante flujo interrumpido y con detección fluorescente.*

	<b>Rango lineal 50-700 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></b>
<b>Ecuación de la recta</b>	$Y = 1.46 \times 10^{-4} [C] + 3.07 \times 10^{-3}$
$\sigma_{\text{pendiente}}$	$2.39 \times 10^{-6}$
$\sigma_{\text{ordenada}}$	$9.44 \times 10^{-4}$
$\sigma_{\text{típica estimada}}$	$2.91 \times 10^{-3}$
<b>Coefficiente de regresión</b>	0.9971
<b>LD (Winerfordner y Long)</b>	$20.55 \mu\text{g L}^{-1}$
<b>LD (Clayton, <math>\alpha = \beta = 0.05</math>)</b>	$44.70 \mu\text{g L}^{-1}$
<b>Sensibilidad analítica (<math>\gamma^{-1}</math>)</b>	$19.93 \mu\text{g L}^{-1}$

### VI.3.2.6 .- Repetitividad y seguridad del método

La repetitividad del método descrito se estableció analizando 11 disoluciones independientes de ácido fólico, que en la célula de medida contenía  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de ácido fólico, en las condiciones óptimas establecidas.

De esta forma se obtienen los datos para las diferentes pendientes y se resume en la Tabla VI.8.

**Tabla VI.8 .-** Datos para obtener la repetitividad del método

<b>Muestra</b>	<b>Ácido fólico encontrado (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
1	116	<b>116</b>
2	90	<b>90</b>
3	98	<b>98</b>
4	97	<b>97</b>
5	103	<b>103</b>
6	104	<b>104</b>
7	96	<b>96</b>
8	98	<b>98</b>
9	98	<b>98</b>
10	98	<b>98</b>
11	101	<b>101</b>

A partir de estos datos y aplicando el cálculo estadístico, se encuentran los parámetros siguientes:

Valor medio (x):  $99.91 \mu\text{g L}^{-1}$

Desviación standar ( $S_{n-1}$ ): 6.50

Intervalo de confianza:  $99.91 \pm 4.37$

% Error: 4.37

### VI.3.2.7.- Método propuesto

Teniendo en cuenta los estudios y resultados expuestos con anterioridad, se propone el siguiente método operatorio para la determinación cinética mediante flujo interrumpido con detección fluorescente del ácido fólico.

Composición de las disoluciones:

Jeringa 1:

- alicuotas de disolución problema, de tal manera que la concentración de ácido fólico esté comprendida entre 0 y  $1400 \mu\text{g L}^{-1}$
- 1.0 mL de tampón HClAc/NaClAc, 0.5 M, pH = 3.0
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Jeringa 2:

- 1.0 mL tampón HClAc/NaClAc, 0.5 M, pH = 3.0
- 4.0 mL  $\text{KMnO}_4$ ,  $10^{-3}$  M
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

La celda de medida se mantiene a  $35^\circ\text{C}$  mediante un baño termostatzado.

En estas condiciones se registran las curvas cinéticas durante 150 segundos manteniendo los monocromadores de excitación y emisión a 276 y 438 nm respectivamente y el ancho de rendija de 8 y 16 nm respectivamente. Las pendientes se miden con un intervalo de regresión de 15 s.

La aplicación de la ecuación de calibración nos permite obtener la concentración de ácido fólico presente en la muestra.

### **VI.3.2.8 .- Estudio de distintos interferentes en la determinación cinética del ácido fólico**

El estudio de las interferencias se lleva a cabo sobre disoluciones que contenían dos niveles de concentración de ácido fólico:

Jeringa 1:

- Serie 1.-  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de ácido fólico
- Serie 2.-  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  de ácido fólico
- Cantidades variables del interferente en estudio
- 1.0 mL de tampón HClAc/NaClAc, 0.5 M, pH = 3.0
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Jeringa 2:

- 1.0 mL de tampón HClAc/NaClAc, 0.5 M, pH = 3.0
- 4.0 mL de  $\text{KMnO}_4$ ,  $10^{-3}$  M
- Agua ultrapura hasta completar los 25.0 mL

Los resultados obtenidos que se resumen en la Tabla VI.9 y VI.10 como se puede observar la interferencia más notable es la producida por las pteridinas, aunque también interfieren en menor medida ácido folínico y metotrexato, como consecuencia el método cinético propuesto no es aplicable al análisis de fluídos biológicos dada la similitud estructural de los derivados pteridínicos naturalmente presentes. Por tanto

no se ha abordado su aplicación a estos medios. En estudios posteriores se establecerá la viabilidad de su aplicación al análisis de alimentos, campo que queda fuera de los límites de esta Memoria

**Tabla VI.9 .-** Tolerancia del ácido fólico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) frente a distintos interferentes

Interferente	Relación Interferente/ácido fólico (p/p)	Ácido fólico calculado	% Recup.
<b>Folínico</b>	1/1	192	96
	1.5/1	170	85
	2/1	158	79
<b>Metotrexato</b>	1/1	224	112
	2/1	226	113
	3/1	266	133
	4/1	254	126
<b>Neopterín</b>	½	186	93
	1/1	151	75
	2/1	132	66
<b>Xanthopterín</b>	½	182	91
	1/1	169	85
	½	141	70
<b>Biopterín</b>	½	84	42
<b>Isoxantopterín</b>	½	105	52

**Tabla VI.10.- Tolerancia del ácido fólico ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$ )  
frente a distintos interferentes**

<b>Interferente</b>	<b>Relación Interferente/ácido fólico (p/p)</b>	<b>Ácido fólico calculado</b>	<b>% Recup.</b>
<b>Folínico</b>	1/1	380	95
	1.5/1	373	93
	2/1	356	89
	3/1	320	80
<b>Metotrexato</b>	1/1	384	96
	2/1	391	97
	3/1	379	95
	4/1	392	98
<b>Neopterín</b>	½	364	91
	1/1	344	86
<b>Xanthopterín</b>	½	352	88
	1/1	340	85
<b>Biopterín</b>	½	373	93
	1/1	370	92
	2/1	290	72
<b>Isoxantopterín</b>	2/1	451	113
	1/1	448	112
	2/1	388	97

#### VI.4.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Sicilia, D., Rubio, S., Perez Bendito, D., Maniasso, N. y Zagatto, E.A.G., *Analyst.*, **124** (4), 615 (1999)
- 2.- Sendra, B., Panadero, S. y Gomez Hens, A., *J. Agric. Food. Chem.*, **47** (9), 3733 (1999)
- 3.- Perez Ruiz, T., Martinez Lozano, C., Tomas, V. y Fenoll, J., *Anal. Lett.*, **34** (2), 295 (2001)
- 4.- Bao, S.Y., Li, S.C., Hu, H.F. y Shi, S.X., *Fenxi Shiyanshi.*, **20** (5), 4 (2001)
- 5.- Feng, S.L., Fan, J., Wei, X.J. y Zhang, G.E., *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi.*, **20** (1), 113 (2000)
- 6.- Fan, J., Wang, R.Y. y Feng, S.L., *Fenxi Shiyanshi* **20** (2), 44 (2001)
- 7.- Li, B., Cui, Y.X., Wang, J., Feng, S.J. y Fan, J., *Lihua Jianyan, Huaxue Fenxi.*, **37** (4), 160 (2001)
- 8.- Shao, J.Z., *Fenxi Ceshi Xuebao.*, **21** (1), 87 (2002)
- 9.- Bao, S.Y., Li, S.C., Meng, F.H., Wang, G.H. y Shi, S.X., *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi.*, **22** (2), 284 (2002)
- 10.- Cai, R., Wu, X., Liu, Z. y Ma, W., *Analyst.*, **124** (5), 751 (1999)
- 11.- Wang, R.Y., Fan, J. y Feng, S.L., *Fenxi Huaxue.*, **28** (8), 968 (2000)
- 12.- Feng, S.L., Tang, A., Jiang, J.H. y Fan, J., *Anal.Chim.Acta.*, **455** (2), 187 (2002)
- 13.- Cheng, D.X. y Zhang, H.W., *Fenxi Huaxue.*, **30** (6), 719 (2002)

- 14.- Espinosa Mansilla, A., Duran Meras, I., Zamoro Madera, A., Pedano, L., Ferreyra, C.F., *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **29** (5), 851 (2002)

**Capítulo VII.**

**ESTUDIOS DE ÁCIDO FÓLICO,  
METOTREXATO, ÁCIDO FOLÍNICO,  
TRIAMTERENO Y CREATININA  
MEDIANTE ELECTROFORESIS  
CAPILAR**

## VII.1.- INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar de alta eficacia (HPCE), o simplemente “electroforesis capilar” (CE), es una técnica que ha surgido de la unión entre los poderosos mecanismos de separación de la electroforesis convencional en gel, con la instrumentación y los conceptos de automatización de la cromatografía de alta eficacia. Tiene por objeto separar los diferentes componentes de una mezcla, basándose en la distinta movilidad que experimentan las especies cuando son sometidas a un campo eléctrico muy intenso (300-400 V/cm) en el interior de un tubo capilar. Es una técnica que puede ser aplicada a la separación de una gran variedad de compuestos polares o apolares iónicos, o no iónicos. También se puede aplicar al análisis de biomoléculas de altos pesos moleculares.

### **Fundamentos que rigen la separación en electroforesis capilar**

La separación por EC se basa en la diferencia de velocidad de los solutos en el seno de un campo eléctrico.

Si aplicamos un campo eléctrico homogéneo, el compuesto cargado  $i$  es acelerado por una fuerza ( $F_e$ ) proporcional al campo eléctrico aplicado ( $E$ ).

$$F_e = q_i E \quad \text{Ecuación 1}$$

Debido a que el ión se encuentra en un medio acuoso, que tiene una viscosidad ( $\eta$ ), la fuerza de rozamiento ( $F_r$ ) que se opone a su movimiento dependerá de una constante ( $k$ ), de la viscosidad del medio ( $\eta$ ) y de la velocidad de migración del ión en el medio ( $v_i$ ).

$$F_r = k \eta v_i \quad \text{Ecuación 2}$$

De acuerdo con la ley de Stokes la constante  $k$  puede ser sustituida por  $6\pi r$  para una partícula esférica. Para partículas no esféricas y pequeños iones, el valor numérico es inferior a 6.

$$F_r = 6\pi r_i \eta v_i \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $r_i$  es el radio del ión solvatado o, en este caso, hidratado.

Si la aceleración causada por la fuerza eléctrica ( $F_e$ ) es compensada por la fuerza de rozamiento se alcanzará un estado de equilibrio en el que las fuerzas serán iguales y de sentido contrario y el ión se moverá con una velocidad constante  $v_i$ .

$$F_r = F_e \quad \text{Ecuación 4}$$

$$v_i = q E / 6\pi r_i \eta \quad \text{Ecuación 5}$$

De acuerdo a la ecuación anterior, la velocidad de migración del ión es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado. A este factor de proporcionalidad se le denomina movilidad

electroforética absoluta del ión ( $\mu_e$ ) que se puede expresar como:

$$\mu_e = v_i / E = (qE / 6r_i\pi\eta) / E = q / 6r_i\pi\eta \quad \text{Ecuación 6}$$

De esta ecuación se deduce que pequeñas partículas altamente cargadas, tienen altas movilidades electroforéticas y viceversa.

En la práctica se trabaja en presencia de otras especies en la disolución de electrolito. Las interacciones electrostáticas a las que se ve sometido un ión en la disolución de electrolito afectan a la movilidad electroforética de dicho ión. Estos iones en disolución se rodean de contraiones de carga opuesta, que crean una atmósfera iónica. Para considerar estos efectos sobre la movilidad, se cambia la carga teórica del ión por una carga efectiva (menor) del ión y el radio hidrodinámico del ión por el radio efectivo del mismo, incluyendo su atmósfera de contraiones. Así, obtenemos una movilidad efectiva que depende no sólo de la viscosidad del medio sino también de las interacciones iónicas que ocurren en disolución. Como consecuencia, la movilidad efectiva será siempre inferior a la movilidad absoluta calculada anteriormente.

Para determinar la movilidad electroforética es necesario conocer el tiempo que tarda la molécula desde que es introducida en el capilar hasta su llegada al detector. A este tiempo se le llama tiempo de migración y depende directamente de la longitud del capilar e

inversamente de la movilidad electroforética y del campo eléctrico aplicado.

Si sólo se considerase la movilidad electroforética, no se explicaría completamente el comportamiento migratorio dentro del capilar, ya que dicho comportamiento depende también del flujo electroosmótico (1-3).

### **El flujo electroosmótico**

Es el fenómeno de transporte de moléculas de disolvente como resultado de la existencia de una doble capa eléctrica en una interfase sólido-líquido. Al aplicar un campo eléctrico tangencial a esta interfase, las cargas netas de la región difusa en el seno del líquido, comenzarán a moverse arrastrando consigo moléculas del solvente, dándole, por tanto, un movimiento de velocidad lineal  $v_{eo}$  (denominada velocidad electroosmótica), que será proporcional al campo eléctrico aplicado.

$$V_{eo} = - \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E = m_{eo} E \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $m_{eo}$ : es la movilidad electroosmótica

$\varepsilon$ : es la constante dieléctrica

$\eta$ : viscosidad del disolvente

$\zeta$ : es el potencial de la superficie del sólido  
llamado también potencial zeta o potencial electrocinético

$E$ : campo eléctrico aplicado

El potencial zeta es proporcional a la densidad de carga de la superficie ( $\sigma$ ) y al espesor de la capa eléctrica ( $\delta$ ), por lo tanto al aumentar la concentración del electrolito resulta una compresión de la doble capa disminuyendo su espesor y, como consecuencia, el potencial y el FEO (14).

$$\xi = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon} \quad \text{Ecuación 8}$$

Combinando las ecuaciones 7 y 8, se obtiene:

$$V_{eo} = -\frac{\delta\sigma}{\eta} E \quad \text{Ecuación 9}$$

Resulta por tanto, que el flujo electroosmótico es proporcional a la densidad de carga.

Generalmente, los capilares se fabrican de sílice fundida, si bien, materiales no iónicos, como el teflón, también exhiben flujo electroosmótico, que resulta probablemente de la adsorción de aniones sobre la superficie.

### **Desarrollo del flujo electroosmótico**

Cuando la sílice está en contacto con una disolución acuosa, su superficie se hidroliza para dar lugar a grupos silanol. Estos grupos pueden estar cargados positivamente, neutros o tener carga negativa, dependiendo del pH de la disolución acuosa. Los contraiones tienden a ser adsorbidos en la pared por

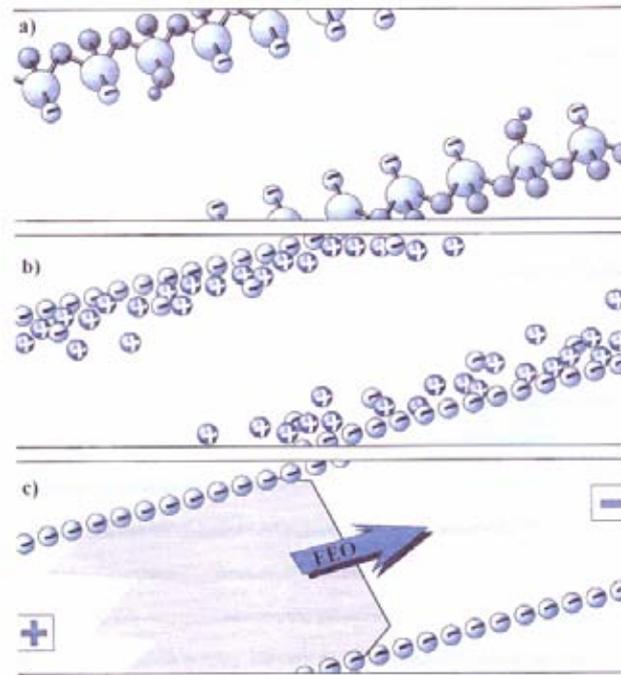
atracciones de tipo electrostático para compensar el defecto de carga, formándose así una doble capa rígida de iones a la que se superpone una doble capa difusa de iones (modelo de Stern). Cuando se aplica una diferencia de potencial a lo largo del capilar, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos hacia el cátodo y como estos están solvatados, arrastran en su movimiento al resto de la disolución que hay en el capilar, constituyendo el flujo electroosmótico (FEO).

Aunque el punto exacto de ionización de la sílice es difícil de determinar, el FEO comienza a tener un valor significativo a partir de pH 4. La Figura VII.1 representa la formación del FEO en las etapas descritas.

Mientras que el FEO, normalmente, es beneficioso para la separación, debe ejercerse sobre él cierto control, puesto que valores elevados pueden producir la elución de los compuestos antes de que se produzca la separación y valores muy bajos pueden conducir a tiempos de análisis elevados o incluso a que no eluyan determinados compuestos.

Una característica importante del flujo electroosmótico en capilares es que su perfil de velocidades es cuasi plano, a diferencia de lo que ocurre en el flujo originado por sistemas conducidos por presión que dan perfiles de flujo laminares o parabólicos. El perfil cuasi plano es muy útil, pues significa que todos los solutos, independientemente de

su posición en el capilar, van a presentar la misma velocidad causada por el FEO y se eluirán dando picos estrechos de alta eficacia.



- a) Superficie de sílice fundida cargada negativamente ( $\text{SiO}^-$ )
- b) Acumulación de cationes hidratados cerca de la superficie
- c) Flujo de disolvente hacia el cátodo después de la aplicación del campo eléctrico

**Figura VII.1** .- Desarrollo del flujo electroosmótico (FEO)

Los cationes migran más rápido ya que se ven impulsados por el FEO, los de menor tamaño son los que tienen mayor velocidad electroforética y serán los primeros en salir y los de mayor tamaño los últimos; las especies neutras avanzan juntas a la misma velocidad que el FEO; por último saldrán los aniones ya que estos están atraídos por el ánodo y oponen resistencia al FEO. En todos los casos, la velocidad resultante de cada especie, será la suma algebraica de la velocidad electroforética de la especie y velocidad electroosmótica.

### **Parámetros analíticos determinantes de la separación**

Se deben conocer los parámetros más relevantes que dan idea del correcto funcionamiento de una separación electroforética. Estos son los siguientes: el tiempo de migración ( $t_m$ ), la eficacia, la selectividad y la resolución.

El tiempo de migración ( $t_m$ ) de un analito es el tiempo que tarda en recorrer la longitud efectiva del capilar ( $l$ ) y se obtiene directamente del electroferograma. Este puede ser descrito en función de los parámetros experimentales como:

$$t_m = lL / (\mu_l + \mu_{FEO})V$$

siendo  $I$  la distancia efectiva del capilar, es decir la distancia desde el punto de inyección hasta el punto de detección, y  $L$  es la longitud total del capilar.

La eficiencia en los sistemas electroforéticos se cuantifica mediante el número de platos teóricos ( $N$ ) que se consiguen con un determinado capilar y se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$N = 5.54 (t_m / w_{1/2})^2$$

$w_{1/2}$ : ancho de pico a la mitad de su altura

Como se deduce de la ecuación anterior, para conseguir altas eficacias se necesitan picos estrechos y acortar los tiempos de migración en la medida de lo posible.

**La selectividad** ( $\alpha$ ) es la capacidad del sistema para separar solutos que están próximos entre sí y se mide como la distancia entre dos máximos consecutivos. La selectividad viene dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = (t_{m2} - t_{mFEO}) / (t_{m1} - t_{mFEO})$$

La forma más eficiente para ejercer una influencia notable sobre ella es cambiar el pH de la disolución.

La resolución ( $R_s$ ) es el parámetro más importante a la hora de la separación. Nos indica lo bien separados que están dos compuestos. Se puede calcular a partir del electroferograma usando la ecuación:

$$R_s = 2(t_{m2} - t_{m1}) / (w_1 + w_2)$$

Pero también se puede expresar como:

$$R_s = 0.177 \Delta\mu (V / D (+ \mu_{FEO}) )^{1/2} (IL)^{1/2}$$

De esta ecuación podemos deducir que la resolución aumenta con el voltaje pero no aumenta tanto como lo hace la eficiencia que es directamente proporcional a voltaje. Así, hemos de usar voltajes lo más altos posibles para llevar a cabo la separación ya que produce separaciones más rápidas, con altas eficiencias.

La mayor resolución se obtendrá cuando la movilidad del FEO sea igual y en sentido contrario a la movilidad electroforética media de los iones pero si tenemos en cuenta el  $t_m$  (*medio*):

$$t_m (\text{medio}) = IL / (\bar{\mu} + \mu_{FEO})$$

Si

$$\bar{\mu} = -\mu_{FEO}$$

entonces el  $t_m$  tendería a infinito, lo cual no es práctico. Por lo tanto, se debe mantener un  $\mu_{FEO}$  que de tiempos

de análisis lo más pequeños posible siempre que exista una resolución entre los picos.

La resolución depende también de las movilidades electroforéticas de los analitos y será tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia entre ellas. Esta diferencia se puede aumentar al optimizar el pH del electrolito de separación o bien mediante la adición de modificadores orgánicos al electrolito de separación que puede causar diferencias en las movilidades y, por lo tanto, aumentar la resolución y la selectividad del sistema.

### **Factores que afectan al desarrollo de la separación**

El alto poder de resolución de la EC se debe fundamentalmente a que los efectos dispersivos pueden ser controlados con la nueva instrumentación, por lo que es importante comprender estos efectos dispersivos para estimar su influencia sobre la separación.

#### *1.- Efectos de dispersión o dispersivos.*

El ensanchamiento de banda en EC es la suma de una serie de efectos que contribuyen al ensanchamiento de los picos. El ensanchamiento puede ser expresado en términos de la variante espacial  $\delta^2$ . Así, la varianza total será la suma total de una serie de varianzas debidas a determinadas fuentes de dispersión.

$$\delta_t^2 = \delta_D^2 + \delta_A^2 + \delta_J^2 + \delta_E^2 + \delta_I^2 + \delta_W^2 + \delta_O^2$$

*D*: difusión *A*: adsorción *J*: efecto Joule

*E*: dispersión electroforética *I*: inyección

*W*: cambio de la zona de detección *O*: otros

Difusión. La zona donde está contenida la muestra se va ensanchando por ambos lados debido a una diferencia de concentración entre la zona de muestra y el electrolito de separación. Se obtiene así un perfil de concentración semejante a una curva gaussiana.

Adsorción. La principal causa de adsorción sobre las paredes de sílice fundida, son las interacciones iónicas entre compuestos catiónicos y las propias paredes, que presentan cargas negativas.

Efecto Joule. Cuando una corriente pasa a lo largo del capilar, parte de la energía eléctrica es convertida a calor. Como consecuencia de este calor, aumenta la temperatura dentro del capilar creándose un gradiente de temperatura desde el centro hacia la pared del capilar y que es eliminada a través de las paredes de éste. Matemáticamente, puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$\Delta T_T = Qr_i^2/2 [1/K_1 \ln(r_2/r_1) + 1/K_2 \ln(r_3/r_2) + 1/r_3 (1/h)]$$

*Q*: calor generado por efecto Joule

*r<sub>i</sub>*: radio interno del capilar

$h$ : velocidad de transferencia térmica desde el capilar

$r_2$ : radio externo del capilar

$k_1$  y  $k_2$ : conductividades térmicas de la sílice y de la poliamida, respectivamente ( $k_1 > k_2$ )

$r_3$ : radio externo de la poliamida

Como consecuencia de la corriente eléctrica, el calor se genera homogéneamente a lo largo del interior del capilar.

Para obviar este fenómeno, se puede eliminar el calor de la superficie del capilar a través de un sistema de refrigeración que puede ser por una corriente forzada de aire o mediante el uso de un líquido refrigerante.

Longitud de la muestra inyectada. Es importante que la longitud de la muestra inyectada sea lo más pequeña posible. Si ésta es mayor que la dispersión causada por la muestra, la eficiencia (5) y la resolución se verán sacrificadas.

Electrodispersión. Ocasiona la dispersión de los picos electroforéticos debido a la diferente composición del tampón y la muestra inyectada, lo cual da origen a dos zonas de diferente conductividad y, por lo tanto, de campo eléctrico.

### **Aplicaciones de la electroforesis capilar**

La EC es una técnica de separación que cada día cobra más importancia a nivel de análisis de rutina. Esto es debido a su amplio rango de aplicación que incluye los ámbitos farmacéutico, clínico, forense, ambiental, de análisis de alimentos, etc. Se pueden encontrar desde separaciones de iones metálicos en muestras acuosas, de aminas en vinos, compuestos acídicos en alimentos, aniones en residuos de explosivos, fármacos en fluidos biológicos, proteínas y péptidos en muestras bioquímicas, etc. A continuación, se resumen alguna de las aplicaciones de la EC, recientemente publicadas.

El ácido ascórbico en tejidos neuronales y no neuronales ha sido determinado usando electroferis capilar con detección inducida por láser (6). También mediante EC se han determinado fármacos tales como dextrometofano, difenidramina y fenilefrina en jarabes expectorantes (7), codeína y su metabolito en orina humana aplicando detección amperométrica (8), nafazolina, difenidramina y fenilefrina en soluciones nasales (9) y tosufloxacino y trovafloxacino en orina (10).

Antibióticos tales como las cefalosporinas también han sido estudiados mediante electroforesis capilar de zona: estudio de la estabilidad de cefalosporinas (11) y determinación directa de cefalosporinas en muestras clínicas (12).

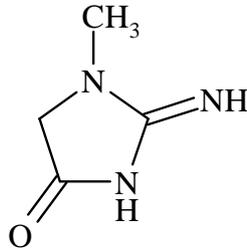
Ácidos orgánicos de cadena corta también se han determinado en suero (13) mediante electroforesis capilar.

Cabe destacar la determinación de drogas antituberculosas como son isoniazida, pirazinamida y rifampicina mediante cromatografía capilar electrocinética micelar (14) por nuestro departamento, y la determinación de tres drogas quimioterápicas como son 6-tioguanina, metotrexato y 5-fluorouracilo en orina humana (15), llevada a cabo por el equipo de investigación con el cual se desarrolló el presente capítulo.

También se ha determinado compuestos dentro del campo de la química agrícola como son herbicidas; sulfonilurea (16), herbicidas de bupiridilio (17), y compuestos tales como sustancias húmicas (18) y los principales carbohidratos y ácidos orgánicos en tomates (19).

Compuestos inorgánicos tales como vanadio en fertilizantes (20), ozono en atmósferas (21) y nitratos y nitritos en agua de mar (22) también son determinados mediante técnicas electroforéticas.

En este Capítulo se ha introducido la determinación de un nuevo compuesto como es la **creatinina** (CREA).



**Figura VII.2.-** Estructura química de la creatinina

La creatinina es un producto residual de la digestión de proteínas y una medida de la función del riñón. Niveles altos son normalmente debidos a problemas nefríticos. Los médicos usan el nivel de creatinina como la señal directa de cómo los riñones desechan los productos residuales del cuerpo (23).

Frecuentemente se utiliza como factor de normalización de otros compuestos en orina, ya que esta depende de la cantidad de orina excretada. Se suele emplear como expresión de los resultados de otros compuestos y metabolitos en orina, la relación  $\mu\text{g}$  compuesto /mg creatinina, en lugar de la cantidad excretada en 24 horas, evitando así la recogida de la muestra.

## **EXPERIMENTAL**

En este Capítulo se han llevado a cabo determinaciones de diferentes compuestos de interés bioquímico y clínico mediante electroforesis capilar de zona:

- η Determinación de ácido folínico, metotrexato y ácido fólico
- η Determinación de triamtereno y metotrexato
- η Determinación de creatinina

El interés de dichos analitos, así como su naturaleza se han expuesto en el Capítulo I.

En todos ellos las condiciones de separación seguidas inicialmente son las siguientes:

### **Condiciones de operación**

Las separaciones se llevaron a cabo empleando viales de vidrio de 4.5 mL de capacidad tanto para los electrolitos de separación, como para las muestras, hidróxido sódico 0.1 N y agua.

El capilar empleado para la separación fue de sílice fundida con una longitud total de 60.2 cm x 75 µm de d.i. y una longitud efectiva de 50 cm. Dicho capilar estaba introducido en un cartucho que presentaba una ventana de detección de 800 µm x 100 µm.

El capilar se acondicionó previamente haciendo pasar NaOH 0.1 N a alta presión durante 20 minutos y después agua durante 10 minutos para arrastrar el exceso de NaOH. A continuación se lavó con el tampón de separación correspondiente durante 10 minutos.

En el método optimizado se realizaron lavados adecuados a cada tipo de muestra previos a las inyecciones, con el electrolito de separación; después se lleva a cabo la inyección de la disolución de problema a baja presión (inyección hidrodinámica) y, por último la separación.

En todos los casos, la primera inyección de una secuencia no se tienen en cuenta por considerar que el equipo debe equilibrarse antes de empezar a proporcionar resultados fiables.

### **Condiciones de medida**

El detector empleado para la identificación de los compuestos en estudio fue un detector de diodos en fila (Diode Array). Si se realiza un corte a una longitud de onda constante se obtiene el electroferograma. El registro se realizó en el rango de longitudes de onda de interés, en este caso entre 190 y 315 nm. Los analitos se identifican en el diagrama tridimensional por medio de su espectro, para ello se realizan inyecciones aisladas de cada uno de los compuestos y se obtienen los espectros en el máximo de los picos.

En los estudios preliminares las medidas utilizadas fueron tiempos de migración y resolución y, en la calibración se utilizaron las áreas de pico corregidas, que se obtienen tras dividir el área del pico entre su correspondiente tiempo de migración, y las alturas de pico.

## **VII.2.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FOLÍNICO, METOTREXATO Y ÁCIDO FÓLICO POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

Cada electroferograma se obtuvo a la longitud de onda más significativa, que en esta determinación es de 280 nm para los tres analitos en el caso de muestras estándar y 305 nm también para los tres compuestos en el caso de muestras de orina, con el objeto de eliminar el mayor número de interferentes de la matriz biológica.

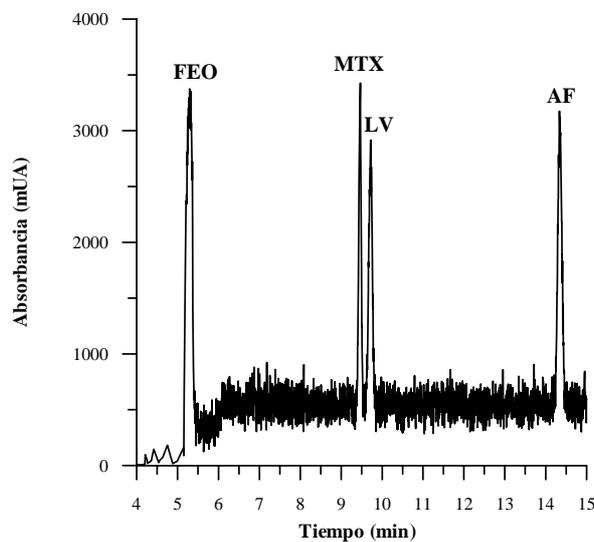
### *ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES*

#### **VII.2.1.- Influencia del pH del medio**

Teniendo en cuenta la ionización de los compuestos, siendo los correspondientes pK aproximadamente de 9 para LV, 11 para MTX y 8 para AF, se observó que se necesitaba un pH suficientemente básico para que los tres analitos en estudio, MTX, LV y AF adquirieran carga negativa. Para realizar este estudio, se ensayaron como electrolito de separación diferentes disoluciones reguladoras de concentración 25 mM ajustadas a valores de pH 8.2, 9.2, 9.7 y 10.2. Estas separaciones se llevaron a cabo aplicando un potencial de 18 kV al capilar de separación, manteniendo una temperatura de 25 °C y utilizando un tiempo de inyección de 7 s.

Se comprobó como a pH inferiores a 9.7, los picos pertenecientes a LV y MTX no están resueltos, y a pH

superiores a 9.7, salen perfectamente resueltos pero se aumenta el tiempo total del electroferograma. Finalmente, se eligió el tampón borato de pH 9.7 para el estudio debido a que se obtiene una buena resolución entre LV y MTX y en un tiempo de análisis razonable. En la Figura VII.3 se observa el electroferograma correspondiente a un valor de pH de 9.7.



**Figura VII.3** .- Electroferograma correspondiente a una muestra conteniendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de MTX, LV y AF y a un pH de 9.7.  $\lambda = 280 \text{ nm}$

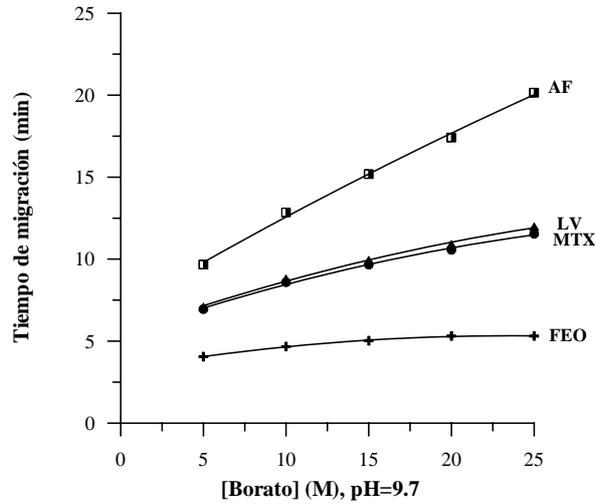
### VII.2.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación

El efecto que produce sobre una separación electroforética la variación de la fuerza iónica del medio no tiene por qué seguir una regla fija. En la gran mayoría de los casos, un aumento de la concentración

de tampón supone un aumento en los tiempos de migración, mejorando la resolución y evitando, en algunos casos, distorsiones en los picos del electroferograma debido a la supresión de los efectos de electrodispersión. Sin embargo, un aumento de la concentración del tampón también ocasiona altas intensidades de corriente que recorren el capilar generando mucho calor por efecto Joule lo cual puede provocar el ensanchamiento de los picos y pérdida de resolución.

Para optimizar este parámetro, se prepararon diferentes disoluciones de electrolito con tampón borato de pH 9.7 de concentraciones variables entre 5 y 40 mM. Las separaciones correspondientes, se hicieron con muestras conteniendo una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> de cada uno de los compuestos, con un voltaje de 18 kV y a una temperatura en el capilar de 25 °C.

En la Figura VII.4 se representan los tiempos de retención en función de la concentración de borato y tal y como se preveía se puede observar que un aumento de la concentración del tampón se traduce en un aumento en los tiempos de migración de MTX, LV y AF. Una concentración de 20 mM de tampón borato pH 9.7 fue seleccionada como óptima por mantener una buena resolución de picos y una corriente pequeña (46 µAmp), lo cual consigue reducir el ruido de la línea base.



**Figura VII.4** .- Influencia de la concentración de borato en los tiempos de migración

En la Tabla VII.1 se muestran los tiempos de migración del FEO y de los tres compuestos así como la resolución obtenida:

**Tabla VII.1** .- Variación de los tiempos de migración con la concentración de borato

[Borato] (mM)	t <sub>m</sub> FEO (min)	t <sub>m</sub> MTX (min)	t <sub>m</sub> LV (min)	Rs	t <sub>m</sub> AF (min)
5	4.05	6.95	7.09	0.85	9.67
10	4.67	8.59	8.80	1.15	12.85
15	5.03	9.66	9.94	1.38	15.18
20	5.31	10.56	10.91	1.45	17.42
25	5.57	11.54	11.98	1.49	20.16

### VII.2.3.- Estudio de la influencia del voltaje

Una vez optimizadas las variables químicas de la separación, abordamos la optimización de las variables instrumentales comenzando con el voltaje.

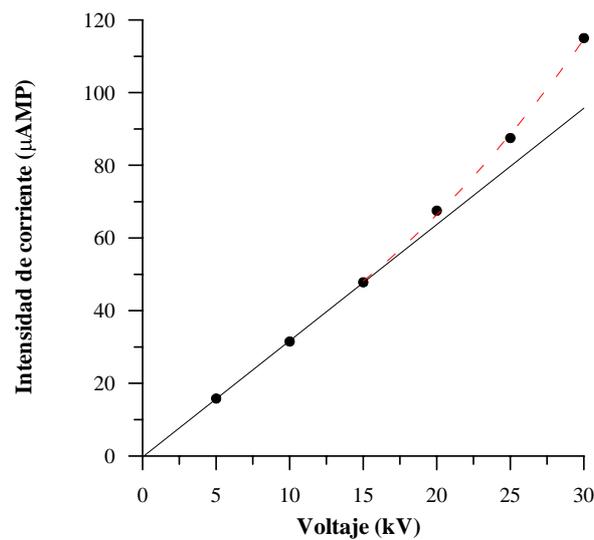
Cuanto mayor sea el voltaje aplicado, se obtienen mayores eficacias y más cortos tiempos de análisis aunque ello conlleva una disminución de la resolución debida a la mayor producción de calor.

En principio, el máximo voltaje que se puede aplicar viene dado por el punto en el cual se pierde la linealidad en la representación de la Ley de Ohm, es decir, la representación de la intensidad que atraviesa el capilar relleno del electrolito de separación cuando se varía el voltaje desde valores muy bajos hasta 30 kV. Este máximo valor depende de las características de la disolución tampón, siendo los valores más frecuentes para el trabajo en electroforesis capilar voltajes hasta 30 kV, intensidades de corriente hasta 300  $\mu\text{A}$  y potencias hasta 6 W.

De igual manera, la aplicación del voltaje requiere hacerlo de manera gradual, es decir, aplicar una rampa lineal de voltaje. Se sabe que hay una relación directa entre voltaje aplicado y calor generado. Aplicando una rampa de voltaje progresiva y adecuada se puede evitar un calentamiento brusco del capilar, de manera que se evite un calentamiento instantáneo de la zona de

muestra que provoque su dilatación y, como consecuencia, la pérdida de la misma.

Para optimizar el voltaje se llevaron a cabo separaciones utilizando como electrolito de separación una disolución que contenía tampón borato 20 mM de pH 9.7. Todos los electroferogramas se registraron a 25 °C, pero aplicando diferentes voltajes, comprendidos en el intervalo de 5 a 30 kV. La representación gráfica de la Ley de Ohm probó que existía linealidad entre voltaje aplicado y corriente generada hasta 15 kV, como se puede ver en la Figura VII.5.



**Figura VII.5 .-** Influencia del voltaje en la corriente obtenida

En orden a rebajar el tiempo de análisis principalmente y atendiendo a una buena resolución y

repetitividad de las medidas se eligió un potencial de 30 kV.

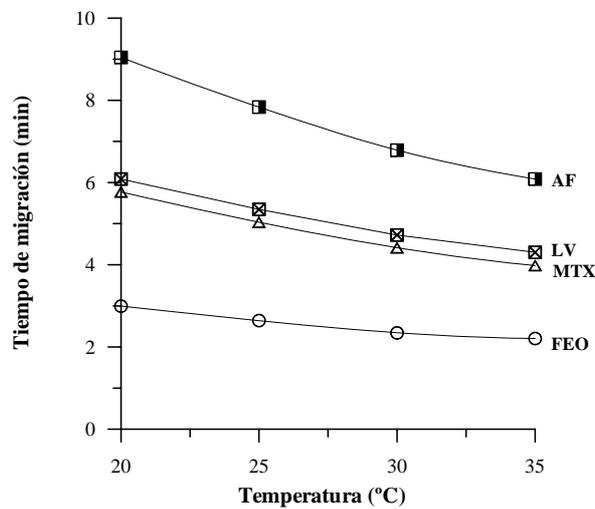
**Tabla VII.2 .-** Variación de los tiempos de migración y resolución con el voltaje

Voltaje (kV)	t <sub>m</sub> FEO (min)	t <sub>m</sub> MTX (min)	t <sub>m</sub> LV (min)	Rs	t <sub>m</sub> AF (min)
5	19.97	39.65	41.58	2.99	---
10	9.57	18.88	19.10	2.67	30.17
15	6.18	12.09	12.67	2.54	19.18
20	4.44	8.62	9.08	2.35	13.59
25	3.36	6.43	6.78	2.34	9.98
30	2.64	5.02	5.33	2.22	7.78

#### VII.2.4.- Influencia de la temperatura

La temperatura se relaciona con la viscosidad del medio electroforético. De este modo, un aumento de la temperatura disminuye la viscosidad, por lo que aumenta la velocidad del FEO y, como consecuencia, la movilidad aparente de los compuestos. Todo ello acorta el tiempo de análisis, aunque a veces a expensas de perder resolución. Durante el proceso de separación, se estudió el efecto de la temperatura en la migración de los compuestos. Para ello, se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón borato 20 mM de pH 9.7. Todos los electroferogramas se registraron a 30 kV y con un tiempo de inyección de 7 s, pero a diferentes temperaturas, comprendidas entre el intervalo de 20 a 35 °C.

Como se preveía, un aumento de la temperatura produjo una disminución de los tiempos de migración (Figura VII.6) y por consiguiente, del tiempo de análisis. También se observó que en todo el intervalo de temperatura estudiado, los picos de MTX y LV aparecía perfectamente separados, si bien la máxima resolución se producía a 35 °C, volviendo a disminuir esta a medida que aumentaba la temperatura de separación.



**Figura VII.6.-** Influencia de la temperatura en los tiempos de migración

Al igual que en el caso anterior hubo que encontrar una solución de compromiso que tuviera en cuenta dos factores, la resolución por un lado y el ruido de la línea base por otro.

En la Tabla VII.3 se muestran los tiempos de migración de cada uno de los compuestos para cada

valor de temperatura, así como la resolución obtenida para LV y MTX

**Tabla VII.3.- Variación de los tiempos de migración y resolución con la temperatura**

Temperatura (°C)	t <sub>m</sub> FEO (min)	t <sub>m</sub> MTX (min)	t <sub>m</sub> LV (min)	Rs	t <sub>m</sub> AF (min)
20	2.993	5.771	6.086	2.19	9.043
25	2.642	5.036	5.346	2.31	7.835
30	2.343	4.412	4.725	2.39	6.786
35	2.205	4.097	4.446	2.43	6.086

Finalmente se seleccionó como óptima una temperatura de 20 °C porque se consigue una buena resolución en un tiempo de análisis aceptable, evitándose así el mayor ruido de la línea base a temperaturas mayores lo cual afectaría a la sensibilidad del método.

### VII.2.5.- Influencia del tiempo de inyección de la muestra

Se ha utilizado siempre la inyección hidrodinámica por presión, por tanto, el tiempo que dure la inyección será un parámetro fundamental, ya que determinará el volumen de disolución inyectada. Además, el tiempo de migración contribuye a la dispersión de la muestra.

Debido a que las especies presentan distinta movilidad para establecer la correspondencia con los

tiempos de inyección se utilizaron las áreas de pico corregidas (APC) (26), es decir, el área del pico dividida entre su tiempo de migración:

$$APC = \text{Área} / t_m$$

Para el proceso de separación se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón borato 20 mM de pH 9.7. Todos los electroferogramas se registraron a 30 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos de inyección de muestra, comprendidas en el intervalo de 1 a 20 segundos.

Los resultados de las inyecciones se muestran en la Figura VII.7. Como se puede observar en la misma, existe un comportamiento lineal entre tiempo de inyección y área de pico corregida para los tres compuestos.

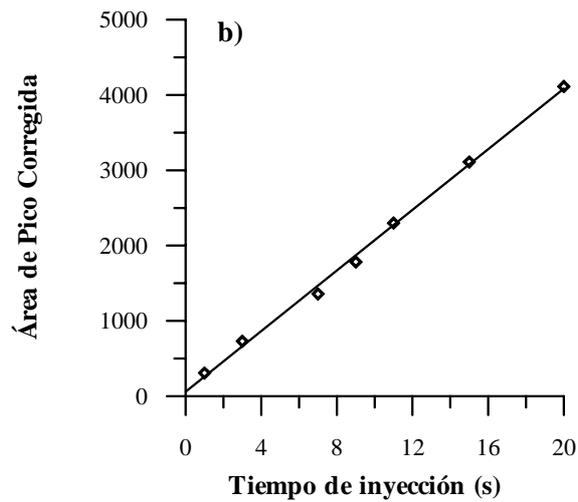
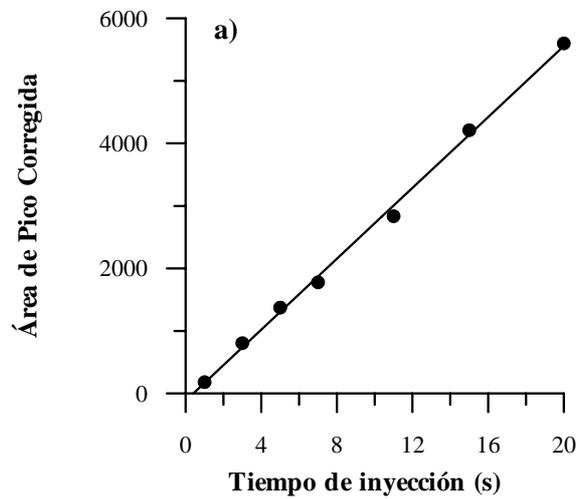
En la Tabla VII.4 se muestran las resoluciones obtenidas para los distintos tiempos de inyección. Podemos observar como la resolución disminuye a medida que aumenta el tiempo de inyección debido a una creciente dispersión de los picos electroforéticos.

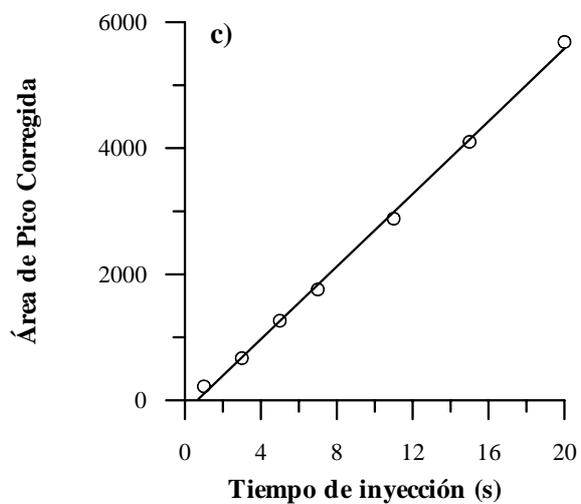
Elegimos como tiempo óptimo de inyección para posteriores experiencias el de 7 segundos, debido a que se establece un compromiso entre una buena resolución sin aumentar la dispersión de los picos, a la vez que

mejoramos la sensibilidad del método respecto a tiempos de inyección inferiores a 7 segundos.

**Tabla VII.4 .-** Influencia del tiempo de inyección en la resolución de MTX y LV

Tiempo inyección (s)	1	3	5	7	9	11	15	20
Resolución	3.46	2.65	2.10	1.90	1.83	1.48	1.10	1.00





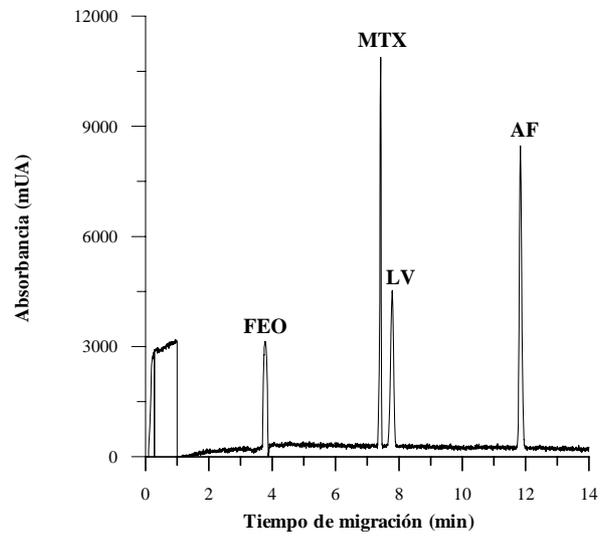
**Figura VII.7 .-** Representación de las áreas de pico corregidas obtenidas para cada analito en función del tiempo de inyección; a) MTX; b) LV y c) AF

**VII.2.6.- Condiciones químicas e instrumentales finales**

El estudio precedente permitió establecer las condiciones óptimas para la calibración, es decir, para realizar la cuantificación de MTX, LV y AF. La corriente generada bajo las condiciones seleccionadas fue de 80  $\mu$ Amp y el tiempo de análisis de 12 minutos. Las condiciones finales se resumen en la Tabla VII.5 y en estas condiciones se registró el electroferograma de la Figura VII.8.

**Tabla VII.5 .- Condiciones finales**

<i>Electrolito de separación</i>	<b>20mM tampón borato de pH 9.7</b>
<i>Voltaje</i>	<b>30 kV</b>
<i>Temperatura</i>	<b>20 °C</b>
<i>Tiempo de inyección</i>	<b>7 segundos</b>



*Figura VII.8 .- Electroferograma de una mezcla conteniendo la mezcla de los tres analitos en una concentración de  $18 \text{ mg L}^{-1}$  para cada uno,  $\lambda = 280 \text{ nm}$*

### **VII.2.7.- Determinación de MTX, LV y AF en orina**

#### VII.2.7.1.- Tratamiento de la orina

Para llevar a cabo la extracción de los tres compuestos en estudio en orina humana, se utilizaron cartuchos C<sub>18</sub> (WATERS sep-pack plus, Milford, MA, USA). Los cartuchos se activaron siguiendo siempre la misma secuencia de operaciones y se hizo después pasar la muestra a través de ellos para llevar a cabo, posteriormente, la elución del MTX, LV y AF en el disolvente apropiado. Todo esto supuso una serie de estudios previos que proporcionasen el método de extracción con el que la recuperación del MTX, LV y AF fuese del 100 %.

Cabe reseñar, que debido a la alta fuerza iónica proporcionada por la orina, hubo que disminuir el voltaje seleccionado anteriormente de 30 kV a 25 kV, ya que se generan intensidades de corriente muy elevadas que producen continuos cortes de corriente en el equipo electroforético. Por tanto, de ahora en adelante, los electroferogramas se registran a un voltaje de 25 kV.

#### *a) Secuencia de acondicionamiento del cartucho*

Los pasos que debían seguirse para activar cada uno de los cartuchos C<sub>18</sub> utilizados fueron los siguientes:

- 1) 5 mL de metanol
- 2) 5 mL de tampón fosfato de pH 2.5, 10 mM

La elección de la activación con tampón fosfato de pH 2.5 fue debido a que ensayos previos nos demostraron que el pH debía estar por debajo del primer pK de los analitos ( $pK_{MTX}$ : 3.4;  $pK_{LV}$ : 2.5;  $pK_{AF}$ : 3.0), para que estos quedaran retenidos por la fase estacionaria del cartucho y no se eluyeran en la fase de lavado. Si están a un pH superior al valor de sus pK, se encuentran en forma ionizada y por tanto muy poco retenidos por la fase apolar del cartucho eluyéndose rápidamente junto con diversos componentes de la orina.

La conexión de los cartuchos a un sistema de vacío facilitaba el paso de los distintos disolventes y disoluciones, a la vez que permitía controlar el flujo a través de los cartuchos, aumentando así la repetitividad del proceso.

#### *b) Optimización del proceso de lavado del cartucho*

Una vez que habían quedado retenidos en el cartucho determinados componentes de la orina y los tres compuestos de interés, se optimizó el proceso de lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferentes de la orina. Se comenzó el lavado con 2 mL de tampón fosfato pH = 2.5, 10 mM seguido del lavado con 6 mL de tampón fosfato pH 2.5, 2.5 mM. Se

utiliza un tampón más diluído con el fin de aumentar el contenido en agua, y así eluir el mayor número posible de componentes polares de la orina. Se registraron los electroferogramas correspondientes a cada una de las fracciones de lavado, comprobándose que ninguna de ellas contenía los analitos de interés.

*c) Optimización del proceso de elución*

La elución desde un primer momento se llevó a cabo con 1 mL de la mezcla agua:metanol (1:1) comprobándose mediante el registro del electroferograma de la fracción, que efectivamente se encontraban en dicha fracción los tres analitos de interés. Se observó por comparación con un patrón conteniendo los tres analitos que el rendimiento obtenido para cada uno de ellos era adecuado.

*d) Optimización del tiempo de lavado del capilar*

Los componentes de la muestra pueden ser adsorbido en la pared del capilar y modificar la efectividad de sucesivas inyecciones. Así, para evitar esto, lavamos el capilar entre cada inyección con NaOH 0.1 N durante 2 minutos y con el electrolito de separación durante 4 minutos más. Seguidamente procedemos a inyectar la muestra.

*e) Estabilidad de las soluciones*

Se estudió la estabilidad de los extractos problema de orina a temperatura ambiente comprobándose que estas éstas eran estables al menos durante 6 horas.

VII.2.7.2.- Optimización de las condiciones experimentales de separación en orina

Influencia del volumen de orina utilizado

Diferentes volúmenes de orina (de 2 a 10 mL) fueron contaminados con la misma cantidad de analito,  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de ellos. Todos ellos fueron pasados por un cartucho  $C_{18}$ , y eluidos en un volumen final de 1 mL ( $H_2O:MeOH$ ). De esta manera el factor de enriquecimiento en las distintas fases metanólicas sería entre 2 y 10 veces el valor de concentración de la muestra original. Se determinó cual es la cantidad óptima de orina que debemos pasar por el cartucho de forma que los analitos se extraigan casi en su totalidad. En la Tabla VII.6 se muestran las áreas de pico corregida (APC) de los analitos en el extracto de orina y las APC para un patrón conteniendo la misma concentración de analito que la que hubiera en la orina después de la extracción en el sek pack. De estos dos valores podemos obtener el % recuperación de los analitos después de pasar por el cartucho  $C_{18}$ .

Se llega a la conclusión, que tanto para el análisis de MTX como de AF podríamos haber utilizado un volumen de 10 mL de orina, ya que las recuperaciones obtenidas para este volumen son bastante aceptables. Sin embargo, para el LV obtenemos recuperaciones inadecuadas para volúmenes de orina superiores a 6 mL, e incluso valores poco aceptables para volúmenes inferiores. Se seleccionó en principio un volumen de orina de 6 mL para llevar a cabo los posteriores estudios.

Es necesario indicar que la longitud de onda de medida fue cambiada de 280 nm en muestras patrón a 305 nm en muestras de orina debido a que a 305 nm eliminamos gran parte de interferencias de la orina sin disminuir apreciablemente la sensibilidad del método.

**Tabla VII.6 .-** Influencia del volumen de orina en los porcentajes de recuperación para cada analito después de pasar por un sek-pack

V <sub>orina</sub>	[Analito] en extracto final (mg L <sup>-1</sup> )	METOTREXATO			ÁCIDO FOLÍNICO			ÁCIDO FÓLICO		
		APC <sub>patrón</sub>	APC <sub>orina</sub>	% REC.	APC <sub>patrón</sub>	APC <sub>orina</sub>	% REC.	APC <sub>patrón</sub>	APC <sub>orina</sub>	% REC.
2	6	1304.9	1186.0	<b>91.0</b>	1507.6	1643.9	<b>109.0</b>	1529.8	1653.2	<b>108.1</b>
4	12	3156.8	2535.9	<b>80.3</b>	3148.6	2061.8	<b>65.5</b>	2891.1	2835.4	<b>98.1</b>
6	18	4236.8	4302.1	<b>101.5</b>	3481.8	3043.7	<b>87.4</b>	3783.4	4243.4	<b>112.0</b>
8	24	5758.4	5665.9	<b>98.4</b>	4897.3	---	---	4973.2	5084.4	<b>102.0</b>
10	30	7644.2	8025.8	<b>105.0</b>	6719.5	2487.9	<b>37.0</b>	6988.7	6246.7	<b>89.4</b>

*Influencia del pH en muestras de orina*

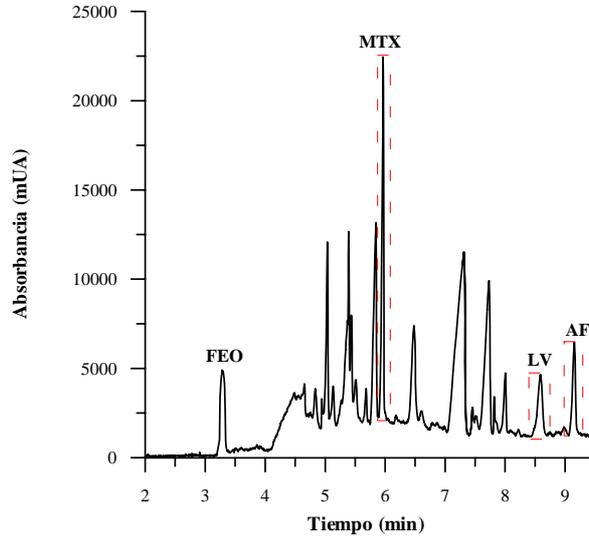
En los estudios preliminares en muestras patrón se optimizó el uso de un tampón borato de pH 9.7, 20 mM para llevar a cabo la separación de los tres componentes. Debido a la diferente fuerza iónica proporcionada por la propia orina y con el objeto de alejar los analitos de interés de la zona más afectada por la señal de la matriz de fondo, especialmente el LV, se estudió de nuevo la influencia del pH en presencia de la orina.

Los tampones utilizados para este estudio fueron un tampón borato 20 mM para el intervalo de pH comprendido entre 8.5 y 10.2 y tampón fosfato 20 mM para valores de pH comprendido entre 11.5 y 12.0.

En la Figura VII.9 se observa como para tampón fosfato 20mM de pH 12.0 el LV se ha desplazado hacia tiempos mayores respecto al tampón borato optimizado anteriormente alejándose así por tanto de la zona donde la orina presenta un mayor número de picos.

Una vez seleccionado el tampón fosfato de pH 12.0 como óptimo para la separación de los compuestos en orina, se realizó la influencia de la fuerza iónica del tampón para unos valores de concentración de tampón comprendidos entre 10mM y 20mM, eligiéndose como concentración optima la de 15 mM, ya que a concentraciones mayores de 15 mM, aumenta la

intensidad de corriente provocando un considerable electrodispersión de los picos.



**Figura VII.9.-** Electroferograma correspondiente a una orina contaminada con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito.  $\lambda = 305 \text{ nm}$

**Tabla VII.7 .-** Condiciones finales en orina

<b>Capilar</b>	<b>Sílice fundida: 60.2 cm longitud x 75 <math>\mu\text{m}</math> diámetro interno</b>
<b>Electrolito de separación</b>	<b>15 mM tampón fosfato de pH 12.0</b>
<b>Temperatura</b>	<b>20 °C</b>
<b>Voltaje</b>	<b>25 kV</b>
<b>Tiempo de inyección</b>	<b>7 s</b>
<b>Ventana de detección</b>	<b>800 x 100 <math>\mu\text{m}</math></b>

### VII.2.8.- Calibrado y estudio estadístico

Para evaluar la respuesta frente a la concentración se realizaron las rectas de calibración. Se hizo una recta de calibración con muestras patrón en orina (resultante de la mezcla de dos orinas) y simultáneamente se realizó la recta de calibración con muestras patrón en ausencia de orina.

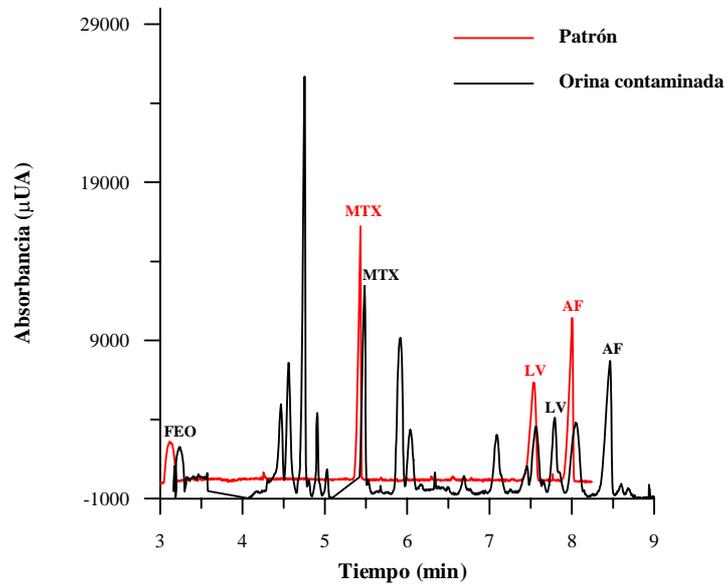
#### *Recta de calibración en orina*

Volúmenes de 6 mL de orina fueron contaminados con distintas concentraciones de los analitos comprendidas en un intervalo de: [MTX]= 0.5 - 6 mg L<sup>-1</sup>; [LV] = 0.5 - 6 mg L<sup>-1</sup>; [AF] = 0.5 - 6 mg L<sup>-1</sup>. Se realizó el tratamiento en cartuchos eluyendo con 1 mL (H<sub>2</sub>O:MeOH), así se logra un efecto de concentración de seis veces con respecto a la orina original.

En la Figura VII.10 se compara un patrón conteniendo los tres analitos con una orina contaminada con 3 mg L<sup>-1</sup> de cada compuesto.

La respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal con la concentración fueron las APC (áreas de pico corregida) y las alturas de pico para cada uno de los compuestos calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda de 305 nm.

Las condiciones de operación fueron las mencionadas en la Tabla VII.7

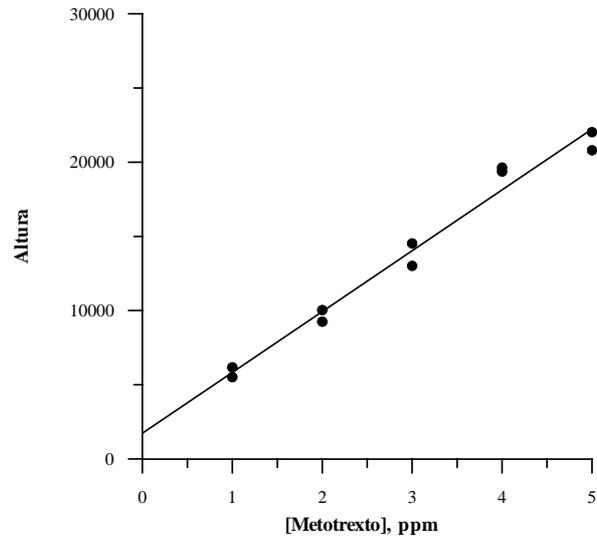
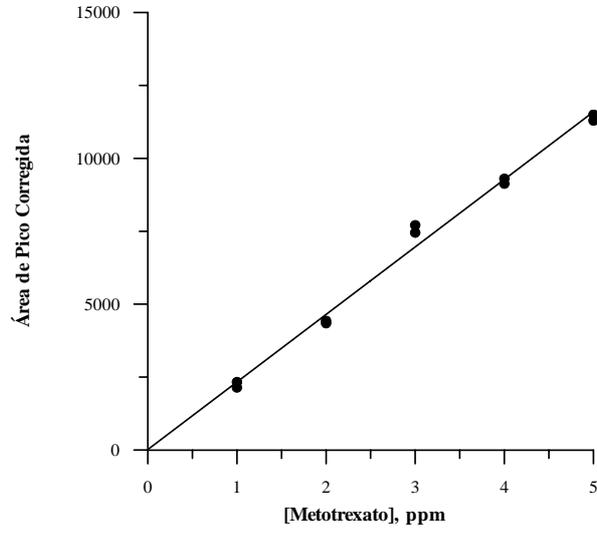


**Figura VII.10 .-** Electroferogramas correspondientes a un patrón conteniendo  $18 \text{ mg L}^{-1}$  de cada compuesto y una orina contaminada con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de cada componente y extraída con  $1 \text{ mL MeOH:Agua}$ .  $\lambda = 305 \text{ nm}$ .

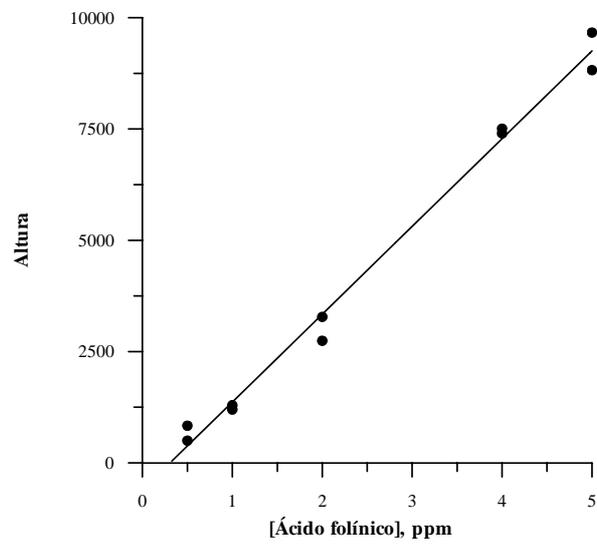
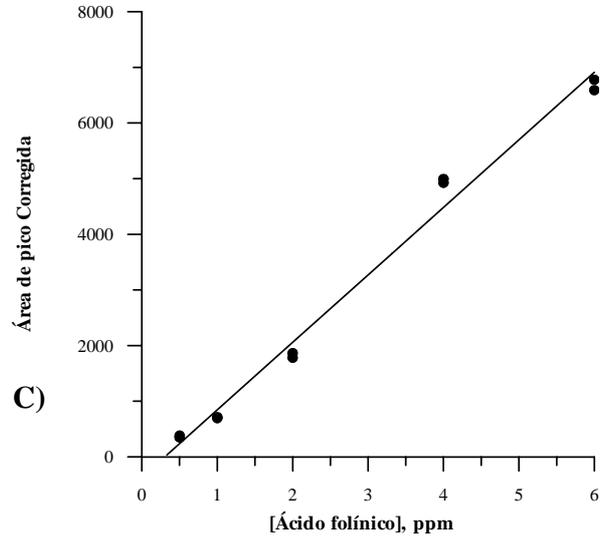
En la Figura VII.11 se representan las áreas corregidas y las alturas de pico frente a las concentraciones de los analitos de interés.

En la Tabla VII.8 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para las rectas de calibración de los analitos en muestras de orina, y se comparan con aquellos obtenidos sin orina.

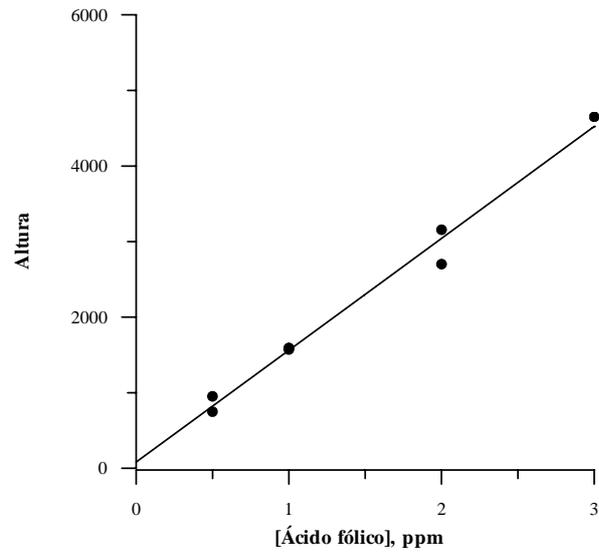
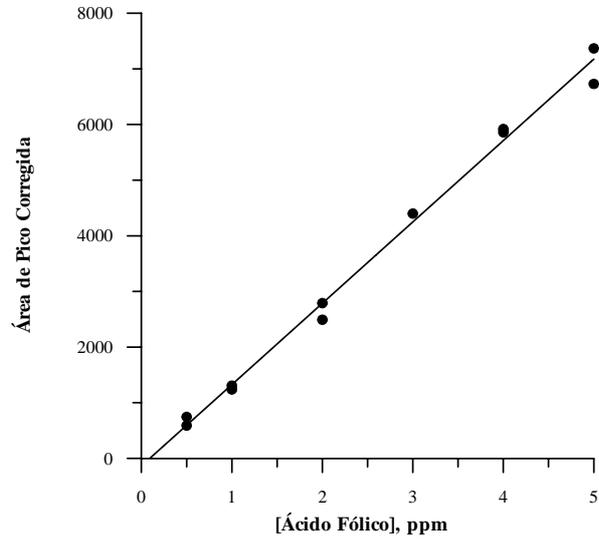
A)



B)



C)



**Figura VII.11** .- Rectas de calibración en función de APC en muestras de orina para: A) MTX; B) LV y C) AF

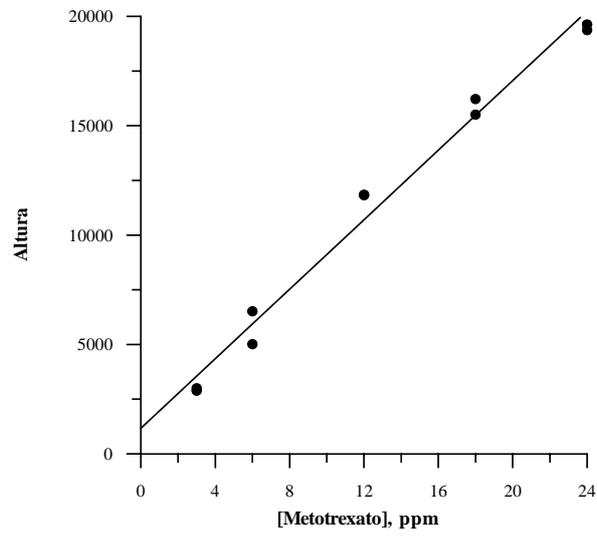
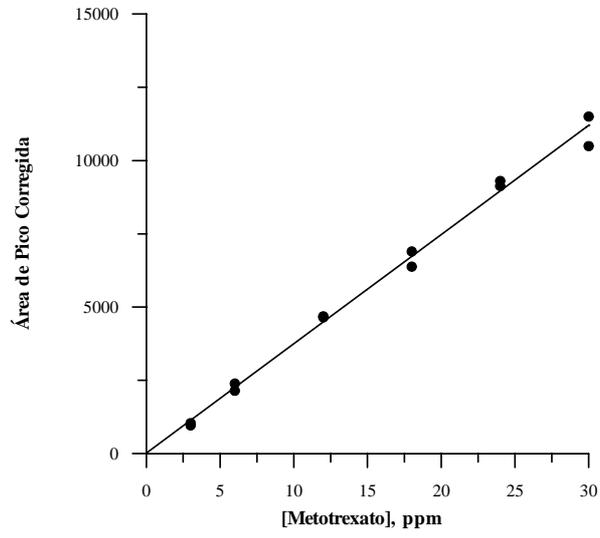
***Rectas de calibración en mezclas patrón sin orina***

Simultáneamente a la recta de calibración en orina, se llevó a cabo también el estudio de linealidad entre señal y concentración para mezclas patrón de los analitos en un intervalo de concentraciones similar a los resultantes tras la concentración de la orina.

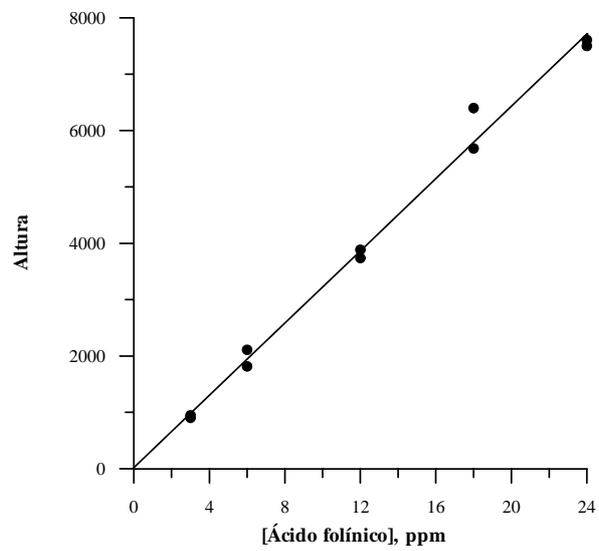
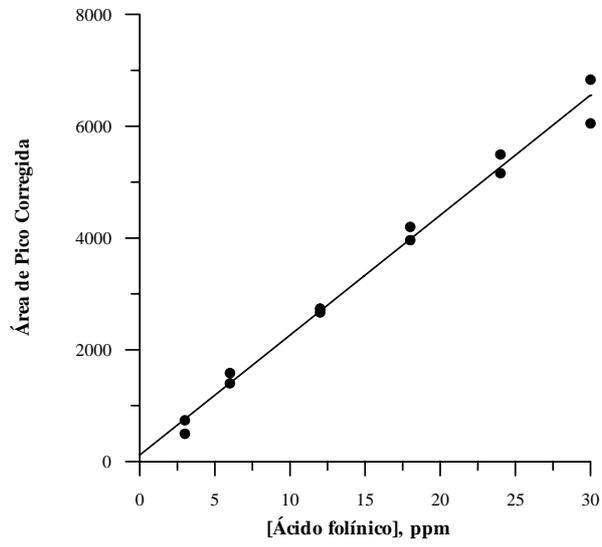
Los intervalos de concentración estudiados fueron de 0 - 30 mg L<sup>-1</sup> para los tres componentes.

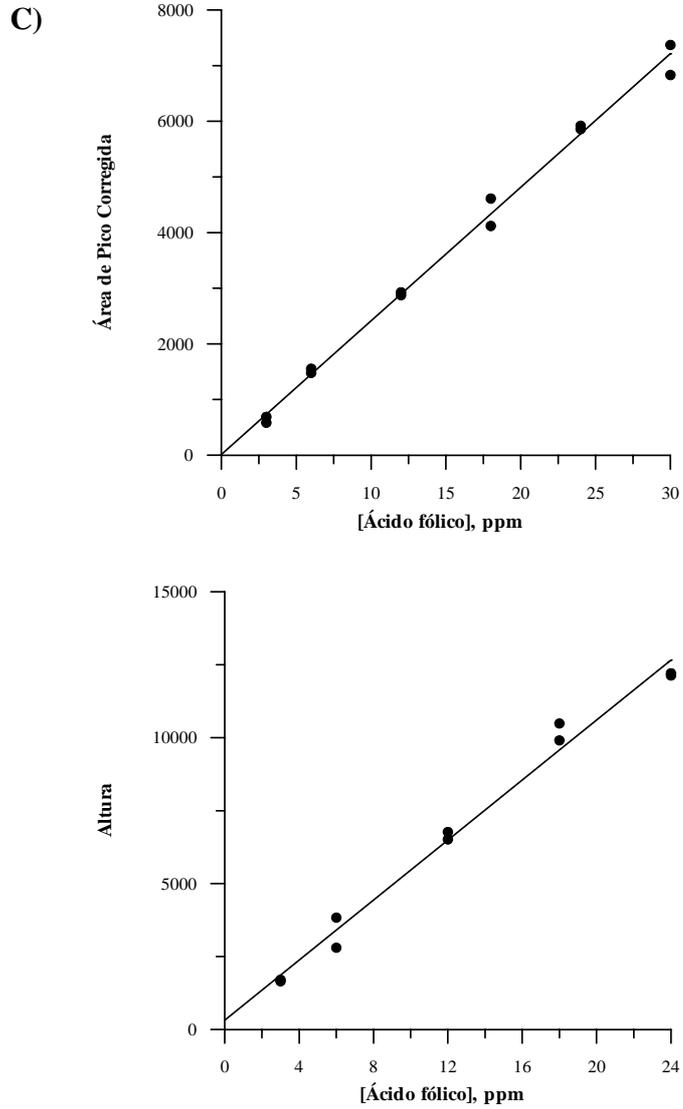
En la Figura VII.12 se muestra la linealidad existente para cada uno de los analitos en relación con el área corregida y la altura de pico, las cuales fueron calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica de 305 nm.

A)



B)





**Figura VII.12** .- Rectas de calibración en función de APC y altura en mezclas sintéticas para: A) MTX; B) LV y C) AF

En la Tabla VII.8 se muestran los parámetros estadísticos derivados de las rectas de calibración en muestras de orina y patrón.

Como se puede observar la sensibilidad de calibración en orina es inferior.

**Tabla VII.8 .- Parámetros estadísticos de las rectas de calibración en muestras de orina y patrón.**

	METOTREXATO		ÁCIDO FOLÍNICO		ÁCIDO FÓLICO	
	APC	Altura	APC	Altura	APC	Altura
<b>Muestras de orina*</b>						
<b>Pendiente</b>	2.31 x 10 <sup>3</sup>	4.10 x 10 <sup>3</sup>	1.18 x 10 <sup>3</sup>	1.97 x 10 <sup>3</sup>	1.46 x 10 <sup>3</sup>	1.48 x 10 <sup>3</sup>
<b>Ordenada origen</b>	1.88 x 10 <sup>1</sup>	1.73 x 10 <sup>3</sup>	-2.37 x 10 <sup>2</sup>	-6.06 x 10 <sup>2</sup>	-1.36 x 10 <sup>2</sup>	-8.16 x 10 <sup>1</sup>
<b>σ pendiente</b>	8.27 x 10 <sup>1</sup>	2.22 x 10 <sup>2</sup>	4.17 x 10 <sup>1</sup>	6.56 x 10 <sup>1</sup>	4.02 x 10 <sup>1</sup>	8.05 x 10 <sup>1</sup>
<b>σ ord.origen</b>	2.74 x 10 <sup>2</sup>	7.35 x 10 <sup>2</sup>	1.29 x 10 <sup>2</sup>	1.99 x 10 <sup>2</sup>	1.22 x 10 <sup>2</sup>	1.34 x 10 <sup>2</sup>
<b>σ estimada</b>	3.70 x 10 <sup>2</sup>	9.91 x 10 <sup>2</sup>	3.06 x 10 <sup>2</sup>	3.59 x 10 <sup>2</sup>	2.21 x 10 <sup>2</sup>	1.84 x 10 <sup>2</sup>
<b>Coef. Regresión</b>	0.9949	0.9985	0.9938	0.9956	0.9966	0.9927
<b>L.O.D.*(ppm)</b>	0.35	0.54	0.33	0.30	0.25	0.27
<b>L.O.D.**(ppm)</b>	0.59	0.89	0.83	0.59	0.49	0.49
<b>Sensib. anal<sup>1</sup></b>	0.16	0.24	0.26	0.18	0.15	0.12
<b>Muestras patrón</b>						
<b>Pendiente</b>	3.73 x 10 <sup>2</sup>	7.94 x 10 <sup>2</sup>	2.15 x 10 <sup>2</sup>	3.20 x 10 <sup>2</sup>	2.40 x 10 <sup>2</sup>	5.14 x 10 <sup>2</sup>
<b>Ordenada origen</b>	2.01 x 10 <sup>1</sup>	1.17 x 10 <sup>3</sup>	1.16 x 10 <sup>2</sup>	2.08 x 10 <sup>1</sup>	1.36 x 10 <sup>1</sup>	3.20 x 10 <sup>2</sup>
<b>σ pendiente</b>	9.62	3.62 x 10 <sup>1</sup>	7.07	1.04 x 10 <sup>1</sup>	5.72	2.12 x 10 <sup>1</sup>
<b>σ ord.origen</b>	1.75 x 10 <sup>2</sup>	5.34 x 10 <sup>2</sup>	1.29 x 10 <sup>2</sup>	1.53 x 10 <sup>2</sup>	1.04 x 10 <sup>2</sup>	3.13 x 10 <sup>2</sup>
<b>σ estimada</b>	3.18 x 10 <sup>2</sup>	8.79 x 10 <sup>2</sup>	2.34 x 10 <sup>2</sup>	2.52 x 10 <sup>2</sup>	1.89 x 10 <sup>2</sup>	5.15 x 10 <sup>2</sup>
<b>Coef. Regresión</b>	0.9967	0.9918	0.9946	0.9958	0.9972	0.9933
<b>L.O.D.*(ppm)</b>	1.41	2.02	1.80	1.43	1.30	1.83
<b>L.O.D.**(ppm)</b>	2.71	3.73	3.40	2.65	2.50	3.38
<b>Sensib. anal<sup>1</sup></b>	0.85	1.11	1.09	0.79	0.79	1.00

\*Límite de detección según Winerforner y Long; \*\*Límite de detección según Clayton,

• Las concentraciones están referidas a las adicionadas en la orina original

<sup>1</sup>Definido según referencia 34

### **VII.2.9.- Repetitividad**

El estudio de repetitividad se realizó para un patrón de analitos conteniendo  $18 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de ellos y para la extracción de una orina contaminada con  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de cada componente (cantidad equivalente al patrón utilizado una vez concentrada la orina).

En la Tabla VII.9 se muestran los valores medios de las medidas así como desviaciones estándar y % de desviación estándar relativa para el patrón y el extracto de orina.

Se obtienen unos valores de RSD muy buenos tanto para áreas como para alturas de pico. Se elige la medida de las áreas de pico corregido como señal analítica como es habitual en la técnica de electroforesis capilar dada la incertidumbre en los tiempos de migración.

### **VII.2.10.- Aplicación al análisis de orina**

Una vez obtenidas las rectas de calibración y la confirmada repetitividad del método, contaminamos diferentes muestras de orina con cantidades de analitos variables para así comprobar como se recuperan los analitos en orinas de diferentes personas. Se contaminaron hasta un total de 9 orinas procedentes de distintas personas adultas además de un niño menor de 5 años y una mujer embarazada, y se pudo comprobar como en cada matriz biológica, especialmente el factor

fuerza iónica, condiciona las recuperaciones de los analitos, aparentemente de una forma aleatoria.

Este efecto de matriz nos llevó a proponer como método alternativo la adición-patrón como el más apropiado para llevar a cabo el análisis propuesto.

*Recta de adición-patrón*

Tomamos un volumen de 50.0 mL de orina y se contamina con diversas concentraciones de cada analito. De esos 50.0 mL de orina contaminada se van tomando volúmenes de 6 mL, los cuales se contaminan con cantidades crecientes de cada compuesto y se someten al proceso de extracción y posterior inyección en el sistema electroforético.

En la Tabla VII.10 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para distintas cantidades de los analitos en estudio.

**Tabla VII.9.-** Cálculo de los parámetros estadísticos para muestras patrón y extracto de orina

	$t_{migrac}$	APC	Altura
<b>MUESTRAS PATRÓN (a partir de 10 réplicas)</b>			
<b>METOTREXATO</b>			
<b>Media</b>	5.41	6975.8	163347
$\sigma_{stándar}$	0.024	129.9	1953
<b>RSD (%)</b>	0.45	1.86	1.19
<b>ÁCIDO FOLÍNICO</b>			
<b>Media</b>	7.47	4342.4	63076
$\sigma_{stándar}$	0.051	172.3	846
<b>RSD (%)</b>	0.68	3.97	1.34
<b>ÁCIDO FÓLICO</b>			
<b>Media</b>	7.94	4502.3	105508
$\sigma_{stándar}$	0.055	105.4	1780
<b>RSD (%)</b>	0.70	2.34	1.69
<b>MUESTRAS DE ORINA (a partir de 8 réplicas)</b>			
<b>METOTREXATO</b>			
<b>Media</b>	5.54	8188.2	164131
$\sigma_{stándar}$	0.043	267.3	4303
<b>RSD (%)</b>	0.78	3.26	2.62
<b>ÁCIDO FOLÍNICO</b>			
<b>Media</b>	7.65	2383.1	36929
$\sigma_{stándar}$	0.090	103.7	846
<b>RSD (%)</b>	1.18	4.35	2.29
<b>ÁCIDO FÓLICO</b>			
<b>Media</b>	8.17	5289.8	56817
$\sigma_{stándar}$	0.1037	346.4	2346
<b>RSD (%)</b>	1.27	6.55	4.13

**Tabla VII.10 .- Recuperaciones obtenidas para los tres compuestos**

	Concentración añadida (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración calculada* (mg L <sup>-1</sup> )	% Rec APC	Concentración calculada** (mg L <sup>-1</sup> )	% Rec altura
<b>MTX</b>	2.00	1.71	<b>85.5</b>	1.86	<b>93.0</b>
	2.50	2.05	<b>81.9</b>	2.08	<b>83.3</b>
	3.00	2.83	<b>94.3</b>	2.20	<b>73.4</b>
<b>LV</b>	2.00	2.22	<b>111.0</b>	2.14	<b>107.0</b>
	3.00	3.37	<b>112.4</b>	3.16	<b>105.4</b>
	4.50	3.57	<b>79.4</b>	3.62	<b>80.5</b>
<b>AF</b>	2.00	1.74	<b>87.0</b>	2.27	<b>113.5</b>
	2.50	2.08	<b>83.4</b>	2.61	<b>104.4</b>
	3.00	2.82	<b>93.9</b>	3.35	<b>111.6</b>

Media (%) **92.1**      Media (%) **96.9**

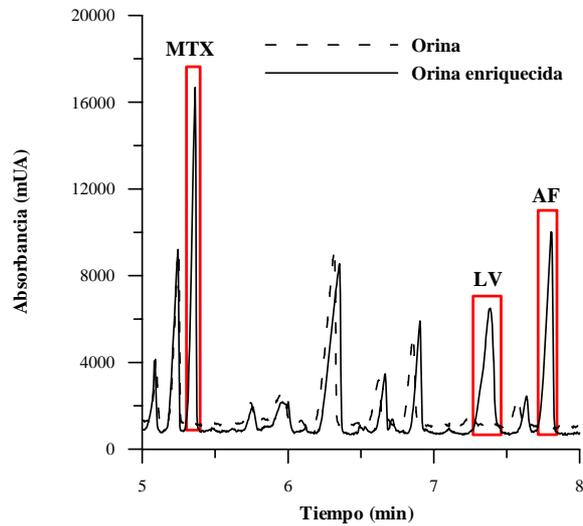
\*Utilizando APC como señal; \*\*Utilizando alturas de pico como señal

Como se puede observar, los valores de recuperación más adecuados son los obtenidos cuando se miden alturas de pico con un valor medio de recuperación del 97 %.

### **VII.2.11.- Influencia de la presencia de otros principios activos**

Para este estudio se procedió a la extracción de una orina proveniente de una persona adulta, la cual había sido tratada con antibiótico, vitamina, analgésico y antitúxico, concretamente, ácido clavulánico, ácido ascórbico, paracetamol y codeína en unas cantidades de 2250 mg, 500 mg, 650 mg y 60 mg diarios respectivamente.

Se inyectó una muestra de orina de este paciente sin contaminar y otra muestra de orina contaminada con 3 mg L<sup>-1</sup> de MTX, LV y AF. En la Figura VII.13 observamos como la señal correspondiente a nuestros analitos aparece en zonas limpias de la orina, es decir, ninguno de los interferentes anteriormente mencionados le afecta a la señal de nuestros analitos.



**Figura VII.13** .- Electroferogramas correspondientes a una muestra de orina no contaminada y la misma orina contaminada con los analitos de interés en una concentración de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ .  $\lambda = 305 \text{ nm}$

Aunque no se ha realizado un estudio exhaustivo de interferentes podemos indicar que los descritos anteriormente, muy habituales en diversas terapias, no impedirían el análisis propuesto.

### **VII.3.- DETERMINACIÓN DE TRIAMTERENO Y METOTREXATO EN ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA**

#### *ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES*

##### **VII.3.1.- Estudios preliminares**

Inicialmente se inyectaron en el sistema de electroforesis capilar muestras de orina diluída (1:1) conteniendo los analitos en estudio, comprobándose que a este nivel de dilución se pueden determinar metotrexato y triamtereno. En las primeras inyecciones se utilizó un tampón fosfato 25 mM de pH 3, ya que a este valor de pH los dos analitos se encuentran en forma protonada. Las condiciones instrumentales iniciales fueron: voltaje de 25 kV, temperatura 25 °C y un tiempo de inyección de 7 s.

Se observó como los picos electroforéticos correspondientes a MTX y TRI presentaban una fuerte electrodispersión por lo que fue necesario hacer uso de un aditivo en el tampón como es la trietanolamina (TEA) de un 99.5 % de riqueza, la cual se adsorbe fuertemente a las paredes del capilar evitándose en gran medida este fenómeno.

La longitud de onda de medida de compromiso utilizada para llevar a cabo los posteriores estudios fue de 210 nm.

Inicialmente también se comprobó que las disoluciones de orina 1:1 eran estables al menos durante un periodo de 2 horas.

### **VII.3.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación**

Para la optimización de la fuerza iónica, se prepararon diferentes soluciones de electrolito de separación que contenía ácido fosfórico en distinta concentración ajustándole el pH con trietanolamina a 2.25. Se realizó una dilución de una orina 1:1 conteniendo en la solución de orina diluída  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de los analitos en estudio. La inyección fue hidrodinámica durante 7 s, manteniéndose el capilar a una temperatura constante de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y aplicando un voltaje de 25 kV. La concentración se varió entre 10 y 50 mM. El valor de 10 mM fue rechazado, debido a que aparecía una considerable electrodispersión en los picos.

En la Tabla VII.11, se observa los distintos tiempos de migración obtenidos para ambos compuestos, en función de la fuerza iónica del tampón.

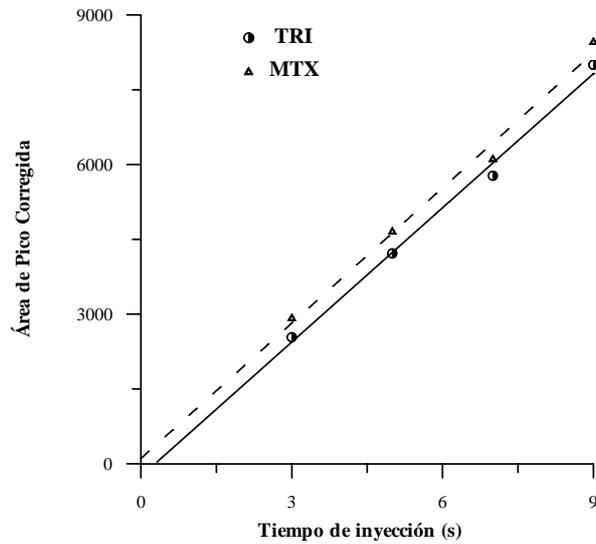
**Tabla VII.11.- Variación de los tiempos de migración con la concentración del tampón**

Concentración fosfato	$t_m$ TRI (min)	$t_m$ MTX (min)
20	8.71	14.65
40	9.25	15.85
50	9.28	16.41

Se seleccionó una concentración de tampón 40 mM, la cual origina una intensidad de corriente de aproximadamente 61  $\mu$ Amp y un tiempo de migración de aproximadamente 9.2 min para triamtereno y 15.8 para metotrexato.

### VII.3.3.- Influencia del tiempo de inyección de la muestra

Se utilizó siempre la inyección hidrodinámica por presión. Las muestras inyectadas fueron orina diluída 1:1 conteniendo 12 mg L<sup>-1</sup> de MTX y TRI. Como electrolito de separación se empleó una disolución conteniendo ácido fosfórico 40 mM + TEA (pH 2.25). Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos de inyección de muestra, comprendidos en el intervalo de 3 a 9 s. Los resultados de las inyecciones se muestran en la Figura VII.14. Un tiempo de inyección de 7 segundos fue seleccionado como óptimo.



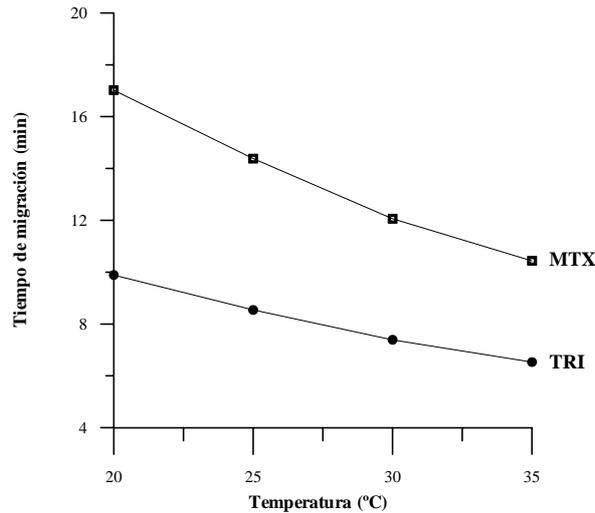
**Figura VII.14** .- Estudio de los tiempos de inyección en función de las APC

#### VII.3.4.- Influencia de la temperatura; Error! Marcador no definido.

Se estudió el efecto de la temperatura en la migración de triamtereno y metotrexato. Las disoluciones de orina diluída 1:1 contenían  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno de los analitos. Como electrolito de separación se utilizó el indicado en el apartado anterior. Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV y con un tiempo de inyección de 7 s, pero a diferentes temperaturas, comprendidas en el intervalo 20 a 35 °C.

Como se observa en la Figura VII.15, un aumento de la temperatura produjo una disminución del tiempo de migración y por consiguiente, del tiempo de análisis.

Finalmente se seleccionó como óptima una temperatura de 30 °C ya que se disminuye considerablemente el tiempo de análisis y además es un valor próximo a la temperatura ambiente.

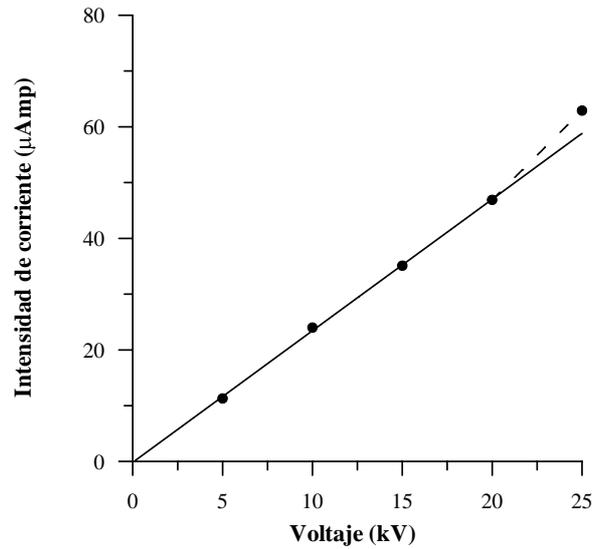


*Figura VII.15 .- Influencia de la temperatura en el tiempo de migración de MTX y TRI*

### VII.3.5.- Influencia del voltaje

Para la optimización del voltaje se llevaron a cabo separaciones en las condiciones antes indicadas y aplicando diferentes voltajes, comprendidos en el intervalo de 5 a 25 kV. El valor de 30 kV no se utilizó debido a los cortes de corriente constante que ocurrían en el equipo a valores tan altos de potencial. En la Tabla VII.12 se han resumido los tiempos de migración obtenidos en cada caso.

La representación gráfica de la Ley de Ohm probó que existía linealidad entre voltaje aplicado y corriente generada hasta 20 kV, como se puede ver en la Figura VII.16.



**Figura VII.16.-** Influencia del voltaje en la corriente obtenida

**Tabla VII.12.-** Variación en el tiempo de migración con el voltaje

Voltaje (kV)	$t_m$ TRI (min)	$t_m$ MTX (min)
5	-	-
10	25.4	**
15	16	31
20	11.14	21
<b>25</b>	<b>8.7</b>	<b>15.5</b>

- No se observa en 50 minutos; \*\* No se observa en 45 minutos

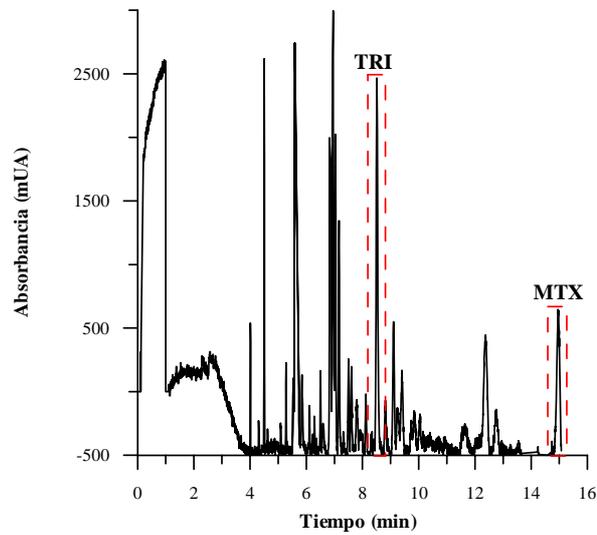
En orden a rebajar el tiempo de análisis se eligió como potencial óptimo el de 25 kV

### VII.3.6.- Condiciones químicas e instrumentales finales

A modo de resumen en la Tabla VII.13 se muestran las condiciones químicas e instrumentales optimizadas para la separación de TRI y MTX. Asimismo, en la Figura VII.17 se muestra un electroferograma utilizando el método optimizado y registrado a 210 nm.

*Tabla VII.13 .- Método optimizado para la separación*

<b>Capilar</b>	Sílice fundida: 60.2 cm longitud x 75 $\mu\text{m}$ diámetro interno
<b>Electrolito de separación</b>	Ácido fosfórico 40 mM + TEA, pH 2.25
<b>Temperatura</b>	30 °C
<b>Voltaje</b>	25 kV
<b>Tiempo de inyección</b>	7s
<b>Ventana de detección</b>	800 x 100 $\mu\text{m}$



**Figura VII.17 .-** Electroferograma de una muestra de orina contaminada con TRI y MTX en concentración  $2 \text{ mg L}^{-1}$  previa dilución 1:1, obtenido en la condiciones citadas en la Tabla VII.13.  $\lambda = 210 \text{ nm}$

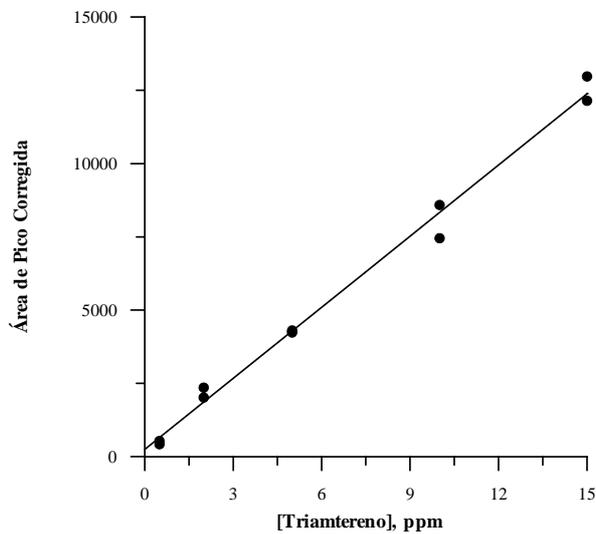
### VII.3.7.- Calibrado y estudio estadístico

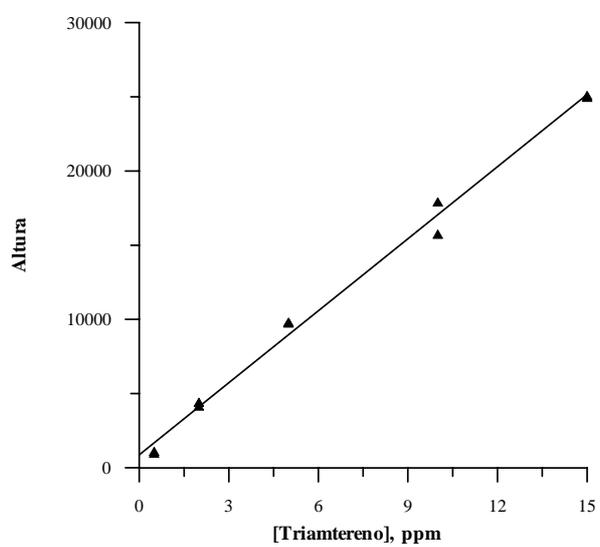
Para evaluar la respuesta frente a la concentración se hicieron dos rectas de calibración una primera recta con orina procedente de una sola persona contaminada con ambos compuestos previa dilución 1:1 y una segunda recta con una orina mezcla, procedente de tres personas, contaminada también con ambos analitos previa dilución 1:1, con el objeto de comparar ambas rectas y ver como influye la matriz sobre la señal de los compuestos en estudio. Las condiciones de operación son las citadas en la Tabla VII.13

*Recta de calibración en orina procedente de 1 persona*

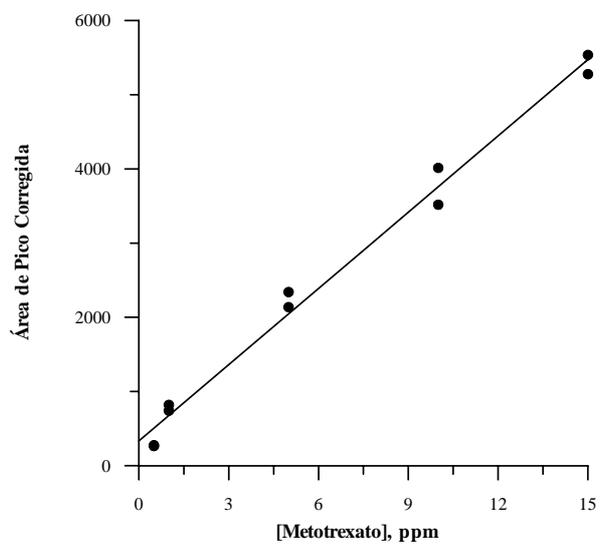
Volúmenes de orina previa dilución 1:1 fueron contaminados con distintas concentraciones de analitos comprendidas en un intervalo de 0.5 - 15 mg L<sup>-1</sup> para ambos compuestos. La respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal con la concentración fueron las áreas de pico corregidas y las alturas de cada uno de los compuestos calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica de 210 nm. En la Figura VII.18 se representan las áreas corregidas y las alturas de los compuestos frente a las concentraciones.

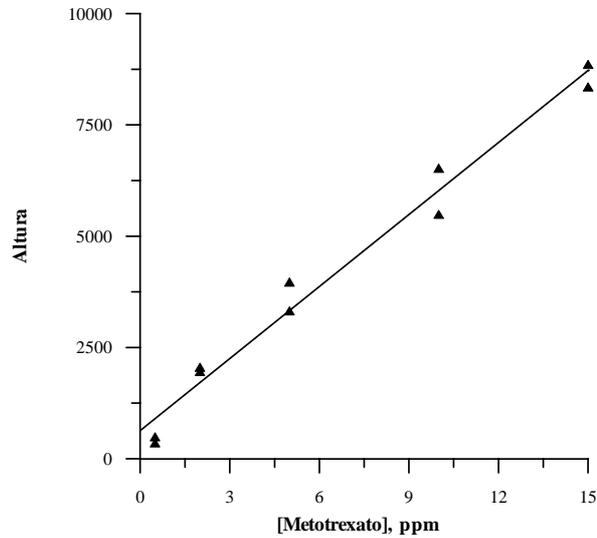
A)





**B)**



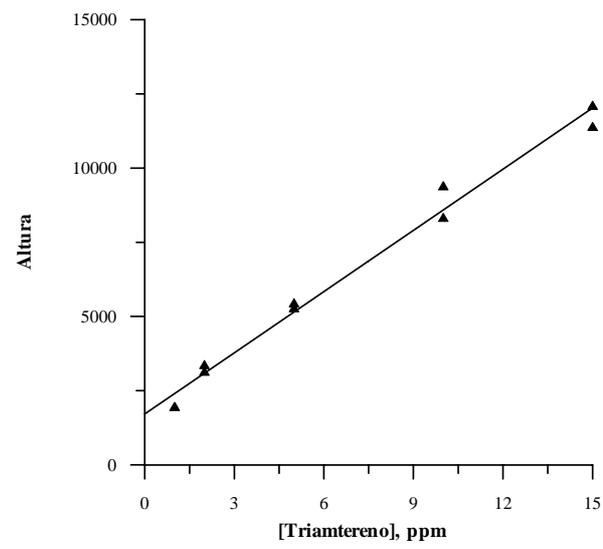
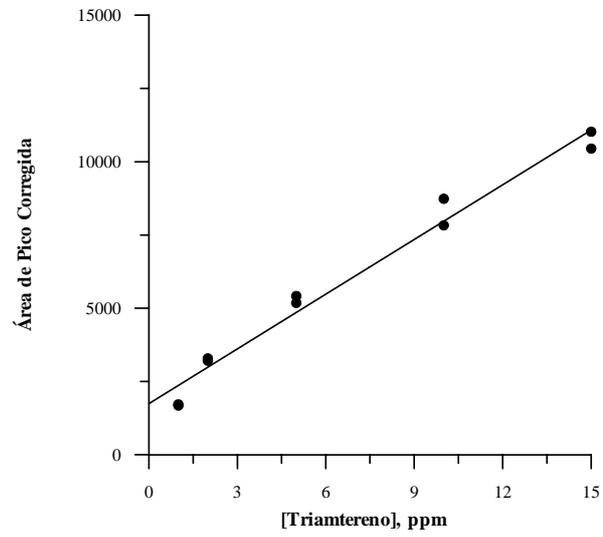


**Figura VII.18 .-** Rectas de calibración en función de APC y altura para: A) TRI y B) MTX

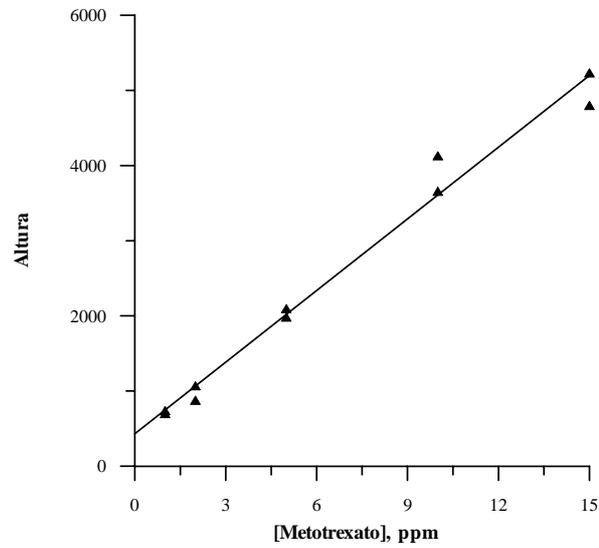
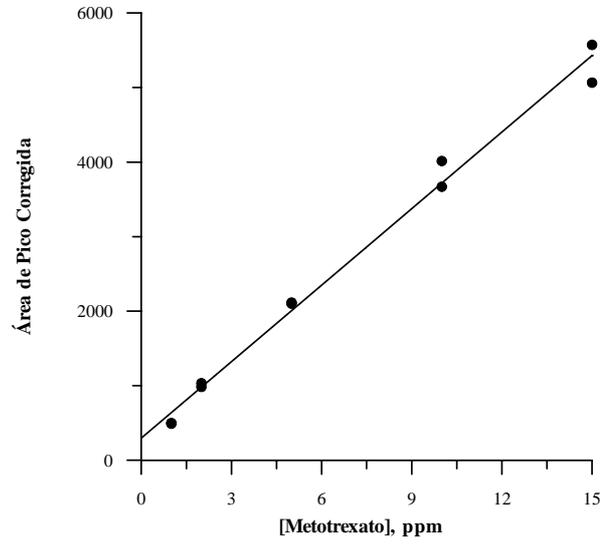
*Rectas de calibración en una orina mezcla de tres personas*

Siguiendo una sistemática similar a la descrita en el apartado anterior, volúmenes de orina previa dilución 1:1 fueron contaminadas con distintas concentraciones de analitos comprendidas en un intervalo de 1.0 - 15 mg L<sup>-1</sup> para ambos compuestos. La respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal con la concentración fueron las áreas de pico corregidas y las alturas de cada uno de los compuestos calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica de 210 nm. En la Figura VII.19 se representan las áreas corregidas y las alturas de los compuestos frente a las concentraciones.

A)



**B)**



**Figura VII.19 .-** Rectas de calibración en función de APC y altura para: A) TRI y B) MTX

En las Tablas VII.14 y VII.15 se muestran los parámetros derivados del análisis estadístico de las rectas de calibración.

**Tabla VII.14 .-** Parámetros estadísticos de las rectas de calibración de TRI y MTX en orina de 1 persona

	TRIAMTERENO		METOTREXATO	
	APC	Altura	APC	Altura
<b>Pendiente</b>	$8.14 \times 10^2$	$1.63 \times 10^3$	$3.48 \times 10^2$	$5.51 \times 10^2$
<b>Ordenada origen</b>	$1.94 \times 10^2$	$7.02 \times 10^2$	$2.71 \times 10^2$	$5.07 \times 10^2$
$\sigma$ pendiente	$2.36 \times 10^1$	$4.29 \times 10^1$	$1.26 \times 10^1$	$2.66 \times 10^1$
$\sigma$ ord.origen	$1.89 \times 10^2$	$3.44 \times 10^2$	$1.00 \times 10^2$	$2.14 \times 10^2$
$\sigma$ estimada	$4.25 \times 10^2$	$7.72 \times 10^2$	$2.32 \times 10^2$	$4.79 \times 10^2$
<b>Coef. Regresión</b>	0.9962	0.9969	0.9942	0.9897
<b>L.O.D.* (ppm)</b>	0.70	0.63	0.87	1.17
<b>L.O.D.** (ppm)</b>	1.63	1.48	2.06	2.72

\*Límite de detección según Winerforner y Long (24);

\*\* Límite de detección según Clayton(25)

**Tabla VII.15 .-** Parámetros estadísticos de las rectas de calibración de TRI y MTX en orina mezcla de 3 personas

	TRIAMTERENO		METOTREXATO	
	APC	Altura	APC	Altura
<b>Pendiente</b>	$6.22 \times 10^2$	$6.87 \times 10^2$	$3.42 \times 10^2$	$3.18 \times 10^2$
<b>Ordenada origen</b>	$1.74 \times 10^3$	$1.71 \times 10^3$	$2.94 \times 10^2$	$4.30 \times 10^2$
$\sigma$ pendiente	$3.35 \times 10^1$	$2.79 \times 10^1$	$1.18 \times 10^1$	$1.48 \times 10^1$
$\sigma$ ord.origen	$2.82 \times 10^2$	$2.35 \times 10^2$	$9.96 \times 10^1$	$1.24 \times 10^2$
$\sigma$ estimada	$5.54 \times 10^2$	$4.62 \times 10^2$	$1.96 \times 10^2$	$2.45 \times 10^2$
<b>Coef. Regresión</b>	0.9886	0.9935	0.9953	0.9915
<b>L.O.D.* (ppm)</b>	1.43	1.07	0.88	1.19
<b>L.O.D.** (ppm)</b>	2.81	2.12	1.81	2.43

\*Límite de detección según Winerforner y Long(24);

\*\*Límite de detección según Clayton(25)

Comparando las pendientes de las rectas de calibración para el caso de una orina independiente y de una orina mezcla, vemos que éstas difieren significativamente sobre todo si consideramos la altura de pico, por lo que será necesario recurrir al método de la adición patrón para considerar el efecto de la matriz de fondo.

*Método de adición-patrón*

En la Tabla VII.16 podemos ver los porcentajes de recuperación obtenidos para una muestra de orina contaminada con los analitos en estudio.

**Tabla VII.16 .-** *Recuperaciones obtenidas para TRI y MTX*

	Concentración añadida (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración calculada* (mg L <sup>-1</sup> )	% Rec <sub>APC</sub>	Concentración calculada* (mg L <sup>-1</sup> )	% Rec <sub>altura</sub>
<b>TRI</b>	4.00	4.44	<b>111.0</b>	3.87	<b>96.7</b>
	6.00	6.05	<b>100.8</b>	5.48	<b>91.4</b>
<b>MTX</b>	4.00	4.27	<b>106.8</b>	3.96	<b>99.0</b>
	6.00	5.57	<b>92.8</b>	5.57	<b>92.8</b>
Media (%)			<b><u>102.8</u></b>	Media (%)	<b><u>95.0</u></b>

\* Utiliza como señal APC; \*\* Utiliza como señal altura de pico

### VII.3.8.- REPETITIVIDAD

El estudio de repetitividad se realizó para una orina contaminada con 12 mg L<sup>-1</sup> de TRI y MTX previa dilución 1:1. En la Tabla VII.17 se muestran los valores medios de las medidas así como desviaciones estándar y porcentajes de desviación estándar relativa.

*Tabla VII.17.- Parámetros obtenidos en el análisis repetitivo*

	TRIAMTERENO			METOTREXATO		
	t <sub>migrac</sub>	APC	Altura	t <sub>migrac</sub>	APC	Altura
<b>Media</b>	7.60	3587.1 3	5181.9	12.5	3240.5 4	5081.7 3
<b>σ estándar</b>	0.043	98.91	143.12	0.084	85.6	283.44
<b>RSD (%)</b>	0.56	2.76	2.76	0.67	2.64	5.56

El método propuesto permite la determinación de TRI y MTX en muestras de orina con recuperaciones medias aceptables y una elevada repetitividad.

## **VII.4.- DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA**

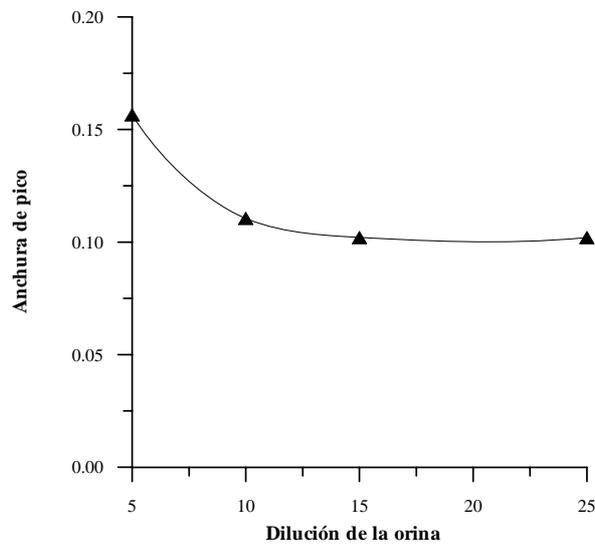
### *ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES*

#### **VII.4.1.- Estudios preliminares**

Dada la alta concentración de creatinina en orina, nuestro primer estudio consistió en buscar el factor de dilución en la orina que permitiera el análisis de dicho compuesto. Por ello inicialmente se inyectaron en el sistema electroforético muestras de orina con dilución 1:1, comprobándose que la señal de la creatinina es muy alta, saturándose la señal y por tanto aumentando la anchura del pico. Por eso, para poder determinarla en orina, será necesario hacer una dilución mayor que la de 1:1. Se ensayaron distintas diluciones de la orina y esta a su vez de distintas personas, para así elegir una dilución óptima de manera que no se sature la señal en posteriores medidas de la creatinina.

En un principio utilizamos un tampón fosfato 25 mM de pH 3, ya que a pH ácidos la creatinina se encuentra ionizada (catión). Las condiciones instrumentales iniciales fueron: voltaje de 25 kV, temperatura = 25 °C, tiempo de inyección de 7 s y  $\lambda = 210$  nm.

En la Figura VII.20 se observa como a partir de una dilución 1/15, la anchura de pico empieza a mantener un valor constante, lo que es un factor importante en las técnicas de separación. Dicho valor es de 0.10 segundos el cual es bastante apropiado en separaciones electroforéticas.

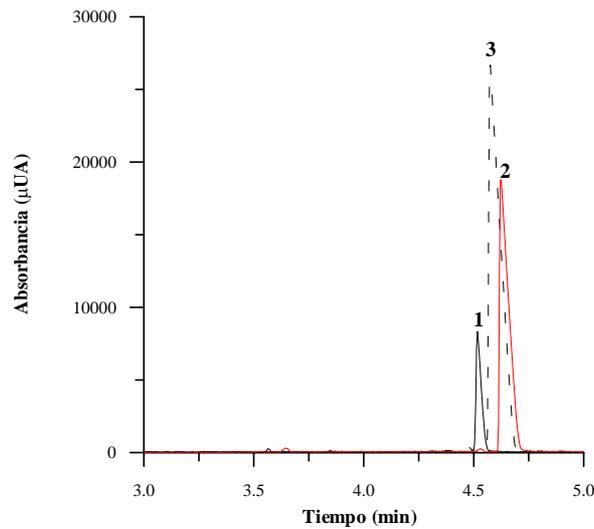


**Figura VII.20.-** Representación de las anchuras de pico obtenidas para la creatinina en función de la dilución de la orina.

En orinas de diferentes personas se ensayaron ya específicamente diluciones 1:15 y 1:25. Se eligió como dilución óptima la de 1:25, porque se obtenía en todos los casos una adecuada señal para la creatinina y a su vez no excesivamente elevada.

En la Figura VII.21 se muestran los electroferogramas correspondientes a orinas de distintas

personas en una dilución 1:25, comprobándose que en todos los casos se obtiene un pico electroforético perfectamente definido, con un área y una definición apropiada. Por otra parte, las disoluciones de orina 1:25 son estables al menos durante 3 horas.

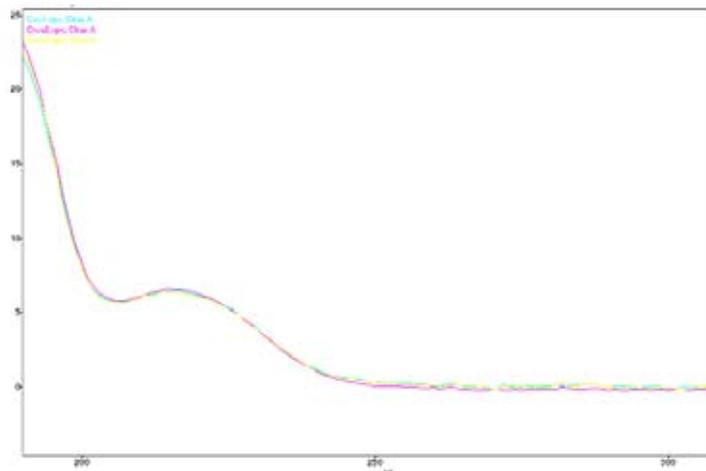


**Figura VII.21.-** Orina de diferentes personas (sanas) con dilución 1:25. La altura de pico está relacionada con la cantidad de líquido ingerida en la dieta.

#### *Pureza de pico*

Debido al valor tan elevado en el área de la creatinina se procedió a examinar su pureza de pico para comprobar si corresponde exclusivamente a la creatinina presente o podría haber contribución de otros interferentes de la orina. Se obtuvieron los espectros del pico electroforético a distintos tiempos, durante la elución, en primer lugar en el tramo ascendente, otro en

el máximo del pico y por último en el tramo descendente. En los tres casos los espectros obtenidos fueron idénticos, hecho que confirma la pureza de nuestro pico (Figura VII.22) y el espectro obtenido se comparó con un patrón de creatinina.



**Figura VII.22.-** Espectros de la creatinina a diferentes longitudes de onda (Pureza de pico) y en distintos tiempos del pico electroforético de la creatinina (pico ascendente, su máximo y pico descendente).

#### **VII.4.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación**

*Debido a una pequeña electrodispersión de pico, utilizamos trietanolamina como aditivo en el tampón fosfato, la cual se adsorbe con mayor fuerza a la pared del capilar que cualquier otro analito presente, evitando así la electrodispersión de pico.*

Para la optimización de la fuerza iónica, se prepararon diferentes soluciones de electrolito de separación que contenía fosfato en distinta concentración + trietanolamina (TEA) de un 99.5 % de riqueza fijando un pH constante de 2.25. La concentración de fosfato se varió entre 15 y 60 mM. El valor de 15 mM fue rechazado porque aparecía una considerable electrodispersión en el pico. Se realizó en todo momento una dilución de una orina 1:25 inyectándose hidrodinámicamente durante 7 s en el capilar, el cual se mantuvo a 25 °C y aplicándose un voltaje de 25 kV. La longitud de onda de medida fue de 210 nm.

**Tabla VII.18 .-** Variación de los tiempos de migración con la concentración del tampón

Concentración fosfato (mM) + TEA	$t_m$ CREA
30	5.64
40	5.70
50	5.79
60	5.92

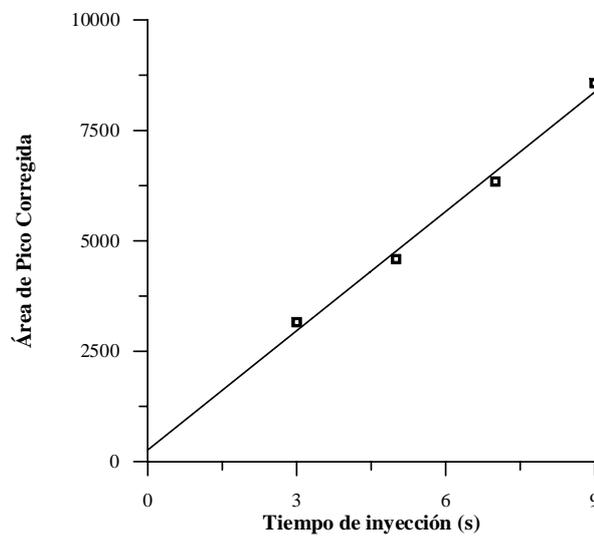
Se seleccionó una concentración de tampón de 40 mM, la cual origina una intensidad de corriente de aproximadamente 60  $\mu$ Amp y un tiempo de migración de aproximadamente 5.7 minutos en el pico electroforético de creatinina.

#### **VII.4.3.- Influencia del tiempo y de la temperatura de inyección**

Se ha utilizado siempre la inyección hidrodinámica por presión. Se utilizó como electrolito de separación el optimizado anteriormente. Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos, comprendidas en el intervalo de 3 a 9 s.

Los resultados de las inyecciones se muestran en la Figura VII.23. Como se puede observar, se obtiene una relación lineal entre el área de pico corregida y el tiempo de inyección.

Un tiempo de inyección de 7 s fue seleccionado como óptimo para evitar la electrodispersión del pico electroforético.

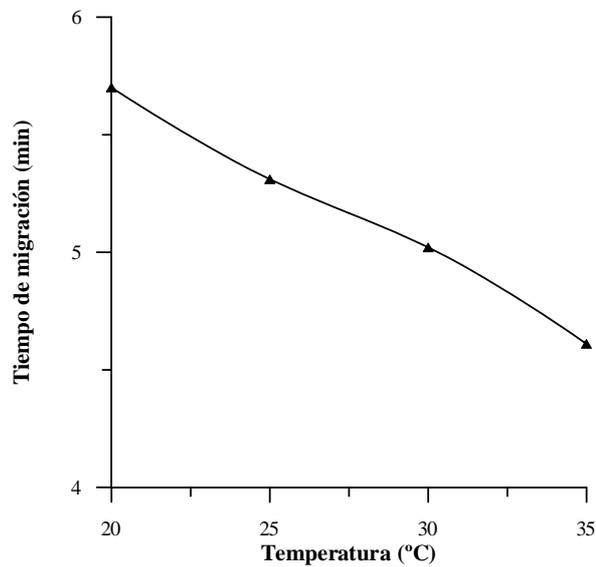


**Figura VII.23.-** Estudio de los tiempos de inyección en función de las APC

Se estudió el efecto de la temperatura en la migración de la creatinina en las condiciones ya descritas, variando la temperatura en el intervalo de 20 a 35 °C.

Como era de esperar, un aumento de la temperatura produjo una notable disminución del tiempo de migración y por consiguiente, del tiempo de análisis, Figura VII.24.

Finalmente se seleccionó como óptima una temperatura de 30 °C ya que se consigue un tiempo de análisis corto y no nos desviamos demasiado de la temperatura ambiente. Temperaturas mayores podrían provocar electrodispersión del pico por efecto Joule.

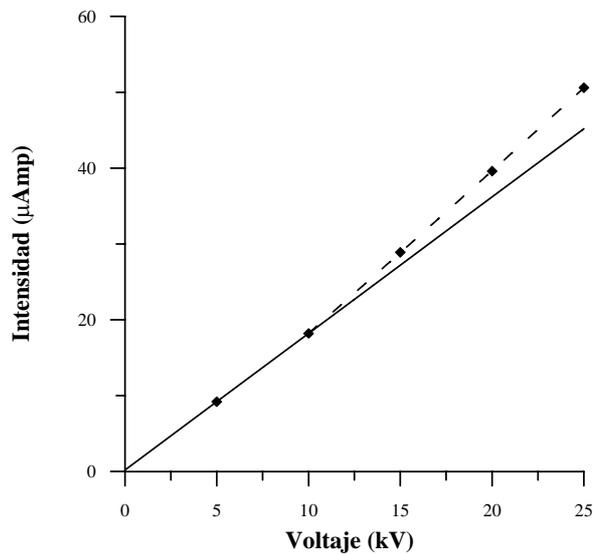


**Figura VII.24.-** Influencia de la temperatura en el tiempo de migración de la creatinina

#### VII.4.4.- Influencia del voltaje sobre la determinación de creatinina

Para la optimización del voltaje se llevaron a cabo separaciones utilizando como electrolito de separación una disolución que contenía fosfato 40 mM + TEA, pH = 2.25 sobre una muestra de orina diluída 1:25. Todos los electroferogramas se registraron a una temperatura de 30 °C, pero aplicando diferentes voltajes, comprendidos en el intervalo 5 a 25 kV. El valor de 30 kV no se utilizó debido a los cortes de corriente constante que ocurrían en el equipo a valores tan altos de potencial.

La representación gráfica de la Ley de Ohm probó que existía linealidad entre voltaje aplicado y corriente generada hasta 10 kV, como se puede ver en la Figura VIII.25.



*Figura VII.25 .- Influencia del voltaje en la corriente obtenida*

En orden a rebajar el tiempo de análisis se eligió como potencial óptimo el de 25 kV (Tabla VII.19).

**Tabla VII.19** .- Variación en el tiempo de migración con el voltaje

<b>Voltaje (kV)</b>	<b><math>t_m</math> CREA (min)</b>
5	30.5
10	14.7
15	9.20
20	6.58
<b>25</b>	<b>5.09</b>

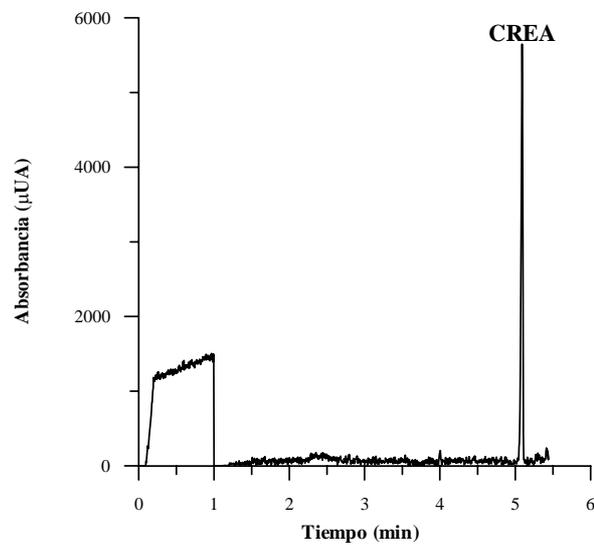
#### **VII.4.5.- Condiciones químicas e instrumentales finales**

El estudio precedente permitió establecer las condiciones óptimas para la calibración, es decir, para realizar la cuantificación de CREA. La corriente generada bajo la condiciones seleccionadas fue de 62.1  $\mu$ Amp y el tiempo de análisis de 5.09 minutos.

Las condiciones finales se resumen en la Tabla VII.20 y en estas condiciones se registró el electroferograma de la Figura VII.26.

**Tabla VII.20.- Condiciones finales**

<b>Capilar</b>	Sílice fundida: 60.2 cm longitud x 75 $\mu\text{m}$ diámetro interno
<b>Electrolito de separación</b>	40 mM fosfato + TEA, pH = 2.25
<b>Temperatura</b>	30 $^{\circ}\text{C}$
<b>Voltaje</b>	25 kV
<b>Tiempo de inyección</b>	7 segundos
<b>Ventana de detección</b>	800 x 100 $\mu\text{m}$



**Figura VII.26.- Electroferograma de una muestra de orina con dilución 1:25 obtenido en las condiciones finales optimizadas.  $\lambda = 210 \text{ nm}$**

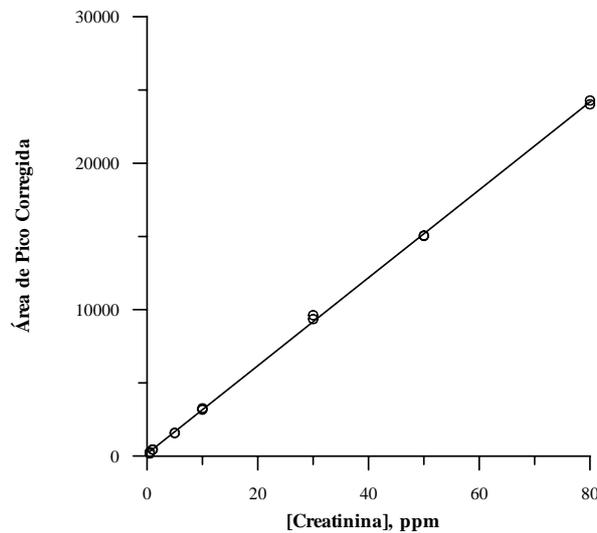
#### VII.4.6.- Calibrado y estudio estadístico

Para evaluar la respuesta frente a la concentración se hizo una recta de calibración con patrones de creatinina y otra recta de calibración de la creatinina en diferentes orinas previa dilución de la misma 1:25.

##### *Recta de calibración con patrones de creatinina*

Se prepararon muestras patrón conteniendo concentraciones variables de creatinina dentro del intervalo de 0.5 a 80 mg L<sup>-1</sup>. Las condiciones de operación fueron las mencionadas en la Tabla VII.20. La longitud de onda de medida fue la de 210 nm.

En la siguiente Figura VII.27 se representan las áreas corregidas del compuesto frente a las concentraciones.

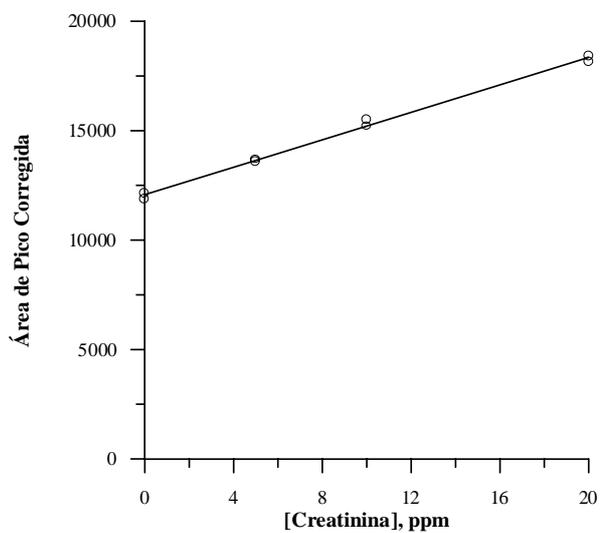


**Figura VII.27.- Recta de calibrado de CREA**

*Recta de calibración de creatinina en diferentes orinas  
(método de adición-patrón)*

Se realizaron 2 rectas de calibración diferentes, utilizando en todo momento el método de la adición patrón, una de ellas con la orina de una sola persona, y la otra orina mezcla de tres personas diferentes, con objeto de evaluar la posible influencia de la matriz biológica. Se fueron adicionando cantidades crecientes de creatinina a la muestra, y al igual que en el caso anterior, la respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal fueron las APC del compuesto. La calibración fue realizada manteniendo constante 1 mL de orina y adicionando cantidades crecientes de creatinina y llevándolo finalmente a un volumen total de 25 mL.

En la Figura VII.28 se muestra la recta obtenida para la orina mezcla de tres personas.



**Figura VII.28.-** Recta adición-patrón obtenida para una orina mezcla de tres personas

En la Tabla VII.21 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para cada una de las rectas.

**Tabla VII.21.- Parámetros estadísticos**

	Ecuación de la recta	$\sigma_{pendiente}$	$\sigma_{ord.origen}$	$\sigma_{típica estimada}$	Coef. correlación	L.O.D <sup>a</sup>	L.O.D <sup>b</sup>
<b>Recta calibración</b>	$Y=3.00 \times 10^2 [C]+1.6$ $2 \times 10^2$	1.63	$6.13 \times 10^1$	$1.70 \times 10^2$	0.9998	0.612 ppm	1.57 ppm
<b>Recta adición-patrón*</b>	$Y=3.06 \times 10^2 [C]+4.6$ $0 \times 10^3$	5.39	$3.70 \times 10^1$	$6.76 \times 10^1$	0.9991	0.872 ppm	0.741 ppm
<b>Recta adición-patrón**</b>	$Y=3.14 \times 10^2 [C]+1.2$ $1 \times 10^4$	8.32	$9.53 \times 10^1$	$1.74 \times 10^2$	0.9979	3.20 ppm	1.86 ppm

\*Procedente de la orina de una persona

\*\*Procedente de la orina mezcla de tres personas

<sup>a</sup> LOD criterio de Winerforner and Long (según referencia 24)

<sup>b</sup> LOD criterio de Clayton (según referencia 25)

Como se puede comprobar en la tabla anterior, las pendientes tanto de la recta patrón como de las adiciones patrón tienen aproximadamente el mismo valor, de lo que se deduce que el fondo de matriz no interfiere en la determinación de creatinina, pudiéndose por tanto proponer como metodología la del patrón externo para los siguientes estudios y su aplicación al análisis de rutina de muestras de orina.

#### VII.4.7.- Repetitividad

Para el estudio de la repetitividad se preparó una orina con una dilución 1:25 y se realizaron 11 medidas en las condiciones óptimas indicadas anteriormente. En la Tabla VII.22 se muestran los valores medios de las señales, desviación estandar y % de desviación estandar relativa (RSD).

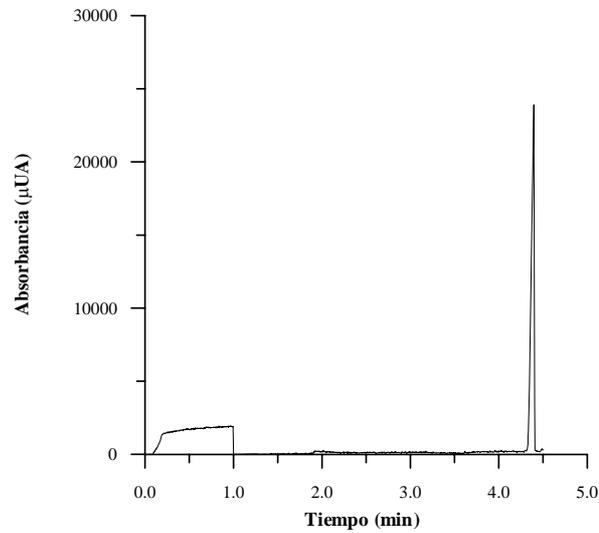
**Tabla VII.22 .-** *Parámetros estadísticos obtenidos para el estudio de repetitividad de la creatinina en orina diluída 1:25*

	CREATININA		
	Tiempo	APC	Altura
<b>Media</b>	5.10	1884.52	5694.5
<b><math>\sigma</math> estándar</b>	0.03	50.6	139.7
<b>RSD (%)</b>	0.50	2.68	2.45

#### **VII.4.8.- Influencia de la presencia de otros principios activos**

Para el estudio de posibles interferentes se procedió a la inyección de una orina proveniente de un niño, el cual se encontraba bajo medicación con antibióticos, mucolítico y un tercer compuesto con propiedades de antiinflamatorio-antipirético, concretamente, amoxicilina y ácido clavulánico, carbocisteína e ibuprofeno en unas cantidades de 750, 187.5, 600 y 300 mg/día respectivamente.

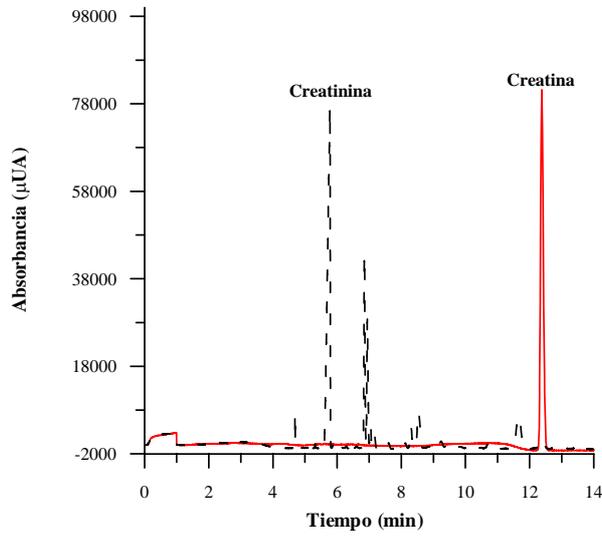
En la Figura VII.29 observamos como la señal correspondiente a la creatinina no se ve afectada por ninguno de los principios activos anteriormente mencionados, analizándose la pureza de pico de la creatinina.



**Figura VII.29.-** Electroferograma correspondiente a una muestra de orina conteniendo antibióticos, mucolíticos y antipiréticos

Teniendo en cuenta que la creatinina es un metabolito de la creatina, también se estudió esta como posible interferencia. Normalmente en la orina la creatina está en concentraciones muchos menores que la creatinina.

Como se observa en la Figura VII.30, no aparece pico correspondiente a la determinación de creatinina, apareciendo a un tiempo superior (aproximadamente 12 minutos). A la vez podemos afirmar que mediante nuestro método podríamos determinar creatina en presencia de creatinina ya que en una muestra de orina diluída 1:1 se observa también la señal procedente de la creatina, perfectamente definida e integrable. (Figura VII.30)



**Figura VII.30 .-** Electroferogramas correspondientes a la inyección de creatina (—) y a una orina diluída 1:1 (---).

Otro interferente estudiado fue la urea, la cual se comprobó que en las condiciones de nuestro método tampoco interfiere en la determinación de creatinina, no mostrándose presente en el electroferograma durante 20 minutos, lo que podría indicar la falta de carga positiva en la urea.

#### **VII.4.9.- Inyección por el lado corto del capilar**

En estudios previos se observó la posibilidad de emplear el capilar realizando la inyección por su lado corto.

La longitud total del capilar es la misma que se ha utilizado hasta ahora, es decir, 60.2 cm, pero ahora la distancia efectiva (es decir, distancia hasta el detector) va a ser de solo 10 cm, y esto se consigue mediante una inversión de polaridad en el equipo, y una inyección de la muestra por el vial izquierdo, que se encuentra por lo tanto a 10 cm de la ventana de detección.

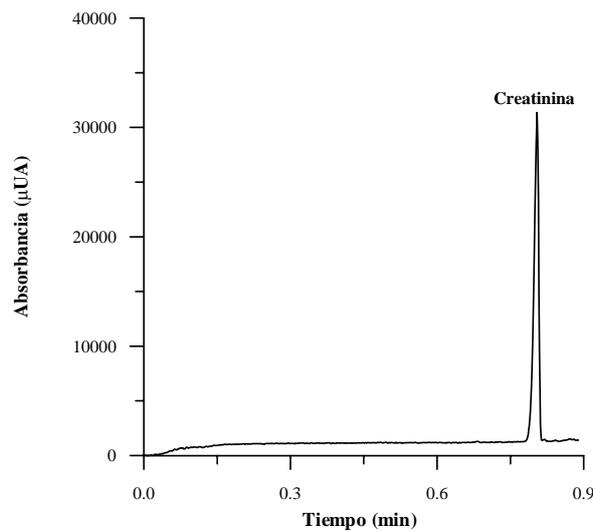
Este estudio se realizó en un equipo Beckman MDQ con detector de diodos en línea, controlado por un ordenador con el programa Beckman MDQ para el registro y tratamiento de datos, ya que el que utilizamos hasta ahora, no permitía realizar este cambio de polaridad. En este equipo también se utilizaron capilares Beckman de sílice fundida, alojados en una carcasa con una ventana de detección de 800 x 100  $\mu\text{m}$ .

Inyectando en estas condiciones del capilar, conseguimos obtener la creatinina en un tiempo de análisis de tan solo 0.8 minutos, lo cual es una gran ventaja en el análisis de rutina por obtener la creatinina en un tiempo de análisis tan corto.

En la Figura VII.31 observamos el tiempo de migración de la creatinina, donde destacamos que el

área obtenida en estas condiciones es equivalente a la obtenida en nuestro sistema de trabajo normal, por tanto, hemos conseguido una mayor rapidez de análisis sin pérdida de sensibilidad apreciable.

En esta forma de operar también analizamos la creatina como posible interferente concluyéndose que esta no interfiere en la determinación de creatinina, ya que se obtiene aproximadamente a 1.5 minutos, y además, la cantidad de creatina en orina es muy pequeña con lo cual en la orina diluída 1:25 no observamos una señal útil proveniente de esta.



**Figura VII.31** .- Electroferograma correspondiente a una muestra de orina diluída 1:25 inyectada por el lado corto del capilar.

**VII.4.10.- Límites de detección y cuantificación**

La determinación de dichos límites se suele obtener de una muestra blanco que no contenga el analito a determinar. En nuestro caso, debido a la existencia natural de creatinina en orina no fue posible la aplicación de esta metodología. Por ello para el cálculo de estos límites se ha realizado con sucesivas diluciones de una misma muestra de orina hasta conseguir una muestra cuya señal respecto al ruido obtenido en la parte anterior y posterior al pico electroforético de la creatinina fuera de 10 y 3 veces, para el cálculo del límite de cuantificación y detección respectivamente.

Para ello se prepararon muestras de orina con distintas diluciones. En la Tabla VII.23 se muestra el APC obtenida para la creatinina en cada una de las diluciones y la concentración obtenida a partir del APC sustituyendo en la recta de calibración de la creatinina en orina.

**Tabla VII.23.- APC y concentraciones de creatinina obtenida para distintas diluciones**

Orina tomada:volumen final	APC	[CREA]obtenida, mg L <sup>-1</sup>
1:25	6219.7	20.2
0.1:25	630.0	1.56
0.03:25	300.9	0.46
0.01:25	80.2	0.27

De la tabla anterior se deduce que el límite de cuantificación está en  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  aproximadamente y el límite de detección en  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  aproximadamente.

#### VII.4.11.- Aplicación al análisis

Con objeto de aplicar nuestro método, procedimos a analizar la creatinina de diferentes grupos de personas con el objeto de ver si existe alguna influencia respecto a la edad, o estado de gestación, sobre la actividad renal del organismo. Los grupos establecidos fueron los siguientes: a) 3 mujeres embarazadas, b) 2 niños menores de 4 años, c) 3 adultos mayores de 40 años, d) 1 adulto mayor de 70 años y e) 1 adulto diabético. El análisis de creatinina se realizó en tres momentos del día: orina de la mañana, orina del mediodía, y orina de la tarde.

En la Tabla VII.24 se muestran los valores obtenidos de creatinina en orina. De ella, deducimos las siguientes conclusiones:

II En el caso de las mujeres embarazadas, se observó una notable disminución de sus niveles de creatinina, coincidiendo con el hecho de que la cantidad de líquido excretada durante el embarazo es mucho mayor.

II En el caso de la persona diabética, es muy importante el control de creatinina ya que el tratamiento prolongado de insulina puede generar nefropatía

diabética. Con el control de creatinina podríamos saber si su riñón funciona dentro de los límites de la normalidad. Fueron contrastados nuestros análisis con sus resultados clínicos, comprobándose que efectivamente sus niveles de creatinina están dentro de la normalidad.

II Cabe destacar el caso del hombre > 40 años cuyos niveles de creatinina son más altos de lo normal, es de suponer que sea debido a la escasa cantidad de líquido ingerido en su dieta alimenticia, ya que se trata de una persona sana, y a lo largo del día su contenido pasa a ser normal.

II No teniendo en cuenta ninguna de las anomalías anteriormente mencionadas, parece ser que la edad no influye en la cantidad de CREA excretada, solo el volumen líquido de su dieta.

De lo anterior se puede concluir la necesidad de determinar la creatinina en las alicuotas de orina a analizar con objeto de poder normalizar la excreción de otros metabolitos presentes en la misma.

**Tabla VII.24.-** Concentración de creatinina obtenida para distintos grupos de personas

	CREATININA, mg L <sup>-1</sup> en orina		
	MAÑANA	MEDIODIA	TARDE
<b>Niño &lt; 5 años</b>	852.3	1349.9	427.9
<b>Niña &lt; 7 años</b>	604.5	1866.6	953.2
<b>Hombre &gt; 40 años</b>	2970.0	992.3	1089.9
<b>Mujer &gt; 40 años</b>	547.8	293.9	547.6
<b>Mujer &gt; 70 años</b>	1351.3	561.8	853.3
<b>Embarazada (2 meses)</b>	374.8	141.3	371.1
<b>Embarazada (6 meses)</b>	---	215.8	---
<b>Embarazada (8 meses)</b>	---	235.2	---
<b>Hombre diabético*</b>	---	1455.8	---

\*Medicándose con aproximadamente 45 unidades de insulina / día durante 22 años.

El método propuesto es simple, rápido y de bajo coste, siendo competitivo con otros empleados en análisis de rutina.

### VII.5.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Khun, R., Hoffster Khun, S., Capillary Electrophoresis. Principles and Practice. Springer Laboratory
- 2.- Baker, D. R., Capillary Electrophoresis, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., (1995)
- 3.- Heiger, D., High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett-Packard Company, Alemania, (1992)
- 4.- Blanco, C., Electroforesis Capilar, Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones, Almería, (1998).
- 5.- Vinther, A., Soeber, H., *J. Chromatogr.*, **3**, 559 (1991)
- 6.- Kim, W.S.; Dahlgren, R.L.; Moroz, L.L. y Sweedler, J.V.; *Anal. Chem.*; **74** (21), 561 (2002)
- 7.- Gomez, M.R.; Olsina, R.A.; Martinez, L.D. y Silva, M.F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **30** (3), 791 (2002)
- 8.- Zhou, T.; Yu, H.; Hu, Q. y Fang, Y.Z.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **30** (1), 13 (2002)
- 9.- Marchesini, A.F.; Williner, M.R.; Mantovani, V.E.; Robles, J.C. y Goicoechea, H.C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **31** (1), 39 (2003)
- 10.- Vilchez, J.L.; Araujo, L.; Prieto, A. y Navalón, A.; *Chromatographia*, **56** (5-6), 351 (2002)
- 11.- Gaspar, A.; Andrasi, M. y Kardos, S.; *J. Chromatogr. B.*, **775** (2), 239 (2002)
- 12.- Gaspar, A.; Kardos, S.; Andradi, M. y Klekner, A.; *Chromatographia*, **56**, S109 (2002)

- 13.- Galli, V. y Barbas, C.; *Anal. Chim. Acta.*, **482** (1), 37 (2003)
- 14.- Acedo Valenzuela, M.I.; Espinosa Mansilla, A.; Muñoz de la Peña, A. y Cañada Cañada, F.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 432 (2002)
- 15.- Rodríguez Flores, J.; Berzas Nevado, J.J.; Castañeda Peñalvo, G. y Rodríguez Cáceres, M.I.; *Chromatographia*, **57**, 493 (2003)
- 16.- Zhou, Q.X.; Liu, J.F.; Cai, Y.Q.; Liu, G.G. y Jiang, G.B.; *Microchem J.*, **74** (2), 157 (2003)
- 17.- Santilio, A.; Casentini, B.; Spagnoli, M. y Dommarco, R.; *J. Capillary. Electrophor. Microchip. Technol.*, **8** (1-2), 1 (2003)
- 18.- Hewitt, J.D. y McGown, L.B.; *Appl. Spectrosc.*, **57** (3), 256 (2003)
- 19.- Rosello, S.; Galiana Balaguer, L.; Herrero Martínez, J.M.; Maquieira, A. y Nuez, F.; *J. Sci. Food. Agric.*, **82** (10), 1101 (2002)
- 20.- Vachirapatama, N.; Macka, M. y Haddad, P.R.; *Anal. Bioanal. Chem.*; **374** (6), 1082 (2002)
- 21.- Copper, C.L. y Callahan, J.H.; *Talanta*, **58** (5), 823 (2002)
- 22.- Ishio, N.; Fukushi, K.; Michiba, K.; Takeda, S. y Wakida, S.I.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **374** (6), 1165 (2002)
- 23.- Cuadros Rodríguez, L., García Campaña, A.M., Jiménez Linares, C. y Román Ceba, M., *Anal. Lett.*, **26**, 1243 (1993)
- 24.- Long, G.L. y Winerfordner, J.D., *Anal. Chem.*, **55**, 712A (1983)

- 25.- Clayton, C.A., Hines, J.W. y Elkins, P.D., *Anal. Chem.*, **59**, 2506 (1987)
- 26.- Altria, K.D., *Chromatographia*, **35**, 177 (1993)

## **Capítulo VIII.**

**ESTUDIOS CROMATOGRÁFICOS DE  
ÁCIDO FOLÍNICO, METOTREXATO,  
LAS PTERIDINAS MARCADORAS:  
ÁCIDO PTERÍN-6-CARBOXÍLICO,  
NEOPTERÍN, XANTOPTERÍN,  
ISOXANTOPTERÍN Y BIOPTERÍN, Y  
CREATININA COMO PATRÓN INTERNO**

### **VIII.1.- INTRODUCCIÓN**

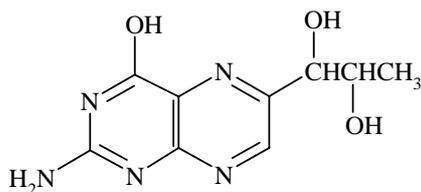
La cromatografía puede definirse como una técnica de separación de los componentes de una mezcla, basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos y que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Se encuentra regida por factores termodinámicos y cinéticos. Los aspectos termodinámicos son los que determinan las características de la retención y selectividad del sistema cromatográfico y corresponden a los equilibrios de distribución de los solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria. En cuanto a los aspectos cinéticos, consideran el tiempo para el que se alcancen los sucesivos equilibrios entre las fases en el tiempo de contacto y la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico.

### **VIII.2.- CARACTERÍSTICAS DE LAS PTERIDINAS**

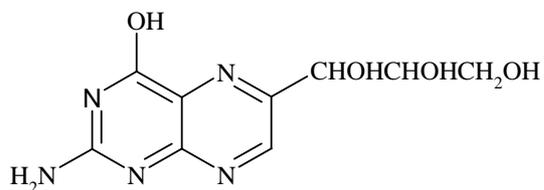
Las pteridinas y sus derivados tales como biopterín (BIO), neopterín (NEO), xantopterín (XAN), isoxantopterín (ISO) y ácido pterín-6-carboxílico (CAR) son una familia de compuestos orgánicos, los cuales juegan un papel muy importante en bioquímica. Estos compuestos están implicados en numerosos procesos de síntesis como por ejemplo en la síntesis de la vitamina

B<sub>2</sub>. Aparecen de forma natural como subproductos del ácido fólico. Por otro lado, los derivados pteridínicos son también factores muy importantes en el metabolismo celular.

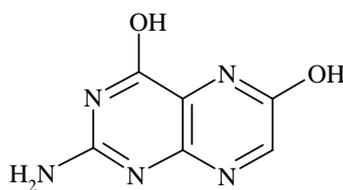
En la última década, los niveles de estos compuestos en varios fluidos biológicos, tales como orina y suero humano, han sido utilizados como importantes criterios clínicos sobre todo en el diagnóstico de infecciones virales (1) y diferentes tipos de cáncer (2).



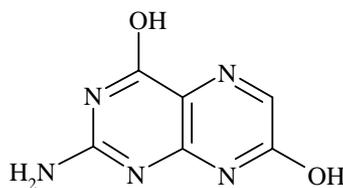
**BIO**



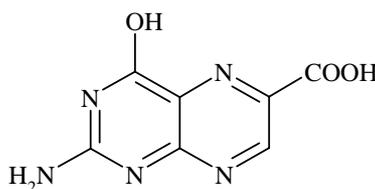
**NEO**



**XAN**



**ISO**



**CAR**

El neopterín ha sido considerado clásicamente como la más importante pteridina marcadora de cáncer (3), sin embargo, la relación entre las cantidades de las diferentes pteridinas se usa como prueba de diagnósticos de cáncer y pre-cáncer en laboratorios clínicos (4).

Se han recogido ampliamente datos sobre aumentos en las cantidades de xantopterín, neopterín y pterín excretados por pacientes enfermos de cáncer, así como el incremento en la relación neopterín/biopterín (5). Recientemente se ha encontrado que la relación neopterín/biopterín para personas normales es  $\square 1.38$  mientras que para pacientes enfermos de cáncer es  $\square 2.19$  (4). El incremento en la excreción de ácido pterín-6-carboxílico y la reducción del isoxantoperín fueron también recogidos por los mismos autores (4).

A su vez, en análisis clínicos, la creatinina es considerada como la mejor referencia para normalizar la excreción de muchos metabolitos, como por ejemplo, las pteridinas (6) en la orina. Por lo tanto la relación neopterín/creatinina será más significativa para seguir el progreso del desorden antineoplásico (7) que el análisis del contenido en neopterín en la orina excretada en 24 horas.

El análisis de las pteridinas es difícil, debido a sus características físico-químicas (8): sensibilidad a la luz, la posibilidad de oxidarse, la baja solubilidad y las concentraciones tan pequeñas en que se encuentra en fluidos biológicos. Las pteridinas excretadas por la orina son una variedad de niveles de oxidación (hidropteridinas), pero solo los derivados completamente oxidados son fluorescentes.

La alta sensibilidad de las técnicas fluorimétricas nos permiten determinar los contenidos de pteridinas en fluidos biológicos. Por tanto, para determinar el contenido total de pteridinas en una muestra de orina, será necesaria la transformación de las diferentes especies reducidas en su forma oxidada. El procedimiento que propone Trehan (9) es el más frecuentemente utilizado para dicha oxidación.

Las técnicas más utilizadas para la determinación de pteridinas son mediante HPLC y un resumen de las mismas se muestra en la Tabla VIII.I.

También la electroforesis capilar con detección fluorescente inducida por láser (4) fue utilizada para la determinación de ácido pterín-6-carboxílico, neopterín, pterín, isoxantopterín, xantopterín y biopterín.

Cabe destacar la resolución de pteridinas por varios métodos llevados a cabo por nuestro equipo de investigación. Así se propuso para la determinación de una mezcla multicomponentes de pteridinas la resolución mediante dos técnicas, espectrofotometría de derivada y métodos de calibración multivariante: PLS (Partial Least Squares) (25). También fueron analizadas mediante fluorescencia derivados pteridinícos comparando entre métodos sincrónicos, PLS y Análisis Lineal Híbrido (HLA) (26). Por último, fue propuesto un método para el análisis de pteridinas y creatinina en HPLC con detección fotométrica y fluorimétrica en serie (24).

Técnicas electroanalíticas (27) y de radio inmunoensayo (28), fueron utilizadas para la determinación de ácido fólico, biopterín y neopterín. Mediante técnicas fluorescentes (29), midiendo en el intervalo de longitudes de onda de emisión entre 451-464 nm (excitando en un intervalo entre 282-365 nm), fueron analizadas pterín, xantopterín, biopterín y neopterín.

Sin embargo no se han encontrado datos bibliográficos referentes a la determinación de las

pteridinas marcadoras, el antineoplásico metotrexato y el agente de rescate ácido folínico de forma simultánea en una misma muestra. Todos estos compuestos coexisten en los fluidos biológicos en aquellas personas sometidas a terapia antineoplásica.

Hay que tener en cuenta el diferente nivel de concentraciones presentes en los distintos compuestos que depende fundamentalmente de la vía de eliminación. En orina la concentración de MTX, LV y creatinina es elevada (nivel de  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) mientras que las pteridinas se encuentran presentes a bajas concentraciones (nivel de  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Sin embargo, en suero todos los componentes se encuentran en muy bajas concentraciones (nivel de  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Por ello las técnicas desarrolladas van encaminadas a su aplicación en orina y en suero teniendo en cuenta el nivel de concentración presentes en las muestras procedentes de individuos bajo tratamiento.

**Tabla VIII.1.- Determinación de pteridinas mediante HPLC**

Analito	Detección	Columna	Elución	Muestra	Ref
Neopterín(I), biopterín(II), isoxantopterín(III), isoxantolumacina(I V) y 7-metilxantopterín (V)	(I,II,III,IV)Fluorimétrica a 440 nm (exc: 355 nm), (V) 490 nm (exc: 365 nm)	Bondapak C18 (30 cm x 9 mm d.i.)	MeOH/tampón fosfato 10mM (1:24), pH 3.2	Bacilos de adultos	10
Oncopterín, biopterín y neopterín	Fluorescente a 450 nm (exc: 355 nm)	Develosil ODS K-5 (15 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato-amonio 50 mM, pH 3	Orina	11
Neopterín y biopterín	Fluorimétrica a 450 nm (exc:350 nm)	Spherisorb ODS1 (25 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 6.8 conteniendo MeOH/NaOH 0.2 M (99:1)	Orina	12
Neopterín(I), pseudouridina(II) y creatinina(III)	(I)Fluorimétrica a 438 nm (exc:353 nm) (II) y (III) a 235 nm	Supelcosil LC-18S (25 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato 17 mM, pH 5.8 conteniendo ác.octanesulfónico 1.7 mM	Orina	13
Neopterín	Fluorimétrica a 438 nm (exc: 353 nm)	LiChrospher 100RP-18 (3.5 cm x 4 mm d.i.)	Tampón acetato sódico 9 mM, pH 5.1	Suero	14
Tetrahidrobiopterín, neopterín	Fluorimétrica a 430-470 nm (exc:340-370 nm)	Ultrasfera ODS (25 cm x 4.6 mm d.i.)	Ac. sódico/ác. cítrico/ Na <sub>2</sub> EDTA/ditioeritritol,(1 365:21:400:3 000) pH 5.2	Fluido cerebroespinal	15
D-neopterín, biopterín, pterín, 7,8-dihidropterín, 6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterín y 6S-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterín	Fluorescente a 440 nm (exc: 350 nm)	Cosmosil 5C18 (5 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato 0.1 M pH 3 conteniendo 5 % MeOH, 3 mM octilsulfato sódico, 0.1 mM Na <sub>2</sub> EDTA y ác. ascórbico	Hígado de rata, mono y 6 regiones del cerebro	16

Tabla VIII.1.- Continuación

Analito	Detección	Columna	Elución	Muestra	Ref
Neopterín	Fluorescente a 440 nm (exc: 350 nm)	Spherisorb C8 (10 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato 15 mM, pH 6.5	Suero	17
Neopterín	Fluorescente a 450 nm (exc: 370 nm)	Fase reversa C18 (25 cm x 4 mm d.i.)	Ác. octanosulfónico /MeOH/KH <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> / EDTA, pH 2.8	Plasma	18
Neopterín	Fluorescente a 430 nm (exc: 340)	Ultrasphere ODS (25 cm x 4.6 mm d.i.)	Tampón fosfato 15 mM/MeOH (49:1), pH 6.4	Suero	19
Biopterín y Neopterín	Fluorescente	Excalibur ODS (25 cm x 4.6 mm d.i.)	H <sub>2</sub> O/MeOH (85:15)	Plasma	20
Tetrahidrobiopterín(I), biopterín(II), neopterín(III), dihidrobiopterín(IV)	(I)Electroquímica (II)(III)(IV) Fluorimétrica a 455 nm (exc: 272 nm)	Hichrom S3ODS2 (12.5 cm x 4.6 mm d.i.)	Ác. octanosulfónico 0.1 M/ MeOH/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / EDTA, pH 2.8	Plasma	21
Creatinina y neopterín	Fotométrica a 235 nm y fluorimétrica a 438 nm (exc:353 nm)	LiChrosorb (15.5 cm x 4 mm d.i.)	Tampón fosfato pH 6.4	Orina	22
Vitaminas antioxidantes y neopterín	Fluorescente a 438 nm (exc: 353 nm)	Separon SGX C18 (15 cm x 3.3 mm d.i.)	Tampón fosfato 15 mM, pH 6.4	Suero y orina	23
Ác. pterín-6-carboxílico, neopterín, xantopterín, isoxantopterín, biopterín y creatinina	Fotométrica a 230 nm y fluorimétrica a 444 (exc: 280 nm)	Nova-Pack C18 (150 mm x 3.9 mm)	Tampón 0.015 M Tris-HCl-10-3 M NaCl, pH 6.8	Orina	24

### **VIII.3.- CONSIDERACIONES GENERALES COMPORTAMIENTO DE LAS PTERIDINAS MARCADORAS, CREATININA, METOTREXATO Y ÁCIDO FOLÍNICO EN UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO.**

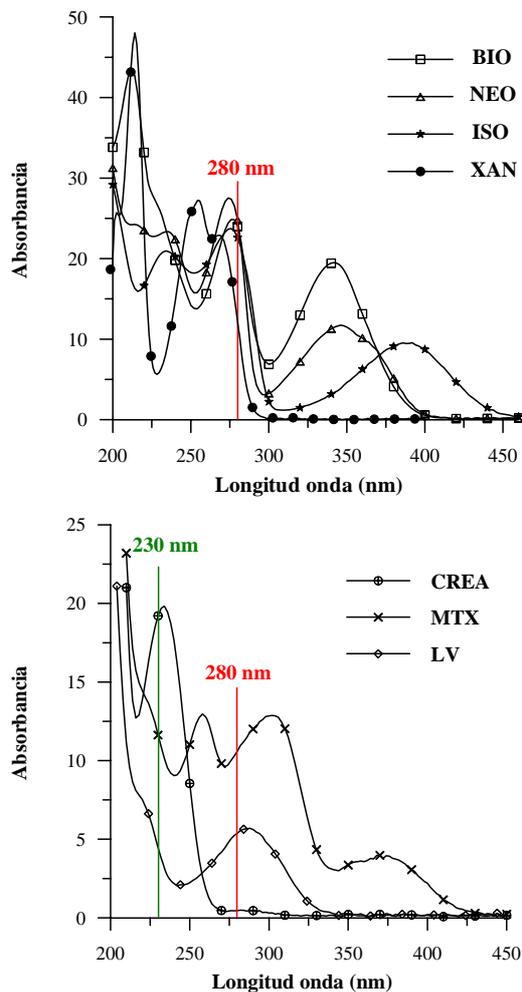
En principio se aborda la resolución de la mezcla formada por cuatro pteridinas marcadoras de patologías neoplásicas tales como neopterín (NEO), xantopterín (XAN), isoxantopterín (ISO), y biopterín (BIO), que son las de mayor interés bioquímico y clínico, además de la creatinina (CREA) utilizada en los análisis de orina como agente normalizador de la excreción de metabolitos del antineoplásico metotrexato (MTX) y de su agente de rescate, el ácido folínico (LV), co-administrado para paliar la toxicidad intrínseca del antineoplásico.

Para llevar a cabo este estudio, se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con un detector fotométrico de diodos y uno fluorimétrico, cuyas características se describen en el Capítulo I.

La composición y flujo de la fase móvil, inicialmente son las propuestas por Espinosa y col. para la determinación de pteridinas en orina (30). Su composición es la siguiente: tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl) 0.015 M de pH = 6.80 conteniendo NaCl ( $10^{-3}$  M) preparada por

dilución de Tris-hidroximetil-aminometano y NaCl en agua y ajuste del pH mediante adición de HCl.

Las longitudes de onda seleccionadas se han elegido en función de las características espectrales de los analitos, cuyos espectros de absorción aparecen representados en la Figura VIII.1, en las condiciones antes mencionadas. Como se puede observar a 280 nm presentan un máximo de absorción todas las pteridinas y el ácido folínico, siendo también muy notable la absorción debida al metotrexato, sin embargo la creatinina no presenta señal, por lo que será necesario efectuar su determinación a 230 nm.



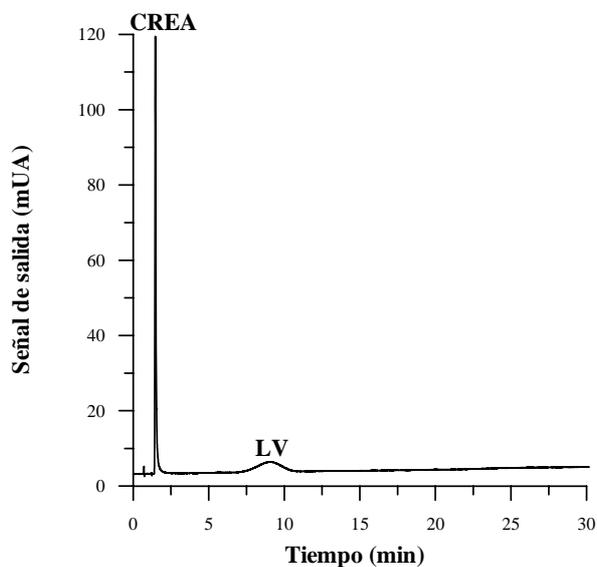
**Figura VIII.1** .- *Espectros de absorción correspondientes a las pteridinas, creatinina, metotrexato y ácido folínico (pH= 6.80, en medio Tris-HCl). [CREA] = [MTX] = [NEO] = [ISO] = [BIO] = 2 mg L<sup>-1</sup> y [LV] = [XAN] = 4 mg L<sup>-1</sup>.*

Comenzaremos con el estudio del comportamiento cromatográfico de creatinina, metotrexato y ácido folínico, de los cuales no tenemos datos, en las condiciones establecidas para las pteridinas, realizando un seguimiento fotométrico.

### VIII.3.1. ESTUDIOS PREVIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE CREATININA, METOTREXATO Y ÁCIDO FOLÍNICO

Con objeto de estudiar el comportamiento de estos analitos en un sistema cromatográfico, se prepararon disoluciones de los tres componentes que en un volumen final de 25.0 mL, contenían una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  y utilizando como disolvente la propia fase móvil compuesta por tampón tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl) 0.015 M de pH = 6.80 conteniendo NaCl ( $10^{-3}$  M), la cual se prepara como se indica en el Capítulo dedicado a reactivos (Capítulo I). La disolución de cada analito se filtra a través de filtros de celulosa regenerada de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro, y se inyectan alícuotas de  $20 \mu\text{L}$ . El caudal utilizado es de  $1.4 \text{ mL/min}$  y la longitud de onda de medida de  $230 \text{ nm}$ , ya que presentan absorción suficiente los tres analitos.

En la Figura VIII.2 se representa el cromatograma obtenido en estas condiciones y se observan solo dos picos situados a 1.46 y 9.07 min respectivamente.



**Figura VIII.2.-** Cromatograma correspondiente a una mezcla de creatinina, ácido folínico y metotrexato en concentraciones de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ ).

El primero de ellos, se asigna a la creatinina por comparación de su espectro de pico y el segundo al ácido folínico, sin embargo no se observa ningún pico asignable a metotrexato aún cuando se prosiguió el registro durante un tiempo elevado ( $> 30$  minutos). Esto es debido al menor carácter polar del metotrexato que hace que se retenga con más fuerza en la fase estacionaria apolar C18.

### VIII.3.1.1.- Influencia de la presencia de un modificador orgánico en la fase móvil

Las distintas polaridades presentadas por LV y MTX como hemos visto, no permiten su elución en un tiempo razonable. Para intentar solucionar este problema, procedimos a preparar una fase móvil a la que se le adiciona un modificador orgánico, en concreto acetonitrilo, para disminuir la polaridad de la fase móvil y así aumentar su poder de elución.

Se prepararon disoluciones que contenían MTX y LV en concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente y se registraron cromatogramas en los que se fue variando el porcentaje de acetonitrilo. En la Tabla VIII.2 se recogen los tiempos de retención del metotrexato y del ácido folínico para diferentes proporciones de acetonitrilo.

Se observa como al aumentar el porcentaje del disolvente orgánico disminuyen notablemente los tiempos de retención de ambos compuestos, y con porcentajes superiores al 6%, el ácido folínico eluye con el frente. Un porcentaje adecuado sería el del 3 % ya que en estas condiciones el MTX eluye a un tiempo razonable, pero el ácido folínico eluiría muy próximo a la creatinina. Por ello, creemos conveniente estudiar el establecimiento de un gradiente de la composición de la fase móvil a lo largo del proceso de elución, de manera que permita la elución del LV en un tiempo razonable, y que permita también la elución previa de las pteridinas

resueltas entre ellas y con respecto al frente, que es nuestro objetivo final.

**Tabla VIII.2 .-** *Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil, sobre los tiempos de retención del MTX y LV (  $\lambda = 230 \text{ nm}$ , flujo =  $1.4 \text{ mL min}^{-1}$ ).*

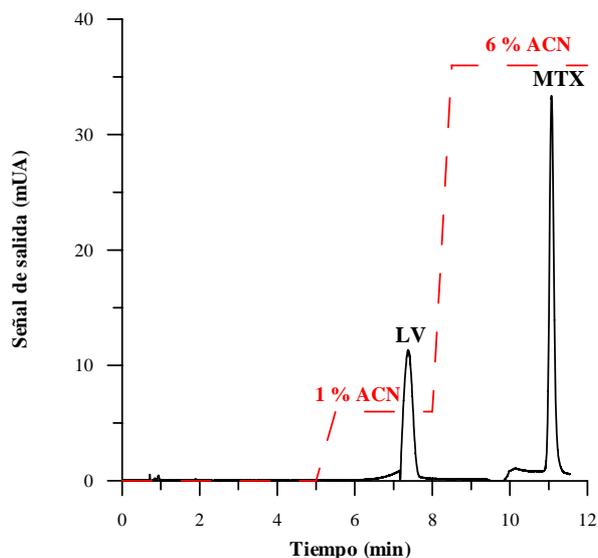
% ACN	$t_R$ (min)	
	Metotrexato	Ácido fólico
0	---	<b>8.156</b>
1	29.76	2.484
2	21.41	1.827
3	<b>8.443</b>	1.175
5	3.499	0.926
6	2.805	0.798
8	1.537	0.686
10	1.079	0.653

Se probó a establecer un gradiente en el que durante los primeros 9 minutos la composición de la fase móvil fuera 100% tris-HCl-NaCl (pH = 6.80) y a partir de ahí se introducía un incremento lineal del porcentaje de ACN hasta llegar al 4%. En estas condiciones el LV eluye a 8.25 min y el MTX a 14.6 minutos, pero el pico de LV era excesivamente ancho, por lo que se modificó el gradiente, eligiéndose como más adecuado el que se recoge en la Tabla VIII.3.

**Tabla VIII.3** .- Gradiente establecido para la resolución de LV y MTX. Composición de la fase móvil.- tampón Tris/HCl pH = 6.80 y acetonitrilo.

Tiempo (min)	% acetonitrilo
0	0.0
5.00	0.0
5.50	1.0
8.00	1.0
8.50	6.0
12.0	6.0
12.5	0.0

Un cromatograma obtenido en estas condiciones se representa en la Figura VIII.3 donde se aprecian los picos del LV y del MTX a tiempos razonables y el ancho de banda correspondiente a LV, ha disminuido considerablemente. Además en estas condiciones, y de acuerdo con lo descrito por Espinosa y col. (30) las pteridinas eluirán antes del LV, con lo que sería posible su determinación conjunta.



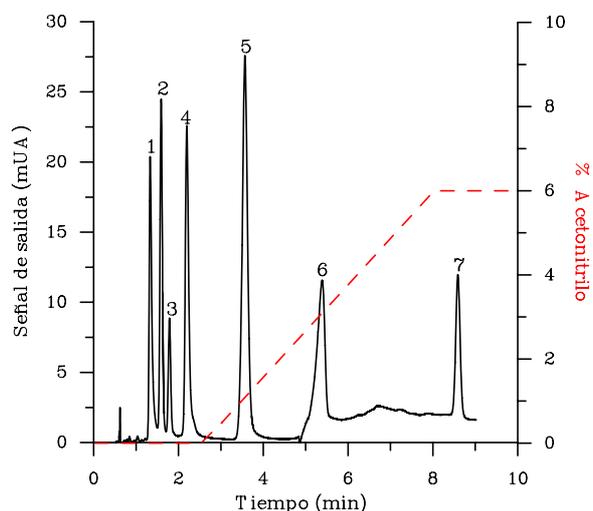
**Figura VIII.3** .- Cromatograma obtenido para una mezcla de MTX y LV mediante el gradiente establecido. ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ , flujo =  $1.4 \text{ mL min}^{-1}$ ).

### VIII.3.2.- SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE CREATININA, NEOPTERÍN, XANTOPTERÍN, ISOXANTOPTERÍN, BIOPTERÍN, ÁCIDO FOLÍNICO Y METOTREXATO. DETECCIÓN FOTOMÉTRICA.

Una vez que hemos optimizado el gradiente de fase móvil para LV y MTX, se procedió a estudiar el comportamiento de las pteridinas en estas condiciones. Para ello se prepararon disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contenían  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de CREA, NEO, ISO, BIO y MTX,  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de XAN y LV y fase móvil hasta enrase. Se registra un cromatograma en estas condiciones (Tabla VIII.3) y el tiempo de elución entre el biopterín, última pteridina eluída y el LV es de

aproximadamente 4 min, por lo que modificamos el gradiente con el fin de obtener una buena separación con menor tiempo.

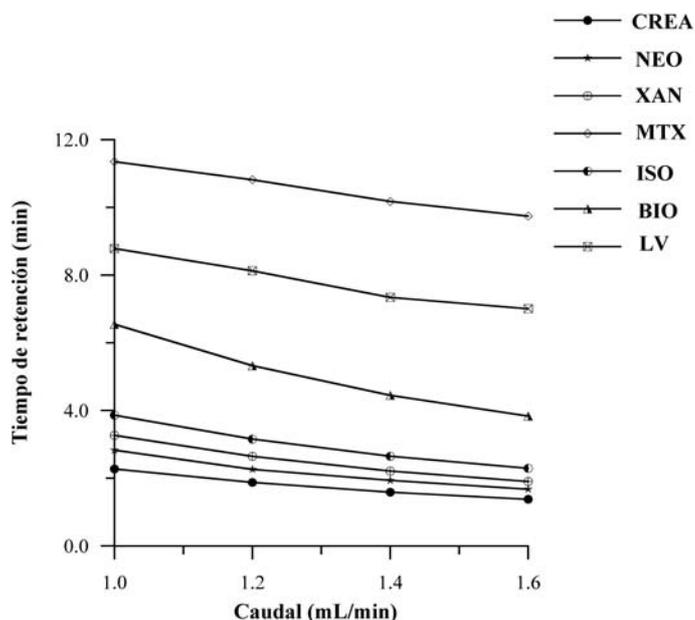
Conseguimos una buena separación cuando el ACN se incorpora de forma progresiva, lineal, a partir de los 2.5 minutos y alcanzando un 6 % de ACN a los 8 minutos. Con la aplicación de este gradiente obtenemos el cromatograma que se observa en la Figura VIII.4.



**Figura VIII.4** .- Cromatograma correspondiente a la resolución de la mezcla de analitos utilizando el gradiente lineal optimizado. CREA (1); NEO (2); XAN (3); ISO (4); BIO (5); LV (6) y MTX (7). ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ ; flujo =  $1.4 \text{ mL min}^{-1}$ ).

Se observa como están adecuadamente resueltos todos los analitos y en un tiempo inferior a los 9 minutos.

Con el objeto de estudiar como influye el caudal de la fase móvil sobre la eficacia del sistema cromatográfico, se preparan muestras conteniendo 2 mg L<sup>-1</sup> de NEO, BIO, CREA y MTX y 4 mg L<sup>-1</sup> de XAN y LV y se inyectan en el sistema cromatográfico, aplicando el gradiente anteriormente optimizado. El flujo de fase móvil se varía entre 1.0 mL min<sup>-1</sup> y 1.6 mL min<sup>-1</sup>. En la Figura VIII.5 podemos ver como los tiempos de retención de los distintos analitos disminuyen al aumentar el caudal de la fase móvil, y además se comprueba que la resolución no se ve afectada prácticamente al utilizar 1.4 mL min<sup>-1</sup> ó 1.6 mL min<sup>-1</sup>. Por tanto, y para llegar a un valor de compromiso entre tiempo, resolución y gasto de fase móvil, en adelante seguiremos aplicando el caudal utilizado hasta ahora de 1.4 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura VIII.5.-** Influencia del caudal de fase móvil en los tiempos de retención de los diferentes analitos.

Una vez optimizada tanto la composición de la fase móvil como el flujo de la misma, procedimos al cálculo de los parámetros cromatográficos que se resumen en la Tabla VIII.4, y como se puede observar se obtienen adecuada resoluciones para todos los componentes en estudio, y el factor de capacidad es relativamente pequeño considerando el número de analitos separados.

**Tabla VIII.4.-** Parámetros cromatográficos para la resolución de la mezcla formada por CREA, NEO, XAN, ISO, BIO, LV y MTX

	Tiempo de retención (min)	Factor de capacidad (k')*	Factor de simetría	Ancho de pico ( $\omega_{1/2}$ )	Resolución (Rs)	Selectividad ( $\nabla$ )
frente	0.62	---	0.76	0.0103	---	---
CREA	1.33	0.53	0.61	0.0608	9.98	---
NEO	1.59	0.61	0.90	0.0600	2.15	1.15
XAN	1.79	0.65	0.92	0.0592	1.67	1.06
ISO	2.20	0.72	0.74	0.0842	2.86	1.11
BIO	3.57	0.83	1.01	0.1333	6.30	1.15
LV	5.39	0.88	1.87	0.1942	5.56	1.06
MTX	8.59	0.93	0.96	0.1125	10.43	1.06

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 ; (t_0 = 0.62 \text{ min})$$

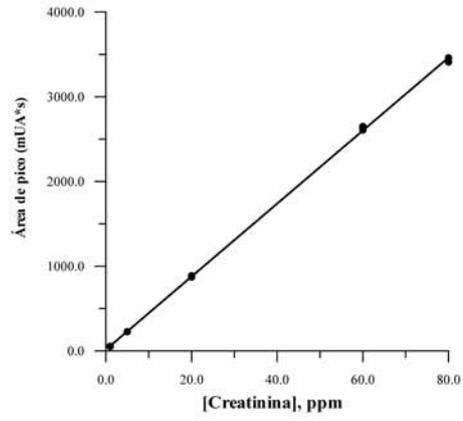
### VIII.3.2.1.- Establecimiento de las rectas de calibrado. Parámetros estadísticos.

Una vez establecida la viabilidad de la separación cromatográfica se procedió al estudio de la relación existente entre la señal, fundamentalmente área de pico y la concentración de los analitos en estudio.

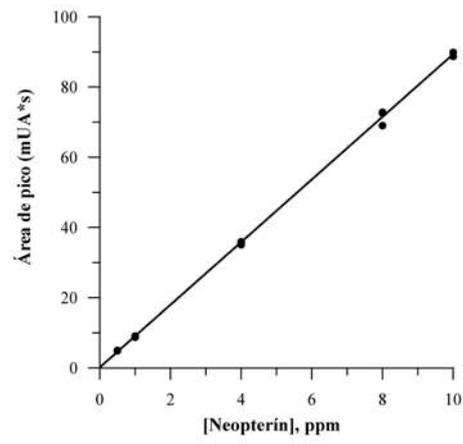
Para ello se prepararon disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contenían concentraciones variables de los analitos y se enrasan hasta el volumen final con fase móvil. Los intervalos de concentración para cada analito son: CREA: 1.0 - 80.0 mg L<sup>-1</sup>, NEO: 0.5 - 10.0 mg L<sup>-1</sup>, XAN: 0.5 - 10.0 mg L<sup>-1</sup>, ISO: 0.50 - 10 mg L<sup>-1</sup>, BIO: 0.50 - 10.0 mg L<sup>-1</sup>, LV: 0.50 - 10.0 mg L<sup>-1</sup> y MTX: 0.50 - 10.0 mg L<sup>-1</sup>.

Cada muestra se prepara por triplicado y de cada una de ellas se efectúan tres inyecciones. Dada la diferente sensibilidad que presentan las pteridinas con respecto a los demás compuestos, esta experiencia se realiza registrando los cromatogramas a dos longitudes de onda distintas. A 280 nm se medirá la señal analítica correspondiente a las pteridinas y a 230 nm determinaremos creatinina, metotrexato y ácido folínico. En la Figura VIII.6 se representan los resultados obtenidos.

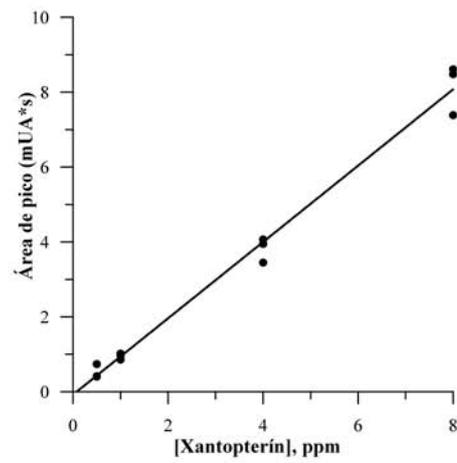
a)



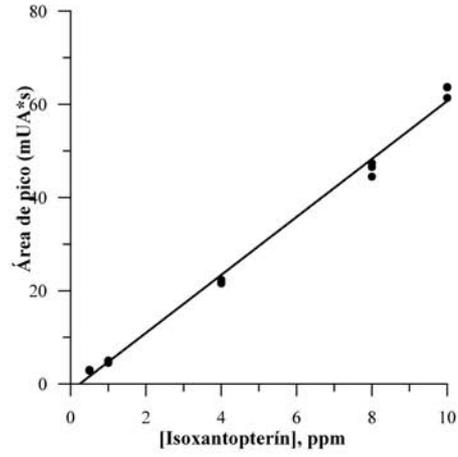
b)



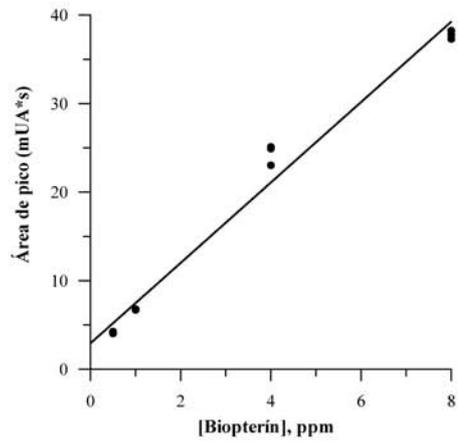
c)



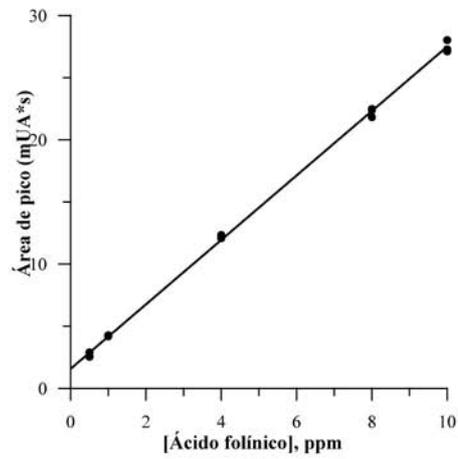
d)



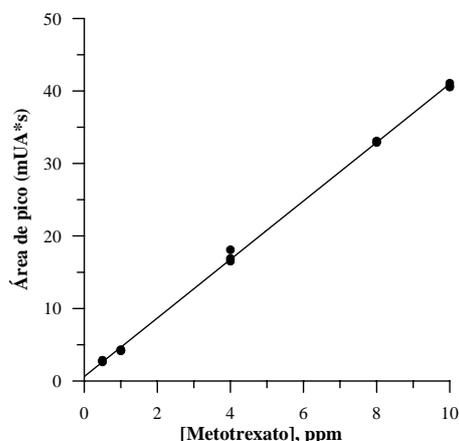
e)



f)



g)



**Figura VIII.6 .-** Influencia de la concentración en el área de pico para: a) CREA ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ ); b) NEO ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ); c) XAN ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ); d) ISO ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ); e) BIO ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ); LV ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ ); f) MTX ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ )

Los parámetros estadísticos correspondientes a la recta de calibrado de cada analito se han resumido en la Tabla VIII.5, y como se puede observar en todos los casos se obtiene una adecuada linealidad. Los límites de detección obtenidos son aceptables, sin embargo, en estas condiciones no podríamos aplicar el método a fluidos biológicos, ya que el contenido de las pteridinas en orina es muy bajo y la sensibilidad de nuestro método, no permitiría su cuantificación. Menos problemas presentaría la determinación de MTX y LV, porque se administran a elevadas dosis y sus concentraciones finales en orina serían superiores y en este caso si sería factible la cuantificación de estos dos analitos.

Con objeto de aumentar la sensibilidad de las pteridinas, y teniendo en cuenta que estos compuestos son altamente fluorescentes, vamos a proceder a su determinación utilizando dos detectores en serie. En primer lugar un detector fotométrico, el cual nos permitiría la determinación de CREA, MTX y LV y a continuación un detector fluorimétrico para la determinación de las pteridinas.

Tabla VIII.5.- Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración lineal.

	CREA	NEO	XAN	ISO	BIO	LV	MTX
<b>Rango lineal (mg L<sup>-1</sup>)</b>	1.0 - 80.0	0.50 - 10.0	0.50 - 10.0	0.50 - 10.0	0.50 - 10.0	0.50 - 10.0	0.50 - 10.0
<b>Ecuación de la recta</b>	$Y = 4.3 \times 10^1 [C] + 1.4 \times 10^1$	$Y = 3.4 \times 10^1 [C] + 3.4$	$Y = 1.0 [C] - 7.8 \times 10^{-2}$	$Y = 4.7 \times 10^1 [C] + 8.4$	$Y = 4.5 \times 10^1 [C] - 2.9$	$Y = 2.7 \times 10^1 [C] + 4.2 \times 10^1$	$Y = 2.9 \times 10^1 [C] + 1.4$
<b><math>\sigma</math> pendiente</b>	$1.785 \times 10^{-1}$	$2.955 \times 10^{-1}$	$3.544 \times 10^{-2}$	1.152	$2.086 \times 10^{-2}$	$4.852 \times 10^{-1}$	$2.044 \times 10^{-1}$
<b><math>\sigma</math> ordenada</b>	8.150	1.779	$1.547 \times 10^{-1}$	6.937	$9.401 \times 10^{-1}$	2.922	1.231
<b><math>\sigma</math> típica estimada</b>	$2.166 \times 10^1$	4.306	$3.667 \times 10^{-1}$	$1.679 \times 10^1$	$2.158 \times 10^1$	7.072	2.980
<b>Coefficiente de regresión</b>	0.9999	0.9995	0.9940	0.9961	0.9896	0.9978	0.9997
<b>LOD, mg L<sup>-1</sup> (Winerfordner y Long)</b>	0.56	0.15	0.47	0.44	0.63	0.34	0.12
<b>LOD, mg L<sup>-1</sup> (Clayton, <math>\alpha = \beta = 0.05</math>)</b>	1.20	0.31	0.92	0.88	1.22	65	0.24
<b>Sensibilidad analítica<sup>1</sup></b>	0.50	0.13	0.37	0.36	0.50	0.26	0.10

1. Según referencia 31

### **VIII.3.3.- SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS ANALITOS EN ESTUDIO UTILIZANDO DETECCIÓN EN SERIE FOTOMÉTRICA Y FLUORIMÉTRICA**

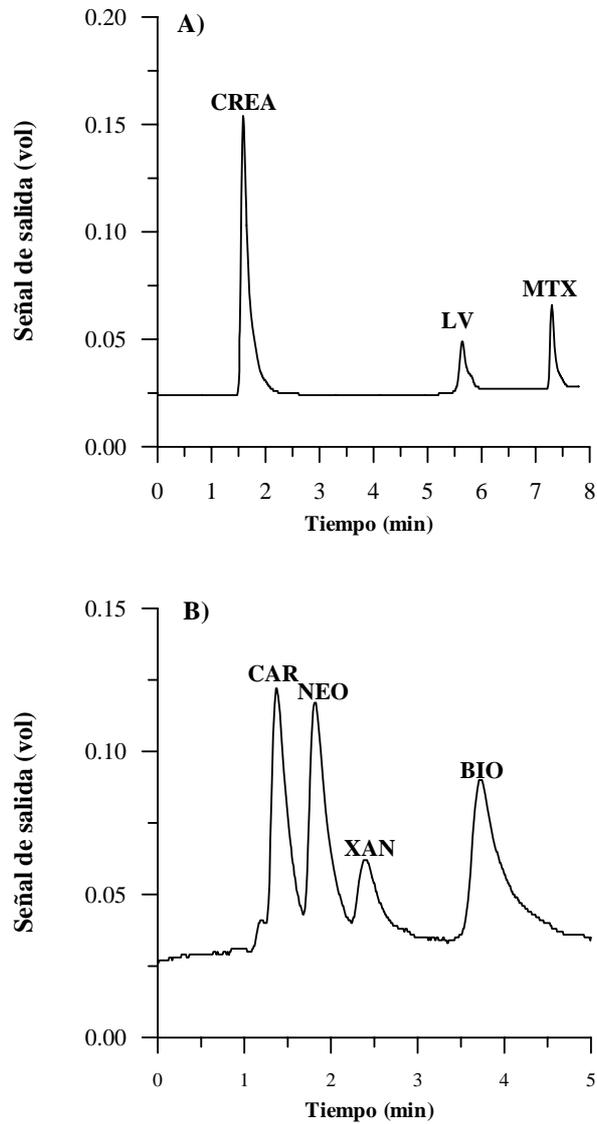
Los estudios previos realizados sobre estos analitos pusieron de manifiesto que tanto MTX como LV presentan escasa fluorescencia en disolución, sin embargo las pteridinas presentan un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia. Este hecho unido a la necesidad de establecer métodos sensibles para la determinación de pteridinas en fluidos biológicos, nos indujo a realizar la separación cromatográfica anteriormente establecida con un seguimiento fluorimétrico para estos derivados.

Así, la utilización de un equipo cromatográfico con un detector fotométrico y otro fluorimétrico acoplados en serie, nos permitía por una parte detectar MTX, LV y CREA mediante detección fotométrica y las pteridinas mediante detección fluorimétrica. Lógicamente la mayor sensibilidad del detector fluorescente permitiría establecer calibraciones en intervalos de concentraciones mucho más bajas. Se analizan las pteridinas presentes apreciablemente en fluidos biológicos, es decir, pterin-6-carboxílico (CAR), NEO, BIO y XAN.

Las condiciones instrumentales iniciales utilizadas en los detectores son las siguientes:

Detector fotométrico:  $\lambda = 230 \text{ nm}$   
Detector fluorimétrico:  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$   
 $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$   
Aumento (gain): x1000  
Ancho rendija: 30 nm  
Composición de la fase móvil: [Tris-HCl] = 0.015 M  
[NaCl] =  $10^{-3} \text{ M}$   
pH = 6.80  
Vflujo = 1.4 mL min<sup>-1</sup>

En estas condiciones se registra un cromatograma, Figura VIII.7, a partir de una disolución que en un volumen final de 25.0 mL contiene: [CAR] = 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , [NEO] = 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , [XAN] = 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y [BIO] = 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; [MTX] = 6  $\text{mg L}^{-1}$ ; [LV] = 6  $\text{mg L}^{-1}$  y [CREA] = 20  $\text{mg L}^{-1}$  y fase móvil hasta enrase. La elución se llevó a cabo utilizando el gradiente lineal establecido previamente, es decir, se introduce acetonitrilo a partir de 2.5 minutos hasta llegar a un porcentaje del 6 % de ACN a los 8 minutos.



**Figura VIII.7.-** Cromatogramas obtenidos con A) detección fotométrica,  $\lambda = 230 \text{ nm}$  y B) detección fluorimétrica a  $444 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ).  $[\text{CREA}] = 20 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[\text{LV}] = 6 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[\text{MTX}] = 6 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[\text{CAR}] = 3 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[\text{NEO}] = 3 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[\text{XAN}] = 4 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $[\text{BIO}] = 4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tal como se observa , los picos cromatográficos correspondiente a los diferentes analitos, aparecen aceptablemente resueltos por lo que se procede a establecer el rango de linealidad para cada uno de los componentes en estas condiciones. Hay que tener en cuenta que en este estudio, la concentración de las pteridinas es del orden de 1000 veces inferior al empleado en el estudio anterior.

### **VIII.3.3.1.- Establecimiento de las rectas de calibrado y parámetros estadísticos**

Se realizó el siguiente estudio con objeto de comprobar si existe una buena relación lineal entre la concentración de los distintos analitos y las señales obtenidas expresadas como áreas de pico. Para ello se prepararon disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contenían concentraciones variables de los analitos. Los intervalos de concentración para cada analito son: CREA: 1 - 80 mg L<sup>-1</sup>, LV: 0.5 - 6 mg L<sup>-1</sup>, MTX: 0.5 - 14 mg L<sup>-1</sup>, CAR: 0.30 - 10 µg L<sup>-1</sup>, NEO: 0.38 - 10 µg L<sup>-1</sup>, BIO: 0.20 - 18 µg L<sup>-1</sup> y XAN: 0.60 - 9 µg L<sup>-1</sup>.

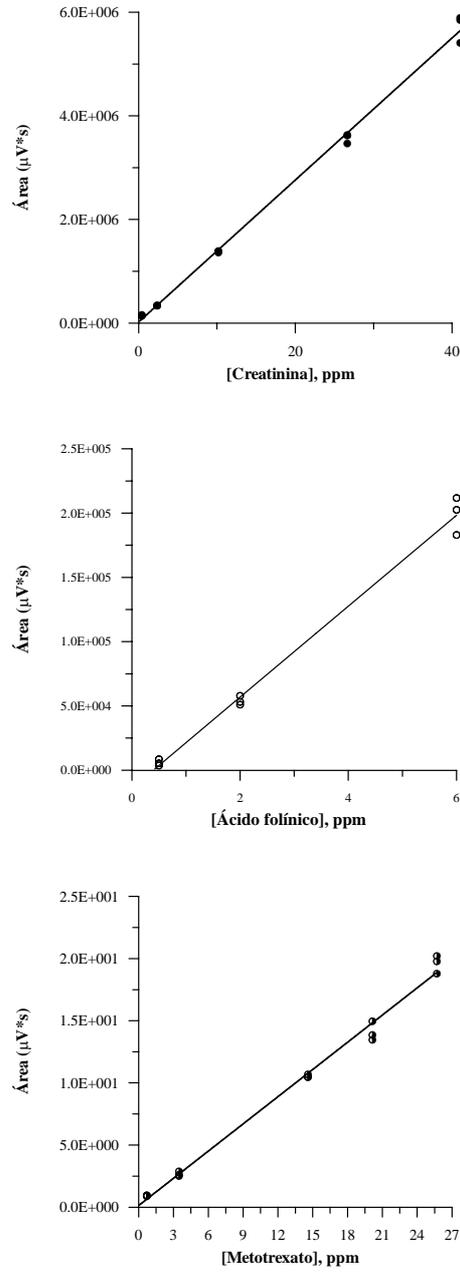
Cada una de las disoluciones se inyectan por triplicado y se les registra el cromatograma con las condiciones fijadas.

En la Figura VIII.8, se representan las rectas obtenidas mediante el seguimiento en el detector fotométrico. Hay que indicar aquí, que la baja

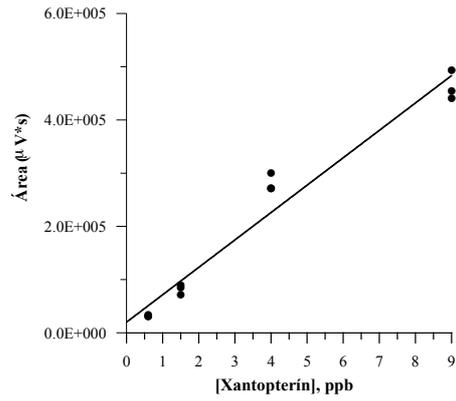
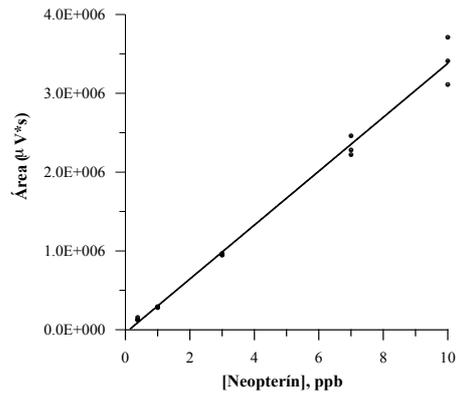
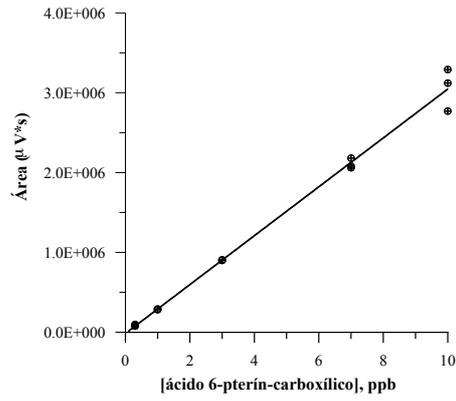
concentración adicionada de las pteridinas hace que dichos compuestos no presenten señal apreciable en este detector. En la Figura VIII.9, se recogen las curvas de calibración obtenidas mediante el seguimiento en el detector fluorimétrico correspondiente a la elución de la pteridinas.

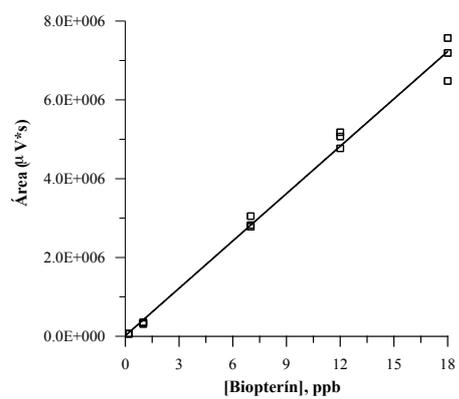
Los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de las rectas de calibración se resumen en la Tabla VIII.6.

Se comprueba que en todos los casos los coeficientes de regresión que se obtienen son aceptables y también como ha bajado enormemente la sensibilidad del método en lo que respecta a la determinación de las pteridinas.



**Figura VIII.8.-** Influencia de la concentración en el área de pico. ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ )





**Figura VIII.9.-** Influencia de la concentración en el área de pico.  $\lambda = 444 \text{ nm}$  ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ )

**Tabla VIII.6.-** Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de CREA, LV y MTX (detección fotométrica) y CAR, NEO, XAN y BIO (detección fluorescente)

	Detección fotométrica, $\lambda = 230 \text{ nm}$			Detección fluorimétrica, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ; $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$			
	CREA	LV	MTX	CAR	NEO	XAN	BIO
<b>Rango lineal</b>	1.0 - 80.0 mg L <sup>-1</sup>	0.5 - 6.0 mg L <sup>-1</sup>	0.5 - 14.0 mg L <sup>-1</sup>	0.30 - 10.0 µg L <sup>-1</sup>	0.38 - 10.0 µg L <sup>-1</sup>	0.60 - 9.0 µg L <sup>-1</sup>	0.20 - 18.0 µg L <sup>-1</sup>
<b>Ecuación de la recta</b>	Y = 6.9x10 <sup>4</sup> [C] - 1.8x10 <sup>4</sup>	Y = 3.5x10 <sup>4</sup> [C] - 1.4 x10 <sup>4</sup>	Y = 4.2x10 <sup>4</sup> [C] - 1.3x10 <sup>3</sup>	Y = 3.1x10 <sup>5</sup> [C] - 1.5 x10 <sup>4</sup>	Y = 3.4x10 <sup>5</sup> [C] - 4.1 x10 <sup>4</sup>	Y = 5.2x10 <sup>4</sup> [C] - 2.0 x10 <sup>4</sup>	Y = 4.0x10 <sup>5</sup> [C] + 1.4 x10 <sup>4</sup>
<b><math>\sigma_{pendiente}</math></b>	1.10 x10 <sup>3</sup>	1.22 x10 <sup>3</sup>	1.05 x10 <sup>3</sup>	7.54 x10 <sup>3</sup>	9.29 x10 <sup>3</sup>	3.35 x10 <sup>3</sup>	1.03 x10 <sup>4</sup>
<b><math>\sigma_{ordenada}</math></b>	4.79 x10 <sup>4</sup>	4.48 x10 <sup>3</sup>	9.22 x10 <sup>3</sup>	4.25 x10 <sup>4</sup>	5.24 x10 <sup>4</sup>	1.67 x10 <sup>4</sup>	1.05 x10 <sup>5</sup>
<b><math>\sigma_{típica}</math> estimada</b>	1.28 x10 <sup>5</sup>	8.51 x10 <sup>3</sup>	2.10 x10 <sup>4</sup>	1.08 x10 <sup>5</sup>	1.32 x10 <sup>5</sup>	3.79 x10 <sup>4</sup>	2.70 x10 <sup>5</sup>
<b>Coefficiente de regresión</b>	0.9983	0.9958	0.9966	0.9961	0.9952	0.9795	0.9957
<b>LOD (Winerfordner y Long)</b>	2.09 mg L <sup>-1</sup>	0.38 mg L <sup>-1</sup>	0.66 mg L <sup>-1</sup>	0.42 µg L <sup>-1</sup>	0.46 µg L <sup>-1</sup>	0.98 µg L <sup>-1</sup>	0.79 µg L <sup>-1</sup>
<b>LOD (Clayton, <math>\alpha = \beta = 0.05</math>)</b>	4.46 mg L <sup>-1</sup>	0.69 mg L <sup>-1</sup>	1.25 mg L <sup>-1</sup>	0.86 µg L <sup>-1</sup>	0.94 µg L <sup>-1</sup>	1.89 µg L <sup>-1</sup>	1.63 µg L <sup>-1</sup>
<b>Sensib. analit1</b>	1.85	0.24	0.50	0.35	0.39	0.73	0.67

1. Según referencia 31

### VIII.3.3.2.- Repetitividad y seguridad del método

La repetitividad del método se estudió sobre 11 disoluciones independientes conteniendo en un volumen final de 25.0 mL los distintos analitos en concentraciones de: [CAR] = 8 µg L<sup>-1</sup>; [NEO] = 5 µg L<sup>-1</sup>; [XAN] = 10 µg L<sup>-1</sup>; [BIO] = 8 µg L<sup>-1</sup>; [CREA] = 52 mg L<sup>-1</sup>; [LV] = 6 mg L<sup>-1</sup> y [MTX] = 8 mg L<sup>-1</sup>.

Mediante la aplicación del cálculo estadístico a las áreas obtenidas a partir de los datos cromatográficos, se obtienen los parámetros que se muestran en la Tabla VIII.7.

*Tabla VIII.7 .- Parámetros estadísticos relacionados con los estudios de repetitividad y seguridad del método.*

	AREA*	S <sub>(n-1)</sub>	Intervalo de confianza	% Error
<b>CAR</b>	1.87x10 <sup>6</sup>	1.79x10 <sup>5</sup>	1.87x10 <sup>6</sup> ± 1.20x10 <sup>5</sup>	6.40
<b>NEO</b>	2.98x10 <sup>6</sup>	3.37x10 <sup>5</sup>	2.98x10 <sup>6</sup> ± 2.26x10 <sup>5</sup>	7.60
<b>XAN</b>	2.58x10 <sup>6</sup>	3.30x10 <sup>5</sup>	2.58x10 <sup>6</sup> ± 2.21x10 <sup>5</sup>	8.60
<b>BIO</b>	2.20x10 <sup>6</sup>	1.65x10 <sup>5</sup>	2.20x10 <sup>6</sup> ± 1.11x10 <sup>5</sup>	5.04
<b>CREA</b>	3.56x10 <sup>6</sup>	8.76x10 <sup>4</sup>	3.56x10 <sup>6</sup> ± 5.89x10 <sup>4</sup>	1.65
<b>LV</b>	1.45x10 <sup>5</sup>	1.50x10 <sup>4</sup>	1.45x10 <sup>5</sup> ± 1.00x10 <sup>4</sup>	6.97
<b>MTX</b>	2.89x10 <sup>5</sup>	3.26x10 <sup>4</sup>	2.89x10 <sup>5</sup> ± 2.19x10 <sup>4</sup>	7.57

(\*) Área media procedente de la suma de las medias proveniente de 3 inyecciones.

También se estudió la repetitividad del método preparando una única disolución conteniendo en un volumen final de 25.0 mL la mezcla de todos los analitos e inyectando 11 veces en el cromatógrafo. Así veremos la repetitividad relativa al sistema cromatográfico.

Los parámetros estadísticos obtenidos de esta experiencia se resumen en la siguiente Tabla VIII.8.

**Tabla VIII.8** .-Parámetros estadísticos obtenidos para los distintos analitos estudiados en un sistema cromatográfico

	AREA **	S <sub>(n-1)</sub>	Intervalo de confianza	% Error
<b>CAR</b>	2.40x10 <sup>6</sup>	9.79x10 <sup>4</sup>	2.40x10 <sup>6</sup> ± 6.58x10 <sup>4</sup>	2.74
<b>NEO</b>	3.04x10 <sup>6</sup>	1.30x10 <sup>5</sup>	3.04x10 <sup>6</sup> ± 8.74x10 <sup>4</sup>	2.87
<b>XAN</b>	3.31x10 <sup>6</sup>	3.61x10 <sup>5</sup>	3.31x10 <sup>6</sup> ± 2.43x10 <sup>5</sup>	7.33
<b>BIO</b>	2.07x10 <sup>6</sup>	7.01x10 <sup>4</sup>	2.07x10 <sup>6</sup> ± 4.71x10 <sup>4</sup>	2.28
<b>CREA</b>	3.57x10 <sup>6</sup>	1.33x10 <sup>5</sup>	3.57x10 <sup>6</sup> ± 8.94x10 <sup>4</sup>	2.50
<b>LV</b>	1.54x10 <sup>5</sup>	1.05x10 <sup>4</sup>	1.54x10 <sup>5</sup> ± 7.06x10 <sup>3</sup>	4.56
<b>MTX</b>	2.89x10 <sup>5</sup>	1.52x10 <sup>4</sup>	2.89x10 <sup>5</sup> ± 1.02x10 <sup>4</sup>	3.53

(\*\*) Area media de las 11 inyecciones

**VIII.3.4.- SEGUIMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LA OXIDACIÓN DE LV y MTX PARA ORIGINAR DERIVADOS FLUORESCENTES MEDIANTE EL MÉTODO TREHAN. DETECCIÓN FOTOMÉTRICA.**

Los estudios previos realizados sobre las características luminiscentes de LV y MTX ponen de manifiesto la posibilidad de generar derivados fluorescentes de ambos analitos previa oxidación de los mismos.

Por otra parte las pteridinas presentan una intensa fluorescencia nativa en disolución cuando se encuentran en su forma oxidada. En la bibliografía se encuentran descritos varios procedimientos para llevar a cabo dichas oxidaciones. El método de Trehan (32) con la utilización del sistema  $I_2/NaOH$ , ha sido previamente propuesto para llevar a cabo el análisis de pteridinas en muestras de orina humana, ya que estas son excretadas como mezcla de diversas formas de oxidación. Otros métodos también descritos en la bibliografía y aplicados por nosotros en la determinación cinético-fluorimétrica de MTX emplean permanganato en medio ligeramente ácido para llevar a cabo la oxidación (33).

En este apartado hemos estudiado la viabilidad del método de Trehan como método de oxidación, con objeto de generar los derivados fluorescentes del MTX y del LV y llevar a cabo la separación cromatográfica posterior de los mismos, en presencia de las pteridinas.

De esta manera se podrían determinar todos los analitos de interés midiendo sus propiedades fluorescentes y mejorando, previsiblemente por tanto sus límites de detección. Este estudio tiene por objeto alcanzar los límites de detección necesarios para la determinación conjunta de todos los analitos en fluidos biológicos, sobre todo en plasma donde es necesaria una mayor sensibilidad.

#### **VIII.3.4.1.- Estudio de la oxidación mediante el método de Trehan modificado y seguimiento fotométrico.**

Como hemos indicado antes, este procedimiento ha sido propuesto para la determinación de pteridinas en orina (30) y por ello este estudio lo comenzaremos analizando el comportamiento del MTX y LV en las condiciones previamente optimizadas para las pteridinas. En él se toma una alícuota de analito problema y se transfiere a un matraz de 25 mL en el cual se añade 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M y 30  $\mu\text{L}$  de una solución  $\text{I}_2 / \text{KI}$  (2 % / 4 %). La mezcla es mantenida en la oscuridad durante 40 minutos a 4 °C y después se enrasa a 25.0 mL con fase móvil (Tris-HCl 0.015 M, pH = 6.80 conteniendo NaCl  $10^{-3}$  M). De esta forma se consigue que las pteridinas excretadas se oxiden y como consecuencia originen derivados intensamente fluorescentes, ya que las hidropteridinas no son fluorescentes.

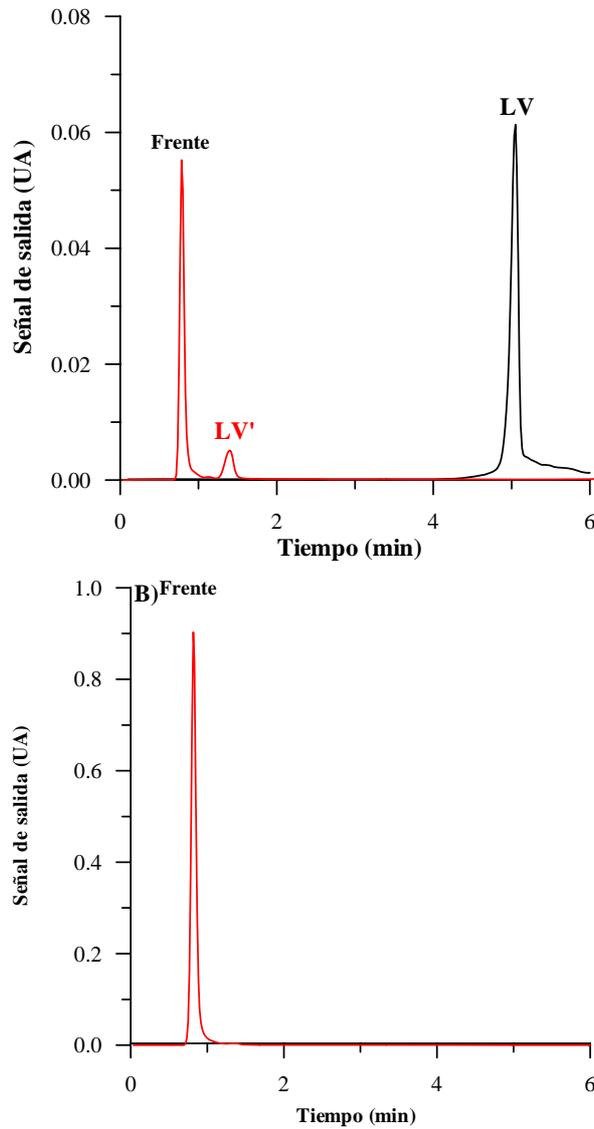
Este estudio lo comenzaremos analizando el comportamiento del LV y del MTX en estas condiciones. Para ello se realiza la oxidación de los dos analitos por separado, para identificar que picos cromatográficos corresponden a cada uno, y también de forma conjunta (LV + MTX), en las condiciones previamente descritas.

*VIII.3.4.1.1.- Estudios previos respecto a la oxidación del ácido folínico y del metotrexato según el procedimiento de Trehan*

Inicialmente se estudia de forma independiente cada uno de los analitos y una vez optimizadas las variables procederemos al estudio de la mezcla.

Para ello preparamos disoluciones que en un volumen de 25.0 mL contienen  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de LV y se oxidará añadiendo 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M y 30  $\mu\text{L}$  de una solución  $\text{I}_2 / \text{KI}$  (2 % / 4 %).

Los cromatogramas de disoluciones de LV sin oxidar y de LV oxidado, a las longitudes de onda de 230 y 280 nm se recogen en la Figura VIII.10A y 10B. Se comprueba, que en estas condiciones, el LV se oxida tal como se pone de manifiesto en la Figura VIII.10A donde se aprecia la desaparición del pico correspondiente al LV que sin oxidar aparecía a 5.2 min aproximadamente.



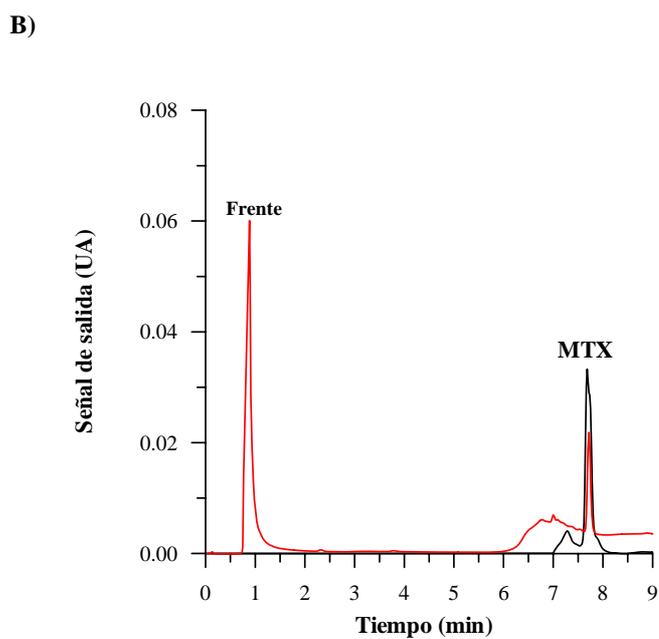
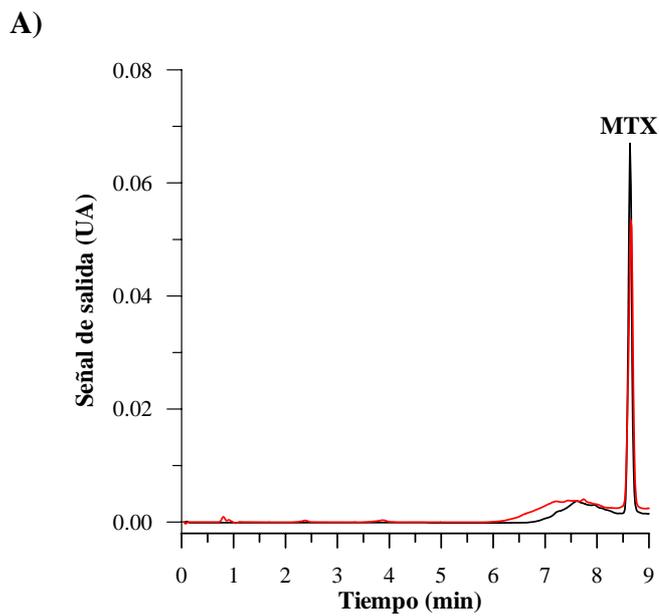
**Figura VIII.10** .- Cromatogramas correspondientes a una muestra conteniendo ácido folínico ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ )(—) y a la oxidación del ácido folínico (—), A)  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . B)  $\lambda = 230 \text{ nm}$

En los cromatogramas obtenidos a dos longitudes de onda, podemos observar que el pico correspondiente al LV que salía a un tiempo de 5.2 minutos, prácticamente desaparece al mismo tiempo que

aparecen dos nuevos picos, uno que eluye con el frente a 0.6 min y que se observa tanto a 230 como a 280 nm y un segundo pico, que solo se observa a 280 nm y que eluye a 1.4 min (LV').

Con objeto de asignar estos picos se registran los correspondientes espectros de pico y se comparan con los obtenidos mediante un espectrofotómetro, comprobándose la total similitud entre el espectro del pico del frente y el obtenido por la mezcla oxidante.

En cuanto a la oxidación del MTX, esta se lleva a cabo en las mismas condiciones y los cromatogramas de disoluciones de 6 mg L<sup>-1</sup> de MTX sin oxidar y oxidado a 280 y 230 nm respectivamente se recogen en la Figura VIII.11. En estas condiciones la oxidación del MTX no es tan drástica como en el caso de LV y solo se observa una oxidación parcial como se pone de manifiesto por la disminución del área de pico del MTX oxidado con respecto al MTX sin oxidar.



**Figura VIII.11.-** Cromatogramas del MTX ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) sin oxidar (—) y oxidado (—); A) 280 nm; B) 230 nm.

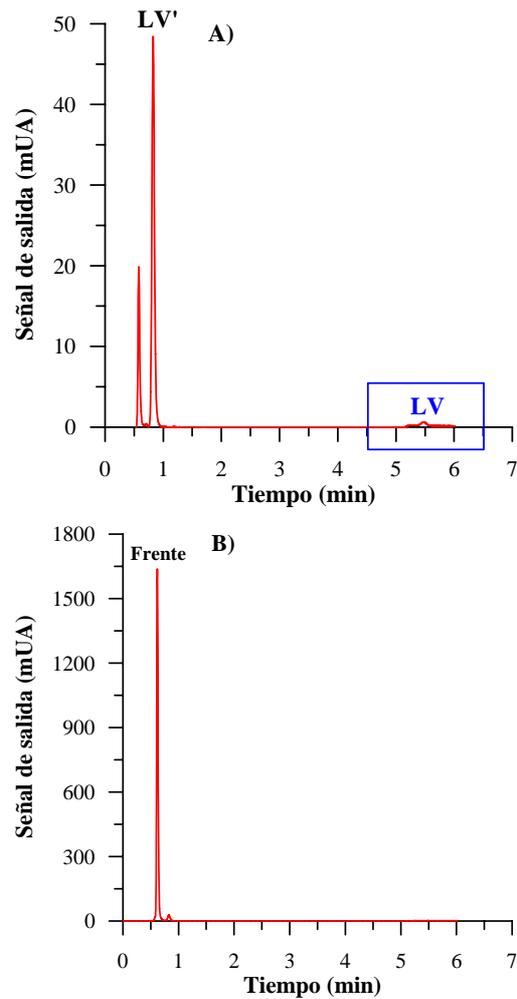
Una vez establecida la posibilidad de oxidación de LV y MTX con el método de Trehan, se procede a oxidar una mezcla de ambos analitos conjuntamente y a estudiar la influencia del tiempo de oxidación

#### **VIII.3.4.2.- Influencia del tiempo sobre la oxidación de LV y MTX**

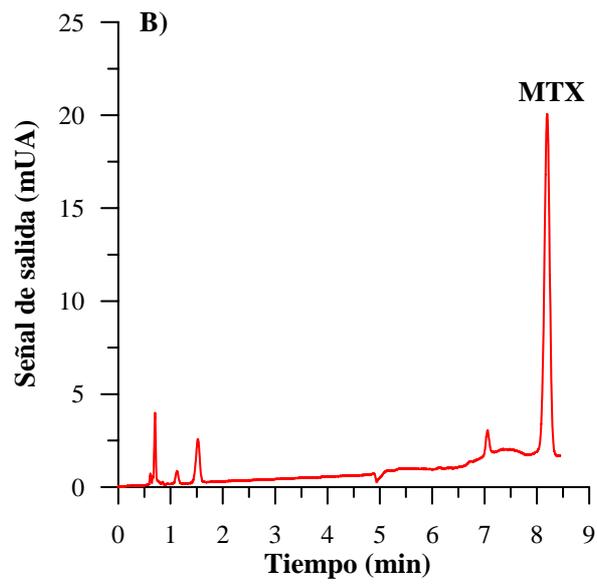
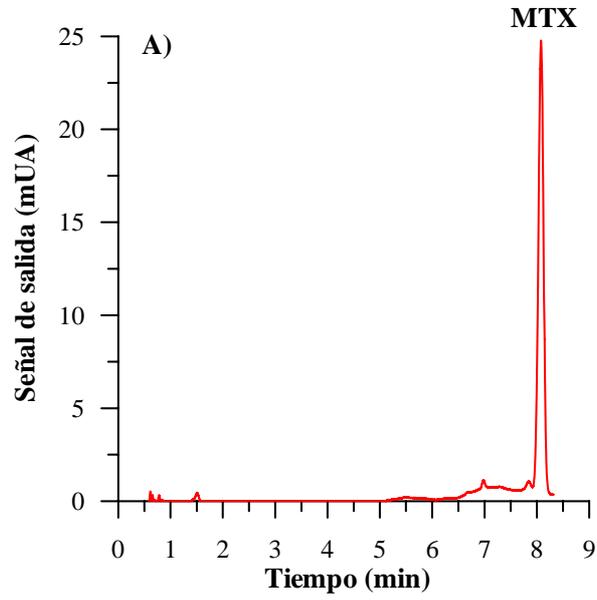
Con objeto de clarificar el comportamiento de ambos analitos en el proceso de oxidación, se procedió a realizar un seguimiento cromatográfico de la reacción de oxidación en función del tiempo. Para ello, se añade la mezcla de oxidante y se comienzan a realizar inyecciones en función del tiempo. En primer lugar para los analitos por separado y luego para la mezcla de ambos analitos.

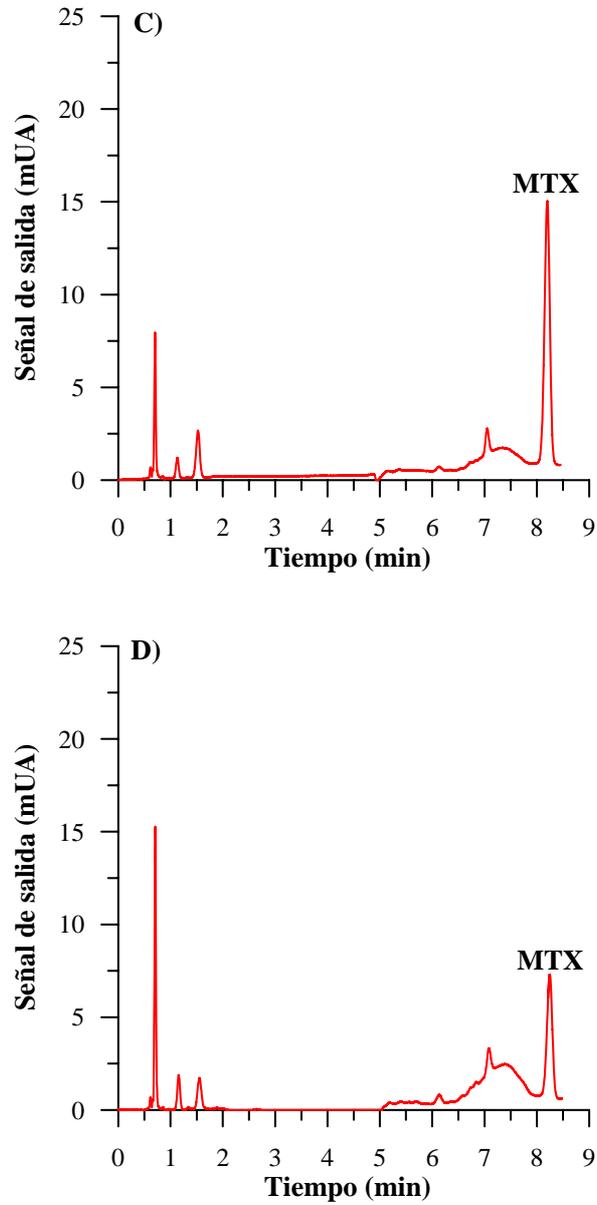
Para el estudio de la oxidación del LV tomamos una alícuota conteniendo una concentración final de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  y se añade la mezcla oxidante,  $30 \text{ }\mu\text{L NaOH 2M}$  /  $30 \text{ }\mu\text{L (I}_2 \text{ / KI) (2:4)}$ . Seguidamente enrasamos con fase móvil Tris-HCl  $0.015 \text{ M}$  conteniendo  $\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$ , pH 6.80 hasta  $25.0 \text{ mL}$  e inyectamos la muestra en el equipo cromatográfico cada 15 minutos. En la Figura VIII.12, se muestran los cromatogramas correspondientes a la oxidación al cabo de los primeros 15 minutos y tal como se observa ya ha tenido lugar la oxidación prácticamente completa del leucovorín.

Cuando se realiza la misma experiencia con MTX, se observa como la señal del MTX va disminuyendo con el tiempo de oxidación. Es decir, el MTX presenta una menor velocidad de oxidación que el LV (Figura VIII.13).



**Figura VIII.12.-** Cromatogramas correspondientes a la oxidación de LV : A) 280 y B) 230 nm.

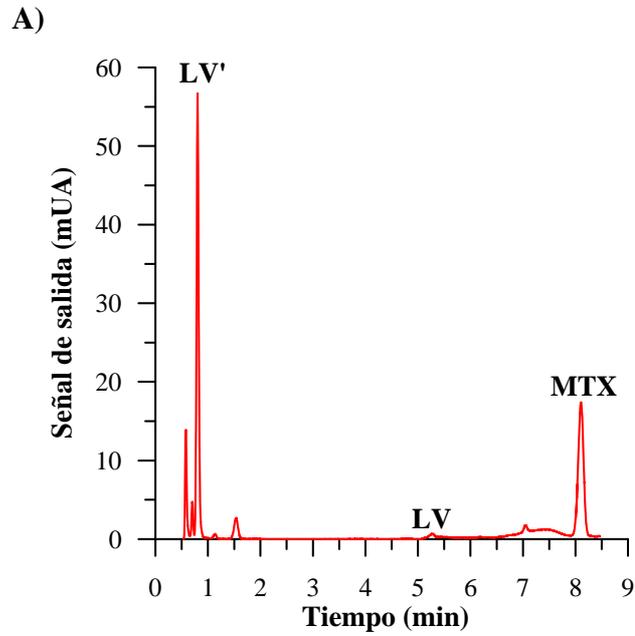


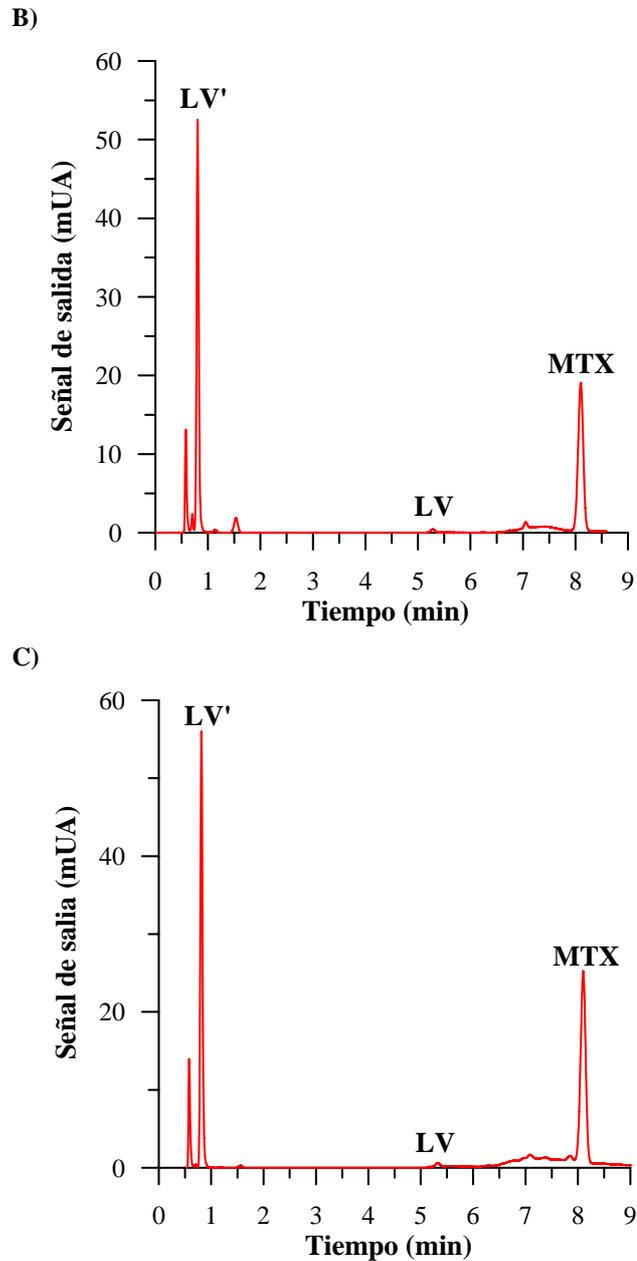


**Figura VIII.13** .- Cromatogramas correspondientes a la oxidación de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de MTX: A) 15 minutos; B) 30 minutos; C) 45 minutos; D) 60 minutos.

Una vez hemos hecho la oxidación de los analitos por separado, se realiza de forma conjunta. Así se obtienen los cromatogramas que se muestran en la

Figura VIII.14, los cuales muestran sucesivas inyecciones de una misma reacción de oxidación. Se comprueba un comportamiento similar al descrito anteriormente de forma individual, aunque la evolución del MTX resulta aún más lenta, no observándose variaciones apreciables en la señal correspondiente al LV oxidado.





**Figura VIII.14** .- Cromatogramas en función del tiempo de oxidación: A) 15 minutos; B) 30 minutos; C) 45 minutos.  $\lambda = 280 \text{ nm}$

Se comprobaron distintas proporciones de agente oxidante, no observándose variaciones apreciables en el comportamiento de ambos analitos.

#### **VIII.4.- ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE LA SEPARACIÓN DE LV Y MTX EN PRESENCIA DE PTERIDINAS MEDIANTE EL MÉTODO DE TREHAN, UTILIZANDO DOS DETECTORES EN SERIE FOTOMÉTRICO-FLUORIMÉTRICO.**

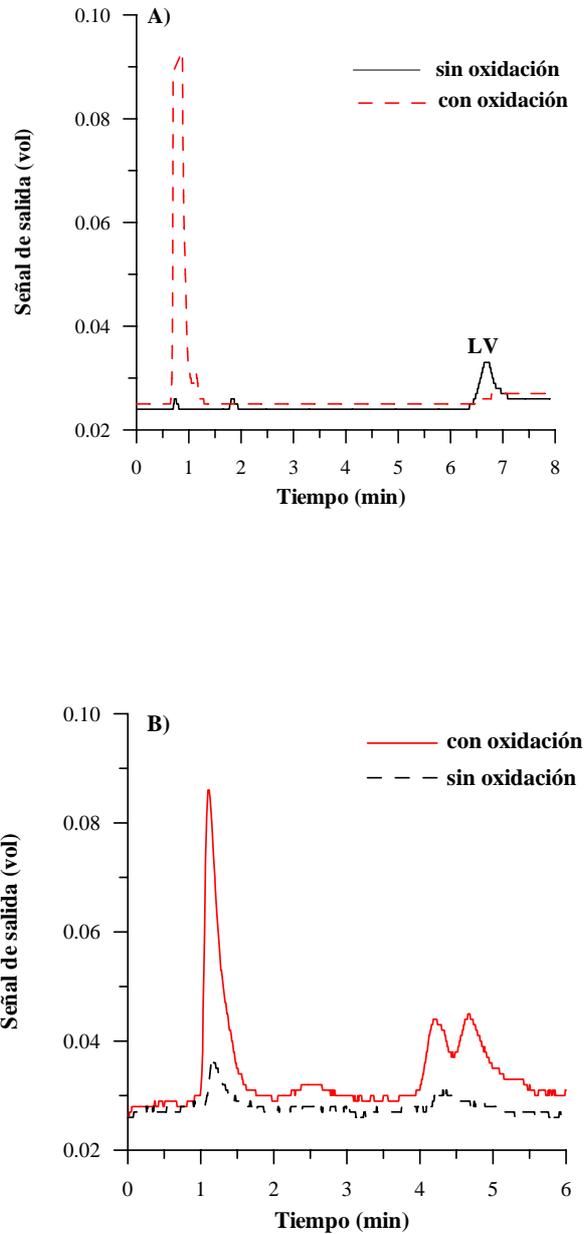
Una vez establecida la posibilidad de realizar la oxidación de LV y MTX utilizando el procedimiento de Trehan, y teniendo en cuenta que los derivados formados presentan propiedades fluorescentes se ha procedido a estudiar las características de los mismos en el sistema cromatográfico, utilizando dos detectores en serie, primero uno fotométrico seguido de uno fluorescente. El objeto último de este estudio es la determinación de todos los analitos de interés mediante el detector fluorimétrico, excepto la creatinina, que dada su elevada concentración se determina adecuadamente mediante fotometría.

En una primera experiencia se preparan muestras conteniendo:

- 6 mg L<sup>-1</sup> de LV y MTX.
- 0.03 ml NaOH 2M
- 0.03 ml de disolución I<sub>2</sub> / KI (2% / 4%)
- Mantenemos la mezcla en la oscuridad durante 40 min a 4 °C
- Enrasar hasta 25.0 mL con fase móvil Tris-HCl-NaCl, pH = 6.60

Se registran cromatogramas en las condiciones instrumentales optimizadas anteriormente para los detectores fotométricos ( $\lambda = 230$  nm) y fluorimétrico ( $\lambda_{exc} = 280$  nm;  $\lambda_{em} = 444$  nm) y mediante una elución en gradiente con una fase móvil de  $[Tris] = 0.015$  M,  $[NaCl] = 10^{-3}$  M y un pH de 6.60.

En la Figura VIII.15 podemos observar el cromatograma correspondiente al ácido folínico con detección fotométrica A) y fluorimétrica B), oxidado y sin oxidar.

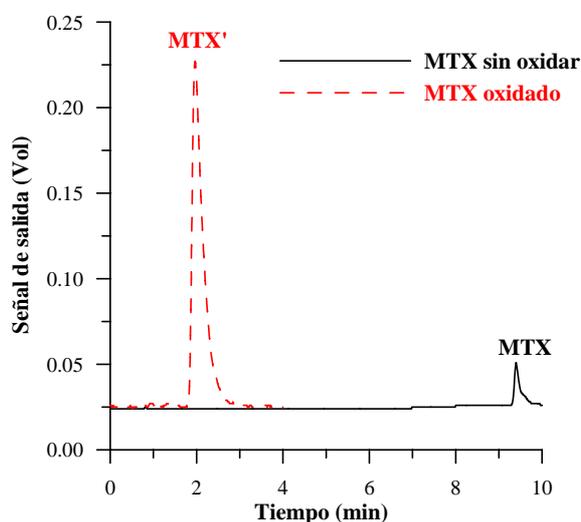


**Figura VIII.15 .-** Cromatogramas de una disolución de LV sin oxidar y otra oxidada. Seguimiento fotométrico A) y fluorimétrico B).

Se puede observar la aparición de un pico de notable intensidad a tiempos próximos 1.4 minutos y de

dos picos situados a tiempos de retención entre 4 y 5 minutos correspondientes a la muestra oxidada cuando se realiza el seguimiento fluorimétrico.

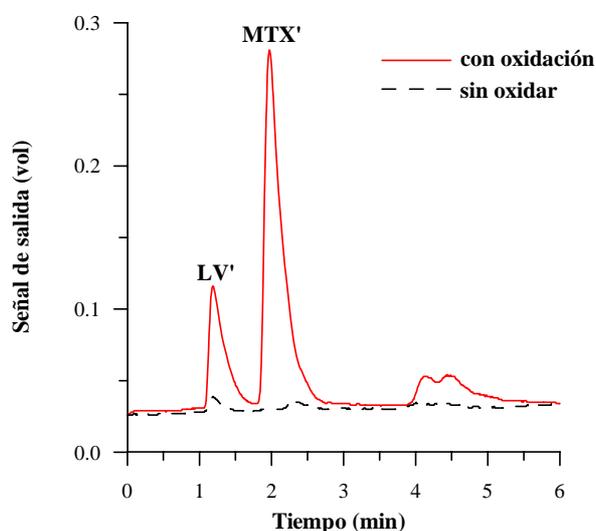
En el caso del metotrexato, en la Figura VIII.16 se muestra al igual que en el caso anterior, el cromatograma correspondiente a una disolución del mismo sin oxidar y oxidada, con detección fluorimétrica.



**Figura VIII.16** .- Cromatogramas obtenidos para una disolución de MTX previamente oxidada y sin oxidar con detección fluorimétrica.

Aparece en el cromatograma correspondiente al seguimiento fluorimétrico un nuevo pico situado a aproximadamente 2 minutos cuando el MTX se ha sometido a oxidación, observándose también el pico correspondiente al MTX sin oxidar.

En la siguiente Figura VIII.17 tenemos los cromatogramas correspondientes a disoluciones de ambos analitos oxidadas y sin oxidar con detección fluorimétrica. Podemos ver el pico derivado del metotrexato, MTX', y otro pico derivado del ácido folínico, LV'.



**Figura VIII.17.-** Cromatogramas correspondientes a muestras con y sin oxidación con detección fluorescente.

Una vez comprobada la viabilidad de la oxidación de LV y MTX, y su posterior separación cromatográfica, se procede a optimizar la resolución de todos los analitos de interés, es decir LV y MTX, así como las pteridinas marcadoras, en presencia de creatinina.

Para ello preparamos disoluciones que en un volumen de 25.0 mL contienen  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  de CAR,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  de NEO,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de XAN y  $4.8 \mu\text{g L}^{-1}$  de BIO, y se añade fase móvil hasta enrase (Tris-HCl-NaCl, pH = 6.60). Esta muestra, sin oxidar, es la que inicialmente utilizamos para comprobar la separación entre los analitos.

Los primeros cromatogramas que registramos utilizando el gradiente previamente seleccionado, no permitía una buena resolución de las pteridinas, sobre todo en el caso concreto de CAR y NEO que salían prácticamente superpuestos. Esto nos llevó a modificar el gradiente y los mejores resultados se obtenían cuando se modificaba tanto el flujo de fase móvil como la composición de la misma, mediante la adición de cantidades variables de modificador orgánico, ACN. En la Tabla VIII.9 se muestra el gradiente de fase móvil establecido como óptimo para llevar a cabo la separación. Como se puede comprobar y con objeto de favorecer la separación entre CAR y NEO, inicialmente se introduce una fase móvil compuesta al 100 % de TRIS a pH= 6.50, para posteriormente cambiar a 100% de TRIS a pH = 6.60. Posteriormente, a partir de un tiempo de 5 min introducimos ACN para la elución de los componentes menos polares.

**Tabla VIII.9** .- Composición y gradiente de fase móvil optimizado para la resolución de la mezcla problema.

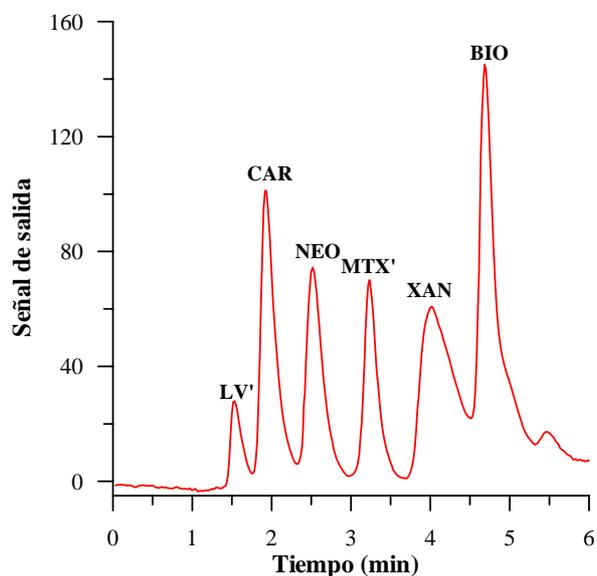
$$V_{\text{flujo}} = 1.2 \text{ mL min}^{-1}$$

Tiempo (min)	%TRIS, pH = 6.50	%TRIS, pH = 6.60	% ACN
0	100	0	
1.5			
1.6	0	100	0
4.0			
5.0			
6.0	0	88	12

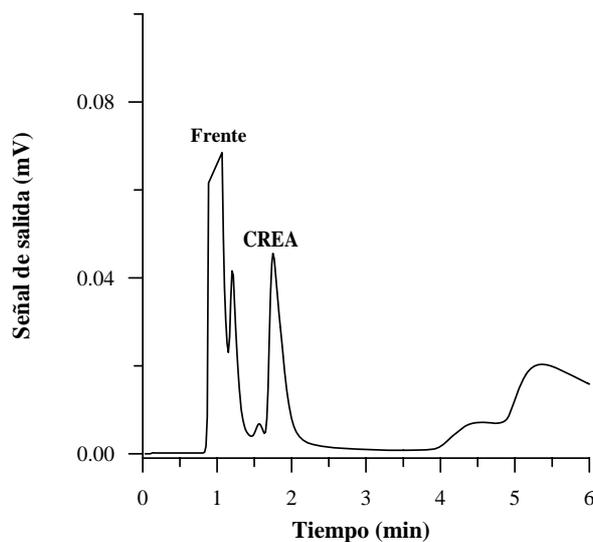
A continuación preparamos disoluciones que en un volumen final de 25.0 mL contienen  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  de CAR,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  de NEO,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de XAN,  $4.8 \mu\text{g L}^{-1}$  de BIO,  $3 \text{ mg L}^{-1}$  LV,  $0.9 \text{ mg L}^{-1}$  de MTX y  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de CREA (uno de la recta de calibración), se añade 0.03 mL NaOH 2 M, 0.03 mL de disolución  $\text{I}_2 / \text{KI}$  (2% / 4%) y esta disolución se mantiene en la oscuridad durante 40 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finalmente se añade fase móvil hasta enrase (Tris-HCl-NaCl, pH = 6.60). A esta disolución oxidada se le registra su cromatograma y este se muestra en la Figura VIII.18 y en la Figura VIII.19 se muestra el cromatograma obtenido mediante detección fotométrica a 230 nm donde se observa el pico correspondiente a la creatinina que aparece a un tiempo de 1.75 minutos.

Las señales de las pteridinas presentes no se ven afectadas por el proceso de oxidación, necesario para

generar los derivados fluorescentes del MTX y del LV. Hay que recordar, llegados a este punto que dicha oxidación además de para lo mencionado anteriormente, se aplicará a las muestras de fluidos biológicos para poner todas las pteridinas excretadas en su forma de máxima oxidación, que es la que estamos usando como patrón, y la que presenta el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia.



**Figura VIII.18** .- Cromatograma correspondiente a la mezcla de:  $[LV] = 3 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[CAR] = 4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[NEO] = 2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[MTX] = 0.9 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[XAN] = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[BIO] = 4.8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y  $[CREA] = 10 \text{ mg L}^{-1}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 444 \text{ nm}$



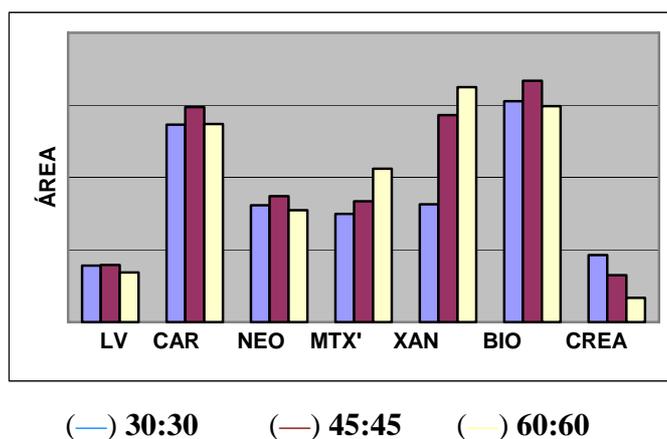
**Figura VIII.19.-** Cromatograma obtenido con detección fotométrica de la mezcla:  $[CREA] = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[LV] = 3 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[CAR] = 4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[NEO] = 2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[MTX] = 0.9 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[XAN] = 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[BIO] = 4.8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .  $\lambda = 230 \text{ nm}$

#### VIII.4.1.- Influencia de la mezcla de oxidante

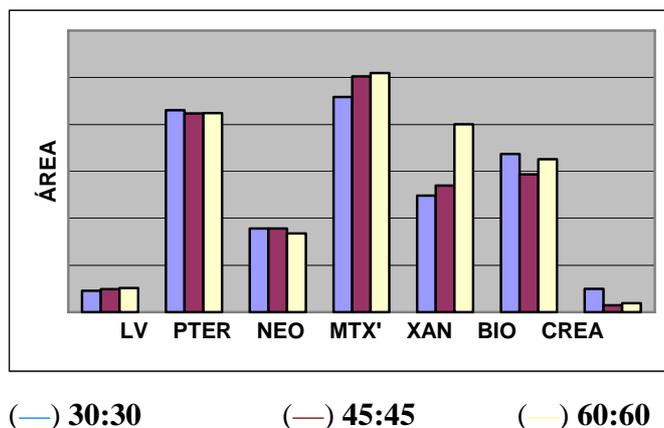
Teniendo en cuenta que la cantidad de mezcla oxidante empleada hasta ahora, ha sido la optimizada en estudios anteriores solo para las pteridinas (30), se ha estudiado la influencia de su concentración con objeto de conseguir la máxima sensibilidad en el proceso de oxidación, cuando tenemos pteridinas en presencia de LV, MTX y CREA.

Registraremos cromatogramas de la oxidación de la mezcla de analitos con tres cantidades distintas de agente oxidante, 30  $\mu\text{l}$  NaOH 2M / 30  $\mu\text{l}$  I<sub>2</sub>/KI , 45  $\mu\text{l}$

NaOH 2M / 45  $\mu$ l I<sub>2</sub>/KI y 60  $\mu$ l NaOH 2M / 60  $\mu$ l I<sub>2</sub>/KI.  
 En las Figuras VIII.20 y VIII.21 se muestra como los valores de áreas de pico fueron comparables en todos los casos, excepto en MTX' y XAN los cuales aumentan su señal con el aumento de mezcla oxidante.



**Figura VIII.20** .- Influencia de la mezcla de oxidante en el área de los distintos analitos para una concentración de: [LV] = 3 mg L<sup>-1</sup>; [CAR] = 3  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; [NEO] = 2  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; [MTX] = 0.9 mg L<sup>-1</sup>; [XAN] = 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; [BIO] = 4  $\mu$ g L<sup>-1</sup>; [CREA] = 10 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura VIII.21** .- Influencia de la mezcla de oxidante en el área de los distintos analitos para una concentración de:  $[LV] = 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[CAR] = 2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[NEO] = 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[MTX] = 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[XAN] = 5 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[BIO] = 2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[CREA] = 5.2 \text{ mg L}^{-1}$ .

Observamos que el área correspondiente al pico de la creatinina disminuye a medida que aumenta la concentración de mezcla oxidante y además esta disminución es más considerable cuanto menor es la concentración de creatinina. Teniendo en cuenta el comportamiento de este analito y que el aumento que se observa en las áreas del metotrexato oxidado y del xantopterin no son excesivas, elegimos para posteriores experiencias una cantidad de agente oxidante de 30  $\mu\text{l}$  NaOH 2M / 30  $\mu\text{l}$  I<sub>2</sub>/KI.

**VIII.4.2.- Parámetros cromatográficos**

Los parámetros cromatográficos se han calculado sobre el cromatograma mostrado en la Figura VIII.18 y se resumen en la Tabla VIII.10.

*Tabla VIII.10 .- Parámetros cromatográficos.*

	frente	LV'	CAR	NEO	MTX'	XAN	BIO
$t_R$ (min)	0.96	1.52	1.91	2.50	3.22	4.00	4.67
$k'$	---	0.58	0.99	1.60	2.35	3.16	3.86
$\forall$	---	1.70	1.62	1.62	1.47	1.34	1.22
$R_s$	---	1.32	1.63	2.00	1.31	1.15	

Tal como se observa en la Tabla VIII.10 la resolución es superior a 1 para todos los picos y el factor de capacidad se puede considerar muy adecuado para la resolución de los analitos.

#### VIII.4.3.- Rectas de calibrado y parámetros estadísticos y analíticos de interés

Se establecen las rectas de calibrado de cada uno de los siguientes intervalos de concentración: [LV] = 0.25 - 3 mg L<sup>-1</sup>; [CAR] = 0.2 - 3 µg L<sup>-1</sup>; [NEO] = 0.12 - 2 µg L<sup>-1</sup>; [MTX] = 0.05 - 0.9 mg L<sup>-1</sup>; [XAN] = 0.8 - 14.4 µg L<sup>-1</sup>; [BIO] = 0.2 - 6 µg L<sup>-1</sup>; [CREA] = 1 - 80 mg L<sup>-1</sup>.

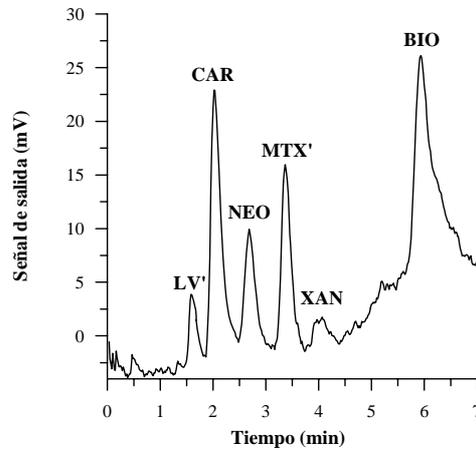
Para ello se prepararon disoluciones, por triplicado, que en un volumen final de 25.0 mL contenían cantidades variables de todos los analitos dentro de los intervalos de concentración mencionados y se sometieron al proceso de oxidación según Trehan, añadiendo 30 µl de NaOH 2M y 30 µl I<sub>2</sub>/KI. Las muestras se mantenían a 4 °C y en la oscuridad durante 40 min al cabo de los cuales se enrasan con fase móvil, se filtran a través de un filtro de nylon y se inyectan en el equipo cromatográfico. La elución se realiza utilizando el gradiente de fase móvil descrito previamente y los cromatogramas se obtienen simultáneamente por los dos detectores para determinar la creatinina fotométricamente y el resto de los analitos mediante fluorescencia.

En los cromatogramas de las Figuras VIII.22 y VIII.23, podemos observar a modo de ejemplo, la buena resolución de los picos para diferentes niveles de concentración de los analitos y en la Figura VIII.24 se muestra la linealidad existente entre la concentración de

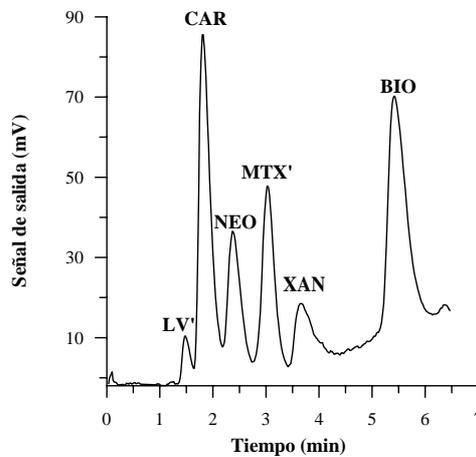
los analitos y la señal de salida en el detector expresadas como áreas y alturas de pico.

En las Tablas VIII.11 y VIII.12 se recogen los parámetros estadísticos para los siete analitos correspondientes al estudio de la influencia de la concentración sobre la señal analítica, área o altura.

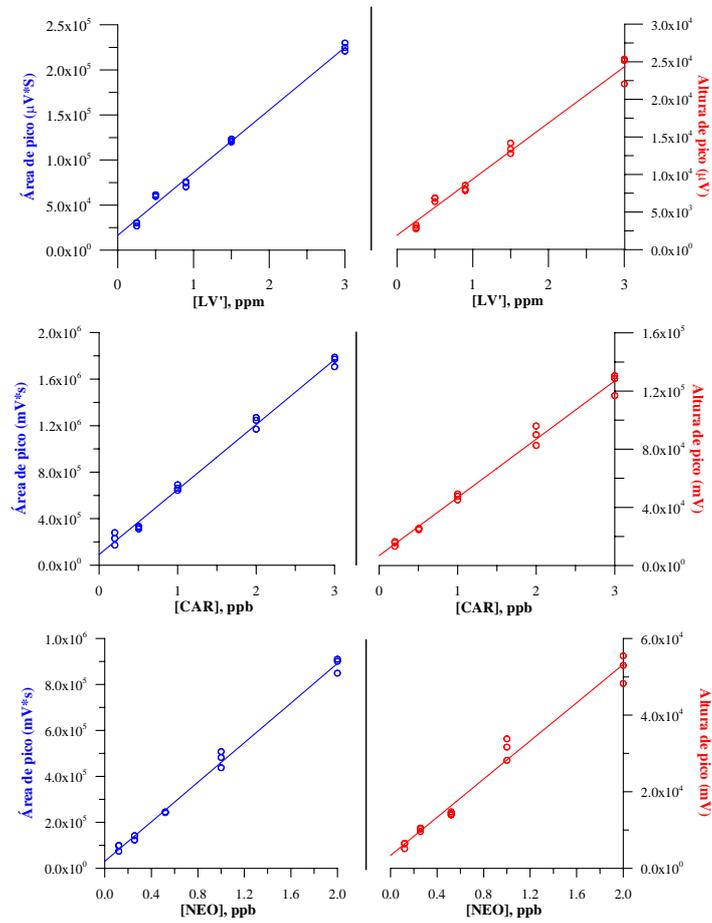
La sensibilidad analítica se calcula como el cociente entre la desviación típica de la regresión y la pendiente de la curva de calibración (31). Asimismo se encuentran tabulados los valores obtenidos para los límites de detección, calculados mediante los métodos de Long y Winefordner (34) y el de Clayton y col. (35), considerando una probabilidad de falso positivo y de falso negativo de 0.05.



**Figura VIII.22.-** Cromatograma obtenido con detección fluorimétrica para una concentración de analitos de:  $[LV] = 0.50 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[CAR] = 0.50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[NEO] = 0.25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[MTX] = 0.10 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[XAN] = 1.20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[BIO] = 0.50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$



**Figura VIII.23.-** Cromatograma obtenido con detección fluorimétrica para una concentración de analitos de:  $[LV] = 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[CAR] = 2.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[NEO] = 1.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[MTX] = 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $[XAN] = 5.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[BIO] = 2.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$



**Figura VIII.24 .-** Influencia de la concentración de los distintos componentes sobre el área de pico y la altura.

Capítulo VIII.- Estudios cromatográficos

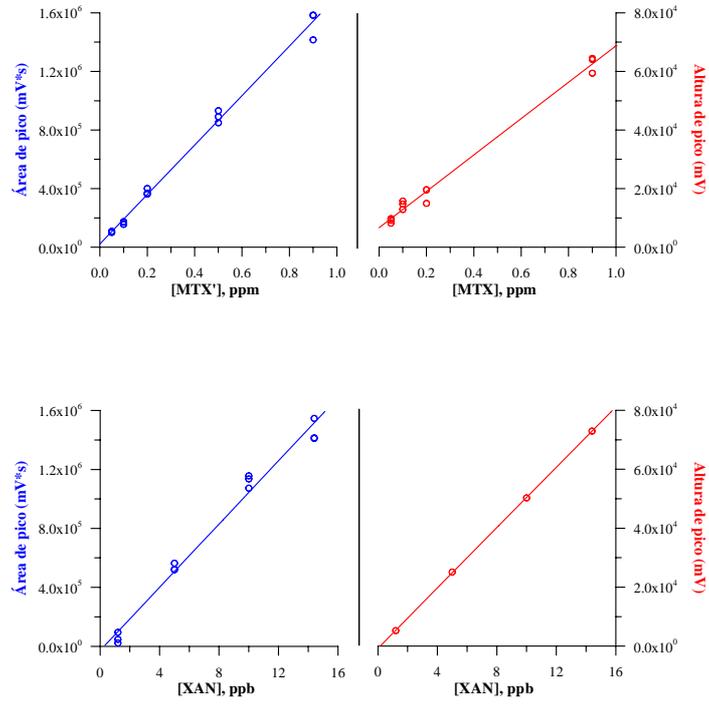


Figura VIII.24.- Continuación

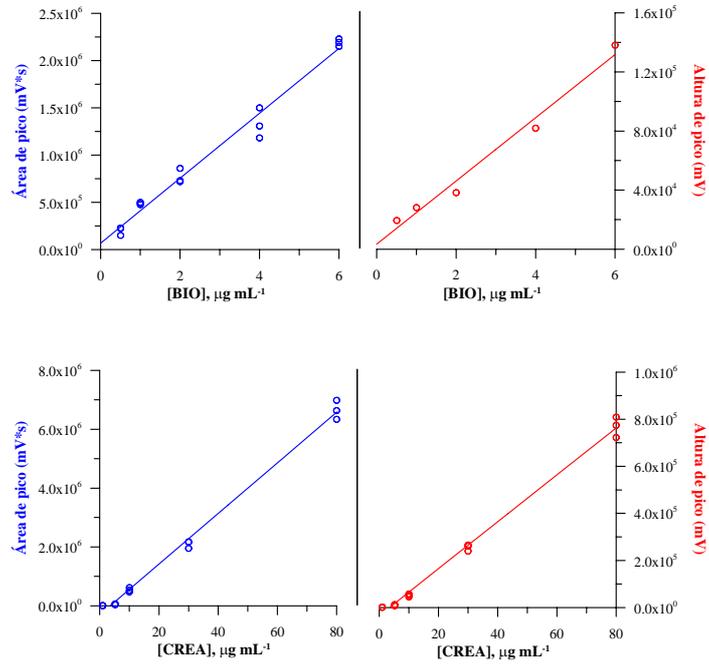


Figura VIII.24.- Continuación

**Tabla VIII.11.-** Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración lineal univariante en la determinación cromatográfica de los distintos analitos con detección fluorescente (Área de pico)

	LV	CAR	NEO	MTX	XAN	BIO	CREA
Intervalo de concentración	0.25 - 3.0 mg L <sup>-1</sup>	0.2 - 5.0 µg L <sup>-1</sup>	0.12 - 5.0 µg L <sup>-1</sup>	0.05 - 1.5 mg L <sup>-1</sup>	0.8 - 14.4 µg L <sup>-1</sup>	0.2 - 6.0 µg L <sup>-1</sup>	1.0 - 80.0 mg L <sup>-1</sup>
Pendiente	6.95x10 <sup>4</sup>	5.58x10 <sup>5</sup>	4.31x10 <sup>5</sup>	1.68x10 <sup>6</sup>	1.07x10 <sup>5</sup>	3.43x10 <sup>5</sup>	8.59x10 <sup>4</sup>
Ordenada en el origen	1.66x10 <sup>4</sup>	9.15x10 <sup>4</sup>	2.99x10 <sup>4</sup>	2.25x10 <sup>4</sup>	-2.87x10 <sup>4</sup>	6.86x10 <sup>4</sup>	-3.00x10 <sup>5</sup>
σ <sub>pendiente</sub>	1.64x10 <sup>3</sup>	1.16x10 <sup>4</sup>	8.81x10 <sup>3</sup>	3.82x10 <sup>4</sup>	4.35x10 <sup>3</sup>	1.33x10 <sup>4</sup>	1.81x10 <sup>3</sup>
σ <sub>ordenada</sub>	2.58x10 <sup>3</sup>	1.95x10 <sup>4</sup>	9.11x10 <sup>3</sup>	1.80x10 <sup>4</sup>	3.97x10 <sup>4</sup>	4.51x10 <sup>4</sup>	6.97x10 <sup>4</sup>
σ <sub>típica estimada</sub>	6.24x10 <sup>3</sup>	4.61x10 <sup>4</sup>	2.32x10 <sup>4</sup>	4.67x10 <sup>4</sup>	7.52x10 <sup>4</sup>	1.05x10 <sup>5</sup>	2.04x10 <sup>5</sup>
Coefficiente de regresión	0.9964	0.9972	0.9973	0.9967	0.9919	0.9904	0.9971
LOD (Long y Winerford)	0.11	0.10	0.06	0.03	1.11	0.39	2.44
LOD (Clayton y col.)	0.22	0.20	0.13	0.07	1.94	0.77	5.54
Sensib. anal.	0.09	0.08	0.05	0.03	0.70	0.31	2.37

**Tabla VIII.12.-** Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración lineal univariante en la determinación cromatográfica de los distintos analitos con detección fluorescente (Altura de pico)

	LV	CAR	NEO	MTX	XAN	BIO	CREA
<b>Intervalo de concentración</b>	<b>0.25 - 3.0 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.2 - 5.0 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.12 - 5.0 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.05 - 1.5 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.8 - 14.4 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>0.2 - 6.0 µg L<sup>-1</sup></b>	<b>1.0 - 80.0 mg L<sup>-1</sup></b>
<b>Pendiente</b>	7.48x10 <sup>3</sup>	4.00x10 <sup>4</sup>	2.49x10 <sup>4</sup>	6.21x10 <sup>4</sup>	5.11x10 <sup>3</sup>	2.14x10 <sup>4</sup>	9.81x10 <sup>3</sup>
<b>Ordenada en el origen</b>	1.89x10 <sup>3</sup>	6.84x10 <sup>3</sup>	3.36x10 <sup>3</sup>	6.64x10 <sup>3</sup>	-7.18x10 <sup>2</sup>	3.40x10 <sup>3</sup>	-3.24x10 <sup>4</sup>
<b>σ<sub>pendiente</sub></b>	2.80x10 <sup>2</sup>	1.10x10 <sup>3</sup>	9.79x10 <sup>2</sup>	1.83x10 <sup>3</sup>	2.41x10 <sup>1</sup>	1.75x10 <sup>3</sup>	1.72x10 <sup>2</sup>
<b>σ<sub>ordenada</sub></b>	4.41x10 <sup>2</sup>	1.87x10 <sup>3</sup>	1.01x10 <sup>3</sup>	8.52x10 <sup>2</sup>	2.21x10 <sup>2</sup>	5.97x10 <sup>3</sup>	6.64x10 <sup>3</sup>
<b>σ<sub>típica estimada</sub></b>	1.06x10 <sup>3</sup>	4.41x10 <sup>3</sup>	2.58x10 <sup>3</sup>	2.18x10 <sup>3</sup>	2.41x10 <sup>2</sup>	7.99x10 <sup>3</sup>	1.94x10 <sup>4</sup>
<b>Coefficiente de regresión</b>	0.9910	0.9951	0.9901	0.9957	0.9999	0.9901	0.9980
<b>LOD (Long y Winerford)</b>	0.18	0.14	0.12	0.04	0.13	0.83	2.04
<b>LOD (Clayton y col.)</b>	0.35	0.27	0.25	0.08	0.28	1.56	4.62
<b>Sensib. anal.</b>	0.14	0.11	0.10	0.03	0.05	0.37	1.98

#### VIII.4.4.- Repetitividad y seguridad del método

La reproducibilidad del método se estudió sobre 9 disoluciones independientes en las que en un volumen final de 25.0 ml contenían 1.5 mg L<sup>-1</sup> de LV, 2 µg L<sup>-1</sup> de CAR, 1 µg L<sup>-1</sup> de NEO, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de MTX, 5 µg L<sup>-1</sup> de XAN, 2 µg L<sup>-1</sup> de BIO y 5.2 mg L<sup>-1</sup> de CREA. Se somete cada disolución a la reacción de oxidación según Trehan y se inyecta en el sistema cromatográfico.

Aplicando el cálculo estadístico, encontramos los parámetros que se muestran en la Tabla VIII.13.

*Tabla VIII.13.- Parámetros estadísticos*

		Valor medio (x)	$\sigma_{n-1}$	% Error
LV'	Área	98974.55	16927.43	12.80
	Altura	12092.33	1557.45	9.70
CAR	Área	1175892.44	47937.67	3.07
	Altura	85478.67	5365.80	4.73
NEO	Área	431670.56	26422.10	4.61
	Altura	30151.89	1896.25	4.74
MTX'	Área	701022.56	34779.13	3.73
	Altura	47053.11	5225.86	8.37
XAN	Área	453889.44	75516.53	12.50
	Altura	2006656	4491.65	16.86
BIO	Área	115189367	98906.78	6.47
	Altura	74805.56	6789.15	6.84
CREA	Área	140425.78	14109.39	7.57
	Altura	12957.89	1590.88	9.25

En general, se obtienen los mejores resultados cuando se utiliza como señal analítica el área de pico, siendo el error muy aceptable para todas las pteridinas exceptuando el xantopterín que es el que presenta un porcentaje de error más elevado.

### **VIII.5.- APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE ORINA**

Con objeto de estudiar la viabilidad del análisis de los compuestos en estudio, tanto las pteridinas naturalmente presentes en fluidos biológicos y consideradas como marcadores, como la presencia de LV y MTX administrados en los tratamientos antineoplásicos, se procedió a establecer las condiciones óptimas de la oxidación y posterior determinación de estos compuestos en orina.

Para ver como influye el fondo de la orina, en primer lugar, diferentes cantidades de orina, 100 y 300  $\mu\text{L}$  fortificadas con LV y MTX, se sometieron al proceso de oxidación según el método de Trehan propuesto.

Cuando se emplean 300  $\mu\text{L}$  de orina, comprobamos que se producían solapamientos entre los picos correspondientes a los analitos y otras especies presentes en el fondo de la orina. Sin embargo, cuando utilizamos menor cantidad orina, 200 ó 100  $\mu\text{L}$ , se observaba una mejor resolución. En estas condiciones se observa el pico correspondiente al LV oxidado pero sin embargo no aparece el pico correspondiente a la oxidación del MTX, probablemente debido a que la orina consume mezcla oxidante en reacciones secundarias de oxidación. Esto limitaría la velocidad de oxidación del MTX, llegando incluso a evitar dicha oxidación. Se hicieron ensayos con mayor cantidad de

agente oxidante pero en ningún caso se consiguió una oxidación parcial del MTX.

Otra posibilidad vista fue realizar la determinación de MTX sin oxidar introduciendo un pequeño porcentaje de ACN en el gradiente de la fase móvil pero en este caso se eluían numerosos compuestos de la orina interfiriendo en su determinación. Estos problemas nos han llevado a abordar solamente la determinación de ácido folínico, en presencia de las pteridinas, en muestras de orina.

#### **VIII.5.1.- Procedimiento para la determinación de LV y pteridinas previa oxidación según Trehan en muestras de orina**

En las condiciones establecidas, se oxidan 100  $\mu\text{L}$  de orina con 30  $\mu\text{L}$   $\text{I}_2/\text{KI}$  y 30  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  2 M, en la oscuridad, a 4  $^\circ\text{C}$  y durante 40 minutos. Se añade tris-HCl hasta completar el volumen y las muestras filtradas a través de un filtro de nylon, se inyectan en el equipo, registrándose los cromatogramas con los dos detectores en serie, fotométrico y fluorimétrico. De igual manera se preparan muestras de orina contaminadas con los analitos en estudio y se someten a idéntico proceso.

A partir de muestras contaminadas con diferentes cantidades de LV se calcularon los valores de recuperación para LV, así como las cantidades de las

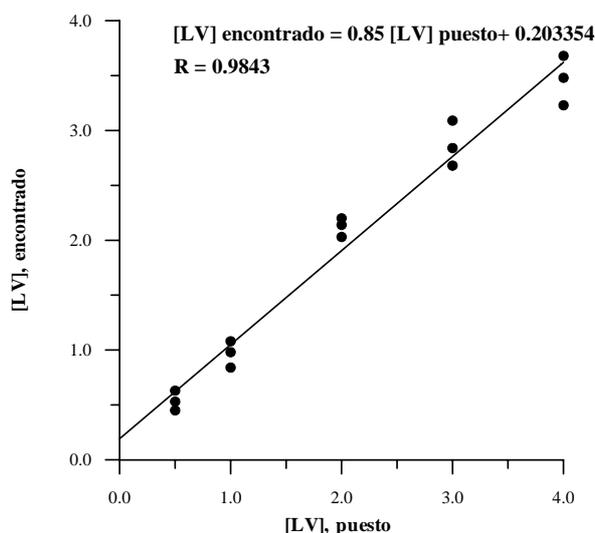
pteridinas presentes, comparando las cantidades obtenidas en presencia y en ausencia de LV.

Los valores de recuperación obtenidos para el ácido folínico se resumen en la Tabla VIII.14, en la que vemos que los porcentajes son aceptables teniendo en cuenta la complejidad del proceso de oxidación previo. Dichos valores oscilan, para una media de los tres valores obtenidos por cada concentración, entre un 86 y un 107 % de recuperación.

**Tabla VIII.14** .- Valores de recuperación obtenidos para diferentes concentraciones de ácido folínico.

Añadido		Encontrado		
[Folínico], Mg L <sup>-1</sup>	Área	[Folínico] mg L <sup>-1</sup>	% Recuperación	% Rec. medio
0.5	28695	0.53	106	<b>107</b>
		0.63	126	
		0.45	89	
1.0	37054	1.08	108	<b>97</b>
		0.98	98	
		0.84	84	
2.0	54937	2.20	110	<b>106</b>
		2.14	107	
		2.03	101	
3.0	76725	3.09	103	<b>96</b>
		2.84	95	
		2.68	89	
4.0	99352	3.68	92	<b>86</b>
		3.48	87	
		3.11	78	

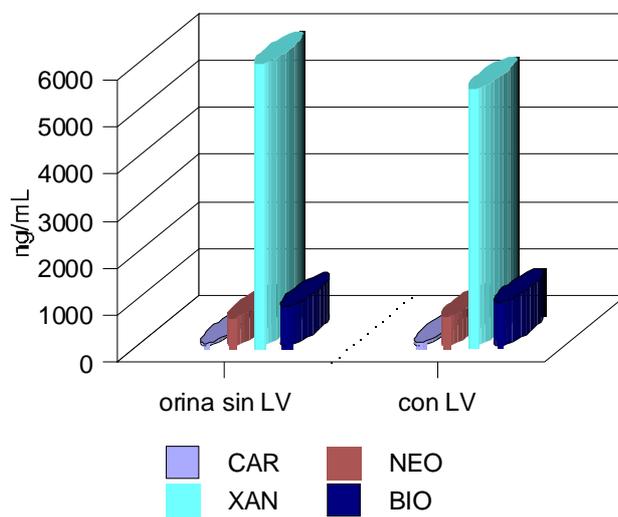
Al representar la concentración añadida a la orina frente a la encontrada para LV, se obtiene una adecuada linealidad tal como se observa en la Figura VIII.25.



**Figura VIII.25** .- Representación de la relación existente entre concentración de ácido folínico puesta y encontrada en orina.

Como consecuencia, la determinación de LV puede ser llevada a cabo en las condiciones indicadas sin que se observe interferencia por parte de las pteridinas.

En la Figura VIII.26 podemos observar un diagrama de distribución de pteridinas en orina humana. Como se puede observar la pteridina más abundante es el xantopterín y la menos abundante el ácido pterín-6-carboxílico.

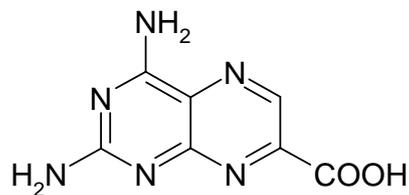


**Figura VIII.26.-** Diagrama de la composición de pteridinas marcadoras en orina humana

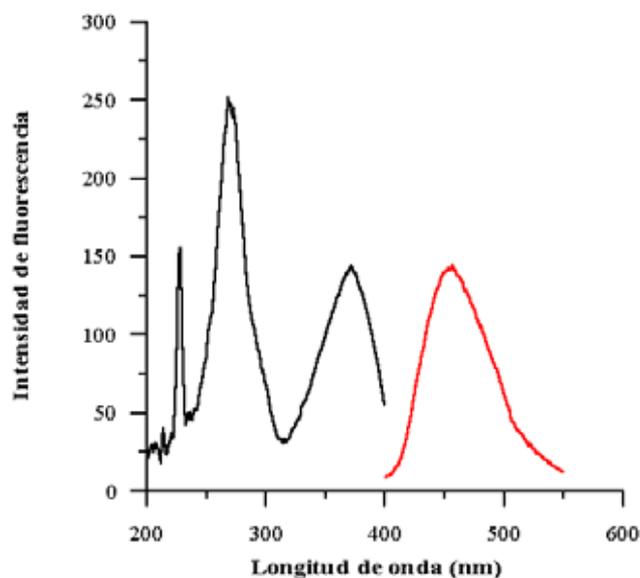
### **VIII.6.- ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE LA OXIDACIÓN DE METOTREXATO CON PERMANGANATO POTÁSICO EN PRESENCIA DE PTERIDINAS. DETERMINACIÓN EN ORINA.**

Dada la imposibilidad de determinar MTX en orina, utilizando el método de Trehan, se ha ensayado la utilización de  $\text{KMnO}_4$  como agente oxidante, ya que de acuerdo con experiencias previas, este compuesto se oxida, en medio ligeramente ácido y en presencia de permanganato potásico, originando un compuesto altamente fluorescente (33).

Según la bibliografía, la oxidación del metotrexato origina un compuesto que presenta una estructura similar a las pteridinas, Figura VIII.27. Los espectros de excitación y emisión del compuesto obtenido por oxidación del metotrexato con  $\text{KMnO}_4$ , se representan en la Figura VIII.28, donde se observa dos máximos de excitación situados a 275 y 380 nm y único máximo de emisión a 457 nm. Estas longitudes de onda son del mismo orden de las que presentan la pteridinas, lo que contribuye a confirmar que el producto generado en la oxidación presenta estructura pteridínica.



**Figura VIII.27 .-** Estructura del derivado pteridínico (MTX') descrito en la bibliografía.



**Figura VIII.28.-** Espectros de excitación y emisión obtenidos después de la oxidación de metotrexato con  $KMnO_4$ .  $[MTX] = 0.30 \text{ mg L}^{-1}$

Como nuestro objetivo final es determinarlo conjuntamente con las pteridinas, para los estudios posteriores vamos a seguir eligiendo las longitudes de onda seleccionadas para el análisis de las pteridinas, medir la emisión a 440 nm, excitando a 280 nm.

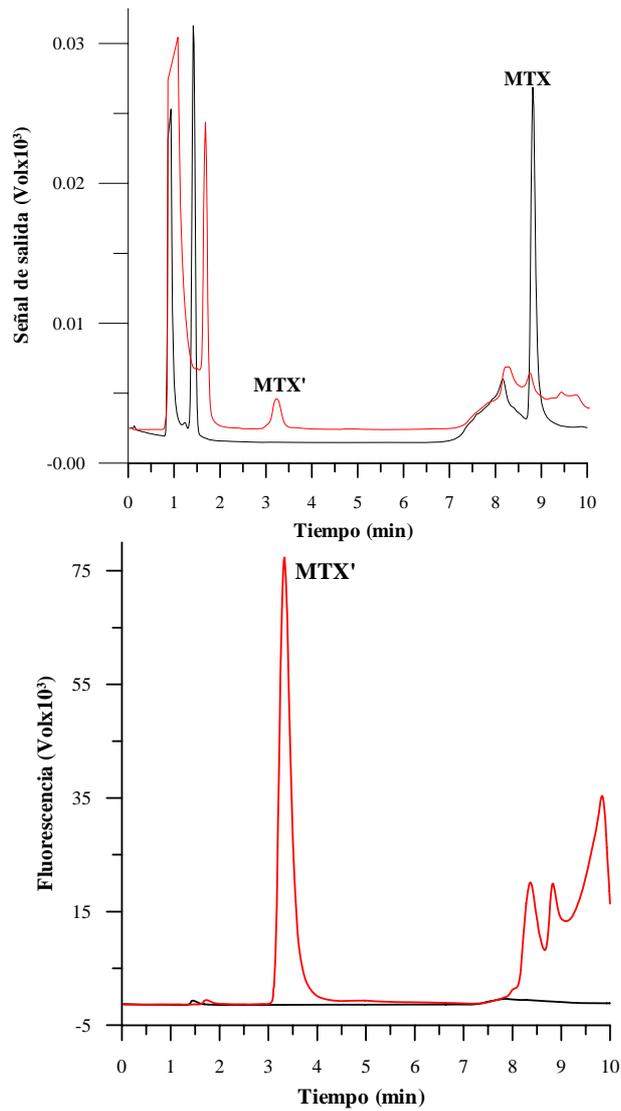
Los estudios cromatográficos iniciales sobre el comportamiento de este compuesto oxidado, se realizan con disoluciones de metotrexato que en un volumen final de 25.0 ml contienen:

- Cantidades variables de MTX
- 5.0 mL tampón HAc/AcNa 0.5 M, pH = 5.0
- 0.25 mL  $\text{KMnO}_4$   $10^{-2}$  M
- 0.25 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$   $5 \times 10^{-2}$  N
- Enrase con fase móvil (Tris-HCl, pH = 6.60)

La elución se realiza utilizando como fase móvil Tris-HCl, pH = 6.60/ACN y efectuando un gradiente de tal manera que durante los primeros 2.5 minutos la composición de la fase móvil es 100 % Tris-HCl y a partir de este tiempo se introduce ACN de forma lineal hasta llegar a un 6% al cabo de los 8 minutos. El flujo de la fase móvil se mantiene constante a lo largo de todo el proceso de elución en  $1.2 \text{ mL min}^{-1}$ .

Los cromatogramas se registran utilizando dos detectores en serie fotométrico-fluorimétrico, y se observa que, en estas condiciones de pH, la molécula de MTX se oxida eficazmente dando lugar a un derivado fluorescente, que eluye antes que el MTX sin oxidar, tal como se observa en la Figura VIII.29. Se observa que en ausencia de  $\text{KMnO}_4$ , y con detección fotométrica solo aparece un pico correspondiente al MTX y este pico no aparece en el detector fluorimétrico ya que el MTX no presenta señal de fluorescencia en presencia de acetonitrilo. Al tener lugar la oxidación prácticamente desaparece, en el detector fotométrico, la señal

correspondiente al MTX y aparece un nuevo pico a aproximadamente 3.2 min asignado al producto de oxidación (MTX') que es altamente fluorescente como se pone de manifiesto con el detector fluorimétrico.



**Figura VIII.29.** - Cromatogramas correspondientes a disoluciones de MTX sin oxidar (MTX) y oxidadas en presencia de  $KMnO_4$  (MTX'): A) Detección fotométrica a 230 nm, B) Detección fluorimétrica  $\delta_{exc}= 280$  nm y  $\lambda_{em}= 444$  nm.

Una vez comprobada la oxidación del MTX, vamos a estudiar las variables que influyen en este proceso y una vez optimizadas estudiaremos el comportamiento de las pteridinas y de la creatinina en estas condiciones.

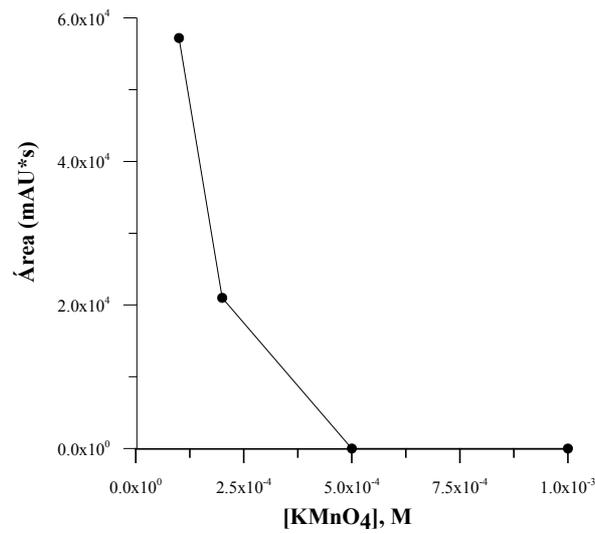
#### **VIII.6.1.-Influencia de la concentración de $\text{KMnO}_4$ sobre el área de pico del MTX oxidado**

Con el fin de optimizar la concentración de  $\text{KMnO}_4$ , para la cual se consigue una adecuada oxidación del MTX, se preparan disoluciones que en un volumen final de 25.0 ml contienen diferentes concentraciones de  $\text{KMnO}_4$  para una concentración de metotrexato de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  y un tiempo de oxidación constante de 30 minutos. Debido a la diferente sensibilidad que presentan el MTX sin oxidar y el compuesto que se forma durante el proceso de oxidación, los cromatogramas se registran simultáneamente con dos detectores conectados en serie, un detector de diodos y un detector espectrofluorimétrico. Esto nos permite seguir el comportamiento de ambos compuestos observando como influye la concentración de  $\text{KMnO}_4$  en el pico correspondiente al MTX sin oxidar, el cual se sigue fotometricamente, y sobre el área del pico del compuesto oxidado, MTX', que se sigue espectrofluorimetricamente.

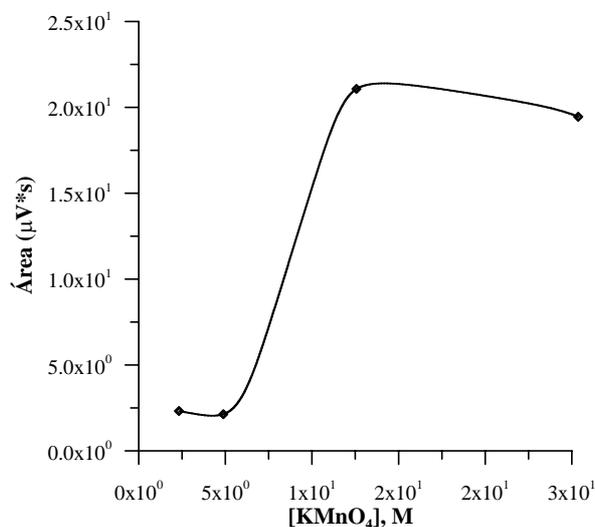
En la Figura VIII.30, se representa la variación de las áreas de los picos correspondientes al MTX sin

oxidar y oxidado para distintas concentraciones de  $\text{KMnO}_4$ . Se observa que a medida que aumenta la concentración de  $\text{KMnO}_4$ , disminuye el área del pico correspondiente al MTX al mismo tiempo que aumenta el área del pico del compuesto oxidado, MTX'. A partir de una concentración de  $\text{KMnO}_4$  del orden de  $5.0 \times 10^{-4}$  M, se produce una oxidación total del MTX y el área correspondiente al pico del compuesto oxidado se mantiene prácticamente constante.

A)



**B)**



**Figura VIII.30.** - Influencia de la concentración de  $KMnO_4$  sobre el área de pico: A) MTX sin oxidar,  $\delta = 230 \text{ nm}$ , B) MTX oxidado (MTX'),  $\delta_{exc} = 280 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$ .

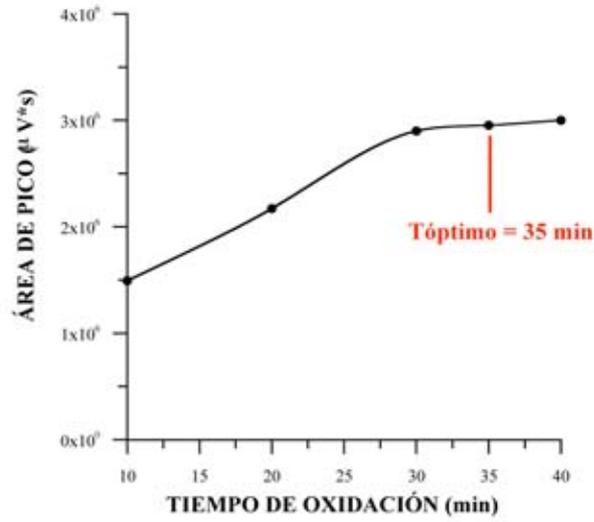
### VIII.6.2.- Influencia del tiempo de oxidación sobre el área de pico de MTX y de su derivado oxidado (MTX') para distintas concentraciones de $KMnO_4$

Una vez establecida la oxidación del MTX en presencia de  $KMnO_4$  se aborda el estudio de las condiciones óptimas del proceso de oxidación. Para ello, y como paso inicial, se estudia la influencia del tiempo de oxidación cuando se emplean diferentes concentraciones de MTX comprendidas entre  $5 \times 10^{-5}$  y  $10^{-3} \text{ M}$ .

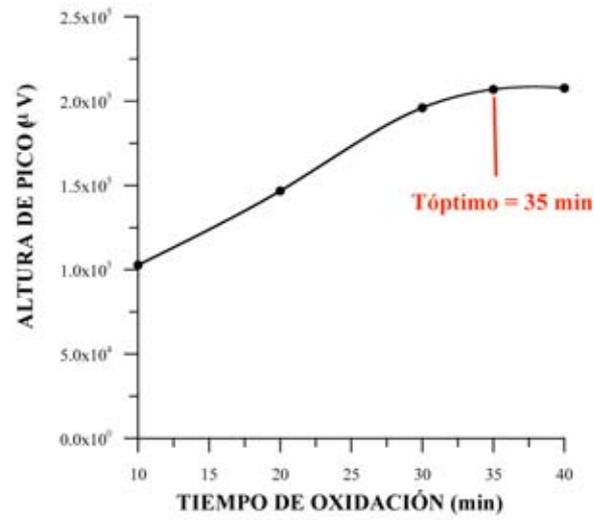
La velocidad de oxidación del MTX aumenta en función de la concentración de  $\text{KMnO}_4$  empleado, y a partir de aproximadamente 15 minutos para una concentración de  $\text{KMnO}_4$   $1.0 \times 10^{-3}$  M, la señal del MTX prácticamente se hace nula y además la velocidad de formación del compuesto oxidado, MTX', es similar para concentraciones de  $\text{KMnO}_4$  comprendidas entre  $5.0 \times 10^{-4}$  y  $1.0 \times 10^{-3}$  M. Para posteriores experiencias, y con objeto de asegurarnos un exceso adecuado de  $\text{KMnO}_4$  se elige como concentración óptima  $1.0 \times 10^{-3}$  M.

Una vez optimizada la concentración de  $\text{KMnO}_4$  se estudia la influencia del tiempo de oxidación. Para ello se preparan, en matraces de 25.0 mL, muestras conteniendo  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , 5 mL de tampón Hac/NaAC 0.5 M, pH = 5.0, 5 mL de  $\text{KMnO}_4$   $5.0 \times 10^{-3}$  M y fase móvil hasta enrase. El tiempo de oxidación se varió para cada una de las muestras y al representar el área y la altura de pico frente al tiempo de oxidación, Figura VIII.31A y VIII.31B respectivamente, observamos como la señal tiende a hacerse constante a partir de un tiempo de oxidación de 30 minutos, por lo que para posteriores experiencias elegimos como tiempo óptimo de oxidación el de 35 minutos con una concentración de  $\text{KMnO}_4$   $10^{-3}$  M.

A)



B)



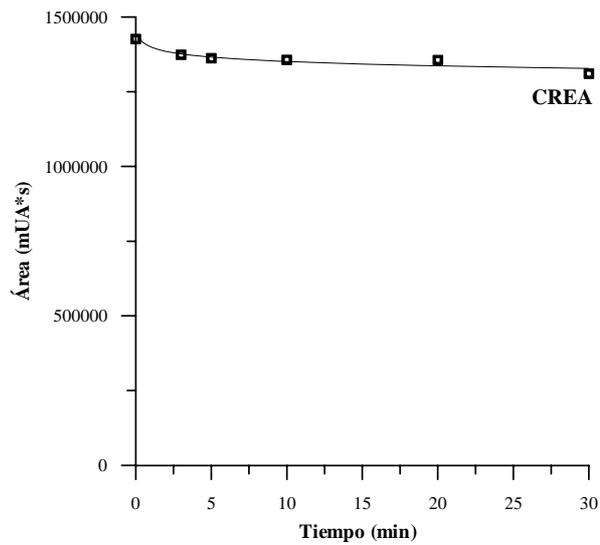
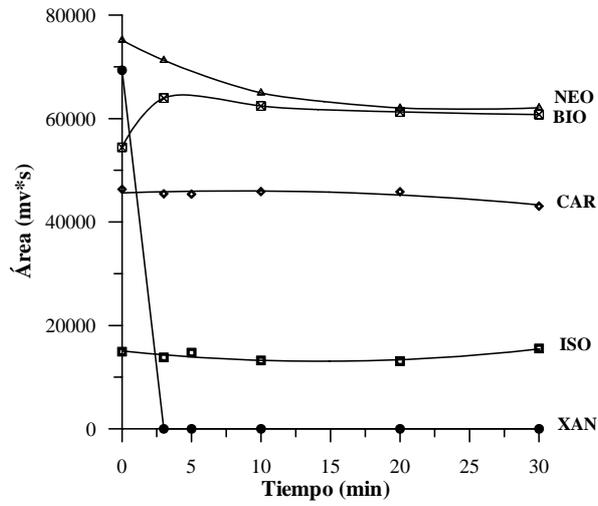
**Figura VIII.31** .- Influencia del tiempo de oxidación sobre el área y la altura de pico correspondiente al compuesto oxidado, MTX'.  $[MTX] = 30 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $[KMnO_4] = 10^{-3} \text{ M}$ .

### VIII.6.3.- Determinación conjunta de MTX y pteridinas

Una vez optimizada las variables que influyen en la oxidación del MTX se estudia como se comportan las pteridinas y la creatinina en presencia de la cantidad de  $\text{KMnO}_4$  previamente seleccionada como óptima. Para ello, vamos a estudiar como influye el tiempo de oxidación sobre las pteridinas y la creatinina, preparando disoluciones independientes de cada una de ellas que en un volumen de 25.0 mL contienen la pteridina en estudio, 5 mL de tampón Hac/NaAc 0.5 M, 5 mL de  $\text{KMnO}_4$   $5.0 \times 10^{-3}$  M y fase móvil hasta enrase. La elución se realiza de forma isocrática utilizando como fase móvil Tris-HCl, pH = 6.60, ya que como hemos comentado anteriormente, en estas condiciones el MTX se oxida totalmente, y el compuesto originado en la oxidación es lo suficientemente polar como para no necesitar un modificador orgánico para su elución. Se registran los cromatogramas, con detección fluorimétrica para la determinación de las pteridinas y fotométrica para la creatinina, a distintos tiempos de oxidación y los resultados obtenidos sobre como influye el tiempo de oxidación sobre las áreas de los picos de cada uno de los analitos, se representan en la Figura VIII.32, donde comprobamos que excepto el xantopterin, el resto de las pteridinas no se ven afectadas por la presencia de  $\text{KMnO}_4$  en el medio. El xantopterin se oxida rápidamente en presencia de  $\text{KMnO}_4$ , y en menos de 5 minutos no se observa ningún

pico en las condiciones de trabajo. Con respecto a la creatinina no se observa ningún cambio apreciable en presencia de  $\text{KMnO}_4$ .

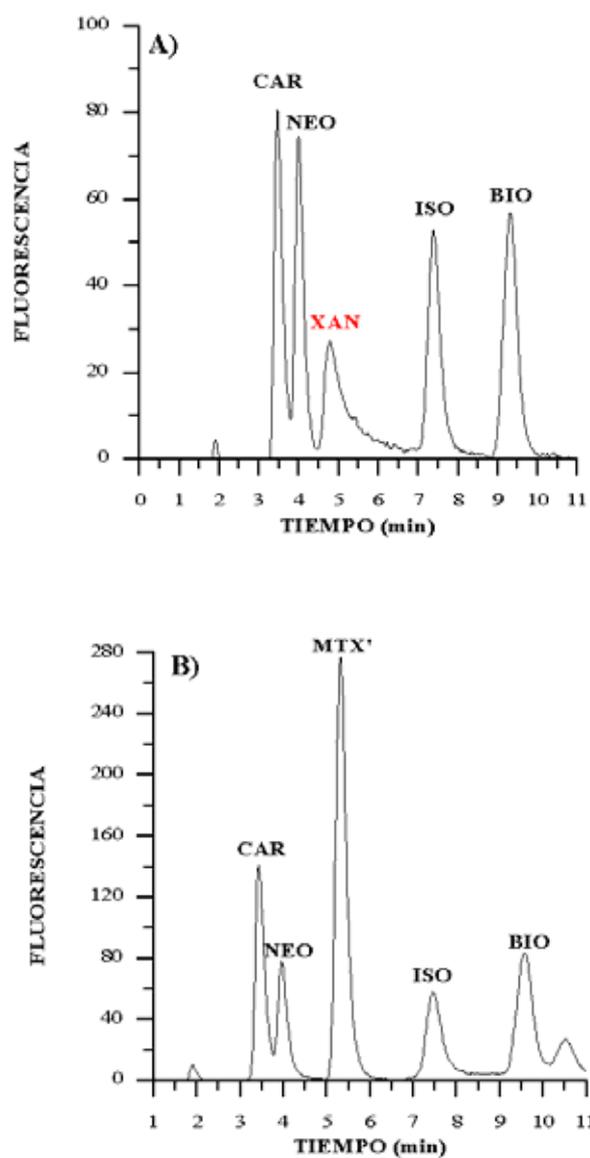
Para posteriores experiencias seguimos manteniendo como concentración óptima de  $\text{KMnO}_4$  la ya optimizada,  $10^{-3}$  M y el tiempo de oxidación de 35 minutos.



**Figura VIII.32** .- Influencia del tiempo de oxidación sobre el área de pico de las pteridinas en estudio y de la creatinina:  $[NEO] = 0.12 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $[CAR] = 0.43 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $[BIO] = 0.40 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $[ISO] = 0.37 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $[XAN] = 0.92 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $[CREA] = 40 \text{ mg L}^{-1}$ .  $[KMnO_4] = 10^{-3} \text{ M}$

A continuación se preparan dos muestras que contienen las pteridinas indicadas anteriormente y el metotrexato y una de ellas se somete al proceso de oxidación. Los cromatogramas obtenidos para cada una de estas disoluciones se representan en la Figura VIII.33. Observamos que el cromatograma correspondiente a la disolución sin oxidar, Figura VIII.33A, presenta los picos correspondientes a las cinco pteridinas en estudio y no se observa ningún pico asignable al metotrexato. Sin embargo, en el cromatograma correspondiente a la disolución una vez oxidada, comprobamos como desaparece el pico correspondiente al xantopterin y aparece un nuevo pico que es debido al producto formado en la oxidación del metotrexato.

Teniendo en cuenta estos resultados, se aborda la determinación del MTX en presencia de cuatro pteridinas que normalmente se encuentran presentes en la orina humana, como son el ácido pterin-6-carboxílico, neopterin, isoxantopterin y biopterin.



**Figura VIII.34.** - Cromatogramas obtenidos tras la reacción de oxidación de un patrón. A) Detección fluorimétrica a 444 nm (exc: 280 nm); B) Detección fotométrica a 230 nm

#### VIII.6.4.- Rectas de calibrado

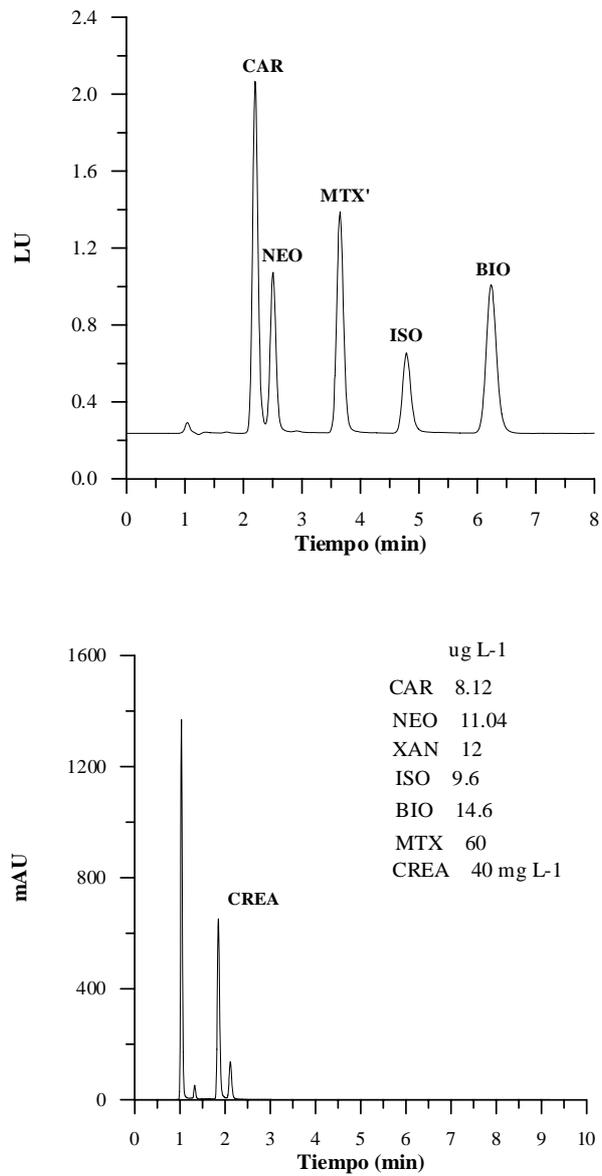
Una vez optimizadas las variables que influyen en el proceso de oxidación, se procede al estudio de la influencia de la concentración de cada uno de los analitos sobre el área de pico. Es preciso indicar que a partir de esta experiencia fue necesario cambiar de cromatógrafo y ello nos llevó a tener que volver a ajustar el flujo de la fase móvil, seleccionándose como el más adecuado el de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . Este flujo permitía una adecuada separación de todos los analitos en un tiempo inferior a los 7 minutos.

Este estudio se realiza con muestras que en un volumen final de 25.0 mL contienen cantidades variables de los analitos en estudio, 5 mL de tampón HAc/NaAc 0.5 M (pH 5.0), y 5 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $5.0 \times 10^{-3}$  M. Las disoluciones se dejan en reposo durante 35 minutos para completar la oxidación del metotrexato y al cabo de este tiempo, se añaden 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del 33 %, para detener la reacción de oxidación y eliminar el exceso de  $\text{KMnO}_4$  con objeto de que no se forme óxido de manganeso (IV), que en el futuro pudiera mermar la eficacia de la columna analítica. Por último, los matraces se enrasan con fase móvil Tris-HCl de pH 6.80.

Cada muestra se prepara por triplicado y de cada una de ellas se efectúan tres inyecciones de 20  $\mu\text{L}$  cada una, filtrándolas previamente a través de un filtro de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ . La elución se realiza de forma

isocrática con disolución de Tris-HCl de pH 6.8 y con un flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

Todos los componentes se determinan mediante el detector fluorimétrico a 444 nm ( $\lambda_{exc.} = 280$  nm) excepto la creatinina que se determina fotométricamente a 230 nm. En las Figuras VIII.34A) y VIII.34B). Se recogen los cromatogramas obtenidos para dos niveles de concentración y en la Tabla VIII.15 se han resumido las ecuaciones obtenidas para la calibración de los analitos, así como los parámetros estadísticos de los mismos. Los valores de límite de detección se han calculado mediante el criterio de Long y Winefordner y el de Clayton y col. poniéndose de manifiesto la elevada sensibilidad del método propuesto. Los coeficientes de regresión son adecuados en todos los casos.



**Figura VIII.34.-** Cromatogramas obtenidos tras la reacción de oxidación de un patrón. A) *Detección fluorimétrica a 444 nm (exc: 280 nm)*; B) *Detección fotométrica a 230 nm.*

**Tabla VIII.15. - Parámetros estadísticos obtenidos para la calibración de CAR, NEO, MTX', ISO y BIO con detección fluorescente y CREA con detección fotométrica.**

	Detector fluorescente ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ; $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$ )					Detector fotométrico ( $\lambda = 230 \text{ nm}$ )
	CAR	NEO	MTX'	ISO	BIO	CREA
<b>Rango de concentraciones</b> ( $\text{:g L}^{-1}$ )	2.8 - 25.0	2.4 - 18.0	9.6 - 160	2.40 - 22.1	5.6 - 22.4	10.0 - 10 <sup>4</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Ecuación de la recta</b> (Área pico* vs conc)	Área = 1.323 [CAR] + 0.659	Área = 0.588 [NEO] - 0.224	Área = 0.177 [MTX'] + 0.444	Área = 0.420 [ISO] - 0.291	Área = 0.626 [BIO] + 0.364	Área = 61.43 [CREA] + 30
$\sigma_{pendiente}$	0.0133	0.0104	0.0034	0.0095	0.0099	0.6567
$\sigma_{ordenada}$	0.1808	0.1138	0.3237	0.1168	0.1396	40.74
$\sigma_{típica \text{ estimada}}$	0.4104	0.2129	0.7445	0.2545	0.2276	89.83
<b>Coef. de regresión</b>	0.9993	0.9985	0.9976	0.9974	0.9988	0.9991
<b>LOD, <math>\text{:g L}^{-1}</math></b> (Long y Winerfordner)	0.41	0.48	10.02	1.36	0.52	3.68 $\text{mg L}^{-1}$
<b>LOD, <math>\text{:g L}^{-1}</math></b> (Clayton, $\alpha=\beta=0.05$ )	0.78	1.01	10.59	0.29	1.08	3.69 $\text{mg L}^{-1}$

\* Unidades de luminiscencia x s (V x s).

### VIII.6.5.- Repetitividad y seguridad del método

La repetitividad del método se estudió sobre 11 disoluciones independientes conteniendo en un volumen final de 25.0 mL los distintos analitos en concentraciones: [CAR] = 8.12 ng mL<sup>-1</sup>; [NEO] = 11.04 ng mL<sup>-1</sup>; [XAN] = 12.00 ng mL<sup>-1</sup>; [ISO] = 9.60 ng mL<sup>-1</sup>; [BIO] = 14.60 ng mL<sup>-1</sup>; [MTX] = 60.00 ng mL<sup>-1</sup> ; [CREA] = 40.00 :g mL<sup>-1</sup>.

Mediante la aplicación del cálculo estadístico a las áreas obtenidas a partir de los datos cromatográficos, se obtienen los parámetros que se muestran en la Tabla VIII.16.

**Tabla VIII.16** .- *Parámetros estadísticos relacionados con los estudios de repetitividad y seguridad del método.*

	ÁREA* (Vol x s)	S <sub>(n-1)</sub>	Intervalo de confianza	% Error	RSD (%)
<b>CAR</b>	11.53	0.776	11.5 ± 0.5	4.5	6.73
<b>NEO</b>	5.94	0.489	6.2 ± 0.8	5.5	8.22
<b>MTX'</b>	9.26	1.134	9.3 ± 0.8	8.2	12.2
<b>ISO</b>	4.15	0.267	4.2 ± 0.2	4.3	6.43
<b>BIO</b>	9.5	0.803	9.5 ± 0.5	5.7	8.45
<b>CREA</b>	2374.37	72.25	2374 ± 49.0	2.1	3.04

(\*) Área media de 11 replicas individuales.

Los cromatogramas obtenidos en los estudios de la repetitividad se emplearon para el cálculo de los parámetros cromatográficos del sistema. En la Tabla VIII.17 se han resumido los valores correspondientes a los factores de capacidad, valores de resolución medios obtenidos, número de platos teóricos para cada componente, así como la dispersión de los resultados expresados como desviación estándar.

**Tabla VIII.17.-** Parámetros cromatográficos para la determinación de MTX, pteridinas y creatinina.  $t_o$  (fotométrico) = 1.029 ( $\pm$  0.001);  $t_o$  (fluorimétrico) = 1.042 ( $\pm$  0.003)

Señal	Compuesto	Tiempo de retención* $t_R$ ( $\pm$ s) (min)	Factor de capacidad* k ( $\pm$ s)	Resolución* $R_{1/2}$ ( $\pm$ s)	Nº Platos teóricos* N ( $\pm$ s)
<b>Detección fotométrica</b> $\lambda = 230$ nm		1.85	0.80		13883.51
	<b>CREA</b>	( $\pm$ 0.012)	( $\pm$ 0.014)	-----	( $\pm$ 412.74)
		2.21	1.12		6321.87
	<b>CAR</b>	( $\pm$ 0.016)	( $\pm$ 0.016)	-----	( $\pm$ 116.92)
<b>Detección fluorimétrica</b> $\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 444$ nm		2.51	1.41	2.67	7295.72
	<b>NEO</b>	( $\pm$ 0.015)	( $\pm$ 0.016)	( $\pm$ 0.031)	( $\pm$ 196.04)
		3.66	2.51	9.04	11554.16
	<b>MTX</b>	( $\pm$ 0.040)	( $\pm$ 0.038)	( $\pm$ 0.141)	( $\pm$ 219.30)
		4.80	3.61	7.52	12914.41
	<b>ISO</b>	( $\pm$ 0.042)	( $\pm$ 0.040)	( $\pm$ 0.092)	( $\pm$ 484.29)
		6.26	5.01	7.66	13799.29
	<b>BIO</b>	( $\pm$ 0.050)	( $\pm$ 0.050)	( $\pm$ 0.080)	( $\pm$ 280.74)

s = desviación estándar; \* valor medio de 11 replicas.

Las calibraciones establecidas se validaron con el análisis de diversos problemas conteniendo algunos o todos los analitos de interés previa oxidación. En la Tabla VIII.18 se han resumido los valores medios de recuperación calculados así como las desviaciones relativas para tres replicas de cada problema.

Los resultados obtenidos se pueden considerar como aceptables en todos los casos, siendo las recuperaciones ligeramente bajas para el neopterin. Los valores medios de recuperación obtenidos son: 104 % para CAR, 83 % para NEO, 107 % para MTX, 99.7 % para ISO y 109 % para BIO. Es de destacar la elevada sensibilidad obtenida para todos los componentes en estudio.

**Tabla VIII.18 .-** Recuperaciones obtenidas a partir de problemas sintéticos que contienen creatinina , metotrexato y pteridinas.

Problema	CAR*			NEO*			MTX**			ISO*			BIO*		
	Puesto	Encontrado (%RSD)	% Recup. (% RSD)	Puesto	Encontrado (% RSD)	% Recup. (%RSD)	Puesto	Encontrado (% RSD)	% Recup. (% RSD)	Puesto	Encontrado (%RSD)	% Recup. (%RSD)	Puesto	Encontrado (% RSD)	% Recup. (% RSD)
<b>P1</b>	0.0	---	---	3.4	2.7 (9.1)	<b>80.9 (9.3)</b>	20.0	22.3 (2.2)	<b>111.3 (2.2)</b>	2.1	2.5 (3.4)	<b>121.1 (3.3)</b>	4.8	5.8 (6.2)	<b>121.8 (6.1)</b>
<b>P2</b>	3.2	3.2 (1.9)	<b>101.7 (1.9)</b>	0.0	---	---	20.0	20.2 (4.2)	<b>101.0 (4.2)</b>	2.1	2.0 (3.2)	<b>96.4 (3.2)</b>	4.8	4.9 (10.4)	<b>101.9 (10.4)</b>
<b>P3</b>	0.0	---	---	8.5	6.5 (1.8)	<b>76.9 (1.8)</b>	80.0	90.1 (0.5)	<b>112.7 (0.5)</b>	7.0	8.3 (0.9)	<b>119.2 (0.9)</b>	9.0	10.6 (1.3)	<b>117.7 (1.3)</b>
<b>P4</b>	7.2	7.3 (4.5)	<b>101.4 (4.5)</b>	0.0	---	---	80.0	92.3 (0.1)	<b>116.2 (0.1)</b>	7.0	7.1 (1.7)	<b>101.6 (1.7)</b>	9.0	9.8 (2.1)	<b>109.4 (2.2)</b>
<b>P5</b>	0.9	1.1 (10.1)	<b>117.2 (10.0)</b>	2.0	1.7 (3.6)	<b>87.3 (3.6)</b>	1.0	0.9 (19.1)	<b>88.8 (2.0)</b>	1.0	1.1 (5.8)	<b>108.5 (5.9)</b>	1.0	0.9 (0.7)	<b>93.5 (0.8)</b>
<b>P6</b>	4.0	4.8 (2.4)	<b>117.7 (2.4)</b>	0.0	---	---	40.0	49.6 (3.4)	<b>124.1 (3.5)</b>	5.0	5.5 (1.7)	<b>110.1 (1.7)</b>	6.0	7.6 (2.5)	<b>126.7 (2.5)</b>
<b>P7</b>	0.0	---	---	6.0	5.4 (3.1)	<b>90.8 (3.1)</b>	80.0	78.9 (3.6)	<b>98.6 (3.6)</b>	7.0	5.6 (0.1)	<b>80.4 (0.1)</b>	8.0	8.2 (3.1)	<b>102.9 (3.1)</b>
<b>P8</b>	1.0	0.9 (0.7)	<b>97.5 (0.7)</b>	2.5	2.1 (6.6)	<b>85.6 (6.6)</b>	4.0	4.1 (7.8)	<b>101.6 (7.8)</b>	2.0	1.7 (1.2)	<b>87.3 (1.21)</b>	2.0	2.2 (5.4)	<b>111.3 (5.4)</b>
<b>P9</b>	2.0	1.8 (6.0)	<b>87.8 (6.0)</b>	4.0	3.1 (1.4)	<b>77.3 (1.4)</b>	30.0	33.2 (0.4)	<b>110.7 (0.5)</b>	6.0	4.4 (5.5)	<b>73.2 (5.51)</b>	6.0	5.7 (3.8)	<b>94.8 (3.8)</b>

\* concentraciones expresadas en ng mL<sup>-1</sup>

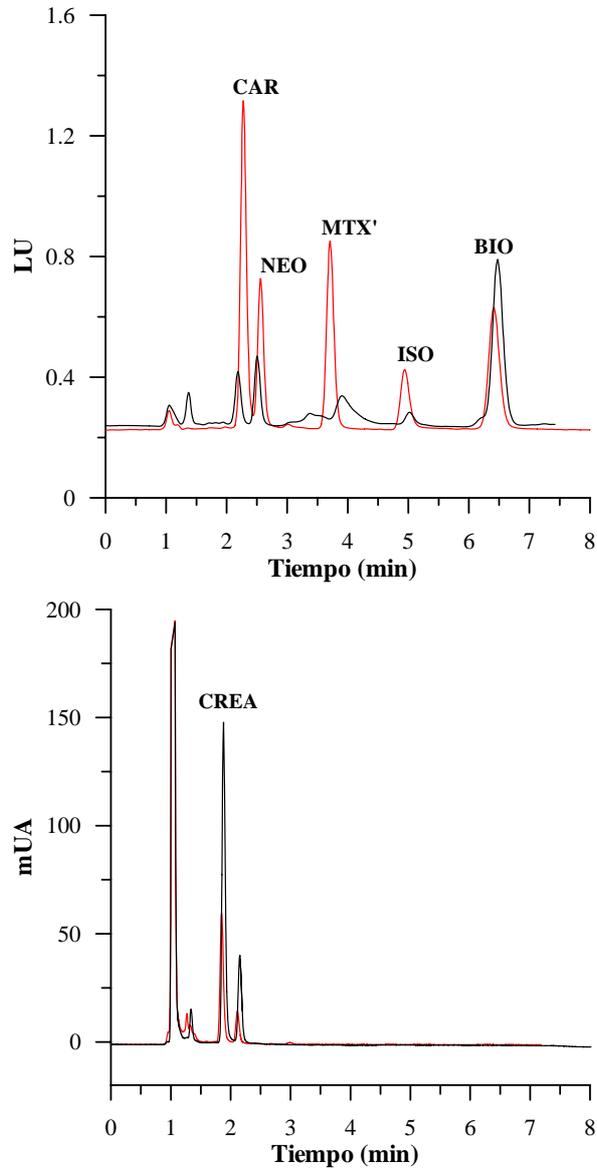
### VIII.6.6.- Aplicación del método propuesto al análisis de orina

En las condiciones anteriormente establecidas se procedió a aplicar el método propuesto al análisis de muestras de orina fortificadas principalmente con MTX, ya que los demás componentes se encuentran naturalmente presentes.

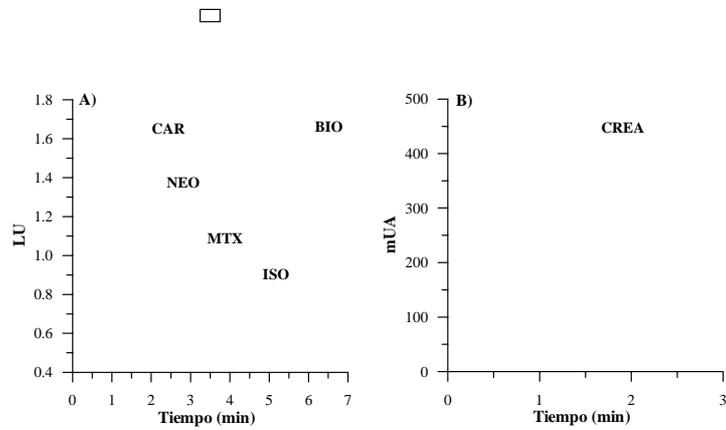
Para ello se oxidan 100  $\mu$ L de orina, tamponada con 5.0 mL de HAc/NaAc 0.5 M, pH 5.0, y durante 35 minutos, con 5.0 mL de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $5 \times 10^{-3}$  M, a continuación se añade 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del 33%, para detener completamente la reacción de oxidación y eliminar el exceso de permanganato y, finalmente enrasamos con fase móvil hasta un volumen de 25.0 mL. Asimismo se preparan muestras similares a partir de orina a la que previamente se le añaden cantidades de los analitos en estudio tales que sus concentraciones finales en los 25.0 mL se encuentren en los límites de las rectas de calibrado. Dichas muestras se filtran en la forma acostumbrada y se inyectan en el sistema cromatográfico al mismo tiempo que patrones conteniendo concentraciones similares de los analitos y se obtienen los cromatogramas en las condiciones que ya habíamos fijado como óptimas para la detección fotométrica de la creatinina y detección fluorescente para el resto de los compuestos.

En la Figura VIII.35 se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de orina

sin contaminar junto con un patrón y en la Figura VIII.36 se recogen los cromatogramas correspondientes a una muestra de orina sin contaminar y una muestra de orina contaminada con todos los analitos. Se observa que no existen interferencias apreciables entre la matriz de la orina y el pico correspondiente al producto de la oxidación del metotraxato, que es el único analito que no está presente de forma natural en la orina, tampoco interfiere con ningún componente de la orina. Además se comprueba que los picos correspondientes a las pteridinas, y el pico correspondiente a la creatinina, presentes de forma natural en la orina, coinciden con los picos de estos analitos en el patrón.



**Figura VIII.35** .- Cromatogramas correspondientes a la oxidación de una muestra de orina (—) y de una muestra patrón (---) conteniendo los derivados pteridínicos en concentraciones [CAR] = 5.04 ppb; [NEO] = 5.52 ppb; [XAN] = 7.8 ppb; [ISO] = ppb; [BIO] = 7.38 ppb; [MTX] = 3.04 ppb; [CREA] = 10 ppm. A)  $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$ ; B)  $\lambda = 230 \text{ nm}$ .



**Figura VIII.36 .-** Cromatogramas correspondientes a muestras oxidadas de orina contaminada (—) y sin contaminar (—) con los diferentes derivados pteridínicos y con MTX. [CAR] = 5.04 ppb; [NEO] = 5.52 ppb; [XAN] = 7.8 ppb; [ISO] = 4.08 ppb; [BIO] = 7 ppb; [MTX] = 30 ppb; [CREA] = 20 ppm. A)  $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 444 \text{ nm}$ ; B)  $\lambda = 230 \text{ nm}$ .

### Aplicación del método de la adición patrón

Una vez comprobado que es posible la separación de los analitos en orina, se han establecido varias rectas de calibración mediante el método de la adición patrón y utilizando dos intervalos de concentración para las adiciones de cada analito. El procedimiento seguido es el siguiente: se toman 100 :L de orina y se añaden 5.0 ml de disolución reguladora Hac/NaAC y 5.0 ml de disolución de  $\text{KMnO}_4$   $5 \times 10^{-3}$  M. Se deja que transcurra la oxidación durante 35 minutos al cabo de los cuales se añade 0.1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del 33%, y se enrasa con fase móvil hasta completar 25.0 mL. De igual modo se preparan muestras de orina a las que se les añaden los analitos en la concentración deseada. Las muestras se filtran a través de un filtro de nylon de 0.20 :m y se inyectan, por duplicado, porciones de 25 :l en el sistema cromatográfico.

En la Tabla VIII.19 se resumen los parámetros estadísticos obtenidos para las calibraciones mediante la adición patrón de los distintos analitos, así como los valores de las pendientes obtenidas, el coeficiente de regresión, la precisión de dichos parámetros y la correspondiente ecuación de referencia obtenida en la recta de calibrado.

**Tabla VIII.19.-** Aplicación del método de la adición patrón al análisis de orina

	CREATININA		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	10 - 60 ;g mL <sup>-1</sup>	5 - 20 ;g mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	62.93 [CREA] + 251.70	60.46 [CREA] + 263.08	
$\sigma_{\text{típica}}$ estimada	27.92	15.65	
Coefficiente de regresión	0.9998	0.9994	

	BIOPTERIN		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	7.3 – 18 ng mL <sup>-1</sup>	2.5 - 7.0 ng mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	0.697 [BIO] + 8.49	0.726 [BIO] + 7.99	
$\sigma_{\text{típica}}$ estimada	0.17	0.54	
Coefficiente de regresión	0.9994	0.97	

	ACIDO PTERIN-6-CARBOXILICO		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	5.0 - 14.0 ng mL <sup>-1</sup>	1.39 -5.04 ng mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	1.300 [CAR] + 1.55	1.20 [CAR] + 1.15	
$\sigma_{\text{típica}}$ estimada	0.18	0.49	
Coefficiente de regresión	0.9996	0.98	

Tabla VIII.19 .- Continuación

	NEOPTERIN		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	5.52 - 18.0 ng mL <sup>-1</sup>	1.31 -5.52 ng mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	0.674 [NEO] + 1.76	0.682 [NEO] + 1.65	
$\sigma$ típica estimada	0.048	0.26	
Coefficiente de regresión	0.9999	0.9821	0.588

	ISOXANTOPTERIN		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	4.08 - 18.0 ng mL <sup>-1</sup>	1.15 - 4.08 ng mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	0.476 [ISO] + 0.41	0.450 [ISO] + 0.43	
$\sigma$ típica estimada	0.068	0.1	
Coefficiente de regresión	0.9998	0.9944	0.42

	METOTREXATO		
	Adición 1	Adición 2	Pendiente referencia (Recta de calibrado)
Rangos de concentración	30 -100 ng mL <sup>-1</sup>	5 - 30 ng mL <sup>-1</sup>	
Ecuación de la recta (Área vs concentración)	0.169 [MTX] + 0.07	0.162 [MTX] + 0.032	
$\sigma$ típica estimada	0.553	0.65	
Coefficiente de regresión	0.9925	0.9934	0.177

Tal como se observa en la Tabla, las pendientes obtenidas por el método de la adición patrón son comparables con las obtenidas mediante el método de calibración del patrón externo en todos los casos. Se puede afirmar por tanto que no hay efecto de matriz en la determinación propuesta. Además se comprueba que existe una adecuada resolución del MTX con respecto a los componentes naturalmente presentes en la orina.

A partir de los datos aportados por la aplicación del método de la adición patrón se calcularon los contenidos de las distintas pteridinas en las muestras de orina. Dichos contenidos se expresan como :g de cada una de las pteridinas con respecto a los contenidos de creatinina (mg) también calculados con el método propuesto. Así en la misma alicuota y con una única inyección se determinan las pteridinas de interés y la referencia de la excreción en orina.

En la Tabla VIII.20 se resumen los valores calculados utilizando los dos intervalos de adición patrón.

**Tabla VIII.20 .-** *Contenidos de pteridinas en orina humana*

	Relación ( :g pteridina/ mg creatinina)				Relación NEO/BIO
	CAR/ CREA	NEO/ CREA	ISO/ CREA	BIO/ CREA	
<b>Adición patrón 1</b>	0.29	0.65	0.22	3.04	0.21
<b>Adición patrón 2</b>	0.22	0.56	0.20	2.56	0.22

Como consecuencia del proceso de oxidación empleado no se puede determinar el XAN, sin embargo se determinan con una adecuada sensibilidad las pteridinas consideradas como más representativas de los procesos marcadores. Nos permite determinar la relación NEO/BIO ampliamente empleada como referencia.

Comparando los valores obtenidos con aquellos definidos en la bibliografía podemos indicar que tanto NEO como BIO presentan mayores relaciones con respecto a CREA que las descritas en la bibliografía. Este hecho puede derivarse de la mayor eficacia en el proceso de oxidación de hidropteridinas a pteridinas en la orina original, comparado con el denominado método de Trehan. Sin embargo la relación NEO/BIO presenta valores normales inferiores a los establecidos como patológicos.

Se procedió a determinar los valores de recuperación para las diversas pteridinas y para el MTX

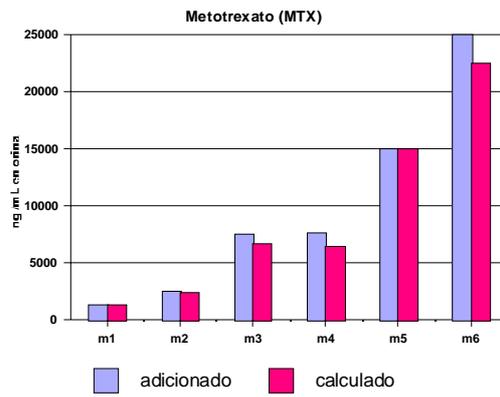
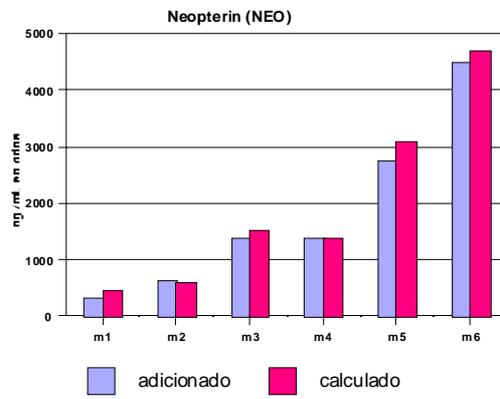
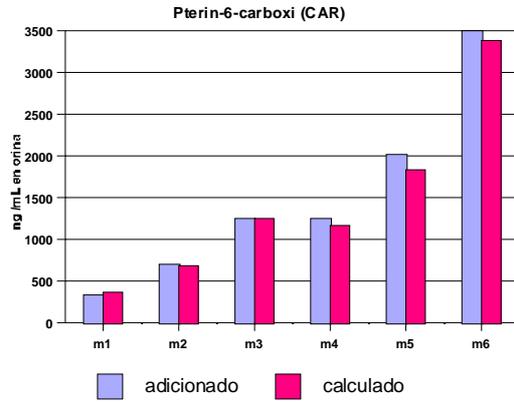
a partir de diversas muestras de orina fortificadas con los analitos de interés. A continuación en la Tabla VIII.21 se resumen las concentraciones adicionadas en la orina original y los valores de recuperación calculados en cada caso y en la Figura VIII.37 se puede observar una representación en forma de diagrama de las concentraciones adicionadas y encontradas para las muestras analizadas como validación del método propuesto. Se observa una adecuada concordancia entre las concentraciones adicionadas y las calculadas para todos los analitos.

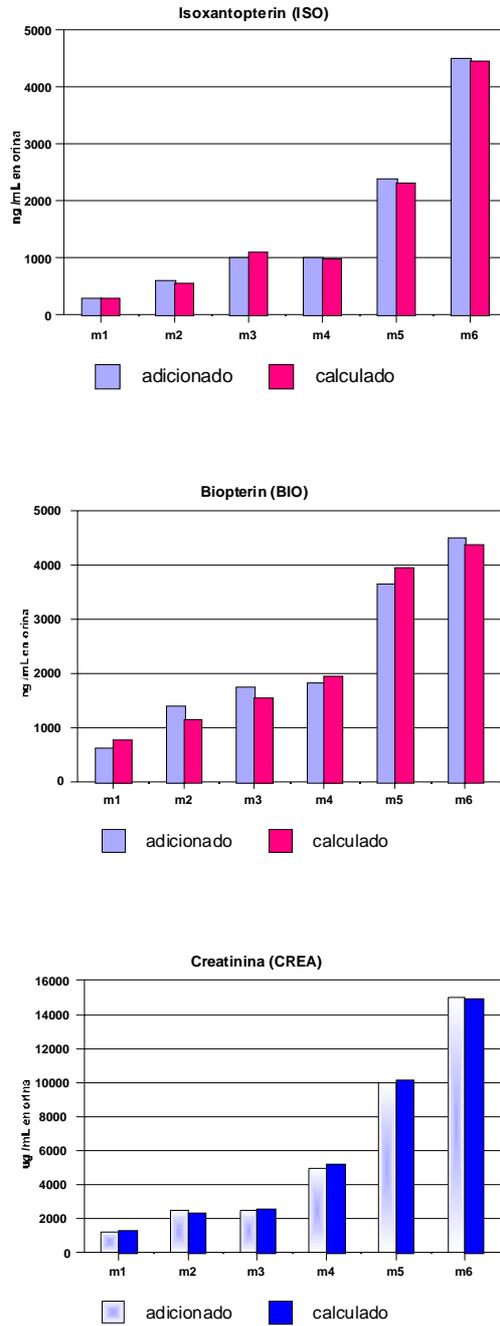
**Tabla VIII.21.-** Concentraciones adicionadas y porcentajes de recuperación obtenidos en el análisis de muestras de orina fortificada sin diluir.

CREA		CAR		NEO		MTX		ISO		BIO	
Añadido :g mL <sup>-1</sup>	% Rec*	Añadido ng mL <sup>-1</sup>	% Rec *	Añadido ng mL <sup>-1</sup>	% Rec*	Añadido ng mL <sup>-1</sup>	% Rec*	Añadido ng mL <sup>-1</sup>	% Rec*	Añadido ng mL <sup>-1</sup>	% Rec*
1250	103.6 (±13.5)	347.5	103.8 (±3.7)	337.5	115.0 (±5.7)	1250	94.9 (±2.7)	287.5	96.8 (±5.4)	625	96.8 (±2.1)
2500	96.9 (±3.7)	700	98.5 (±1.1)	630	96.0 (±4.5)	2500	95.7 (±3.5)	600	93.6 (±3.0)	1400	84.1 (±8.9)
2500	103.4 (±6.8)	1260	100.1 (±1.9)	1380	110.2 (±6.1)	7500	88.8 (±1.0)	1020	107.2 (±1.9)	1750	89.2 (±12.4)
5000	104.4 (±3.6)	1260	93.5 (±6.3)	1380	101.0 (±4.8)	7600	83.6 (±1.0)	1020	96.5 (±0.7)	1825	100.2 (±8.7)
10000	101.7 (±1.0)	2030	90.8 (±2.6)	2760	110.6 (±2.7)	15000	99.7 (±1.6)	2400	97.0 (±0.8)	3650	104.9 (±5.4)
15000	99.7 (±0.3)	3500	97.0 (±0.5)	4500	111.3 (±3.6)	25000	90.0 (±7.7)	4500	99.1 (±2.6)	4500	97.2 (±3.4)

\* valor medio de 3 determinaciones.

Capítulo VIII.- Estudios cromatográficos





**Figura VIII.37.-** Representación de las concentraciones adicionadas y encontradas para cada uno de los compuestos.

### VIII.7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Hubber, C., Fuchs, D., Hausen, A., Margreiter, R., Reibenegger, G., Spielberger, M. y Wachter, H., *J. Immunol.* **130**, 1047 (1983)
- 2.- Fuchs, D., Kramer, A., Reibenegger, G., Werner, E.R., Dierich, M.P., Geodert, J.J y Wachter, H. *Infection* **19**, 598 (1991)
- 3.- Muller, M.M., Curtius, H., Herold, M., Huber, C.H., *Clin. Chim. Acta* **201**, 1 (1991)
- 4.- Han, F., Huynh, B. H., Shi, H., Lin, B., Ma, Y., *Anal. Chem.* **71**, 1265, (1999)
- 5.- Muller, M.M., Curtius, H., Herold, M., Huber, C.H., *Clin. Chim. Acta* **201**, 1, (1991)
- 6.- Salvatore, F., Colonna, A., Costanzo, F., Russo, T., Esposito, F., Cimino, F., *In Recent Results on Cancer Research*, Vol. **84**, Nass, G., Ed., Springer, New York, 1983
- 7.- Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibenegger, G., Wachter, H. *Clin. Chem.* **33**, 2028, (1987)
- 8.- Katritzky, A. R., Rees, C. W. *In Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Boulton, A.J. y Mckillop, A., Eds, Vol. 3, Pergamon Press, 1984
- 9.- Trehan, S. y Noronha, J. M., *J. Clin. Biochem, Nutr.* **14**, 195 (1993)
- 10.- Porcar, M., Bel, Y., Socha, R., Nemeč, V. y Ferre, J., *J. Chromatogr. A.*, **724** (1-2), 193 (1996)
- 11.- Hibiya, M., Teradaira, R., Sugimoto, T., Fujita, K., Nagatsu, T. *J. Chromatogr.B, Biomed-Appl.*, **672** (1), 143 (1995)
- 12.- Sawada, Y., Shintaku, H., et-al, *Gilson-Chromatogr.-Appl.*, **6** (2), 5 (1995)
- 13.- Palmisano, F., Rotunno, T., La- Sorsa, M., Zambonin, C.G., Abbate, I, *Analyst*, **120** (8), 2185 (1995)
- 14.- Huber, J.F.K., Lamprecht, G., *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, **666** (2), 223 (1995)
- 15.- Candito, M., Nagatsu, T., Chambon, P., Chatel, M. *J. Chromatogr.B, Biomed. Appl.* **657** (1), 61 (1994)
- 16.- Tani, Y., Ohno, T., *J. Chromatogr., Biomed. -Appl.*, **128**, 249 (1993)
- 17.- Palfrey, S.M., Labib, M.H. *Ann. Clin. Biochem.*, **30** (2), 209 (1993)

- 18.- Iizuka, T., Minatogawa, Y., Suzuki, H., Itoh, M., Nakamine, S., Hatanaka, Y., Uemura, S., Koike, M. *Clin.Chem* **39** (4), 600 (1993)
- 19.- Candito, M., Cavenel, C., Gugenheim, J., Mouiel, J., Parisot, F., Jacomet, Y., Sudaka, P. y Chambon, P., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **125**, 164 (1993)
- 20.- Slazyk, W.E. y Spierto, F.W., *Clin. Chem* **36** (7), 1364 (1990)
- 21.- Powers, A.G., Young, J.H. y Clayton, B.E., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **76**, 321 (1988)
- 22.- Murr, C., Bergant, A., Widschwendter, M., Heim, K., Schroecksnadel, H. y Fuchs, D., *Clin. Chem.* **45** (11), 1998 (1999)
- 23.- Solichova, D., Melichar, B., Svobodova, I., Blaha, V. y Zadak, Z., *Biomed. Chromatogr.* **13** (2), 117 (1999)
- 24.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Salinas, F., *Chromatographia*, **53**, 510 (2001)
- 25.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Salinas F., *J. of Pharm.l and Biomed. Analysis*, **17**, 1325 (1998)
- 26.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Galián, R., *Applied Spectroscopy*, **55** (6), 701 (2001)
- 27.- Fernández Álvarez, J.M., Costa García, A. y Tuñón Blanco, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7** (12), 1485 (1989)
- 28.- Nagatsu, T., Sawada, M., Yamaguchi, T., Sugimoto, T., Matsuura, S., Akino, M., Nakazawa, N. y Ogawa, H., *Anal. Biochem.* **141** (2), 472 (1984)
- 29.- Liao, K., Fu, M.G., Wan, Y.Q. y Yang, W.P., *Fenxi-Kexue-Xuebao.* **17** (1), 29 (2001)
- 30.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I. y Salinas, F., *Chromatographia*, **53**, 510 (2001)
- 31.- Cuadros Rodríguez, L., García Campaña, A.M., Jiménez Linares, C. y Román Ceba, M., *Anal. Lett.*, **26**, 1243 (1993)
- 32.- Trehan, S., Noronha, J.M., *J. Clin. Biochem, Nutr.*, **14**, 195 (1993)
- 33.- Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I., Zamora Madera, A., Pedano, L. y Ferreyra, C., *J. of Pharm. and Biomed. Analysis*, **29**, 851 (2002)
- 34.- Long, G.L. y Winerfordner, J.D., *Anal. Chem.*, **55**, 712A (1983)

- 35.- Clayton, C.A., Hines, J.W. y Elkins, P.D., *Anal. Chem.*, **59**, 2506 (1987)

## **CONCLUSIONES**

1.- Se ponen a punto tres métodos espectrofotométricos con diferente tratamiento de los datos analíticos, para la determinación de las mezclas triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico en fluidos biológicos (orina y suero humano). El primero de ellos consiste en la aplicación de la técnica de espectrofotometría de derivada, haciendo uso de los espectros derivados para resolver ambas mezclas. El segundo y tercer método espectrofotométrico consiste en la aplicación de métodos de calibración multivariante, concretamente aplicamos los algoritmos PLS (Partial Least Squares) y HLA (Hybrid Linear Analysis) los cuales utilizan el espectro completo de absorción de la mezcla de analitos.

2.- Observamos como se obtienen resultados más satisfactorios mediante la aplicación de métodos de análisis multivariante que mediante la técnica de espectros derivados. También comprobamos que dentro los métodos de calibración multivariante aplicados, se obtienen resultados ligeramente mejores para los parámetros estadísticos mediante HLA que con PLS.

El concepto de señal neta del analito (NAS), utilizado en HLA, nos permite el cálculo de los parámetros de calidad (selectividad, sensibilidad, sensibilidad analítica y límites de detección) útiles para la comparación de los métodos.

3.- El hecho de que los ácidos folínico y fólico originan derivados altamente fluorescentes en presencia de  $\text{KMnO}_4$  en un corto periodo de tiempo nos permite proponer métodos cinéticos fluorimétricos para la determinación de ambos analitos.

El ácido folínico ha sido determinado en orina mediante un método cinético convencional con resultados satisfactorios. En cuanto al ácido fólico, dada la elevada velocidad de la reacción se ha hecho uso de la técnica de flujo interrumpido para poder determinarlo mediante métodos cinéticos.

4.- Mediante electroforesis capilar se resuelven mezclas folatos y antifolatos, proponiéndose dos métodos diferentes. En uno de ellos se resuelve la mezcla formada por metotrexato, ácido folínico y ácido fólico, y el método propuesto se aplica a la determinación de estos analitos en orina con un paso previo de extracción en fase sólida utilizando cartuchos C-18 para la purificación de la muestra.

En cuanto a la otra mezcla resuelta es la formada por triamtereno, metotrexato y creatinina. La determinación de triamtereno y metotrexato se lleva a cabo previa dilución simple de la orina en agua (1:1) y la creatinina, utilizada como patrón normalizador en el análisis de orina, se determina con una dilución previa de la orina en agua (1:25).

En ambos casos, fue necesario hacer uso del método de adición patrón debido al efecto de matriz generado por la orina en la condiciones de trabajo.

5.- Mediante cromatografía líquida, y utilizando dos detectores en serie, uno fotométrico y otro fluorimétrico se establece un método para la determinación de creatinina, ácido folínico y algunas pteridinas marcadoras de procesos patológicos de proliferación celular, tales como ácido pterín-6-carboxílico, neopterín, xantopterín, isoxantopterín y biopterín, que están naturalmente presentes en la orina. Las muestras se someten previamente a un proceso de oxidación con  $I_2/KI$ , en medio básico, llevándose a cabo la cuantificación de creatinina mediante el detector fotométrico y el resto de los analitos mediante el detector fluorimétrico.

6.- Utilizando un agente oxidante más potente, como es el  $KMnO_4$  en medio ligeramente ácido, se propone un segundo método mediante cromatografía líquida que permite la determinación de creatinina, metotrexato y las pteridinas marcadoras ácido pterín-6-carboxílico, neopterín, isoxantopterín y biopterín. Este método se aplica con buenos resultados a la determinación de estos analitos en muestras de orina.

**PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO  
LUGAR LOS TRABAJOS RECOGIDOS  
EN ESTA MEMORIA**

1.- Título: “Determination of triamterene and leucovorin in biological fluids by UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration”.

Autores: Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A., Salinas López, F. y Rodríguez Gómez, M.J.

Revista: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27 (2002), 81-90

2.- Título: “Kinetic fluorimetric study of the oxidation reaction of folic acid (leucovorin) with potassium permanganate. Determination in human urine”

Autores: Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A., Salinas López, F. y Rodríguez Gómez, M.J.

Revista: Talanta, 55 (2001), 623-630

3.- Título: “Comparison of UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration for determination of methotrexate and leucovorin in biological fluids”

Autores: Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A., Salinas López, F. y Rodríguez Gómez, M.J.

Revista: Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002), 251-258

4.- Título: “Selection of the wavelength range and spectrophotometric determination of leucovorin and methotrexate in human serum by a net analyte signal based method”

Autores: Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I., Rodríguez Gómez, M.J., Muñoz de la Peña, A. y Salinas López, F.

Revista: Talanta, 58 (2002), 255-263

5.- Título: “Direct capillary electrophoretic determination of methotrexate, leucovorin and folic acid in human urine”

Autores: Rodríguez Flores, J., Castañeda Peñalvo, G., Espinosa Mansilla, A. y Rodríguez Gómez, M.J..

Revista: Enviado a Journal of Separation Science

**INDICE**

**Capítulo I.- Introducción. Naturaleza de los compuestos pteridínicos y revisión bibliográfica.**

**Aparatos y reactivos**

I.1.- Características del ácido fólico .....14 -17

    I.1.1.- Métodos más comunes para la determinación del ácido fólico.....17-23

I.2.- Características del metotrexato .....23-28

    I.2.1.- Métodos más comunes para la determinación del metotrexato.....28-34

I.3.- Características del ácido folínico o leucovorín.....34-35

    I.3.1.- Métodos más comunes para la determinación del ácido folínico.....35-41

I.4.- Características del triamtereno.....42

    I.4.1.- Métodos más comunes para la determinación de triamtereno.....42-49

I.5.- Aparatos y reactivos utilizados en el desarrollo de la Memoria

    I.5.1. Aparatos.....50-52

    I.5.2. Reactivos.....52-56

I.6. Bibliografía.....57-70

**Capítulo II.- Estudios espectrofotométricos y espectrofluorimétricos básicos de ácido folínico, metotrexato, ácido fólico y triamtereno**

II.1.- Estudios de las propiedades analíticas del ácido folínico

    II.1.1.- Estudio espectrofotométrico del ácido folínico.....72-76

    II.1.2.- Estudio espectrofluorimétrico del ácido folínico.....77-81

II.2.- Estudio de las propiedades analíticas del metotrexato

    II.2.1.- Estudio espectrofotométrico del metotrexato.....82-84

    II.2.2.- Estudio espectrofluorimétrico del metotrexato.....84-89

II.3.- Estudio de las propiedades analíticas del ácido fólico

    II.3.1.- Estudio espectrofotométrico del ácido fólico.....89-92

    II.3.2.- Estudio espectrofluorimétrico del ácido fólico.....92-96

II.4.- Estudio de las propiedades analíticas del triamtereno

    II.4.1.- Estudio espectrofotométrico del triamtereno.....97-99

    II.4.2.- Estudio espectrofluorimétrico del triamtereno.....99-104

II.5. Bibliografía.....105

**Capítulo III.- Aplicación de la técnica de espectrofotometría de derivadas al análisis de triamtereno, ácido folínico y metotrexato**

III.1.- Introducción a la técnica de espectroscopía de derivadas

- III.1.1.- Concepto, origen y desarrollo.....107-111
- III.1.2. Instrumentación.....111-112
- III.1.3.- Registro y características de los espectros derivados.....112-115
- III.1.4.- Ventajas de la espectroscopía de derivadas.....115-117
- III.1.5.- Métodos para resolver mezclas.....117-123
- III.1.6.- Factores que influyen en los espectros derivados.....124-126
- III.1.7.- Selección del orden de derivada.....126
- III.1.8. Aplicaciones.....127-133

III.2.- Resolución mediante primera derivada de mezclas binarias de triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico.....134-137

- III.2.1.- Influencia del pH.....137-141
- III.2.2.- Selección de las condiciones instrumentales.....141-145
- III.2.3.- Selección de las longitudes de onda de medida.....145-150

III.2.4.- Influencia de la concentración. Calibración lineal univariante. Parámetros analíticos.....	151-156
III.3.- Resolución de mezclas sintéticas de triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico.....	156-159
III.4. Aplicaciones.....	160-167
III.5. Bibliografía.....	168-171

**Capítulo IV.- Determinación simultánea de triamtereno, ácido folínico y metotrexato mediante análisis multivariante PLS.**

IV.1.- Introducción al análisis multivariante.....	173-187
IV.1.1.- Antecedentes bibliográficos.....	187-195
IV.2.- Resolución de las mezclas triamtereno-ácido folínico y metotrexato-ácido folínico mediante análisis multivariante	
IV.2.1.- Diseño y optimización de la matriz de calibrado para la determinación de triamtereno-ácido folínico.....	197-198
IV.2.2.- Aplicación de PLS-1 a la mezcla triamtereno-ácido folínico.....	199-210
IV.2.3.- Diseño y optimización de la matriz de calibrado para la determinación de metotrexato-ácido folínico.....	211-219
IV.2.5.- Aplicación de los modelos PLS optimizados.....	220-238
IV.3. Bibliografía.....	239-243

**Capítulo V.- Determinación simultánea de ácido folínico y metotrexato mediante análisis multivariante HLA**

V.1.- Introducción

V.1.1.- HLA (Hybrid Linear Analysis) como un nuevo algoritmo en análisis multivariante.....245-246

V.1.2.- Concepto de señal neta del analito (NAS).....246-251

V.1.3.- Selectividad, sensibilidad y límites de detección.....251-253

V.1.4. Aplicaciones.....253-256

V.2.- Determinación simultánea de ácido folínico y metotrexato en suero mediante HLA.....256-258

V.2.1.- Optimización de la matriz de calibración.....258-259

V.2.2.- Selección del intervalo de longitudes de onda y del número de factores del modelo.....260-265

V.2.3.- Parámetros estadísticos optimizados para el modelo HLA/GO.....265-266

V.2.4.- Parámetros de calidad del modelo.....267-269

V.2.5.- Análisis de muestras de suero.....269-272

V.3.- Determinación simultánea de ácido folínico y metotrexato en orina mediante HLA.....272-276

V.4. Bibliografía.....277-278

**Capítulo VI.- Estudios cinéticos de la oxidación de los ácidos folínico y fólico**

VI.1.- Características generales de los métodos cinéticos de análisis.....280-283

    VI.1.1.- Instrumentación en los métodos cinéticos de análisis.....283-286

    VI.1.2.- Precisión en los métodos cinéticos de análisis.....286

    VI.1.3. Aplicaciones.....287-288

VI.2.- Determinación cinética-fluorimétrica de ácido folínico.....288-289

    VI.2.1.- Influencia del pH en la determinación cinética de ácido folínico.....289-291

    VI.2.2.- Influencia de la concentración de NaOH.....292-294

    VI.2.3.- Influencia de la concentración de  $\text{KMnO}_4$  sobre la cinética de oxidación del ácido folínico en medio NaOH.....295-298

    VI.2.4.- Influencia de la temperatura.....298-300

    VI.2.5.- Rectas de calibrado del ácido folínico.....301-306

    VI.2.6.- Cálculo de la energía de activación.....306-308

    VI.2.7.- Repetitividad y seguridad del método.....308-309

    VI.2.8.- Método propuesto.....309-310

    VI.2.9.- Estudios de distintos interferentes en la determinación cinética del ácido folínico.....310-312

VI.2.10.- Análisis de ácido folínico en orina humana.....	313-315
VI.3.- Determinación cinética mediante flujo interrumpido del ácido fólico	
VI.3.1.- Técnica de flujo detenido o stopped-flow.....	316-319
VI.3.2.- Estudio cinético-fluorimétrico de la reacción de ácido fólico con $\text{KMnO}_4$ mediante la técnica de flujo detenido.....	320-321
VI.3.2.1.- Influencia del pH.....	321-322
VI.3.2.2.- Influencia de la concentración de tampón.....	322-324
VI.3.2.3.- Influencia de la concentración de $\text{KMnO}_4$ sobre la cinética de oxidación del ácido fólico en medio ácido.....	324-326
VI.3.2.4.- Influencia de la temperatura.....	326-328
VI.3.2.5.- Recta de calibrado del ácido fólico.....	328-331
VI.3.2.6.- Repetitividad y seguridad del método.....	331-332
VI.3.2.7.- Método propuesto.....	333-354
VI.3.2.8.- Estudio de distintos interferentes en la determinación cinética del ácido fólico.....	334-336
VI.4. Bibliografía.....	337-338

**Capítulo VII.- Determinación mediante electroforesis capilar de ácido fólico, metotrexato, ácido folínico, triamtereno y creatinina**

VII.1. Introducción.....340-358

VII.2.- Determinación de ácido folínico, metotrexato y ácido fólico en orina mediante electroforesis capilar

    VII.2.1.- Influencia del pH del medio.....359-360

    VII.2.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación.....360-362

    VII.2.3.- Estudio de la influencia del voltaje.....363-365

    VII.2.4.- Influencia de la temperatura.....365-367

    VII.2.5.- Influencia del tiempo de inyección de la muestra.....367-370

    VII.2.6.- Condiciones químicas e instrumentales finales.....371-372

    VII.2.7.- Determinación de metotrexato, ácido folínico y ácido fólico en orina.....373-380

    VII.2.8.- Calibrado y estudio estadístico.....381-390

    VII.2.9 .Repetitividad.....391

    VII.2.10.- Aplicación al análisis de orina.....391-394

    VII.2.11.- Influencia de la presencia de otros principios activos.....395-396

VII.3.- Determinación de triamtereno y metotrexato en orina mediante electroforesis capilar

    VII.3.1.- Estudios preliminares.....397-398

VII.3.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación.....	398-399
VII.3.3.- Influencia del tiempo de inyección de la muestra.....	399-400
VII.3.4.- Influencia de la temperatura.....	400-401
VII.3.5.- Influencia del voltaje.....	401-402
VII.3.6.- Condiciones químicas e instrumentales finales.....	403-404
VII.3.7.- Calibrado y estudio estadístico.....	404-412
VII.3.8. Retitividad.....	413
VII.4.- Determinación de creatinina en orina mediante electroforesis capilar de zona	
VII.4.1.- Estudios preliminares.....	414-417
VII.4.2.- Influencia de la concentración del tampón de separación.....	417-418
VII.4.3.- Influencia del tiempo y de la temperatura de inyección.....	419-421
VII.4.4.- Influencia del voltaje sobre la determinación de creatinina.....	421-422
VII.4.5.- Condiciones químicas e instrumentales finales.....	423-424
VII.4.6.- Calibrado y estudio estadístico.....	424-428
VII.4.7. Repetitividad.....	428
VII.4.8.- Influencia de la presencia de otros principios activos.....	429-431
VII.4.9.- Inyección por el lado corto del capilar.....	432-433

VII.4.10.- Límites de detección y cuantificación.....	434-435
VII.4.11.- Aplicación al análisis.....	435-437
VII.5. Bibliografía.....	438-440
<b>Capítulo VIII.- Estudios cromatográficos de ácido folínico, metotrexato, las pteridinas marcadoras: ácido pterín-6-carboxílico, neopterín, xantopterín, isoxantopterín, biopterín y creatinina como patrón normalizador</b>	
VIII.1. Introducción.....	442
VIII.2.- Características de las pteridinas.....	442-449
VIII.3.- Consideraciones generales del comportamiento de las pteridinas marcadoras, creatinina, metotrexato y ácido folínico en un sistema cromatográfico.....	450-452
VIII.3.1.- Estudios previos sobre el comportamiento cromatográfico de creatinina, metotrexato y ácido folínico.....	453-458
VIII.3.2.- Separación y determinación de creatinina, neopterín, xantopterín, isoxantopterín, biopterín, ácido folínico y metotrexato. Detección fotométrica....	458-467
VIII.3.3.- Separación y determinación de los analitos en estudio utilizando detección en serie fotométrica y fluorimétrica.....	468-478
VIII.3.4.- Seguimiento cromatográfico de la oxidación de ácido folínico y metotrexato para originar derivados fluorescentes mediante el método Trehan. Detección fotométrica.....	479-490

VIII.4.- Estudio cromatográfico de la separación de ácido folínico y metotrexato en presencia de pteridinas mediante el método Trehan, utilizando dos detectores en serie fotométrico-fluorimétrico.....	491-499
VIII.4.1.- Influencia de la mezcla oxidante.....	499-501
VIII.4.2.- Parámetros cromatográficos.....	502
VIII.4.3.- Rectas de calibrado y parámetros estadísticos y analíticos de interés.....	503-510
VIII.4.4.- Repetitividad y seguridad del método.....	511-512
VIII.5.- Aplicación al análisis de orina.....	513-514
VIII.5.1.- Procedimiento para la determinación de ácido folínico y pteridinas previa oxidación según Trehan en muestras de orina.....	514-517
VIII.6.- Estudio cromatográfico de la oxidación de metotrexato con $\text{KMnO}_4$ en presencia de pteridinas. Determinación en orina.....	518-522
VIII.6.1.- Influencia de la concentración de $\text{KMnO}_4$ sobre el área de pico del MTX oxidado.....	522-524
VIII.6.2.- Influencia del tiempo de oxidación sobre el área de pico de MTX y de su derivado oxidado (MTX') para distintas concentraciones de $\text{KMnO}_4$ .....	524-526
VIII.6.3.- Determinación conjunta de MTX y pteridinas.....	527-531
VIII.6.4.- Rectas de calibrado.....	532-535

VIII.6.5.- Repetitividad y seguridad del método.....	536-539
VIII.6.6.- Aplicación del método propuesto al análisis de orina.....	540-552
VIII.7 .Bibliografía.....	553-555
CONCLUSIONES.....	557-559
PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR LOS TRABAJOS RECOGIDOS EN ESTA MEMORIA.....	561-562